ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Jeremías
Bayón Lorenzo

Tesis doctoral

Papel de las ciclofilinas en la enfermedad aterosclerótica

Lugo, 2023

Programa de doctorado en Investigación Básica y Aplicada en Ciencias Veterinarias

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

Papel de las ciclofilinas en la enfermedad aterosclerótica

Jeremías Bayón Lorenzo

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN CIENCIAS VETERINARIAS.

Lugo

2023

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

D. Jeremías Bayón Lorenzo

Título de la tesis: Papel de las Ciclofilinas en la enfermedad aterosclerótica.

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.

2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.

3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Lugo, a 30 de Junio del 2023.

Fdo: Jeremías Bayón Lorenzo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Papel de las Ciclofilinas en la enfermedad aterosclerótica

Dª. María Amparo Alfonso Rancaño (Directora)

D. Carlos González Juanatey (Director)

D. José Manuel Cifuentes Martínez (Tutor)

INFORMAN:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D. Jeremías Bayón Lorenzo, bajo su dirección/tutorización, y autorizan su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como directores de esta no incurren en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

De acuerdo con lo indicado en el Reglamento de Estudios de Doctorado, declaran también que la presente tesis doctoral es idónea para ser defendida en base a la modalidad de COMPENDIO DE PUBLICACIONES, en los que la participación del doctorando fue decisiva para su elaboración y las publicaciones se ajustan al Plan de Investigación.

En Lugo, 30 de junio de 2023

María Amparo Alfonso Rancaño	Carlos González Juanatey	José Manuel Cifuentes Martínez
(Directora)	(Director)	(Tutor)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis Doctoral, Amparo y Carlos, por animarme a ser cada día un poco mejor.

A todo el personal del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo y del Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de Lugo.

A mis padres Sonia y Alberto, por apoyarme siempre. A mi hermano Diego, un luchador que me inspira.

A mis hijos Jimena y Martín, por perdonarme esas horas en las que no pude jugar con ellos.

A Laura, por tanto y por siempre.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ACV: Accidente Cerebrovascular

aGLP1: agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1)

Apo B: Apolipoproteína B

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ASA: Amiloide Sérico A

BNP: Péptido Natriurético tipo B

CETP: Proteína de Transferencia de Colesterolester

CK-MB: Subunidad de Creatinquinasa

Cyp: Ciclofilina

DM: Diabetes melitus

DOD: Daño de órgano diana

EA: Enfermedad ateroesclerótica

EAC: Enfermedad arterial coronaria

EAS: European Atherosclerosis Society

ECV: enfermedad cardiovascular

EMMPRIN: Inductor de metaloproteinasas de matriz extracelular

ERC: Enfermedad renal crónica

ESC: European Society of Cardiology

HbA1c: Glucohemoglobina

HDL-c: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad

HF: Hipercolesterolemia familiar

HTA: Hipertensión Arterial

IAM: Infarto Agudo de Miocardio

ICAM: Molécula de adhesión intercelular

IDL-c: Lipoproteínas de densidad intermedia

IFN: Interferón

IL: Interleucina

IMC: Índice de Masa Corporal

iSGLT2: Inhibidores del cotransportador 2 de sodio y glucosa

USC DE COMPOSTELA

LDL-c: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad

Lp(a): Lipoproteína a

MCP-1: Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1

M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos

MEC: Matriz Extracelular

MMP: Metaloproteinasa de Matriz

MPO: Mieloperoxidasa

mPTP: poro de transición de permeabilidad mitocondrial.

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

NYHA: New York Heart Association

NO: Óxido Nítrico

NOS: óxido Nítrico Sintetasa

NT-ProBNP: Propéptido Natriurético tipo B N-terminal

OMS: Organización Mundial de la Salud

OR: Odds Ratio

PA: Presión arterial

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PCR: Proteina C Reactiva

PCR-hs: Proteina C reactiva alta sensibilidad

PIB: Producto Interior Bruto

PPIasas: Peptidil-Protil cis/trans isomerasas

ROS: especies reactivas de oxígeno

TAPD: Tratamiento antiagregante plaquetario doble

TGF: Factor de crecimiento transformante

TIMI: Escala flujo coronario según Thrombolysis in Myocardial Infarction

TF: Factor Tisular

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

VCAM: Molécula de adhesión de células vasculares

VLDL-c: Lipoproteínas de muy baja densidad

VSMC: Células musculares lisas vasculares

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

RESUMEN..... 1

1. INTRODUCCIÓN..... 7

1.1 Enfermedad Coronaria: epidemiología y factores de riesgo cardiovascular 9

1.2 Inflamación y fisiopatología en la enfermedad coronaria 27

1.3 Principales biomarcadores cardiacos y su relación con la enfermedad coronaria 34

2. OBJETIVO..... 59

3.MATERIAL Y MÉTODOS 63

4.- RESULTADOS-PUBLICACIONES 73

4.1 SECCIÓN I.-Ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad arterial coronaria

I.1. High Serum Cyclophilin C levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease..... 77

I.2.Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences Between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients..... 93

I.3. Increase of serum cyclophilin C levels in the follow-up of coronary artery disease: A biomarker and possible clinical predictor..... 105

4.2 SECCIÓN II.-Asociación de ciclofilinas con factores de riesgo aterosclerótico

II.1-Association of cyclophilins and cardiovascular risk factors in coronary artery disease..... 115

5.- DISCUSIÓN..... 131

6.- CONCLUSIONES..... 147

7.- BIBLIOGRAFÍA..... 151

8.- ANEXOS..... 183

ANEXO I. DECLARACIONES..... 185

ANEXO II. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS..... 187

ANEXO III. INFORMES COMITÉ ÉTICA..... 197

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares son causa de una alta morbilidad y mortalidad en los países desarrollados. La incidencia de estas patologías aumenta con la presencia de factores de riesgo asociados como son las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, entre las que destaca la enfermedad arterial coronaria (EAC). Esta enfermedad se define como un proceso inflamatorio crónico de la pared vascular. En los últimos 10 años la familia de proteínas peptidil-prolil cis-trans isomerasas se ha relacionado con la inflamación asociada a diversas enfermedades cardiacas y vasculares incluyendo la aterosclerosis. Dentro de esta familia, las ciclofilinas (Cyps) parecen desempeñar un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la evolución de la placa de ateroma, lo que las convierte en interesantes dianas terapéuticas. Hasta ahora, cuatro isoformas se han relacionado con las enfermedades cardiovasculares, siendo la más estudiada la ciclofilina A cuyos niveles parece que comienzan a aumentar antes de cualquier manifestación clínica. En esta tesis, se pretende estudiar el perfil de cuatro isoformas (CypA, CypB, CypC y CypD) y de marcadores de la inflamación en muestras de pacientes con EAC aguda y crónica con y sin factores de riesgo asociados, con el fin de establecer nuevos biomarcadores relacionados con esta enfermedad. Se observa que los niveles séricos de CypA, CypB y CypC, IL-1β e IL-6 fueron significativamente más altos en pacientes con EAC. El análisis de correlación bivariada reveló una correlación positiva significativa entre Cyps y varios parámetros sanguíneos y bioquímicos. Cuando se evaluó la capacidad de los niveles de Cyps para el diagnóstico de EAC, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad más altos con CypC (estadístico c 0,891), lo que indica que CypC es un buen marcador de EAC, mientras que se obtuvieron resultados menos concluyentes con CypA (estadístico c 0,748) y CypB (estadístico c 0,655). Además, se observaron correlaciones significativas de los factores de riesgo tradicionales de EAC y CypC. Asimismo, se compararon los niveles de Cyps y mediadores inflamatorios entre el grupo de EAC aguda y EAC crónica con los sujetos control. Los niveles de CypA aumentaron significativamente en los pacientes con EAC en comparación con los sujetos de control, pero no se observaron diferencias entre los pacientes con EAC aguda (7,80 ±1,30 ng/mL) y los pacientes con EAC crónica (5,52 ±1 0,76 ng/mL). No se mostraron diferencias en los niveles de CypB y CypD entre pacientes con EAC y controles y entre pacientes con EAC aguda y EAC crónica. En relación con CypC, los niveles en pacientes con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

EAC fueron significativamente más altos en comparación con los controles (32,42 ±3,71 pg/mL vs. 9,38 ± 1,51 pg/mL), pero no se obtuvieron diferencias entre los grupos de EAC aguda y EAC crónica.

Por otro lado, se ha realizado un seguimiento durante 12 meses a los pacientes analizando las Cyps para evaluar su capacidad diagnóstica a lo largo del tiempo. Se demostró que los niveles séricos de CypC aumentaron gradualmente en pacientes con EAC (30,63 pg/mL ± 3,77 al inicio, 38,70 pg/mL ± 6,41 a los 6 meses y 47,27 pg/mL ± 5,65 a los 12 meses). Además, los niveles séricos de CypC durante el seguimiento fueron un predictor significativo de EAC (Estadístico-C 0,76 a los 6 meses y 0,89 a los 12 meses). A pesar de ello, no hubo asociación significativa entre CypC y eventos cardiovasculares, pero los niveles séricos de CypC tendieron a ser más altos en pacientes que sufrieron eventos cardiovasculares durante el seguimiento (29,02 pg/mL ± 6,39 vs. 79,96 pg/mL ± 22,18). En este sentido, los niveles plasmáticos de Proteína C Reactiva de alta sensibilidad (PCR-hs) > 2,3 mg/L junto con los de NT-proBNP > 300 pg/mL fueron predictores significativos de eventos cardiovasculares durante el seguimiento en pacientes con EAC con niveles de CypC > 17,5 pg/mL.

Finalmente se ha analizado la relación de las Cyps con los factores de riesgo cardiovascular clásico. El estudio revela que la CypA y CypC están elevadas en pacientes con EAC independientemente de la presencia de factores de riesgo. Además, la CypB está elevada en pacientes varones con HTA, DM tipo 2 o niveles elevados de glucosa. Asimismo, CypA, CypB y CypC se correlacionaron significativamente con factores de riesgo cardiovascular, pero solo la CypB se asoció con la DM tipo 2. El análisis multivariante refuerza el valor predictivo de enfermedad coronaria de CypA (>8,2 ng/mL) y CypC (>17,5 pg/mL) junto con factores de riesgo cardiovascular como el tabaco, HTA, dislipidemia y niveles elevados de glucosa y colesterol. Además, el riesgo de enfermedad arterial coronaria aumenta en presencia de niveles de CypB por encima de 63,26 pg/mL y con hipertensión o dislipidemia en pacientes masculinos.

En resumen, las Cyps, y sobre todo la CypA, La CypB y la CypC se correlacionan con EAC. De hecho, niveles de CypC en suero mayores de 17,5 pg/mL discriminan los pacientes de EAC aguda y constituyen un buen biomarcador de enfermedad. Además, tanto la CypA como la CypC se correlacionan con marcadores inflamatorios y con factores de riesgo cardiovascular. La CypC junto con la PCR y el NT-proBNP son buenos biomarcadores de pronóstico de eventos cardiovasculares a 12 meses. La CypB también esta elevada en pacientes varones con EAC y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

se correlaciona con factores de riesgo como la dislipidemia, la hipertensión y sobre todo la DM tipo 2.

SUMMARY

Cardiovascular diseases are a cause of high morbidity and mortality in developed countries. The incidence of these diseases increases with the presence of associated risk factors, such as inflammatory and autoimmune diseases, most remarkably coronary artery disease (CAD). This disease is defined as a chronic inflammatory condition of the vascular wall. In the past 10 years the peptidyl-prolyl cis-trans isomerases family has been related to the inflammation associated with several heart and vascular diseases, including atherosclerosis. In this family, cyclophilins appear to play a key role both in the development and the evolution of the atheromatous plaque, which makes them interesting therapeutic targets. To date, four isoforms have been related to cardiovascular diseases, the most studied being cyclophilin A, with levels that appear to start to increase before any clinical sign. In this thesis, it is intended to study the profile of these four isoforms (CypA, CypB, CypC and CypD) and inflammation markers in samples of patients with acute CAD and chronic CAD with or without risk factors for the purpose of establishing new biomarkers related to this disease. Serum levels of CypA, CypB and CypC, IL-1β and IL-6 were significantly higher in patients with CAD. The analysis of bivariate correlation evidenced a significant positive relationship between Cyps and several blood and biochemical parameters. When the capacity of Cyps levels for the diagnosis CAD, higher sensitivity and selectivity values were obtained with CypC (statistic c 0.891), which indicates that it is a good CAD marker, while less conclusive results were obtained with CypA (statistic c 0.748) and CypB (statistic c 0.655). In addition, significant correlations of traditional risk factors for CAD and CypC were observed. The Cyps and inflammatory mediators were compared between the group of acute CAD and chronic CAD vs the controls. Cyp A levels increased significantly in patients with CAD compared to the control subjects, but no differences were observed between the patients with acute CAD (7.80 ±1.30 ng/mL) and patients with chronic CAD (5.52 ±1 0.76 ng/mL) . No differences were shown in CypB and CypD levels between patients with CAD and controls and between patients with acute CAD and chronic CAD. In relation to CypC, the levels in patients with CAD were significantly higher as compared to the controls (32.42 ±3.71 pg/mL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

vs 9.38 ±1.51 pg/mL), but no differences were obtained between the groups of acute CAD and chronic CAD.

On the other hand, the patients were monitored for 12 months, analyzing cyclophilins to evaluate their diagnostic capacity over time. It was shown that CypC serum levels increased gradually in patients with CAD (30.63 pg/mL ±3.77 at the start, 38.70 pg/mL ±6.41 at 6 months and 47.27 pg/mL ±5.65 at 12 months). In addition, CypC serum levels during the follow-up were a significant predictor of CAD (Statistic-C 0.76 at 6 months and 0.89 at 12 months; $p < 0.001$). Despite this, there was no significant association between CypC and cardiovascular events, but CypC serum levels were generally higher in patients who experienced cardiovascular events during the follow-up (29.02 pg/mL ± 6.39 vs 79.96 pg/mL ±22.18). With this regard, the plasma levels of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) > 2.3 mg/L plus NT-proBNP > 300 pg/mL together with significant predictors of cardiovascular events during the follow-up in patients with CAD with CypC levels > 17.5 pg/mL .

Finally, the relationship between cyclophilins and classical cardiovascular risk factors has been studied. This study shows that CypA and CypC are high in patients, regardless of the presence of risk factors. In addition, CypB is high in male patients with hypertension, type 2 DM or high glucose levels. In addition, CypA, CypB and CypC were significantly related to cardiovascular factors, but only CypB was associated with type 2 diabetes. The multivariate analysis reinforces the predictive value of the presence of coronary disease of CypA (>8.2 ng/mL) and CypC (>17.5 pg/mL) together with cardiovascular risk factors, such as smoking, hypettension, dyslipidemia and high levels of glucose and cholesterol. In addition, the risk of coronary artery disease increases in the presence of CypB levels above 63.26 pg/mL and with hypertension or dyslipidemia in male patients.

In summary, Cyps, and especially CypA, CypB and CypC correlate with EAC. In fact, serum CypC levels > 17.5 pg/mL discriminate patients with acute CAD and constitute a good CAD biomarker. Furthermore, both CypA and CypC correlate with inflammatory markers and cardiovascular risk factors. CypC together with CRP and NT-proBNP are good prognostic biomarkers of cardiovascular events at 12 months. CypB is also elevated in male patients with CAD and is correlated with risk factors such as dyslipidemia, hypertension, and especially type 2 DM.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

RESUMO

As enfermidades cardiovasculares son causa dunha alta morbilidade e mortalidade nos países desenvolvidos. A incidencia destas patoloxías aumenta coa presenza de factores de risco asociados como son as enfermidades inflamatorias e autoinmunes, entre as que destaca a enfermidade arterial coronaria (EAC). Esta enfermidade defínese como un proceso inflamatorio crónico da parede vascular. Nos últimos 10 anos a familia de proteínas peptidil-prolil cis-trans isomerasas relacionouse coa inflamación asociada a diversas enfermidades cardíacas e vasculares incluíndo a aterosclerosis. Dentro desta familia, as ciclofilinas (Cyps) parecen desempeñar un papel fundamental tanto no desenvolvemento como na evolución da placa de ateroma, o que as converte en interesantes dianas terapéuticas. Ata o de agora, catro isoformas relacionáronse coas enfermidades cardiovasculares, sendo a máis estudada a ciclofilina A cuxos niveis parece que comezan a aumentar antes de calquera manifestación clínica. Nesta tese, preténdese estudar o perfil de catro isoformas (CypA, CypB, CypC e CypD) e de marcadores da inflamación en mostras de pacientes con EAC aguda e crónica con e sen factores de risco asociados co fin de establecer novos biomarcadores relacionados con esta enfermidade. Obsérvase que os niveis séricos de CypA, CypB e CypC, IL-1β e IL-6 foron significativamente máis altos en pacientes con EAC. A análise de correlación bivariada revelou unha correlación positiva significativa entre Cyps e varios parámetros sanguíneos e bioquímicos. Cando se avaliou a capacidade dos niveis de Cyps para o diagnóstico de EAC, obtivéronse valores de sensibilidade e especificidade máis altos con CypC (estatístico c 0,891), o que indica que CypC é un bo marcador de EAC, mentres que se obtiveron resultados menos concluíntes con CypA (estatístico c 0,748) e CypB (estatístico c 0,655). Ademais, observáronse correlacións significativas dos factores de risco tradicionais de EAC e CypC. Así mesmo, comparáronse os niveis de Cyps e mediadores inflamatorios entre o grupo de EAC aguda e EAC crónica co suxeitos control. Os niveis de CypA aumentaron significativamente nos pacientes con EAC en comparación cos suxeitos de control, pero non se observaron diferenzas entre os pacientes con EAC aguda (7,80 ±1,30 ng/mL) e os pacientes con EAC crónica (5,52 ±1 0,76 ng/mL). Non se mostraron diferenzas nos niveis de CypB e CypD entre pacientes con EAC e controis e entre pacientes con EAC aguda e EAC crónica. En relación con CypC, os niveis en pacientes con EAC foron significativamente máis altos en comparación cos controis (32,42 ±3,71 pg/mL vs. 9,38 ± 1,51 pg/mL), pero non se obtiveron diferenzas entre os grupos de EAC aguda e EAC crónica.

USC DE COMPOSTELA

Doutra banda, realizouse un seguimento durante 12 meses aos paciente analizando as Cyps para avaliar a súa capacidade diagnóstica ao longo do tempo. Demostrouse que os niveis séricos de CypC aumentaron gradualmente en pacientes con EAC (30,63 pg/mL ± 3,77 ao comezo, 38,70 pg/mL ± 6,41 aos 6 meses] e 47,27 pg/mL ± 5,65 aos 12 meses). Ademais, os niveis séricos de CypC durante o seguimento foron un predictor significativo de EAC (Estatístico-C 0,76 aos 6 meses e 0,89 aos 12 meses). A pesar diso, non houbo asociación significativa entre CypC e eventos cardiovasculares, pero os niveis séricos de CypC tenderon a ser máis altos en pacientes que sufriron eventos cardiovasculares durante o seguimento (29,02 pg/mL ± 6,39 vs. 79,96 pg/mL ± 22,18; p = 0,029). Neste sentido, os niveis plasmáticos de Proteína C Reactiva de alta sensibilidade (PCR-hs) > 2,3 mg/L xunto cos de NT-proBNP > 300 pg/mL foron predictores significativos de eventos cardiovasculares durante o seguimento en pacientes con EAC con niveis de CypC > 17,5 pg/mL.

Finalmente, analizouse a relación das Cyps cos factores de risco cardiovascular clásico. O estudo revela que a CypA e CypC están elevadas en pacientes con EAC independentemente da presenza de factores de risco. Ademais, a CypB está elevada en pacientes homes con HTA, DM tipo 2 ou niveis elevados de glicosa. Ademais, CypA, CypB e CypC correlacionaronse significativamente con factores de risco cardiovascular, pero só a CypB asociouse coa DM tipo 2. A análise multivariante reforza o valor preditivo de enfermidade coronaria de CypA (>8,2 ng/mL) e CypC (>17,5 pg/mL) xunto con factores de risco cardiovascular como o tabaco, HTA, dislipidemia e niveis elevados de glicosa e colesterol . Ademais, o risco de enfermidade arterial coronaria aumenta en presenza de niveis de CypB por encima de 63,26 pg/mL e con hipertensión ou dislipidemia en pacientes masculinos.

En resumo, as Cyps, e sobre todo a CypA, CypB e a CypC correlacionanse con EAC. De feito, niveis de CypC en soro maiores de 17,5 pg/mL discriminan os pacientes de EAC aguda e constitúen un bo biomarcador de enfermidade. Ademais, tanto a CypA como a CypC se correlacionan con marcadores inflamatorios e con factores de risco cardiovascular. A CypC xunto coa PCR e a NT-proBNP son bos biomarcadores de prognóstico de eventos cardiovasculares a 12 meses. A CypB tamén esta elevada en pacientes homes con EAC e se correlaciona con factores de risco como a dislipidemia, a hipertensión e sobre todo a DM tipo 2.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.- INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.- INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CORONARIA: EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

1.1.1 Epidemiología

Se estima, en términos absolutos, que las enfermedades cardiovasculares causan aproximadamente un tercio de las muertes en todo el mundo (1). Esta afirmación se realiza a partir del conjunto de datos de "Global Burden of Disease" que se actualiza activamente en función de datos de investigación, de estudios epidemiológicos publicados y de publicaciones gubernamentales de más de 90 000 fuentes, construyendo modelos y estimaciones estadísticas. De esta forma se define la pérdida de salud debido a enfermedades, lesiones y factores de riesgo. Anualmente, el "Global Burden of Disease" proporciona medidas de prevalencia, incidencia, muerte y años de vida perdidos, ajustados por discapacidad, y de esta forma se estima la carga general de la cardiopatía isquémica. Basado en áreas geográficas, el "Global Burden of Disease" divide el mundo en cuatro regiones: Asia, Europa, América y África. Además, se analizan los datos de todos los países ajustados por edad para comparar las tasas anuales, para compensar los posibles efectos de los cambios en la estructura y el envejecimiento de la población. En base a esos datos, la cardiopatía isquémica, constituye en el mundo desarrollado la primera causa de muerte y una demanda de recursos económicos y sociales que han permanecido constantes a lo largo de los últimos años (2). Además, un número cada vez mayor de personas con cardiopatía isquémica, vive con discapacidades crónicas y una calidad de vida deteriorada (3).

Entre todo el espectro de la enfermedad cardiovascular, la cardiopatía isquémica es la más prevalente, afectando a alrededor de 126 millones de personas en todo el mundo (1.655 casos por 100.000 habitantes), lo que se estima en el 1,72% de la población mundial. Hasta el año 2017, se atribuye alrededor de nueve millones de muertes a la cardiopatía isquémica, lo que la convierte en la principal causa de mortalidad en toda la población del primer mundo (4). Por lo tanto, la cardiopatía isquémica es la primera causa de mortalidad prematura en todo el mundo occidental y ha mantenido esta posición durante décadas, aunque con variaciones considerables entre regiones. Si bien la cardiopatía isquémica continúa aumentando en términos de números absolutos, las tasas ajustadas por edad muestran evidencia de una disminución en los últimos

UCC UNIVERSIDAD

años (5). A pesar de todo, la rápida urbanización y globalización en los países de bajos y medianos ingresos ha llevado a una disminución en las muertes y discapacidades relacionadas con enfermedades no transmisibles como la cardiopatía isquémica (3).

Los pronósticos, en cuanto a la tendencia al alza de la cardiopatía isquémica basados en modelos predictivos, indican que para 2030, la prevalencia de la enfermedad coronaria podría aumentar a más de 1845 casos por 1000 000 habitantes. El género masculino es un factor de riesgo bien conocido y, en consecuencia, la prevalencia de cardiopatía isquémica será mayor en hombres que en mujeres (1.786 vs 1.522 casos por 100.000 habitantes). Esta diferencia está presente en todos los grupos de edad. La edad de inicio también parece ser más temprana en los hombres y la distribución por edad muestra patrones esperados de prevalencia e incidencia crecientes con el incremento de la edad. La incidencia aumenta a partir de la cuarta década de la vida y no disminuye después, lo que refrenda el papel de la edad como factor de riesgo. La prevalencia sigue siendo más alta que la incidencia para todos los grupos de edad, lo que indica la naturaleza crónica de la cardiopatía isquémica (6).

En cuanto a la incidencia de la Enfermedad Cardiovascular se ha reportado un aumento de cerca del 50% de enfermedad coronaria, insuficiencia cardiaca y Accidente Cerebrovascular (ACV) en adultos por encima de 20 años en los Estados Unidos (6). Con respecto al continente europeo, se estima que la incidencia de Infarto Agudo de Miocardio (IAM) se sitúa entre 40 y 140 casos por 100.000 habitantes (7), frente a los 50 casos por 100.000 habitantes de Estados Unidos (6). Cuando se analiza la incidencia de la cardiopatía isquémica en fase estable, lo que actualmente se conoce como síndrome coronario crónico, las cifras también son significativas, con prevalencia entre 20.000 y 40.000 pacientes por millón de habitantes (2). Actualmente, se ha comprobado que pudiera ser incluso mayor, ya que estos pacientes son muy heterogéneos englobando aquellos con o sin angina de pecho, con o sin revascularización coronaria y con o sin antecedentes de IAM (8). En un estudio reciente, realizado en 45 países se analizaron 32.703 pacientes con síndrome coronario crónico incluidos en el registro prospectivo observacional CLARIFY. El objetivo primario, muerte cardiovascular o IAM no mortal, a 5 años fue del 8 %. Al analizar los predictores independientes asociados a los eventos principales se encontraron los siguientes: el hábito tabáquico, la insuficiencia cardiaca previa, la fibrilación auricular, vivir en América Central/Sur, IAM previo, angina actual, ACV previo, diabetes mellitus (DM) y la enfermedad periférica arterial (9). Los problemas sociales emergentes como el estrés, una disminución en la calidad y horas de sueño a un promedio de menos de seis horas de sueño por

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

noche, así como la contaminación atmosférica, también contribuyen como factores de riesgo emergentes de cardiopatía isquémica (10). El pronóstico tras un IAM ha mejorado en las últimas décadas, sobre todo tras la puesta en marcha de redes asistenciales de atención al IAM mediante trombolisis y Angioplastia Primaria (5) así como la extensa aplicación de las medidas farmacológicas de prevención secundaria (11). A pesar de ello, la mortalidad hospitalaria de pacientes con IAM en registros europeos se sitúa en torno al 4-14%, por lo que constituye un aspecto de mejora en el momento actual (12).

El envejecimiento de la población mundial, de gran relevancia en el continente europeo, ha sido evidente en las últimas décadas. En 2019 una de cada once personas era mayor de 65 años, y las proyecciones actuales estiman que seis de cada 10 personas serán mayores de 65 años para el año 2050, aunado al estilo de vida moderno y las tendencias de las últimas décadas en la incidencia de enfermedades cardiovasculares, destacará el incremento en la enfermedad arterial coronaria en dicho estrato etario. En términos de distribución regional, la cardiopatía isquémica muestra la prevalencia más alta en Europa central y del este, mientras que en los países de altos ingresos, como el Reino Unido, Finlandia, Dinamarca, Alemania e Italia, ha descendido su prevalencia en los últimos años (13). Los países de Europa del Este, influidos por su nivel socioeconómico y hábitos higiénico-dietéticos, muestran una carga desproporcionadamente alta de cardiopatía isquémica (14).

Se ha establecido una estrecha relación con la carga de enfermedad cardiovascular y una posible asociación con un nivel socioeconómico más bajo y menor nivel educativo (15). De manera que una inversión eficaz debería centrarse en la educación de la población general, creando conciencia sobre los factores de riesgo asociados con las enfermedades cardiovasculares y los primeros síntomas de las mismas por lo que los pacientes deberían consultar en el servicio médico (16).

En España, la cardiopatía isquémica tiene una prevalencia de 2.733 personas por 100.000 habitantes y en relación a la discapacidad-años de vida ajustados de 1503 personas por cada 100.000 habitantes (17).

Según la Federación Mundial del Corazón, el coste global de las Enfermedades cardiovasculares (ECV) en 2010 fue de aproximadamente 863.000 millones de dólares US, y se espera que aumente a más de 1 billón de dólares US para 2030. En países como Estados Unidos, el coste de la cardiopatía isquémica se acerca al 1-1,5% del Producto Interior Bruto (PIB), con coste por episodio de cardiopatía isquémica de más de 5.000 dólares US. En países

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de ingresos moderados, el coste total medio de la atención de la cardiopatía isquémica supone el 10 % del gasto total sanitario (18). Este impacto financiero de la cardiopatía isquémica proviene de las hospitalizaciones, los tratamientos necesarios durante la hospitalización, los procedimientos de revascularización, las visitas clínicas, las visitas de emergencia y los tratamientos farmacológicos prescritos (19). Este aumento en la carga de enfermedades cardiovasculares tiene serias implicaciones para la capacidad de los sistemas de salud. En particular, una política centrada en brindar atención cardíaca terciaria puede ser insostenible sin un énfasis correspondiente en la prevención y la atención primaria (12).

Un hallazgo clave es que las tasas de incidencia, prevalencia y mortalidad han disminuido en las últimas dos décadas en muchas regiones del mundo. Esto puede deberse a una mayor conciencia de los factores de riesgo cardiovascular y del estilo de vida, la disminución del tabaquismo, la lucha frente a la obesidad y la promoción del ejercicio físico (14). Así, las iniciativas de salud pública también han ayudado a reducir el tabaquismo (20), como también otras estrategias nacionales para la promoción de la salud pueden ayudar a reducir la epidemia de obesidad (21). A pesar de ello, el número total de casos seguirá aumentando debido al empeoramiento de los factores de riesgo cardiovasculares. El pronóstico de una mayor carga de discapacidad debido a la cardiopatía isquémica debe incitar a los sistemas sanitarios a desarrollar estrategias para mejorar la prevención primaria de la cardiopatía isquémica (22). Medidas como el asesoramiento constante sobre una dieta saludable (23), así como la reducción de la ingesta total de sal en un tercio, han demostrado que podrían reducir las muertes por cardiopatía isquémica hasta en un 8 % (24).

1.1.2 Factores de riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo cardiovascular son aquellas condiciones que están asociadas a una probabilidad mayor de sufrir una enfermedad cardiovascular. La evaluación o el cribado de factores de riesgo cardiovascular, tiene como objetivo principal la detección precoz de dichos factores de riesgo, aunque diversos estudios no han mostrado impacto sobre los eventos cardiovasculares (25). A pesar de los resultados donde no se observa un beneficio claro sobre los desenlaces clínicos; el cribado para factores de riesgo de enfermedad ateroesclerótica, como dislipemia, DM, hipertensión arterial (HTA), tabaquismo, obesidad, mala alimentación, sedentarismo, estrés, ansiedad, frecuencia cardiaca inapropiada y enfermedad periodontal, entre otros, es eficaz para incrementar las tasas de detección y tratamiento precoz, de manera que

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

podamos al menos retrasar, sino evitar, desenlaces clínicos adversos (26). Un problema que afecta a los programas de cribado es el posible efecto negativo de los falsos positivos y falsos negativos, no obstante, las personas evaluadas no desarrollaron una reacción psicológica negativa a largo plazo después de la información sobre un mayor riesgo de desarrollar enfermedad coronaria (27). A favor del cribado, persiste la detección de factores de riesgo cardiovascular y la disminución en los costes por la atención de las comorbilidades. En esta línea de actuación, se recomienda la evaluación cardiovascular en personas con factores de riesgo cardiovascular o comorbilidades que incrementen el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque por el momento no existe una recomendación estricta que determine los intervalos con que deben llevarse a cabo dichos cribados (28).

Los cuidados en el estilo de vida deben seguir siendo la base para la prevención primaria de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, las personas cuyo riesgo de eventos cardiovasculares excede el 2%/año y los pacientes con enfermedad arterial coronaria o equivalentes, a menudo precisan terapia farmacológica además de las medidas de cambio en el estilo de vida. El reconocimiento y tratamiento precoz de los factores de riesgo modificables, reduce los eventos cardiovasculares a largo plazo y debe acompañarse de una revascularización coronaria apropiada. Por lo tanto, el tratamiento del síndrome coronario agudo debe involucrar dos fases: primero, abordar la lesión coronaria culpable del evento índice y segundo, buscar la rápida "estabilización" de esas otras lesiones ateroscleróticas que puedan producir eventos recurrentes durante el seguimiento. El concepto de “cardiología intervencionista” por tanto estaría más allá de la simple revascularización mediante implante de prótesis coronarias y en esencia, implicaría también intervenciones preventivas de eventos futuros, incluyendo siempre el tratamiento médico óptimo (29).

Existen múltiples factores de riesgo cardiovascular clásicos como el tabaco, HTA, dislipemia, DM, obesidad, antecedentes familiares, genética, estrés psicosocial, sexo masculino, edad, etnia, estrato social y determinantes socioeconómicos, zona geográfica donde se habite y contaminación medioambiental. Los principales factores de riesgo cardiovascular encuadrados dentro de los modificables son la apolipoproteína B (Apo B) que resulta en un aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL-c), la HTA, el tabaquismo y la DM (30). Clásicamente se ha adoptado una relación exponencial de dichos factores con el riesgo de desarrollar enfermedad coronaria y parece que pueda existir una vía común patogénica mediada por la inflamación, con la aterosclerosis como evento fundamental.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La cuantificación del riesgo cardiovascular total, visto como la probabilidad de sufrir una complicación cardiovascular en un periodo de tiempo determinado, es clave en la estratificación del riesgo. En la práctica clínica diaria se emplean sistemas de evaluación del riesgo cardiovascular que calculan el riesgo de sufrir un evento cardiovascular mayor a los 10 años. Así, la guía europea sobre prevención de las enfermedades cardiovasculares recomienda el uso del sistema SCORE2/SCORE2-OP, sustentado en bases de datos de grandes cohortes europeas representativas. El sistema SCORE2 estima la probabilidad de sufrir una primera complicación cardiovascular (IAM o ACV) mortal o no mortal en 10 años, según el sexo, la edad, la concentración de colesterol no elevada densidad (no-HDL), el consumo de tabaco y la medida de la presión arterial sistólica (31).

1.1.2.1 Tabaquismo

El 50% de todas las muertes evitables en fumadores se debe al tabaquismo y la mitad de ellas se deben a complicaciones cardiovasculares. Así, se ha visto que un paciente fumador tiene un 50% de probabilidad de morir a causa del tabaquismo y la pérdida de años de vida en promedio será de 10 años (32). El riesgo de enfermedad cardiovascular en fumadores menores de 50 años es hasta cinco veces mayor que en no fumadores (33) y este hecho es más acentuado en las mujeres que en los hombres (34). En todo el mundo, después de la HTA, fumar es el principal factor de riesgo de discapacidad ajustada por años de vida (35).

El tabaquismo pasivo también se asocia con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular (36) e incluso el cigarrillo electrónico también se asocia con dicho aumento del riesgo (37). Más aún, niveles modestos y bajos de tabaquismo confieren un aumento del riesgo cardiovascular (38). Aunque la tasa de tabaquismo está disminuyendo en Europa, sigue siendo muy común y a pesar de todos los esfuerzos, está aumentando en mujeres, adolescentes y población socialmente desfavorecida (39). En la encuesta EUROASPIRE IV, realizada en pacientes con antecedentes de Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) previa, el 16% de los pacientes continuaba fumando tras 16 meses de seguimiento y prácticamente la mitad de los que fumaban en el momento de sufrir el infarto, se mantuvieron como fumadores persistentes. La encuesta también demostró que las terapias basadas en la evidencia para abandonar el hábito tabáquico estaban infrautilizadas, constituyendo una clara oportunidad de mejora en dicha esfera terapéutica (40).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El riesgo cardiovascular asociado con el tabaco muestra la clásica relación dosis-respuesta, pero sin objetivarse un límite inferior para los efectos perjudiciales del tabaco (41). La duración del hábito tabáquico también juega un papel, y aunque los cigarros son la forma más común, todos los tipos de tabaco fumado, incluidos los cigarrillos con bajos niveles de alquitrán, los cigarrillos con filtro, las pipas y los puros, son dañinos y aumentan el riesgo cardiovascular. El humo procedente de la combustión del tabaco es más perjudicial cuando se inhala, pero los fumadores que no inhalan el humo también tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Las formas de consumo de tabaco denominadas "sin humo" (mascado, esnifado...) también se asocia con un aumento pequeño, pero estadísticamente significativo, del riesgo de IAM y ACV (42).

El tabaquismo pasivo también aumenta el riesgo de enfermedad arterial coronaria. Un cónyuge que fuma o la exposición en el ambiente laboral, aumenta el riesgo de enfermedad cerebrovascular en aproximadamente un 30% (41).

Se ha demostrado que fumar aumenta el desarrollo de aterosclerosis, así como la alteración de la función endotelial que genera procesos oxidativos, disfunción plaquetaria, alteración de la fibrinólisis, oxidación de lípidos y afectación de la función vasomotora. En estudios experimentales, varios de estos efectos son total o parcialmente reversibles en muy poco tiempo tras el abandono del tabaco, aunque la formación de placa de ateroma nunca será completamente reversible y, por lo tanto, nunca se esperaría que los fumadores alcanzaran el nivel de bajo riesgo de los que nunca fueron fumadores en relación con las enfermedades cardiovasculares (43).

Los beneficios de dejar de fumar son claros y tienen una gran base de evidencia científica. Alguna las ventajas son casi inmediatas, aunque otras podrían precisar períodos de tiempo más largos. Así, el riesgo de enfermedad cerebrovascular en los exfumadores está entre la de los fumadores actuales y la de los nunca fumadores. El hecho de abandonar el hábito tabáquico tras sufrir un IAM es la más eficaz y potente de las medidas de prevención secundaria según un reciente estudio, demostrando una reducción en el re-IAM y en el compuesto de muerte/IAM en un 43% y un 36% respectivamente (Reducción Riesgo Relativo, RRR= 0,57 y 0,74; $p < 0,005$) en comparación con aquellos que continúan fumando (44).

Los cigarrillos electrónicos son unos dispositivos electrónicos que simulan cigarrillos combustibles, calentando nicotina y otras sustancias químicas. Los cigarrillos electrónicos aportan la nicotina sin la gran mayoría de los productos químicos del tabaco y son

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

probablemente menos dañinos que el tabaco, aunque persiste globalmente un aumento de riesgo cardiovascular (45).

La evidencia sobre la efectividad de los cigarrillos electrónicos, como sustituto del tabaco tradicional, es limitada debido al pequeño número de estudios y las bajas tasas de eventos en esta población concreta (46). Datos de algunos estudios observacionales sugieren que los cigarros electrónicos son al menos tan eficaces como los parches transdérmicos o los inhaladores de terapia de remplazo de nicotina para el abandono del hábito tabáquico (47). El beneficio global podría provenir de un suministro bajo de nicotina, aunque alrededor del 6% de los exfumadores que usaban cigarrillos electrónicos diariamente, volvieron a fumar después de 1 mes y el 6% después de 1 año. Por otra parte, prácticamente el 50% de aquellos consumidores de cigarrillos electrónicos abandonaron el tabaco después de 1 año, lo que indica que podrían ser eficaces en la prevención de recaídas y el abandono del hábito de fumar (48).

1.1.2.2 Hipertensión Arterial

La HTA ha sido ampliamente relacionada con la enfermedad aterosclerótica cardiovascular, así como con Insuficiencia Cardiaca mediante estudios observacionales, epidemiológicos y ensayos clínicos. Dicha asociación causal supone de manera indirecta unos 9,4 millones de muertes en el mundo y un 7% de discapacidad ajustada por años de vida (49).

En todo el mundo la alta prevalencia de HTA es comparable, incluso de manera independiente a la renta de cada país (50). La HTA fue el factor más importante asociado con mortalidad prematura en 2015, causando casi 10 millones de fallecimientos y más de 200 millones de años de vida ajustados por discapacidad. Los valores de Presión Arterial Sistólica (PAS) elevados, concretamente valores ≥ 140 mmHg, se presentan como la primera causa de mortalidad y discapacidad de entorno al 70%. Cuando analizamos la mortalidad anual asociada a los niveles aumentados de PAS, destaca la cardiopatía isquémica (4,9 millones), ictus hemorrágico (2,0 millones) e ictus isquémico (1,5 millones) (51). Relacionado con las altas tasas de complicaciones cardiovasculares, destaca la cada vez más alta presencia de HTA en el mundo, alcanzando una prevalencia mundial que se ha estimado en 1.130 millones de pacientes hipertensos en el año 2015 (52).

La HTA es un factor de riesgo cardiovascular asociado a todo el espectro de enfermedad vascular: enfermedad arterial coronaria, enfermedad cerebrovascular, nefropatía, enfermedad arterial periférica y arritmias como la fibrilación auricular. Estudios previos asocian

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de manera consistente la HTA con un aumento del riesgo de sufrir fibrilación auricular (53) e incluso se han asociado el aumento de riesgo de deterioro cognitivo y/o la aparición de demencia (54). Además de las comorbilidades asociadas, la HTA se asocia a una mayor mortalidad y concretamente, la probabilidad de muerte por enfermedad coronaria o cerebrovascular aumenta de manera lineal desde límites tan bajos como 90 mmHg de tensión arterial sistólica y 75 mmHg de tensión arterial diastólica (55,56).

La Presión Arterial Diastólica (PAD) elevada se asocia con un aumento del riesgo cardiovascular y es más prevalente en pacientes jóvenes de menos de 50 años. Con el envejecimiento, la PAD tiende a reducirse, fundamentalmente debido al aumento de la rigidez de la pared arterial y debido a ello, la PAS pasa a constituir un factor de riesgo más relevante a partir de esta época de la vida (57). Así, a partir de la mediana edad y en los ancianos, el aumento de la presión de pulso (la diferencia entre la PAS y la PAD) se postula como un factor de mal pronóstico para complicaciones cardiovasculares (58).

La HTA con una alta frecuencia se asocia con otros factores de riesgo cardiovascular como por ejemplo la intolerancia a la glucosa, la obesidad o la dislipemia (59). Esta agrupación de factores de riesgo, más allá de sumar los riesgos por separado en el paciente, implica un efecto sinérgico y multiplicativo en el riesgo cardiovascular, que resulta mucho más alto que el provocado por cada uno de los factores de riesgo aislados (60).

Se ha observado que la evolución de la presión arterial a lo largo de la vida difiere en las mujeres en comparación con los hombres, lo que puede resultar en un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular en umbrales de presión arterial más bajos (61,62).

Existen pacientes considerados de muy alto riesgo cardiovascular, en los que no es necesario medir el riesgo cardiovascular mediante la escala Systemic Coronary Risk Estimation 2 (SCORE2)/ Systemic Coronary Risk Estimation 2 Older Persons (SCORE2-OP), como son:

1.- Pacientes con Enfermedad Renal Crónica (ERC) grave (Tasa de Filtrado Glomerular estimada (TFGe) < 30 ml/min/1,73 m2 o TFGe 30-44 ml/min/1,73 m2 y cociente albúmina/ creatinina > 30)

2.- Pacientes diabéticos con Enfermedad Aterosclerótica (EA) establecida o daño de órgano diana grave:

- TFGe < 45 ml/min/1,73 m2 independientemente de la albuminuria
- TFGe 45-59 ml/min/1,73 m2 y microalbuminuria (cociente albúmina/creatinina 30-300 mg/g)

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

- Proteinuria (cociente albúmina/ creatinina > 300 mg/g).

- Presencia de enfermedad microvascular en al menos 3 localizaciones (p. ej. retinopatía, neuropatía microalbuminuria…)

3.- EA documentada por clínica (IAM previo, ACV, enfermedad arterial periférica, revascularización arterial coronaria) o técnicas de imagen inequívocas (placas en la ecografía o angiografía carotídea o en la Tomografía computerizada, sin incluir el aumento de grosor de la intima-media carotídea)

También existen pacientes con Alto riesgo Cardiovascular, en los que las medidas de prevención cardiovascular han de ser intensivas, que incluyen:

1.- Pacientes con ERC moderada (TFGe 30-40 ml/min/1,73 m2 y cociente albúmina/creatinina <30 o TFGe 45-59 ml/ min/1,73 m2 y cociente albúmina/creatinina 30-300 o TFGe >60 ml/min/1,73 m2 y cociente albúmina/ creatinina > 300)

2.- Pacientes con Hipercolesterolemia Familiar

3.- Pacientes con DM (DM tipo 2 o DM tipo 1 de más de 10 años de evolución) sin EA ni daño de órgano diana.

En general, para la población, se recomienda siempre la estimación del riesgo cardiovascular a los 10 años mediante el sistema SCORE2/SCORE2-OP, salvo aquellas excepciones mencionadas previamente (31) .

Por otro lado, para pacientes con HTA se recomienda medir las concentraciones de ácido úrico sérico, ya que un aumento del mismo, incluso niveles inferiores a los asociados a la gota, se correlaciona con un aumento del riesgo cardiovascular (63).

El riesgo total de complicaciones cardiovasculares globales, considerando mortales y no mortales, en pacientes con HTA, es 3 veces mayor que el riesgo de complicaciones mortales en los varones y 4 veces mayor que el riesgo de complicaciones mortales en las mujeres. Cuando analizamos los pacientes ancianos, este factor multiplicador desciende a menos de 3, ya que con la vejez es más probable que una primera complicación de la HTA curse de manera fatal (64).

1.1.2.3 Obesidad

Se ha publicado como la obesidad (65), de forma independiente o constituyendo parte del denominado síndrome metabólico asociado a HTA, DM y dislipemia, se ha relacionado de manera directa con la aterosclerosis (66). Es un hecho que el índice de Masa Corporal (IMC),

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

medido como el peso (en kg) dividido por la altura al cuadrado (en m^2), ha aumentado de manera relevante en todo el mundo en todos los estratos etarios: niños, adolescentes y adultos (67). Se ha demostrado una relación de forma lineal entre IMC y la mortalidad en fumadores, mientras que en los pacientes no fumadores la relación presenta una curva en forma de J (68). Analizando la mortalidad global, se observan valores más bajos con IMC entre 20 -25 kg/m2 en personas sanas, persistiendo una curva en J, con mortalidades más altas a niveles inferiores y superiores de IMC (69).

La grasa corporal total, sobre todo la acumulada a nivel abdominal, conlleva un mayor riesgo cardiovascular que la grasa subcutánea, por lo que multitud de estudios han incidido en su relación con la enfermedad cardiovascular. Los parámetros más estudiados han sido, el índice de masa corporal, la relación entre la circunferencia de la cintura y la cadera y la circunferencia de la cintura. El nivel óptimo para la medición de la circunferencia de la cintura está a medio camino del borde costal inferior y la cresta ilíaca anterosuperior, con el paciente en bipedestación. Las medidas umbral recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una circunferencia igual o menor a 102 cm en los hombres e igual o menor de 88 cm en las mujeres. En un metaanálisis reciente, se llegó a la conclusión que tanto el IMC como la circunferencia de la cintura, están asociados estrechamente con enfermedad cardiovascular y DM tipo 2 (70).

1.1.2.4 Diabetes mellitus

Íntimamente ligada a la obesidad, la DM se está convirtiendo en la pandemia de los países desarrollados, con un incremento en su incidencia y el consiguiente aumento de la enfermedad coronaria asociada a la misma. En comparación con los no diabéticos, las personas con DM tipo 2 tienen un mayor riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular en diferentes grupos étnicos y sexos, siendo la insuficiencia cardíaca, la enfermedad arterial periférica y la cardiopatía isquémica las causas principales de aumento de dicha mortalidad (71).

La DM tipo 1, la DM tipo 2 y la prediabetes se han asociado de forma independiente a enfermedad cardiovascular, aumentando su riesgo en aproximadamente dos veces y provocando una reducción de la esperanza de vida de entre 5 y 10 años (72). Además, la DM tipo 2 se ha asociado de manera significativa también a una mayor incidencia de ACV, con mayor prevalencia en el sexo femenino (73). Cada vez hay más evidencia de un riesgo relativo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

muy alto en los adultos jóvenes (<40 años) con DM tipo 2 (74), de tal manera que el control terapéutico y abordaje de estos pacientes debe ser multidisciplinario (72) .

Los pacientes con DM tipo 2, suelen tener asociados otros factores de riesgo cardiovascular, que resultan en un aumento relativo del riesgo de complicaciones cardiovasculares. Este incremento de riesgo resalta la importancia del abordaje global del riesgo cardiovascular de los pacientes para reducir las complicaciones macrovasculares, así como de un control glucémico estricto, para disminuir el desarrollo de complicaciones microvasculares y en menor medida, el riesgo de enfermedad cerebrovascular (75).

La mayoría de los pacientes con DM son obesos, por lo que el control del peso es un objetivo prioritario. Se deben adoptar modelos de dieta en los que el predominio de frutas, cereales integrales, verduras y fuentes de proteínas bajas en grasas sean la base principal de la dieta (76). A día de hoy, se recomienda de manera encarecida limitar la ingesta de alcohol y grasas saturadas y grasas trans, controlar el consumo de hidratos de carbono y aumentar la fibra dietética. Estas recomendaciones suponen la base de lo que se conoce como "dieta mediterránea", donde las grasas derivan fundamentalmente de los aceites monoinsaturados.

Por otro lado, se recomienda, el equilibrio entre entrenamiento físico aeróbico y de resistencia, ya que se ha demostrado eficaz en la prevención de la progresión de la DM y también para el control de la glucemia. Esta intervención en el estilo de vida también puede prevenir el desarrollo de DM en personas con alto riesgo y, a su vez, reducir las futuras complicaciones micro y macrovasculares (77).

Clásicamente se ha equiparado la DM a la EAC en cuanto al riesgo cardiovascular, aunque en aquellos pacientes con una enfermedad de corta evolución, la DM no es un estado equivalente al riesgo de EAC establecida (78). Podría afirmarse, que su nivel riesgo se asemeja a los de la enfermedad ateroesclerótica después de aproximadamente una década de evolución, aunque podría ser aún más acusada si padecen asociada enfermedad renal secundaria con proteinuria o filtrado glomerular bajo. Por tanto, los pacientes que desarrollan DM a una edad más temprana tienen consecuentemente una mayor carga de complicaciones cardiovasculares a lo largo de su vida (79). También se ha observado que las personas con DM y enfermedad coronaria tienen un riesgo cardiovascular muy superior al de las personas con enfermedad coronaria, pero sin DM y una expectativa de vida sustancialmente menor (80).

El estricto control glucémico y de presión arterial en pacientes con DM reduce el riesgo de retinopatía, nefropatía (albuminuria) y ACV (81). Los inhibidores del cotransportador sodio-

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

glucosa tipo 2 reducen sustancialmente la enfermedad cerebrovascular y mortalidad total y hospitalización por insuficiencia cardiaca sin efectos adversos importantes, por lo que deben considerarse parte del tratamiento inicial en los pacientes con DM tipo 2 (75).

Las estatinas se recomiendan para todos aquellos recién diagnosticados con DM tipo 2 más allá de cierta edad (actualmente se recomienda a los 40 años). Sin embargo, una proporción de pacientes con DM entre 40 y 50 años, pueden tener un bajo riesgo de enfermedad cardiovascular a 10 años, debido a niveles normales de presión arterial, lípidos y a no fumar, y en tales casos, queda a disposición médica su prescripción. Del mismo modo, en algunos pacientes menores de 40 años con DM tipo 2 con evidencia de daño de órgano diana o factores de riesgo significativos asociados, las estatinas si debieran ser recomendadas (82).

1.1.2.5 Enfermedad renal

La enfermedad renal constituye, sin lugar a duda, un factor de riesgo cardiovascular. Se ha demostrado que con Filtrado Glomerular Renal (FGR) por debajo de de 60 ml/min/m² la posibilidad de desarrollar enfermedad coronaria aumenta linealmente, siendo en estadios avanzados de la enfermedad hasta el doble (estadio 3) y el triple (Estadio 4) de riesgo de mortalidad cardiovascular (83,84).

Los pacientes con enfermedad renal presentan, en cualquier caso, una infraestimación de su riesgo cardiovascular (85). Este inconveniente podría paliarse añadiendo variables altamente específicas de esta población a los modelos de estimación de riesgo cardiovascular clásicos, como son la tasa de filtrado glomerular o la albuminuria (86).

La calcificación coronaria, altamente prevalente en pacientes con enfermedad renal, presenta un patrón más agresivo y precoz cuanto más avanzada sea la insuficiencia renal (87). Además, se ha observado que la calcificación subintimal y de la media se asocia a una mayor mortalidad cardiovascular y una mayor mortalidad por todas las causas (88). A nivel molecular, se ha demostrado una mayor inflamación en las placas ateroscleróticas coronarias frente a las de controles sin enfermedad renal (89).

La enfermedad renal en sus fases avanzadas y su relación con la cardiopatía isquémica ha sido ampliamente estudiada. Estos pacientes, además del resto de factores de riesgo cardiovascular previamente mencionados, están expuestas a otros no tradicionales relacionados con la uremia, que incluyen inflamación, estrés oxidativo y metabolismo anormal del calcio y el fósforo (90).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cabe destacar que el conjunto de pacientes con enfermedad renal podría beneficiarse de un tratamiento precoz y óptimo de los factores de riesgo cardiovascular establecidos, así como señalan las guías KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) en trasplante renal, (91), además de un manejo específico de la dislipemia en dichos pacientes (92). Sin embargo, existe una falta de evidencia científica a la hora de tomar decisiones terapéuticas en estos pacientes, ya que la mayoría de estas recomendaciones parten de extrapolaciones de estudios con pacientes sin enfermedad renal.

1.1.2.6 Dislipemia

El colesterol es fundamental para la síntesis de las membranas celulares, así como un precursor de los ácidos biliares y las hormonas esteroideas, imprescindibles en el organismo. El colesterol de origen tanto exógeno como endógeno, es transportado en el plasma hasta las células periféricas en gran parte por las lipoproteínas que contienen apolipoproteina B (apoB). Las partículas de lipoproteína de baja densidad (LDL-c) constituyen aproximadamente el 90 % de las lipoproteínas que contienen apoB circulantes en la sangre. Sin embargo, en la práctica clínica, el nivel de lipoproteínas de baja densidad en plasma generalmente no se mide directamente, sino que se utiliza una estimación teniendo en cuenta la medida de la cantidad total de colesterol contenida en las partículas de LDL-c. Como resultado, el LDL-c calculado se ha postulado como clave para evaluar el riesgo de enfermedad cardiovascular y en estudios clínicos para evaluar los beneficios terapéuticos de determinados fármacos e incluso los cambios a lo largo del tiempo (93).

El rol del LDL-c y otras lipoproteínas que contienen apoB en el desarrollo de enfermedad coronaria ha sido ampliamente demostrado por estudios observacionales y ensayos clínicos (94). Múltiples líneas de evidencia han establecido que las LDL-c ricas en colesterol y otras lipoproteínas que contienen apoB, incluidas las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-c) y sus remanentes, las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-c) y la Lipoproteína-a -Lp(a)- están directamente implicadas en el desarrollo de síndromes coronarios agudos (29).

Así, se ha visto que en relación al LDL-c, que niveles plasmáticos más bajos se asocian con un menor riesgo de enfermedad aterosclerótica coronaria y los ensayos clínicos demuestran que al reducir el LDL-c se reduce el riesgo de eventos cardiovasculares, incluso hasta niveles tan bajos de LDL-c como < 55 mg/dL (94). De hecho, la reducción relativa del riesgo de EAC

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

es proporcional al descenso absoluto de las concentraciones de LDL-c, independientemente del fármaco utilizado para lograr tal efecto (95). Incluso reducciones modestas de LDL-c en pacientes de alto riesgo cardiovascular, resultan beneficiosas en cuanto a la reducción en el número de eventos aterotrombóticos cardiovasculares (96). Sin embargo, el beneficio absoluto de una reducción del LDL-c está en relación con el riesgo absoluto de enfermedad ateroesclerótica y, por tanto, puede ser más beneficiosa en pacientes con riesgo cardiovascular alto o muy alto (95).

El colesterol no de lipoproteínas de alta densidad (no HDL-c) abarca todas las lipoproteínas aterogénicas (que contienen apo-B) y se calcula como: colesterol total - HDL-c. La relación entre el no-HDLc y el riesgo cardiovascular es al menos tan consistente como la relación con el LDL-c. Los niveles de colesterol no-HDL-c contienen, básicamente similar información a la aportada por los niveles plasmáticos de apo-B. El SCORE2 y SCORE2-OP tienen en cuenta el no HDL-c en la evaluación del riesgo cardiovascular (97).

Sin embargo, el HDL-c, está inversamente asociado con el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque valores de HDL-c extremadamente altos indicarían un aumento del riesgo cardiovascular (98). Sin embargo, no hay evidencia de ensayos clínicos en que inhibidores de la proteína de transferencia del colesterol-ester o CETP, por su nombre en inglés, que elevan el HDL-c plasmático reduzcan el riesgo de enfermedad cardiovascular (99).

El Heart Protection Study mostró un beneficio inequívoco de la administración de estatinas en individuos de 40 a 80 años con colesterol total de 135 mg/dl y en riesgo debido a un IAM previo u otra enfermedad oclusiva arterial coronaria o no coronaria, DM o HTA tratada, con reducciones en la mortalidad de origen coronario del 5,7% en los tratados con simvastatina 40 frente al 6,9% en los pacientes del grupo placebo (100).

En cuanto al papel de los lípidos y lipoproteínas en la fisiopatología de la enfermedad aterosclerosa, cabe destacar que todas las lipoproteínas que contienen ApoB de diámetro <70 nm, sobre todo si existe disfunción endotelial, podrían cruzar la barrera endotelial quedando almacenadas a dicho nivel (101), y provocar en la pared arterial un proceso complejo que lleva al depósito lipídico y al comienzo de la formación de la placa de ateroma (102).

Las placas ateroscleróticas, a medida que transcurre el tiempo, aumentan de tamaño porque se retienen cada vez más partículas de lipoproteínas que contienen ApoB y así, la carga total de placas ateroscleróticas está proporcionalmente determinado por la concentración de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

LDL-c circulante y otras lipoproteínas que contienen ApoB, como por el tiempo de exposición a dichas lipoproteínas (93).

Por tanto, la enfermedad coronaria subyacente a la cardiopatía isquémica se caracteriza por un aumento de las placas ateroscleróticas en las arterias epicárdicas, pudiendo así comprometer la circulación a dicho nivel. La enfermedad aterosclerótica se manifiesta como una enfermedad inflamatoria vascular que afecta al territorio coronario, a la circulación arterial periférica y a la cerebrovascular/carotídea como expresión de un mismo espectro patológico (103). Entendida como una enfermedad sistémica, la aterosclerosis, es un continuum caracterizado por un grado de inflamación variable, la afectación de las células endoteliales, el acúmulo de sustancias lipídicas y la formación de placas de ateroma en la íntima de la pared vascular (104). Las células endoteliales expresan en sus membranas una serie de moléculas de adhesión que captan a los leucocitos, aumentando así la permeabilidad del endotelio y modificando la matriz extracelular bajo el mismo, para finalmente favorecer la entrada y el acúmulo de partículas de LDL-c en la pared arterial (101). Los eventos clave en el inicio de un síndrome coronario agudo son la retención y acumulación de lipoproteínas ricas en colesterol que contienen apoB dentro de la íntima arterial en sitios predilectos para la formación de placa, como por ejemplo en las bifurcaciones arteriales (105).

1.1.2.7 Otros Factores de riesgo cardiovascular: género y edad

Más allá del riesgo aumentado del sexo masculino en la cardiopatía isquémica y del efecto cardioprotector de las hormonas femeninas (estrógenos, progesterona), también se ha de destacar las diferencias fisiopatológicas y clínicas en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), las reacciones adversas farmacológicas, la conciencia sobre los factores de riesgo de enfermedad aterosclerótica (106) o las diferencias entre los sexos en el tratamiento tras el síndrome coronario agudo (107).

La edad es el principal factor de riesgo cardiovascular, así las mujeres por encima de 75 años y los hombres mayores de 65 años presentan un alto riesgo de enfermedad cardiovascular a 10 años, mientras que las mujeres menores de 50 años y los varones menores de 40 presentan, por norma, bajo riesgo cardiovascular a 10 años (30).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 1: Objetivos terapéuticos para distintas categorías de pacientes.
(Adaptado de la Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología 2021 sobre la prevención cardiovascular) (30)

Categorías de pacientes	Objetivos terapéuticos	Objetivos de prevención intensificados
Personas aparentemente sanas	Para la PA y los lípidos: inicio del tratamiento farmacológico según la evaluación del riesgo de ECV o PAS>160 mmHg	
<50 años	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS<140 mmHg o 130 mmHg si se tolera, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl)	PAS<130mmHg si se tolera, LDL-c<1,8mmol/l (70 mg/dl) y reducción > 50% para pacientes en alto riesgo, LDL-c<1,4 mmol/l (55 mg/dl) y reducción >50% para pacientes en muy alto riesgo
50-69 años	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS <140 o <130 mmHg si se tolera, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl)	PAS<130 mmHg si se tolerab, LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl) y reducción >50% para pacientes en alto riesgo, LDL-c<1,4 mmol/l (55 mg/dl) y reducción del LDL-c>50% para pacientes en muy alto riesgo
>70 años	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS<140 mmHg si se tolera, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl)	
Pacientes con ERC	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS<140 mmHg si se tolera, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl) y reducción del LDL-c>50%; en otro caso, según EA y el antecedente de DM	LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl) para los pacientes en alto riesgo y <1,4 mmol/l (55 mg/dl) para aquellos en muy alto riesgo
Pacientes con HF	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS <140 o <130 mmHg si se tolera, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl), reducción del LDL-c> 50%; en otros casos, según antecedentes de EA y DM	LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl) para los pacientes en alto riesgo y <1,4 mmol/l (55 mg/dl) para aquellos en muy alto riesgo
Paciente con DM tipo 2, buen control de la DM de inicio reciente (p. ej.e < 10 años), sin evidencias de DOD ni otros factores vida de riesgo de EA	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida	
Paciente con DM tipo 2, sin EA establecida o DOD grave	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS<140o<130mmHgsisetolerab, LDL-c<2,6 mmol/l (100 mg/dl), HbA1c < 53 mmol/mol (7,0%)	PAS < 130 mmHg si se tolerab, LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl) y reducción del LDL-c< 50%, iSGLT2 o aGLP1
Paciente con DM tipo 2, con EA establecida o DOD grave	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS <140 o <130 mmHg si se tolerab, LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl), HbA1c <64 mmol/mol (8,0%), iSGLT2 o aGLP1; para ECV, tratamiento antiagregante plaquetario	PAS<130 mmHg si se tolerab, LDL-c<1,4 mmol/l (55 mg/dl) y reducción del LDL-c>50%, iSGLT2 o aGLP1 si todavía no se han iniciado. Se puede considerar tratamientos emergentes: TAPD, doble inhibición, colchicina, icosapento de etilo
Pacientes con EA establecida	Deshabituación tabáquica y optimización del estilo de vida, PAS <140 o <130 mmHg si se tolerab, tratamiento hipolipemiante oral intensivo con objetivo de LDL-c<1,8 mmol/l (70 mg/dl), tratamiento antiagregante plaquetario	PAS < 130 mmHg si se tolerab, LDL-c<1,4 mmol/l (55mg/dl). Se puede considerar además los tratamientos emergentes: TAPD, doble inhibición, colchicina, icosapento de etilo

aGLP1: agonistas del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1); DOD: daño de órgano diana; EAS: European Atherosclerosis Society; ESC: European Society of Cardiology; HbA1c: glucohemoglobina; HF: hipercolesterolemia familiar; iSGLT2: inhibidores del cotransportador 2 de sodio y glucosa; TAPD: tratamiento antiagregante plaquetario doble.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.2. INFLAMACIÓN Y FISIOPATOLOGÍA EN LA ENFERMEDAD CORONARIA

En la década de 1970, prevalecía cierta incertidumbre con respecto al papel causal de la trombosis en el síndrome coronario agudo (108). Las técnicas de imagen in vivo y el éxito de la terapia antitrombótica y fibrinolítica en el síndrome coronario agudo, establecieron en la práctica el papel de la trombosis en su patogenia. La fisiopatología de la formación de lesiones crónicas de la enfermedad arterial coronaria se consideraba que se debía al almacenamiento de colesterol en la pared arterial, aunque actualmente entendemos la aterogénesis como una interacción compleja de factores de riesgo, que incluyen células de la pared arterial y la sangre y los mensajes moleculares que intercambian entre ellas. Por tanto hoy en día, se conocen varios mecanismos microanatómicos que explican la trombosis coronaria aguda y se otorga a la inflamación un papel protagonista en todas las etapas de la aterogénesis. La inflamación participa en las complicaciones miocárdicas locales y sistémicas de la aterosclerosis (109). Cuando el endotelio arterial se expone a determinadas sustancias asociadas a factores de riesgo cardiovascular (vasopresina en HTA, Apo B en dislipemia, citocinas liberadas por adipocitos en obesidad, productos del metabolismo de la glucosa en diabético, etc...), estas células endoteliales expresan mayor número de moléculas de adhesión de los leucocitos sanguíneos a la membrana de la pared arterial. La transmigración de los leucocitos adherentes depende en gran parte de la expresión de citoquinas quimiotácticas reguladas por señales asociadas con factores de riesgo tradicionales y también emergentes para la aterosclerosis. Una vez que se localizan en la íntima arterial, los leucocitos sanguíneos, principalmente fagocitos mononucleares y linfocitos T, se comunican con las células endoteliales y del músculo liso, las células endógenas de la pared arterial. Los principales mensajes intercambiados entre los tipos de células involucrados en la aterogénesis incluyen mediadores lipídicos como los prostanoides y otros a partir del ácido araquidónico, por ejemplo, los leucotrienos. Otros, como la histamina, regulan de manera efectiva el tono de la musculatura lisa vascular y aumenta y favorece el paso de sustancias a través de la barrera endotelial (110).

Existen otras proteínas mediadoras de la inflamación y la inmunidad, incluidas las citoquinas y los componentes del complemento. Las citoquinas activan los receptores de linfocitos y macrófagos liberando sustancias proaterogénicas, así como también activan a las células lisas musculares para que migren desde la túnica media hacia la íntima. Estas células proliferan y elaboran un rico complejo de matriz extracelular. Junto con las células endoteliales y los monocitos, liberan metaloproteinasas de matriz en respuesta a varias señales inflamatorias,

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

hemodinámicas, oxidativas y de tipo autoinmune. Las metaloproteinas, en equilibrio con sus inhibidores tisulares endógenos, modulan numerosas funciones de las células vasculares, incluida la activación, la proliferación, la migración y la apoptosis celular, así como la neoangiogénesis, la remodelación geométrica, la cicatrización o la destrucción de la matriz extracelular (111). Existen sustancias en la matriz extracelular, especialmente los proteoglucanos, que se unen a las lipoproteínas prolongando su permanencia en la íntima y volviéndolas más susceptibles a la modificación oxidativa y la glicación (112). Estos productos de modificación de lipoproteínas y los productos finales de glicación avanzada, sostienen y propagan la respuesta inflamatoria. Además de la proliferación, la apoptosis ocurre en la lesión aterosclerótica establecida (113). La necrosis o muerte de las células macrofágicas repletas de lipoproteinas puede conducir al depósito extracelular, que se acumula en la íntima y puede coalescender formando el clásico núcleo necrótico rico en lípidos de la placa aterosclerótica, el cual se analizará con detenimiento posteriormente (114).

La remodelación arterial, es un componente clínicamente crítico de la aterogénesis. Debido a la cada vez mayor extensión en el uso de la coronariografía y el éxito de las estrategias de revascularización dirigidas a las estenosis arteriales, el grado de estrechamiento arterial prevaleció como un evento de importante transcendencia en la fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria. Así, se interpretaba el riesgo de eventos como dependiente del grado de estenosis y se visualizaba la aterosclerosis como una enfermedad segmentaria o focal. Ahora, tras años de investigación, es un hecho de probada evidencia que la lesión aterosclerótica crece hacia afuera, o abluminalmente, en lugar de hacia adentro (115). Por tanto, puede existir una carga importante de aterosclerosis sin provocar estenosis significativas en las coronariografias. Los estudios de ultrasonido intravascular coronaria demuestran que las estenosis representan la "punta del iceberg" de la aterosclerosis. En el momento en que las lesiones han progresado hasta el punto de producir estenosis, la aterosclerosis de la íntima, por lo general, es abundante y se presenta difusamente constituyendo un grado avanzado de enfermedad. Pero las lesiones ateroscleróticas que no limitan el flujo, no están carentes de riesgo y constituyen un dilema para la comprensión de los síndromes coronarios agudos en dicho escenario (116). La coronariografía tradicional proporciona sólo estimaciones de la gravedad de la mayoría de las lesiones y en ocasiones la isquemia puede deberse a una obstrucción dinámica superpuesta a las estenosis fijas, sin olvidarnos de aquellas lesiones moderadas que pueden progresar sorprendentemente rápido, anunciando un mal pronóstico cardiovascular (117).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto al síndrome coronario agudo, se ha observado que la ruptura física de la placa aterosclerótica explica casi todas las trombosis coronarias agudas. Las placas rotas provocan trombosis de varias maneras, aunque todas ellas tienen en común un acúmulo de plaquetas activas y de factor tisular (118). También se ha demostrado que un mayor número de lesiones activas conlleva un peor pronóstico en el seguimiento de estos pacientes. Los estudios sistemáticos de ultrasonido intravascular de pacientes con síndrome coronario agudo han objetivado que muchos de ellos tienen más de una placa rota y también las observaciones angioscópicas arrojan hallazgos similares en este campo (119). Por lo tanto, la placa rota representa un estímulo sólido tanto para la trombosis como para la activación de la coagulación y estas vías se refuerzan entre sí, ya que la generación de trombina amplifica la activación de plaquetas y otras células en la lesión aterosclerótica. La transformación de fibrinógeno en fibrina y la liberación por parte de las plaquetas del factor de von Willebrand, puede proporcionar los puentes moleculares de enlace cruzado entre las plaquetas que producen la densa red tridimensional de plaquetas atrapadas en la fibrina, tan característica del denominado trombo arterial blanco (120). Además de los cambios plaquetarios, otras sustancias liberadas a la sangre pueden predisponer a la trombosis coronaria. El inhibidor del activador del plasminógeno-1 extingue el mecanismo fibrinolítico natural del cuerpo, que se encarga de disminuir la carga protrombótica, al inhibir los activadores del plasminógeno de tipo tisular y de tipo uroquinasa. Los niveles circulantes de activador del plasminógeno-1 aumentan en la DM y la obesidad, y proteínas circulantes en pacientes con HTA, como la angiotensina II, pueden aumentar la expresión de activador del plasminógeno-1 en varios tipos de células implicadas en el proceso aterotrombótico. Estos hechos expuestos, traducen una asociación a nivel molecular, entre los clásicos factores de riesgo cardiovascular y las complicaciones vasculares de la enfermedad aterosclerosa (121).

Así, la activación celular múltiple y la activación humoral, implicando la cascada de la coagulación y su sistema natural de fibrinolisis, se asociaron al termino “placa vulnerable”. Dicha placa se considera inestable y con tendencia a las complicaciones trombóticas sobre ella. Los estudios anatomopatológicos establecieron las características de la placa propensa a la ruptura, incluida una cubierta delgada y fibrosa y un gran núcleo lipídico poblado por numerosas células inflamatorias y relativamente desprovista de células de musculo liso. Una ruptura completa de la cubierta fibrosa protectora de la placa causa con mayor frecuencia una trombosis coronaria potencialmente letal para el paciente (122).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Incluso las arterias coronarias aparentemente sanas por angiografía a menudo albergan una carga sustancial de aterosclerosis. En particular, las placas con una remodelación externa importante, o aumento de tamaño compensatorio, pueden tener cubiertas fibrosas delgadas y grandes acumulaciones de lípidos sin invadir la luz. Estas lesiones ocultas, no solo evaden la detección angiográfica, sino que tampoco producen síntomas hasta que desencadenan una trombosis, ya que no producen isquemia al mantener una adecuada circulación de perfusión coronaria (123).

La placa vulnerable puede promover la trombosis distal en la microcirculación, explicando en parte el fenómeno de "no reflujo", que puede complicar la rotura de la placa tanto espontánea como iatrogénica e impedir la reperfusión efectiva de la microcirculación distal, sobre todo en el contexto de Síndrome Coronario Agudo con Elevación del segmento ST (124).

Por otro lado, la alteración de la función endotelial normal favorece la vasoconstricción a través de la disminución de la síntesis de óxido nítrico (NO) y el aumento de la síntesis de endotelina I y angiotensina II (125). La activación de las células endoteliales está mediada por las citocinas proinflamatorias y el Factor de Necrosis Tumoral α (TNF-α). La activación de las células endoteliales aumenta la selectina E, la Molécula de Adhesión de Células Vasculares (VCAM-1) y la Molécula de Adhesión Intercelular (ICAM-1), lo que facilita la unión de monocitos y linfocitos T al endotelio (126).

Las citocinas o mediadores quimiotácticos dirigen la migración de los leucocitos adheridos al endotelio hacia la capa más interna de la arteria, la túnica íntima (127). Una vez en la pared de la arteria, los monocitos, los glóbulos blancos más numerosos en las placas, se diferencian en macrófagos que expresan "receptores carroñeros o basura" para lipoproteínas modificadas, como la LDL-c oxidada (128) y se convierten en "células espumosas", una definición en base a la morfología vista a través del microscopio de estos macrófagos cargados de lipoproteínas. El grupo de diferenciación (CD36) y el receptor de lipoproteína de baja densidad (LOX-1) similar a la lectina oxidada, permiten la internalización de LDL-c oxidada y promueven la conversión de macrófagos en células espumosas. Además, estas células espumosas en la placa de ateroma también tienen funciones proinflamatorias, característica de los macrófagos M19, que producen altos niveles de Interleucina-1β (IL-1β) y TNF-α y citocinas como la Proteína Quimiotáctica de Monocitos 1 (MCP-1) que estimulan la expresión de moléculas de adhesión de células endoteliales y provocan una acumulación continua de leucocitos en la íntima y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) que induce a la diferenciación de los

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

leucocitos a macrófagos. El reclutamiento de células inmunitarias adicionales en la íntima, en particular linfocitos T y mastocitos, contribuye a los procesos inflamatorios extravasculares. Además, los linfocitos y mastocitos pueden también quedar retenidos en la placa de ateroma, pero en menor cantidad que los macrófagos (129).

Los linfocitos T dentro de la íntima, son predominantemente células T auxiliares (Linfocitos T Helper 1 o LTh1). Estas células secretan citoquinas, incluyendo interferón (IFN)-γ, IL-2 y TNF-α, y potencian así la respuesta inflamatoria local (130).

Los estímulos inflamatorios comentados, así como la migración y proliferación de células musculares lisas vasculares (VSMC) de la túnica media de la pared de la arterial, hacia la túnica íntima, hacen crecer las placas ateroscleróticas a lo largo del tiempo (131). Estas células proliferan en respuesta a estímulos quimiotácticos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas y sintetizan y secretan colágeno, lo que da como resultado la expansión de la matriz extracelular y la formación de una cubierta fibrosa. Esta placa fibrosa cubre típicamente un acúmulo de células espumosas que tras su apoptosis liberan lípidos que se acumulan extracelularmente. Además, las VSMC secretan citocinas y quimiocinas que promueven el reclutamiento de leucocitos, aumentan la permeabilidad endotelial y contribuyen a la expansión de las placas. Las citocinas también estimulan la expresión de factores de coagulación como el Factor Tisular (TF) por macrófagos, células endoteliales y VSMC. El TF actúa como un potente iniciador de la cascada de la coagulación a través de la interacción con el factor de coagulación VII del plasma, lo que genera la generación de trombina y la consiguiente activación de las plaquetas y la conversión del fibrinógeno en fibrina. La unión del ligando CD40 (CD40L) a los receptores CD40 en linfocitos T activados, células endoteliales, VSMC y macrófagos, hace que éstos posteriormente expresen TF (132). A la larga, este proceso puede promover el acúmulo de desechos celulares (LDL oxidada en los macrófagos) y lípidos extracelulares, formando un grupo rico en lípidos llamado núcleo necrótico de la placa (133).

La localización de las lesiones ateromatosas en las arterias coronarias probablemente refleje diferencias hemodinámicas y hemorreológicas en diferentes segmentos del árbol arterial coronario (134) y la pérdida de adaptación y regulación genética a la tensión de cizallamiento laminar por parte del endotelio (135).

Por otro lado, los fenómenos de trombosis a menudo surgen después de la ruptura de la placa, más frecuentemente una fractura de la cápsula fibrosa que pone de manifiesto el núcleo necrótico de la placa a las proteínas procoagulantes del plasma, lo que desencadena la cascada

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

trombogénica. Estas placas que se rompen típicamente tienen cubiertas fibrosas delgadas y pobres en colágeno con pocas células musculares lisas pero abundantes macrófagos. Estos últimos pueden acelerar la ruptura de la placa al elaborar enzimas colagenolíticas y generar mediadores que provocan la muerte de las células musculares lisas, disminuyendo por tanto el colágeno arterial (136). Por todo ello, estas placas pueden sufrir procesos de ruptura, fisuras o erosión, con la posterior activación de la cascada trombótica que puede dar lugar a una oclusión completa del vaso sanguíneo (aterotrombosis) con manifestaciones como el IAM, el ACV o la isquemia aguda periférica en extremidades inferiores (103,137).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

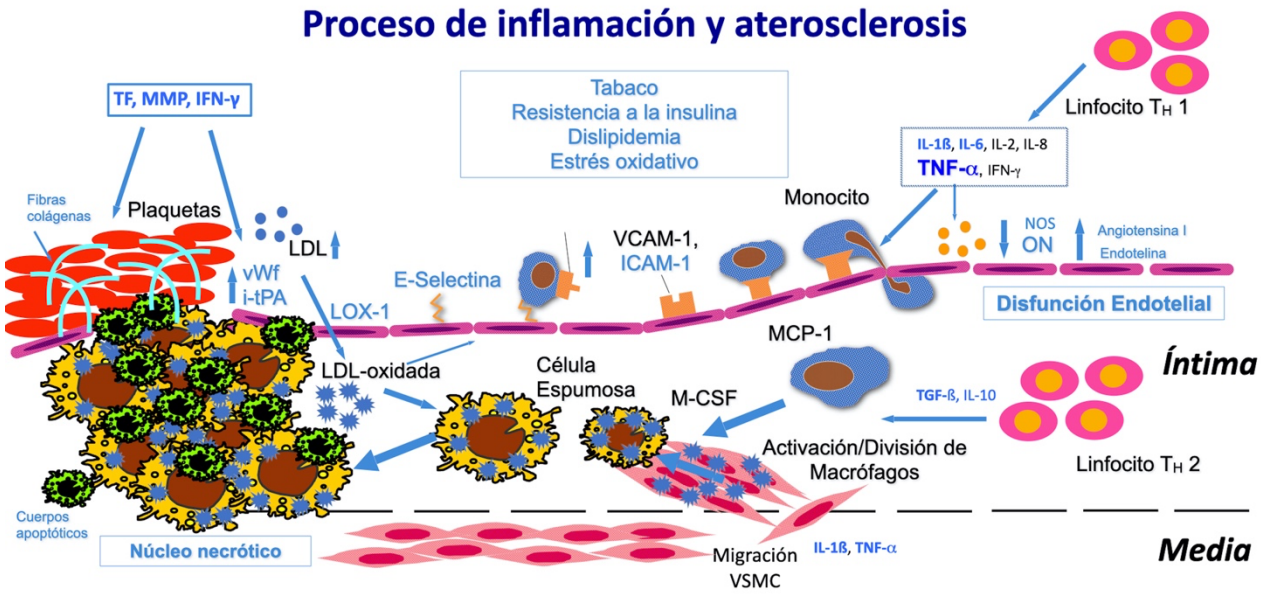


Figura 1.- Proceso de inflamación y aterosclerosis. ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular 1, IFN-γ: Interferón gamma, IL: interleucina, iTPA: Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1, LDL: lipoproteína de baja densidad, LOX-1: Receptor de lipoproteinas de baja densidad oxidadas 1, MCP-1: Proteína quimioatrayente de monocitos 1, MCSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos, MMP: Metaloproteinasas de matriz, NO: Oxído nítrico, NOS: Oxido nítrico sintetasa, TGF-ß: Factor de crecimiento transformante beta, TNF-α- Factor de necrosis tumoral alfa, TF: Factor tisular, VCAM-1: Molécula de adhesión de células vasculares 1, VSMC: célula muscular lisa vascular, vWF: Factor von Willebrand. Fuente: Elaboración propia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1.3. PRINCIPALES BIOMARCADORES CARDIACOS Y SU RELACIÓN CON LA ENFERMEDAD CORONARIA

El concepto de biomarcador surge en el año 1989 y el National Institute of Health en el 2001 lo define textualmente como "una característica objetivamente medible y evaluada como indicadora de procesos biológicos normales, patológicos, o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica" (138). A nivel estructural se pueden determinar en el laboratorio de bioquímica, como moléculas sintéticas, enzimas, proteínas y/o productos metabólicos, cuya particularidad es que representan indirecta o directamente procesos biológicos y/o patológicos activos.

A grandes rasgos la diferencia entre factor de riesgo y biomarcador es que el primero se relaciona con la enfermedad y forma parte en algún momento de la causa de la misma, mientras que un biomarcador se asocia estadísticamente con la enfermedad, pero no se reconoce como causa de ella (138).

Los biomarcadores de enfermedad cardiovascular pueden ser plasmáticos circulantes y urinarios, deben estar elevados o disminuidos en presencia de la enfermedad, existir evidencia sobre su asociación causal con la patología reseñada a través de estudios con casos y controles y estudios de seguimiento prospectivo, demostrar su poder discriminatorio a la hora de separar casos de controles, así como optimizar el poder predictivo del riesgo de enfermedad cardiovascular a 10 años calculado con la escala de riesgo. Los biomarcadores pueden participar en cualquier etapa de la formación de la placa ateromatosa o simultáneamente en varios procesos de la aterogénesis (139).

La evaluación del riesgo de eventos cardiovasculares entre los pacientes con enfermedad coronaria estable se basa principalmente en características clínicas y biomarcadores que indican, entre otros, dislipidemia, disfunción renal, resistencia a la insulina o DM y biomarcadores inflamatorios. Se ha descrito que el recuento de glóbulos blancos con Odds Ratio (OR) de 1,21 por cada 10^6 células/litro, la glucosa en ayunas con OR= 1,29 por mmol o la creatinina sérica (OR= 1,02 por micromol) se han visto asociados a la mortalidad cardiovascular en pacientes con angina de pecho, aunque no pueden considerarse biomarcadores de la misma (140).

El diagnóstico bioquímico de inflamación viene establecido por la elevación de los niveles plasmáticos de mediadores inflamatorios como el factor de necrosis tumoral alfa, las interleucinas o reactantes de fase aguda como la Proteína C Reactiva (PCR), el fibrinógeno, la proteína amiloide sérica A, el fibrinógeno y la alfa-1-antitripsina, entre otros. En la cardiopatía

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

isquémica y enfermedad coronaria aterosclerótica se han definido varios marcadores inflamatorios. Por ejemplo, el eje IL1ß e IL-6 activa en la respuesta inicial aguda, induciendo la liberación de PCR e involucrada en la evolución, crecimiento y complicación de la placa de ateroma (141).

En general, los biomarcadores se pueden clasificar en inflamatorios, trombóticos, marcadores relacionados con el metabolismo de la glucoxidación y lipogénesis y marcadores específicos de daño orgánico. Sin embargo, a efectos de la estimación general del riesgo cardiovascular, estas distinciones generalmente no son relevantes, más allá de que determinados marcadores pueden establecer un valor predictivo pronóstico de la enfermedad (142).

Algunos pueden ser biomarcadores causales o directamente relacionados con la patología, por ejemplo, la Lp(a), que refleja carga lipídica patogénica, sin embargo otros pueden manifestar procesos, como la PCR, que refleja inflamación u otros como los péptidos natriuréticos o la troponina cardiaca, que indican daño cardiaco (143).

A lo largo de los años, las revisiones o metaanálisis muestran que en general, los biomarcadores circulantes y urinarios tienen una capacidad limitada para mejorar la clasificación del riesgo cardiovascular. Sin embargo, la medida en que se han probado en cuanto a su capacidad para agregar valor a la estratificación del riesgo varía considerablemente, con fuerte evidencia de sesgos de publicación, por lo que a día de hoy no se recomienda su empleo de manera sistemática en la población general (144). Aunque cuando se utilizan nuevos biomarcadores como modificadores de riesgo para la reclasificación de los pacientes, es importante tener en cuenta que poseer un perfil de dichos marcadores adversos, puede estar asociado con un riesgo algo mayor, pero es esencial un conocimiento detallado de la prevalencia de este factor de riesgo, específico para el perfil de los pacientes (145). Es por eso por lo que, en estos pacientes, particularmente con un perfil de riesgo cardiovascular moderado, solo se justifican ajustes relativamente pequeños en el riesgo calculado, y los pacientes que claramente tienen un riesgo alto o bajo no deben reclasificarse en función de los biomarcadores (146).

Los biomarcadores cardiacos y su uso en la población general son prometedores, pero se necesitan más estudios que pueden aclarar la utilidad y la implementación pronóstica de los mismos en este nicho concreto. Así, por ejemplo, en un trabajo reciente se estudiaron más de 150.000 participantes a los que se determinó la troponina T, demostrando que en la población general, concentraciones altas de troponina T por encima del rango normal se asocian con aumento del riesgo cardiovascular, incluso de manera independiente de los factores de riesgo

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cardiovascular clásicos y muy robusto como biomarcador para enfermedad cardiovascular fatal, aplicando tanto para patología coronaria como cerebrovascular (147).

1.3.1 Troponina.

La troponina es el biomarcador de elección para la detección de daño cardíaco, tanto por su especificidad como por su rapidez y facilidad de detección a nivel hospitalario. La Troponina es una proteína detectada en plasma consecuencia del daño miocárdico. Este daño puede producirse por múltiples etiologías, destacando la causa isquémica coronaria (aterotrombosis, síndrome coronario agudo) como la más frecuente con diferencia. Además, podemos encontrar niveles séricos elevados de Troponina en otras patologías no coronarias: miopericarditis, tromboembolismo pulmonar, daño traumático cardiaco y sepsis entre otras (148).

El complejo de Troponina de tres unidades: Troponina I, T y C, junto con la tropomiosina, se halla en el filamento de actina y es esencial para la regulación mediada por calcio de la contracción del músculo esquelético y cardíaco (149). Existen isoformas específicas de tejido de la troponina I, T y C. Debido a que la isoforma cardíaca de la troponina C es compartida por los músculos esqueléticos de contracción lenta, la troponina C no tiene especificidad cardíaca y no se usa para diagnóstico específico de lesión cardíaca (150). La isoforma de troponina I cardíaca, en el tejido miocárdico, tiene 32 aminoácidos en el extremo N-terminal, esta disimilitud con las secuencias de las otras isoformas, han hecho posible la generación de anticuerpos monoclonales altamente específicos, sin reactividad cruzada con otras formas no cardíacas, por lo que es altamente específica de daño miocárdico (151). Tres genes controlan la troponina T cardíaca. Estos genes producen una serie de isoformas con secuencias variables cercanas a las regiones del extremo N-terminal y C-terminal. El músculo cardíaco humano contiene 4 troponinas isoformas T, pero sólo una es característica del corazón normal en un adulto. Se han producido anticuerpos altamente específicos contra la secuencia específica del extremo N de esta isoforma de troponina T cardiaca, constituyendo un biomarcador eficaz de daño miocárdico (152).

Estudios clásicos demostraron tanta o más capacidad diagnóstica de la Tn I como de la subunidad de la creatinquinasa (CK-MB). También existe lo que se ha denominado un grupo citosólico de troponina no unida que se libera de forma aguda, imitando la cinética de aparición de otras proteínas citosólicas como la CK-MB. Este grupo representa alrededor del 6 % de Troponina T y el 3% de la Troponina I, que es similar a la concentración de la isoenzima CK-

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

MB, con una concordancia del 96,6%, siendo indistinguibles estos dos biomarcadores en cuanto a la precisión diagnóstica de infarto de miocardio (153).

Al igual que la CK-MB, las concentraciones de troponina cardíaca comienzan a aumentar 4 a 6 horas después del inicio de los síntomas en el IAM. Debido a su cinética se recomienda obtener una muestra de sangre al ingreso y nuevamente de 6 a 9 horas después, finalmente su pico máximo se obtendrá entre 18 y 24 horas tras el inicio de los síntomas. Las altas concentraciones serán diagnósticas de daño miocárdico, aunque en ausencia de evidencia clínica de que la lesión se deba a isquemia coronaria, se deben buscar otras causas alternativas (154).

A diferencia de la CK-MB, que puede verse francamente elevada por daño muscular esquelético o fracaso renal, la Troponina es específica cardiaca. El aumento de la sensibilidad probablemente refleja el hecho de que el porcentaje de troponina liberada que llega a la sangre después de una lesión cardíaca es mayor para la troponina que para la CK-MB (155). Las concentraciones séricas elevadas de troponina permanecen en la sangre debido a la liberación lenta, ya que la semivida de la troponina es de unas 2 horas. La ventana extendida, durante la cual los niveles de troponina están elevados, permite una mayor detección clínica de eventos cardíacos y, por tanto, funcionalmente una mayor sensibilidad clínica (156).

En los primeros ensayos clínicos realizados en pacientes con IAM se encontró que alrededor del 33 % de los pacientes que presentaban síntomas de síndromes coronarios agudos tenían niveles elevados de troponina en ausencia de niveles elevados de CK-MB y estos niveles altos de troponina, conferían un mayor riesgo tanto a corto como a largo plazo (157).

Los análisis de troponina no solo son más sensibles, sino que también son más específicos, que la CK-MB. Ésta última no es exclusiva del corazón ya que se encuentra en el músculo esquelético, el tracto gastrointestinal, en el útero de mujeres embarazadas y aparece elevada en situaciones de trauma, rabdomiólisis, miopatías, enfermedad renal o durante el periparto. Es por ello por lo que la troponina cardiaca I y T brindan información comparable, excepto en pacientes con enfermedad renal y son los biomarcadores ideales para el diagnóstico de daño miocárdico (158).

Ya desde el año 2000, un comité conjunto de la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología emitió nuevos criterios que reconocían que las elevaciones de estos biomarcadores eran fundamentales para el diagnóstico de IAM, ya que los síntomas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pueden ser atípicos o inexistentes y los cambios en el electrocardiograma pueden estar ausentes o ser inespecíficos (159,160).

En el grupo de pacientes con síndromes coronarios agudos, los niveles elevados de troponina cardiaca I o T son un indicador de pronóstico adverso, incluso tras el ajuste por predictores clínicos y hallazgos del electrocardiograma (161). En pacientes con infarto de miocardio sin elevación del segmento ST, los datos angiográficos sugieren que hay placas más agudas y complejas, enfermedad más extensa, trombos y reducción de los grados de flujo coronario, cuando los niveles de troponina están más elevados (162).

Los niveles de troponina al ingreso también son valiosos para los pacientes con infarto de miocardio con elevación del segmento ST, ya que independientemente de la terapia inicial, un nivel elevado de troponina es predictor independiente de muerte a los 30 días y durante el seguimiento a largo plazo (163).

En resumen, sea cual sea el tipo de Síndrome coronario Agudo, con Elevación del Segmento ST o Sin Elevación del Segmento ST, existe una relación entre la magnitud del aumento de los niveles de troponina y los eventos adversos durante el seguimiento (164) y el valor pronóstico de la troponina cardiaca I y T parece equivalente (165).

Otro papel de la Troponina es predecir el tamaño del infarto, ya que se puede estimar a partir del valor de troponina medido a las 72 horas (166). Los datos son más sólidos con troponina cardiaca T que con I, lo que sugiere que el nivel de TnT medido a las 72 horas es una buena estimación del tamaño del infarto gammagráfico independientemente que los pacientes hayan sido reperfundidos o no (167).

Además, gracias a la determinación de troponinas se han podido filiar otro tipo de infartos relacionados con los procedimientos intervencionistas. Así, después de las intervenciones coronarias percutáneas, los aumentos en los niveles de troponina por encima del percentil 99, son indicativos de lesión miocárdica y, por lo tanto, cumplen la definición de infarto agudo de miocardio (159). En este contexto, parece importante diferenciar los pacientes con síndromes coronarios agudos que pueden tener elevación de troponina al inicio debido a la liberación continua de troponina, de aquellos otros en los que la liberación de troponina está relacionada con la intervención coronaria percutánea. Tanto es así, que pacientes con infarto agudo de miocardio con determinación inicial de Troponinas elevada, presentan peores resultados clínicos, tasas más bajas de flujo TIMI 3 postprocedimiento y perfusión miocárdica más comprometida a pesar del flujo epicárdico normal, pudiendo beneficiarse de terapias

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

complementarias más agresivas (168). Aunque se ha considerado que un aumento de más del 25% después del procedimiento, podría estar relacionado a la lesión por la intervención coronaria percutánea, un nivel de troponina de referencia es esencial para la interpretación adecuada de las elevaciones posteriores a la intervención coronaria percutánea (169).

1.3.2 Péptido natriurético tipo B y Propéptido Natriurético tipo B N-terminal

En la actualidad, los biomarcadores más importantes en enfermedad arterial coronaria son las troponinas cardíacas, que se han convertido en la clave para el diagnóstico de pacientes con síndromes coronarios agudos y el péptido natriurético tipo B (BNP) y su fragmento N-terminal (NT-proBNP). Ambos biomarcadores han demostrado su utilidad diagnóstica, por tanto, han pasado del laboratorio a la aplicación clínica diaria en el escenario de la cardiopatía isquémica (170).

El BNP, que también se denomina péptido natriurético de tipo cerebral, se describió por primera vez en 1988 después de aislarlo del cerebro porcino (171). Sin embargo, pronto se descubrió que se originaba principalmente en el corazón como una hormona cardíaca. El BNP pertenece a la familia de los péptidos natriuréticos junto con otros péptidos estructuralmente similares, en su estructura bioquímica que se caracterizan por un anillo de 17 aminoácidos y un puente disulfuro entre dos moléculas de cisteína (172).

La principal fuente de síntesis y secreción de BNP es el miocardio ventricular. Se sintetiza como una prohormona de 108 aminoácidos (proBNP). Tras su liberación a la circulación, el proBNP se separa en proporciones iguales, es decir, en el BNP, de 32 aminoácidos biológicamente activo, que es el fragmento C- terminal, y en el fragmento N-terminal de 76 aminoácidos biológicamente inactivo (173).

El estímulo más importante para el incremento de la síntesis y secreción de BNP y su fragmento N-terminal, es el estrés de la pared miocárdica (174). En la circulación sistémica, el BNP media una variedad de efectos biológicos al interactuar con el receptor del péptido natriurético tipo A, lo que conduce a la producción intracelular de GMP cíclico. Los efectos fisiológicos del BNP son múltiples y comprenden natriuresis, vasodilatación periférica e inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona y del sistema nervioso simpático (175). El BNP se elimina del plasma al unirse al receptor del péptido natriurético tipo C, mediante proteólisis por endopeptidasas neutras y su fragmento N-terminal se elimina principalmente por excreción renal (176). La vida media del BNP es de 20 minutos, mientras que el proBNP y NT-

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

proBNP tiene una vida media de 120 minutos; esta diferencia explica por qué los niveles séricos de NT-proBNP son aproximadamente seis veces más altos que los niveles de BNP, a pesar de que ambas moléculas se liberan en proporciones similares (170).

Las concentraciones plasmáticas elevadas de BNP y su NT-proBNP se han asociado con el riesgo de muerte cardiovascular, insuficiencia cardíaca y accidente cerebrovascular en pacientes con enfermedad coronaria (177). Por otro lado, se ha observado que las concentraciones de BNP en la fase aguda y subaguda de un infarto de miocardio estaban fuertemente asociadas con la mortalidad y esta evidencia pronto se demostró también en pacientes con enfermedad coronaria estable (178). El valor predictivo de BNP y NT-proBNP para eventos cardiovasculares adversos es más alto que dicho valor para la mayoría de los otros biomarcadores como las Troponinas de alta sensibilidad, factores de crecimiento, factor de necrosis tumoral, interleucinas, entre otros (179).

Los niveles de BNP y su fragmento NT-proBNP están elevados en pacientes con insuficiencia cardíaca; además, estos niveles están relacionados con la gravedad de la misma, según lo indicado por la clase funcional de la NYHA (New York Heart Association) y la fracción de eyección sistólica del ventrículo izquierdo (173). Independientemente de su valor diagnóstico, los niveles altos de ambos biomarcadores brindan información pronóstica para mortalidad total, muerte cardiovascular y reingreso hospitalario en pacientes con insuficiencia cardíaca (180). Además, su valor pronóstico perdura en el tiempo y así, el BNP y su fragmento NT-pro BNP muestran superioridad frente a otros parámetros pronósticos incluso a 6 años (181). Es por este alto valor pronóstico por lo que el BNP y el NT-pro BNP se han convertido en potentes biomarcadores en enfermedad cardiovascular para predecir mortalidad, así como en pacientes con insuficiencia cardiaca aguda o crónica (182).

Se ha postulado como la variación en las concentraciones de BNP en plasma a lo largo del tiempo podría reflejar un cambio en la función cardíaca, como se objetivó durante los meses posteriores a un IAM (183) o insuficiencia cardíaca descompensada o tras tratamientos modificadores de la enfermedad cardiovascular (184). Incluso en adultos aparentemente sanos, los niveles elevados de BNP se asociaron con un elevado riesgo de desarrollar eventos cardiovascular adversos y a una mayor mortalidad cardiovascular (185).

En el ensayo clínico EXCEL, se incluyeron biomarcadores circulantes como orientación para seleccionar la terapia óptima de revascularización de cirugía aorto-coronaria frente al implante de stent coronario Xience en pacientes con enfermedad coronaria. Se documentó una

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fuerte asociación entre las concentraciones más altas de BNP que se asociaron con el riesgo de muerte, pero no con la incidencia de infarto de miocardio no fatal, accidente cerebrovascular o revascularización repetida. Las características angiográficas, incluida la puntuación SYNTAX, no se asociaron con los niveles de BNP (186). Se ha demostrado que mientras concentraciones de BNP por debajo del límite de 100 ng/l parecían beneficiarse del tratamiento con implante de stent, en pacientes con concentraciones de BNP más altas, la cirugía de revascularización tendía a asociarse con un riesgo menor que el Intervencionismo Coronario Percutáneo. Ante estos hallazgos, se plantea la hipótesis de que las mediciones de BNP pudieran tener valor a la hora de seleccionar la estrategia de revascularización óptima en pacientes con enfermedad obstructiva del Tronco coronario izquierdo (187) Los pacientes con BNP elevado tuvieron tasas significativamente más altas a los 3 años del evento principal de valoración (18,6 % frente a 11,7 %; P=0,005) y más alta mortalidad (11,5 % frente a 3,9 %; P=0,0006), tanto por causas cardiovasculares como por mortalidad no cardiovascular. Por otro lado, no hubo diferencias significativas en los riesgos de IAM, ACV, revascularización provocada por isquemia, trombosis del stent, oclusión del injerto o hemorragia mayor (188).

Los péptidos natriuréticos pueden no solo estar asociados con el riesgo absoluto de muerte, sino también, proporcionar información que pudiera modificar la actitud clínica. Este hecho es más relevante en el ensayo SYNTAX en el que se sugiere que en pacientes aleatorizados a Cirugía de revascularización Aorto-Coronaria frente a revascularización percutánea, las principales causas de muerte cardiovascular están relacionadas con insuficiencia cardíaca y arritmias cardíacas, eventos que están fuertemente asociados con los niveles de BNP y potencialmente modificables mediante tratamiento médico, por lo que el BNP podría servir como una “monitorización” del tratamiento médico óptimo (189).

El papel del BNP también ha sido estudiado en el ensayo MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis), en el que se relacionaba la fibrosis cardiaca medida mediante Resonancia Magnética Nuclear y los niveles de NT-ProBNP en un total de 1334 participantes, observando que los niveles altos del biomarcador se correlacionaban con fibrosis subclínica miocárdica (190). Además, se demostró que, en una población con cardiopatía isquémica estable con función sistólica conservada, el riesgo futuro de insuficiencia cardiaca, arritmias graves y riesgo de muerte, se incrementaba en aquellos pacientes con BNP más altos (191).

En el subgrupo de cardiopatía isquémica también se ha evaluado el valor del péptido natriurético a lo largo del tiempo. Así, en pacientes con antecedentes de infarto de miocardio o

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

angina inestable, la fuerza de la asociación entre la concentración plasmática de BNP y el riesgo de muerte cardiovascular se mantuvo durante al menos una década. Debido a que existe una variación aleatoria considerable en las concentraciones plasmáticas de BNP, el promedio de 2 mediciones de BNP con 1 año de diferencia fue un predictor más preciso en comparación con el BNP medido al inicio o tras solo 1 año desde la primera determinación (192).

1.3.3 Proteina C Reactiva

Entre los biomarcadores más extensamente estudiados y discutidos está la Proteína C Reactiva (PCR) también llamada proteína C reactiva de alta sensibilidad por el hecho de poder precipitar el polisacárido-C somático del *Streptococcus pneumoniae* (193). Fue descrita por vez primera por Tillet y Frances en 1930 y fue la primera proteína de fase aguda que se descubrió. Como constituyente de la denominada inmunidad innata, la PCR se sintetiza como reacción al daño tisular debido a infecciones, neoplasias o inflamación. Concretamente, su producción depende principalmente de los hepatocitos y las células endoteliales vasculares, regulada por las citoquinas, especialmente por la IL-6 y el TNF (194). Así, la PCR es una proteína pentamérica anular que, aunque se sintetiza principalmente en el hígado, también puede producirse por parte de leucocitos y adipocitos (195) y se encuentra aumentada en el plasma sanguíneo en respuesta a la inflamación y a distintos factores de riesgo cardiovascular (196). Lo que define la operatividad de la PCR es su facultad para unir ligandos específicos dependientes de calcio, ya que se asocia a moléculas de fosfocolina con elevada afinidad por ella, así como a una amplia variedad de ligandos tanto autólogos como heterólogos. La PCR cuando está asociada a ligandos macromoleculares puede activar la vía clásica del complemento y promover la fagocitosis por parte de los macrófagos que eliminan las células necróticas.

La síntesis de la PCR se inicia seis horas después del estímulo inflamatorio y llega a niveles máximos entre 24 a 72 horas. Su vida media es de 19 horas, con una constante concentración en el plasma y sin modificarse por la variación circadiana, a diferencia de las estructuras proteicas que intervienen en la cascada de la coagulación u otras proteínas de fase aguda. Una vez finalizado el estímulo de la IL-6, la PCR regresa a valores normales en siete días.

Se ha demostrado que la PCR es un biomarcador de inflamación sistémica y su nivel sérico es estable en ausencia de inflamación, sin embargo, su nivel aumenta en los hepatocitos por estimulación con IL-6. Los pacientes con niveles basales elevados de PCR tienen un mayor riesgo de diabetes, hipertensión y enfermedades cardiovasculares (197).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Las condiciones más frecuentes asociadas a su elevación son procesos infecciosos, hipersensibilidad, enfermedad inflamatoria, malignidad, necrosis y trauma. La PCR destaca ya que su importancia no solo radica en su sensibilidad, sino que se ha comprobado que forma parte activa en la patogenia de la aterosclerosis y hoy por hoy es un predictor independiente de enfermedad cardiovascular. La interacción de la inflamación en la aterosclerosis es un hecho y se ha demostrado que la inflamación está implicada en todas las fases de la evolución de la placa de aterosclerosis, desde la formación y el crecimiento, hasta la posible complicación con ruptura y/o erosión de la placa de ateroma (142).

La PCR está presente en las arterias con lesiones ateroescleróticas, además de inducir la multiplicación de células inflamatorias y disminuir la expresión de la enzima Óxido Nítrico Sintetasa (NOS) en las células endoteliales. La asociación entre PCR y enfermedad cardiovascular se mantiene incluso tras ajustar por variables modificadoras de riesgo como puede ser el tabaco, la edad, el colesterol, DM, antecedentes familiares de cardiopatía, HTA, índice de masa corporal y nivel de ejercicio (138). En la aterogénesis, la inflamación se asocia con vasodilatación, que aumenta la permeabilidad del endotelio vascular, favoreciendo el reclutamiento de las células inflamatorias y la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios. Las citoquinas derivadas de macrófagos como IL-1 e IL-6, son las principales responsables de la respuesta de fase aguda, una manifestación de la respuesta defensiva en la producción de proteínas plasmáticas (198).

En resumen, la PCR provoca disfunción endotelial y promueve la activación y la migración de macrófagos y linfocitos en la íntima de la pared arterial. Esto favorece la formación de daño vascular inflamatorio, que es fundamental en la evolución de la aterosclerosis. Existe una relación bidireccional causa-efecto entre la ateroesclerosis y la inflamación. Sin importar el origen del proceso inflamatorio, la inflamación crónica, aunque sea por enfermedades autoinmunes incrementa notablemente el riesgo de enfermedad cardiovascular (199). Las LDL-c plasmáticas alcanzan determinadas concentraciones en la sangre que favorecen su penetración y difusión al interior de la pared arterial donde son transformadas mediante procesos de oxidación. La PCR se une a estas lipoproteínas oxidadas y favorece que sean fagocitadas e internalizadas por macrófagos presentes en la íntima arterial, promoviendo así la formación de las células espumosas. El acúmulo de células espumosas es fundamental para la formación de la placa aterosclerosa, ya que la favorece la predisposición a la erosión o ruptura de placa, que conllevará la activación de la cascada protrombótica a lo que también se suma a la capacidad

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de la PCR de la estimulación de los macrófagos para producir factor tisular, molécula que activa la cascada de la coagulación (200).

La PCR también favorece el aumento de la síntesis de metaloproteasas, enzimas que degradan componentes de la matriz extracelular, causando adelgazamiento y vulnerabilidad de la capa fibrosa de las placas ateroscleróticas, haciéndola más propensa a la ruptura. De hecho, se han observado niveles elevados de PCR en pacientes con enfermedad coronaria (tanto síndrome coronario agudo como síndrome coronario crónico) y se han correlacionado con la composición y complejidad de la placa de ateroma (201).

La asociación entre el riesgo de enfermedad coronaria con altos niveles de PCR ha sido demostrada en un estudio prospectivo multicéntrico, siendo un biomarcador más fiable que los niveles de LDL-c (202). Las estatinas pueden reducir los niveles sanguíneos de PCR y otros marcadores de inflamación. Estas reducciones respaldan la importancia de los efectos antiinflamatorios de estos fármacos, así como los eventuales beneficios de la terapia antiinflamatoria o moduladora del sistema inmunitario dirigida específicamente a la aterosclerosis. Una combinación de algunos de estos marcadores con otros, como las variantes genéticas, puede proporcionar nuevos conocimientos sobre los mecanismos subyacentes del inicio y la progresión de la aterosclerosis y la vulnerabilidad de la placa y, finalmente, pueden guiar la terapia futura. En esta línea, se determinó que las personas que más se benefician de la terapia con aspirina y estatinas en los ensayos de prevención primaria, eran aquellas con valores elevados de PCR (202).

Un estudio reciente, demostró que la obesidad de distribución central incrementa aún más los niveles de PCR, ya que la grasa intraabdominal generara tres veces más IL-6 que la grasa subcutánea y además, se ha demostrado que el adipocito posee la capacidad de expresar ARNm de la PCR (203).

Por lo tanto, la PCR como biomarcador ha mostrado consistencia en grandes estudios prospectivos acercándose al valor predictivo de los factores de riesgo cardiovascular clásicos (142).

1.3.4 Lipoproteina a

La lipoproteína-a (Lp(a)) es una partícula similar a la proteína de baja densidad de colesterol (LDL-c) unida a una gran glicoproteína similar al plasminógeno (la apolipoproteína a, unida covalentemente a la Apo B) (204). Ensayos previos in vitro y con animales, han

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

demostrado el papel de la Lp(a) en el proceso de la aterosclerosis, con la proliferación de las células musculares lisas vasculares, la formación de células espumosas y el crecimiento e inestabilidad de la placa de ateroma (205).

En pacientes con concentraciones elevadas de Lp(a), la cantidad de colesterol proaterogénico suele ser considerablemente menor que la que transporta la LDL, aunque los estudios *in vivo* han señalado que dicha Lp(a) tiende a acumularse preferencialmente en la pared del vaso, por lo que podría aumentar su potencial aterogénico frente al LDL-c (206). Además, la Lp(a) también se ha identificado como uno de los principales transportadores de fosfolípidos oxidados, considerados estos últimos, moléculas con efectos proinflamatorios y proaterogénicos (207). Los estudios en animales han demostrado que la Lp(a) posee una estructura similar al plasminógeno, con la que se une a la plasmina, y mediante una unión competitiva inhibe su función, evitando la fibrinolisis y promoviendo por tanto la trombosis (208).

Se ha comprobado una asociación de altas concentraciones de Lp(a) con un mayor riesgo de ECV en numerosos estudios observacionales, y donde una multitud de datos de estudios experimentales generalmente respaldan un efecto fisiopatológico, ensayos randomizados para reducir los niveles de Lp(a) un 20-30% no han demostrado beneficios cardiovasculares, más allá de los esperados por la reducción de las lipoproteínas que contienen ApoB. Sin embargo, estudios recientes con Inhibidores del receptor PCSK9 muestran un futuro esperanzador a través de la posibilidad de reducir el riesgo cardiovascular al reducir la Lp(a) (209).

A pesar de que las altas concentraciones en plasma de Lp(a) se asocian a un mayor riesgo cardiovascular, su efecto parece ser mucho más débil que la asociación de este riesgo con las concentraciones de LDL-c (210). Sin embargo, en los últimos años, en el campo de la epidemiología genética, varios estudios han proporcionado una fuerte evidencia de asociaciones causales de Lp(a) con un mayor riesgo de enfermedad valvular aórtica, enfermedad coronaria, insuficiencia cardíaca y mortalidad de origen cardiovascular (211–213).

Aunque la Lp(a) juegue un papel en la enfermedad coronaria, su capacidad para reclasificar el riesgo cardiovascular es limitado, añadiendo poco valor, salvo en caso de concentraciones de Lp(a) extremas (>180 mg/dl), como se demostró en un estudio con más de 8000 pacientes daneses, en los que sólo los valores extremos aumentaban la probabilidad de riesgo de cardiopatía isquémica e infarto de miocardio (214).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En definitiva, la Lp(a) ha ganado en los últimos años mucha relevancia y tanto es así que las Guías Europeas de Cardiología en manejo de la dislipemia, recomiendan que se debe considerar la medición de Lp(a) al menos una vez en la vida en personas adultas para identificar a aquellos con niveles de Lp(a) heredados muy altos >180 mg/dL (>430 nmol/L), ya que pueden tener un riesgo aumentado de por vida de enfermedad aterosclerosa cardiovascular (215).

1.3.5 Complemento

El sistema del complemento es uno de los protagonistas clave de la respuesta inmunitaria en la defensa frente a estímulos adversos. Se sintetiza principalmente en los hepatocitos, aunque también se ha encontrado en monocitos, macrófagos y células epiteliales de tracto gastrointestinal y genitourinario. El complemento consta de unos elementos que constituyen cascadas bioquímicas cuya misión es favorecer e impulsar la respuesta inflamatoria, así como promover la fagocitosis de patógenos, incluyendo la apoptosis celular. Su activación consta de la vía clásica (inmuno complejos antígeno-anticuerpo), vía alternativa (activación permanente de C3) y vía de las lectinas (216).

Como parte de la patogenia de la enfermedad coronaria, la inflamación y el complemento juegan un papel clave. Así, se han observado componentes activos del complemento en placas ateroscleróticas, junto a lipoproteínas oxidadas y altos niveles de PCR (217). Además, esta última es uno de los activadores de la vía clásica del complemento al interactuar con C1q, con lo que contribuirá a la formación de placas ateroscleróticas y su posterior progresión y ruptura (218).

Existen dos productos de escisión de la activación del complemento, C3a y C5a, que son anafilatoxinas y potentes mediadores de la inflamación y quimiotaxis, por ejemplo C5a es quimiotáctico para monocitos y linfocitos T y promueve la infiltración de monocitos en la matriz extracelular (219). C5a también estimula la síntesis en leucocitos de IL-6, IL-1β y TNF-α contribuyendo a la inflamación de la placa de ateroma y tanto C3a como C5a pueden inducir la desgranulación de los mastocitos y contribuyen progresivamente a la desestabilización de las placas (220).

Otro complejo, el C5b-9, promueve la liberación de citocinas de las VSMC, lo que aumenta aún más la acumulación de monocitos y linfocitos T dentro de la matriz extracelular en la placa. Además, tras la ruptura de la placa, C5b-9 conduce a la exposición de las membranas celulares,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

promoviendo el ensamblaje del complejo de protrombinasa con lo que potencia la formación de trombina inducida por el TF (221).

1.3.6 Interleucina 6

La IL-6 es una citoquina circulante secretada mayoritariamente por macrófagos y linfocitos activados (222). Su activación precisa de su unión a un complejo receptor de alta afinidad que consta de dos glicoproteínas de membrana; la primera, un receptor de unión a ligandos de 80 kDa, glicoproteina80 (gp80) de baja afinidad denominada IL6-R, mientras que el segundo componente, de transducción de señales de 130 kDa (gp130) presenta alta afinidad por IL-6 unida a gp80 (223). La unión e interacción de IL-6 con sus receptores, proteínas gp130 e IL-6R, conduce a la formación de un complejo de señalización activado (224). La IL-6 y otros mediadores inflamatorios pueden ser mecanismos clave que contribuyen al desarrollo de la aterosclerosis y su expresión como enfermedad coronaria (225). Estudios in vitro con animales muestran que una dieta alta en grasas junto al estrés, provocan la elevación de los niveles séricos de IL6 y una mayor formación de placas ateroscleróticas (226). La IL-6 se considera una citocina inflamatoria que juega un papel central como mediador que propaga la respuesta inflamatoria y es esencial para el inicio y la progresión de la enfermedad aterosclerótica (227).

La IL-6 conduce a la producción hepática de PCR, asociado con el riesgo de desarrollar eventos cardiovasculares. La asociación entre estos marcadores, IL-6 y la PCR de alta sensibilidad, se han relacionado con eventos aterotrombóticos tanto en individuos sanos como en pacientes con síndrome coronario agudo (228). Existe interacción de la IL-6 con la PCR y los componentes del complemento, contribuyendo a un estado procoagulante a través de la regulación al alza del fibrinógeno (229).

El ensayo STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) que incluyó a 15.828 pacientes con enfermedad arterial coronaria crónica estable, establece en su subestudio, la asociación independiente entre los niveles de biomarcadores de inflamación, PCR de alta sensibilidad e IL-6, con el riesgo de muerte de origen cardiovascular, IAM, ACV y hospitalización debida a insuficiencia cardíaca. Los principales hallazgos fueron que la IL-6 se asoció con el riesgo de muerte cardiovascular por cualquier causa e IAM, hospitalización por insuficiencia cardíaca, incluso después de ajustes multivariables para factores de riesgo convencionales y biomarcadores estándar y específicos, incluida la PCR. Así

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mismo, el recuento de leucocitos permaneció asociado con muerte cardiovascular y eventos coronarios mayores después de los ajustes multivariables (230).

Se considera que la IL-6 es un potente marcador inflamatorio que orquesta la respuesta inflamatoria en la aterosclerosis (231). En un metaanálisis donde se analizaron individuos sanos, la elevación de IL-6 se asoció con un riesgo relativo ajustado de 1,25 veces la probabilidad de sufrir un infarto de miocardio (232). En otro estudio la IL-6 también se asoció con infarto de miocardio recurrente, muerte cardiovascular, trombosis de stent, en pacientes con angina inestable revascularizados con stents farmacoactivos y que no habían recibido estatinas (233). En el grupo de pacientes con cardiopatía coronaria estable, se estudió mediante Tomografía de Coherencia Óptica la relación de la presencia de fibroateroma de cápsula fina con la IL-6 y PCR, y se obtuvieron datos de asociación significativa entre ambas (234).

1.3.7 Interleucina-1β, interleucina-8 e Interleucina-2

La IL-1β, la IL-8 y la IL-2 son citocinas que se liberan al plasma en la respuesta inflamatoria y se producen fundamentalmente por fibroblastos, células endoteliales, células T y monocitos. Las ILs son proteínas de bajo peso molecular con una misión fundamental en la respuesta inmune a través de la quimiotaxis, de la diferenciación de linfocitos T y B y de la producción de anticuerpos, entre otros (235).

Algunas de las características fundamentales de las ILs incluyen que no actúan a título individual, sino de forma conjunta, pudiendo ser secretadas varias ILs por la misma célula, pueden favorecer la secreción de otras ILs o por el contrario reducir o aumentar el número y/o afinidad de los receptores de membrana de otras ILs (236).

La IL-1β favorece un aumento de las moléculas de adhesión endoteliales favoreciendo la migración de leucocitos al espacio subendotelial, así como el aumento de estos, a través de la producción de factores estimuladores de colonias leucocitarias. La IL-1β también induce la expresión de genes involucrados en un aumento de factores procoagulantes y por otra parte inhibe factores fibrinolíticos (237). La IL-1β está estrechamente relacionada con la IL-6 que induce la expresión de PCR y promueve la síntesis de metaloproteasas, así como la transformación de macrófagos en células espumosas, favoreciendo la inestabilidad de la placa de ateroma (238). La IL-1β entonces favorece la síntesis de IL-6, que a su vez estimula la IL-8, favoreciendo la cascada proinflamatoria (237).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La IL-1β regula la placa aterosclerótica promoviendo la síntesis de moléculas de adhesión leucocitaria en las células del endotelio vascular y la proliferación de VCSM. En el estudio CANTOS, se demostró que la terapia dirigida con canakinumab, un anticuerpo monoclonal frente a la IL-1β, a parte de reducir los marcadores plasmáticos inflamatorios (PCR e IL-6) también producía una reducción de eventos cardiovasculares (239). Además, se ha demostrado que esta modulación de la vía de señalización de la IL-6 con canakinumab, se asocia con tasas reducidas de eventos cardiovasculares, independientemente de la reducción de lípidos (240).

La IL-8 es una citocina proinflamatoria liberada fundamentalmente por macrófagos y linfocitos T asociada a fenómenos protrombóticos, ya que aumenta las propiedades procoagulantes de macrófagos, así como también inhibe los valores de TIMP-1 (Inhibidor de las Metaloproteinasa), favoreciendo los procesos de activación enzimática dentro de la placa aterosclerótica (241).

En un estudio de 180 hombres con IAM, se observó que la concentración sérica de IL-8 se asocia con un mayor riesgo de mortalidad por cualquier causa a 5 años, como predictor independiente de variables clínicas, angiográficas, incluso niveles biomarcadores como la PCR y el NT- proBNP (242).

Sin embargo, el papel de la IL-8 en el síndrome coronario agudo ha sido cuestionado en el Stockholm Heart Epidemiology Program, en el que se observó que la IL-8 se asociaba a un mayor riesgo de IAM en los hombres en contraposición a las mujeres, en las que los niveles séricos se asociaron con una menor incidencia de IAM (243).

La IL-2 ha sido ampliamente estudiada en la década de los 90 en el contexto de la enfermedad de Kawasaki asociada a la formación de aneurismas arteriales coronarios en dichos pacientes (244). Por otro lado, la IL-2 se ha asociado también a aterosclerosis coronaria. Recientemente se ha visto que el polimorfismo de IL-2 podría afectar la susceptibilidad a padecer EAC y los niveles séricos de IL-2 están relacionados con el desarrollo, progresión y severidad de la enfermedad coronaria (245).

Un estudio reciente en pacientes con cardiopatía isquémica que fueron sometidos a cirugía de revascularización aortocoronaria, objetivó que tanto la IL-1β como la IL-8 podían contribuir al síndrome postpericardiectomía, siendo las bajas concentraciones de IL-8 previo a la cirugía un marcador pronóstico independiente de dicha patología (246).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.8 Amiloide sérico A

El amiloide sérico A (ASA) es una proteína de fase aguda, que participa en la inflamación inherente a la aterosclerosis fundamentalmente como un inductor de disfunción endotelial (247). En estudios previos se correlacionaron los altos niveles séricos de ASA con un peor pronóstico en angina inestable e IAM (248).

ASA es una proteína cuyo aumento de la concentración en la sangre es un marcador de inflamación activa. ASA activa múltiples receptores, incluidos los receptores tipo toll (TLR) frecuentes en la microglía, el receptor SR-BI, relacionado con la captación de lípidos y el receptor de trifosfato de adenosina P2X7 (249). Estudios previos han correlacionado los niveles séricos de ASA con la gravedad de la cardiopatía coronaria y con un mayor riesgo de morbimortalidad en dichos pacientes (250), aunque por otro lado se han visto que niveles de ASA tras un Síndrome Coronario Agudo no se correlacionaron con un mayor riesgo de eventos durante el seguimiento (251).

En modelos murinos de aterosclerosis el ASA favoreció el aneurisma de aorta abdominal promovido por angiotensina, además se objetivó que la modulación de la expresión de los receptores ASA1 y/o ASA2 en modelos murinos de aterosclerosis sugiere que ASA promueve la aterogénesis temprana (252). Además, ASA también se expresa en lesiones ateroscleróticas humanas, lo que induce que sea participe que en la formación de dichas lesiones (253).

1.3.9 El sistema CD40/CD40 Ligando

CD40 es un receptor de proteína transmembrana I y miembro de la familia de proteínas Factor de Necrosis Tumoral (TNF) (254). El CD40 se expresa principalmente en los linfocitos B y en otras células del sistema inmunitario, células epiteliales, células neuronales, fibroblastos, células de la pared vascular y plaquetas (255). Estudios previos demostraron que un anticuerpo anti-CD40 Ligando (CD40L) reduce notablemente el tamaño y el contenido de lípidos de las lesiones ateroscleróticas (256). Estudios posteriores informaron una disminución significativa de la placa aterosclerótica en ratones ApoE–/– con desactivación de CD40L (257). Los niveles circulantes de CD40L en su forma soluble, son un marcador importante de la existencia de aterosclerosis, incluida las enfermedades cardiovasculares y los síndromes coronarios agudos (258). Asimismo, la interrupción de la unión de CD40 y CD40L con ARN de interferencia pequeño o el bloqueo del anticuerpo anti-CD40, impide la contribución de CD40 a la formación de células espumosas (259). Toda esta evidencia científica hasta la fecha, a pesar de ser

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

necesarios más estudios, orienta al probable valor del complejo CD40 como diana terapéutica en la aterosclerosis.

1.3.10 Mieloperoxidasa

La Mieloperoxidasa (MPO) es una peroxidasa, más abundante en los leucocitos, que induce radicales libres de oxígeno (260). Esta proteína lisosomal se almacena en gránulos azurófilos de neutrófilos y se libera al espacio extracelular por desgranulación. Estudios recientes han demostrado la existencia de una asociación entre niveles elevados de MPO y la gravedad de la enfermedad coronaria (261). Así, se observó en pacientes con angina de pecho estable e inestable, una correlación inversa significativa entre los niveles plasmáticos de MPO y paraoxonasa-1 unida a HDL, hecho que contribuye a la progresión de la inestabilidad de la placa coronaria (262).

1.3.11 Metaloproteinasa

Las Metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) son proteínas, endopeptidasas dependientes de Zinc, que forman parte de la matriz extracelular (MEC) y se encargan de degradar dicha matriz, así como de activar factores de crecimiento y moléculas de adhesión. Las MMP se sintetizan y secretan como proenzimas y su activación depende de la escisión de un dominio propeptídico que se pliega e interactúa con el Zinc. Su clasificación depende de la especificidad por el sustrato y la unión a las membranas y por la estructura, diferenciándose así colagenasas (como MMP-1 o MMP-8), estromalisinas (MMP-3, MMP-11), gelatinasas (MMP-2, MMP-9) y otras como metaloelastasas, tipo membrana (MT-MMP), matrilisinas, entre otras (263).

En la regulación de las MMP intervienen factores de crecimiento, trombina y la plasmina como el mayor activador fisiológico, favoreciendo la escisión del dominio propeptídico, mientras que el factor transformante beta (TGF β) y los corticoides la inhiben (264). También existen inhibidores específicos (TIMP), mediante una unión irreversible a la forma activa de la MMP, de los que se han descrito 4 miembros (TIMP-1, 2, 3 y 4) (265).

Los estímulos inflamatorios, como el TNFα y IL-1, también influyen en la producción de MMP, fundamentalmente MMP-2, por parte de las células del endotelio vascular (266). Por otro lado, la PCR favorece la sobrexpresión de MMP-1 por monocitos y de MMP-10 por células endoteliales sin variaciones significativas de los niveles de TIMP-1 (201).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la aterosclerosis la alteración del desequilibrio entre MMP/TIMP juega un papel fundamental favoreciendo la degradación de la MEC, y la progresión e inestabilidad de la placa de ateroma (267).

Las MMP también favorecen la infiltración de macrófagos en la pared vascular, con degradación de la lámina elástica interna y progresión de la placa aterosclerótica (268). Además, otras MMP como la MMP-14 favorecen la proliferación de los fibroblastos y las células musculares lisas vasculares favoreciendo la hiperplasia y fibrosis vascular (269). Otras MMP, como la MMP-2 y la MMP-9, son indispensables en aquellos procesos relacionados con la vulnerabilidad de la placa de ateroma, concretamente favoreciendo la inflamación y la neoangiogénesis en la placa de aterosclerosis. (270,271). Las MMP juegan un rol protagonista desde la inicial estría grasa hasta la placa de ateroma de cápsula fina propensa a la ruptura, en la que se observa un aumento de macrófagos entorno al núcleo necrótico y una sobrexpresión de MMP-1 y MMP-9 (272).

Los niveles plasmáticos de MMP-9 en pacientes con enfermedad coronaria, son superiores a los de los individuos sanos y además se asocian a PCR, IL-6 y fibrinógeno, sin encontrar esta asociación con la MMP-2 (273). También se ha observado un aumento de MMP-9, en las placas de aterosclerosis de aquellos pacientes que acudían con un síndrome coronario agudo respecto a aquellos que presentaban angina estable, (274,275) así como un aumento de la concentración urinaria de MMP-2 y MMP-9 tras un IAM (276).

Se ha constatado también la elevación de la MMP-9 en otros territorios vasculares como en el cerebro tras el ictus isquémico y hemorrágico (277), o en el caso de la MMP-10, presente en lesiones relacionadas con el remodelado vascular y degradación de la MEC, como sucede en los aneurismas aórticos (278).

Las MMPs también se han estudiado como factores pronósticos de las ECV. Así, se ha demostrado que la MMP-9 podría predecir la estenosis vascular y la reestenosis postimplante de stent, así como la muerte de origen cardiovascular en pacientes con EAC (279,280). A otros niveles se ha asociado a la expansión y la rotura de aneurismas aórticos (281) o a un aumento de transformación hemorrágica en pacientes con ictus (282).

La MMP-9 se ha asociado a un mayor riesgo de padecer hipertensión arterial y cardiopatía isquémica (283). Finalmente, los niveles séricos MMP-2 pueden predecir el tamaño y la disfunción del ventrículo izquierdo tras una IAM (284).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.12 Factor de Necrosis Tumoral α

El TNF-α es una de las citocinas proinflamatorias con un rol fundamental en la aterosclerosis y en la ECV (285). El TNF-α es una proteína pleiotrópica de bajo peso molecular que actúa activando dos receptores, receptor 1 del factor de necrosis tumoral α (TNFR1) y 2 (TNFR2), en diversas células del organismo activando el sistema inmune y la expresión de genes involucrados en la enfermedad cardiovascular. Así, el TNF-α, al igual que otras citocinas, participa en la disfunción endotelial, alterando la microcirculación a través de la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (286). El TNF-α interfiere con la NOS, concretamente favorece la expresión de NOS inducible (iNOS) y disminuye la expresión de NOS endotelial (eNOS), favoreciendo la disfunción microvascular (287).

A nivel de las células endoteliales, el TNF-α promueve la síntesis y liberación de diversas moléculas de adhesión y citocinas proinflamatorias y quimiotácticas que favorecen el reclutamiento de neutrófilos y la apoptosis de estas células (288). Además, TNF-α estimula la activación de la MMP2, favoreciendo la degradación del colágeno y la apoptosis de los cardiomiocitos, contribuyendo a la disfunción del ventrículo izquierdo tras un IAM. Por otro lado, en este contexto del síndrome coronario agudo, se ha observado que tras un IAM los altos niveles plasmáticos de TNF-α están asociados con un mayor riesgo de recurrencia de eventos coronarios y con mayor riesgo de mortalidad (289,290).

En cuanto al tamaño del IAM, un estudio correlacionó la apoptosis de los miocardiocitos con el aumento plasmático del TNF-α y sus receptores solubles (sTNF-R1 y sTNF-R2), pudiendo considerarse útil para monitorizar el tamaño del IAM (291). Además, existe una correlación directa del TNF-α con la formación de la placa aterosclerótica, encontrando asociación positiva entre niveles altos de TNF-α- y LDLc y por el contrario, negativa con los niveles de HDLc (292). El TNF-α no sólo contribuye a la formación y progresión de la placa de ateroma, sino que favorece la ruptura e inestabilidad de la misma (293).

Se han asociado altos niveles en sangre de TNF-α con una mayor gravedad y extensión de la EAC (294), deterioro de la función cardíaca y renal (295) e incluso como predictor pronóstico de muerte por EAC (296). En pacientes sometidos a intervencionismo coronario con implante de stents en el contexto de síndrome coronario agudo, se ha observado mayores niveles plasmáticos de TNF-α (297).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.13 Interferón Gamma

A finales de los años 50 del siglo pasado, Isaacs y Lindenmann descubrieron una sustancia que evitaba la infección vírica celular, denominándola Interferón (IFN) (298). Los IFN consisten en una familia de glicoproteínas que son liberadas al plasma por las células, en respuesta a estímulos infecciosos o tumorales, con el objeto de estimular el sistema inmune.

Existen tres tipos de interferones: IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III. Los Interferones del tipo I se dividen a su vez en cuatro: IFNα, IFNβ, IFNω e IFNτ. Estos interferones son clave en la inmunidad innata, en general producidos tras infección vírica, poseen efectos moduladores del sistema inmune y reguladores de la proliferación celular, así como antitumoral (299).

Los interferones del tipo III se conocen como los IFN-λs y en humanos se han descrito el IFN-λ1, -λ2, -λ3 (300). Aunque comparten vías comunes de señalización con los interferones tipo I, mientras que los tipo III se unen a receptores de membrana (IFNLR y IL10R2), los de tipo I se unen a receptores IFN-α (IFNAR), que consiste en cadenas de IFNAR1 e IFNAR2 (300,301).

Finalmente, el IFN tipo II, conocido como IFN inmune o IFNγ se produce fundamentalmente por linfocitos T CD4+, CD8+, células Tγ/δ, así como por células Natural Killer (NK) como respuesta inmune e inflamatoria a una agresión. El IFNγ posee una estructura proteica diferente al resto de interferones y además se une a receptores de membrana diferentes al resto de IFN (302).

La producción de IFNγ es promovida por patógenos, por la activación de las células T o por estimuladores no específicos como la fitohemaglutinina, la concanavalina-A y por citocinas (IL-1, IL-2, IL-12, IL-18) (303) y se inhibe por el factor de crecimiento transformador beta (TGFβ), los glucocorticoides, y la ciclosporina-A (304).

El IFNγ se ha correlacionado con la enfermedad coronaria, como se observó en estudios recientes que mostraban que altos niveles de RNA de IFNγ circulante se asociaba con un mayor nivel de inflamación y un mayor riesgo de enfermedad coronaria (305,306).

1.3.14 Ciclofilinas

La cardiopatía isquémica es principalmente causada por aterosclerosis y el riesgo de enfermedad arterial coronaria aumenta en pacientes con factores de riesgo cardiovascular tradicionales y, aún más, incrementa su mortalidad cuando se asocia a enfermedades autoinmunes e inflamatorias (307). La inflamación está presente en todas las fases evolutivas

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de la aterosclerosis, desde la formación temprana de las placas de ateroma hasta la inestabilidad de dicha placa y su eventual ruptura y complicación, siendo la piedra angular en la EAC (308).

Las inmunofilinas son una familia de peptidil-prolil cis/trans isomerasas (PPIasas) consistentemente involucradas en enfermedades cardiovasculares (309). Las PPIasas incluyen tres subfamilias de proteínas, ciclofilinas (Cyps), las proteínas de unión a FK506 (FKBP) y las parvulinas. Algunas de estas proteínas, a saber, CypA, CypB, CypD o FKBP51, se han asociado previamente con cardiopatía isquémica y aterosclerosis (310–313). La proteína 1A de unión a FK506, también llamada FKBP1A, es una enzima que se encuentra en humanos codificada por el gen fkbp1A. La FKBP1A forma parte de las inmunofilinas, que intervienen en la inmunorregulación y en procesos fundamentales de la célula, como plegamiento de proteínas y transporte de las mismas (309).

Las Cyps son una familia altamente conservada de enzimas ubicuas con al menos 17 tipos. Catalizan la isomerización cis-trans de los enlaces peptidil-prolilo de proteínas y modulan el plegamiento y ensamblaje de proteínas. CypA, CypB y CypC se secretan al espacio extracelular mientras que CypD generalmente se localiza en las mitocondrias (309).

La CypA se secreta a los medios extracelulares después de estímulos inflamatorios y tanto CypA intra como extracelular están involucrados en varias enfermedades cardiovasculares (309,314). La CypA intracelular desempeña un papel en la translocación de la enzima NOS (que participan en la señalización del músculo liso vascular), la activación de Janus y ERK1/2, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo (309).

La CypB se expresa en niveles más bajos que CypA y tiene un papel importante en la hemostasia redox y la inflamación con diferentes efectos según la localización intracelular o extracelular y en la función vascular (309,315). Ambas, CypA y CypB, son ligandos del receptor Inductor de Metaloproteinasas de Matriz Extracelular (EMMPRIN) también conocido como “Cluster of Differentation” 147 (CD147) (316). Estas proteínas son secretadas constitutivamente a través de vesículas y en menor proporción en forma libre, por células de músculo liso vascular y endotelial, fibroblastos, macrófagos y plaquetas en respuesta al estrés oxidativo. Además, CypA actúa como una molécula quimiotáctica junto con citocinas en células inflamatorias y CypB también se describió como un inductor de quimiotaxis de células inflamatorias en tejidos dañados (309).

La CypC se localiza en el riñón y modula la activación de macrófagos, la señalización de endotoxinas, la expresión de MMP-13 y la homeostasis redox del retículo endoplásmico junto

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

con CypB (315,316). La proteína asociada a CypC es el ligando endógeno de CypC que regula la respuesta a la activación de endotoxinas y macrófagos (317) .

La CypD juega un papel en la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), un gran poro de conductancia cuya apertura despolariza la membrana mitocondrial interna disminuyendo el ATP y aumentando la producción de especies reactivas del oxígeno, relacionándose con la apoptosis celular, la enfermedad de Alzheimer y la insuficiencia cardíaca entre otras enfermedades (190). Múltiples estudios han demostrado que la inhibición o eliminación de CyPD, podría mostrar una protección frente al daño por isquemia/reperfusión en el miocardio (318), músculo esquelético (319), riñón (320), pulmón (321) y cerebro (322).

Si bien el papel, el modo de acción y la localización de CypA en las enfermedades cardiovasculares están bien documentados y se ha propuesto como un biomarcador de CAD, hay menos datos disponibles sobre otras Cyps, en términos de niveles celulares o extracelulares y la relación de éstos cuando están presentes otros factores de riesgo cardiovascular (309,323).

Los niveles extracelulares de Cyps se consideran una respuesta inflamatoria a la lesión, ya que aumentan en los tejidos y fluidos corporales en muchos procesos inflamatorios agudos y crónicos (324,325). Además, las Cyps está relacionadas con la homeostasis redox, y esta señalización mediada por redox tiene un papel importante en la inflamación, la aterosclerosis y la cardiopatía isquémica (326,327).

Las Cyps son algunas de las proteínas mejor conservadas presentes en eucariotas y procariotas, y han sido implicadas en diversos procesos celulares y respuestas a múltiples estreses bióticos y abióticos (328). Así, las Cyps, las citocinas proinflamatorias y los factores inmunitarios se han involucrado en la patogenia y progresión de la aterosclerosis, la lesión por isquemia/reperfusión miocárdica y la insuficiencia cardíaca (307). De hecho, los niveles plasmáticos de Cyps se han propuesto previamente como biomarcadores para los pacientes con enfermedad coronaria y con su posible impacto pronóstico (329).

Debido a que la CypA es muy abundante en el citoplasma, muchos estudios se han centrado en el papel intracelular de la CypA. Sin embargo, en las enfermedades cardiovasculares, se ha demostrado como la CypA extracelular juega un rol importante a través de vías de señalización autocrinas y paracrinas mediadas por el receptor CD147 (330). CypA reduce la producción de especies reactivas de oxígeno y suprime la producción de O2 dependiente de la reducción de la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH) oxidasa, que podría ser un objetivo

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

potencial para la terapia de lesiones por isquemia-reperfusión (331). Se ha demostrado que la CypA media en la progresión de la aterosclerosis, al aumentar la adhesión y la diferenciación de los monocitos, así como la formación de células espumosas (332). Además, en condiciones de hiperglucemia en conejos con dieta rica en colesterol, CypA puede inducir la apoptosis de los macrófagos (333) y alterar la eferocitosis en macrófagos apoptóticos asociados con estas lesiones ateroscleróticas, pudiendo influir en la progresión e inestabilización de las mismas, sobre todo en pacientes con DM tipo 2, con altos niveles séricos de CypA (311). Se ha visto que la eficacia de la eferocitosis en macrófagos cultivados in vitro y en presencia de CypA, evaluada mediante citometría de flujo, se muestra alterada al reducir la salida de colesterol en las células espumosas, acelerando la progresión de la aterosclerosis (334). Además, CypA también se ha implicado en la remodelación de la miocardiopatía arritmogénica, caracterizada por la sustitución progresiva del miocardio funcional por tejido fibroadiposo no contráctil, que favorece las arritmias ventriculares y la muerte súbita cardíaca (335).

El papel fisiológico o patológico de la CypC permanece aún en estudio, sin embargo, se relaciona con la activación de macrófagos y los niveles se elevan en los tejidos cerebrales después de la isquemia (336).

La inhibición de CypD evita la apertura del mPTP de los miocardiocitos y protege contra la lesión por isquemia-reperfusión, lo que hace que la modulación de la actividad de CypD sea un objetivo terapéutico potencialmente importante en este campo de la cardiología (337). Así, estudios iniciales con inhibición de la CypD, mostraron reducción del daño por reperfusión tras intervencionismo coronario en el contexto del síndrome coronario agudo (338). Aunque, por otro lado, otros trabajos no pudieron demostrar un beneficio clínico neto frente al daño por reperfusión tras un síndrome coronario agudo (339).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2.- OBJETIVO

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.- OBJETIVO

La aterosclerosis es la principal causa de enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. Esta patología se asocia a factores de riesgo como la DM, la HTA, la artritis reumatoide o la hiperlipidemia. En todos estos procesos, la inflamación y el estrés oxidativo juegan un papel fundamental y aumentan el riesgo de daño vascular. La presencia aumentada de marcadores inflamatorios se relaciona con el grado de desarrollo de la enfermedad, sin embargo, la ausencia de biomarcadores tempranos impide su detección precoz. En los últimos años, la familia de proteínas PPIasas se ha relacionado con la inflamación asociada a enfermedades cardíacas y vasculares, incluyendo la aterosclerosis. Dentro de este grupo de proteínas, las Cyps parecen desempeñar un papel fundamental tanto en el desarrollo como en la evolución de la placa de ateroma. De las cuatro isoformas que hasta el momento se han relacionado con las enfermedades cardiovasculares, la más estudiada es la CypA cuyos niveles comienzan a aumentar antes de cualquier manifestación clínica. Sin embargo, se desconocen los niveles plasmáticos de las otras Cyps, su evolución en el tiempo o su relación con otros marcadores inflamatorios o con factores de riesgo aterosclerótico. Por lo tanto, en objetivo de la presente Tesis Doctoral es explorar el perfil de Cyps (CypA, CypB, CypC y CypD) y de marcadores de la inflamación en pacientes con EAC en fase aguda y crónica, con/sin factores de riesgo asociados con el fin de establecer nuevos biomarcadores relacionados con la enfermedad.

El objetivo propuesto se aborda en las publicaciones con la siguiente distribución:

-Explorar los niveles plasmáticos de las Cyps (CypA, CypB, CypC y CypD) y marcadores inflamatorios en pacientes con EAC Aguda. **Publicación I.1.**

-Analizar la relación entre los niveles plasmáticos de Cyps y los mediadores de inflamación, en pacientes con enfermedad coronaria en fase estable (síndrome coronario crónico) y en fase aguda (síndrome coronario agudo). **Publicación I.2.**

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

-Analizar la evolución a seis y doce meses de los valores de Cyps en pacientes con enfermedad coronaria y estudiar la relación de las Cyps como predictores de diagnóstico y pronóstico de enfermedad coronaria asociada a biomarcadores establecidos. **Publicación I.3.**

-Buscar asociaciones entre los niveles de Cyps y los factores de riesgo cardiovascular clásicos. **Publicación II.1.**

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

Esta sección contiene los materiales, reactivos y métodos utilizados durante la presente Tesis Doctoral.

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Los reactivos y materiales se han adquiridos a las siguientes casas comerciales:

-Merk Life Science (Madrid, España): el kit de bolas magnéticas MILLIPLEX® MAP KIT Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel 96-Well Plate Assay (#HSTCMAG- 28SK) para la detección de Interleucinas (IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8), IFNγ y TNF-α

-Merk Life Science (Madrid, España): el kit de bolas magnéticas el kit de bolas magnéticas MILLIPLEX® MAP KIT Human MMP MAGNETIC BEAD PANEL 2 96-Well Plate Assay (#HMMP2MAG-55K) para la detección de MMP-2 y MMP-9

-Elabscience (Madrid, España): kit de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para la detección de ciclofilina D (E-EL-H1936).

-Cusabio (Madrid, España): kits de ELISA humano para la detección de ciclofilina A (CSB-E09920H), ciclofilina B (CSB-E11218H), y ciclofilina C (CSB-EL018473HU).

-BD vacutainer: tubos de suero

3.2 POBLACIÓN OBJETO DE ESTUDIO

En la presente tesis doctoral se realizaron dos estudios en pacientes remitidos por EAC al Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Lucus Augusti de Lugo. Los pacientes se dividen en varios grupos en función del estudio realizado. Por un lado, se determinaron los niveles de Cyps en pacientes con EAC aguda y crónica a tiempo 0, 6 y 12 meses y por el otro se estudió la relación de los factores de riesgo cardiovascular con las Cyps en pacientes con EAC.

La EAC se definió como IAM previo, revascularización coronaria o documentación de estenosis coronaria significativa mediante el estudio angiográfico. Así mismo, los pacientes fueron divididos en cardiopatía isquémica estable sin aumento de marcadores de daño

USC UNIVERSIDADE

miocárdico síndrome coronario crónico o cardiopatía isquémica aguda (síndrome coronario agudo sin elevación del ST y síndrome coronario agudo con elevación del ST), según las definiciones actuales de las Guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología. (2,340,341).

Las coronariografías fueron revisadas a ciegas por dos cardiólogos que no conocían la clínica de los pacientes para evitar sesgos. Se considera lesión coronaria significativa, aquella estenosis o reducción de de la luz de la arteria (luminograma) en más del 50% del diámetro de la arteria. Fueron excluidos del estudio todos aquellos pacientes críticos o hemodinámicamente inestables, con enfermedad inflamatoria crónica o aguda, enfermedad reumática, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedad valvular o insuficiencia cardiaca congestiva. En los estudios de niveles de Cyps en pacientes con EAC aguda y crónica se incluyeron 40 pacientes agudos y 40 crónicos a los que se tomaron muestras a tiempo 0, 6 y 12 meses. En todos los casos se realizaron analíticas sanguíneas completas. En el estudio de relación de las Cyps con los factores de riesgo cardiovascular se incluyeron 113 pacientes.

En los dos estudios se incluyeron grupos de voluntarios control. En el primer caso se incluyeron 44 sujetos sin enfermedad aterosclerótica conocida. En el segundo caso se seleccionaron 65 voluntarios, pero solo 49 cumplían los criterios de inclusión. Para este estudio se requerían voluntarios sin enfermedad aterosclerótica conocida, con hallazgos angiográficos normales, biomarcadores cardíacos séricos normales y sin factores de riesgo cardiovascular. Se excluyeron los participantes con enfermedades inflamatorias crónicas o agudas, cáncer, enfermedades autoinmunes y enfermedades reumáticas.

Todos los participantes incluidos en el presente estudio pertenecen al área sanitaria pública de Lugo. El número de pacientes a estudiar se diseñó según la prevalencia de EAC en esta zona. Los participantes (pacientes y controles) fueron informados y firmaron un consentimiento informado.

Todos los protocolos y estudios incluidos en la presente Tesis Doctoral han sido aprobados por el comité ético institucional y autonómico (Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia, Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo, Secretaria Xeral, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia) aprobó el estudio (Referencia: 2016/508, Fecha de aprobación: 19 de diciembre de 2016, y Referencia 2019/639, Fecha de aprobación 20 de enero de 2020) según los principios expuestos en la Declaración de Helsinki).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.1Datos de la población a estudio

Se empleó la historia clínica electrónica de los pacientes para obtener los datos relativos a su estado general, enfermedades concomitantes, así como factores de riesgo cardiovascular. Así, se identificaron como factores de riesgo cardiovascular clásicos, la HTA, la DM, la dislipidemia, el tabaquismo,el sexo y la edad . También se consideró el consumo de determinados fármacos de la esfera cardiovascular como antiagregantes plaquetarios, hipolipemiantes, antidiabéticos, entre otros.

Para el diagnóstico de HTA, se consideró el umbral de >140/90 mmHg, de acuerdo a las guías vigentes de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (342), así como para DM cuando los niveles de glucosa en ayunas eran ≥ 126 mg/dl o si se empleaba de forma crónica tratamiento hipoglucemiante (76). Se consideró Dislipemia si el colesterol total era >200 mg/dl, el nivel de lipoproteínas de baja densidad (LDL) era ≥ 140 mg/dl o el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) era ≤ 40 mg/dl, o si se utilizaba un tratamiento hipolipemiante de forma crónica (215).

3.2.2 Protocolo de toma de muestras de sangre

Se obtuvo sangre periférica de cada participante (tanto pacientes como controles) a través de la vena antecubital utilizando tubos libres de anticoagulantes (tubos de suero BD vacutainer), en las primeras 24 horas después del ingreso o en el momento de la revisión en pacientes crónicos. Las muestras de sangre se dejaron reposar durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugan (3000 rpm durante 10 minutos a 4 °C) y se separan los sobrenadantes (suero) y almacenan a -80°C hasta realizar el análisis de Cyps y marcadores de la inflamación.

3.3 MEDICIÓN DE LOS NIVELES SÉRICOS DE CYPS A, B, C Y D.

Los niveles séricos de CypA, CypB, CypC y CypD se miden mediante kits de ELISA siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Antes de llevar a cabo los experimentos, las muestras de suero se llevan a temperatura ambiente, se mezclan mediante vortex y centrifugan. Se añaden 100 µL de cada muestra, control o estándar en el correspondiente pocillo y se incuban durante 2 horas (CypsA, B y C) o 90 minutos (CypD) a 37º C con agitación. Se retira el sobrenandante y se añaden 100 µL del correspondiente anticuerpo biotinilado y se incuba durante 1 hora a 37º C con agitación. Se lavan las placas tres veces con tampón de ensayo y se añaden a cada pocillo

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

100 µL de avidina-HRP (peroxidasa de rábano picante) y se incuban durante 1 hora a 37º C con agitación. Se lavan las placas 5 veces con tampón de ensayo, se añaden 90 µL de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) y se incuban durante 15 minutos en oscuridad a 37º C con agitación.

Se frena la reacción añadiendo 50 µL de solución ácida. A continuación, se mide la absorbancia en un lector de placas a 450 y 540 nm (solo a 450 nm en el caso de CypD). Las lecturas a 540 nm se utilizan para corregir las interferencias ópticas y se restan de las lecturas a 450 nm. Todas las muestras se analizan por duplicado y las concentraciones se calculan utilizando una curva estándar específica para cada Cyp con distinto rango:

-CypA: 3,12 a 200 ng/mL
-CypB: 31,25–2000 pg/mL
-CypC: 23,5–1500 pg/mL
-CypD: 62,5–4000 pg/mL

Los niveles séricos por debajo del límite inferior de determinación se consideran indetectables (0 pg/mL) para el análisis estadístico. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo de los kits ELISA fueron siempre menores al 10%. No se observó reactividad cruzada entre los anticuerpos de Cyps en cada ensayo. Todas las incubaciones se realizaron en un agitador orbital a 600 rpm a 37 ºC.

3.4 MEDICIÓN DE LOS NIVELES DE CITOCINAS Y METALOPROTEINASAS

Los niveles séricos de IFNγ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNFα, MMP-2 y MMP-9 se determinaron usando un inmunoensayo multiplex basado en bolas magnéticas (Milliplex® Map Kit) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El suero se mantuvo a -80°C hasta el momento de realizar el ensayo. Antes del experimento, las muestras se descongelan, se mezclan mediante vórtex y se centrifugan. Las muestras de suero se diluyen (veinte veces en el caso de las citocinas y dos veces en el caso de las MMP) con tampón. Se agregan 25 µL de cada estándar, control o muestra a los pocillos apropiados, se añaden 25 µL de tampón de ensayo y 25 µL de bolas mixtas y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente, en el caso de las citocinas, y durante 18 horas a 4°C en el caso de las MMP. Transcurrido este tiempo se lava la placa tres

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

veces con tampón de lavado fijando las bolas con un imán. A continuación, se añaden los anticuerpos de detección a cada pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la placa con tampón y se añade Streptavidina-Ficoeritrina a cada pocillo y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Todas las incubaciones se realizaron en un agitador orbital a 600 rpm. Finalmente, se lava la placa y se registran las medianas de las unidades relativas de fluorescencia utilizando un Luminex® 200TM con software xPONENT®. Todas las muestras se analizaron por duplicado y las concentraciones se calcularon utilizando una curva estándar. El rango de determinación para cada analito es:

-IFNγ: 0,61-2500 pg/ml
-IL-1β e IL-2: 0,49–2000 pg/mL
-IL-6: 0,18–750 pg/mL
-IL-8: 0,31–1250 pg/mL
-TNFα: 0,43– 1750 pg/mL
-MMP-2: 68–50 000 pg/mL
-MMP-9: 14–10 000 pg/mL.

Los niveles séricos por debajo del límite inferior de determinación fueron indetectables y se consideraron como 0 pg/mL para el análisis estadístico. No hubo reactividad cruzada o fue insignificante entre los anticuerpos de todos los analitos. El coeficiente de variación intraensayo de los kits ELISA fue menor del 5%. Los coeficientes de variación interensayo de los kits ELISA fueron menores del 15% (en el caso de IL-1β, IL-2, IL-8,TNFα y MMP-9) y menores del 20% (en el caso de IFNγ, IL -6 y MMP-2).

3.5 MEDICIÓN DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y SANGUÍNEOS

Los parámetros bioquímicos (niveles de glucosa, HDLc y LDLc) así como el hemograma y los niveles de PCR y BNP se midieron en el Servicio de Análisis del Hospital Lucus Augusti mediante un Sistema de Química Clínica ADVIA (Siemens Healthcare).

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS24 y SPSS25 (iBM Corp. NY, Estados Unidos). La significación estadística se fijó siempre en $p < 0,05$. Las variables categóricas se

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

presentaron como porcentajes y las variables continuas como medias ± error estándar de la media (SEM). Para la prueba de la normalidad se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (con corrección de Lilliefors). Para las variables continuas con distribución normal se utilizó la comparación mediante la prueba T de Student (que incluye la prueba de Levene para evaluar la igualdad de varianza), en caso contrario se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Las variables categóricas se compararon mediante la prueba de Chi Cuadrado. Las correlaciones (análisis bivariado) entre Cyps y los marcadores de inflamación y los parámetros sanguíneos se analizaron utilizando el coeficiente de correlación de rangos de Spearman. Para conocer la capacidad de diagnostica de las Cyps se empleó el área bajo la curva ROC (AUC) y su significación estadística se expresó como estadístico C (343). También se calcularon la especificidad, la sensibilidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y el poder estadístico (P) para la puntuación de riesgo. Se utilizó un modelo de regresión logística simple (análisis univariable y multivariable) para evaluar la asociación entre los niveles séricos de Cyps y los factores de riesgo cardiovascular (edad, sexo, consumo de tabaco, HTA, DM y Dislipemia)

Para estudiar las diferencias entre grupos de pacientes agudos, crónicos y controles o entre grupos de riesgo se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) o Kruskal-Wallis (en el caso de variables no paramétricas), seguida de pruebas post hoc.

En los estudios de grupos de riesgo los participantes se dividieron según la presencia de riesgo cardiovascular. Se generaron estadísticas de resumen que se presentan como porcentajes para variables categóricas y media ± SEM para variables continuas. Las correlaciones entre los niveles de Cyps y los factores de riesgo cardiovascular se analizaron mediante análisis bivariado con coeficiente de correlación de rangos de Spearman en el caso de variables categóricas (sexo, edad>50 años, fumador activo, DL, HTA, DT2, glucosa >100 mg/dl, TG >200 mg/dL, colesterol total>200 mg/dL, LDLc >100 mg/dL y HDLc <50 mg/dL) y se utilizó el análisis de componentes principales para calcular las correlaciones entre variables numéricas (parámetros de laboratorio de glucosa, triglicéridos; TG, colesterol total, LDLc y HDLc). Después de encontrar una correlación bruta significativa, se utilizaron modelos de regresión lineal múltiple con un subsiguiente paso a paso hacia atrás para evaluar la asociación de los niveles séricos de CypA, CypB, CypC y/o CypD con factores de riesgo cardiovascular. Todos los modelos de selección paso a paso utilizaron un nivel de $p < 0,05$ para la entrada y un nivel de $p < 0,10$ para la eliminación. Las variables incluidas en estos modelos se basaron en los modelos de regresión

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

simple anteriores. La asociación se midió por el odds ratio (OR) y su intervalo de confianza (IC).

3.7 LIMITACIONES DE LOS ESTUDIOS

1.-El número de sujetos participantes en nuestros estudios es relativamente pequeño, así como la distribución etaria de la muestra y el género, aunque representa de manera fiel el perfil de enfermedad coronaria con predominio de los varones añosos en el área sanitaria de Lugo. Para intentar compensar estos sesgos en la población con cardiopatía isquemica se seleccionó un grupo de sujetos control con un amplio rango de edad en hombres y mujeres.

2.-Las Cyps estudiadas habían estado relacionadas con enfermedad coronaria (CypA) o metabolopatías que constituían un factor de riesgo cardiovascular como DM o síndrome metabólico (CypB) a excepción de la Cyp C cuya asociación con la enfermedad coronaria no había sido demostrada previamente.

3.-Los valores de colesterol total y LDL son más altos en los sujetos control que en los pacientes con Enfermedad Coronaria debido a los tratamientos hipolimemiantes que toman más del 95% de los pacientes que sufren enfermedad arterial coronaria o cualquier expresión de enfermedad vascular aterosclerótica.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.- RESULTADOS Y PUBLICACIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4.- RESULTADOS Y PUBLICACIONES

En este apartado se presentan los resultados obtenidos durante la Tesis Doctoral publicados en cuatro artículos en revistas internacionales. Los resultados se dividen en dos secciones. En la primera sección se agrupan los estudios de los niveles de Cyps en pacientes con EAC aguda y crónica, su relación con marcadores de la inflamación y su papel como biomarcadores de enfermedad. En la segunda sección se incluyen los datos sobre la asociación de Cyps con factores de riesgo de EAC.

SECCIÓN I: Cyps como biomarcadores de enfermedad arterial coronaria.

I.1- Niveles altos de cyclofilina C como factor de riesgo en enfermedad arterial coronaria.

I.2.-Ciclofilinas en la enfermedad cardíaca isquémica: diferencias entre pacientes con enfermedad arterial coronaria en fase aguda y en fase crónica

I-3.-Incremento en los niveles séricos de ciclofilina C en el seguimiento de la enfermedad arterial coronaria: un biomarcador y posible predictor clínico

SECCIÓN II: Asociación de Cyps con factores de riesgo aterosclerótico.

II-1.-Asociación de ciclofilinas y factores de riesgo cardiovascular en la enfermedad arterial coronaria.

A continuación, se presentan los artículos en inglés con una traducción de sus resúmenes en castellano.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SECCIÓN I: CYPS COMO BIOMARCADORES DE ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA

I.1.- High Serum Cyclophilin C levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease

Resumen:

Las ciclofilinas (Cyps) son proteínas ubicuas que pertenecen a la familia de las inmunofilinas consistentemente asociadas con enfermedades inflamatorias y cardiovasculares. Mientras que los niveles de CypA han sido ampliamente estudiados, hay menos datos disponibles para las otras Cyps. El propósito de este estudio de casos y controles fue determinar la relación de las Cyps (A, B, C y D) con la enfermedad de las arterias coronarias (EAC) y ocho marcadores inflamatorios. Los niveles séricos de Cyps, ILs y metaloproteinasas se midieron en suero recogido de 84 sujetos. Los participantes se dividieron en dos subgrupos según el diagnóstico de EAC: 40 pacientes con EAC y 44 voluntarios de control. Los niveles séricos de CypA, CypB y CypC, IL-1β e IL-6 fueron significativamente más altos en pacientes con EAC. El análisis de correlación bivariada reveló una correlación positiva significativa entre Cyps y varios parámetros sanguíneos y bioquímicos. Cuando se evaluó la capacidad de los niveles de Cyps para el diagnóstico de EAC, se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad más altos con CypC (estadística c 0,891, $p < 0,001$), lo que indica que es un buen marcador de EAC, mientras que se obtuvieron resultados menos concluyentes con CypA (estadística c 0,748, $p < 0,001$) y CypB (estadístico c 0,655, $p < 0,014$). Además, se observaron correlaciones significativas de los factores de riesgo tradicionales de EAC y CypC. En resumen, los niveles altos de CypC son un factor de riesgo para la EAC y, por lo tanto, se puede proponer como un nuevo biomarcador para esta enfermedad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

High Serum Cyclophilin C levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease

Received: 22 November 2018
Accepted: 9 July 2019
Published online: 22 July 2019

Amparo Alfonso[1], Jeremías Bayón[2], Sandra Gegunde[1], Eva Alonso[1], Rebeca Alvariño[1], Melisa Santás-Alvarez[2], Ana Testa-Fernández[2], Ramón Rios-Vázquez[2], Carlos González-Juanatey[2] & Luis M. Botana[1]

Cyclophilins (Cyps) are ubiquitous proteins that belong to the immunophilins family consistently associated with inflammatory and cardiovascular diseases. While levels of CypA have been extensively studied, less data are available for other Cyps. The purpose of this case-control study was to determine the relationship of Cyps (A, B, C and D) with coronary artery disease (CAD) and eight inflammation markers. Serum levels of Cyps, interleukins and metalloproteinases were measured in serum collected from 84 subjects. Participants were divided into two sub-groups based on CAD diagnosis: 40 CAD patients and 44 control volunteers. Serum levels of CypA, CypB and CypC, IL-1β and IL-6 were significantly higher in CAD patients. Bivariate correlation analysis revealed a significant positive correlation between Cyps and several blood and biochemical parameters. When the ability of Cyps levels for CAD diagnosis was evaluated, higher sensitivity and selectivity values were obtained with CypC (c-statistic 0.891, $p < 0.001$) indicating that it is a good marker of CAD disease, while less conclusive results were obtained with CypA (c-statistic 0.748, $p < 0.001$) and CypB (c-statistic 0.655, $p < 0.014$). In addition, significant correlations of traditional CAD risk factors and CypC were observed. In summary, high levels of CypC are a risk factor for CAD and therefore it can be proposed as a new biomarker for this disease.

Coronary artery disease (CAD) is an ischemic heart disease of coronary arteries mainly caused by atherosclerosis. The risk of CAD is increased in patients with traditional cardiovascular risk factors such as diabetes mellitus, age, tobacco, high blood pressure, chronic kidney disease, high lipid levels, overweight and obesity[1–4]. In addition, there is a higher incidence in mortality when CAD is associated to inflammatory and autoimmune diseases, being systemic inflammation a key factor in the development of this disease[5]. Besides, there is a general agreement of the fact that atherosclerosis is an inflammatory disease, and that inflammation plays an important role in the atherogenic process. Thus, inflammation contributes to all stages of atherosclerosis, from plaque formation to instability and eventual plaque rupture[5–8].

Immunophilins are a family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases) consistently involved in cardiovascular diseases[9]. PPIases include three protein subfamilies, Cyclophilins (Cyps), FK506-binding proteins (FKBP) and parvulins. Some of these proteins, namely CypA, CypB, CypD or FKBP51 have been previously associated with CAD[10–13]. Cyps are a highly conserved family of ubiquitous enzymes with at least 17 types. They catalyze cis-trans isomerization of protein peptidyl-prolyl bonds and modulate protein folding and assembly. CypA, CypB and CypC are secreted to the extracellular space while CypD is usually localized in the mitochondria[9]. CypA is secreted to the extracellular media after inflammatory stimuli and both intra and extracellular CypA are involved in several cardiovascular diseases[9,14]. Intracellular CypA plays a role in NOX enzyme translocation, Janus and ERK1/2 activation, Reactive Oxygen Species (ROS) production and oxidative stress[9]. CypB is expressed at lower levels than CypA and has an important role in redox hemostasis and inflammation with different effects depending on intracellular or extracellular localization and in the vascular function[9,15]. Both, CypA and CypB, are ligands of the Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN) (CD147) receptor[16]. These proteins are constitutively secreted through vesicles by endothelial and vascular smooth muscle cells (VSMC), fibroblasts, macrophages and platelets in response to oxidative stress. Moreover, CypA acts as a chemoattractant along with

[1]Pharmacology Department, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain. [2]Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003, Lugo, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.A. (email: amparo.alfonso@usc.es)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Control subjects (n = 44)	CAD patients (n = 40)	*P* Value
CypA (ng/mL)	2.44 ± 0.46	7.80 ± 1.30	<0.001
CypB (pg/mL)	138.55 ± 33.39	208.83 ± 44.76	0.014
CypC (pg/mL)	9.60 ± 1.52	34.28 ± 5.77	<0.001
CypD (pg/mL)	127.33 ± 20.84	97.68 ± 10.69	0.687
IFNϒ (pg/mL)	34.26 ± 2.89	27.43 ± 2.65	0.073
IL-1β (pg/mL)	2.72 ± 0.17	3.73 ± 0.36	0.016
IL-2 (pg/mL)	4.32 ± 0.45	4.97 ± 0.51	0.543
IL-6 (pg/mL)	3.98 ± 0.33	8.08 ± 1.59	0.028
IL-8 (pg/mL)	8.01 ± 0.64	7.02 ± 0.75	0.131
TNFα (pg/mL)	10.34 ± 0.47	9.27 ± 0.64	0.123
MMP-2 (ng/mL)	121.53 ± 5.03	95.43 ± 5.69	<0.001
MMP-9 (ng/mL)	256.85 ± 45.81	221.37 ± 20.44	0.087

Table 1. Human serum levels of Cyclophilins and inflammatory markers in control subjects and coronary artery disease patients. Data are shown as average ± SEM. Significance ($p < 0.05$) comparing CAD patients and control subjects. Coronary artery disease (CAD), Cyclophilin A (CypA), Cyclophilin B (CypB), Cyclophilin C (CypC), Cyclophilin D (CypD). Interferon ϒ (IFNϒ), interleukin (IL), tumor necrosis factor α (TNFα), metalloproteinase (MMP). Student's T test or Mann-Whitney test were used to perform statistical analysis. Significant differences $p < 0.05$.

cytokines in inflammatory cells and CypB was also described as a chemotaxis inducer of inflammatory cells into damage tissues[9]. CypC is localized in the kidney and modulates macrophage activation, endotoxin signaling, and metalloproteinase-13 expression and it is also involved in macrophages activation and redox homeostasis of endoplasmic reticulum together with CypB[15,17]. The cyclophilin C-associated protein is the endogenous ligand for CypC that regulates the response to endotoxins and macrophages activation[17]. CypD plays a role in the opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP), and has been linked to apoptosis, Alzheimer's disease and heart failure[12].

While the role, mode of action and localization of CypA in cardiovascular diseases is well documented and it has been proposed as a biomarker for CAD, less data are available about other Cyps, in terms of cellular targets or extracellular levels, and the relationship of those when other cardiovascular risk factors are present[9,14,16,18]. Besides, as it was mentioned, the relationship of Cyps and inflammation has been extensively discussed. Extracellular Cyps levels are considered as an inflammatory response to injury since they are increased in inflammatory tissues and body fluids in many acute and chronic inflammatory processes[19,20]. In addition, Cyps are related to redox homeostasis, and redox mediated signaling has an important role in inflammation, atherosclerosis and CAD[15,21,22]. Taking into account the multiple cross-talks of these enzymes, the aim of this paper was to explore the levels of CypA, B, C and D and several inflammatory markers in CAD patients in order to better understand and predict this disease.

Results

84 participants (mean age 54.3 ± 1.58, range 26–85 years, 66.7% male) were enrolled in the present study and divided into two sub-groups based on CAD diagnosis: 40 CAD patients (35 men and 5 women) and 44 control volunteers (CAD free) (22 men and 22 women). The same measurements were done in both populations to compare results. First, serum levels of Cyp A, B, C and D were measured (Table 1). Figures 1–4 show the distribution of patients with and without CAD by serum levels of Cyps and the distribution of Cyp levels among the groups under study (CAD patients and control volunteers). As it was expected, the levels of CypA, Fig. 1, were significantly increased in CAD patients, 7.80 ng/mL ± 1.02 compared with control subjects, 2.44 ng/mL ± 0.46 ($P < 0.001$). When CypB levels were compared, as shown in Fig. 2, the values in CAD patients were significantly higher than in control participants, 208.83 pg/mL ± 36.18 and 148.69 pg/mL ± 35.34 ($P < 0.05$), respectively. In the case of CypC, Fig. 3, the levels in CAD patients were significantly higher, 34.28 pg/mL ± 5.77 *versus* 9.60 pg/mL ± 1.52 ($P < 0.001$). However, when CypD levels were measured, Fig. 4, no significant differences were observed, 97.68 pg/mL ± 10.69 in CAD patients *versus* 127.33 pg/mL ± 20.84 in control subjects. Furthermore, levels of eight inflammation markers, IFNϒ, IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNFα, MMP-2 and MMP-9 were also analyzed to understand their relationship with immunophilins production and CAD. As Table 1 shows, no significant modifications in the levels of these parameters were observed when CAD patients and control participants were compared, with three exceptions, IL-1β, IL-6 and MMP-2. IL-6 levels were significantly increased in CAD patients, 8.08 pg/mL ± 1.59, with respect to control subjects, 3.82 ± 0.30, ($P < 0.05$). Also, IL-1β levels were significantly increased in CAD patients, 3.73 pg/mL ± 0.36, *versus* 2.71 pg/mL ± 0.17 for control subjects ($P < 0.05$). On the contrary, MMP-2 levels were significantly decreased, from 120.9 ng/mL ± 5.11 in control subjects to 95.43 ng/mL ± 5.69 in CAD patients ($P < 0.001$).

At the same time, traditional baseline characteristics as well as laboratory data of participants were collected and are shown in Table 2. Results were divided in two populations. As Table 2 shows, a higher percentage of patients with CAD were smoker or ex-smoker, with history of cardiac failure and some of them had peripheral arterial disease. In addition, HTA, Diabetes Mellitus Type 1 and Type 2 or DL diagnosis were also prevalent in

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

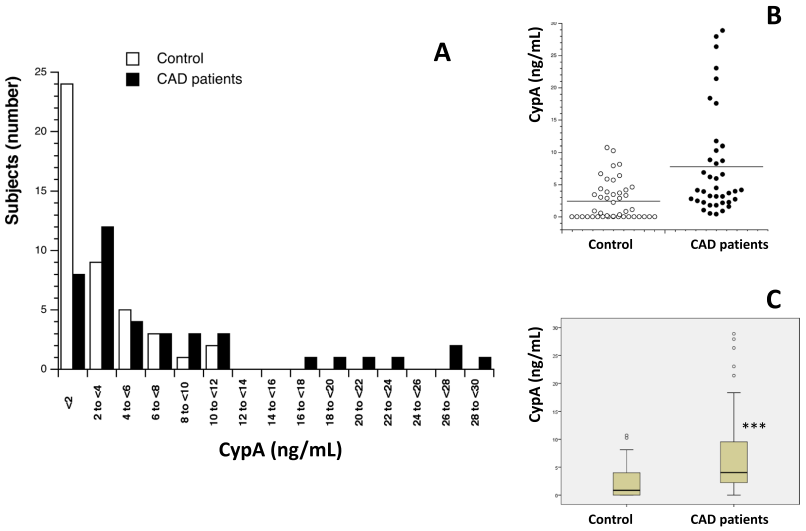


Figure 1. Serum Cyclophilin A (CypA) levels in control subjects (n = 44) and in patients (n = 40) with coronary artery disease (CAD). (**A**) Frequency plot: Data represented as CypA levels (X-axis) *versus* number of subjects (n = 84) (Y-axis). (**B**) Data are shown as dots of CypA levels in control subjects (control, n = 44) and CAD patients (n = 40). (**C**) Data are shown as box-and-whisker plots of CypA levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n = 40). CypA was significantly elevated (***$P < 0.001$, Mann-Whitney U test) in CAD patients compared with controls.

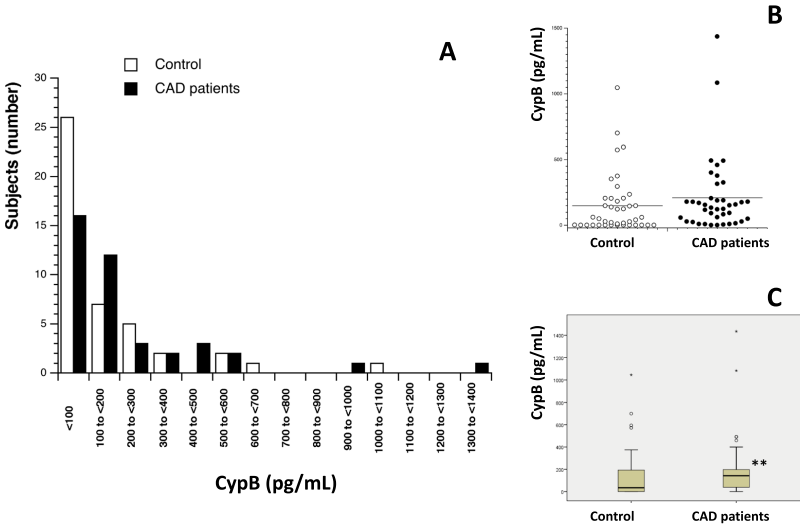


Figure 2. Serum Cyclophilin B (CypB) levels in control subjects (n = 44) and in patients (n = 40) with coronary artery disease (CAD). (**A**) Frequency plot: Data represented as CypB levels (X-axis) *versus* number of subjects (n = 84) (Y-axis). (**B**) Data are shown as dots of CypB levels in control subjects (control, n = 44) and CAD patients (n = 40). (**C**) Data are shown as box-and-whisker plots of CypB levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n = 40). CypB was significantly elevated (**$P < 0.01$, Mann-Whitney U test) in CAD patients compared with controls.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

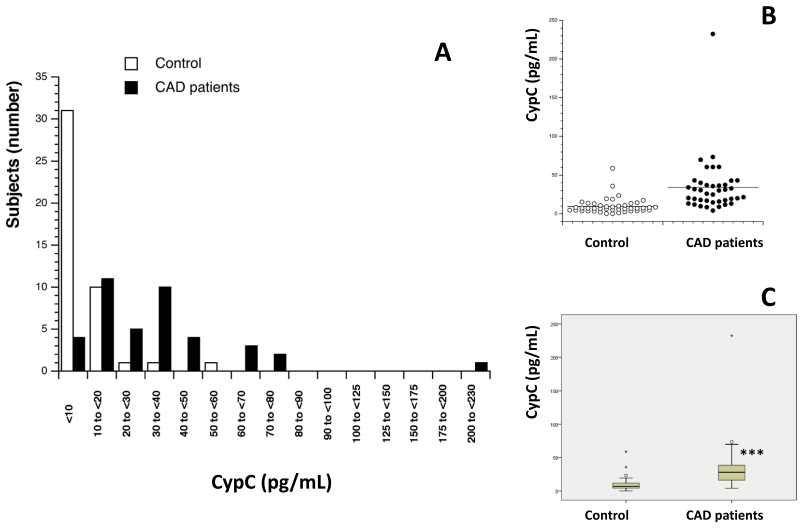


Figure 3. Serum Cyclophilin C (CypC) levels in control subjects (n = 44) and in patients (n = 40) with coronary artery disease (CAD). (**A**) Frequency plot: Data represented as CypC levels (X-axis) *versus* number of subjects (n = 84) (Y-axis). (**B**) Data are shown as dots of CypC levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n = 40). (**C**) Data are shown as box-and-whisker plots of CypC levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n=40). CypC was significantly elevated (***$P < 0.001$, Mann-Whitney U test) in CAD patients compared with controls.

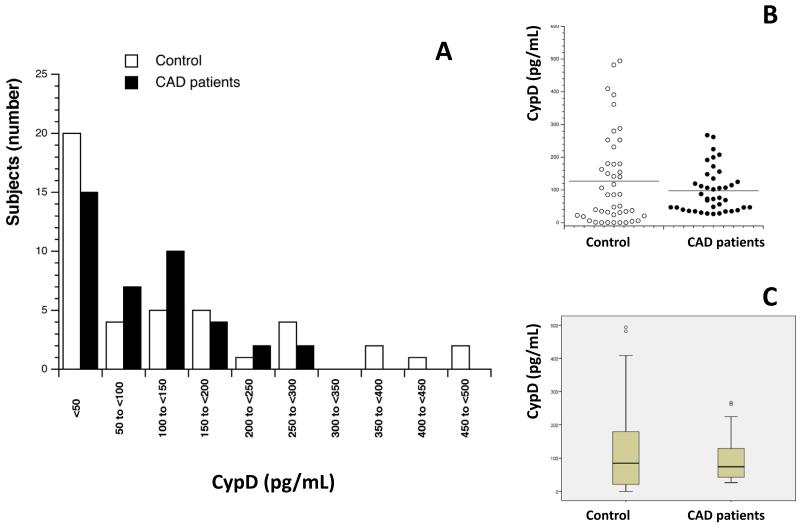


Figure 4. Serum Cyclophilin D (CypD) levels in control subjects (n = 44) and in patients (n = 40) with coronary artery disease (CAD). (**A**) Frequency plot: Data represented as CypD levels (X-axis) *versus* number of subjects (n = 84) (Y-axis). (**B**) Data are shown as dots of CypD levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n = 40). (**C**) Data are shown as box-and-whisker plots of CypD levels in control subjects (n = 44) and CAD patients (n = 40).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Control subjects (n = 44)	CAD patients (n = 40)	*P* Value
Male (%)	50%	87.5%	0.001
Smoker	2.3%	37.5%	<0.001
Ex-smoker	15.9%	27.5%	<0.001
Family History of CAD	18.2%	17.5%	0.900
CF History	0.0%	15%	0.009
Peripheral arterial disease	0.0%	7.5%	0.064
Medical history			
Hypertension (HTA)	6.8%	47.5%	<0.001
Dibetes Mellitus Type 1	0.0%	2.5%	<0.05
Dibetes Mellitus Type 2	2.3%	17.5%	<0.05
Dyslipidemia (DL)	13.6%	67.5%	<0.001
Total Cholesterol (mg/dL)	202.57 ± 1.54	177.05 ± 6.74	0.004
LDL (mg/dL)	122.03 ± 3.90	108.00 ± 5.54	0.071
HDL (mg/dL)	58.00 ± 2.55	36.53 ± 1.29	<0.001
TG (mg/dL)	106.89 ± 6.84	164.00 ± 11.31	<0.001
CRP* (mg/dL)	0.49 ± 0.14	43.45 ± 15.10	<0.001
ALT (U/L)	22.06 ± 2.38	33.32 ± 3.74	0.003
WBC (number/μL)	6632.35 ± 320.45	10383.50 ± 748.25	<0.001
Lymphocytes (number/μL)	2139.39 ± 113,98	1982.50 ± 184.63	0.119
Neutrophils (number/μL)	3757.58 ± 293.36	7462.50 ± 670.15	<0.001
Monocytes (number/μL)	548.48 ± 23.08	730.00 ± 49.90	0.01
Hemoglobine (pg)	13.91 ± 0.23	14.65 ± 0.24	0.028
Platelet (number/μL)	230205.88 ± 8777.89	221925.00 ± 12331.08	0.648
Glucose (mg/dL)	90.23 ± 5.48	110.80 ± 3.16	0.001
Medications			
Statins	11.4%	42.5%	0.003
Antiaplatelets/anticoagulant	0.0%	22.5%	0.001
Antihypertensives	9.1%	52.5%	<0.001
Hypoglycemics	2.4%	15.0%	0.05
Angiographyc findings			
1-vessel disease	0.0%	47.5%	N/A
2-vessel disease	0.0%	30.0%	N/A
3-vessel disease	0.0%	22.5%	N/A
Total Revasc	0.0%	70.0%	N/A

Table 2. Baseline clinical characteristics in control subjects and Coronary Artery Disease (CAD) patients. Data are shown as average ± SEM. Significance ($p < 0.05$) comparing CAD patients and control subjects. Cardiac failure (CF), low density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL), triglycerides (TG), C-reactive protein (CRP), alanine aminotransferase (ALT), white blood cells (WBC). *N = 30. Student's T test or Mann-Whitney test were used to perform statistical analysis. Categorical variables were compared using X^2 test. Significant differences $p < 0.05$.

CAD patients. Besides, clinical parameters as total cholesterol, LDL and HDL cholesterol, triglycerides (TG), C-reactive protein (CRP) and alanine aminotransferase (ALT) were also measured. While TG, CRP and ALT were significantly increased in CAD patients, cholesterol values were significantly decreased, according to statins treatment in this cardiovascular high-risk populations. In the case of blood cell count, white blood cells (WBC), neutrophils, monocytes and hemoglobin were significantly increased in CAD patients as well as glucose levels, while lymphocytes and platelets were not modified. Significantly more CAD patients were under treatment with statins, antiplatelets/anticoagulant, antihypertensives and hypoglycemics.

Bivariate correlation analysis of Cyps and clinical parameters revealed, Table 3, a significant positive correlation between CypC levels and the levels of CypA ($p < 0.002$), CypB ($p < 0.001$) and CypD ($p < 0.01$). In addition, CypC was positively associated to IL-6, WBC, neutrophils and glucose. Furthermore, CypC was negatively associated with MMP-2 and HDL levels. In the case of CypA, there is a significant positive correlation between the levels of this immunophilin and IL-1β, TG, ALT, neutrophils and glucose levels, while a negative correlation is observed with IL-8, TNFα, MMP-2 and HDL. CypB levels were positively associated with CypD, IL-6 and MMP-9 measures and negatively with hemoglobin levels. Finally, CypD serum levels were only positively associated with MMP-9 and platelet. No correlations of Cyps levels with IFNϒ, IL-2, total cholesterol, LDL, lymphocytes and monocytes were observed. Besides CypA levels were significantly ($p < 0.05$) elevated in subjects with traditional cardiovascular risk factors such as hypertension, dyslipidemia, smoking, gender (male) and age > 50 years, Fig. 5A. In the case of CypB, Fig. 5B, the levels were significantly elevated in subjects with hypertension

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	CypA	CypB	CypC	CypD
CypA			0.339 ($p < 0.005$)	
CypB			0.535 ($p < 0.001$)	0.389 ($p < 0.001$)
CypC	0.339 ($p < 0.002$)	0.535 ($p < 0.001$)		0.284 ($p < 0.01$)
CypD		0.389 ($p < 0.001$)	0.284 ($p < 0.01$)	
IL-1β	0.304 ($p < 0.01$)			
IL-6		0.257 ($p < 0.01$)	0.302 ($p < 0.005$)	
IL-8	−0.300 ($p < 0.005$)			
TNFα	−0.298 ($p < 0.005$)			
MMP-2	−0.270 ($p < 0.01$)		−0.215 ($p < 0.05$)	
MMP-9		0.304 ($p < 0.005$)		0.378 ($p < 0.001$)
HDL	−0.294 ($p < 0.01$)		−0.466 ($p < 0.001$)	
TG	0.266 ($p < 0.05$)			
CRP	0.409 ($p < 0.05$)		0.577 ($p < 0.005$)	
ALT	0.332 ($p < 0.005$)			
WBC	0.219 ($p < 0.05$)		0.310 ($p < 0.005$)	
Neutrophils	0.296 ($p < 0.01$)		0.379 ($p < 0.001$)	
Hemoglobin		−0.238 ($p < 0.05$)		
Platelet				0.262 ($p < 0.05$)
Glucose	0.363 ($p < 0.001$)		0.520 ($p < 0.001$)	

Table 3. Correlations between cyclophilins, inflammation markers and clinical parameters. Bivariate analysis, N = 84. Spearman coefficient and significance ($p < 0.05$). Significant differences $p < 0.05$. Abbreviations as in Tables 1 and 2.

($p < 0.01$) and gender (male) ($p < 0.05$). Interesting CypC was significantly elevated ($p < 0.002$) by the presence of all cardiovascular risk factors with the exception of gender, Fig. 5C. Finally, CypD levels were not related to the risk factors, Fig. 5D.

Then, to evaluate the sensitivity and selectivity of Cyps values for the diagnosis of CAD, ROC curves were calculated on the basis of immunophilin levels, using CAD presence or absence as state variable or specific condition. As Fig. 6 shows, higher sensitivity and selectivity values were obtained with CypC. The AUC (c-statistic) calculated was 0.891 showing a significant value ($p < 0.001$) for CypC as predictor of CAD. For CypA and CypB, AUC were also significant, 0.748 and 0.655 respectively while CypD values are not useful to predict CAD. Therefore, it can be concluded that CypC is a good marker, CypA is fair as marker while CypB is a poor marker. From ROC curves, cut-off points for CAD presence were obtained as a compromise between sensitivity and selectivity. A cut-off for CypA > 8.2 ng/mL provides a specificity of 95.5%, a sensitivity of 32.5%, a positive predictive value (VPP) of 86.7%, a negative predictive value (VPN) of 60.9% and statistic power (P) of 65.5%. A cut-off for CypB > 204 pg/mL provides a specificity of 77.3%, a sensitivity of 25%, a VPP of 50%, a VPN of 53.1% and P of 52.4%. In the case of CypC, a cut-off > 17.5 pg/mL provides a specificity of 88.6%, a sensitivity of 70%, a VPP of 84.8%, a VPN of 76.5% and P of 79.8%. These values were used to evaluate the association between serum Cyps levels and traditional risk factors (gender, age, smoke, dyslipidemia and HTA). Each of the known risk factors and Cyps were combined in a single logistic-regression model (Table 4). When CypB > 204 pg/mL and CAD correlations were studied (univariable analysis) no significant differences were observed (data not shown), therefore this protein was not used for multivariable analysis. However, as Table 4 shows, either traditional risk factors and CypA and C are highly related with disease status (OR values between 7 and 18.2 and $p > 0.005$), with a higher relationship in the case of CypC. When multivariable analyses were performed with traditional risk factors, OR values were decreased while CI increased, compared to univariable analysis, but still significant. When CypA was added to risk factors, both age and CypA lost the correlation with CAD, while the rest of risk factors remained highly related with the disease. The inclusion of CypC in multivariable analysis, instead of CypA, resulted in a significant improvement of the overall performance of the logistic regression model (Cox-Snell R^2 from 0.54 to 0.596), although CI were also increased, and age and smoking condition lost the correlation with CAD. Finally, when both, CypA and CypC, were included in the logistic regression model, R^2 was improved to 0.605 as well as the CI. In summary, additionally to traditional risk CAD factors, levels of CypC over 17.5 pg/mL or of CypA over 8.2 ng/mL increase the risk of CAD. Therefore, CypA serum levels but especially the level of CypC can be useful biomarkers for CAD.

Discussion

Cyps play a key role in protein folding, repairing damaged proteins, modulation of the immune system, and other biological functions, although the role of most of the components of this family is not well known[23,24]. In addition to physiological functions, these proteins have been related with many other processes. In this regard, Cyps have been associated to cancer, aging, diabetes mellitus, chronic kidney diseases and neurodegeneration among others. Nevertheless, they seem to play a especial, and critical role in cardiovascular diseases[9,12]. In fact, CypA plasma levels have been previously proposed as biomarkers for coronary artery disease having also prognostic impact[18,21].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

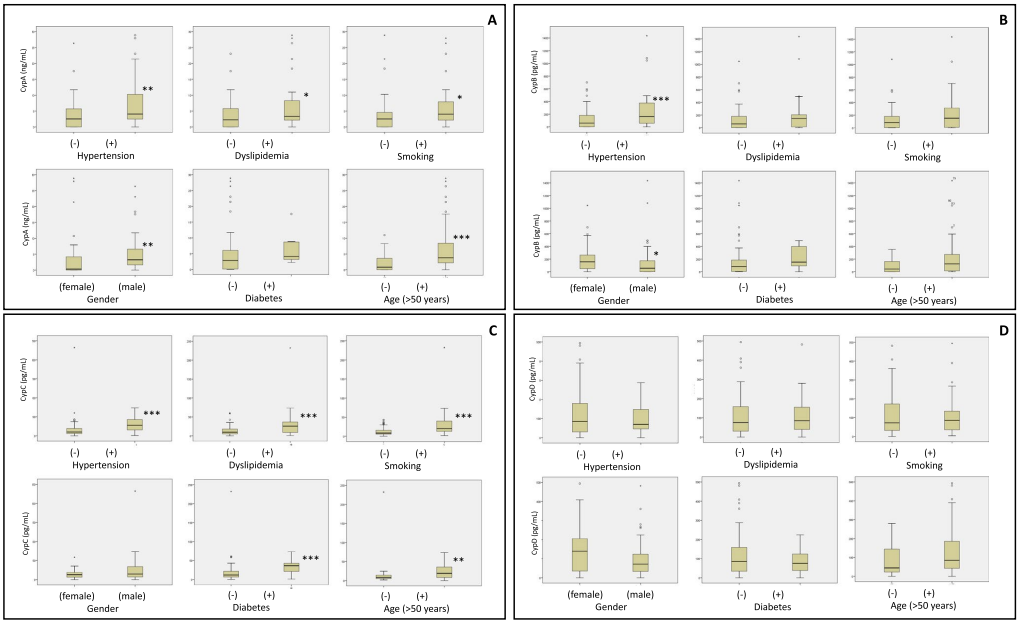


Figure 5. Cyclophilin levels and cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, smoking, gender, diabetes, age > 50). (**A**) Cyclophilin A (CypA) levels were significantly increased by the presence of hypertension, dyslipidemia, smoking, age of 50 years or older and in men but not by diabetes. (**B**) Cyclophilin B (CypB) levels were significantly increased by the presence of hypertension and in men but not by dyslipidemia, smoking, diabetes or age of 50 years or older. (**C**) Cyclophilin C (CypC) levels were significantly increased by the presence of hypertension, dyslipidemia, smoking, diabetes and age of 50 years or older but not by gender difference. (**D**) Cyclophilin D (CypD) levels were not significantly increased by the presence of cardiovascular risk factors. Mann-Whitney U Test was used to check statistic significances, N = 84. (***$P < 0.001$, **$P < 0.01$, *$P < 0.05$).

However, the role of the other Cyps and their relationship with CypA is less known. In the present study, we describe the serum levels of 4 Cyps and 8 inflammation markers in patients with acute CAD in comparison to healthy individuals, in order to clarify their relationship and to know if the less-studied immunophilins have a role in this disease.

CypA is released to the extracellular media in response to inflammatory stimuli and it is a critical regulator of endothelial cell dysfunction, vascular smooth muscle cells, fibroblast proliferation and cardiac hypertrophy[9,12]. In addition, CypA is involved in atherosclerosis, in oxidative stress, in nitric oxide generation and probably in blood pressure regulation[9,12]. We observed that CypA levels were significantly increased in CAD patients, as it was previously described[18,21,25]. In addition, the levels of CypA were correlated with several clinical parameters and with several inflammation markers as IL-1β, IL-8, TNFα, MMP-2, as well as with CRP, a known clinical marker of vascular inflammation. The correlation of CypA and CRP was before described and the role of both to predict the risk of coronary artery disease, or as markers of proinflammatory status in patients with diabetes was hypothesized[11,18,21,25]. Extracellular CypA has been involved in the production of IL-8, IL-1β, TNFα and MMP-9, while MMP-2 was not affected[26,27]. From our results, including ROC values, the role of CypA as CAD biomarker is reinforced although no significant correlation with traditional CAD risk factor was observed, probably due to the limited population used.

CypB is also abundant in all tissues but at lower levels than CypA. It has a crucial role against ROS and pro-inflammatory stimuli ant to induce chemotaxis of inflammatory cells. In addition, CypB levels were associated with the prevalence of metabolic syndrome and it is also related to hypertension, ROS effects in vascular function and heart failure[9,13,28]. In the present study, CypB levels were significantly increased in CAD patients and this increase was associated with IL-1β, IL-6, and MMP-9. However, CypB for CAD diagnosis, with a c-statistic 0.655 seems to be, although significant, a poor marker.

CypC is the less known among the Cyps studied in the present work. It has been mostly described in the kidney, but it was also reported to be localized intracellular and extracellularly[19]. The physiological or pathological role of this protein is still unknown, although it was related to macrophages activation and the levels are increased in cerebral tissues after ischemia[29]. In our study, CypC levels were significantly increased in patients with acute

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

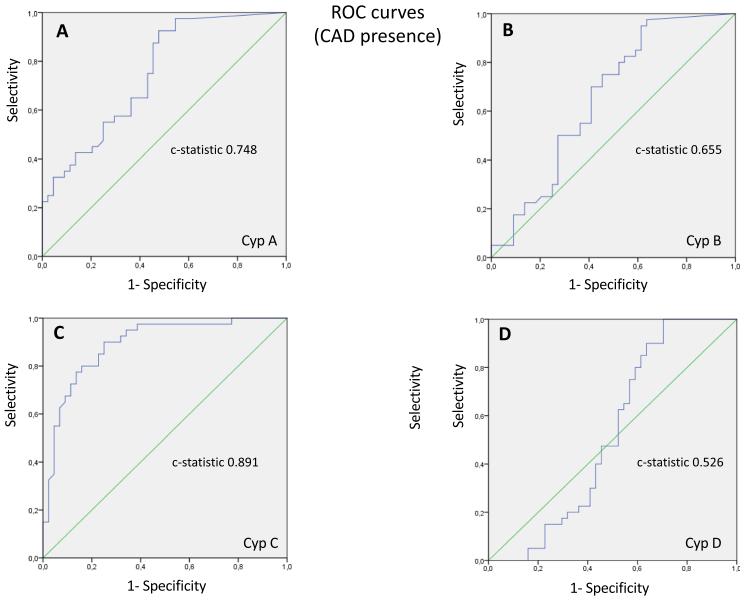


Figure 6. Receiver-operating-characteristic curves (ROC) describing the diagnostic performance of cyclophilins to identify coronary artery disease (CAD) > 50% as compared with the control subjects. (**A**) Cyclophilin A (CypA), the AUC (c-statistic) was 0.748 (95% confidence interval (CI), 0.654–0.851, $p < 0.001$). (**B**) Cyclophilin B (CypB), the AUC (c-statistic) was 0.655 (95% CI, 0.538–0.773, $p = 0.014$). (**C**) Cyclophilin C (CypC), the AUC (c-statistic) was 0.891 (95% CI, 0.821–0.961, $p < 0.001$), Specificity (88.6%), Sensitivity (70%), positive predictive value (VPP) (84.8%) and negative predictive value (VPN) (76%). (**D**) Cyclophilin D (CypD) the AUC (c-statistic) was 0.526 (95% CI, 0.396–0.655, $p = 0.687$). N = 84.

CAD. In fact, the values were three times higher. Interestingly, this protein was significantly associated with CypA, CypB and CypD levels as well as with IL-6, a well-known inflammatory marker associated to the rupture of the atheroma plaque[5,30]. CypC has a significant role as CAD marker when values are up to 17.5 pg/mL with a high OR when other risk factors are also included. As far as we know, this is the first paper describing the values of CypC and its proposed usefulness as CAD marker. The capability of CypC to diagnose CAD presence was also showed through the ROC curve. The C-statistic value in this case was 0.89, meaning that if CypC values are high then there is a probability of 89% of developing CAD.

Moreover, traditional cardiovascular risk factors frequency (hypertension, dyslipidemia, smoking and age >50) is related to higher levels of CypA and CypC, whereas CypB levels are only related to hypertension and gender. The relationship of CypA and these parameters was already described, however this is the first study where human serum CypB and C levels are analyzed and related to CAD risk[21]. These results point again to the relevance of Cyps in CAD.

CypD has a key role regulating mitochondria function (opening the mPTP), mitochondria-dependent cell death, ischemia-reperfusion injury, and it has been also associated with atherosclerosis and diabetes[10,31]. The inhibition of CypD is postulated as a therapeutic strategy for cardio-protection in ischemia-reperfusion damage[31,32]. All these studies are based on the effect of CypD at mitochondrial level but no data about serum levels of this protein are available. In this paper we describe serum levels of CypD that although not significant, probably due to the population size, seems to be different depending or not on the presence or absence of the disease. Although the relevance of these data is unknown, it is worth mentioning that CypD can be quantified in serum levels and the profile in healthy subjects and patients is not the same. Further studies should be done to clarify these findings that cannot yet be explained.

The general link between Cyps levels and biochemical blood parameters and cells count require further specific studies to be understood. However, since many of them are significantly related to the presence of CAD, their correlation with CypA and CypC again reinforce the possible engagement of these inmunophilins in this process.

Several limitations should be considered in the present study. First the number of subjects involved in this study is relatively small, however it is representative of the number of cases of the health area. The same happens with gender and age of patients. It is well known that CAD diseases prevalence is higher in men and aging people[2]. However, to avoid bias in control subjects values a wide range of age in men and women were selected, although a further analysis should be done in a large population. Second, CypA plasma levels were before proposed as CAD biomarker and related with several pathological process[9,21]. In addition, CypB was recently related

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

	Univariable analysis			Multivariable analysis (1)			Multivariable analysis (2)			Multivariable analysis (3)			Multivariable analysis (4)		
	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value	OR	95% CI	P value
Age > 50	8.18	2.8–23.5	<0.001	5.927	1.2–29.2	0.029	4.208	0.7–22.9	0.097	3.733	0.9–23	0.156	2.455	0.4–15	0.33
Gender (male)	7	2.3–21.1	0.001	10.835	1.2–80.4	0.020	14.064	1.5–130.4	0.02	27.026	2.3–316.5	0.009	18.725	1.8–194.7	0.014
Smoking	8.357	3–22.8	<0.001	14.731	2.8–76.1	0.001	13.499	2.4–74.18	0.003	5.872	0.9–36.4	0.057	4.757	0.8–27.4	0.081
HTA	12.36	3.2–46.5	<0.001	12.714	1.4–109.1	0.020	12.709	1.4–113.2	0.023	22.227	1.8–265.7	0.014	8.989	1.1–70	0.04
DL	13.15	4.4–38.9	<0.001	6.065	1.24–29.6	0.026	5.594	1–30.3	0.046	7.113	1.2–42.7	0.032	5.18	0.9–29.4	0.064
Cyp A > 8.2 ng/mL	10.11	2.1–48.3	0.004				5.177	0.7–38.2	0.107				4.504	0.5–36	0.156
Cyp C > 17.5 pg/mL	18.2	5.7–57.5	<0.001							23.002	2.5–209.8	0.005	18.46	2.2–152.6	0.007

Table 4. Correlated Risk factors for coronary artery disease. Analysis was performed on 7 variables: (1) Traditional risk factors (age > 50, gender, smoking, HTA and DL), % of cases 88.0, Cox and Snell R^2: 0.538, Nagelkerke R^2: 0.717. (2) Traditional risk factors + CypA, % of cases 86.7, Cox and Snell R^2: 0.554, Nagelkerke R^2: 0.739. (3) Traditional risk factors + CypC, % of cases 88.0, Cox and Snell R^2: 0.596, Nagelkerke R^2: 0.796. (4) Traditional risk factors + CypA + CypC, % of cases 90.4, Cox and Snell R^2: 0.605, Nagelkerke R^2: 0.807. Significant differences $p < 0.05$. Abbreviations as in Tables 1 and 2.

with metabolic syndrome[13]. However, CypC levels were not before studied. Third, total cholesterol and LDL values are higher in control subjects than in CAD patients due to antilipidemic treatments. Finally, DM was not considered as cardiovascular risk factor because of the limited number of control participants with this medical status, this will be considered in further studied. In addition, the intra and inter-assay coefficients of variation of the ELISA kits for Cyps determinations were <10%.

In summary, atherosclerosis is a vascular inflammatory disease, which involves several causative agents as oxidative stress among others. Migrating inflammatory cells produce large amounts of ROS and other pro-inflammatory stimuli that promote cardiovascular diseases. CypA has a key role in ROS production, as chemotactic agent and has been extensively associated to these diseases[14,19]. Since CypB and CypC are associated to redox regulation, their participation in those processes could be hypothesized.

Despite study limitations such as a study population relatively small, serum levels of CypC are clearly and significantly related with CAD. Further analysis in larger population would clarify the role of this protein. This paper describes for the first time that CypC levels are increased in CAD patients and confirms the role of CypA in this process. Among them, CypC serum levels highlight as a promising biomarker of CAD.

Material and Methods

Chemicals and solutions. Human Cyclophilin A ELISA kit (CSB-E09920H), Human Cyclophilin B ELISA kit (CSB-E11218H) and Human Cyclophilin C ELISA kit (CSB-EL018473HU) were obtained by Cusabio. Human Cyclophilin D ELISA kit (E-EL-H1936) was from Elabscience. Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel Milliplex® map kit (#HSTCMAG-28SK; #HSTCMAG28SPMX13; #HSTCMAG28SOMX21; #HSTCMAG28PMX13BK and #HSTCMAG28PMX21BK) and Human MPP Magnetic Bead Panel 2 Milliplex® map kit (#HMMP2MAG-55K) were purchased from Merk (Madrid, Spain).

Population study. An observational study about serum levels of Cyps was conducted in patients with symptoms of CAD referred to the Cardiology Department of Hospital Universitario Lucus Augusti in Lugo, Spain, from January 2017 to March 2018. A total of 40 patients with CAD were included. CAD disease was defined as prior myocardial infarction (MI), coronary revascularization or angiographic documentation of any significant coronary stenosis. CAD Patients with unstable angina suffering ischemic chess pain and/or electrocardiography abnormalities in the previous 24 hours were selected before receiving treatment. These patients were in the early onset of acute coronary syndrome. Coronary angiograms were evaluated by experienced cardiologists, who were blinded to the patients' data. A narrowing of artery lumen by more than 51% of the diameter was considered as a clinically significant for CAD. Patients with chronic or acute inflammatory disease, rheumatic disease, cancer, autoimmune diseases, valvular disease or congestive heart failure were excluded. Also, 44 control subjects without known atherosclerosis disease, with normal angiography findings and normal serum cardiac biomarkers were enrolled in the study. All participants included in the present study belong to the public healthcare area of Lugo, Spain. The population to be studied was designed according to CAD prevalence in this area. The institutional and regional ethical board (Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia, Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo, Secretaria Xeral, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia) approved the study (Reference: 2016/508, Approved date: December 19, 2016, according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki). Participants in the present study were informed and voluntarily written informed consent was obtained from all of them.

Baseline measurements. Information on general vital status and significant clinical data were obtained for all the patients and control volunteers from their medical history and personal questionnaires. CAD as well as familiar CAD antecedents were recorded. Hypertension (HTA), dyslipidemia (DL), smoking status, age and gender were assessed as cardiovascular risk factors. The lipid-lowering drugs, hypoglycemic drugs and antiagregants consumption was also taken into consideration. HTA was considered when blood pressure was ≥140/90 mmHg.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Diabetes mellitus (DM) was considered when fasting glucose levels were ≥126 mg/dl or if hypoglicemic treatment or insulin was used. DL was considered if low-density lipoprotein (LDL) cholesterol level was ≥140 mg/dl or high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level was ≤40 mg/dl, or if an antilipidemic treatment was used.

Blood sampling protocol. Peripheral blood was obtained from each participant from the antecubital vein using anti-coagulant free tubes (BD vacutainer serum tubes), in the first 24 hours after admission. The blood samples were allowed to clot for 20 min at room temperature before centrifugation (3,000 rpm for 10 minutes at 4 °C). Serum supernatants were collected and stored at −80 °C until needed for analysis. Samples were thawed once.

Measurement of Cyclophilin A, B, C and D serum levels. Levels of serum CypA, CypB, CypC and CypD were measured using ELISA regarding manufacturer's instructions. Before carrying out the experiments, serum samples were brought to room temperature, vortexed and centrifuged. Absorbance measurements were done in a microplate reader at 450 and 540 nm (only at 450 nm in the case of Cyp D). To correct optical imperfections, readings at 540 nm were subtracted from readings at 450 nm. All samples were run by duplicate and the concentrations were calculated using a standard curve. The range of determination was 3.12–200 ng/mL for CypA; 31.25–2,000 pg/mL for CypB; 23.5–1,500 pg/mL for CypC and 62.5–4,000 pg/mL for Cyp D. Serum levels below the lower limit of determination were undetectable and were considered as 0 pg/mL for statistical analysis. The intra and inter-assay coefficients of variation of the ELISA kits were <10%. No cross reactivity was observed between Cyp antibodies.

Measurement of cytokines and metalloproteinases levels. Levels of serum interferon ϒ (IFNϒ), interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNFα), metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were determined using a magnetic bead-based multiplex immunoassay (Milliplex® Map Kit) according to manufacturer's instructions. Briefly, the serum was collected and kept at −80 °C until the time of performing the ELISA. Before the experiment, the samples were thawed, mixed by vortexing and centrifuged to remove particles. Serum samples were diluted (twenty times in the case of cytokines and twice in the case of MMPs) with buffer. First, the 96-well filter bottom well was pre-washed. 25 μL of each standard, control or samples were added to the appropriate wells with 25 μL of assay buffer provided in the kit and 25 μL of the mixed beads to each well. After that, the plate was incubated for 2 hours at room temperature, in the case of cytokines, and for 18 hours at 4 °C in the case of MMPs and washed three times with washing buffer. Thereafter, detection antibodies were added to each well and incubated for 1 hour at room temperature. The plate was washed as described before and Streptavidin-Phycoerythrin added to each well and incubated for 30 min at room temperature. All incubations were performed in an orbital shaker at 600 rpm. Finally, the plate was washed, and the median relative fluorescence units were recorded using a Luminex® 200™ with xPONENT® software. All samples were run by duplicate and the concentrations were calculated using a standard curve. The range of determination was 0.61–2,500 pg/mL for IFNϒ; 0.49–2,000 pg/mL for IL-1β and IL-2; 0.18–750 pg/mL for IL-6; 0.31–1,250 pg/mL for IL-8; 0.43–1,750 pg/mL for TNFα; 68–50,000 pg/mL for MMP-2 and 14–10,000 for MMP-9. Serum levels below the lowest limit of determination were undetectable and were considered as 0 pg/mL for statistical analysis. There was no or negligible cross-reactivity between the antibodies and any of the other analytes. The intra-assay coefficient of variation of the ELISA kits were <5%. The inter-assay coefficient of variation of the ELISA kits were <15% (in the case of IL-1β, IL-2, IL-8, TNFα and MMP-9) and <20% (in the case of IFNϒ, IL-6 and MMP-2).

Statistical analysis. SPSS24 for Windows OS was used for the statistical analysis. Significance was set at $p < 0.05$. Participants were divided in two groups based on CAD diagnosis. Categorical variables were presented as percentages and continuous variables were presented as means ± SEM. Kolmogorov-Smirnov (with Lilliefors correction) was first performed as normality test. Those continuous variables with normal distribution were compared using a Student's T test (including Levene's test to assess the equality of variance), otherwise the non-parametric Mann-Whitney U test was used. In this way, basic characteristics, biochemistry parameters, and levels of Cyps and inflammation markers were compared. Categorical variables were compared using X^2 test. Correlations (bivariate analysis) between Cyps and inflammation markers and blood parameters were analyzed using the Spearman rank correlation coefficient. Receiver-operating-characteristic curves (ROC) were constructed to assess the sensitivity and specificity of Cyps measurements to know the ability to diagnose CAD by means of the area under the curve (AUC) ROC and expressed as C-statistic[33,34]. In addition, CAD curves were used to obtain cut-off points for logistic regression. Specificity, sensitivity, positive predictive value (VPP), negative predictive value (VPN) and statistic power (P) for the risk score were also calculated. Subsequently, single logistic regression model (univariable and multivariable analysis) was used to evaluate the association between serum Cyps levels and traditional risk factors (gender, age, smoke, DL and HTA). Data were present following STROBE reporting guidelines.

Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

1. Goodson, N., Marks, J., Lunt, M. & Symmons, D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. *Ann Rheum Dis* **64**, 1595–1601, https://doi.org/10.1136/ard.2004.034777 (2005).
2. Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J. & Lewington, S. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circulation research* **118**, 535–546, https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.307611 (2016).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. Leon, B. M. & Maddox, T. M. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World journal of diabetes* **6**, 1246–1258, https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i13.1246 (2015).
4. Martin-Timon, I., Sevillano-Collantes, C., Segura-Galindo, A. & Del Canizo-Gomez, F. J. Type 2 diabetes and cardiovascular disease: Have all risk factors the same strength? *World journal of diabetes* **5**, 444–470, https://doi.org/10.4239/wjd.v5.i4.444 (2014).
5. Goikuria, H., Vandenbroeck, K. & Alloza, I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. *Cytokine & growth factor reviews* **39**, 62–70, https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.01.006 (2018).
6. Gonzalez-Gay, M. A. & Gonzalez-Juanatey, C. Inflammation, endothelial function and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy* **14**, 122, https://doi.org/10.1186/ar3891 (2012).
7. Gonzalez-Gay, M. A. & Gonzalez-Juanatey, C. Cardiovascular risk factor assessment: still an unmet need in chronic inflammatory diseases. *Heart* **102**, 1937–1939, https://doi.org/10.1136/heartjnl-2016-310292 (2016).
8. Gonzalez-Gay, M. A. & Gonzalez-Juanatey, C. Inflammation: NSAIDs and cardiovascular risk in arthritis. *Nature reviews. Cardiology* **14**, 69–70, https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.208 (2017).
9. Perrucci, G. L. *et al.* Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. *Cardiovascular research* **106**, 353–364, https://doi.org/10.1093/cvr/cvv096 (2015).
10. Fujimoto, K., Chen, Y., Polonsky, K. S. & Dorn, G. W. 2nd. Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 10214–10219, https://doi.org/10.1073/pnas.0914209107 (2010).
11. Ramachandran, S. *et al.* Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease. *Cardiovascular diabetology* **13**, 1–8, https://doi.org/10.1186/1475-2840-13-38 (2014).
12. McClements, L., Annett, S., Yakkundi, A. & Robson, T. The Role of Peptidyl Prolyl Isomerases in Aging and Vascular Diseases. *Current molecular pharmacology* **9**, 165–179, https://doi.org/10.2174/1874467208666150519115729 (2016).
13. Zhang, H. *et al.* Elevated Serum Cyclophilin B Levels Are Associated with the Prevalence and Severity of Metabolic Syndrome. *Frontiers in endocrinology* **8**, 1–9, https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00360 (2017).
14. Satoh, K. C. A in cardiovascular homeostasis and diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine* **235**, 1–15, https://doi.org/10.1620/tjem.235.1 (2015).
15. Stocki, P., Chapman, D. C., Beach, L. A. & Williams, D. B. Depletion of cyclophilins B and C leads to dysregulation of endoplasmic reticulum redox homeostasis. *The Journal of biological chemistry* **289**, 23086–23096, https://doi.org/10.1074/jbc.M114.570911 (2014).
16. von Ungern-Sternberg, S. N. I., Zernecke, A. & Seizer, P. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease. *International journal of molecular sciences* **19**, e507, https://doi.org/10.3390/ijms19020507 (2018).
17. Yamaguchi, R. *et al.* Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. *Brain research* **1397**, 55–65, https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.03.036 (2011).
18. Ohtsuki, T. *et al.* Prognostic Impacts of Plasma Levels of Cyclophilin A in Patients With Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **37**, 685–693, https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308986 (2017).
19. Hoffman, H. & Schiene-Fischer, C. Functional aspects of extracellular cyclophilins. *Biol. Chem.* **395**, 721–735, https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0125 (2014).
20. Bukrinsky, M. Extracellular cyclophilins in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* **1850**, 2087–2095, https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.013 (2015).
21. Satoh, K. *et al.* Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ J.* **77**, 447–455, https://doi.org/10.1253/circj.CJ-12-0805 (2013).
22. Liu, X. *et al.* Blocking mitochondrial cyclophilin D ameliorates TSH-impaired defensive barrier of artery. *Redox biology* **15**, 418–434, https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.01.004 (2018).
23. Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S. L. & Pareek, A. Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant signaling & behavior* **8**, e22734, https://doi.org/10.4161/psb.22734 (2013).
24. Harikishore, A. & Yoon, H. S. Immunophilins: Structures, Mechanisms and Ligands. *Curr Mol Pharmacol.* **9**, 37–47, https://doi.org/10.2174/1874467208666150519113427 (2016).
25. Liu, M. C. *et al.* Cyclophilin A is associated with peripheral artery disease and chronic kidney disease in geriatrics: The Tianliao Old People (TOP) study. *Sci Rep.* **5**, 1–5, https://doi.org/10.1038/srep09937 (2015).
26. Yuan, W., Ge, H. & He, B. Pro-inflammatory activities induced by CyPA-EMMPRIN interaction in monocytes. *Atherosclerosis* **213**, 415–421, https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.09.033 (2010).
27. Kim, H. *et al.* Cyclophilin A may contribute to the inflammatory processes in rheumatoid arthritis through induction of matrix degrading enzymes and inflammatory cytokines from macrophages. *Clin Immunol.* **6**, 217–224, https://doi.org/10.1016/j.clim.2005.05.004 (2005).
28. Liao, D. F. *et al.* Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **275**, 189–196, https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.189 (2000).
29. Shimizu, T. *et al.* Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **25**, 325–337, https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600029 (2005).
30. Held, C. *et al.* Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *J Am Heart Assoc.* **6**, e005077, https://doi.org/10.1161/JAHA.116.005077 (2017).
31. Alam, M. R., Baetz, D. & Ovize, M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. *J Mol Cell Cardiol* **78**, 80–89, https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.09.026 (2015).
32. Kato, M. *et al.* The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy: evidence from two-photon imaging. *Cardiovasc Res.* **83**, 355–344, https://doi.org/10.1093/cvr/cvp094 (2009).
33. Kumar, R. & Indrayan, A. Receiver operating characteristic (ROC) curve for medical researchers. *Indian Pediatr* **48**, 277–287, https://doi.org/10.1007/s13312-011-0055-4 (2011).
34. Uno, H., Cai, T., Pencina, M. J., D'Agostino, R. B. & Wei, L. J. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med* **30**, 1105–1117, https://doi.org/10.1002/sim.4154 (2011).

Acknowledgements

This work could not have been done without the invaluable collaboration of the staff at the Servicio Vixilancia da Saude from Universidad de Santiago de Compostela (Andrea Vidal Dopazo) and at the Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti (Maria Jesús Basanta-Castro, Maria del Carmen Cabarcos Leal, Clara Jimenez-Serrano, Leonor Ortega- Fernández, Maria Jesus Palacios Pool, Sofía Seco-Aldegunde). The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From Conselleria de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia, 2017 GRC GI-1682 (ED431C 2017/01). From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, AGL2016-78728-R (AEI/FEDER, UE), ISCIII/PI16/01830, ISCIII/PI16/01816 and RTC-2016-5507-2, ITC-20161072.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

From European Union POCTEP 0161-Nanoeaters -1-E-1, Interreg AlertoxNet EAPA-317-2016, Interreg Agritox EAPA-998-2018, and H2020 778069-EMERTOX. Sandra Gegunde was supported by a fellowship from FIDIS, Spain.

Author Contributions

A.A., C.G.J. and L.M.B. conceived, designed the experiments and manuscript elaboration. J.B., M.S.A., A.T.F. and R.R.V. selected CAD patients and collected blood samples and baseline clinical characteristics. S.G., E.A. and R.A. determinations of cyclophilins and inflammatory mediators and data analysis.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Información de la revista: Según Journal Citations Reports. Clarivate.

High Serum Cyclophilin c levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease

Amparo Alfonso[1], Jeremías Bayón[2], Sandra Gegunde[1], Eva Alonso[1], Rebeca Alvariño[1], Melisa Santás-Álvarez[2], Ana Testa-Fernández[2], Ramón Rios-Vázquez[2], Carlos González-Juanatey[2] y Luis M. Botana[1]

[1]Pharmacology Department, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain.

[2]Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003, Lugo, Spain.

Revista: Scientific Reports. **ISSN:** 2045-2322

Fecha de la publicación: 22 de julio de 2019

Enlace: https://www.nature.com/articles/s41598-019-46988-x

Doi: 10.3390/md17060319

Editorial: SpringerNature. Nature Publising Group. Nature Portfolio. Heidelberger Platz 3, Berlin 14197, Alemania

Indicios de calidad:

Factor de Impacto (2019): 3,998

Factor de impacto de 5 años: 5,516

Categoría (2019): Multidisciplinary Sciences (17 de 71) Cuartil: Q1

Contribución del doctorando:

Jeremias Bayón realizó la selección de sujetos del estudio, la extracción de sangre, la recolección de datos de la historia clínica, participó en la elaboración de los kits y del artículo.

Autorización de la revista/editorial

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

I.2.- Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences Between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients

Resumen:

Antecedentes: Las ciclofilinas (Cyps) son una familia de peptidil-prolil cis/trans isomerasas involucradas consistentemente en enfermedades cardiovasculares a través de la vía de la inflamación. Este estudio tiene como objetivo investigar los niveles séricos de Cyps (CypA, CypB, CypC y CypD) en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) y la correlación con las características clínicas y los maracadores de inflamación.

Métodos: Desarrollamos un estudio prospectivo observacional con un total de 125 sujetos: 40 pacientes con EAC aguda, 40 pacientes con EAC crónica y 45 voluntarios control, en quienes se midieron los niveles séricos de Cyps (CypA, CypB, CypC y CypD), interleucinas y metaloproteasas.

Resultados: Los niveles de Cyp A aumentaron significativamente en los pacientes con EAC en comparación con los sujetos de control, pero no se observaron diferencias entre los pacientes con EAC aguda (7,80 ±1,30 ng/mL) y los pacientes con EAC crónica (5,52 ±1 0,76 ng/mL) (P = 0,13). No se mostraron diferencias en los niveles de CyB y Cyp D entre pacientes con EAC y controles y entre pacientes con EAC aguda y crónica. En relación con CypC, los niveles en pacientes con EAC fueron significativamente más altos en comparación con los controles (32,42 ±3,71 pg/mL vs. 9,38 ± 1,51 pg/mL, P < 0,001), pero no se obtuvieron diferencias entre los grupos de EAC aguda y crónica. (P = 0,62). Analizamos el punto de corte de CypC > 17,5 pg/mL y se asoció significativamente con mayor edad, hipertensión, dislipidemia y una EAC más extensiva en pacientes con EAC aguda y crónica.

Conclusiones: Los niveles de CypA y CypC están aumentados en pacientes con EAC. Los niveles séricos altos de CypC podrían ser un nuevo biomarcador en pacientes con EAC que se correlaciona con una enfermedad más grave.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ELMER PRESS

Original Article

Cardiol Res. 2020;11(5):319-327

Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences Between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients

Jeremias Bayon[a], Amparo Alfonso[b], Sandra Gegunde[b], Eva Alonso[b, c], Rebeca Alvarino[b], Melisa Santas-Alvarez[a], Ana Testa-Fernandez[a], Ramon Rios-Vazquez[a], Luis Botana[b], Carlos Gonzalez-Juanatey[a, d]

Abstract

Background: Cyclophilins (Cyps) are a family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases consistently involved in cardiovascular diseases through the inflammation pathway. This study aims to investigate the serum levels of Cyps (CypA, CypB, CypC and CypD) in patients with coronary artery disease (CAD) and the correlation with clinical characteristics and inflammation parameters.

Methods: We developed an observational prospective study with a total of 125 subjects: 40 patients with acute CAD, 40 patients with chronic CAD and 45 control volunteers, in whom serum levels of Cyps (CypA, CypB, CypC and CypD), interleukins and metalloproteinases were measured.

Results: CypA levels increased significantly in CAD patients compared with control subjects, but no differences were noted between acute CAD (7.80 ± 1.30 ng/mL) and chronic CAD (5.52 ± 0.76 ng/mL) patients (P = 0.13). No differences in CypB and CypD levels were showed between CAD patients and controls and between acute CAD and chronic CAD patients. In relation with CypC, the levels in CAD patients were significantly higher compared to controls (32.42 ± 3.71 pg/mL vs. 9.38 ± 1.51 pg/mL, P < 0.001), but no differences between acute and chronic CAD groups were obtained (P = 0.62). We analyzed the CypC > 17.5 pg/mL cut-off point, and it was significantly associated with older age, hypertension, dyslipidemia and more extensive CAD in acute and chronic CAD groups.

Conclusions: CypA and CypC levels are increased in CAD patients. High CypC serum levels could be a novel biomarker in CAD patients correlating with a more severe disease.

Keywords: Cyclophilins; Inflammation; Ischemic heart disease; Cardiovascular risk factors

Manuscript submitted June 12, 2020, accepted July 2, 2020
Published online August 1, 2020

[a]Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, c/Ulises Romero n°1, 27003 Lugo, Spain
[b]Pharmacology Department, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Avenida Carballo Calero s/n, 27002 Lugo, Spain
[c]Fundacion Instituto de Investigacion Sanitario Santiago de Compostela (FIDIS), Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003 Lugo, Spain
[d]Corresponding Author: Carlos Gonzalez-Juanatey, Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, c/Ulises Romero n°1, 27003 Lugo, Spain. Email: carlos.gonzalez.juanatey@sergas.es

doi: https://doi.org/10.14740/cr1120

Introduction

Inflammation plays a pivotal role in atherogenic process, being the cornerstone in coronary artery disease (CAD). Proinflammatory cytokines and immune factors are involved in the pathogenesis and progression of atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion injury and heart failure [1]. Immunophilins are a family of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases (PPIases) consistently involved in cardiovascular diseases [2]. PPIases include three protein subfamilies: cyclophilins (Cyps), FK506-binding proteins (FKBP) and parvulins. Cyps are some of the most conserved proteins present in eukaryotes and prokaryotes, and they have been implicated in diverse cellular processes and responses to multiple biotic and abiotic stresses [3]. Some of these proteins, such as CypA, CypB, CypD or FKBP51, have been previously associated with CAD [4-6].

The role of CypA in cardiovascular diseases as a biomarker for CAD has been previously reported [7-9], but less data are available about other Cyps. There is an important role for extracellular CypA in the pathogenesis of several diseases through receptor (cluster of differentiation 147 (CD147) or other) mediated autocrine and paracrine signaling pathways [10]. CypA reduced reactive oxygen species production and suppressed O_2 production dependent on reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, which could be a potential target for ischemia-reperfusion injury therapy [11]. Also, CypA has also been involved in arrhythmogenic cardiomyopathy remodeling, characterized by the progressive substitution of functional myocardium with non-contractile fibro-fatty tissue contributing to ventricular arrhythmias and sudden cardiac death [12]. Extracellular Cyps levels are considered as an inflammatory response to injury in many inflammatory processes [13]. In addition, Cyps are related to redox homeostasis, and redox-mediated signal-

Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org
This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Jeremías Bayón Lorenzo

ing has an important role in inflammation, atherosclerosis and CAD [14, 15]. In another way, inhibiting CypD to inhibit mitochondria permeability transition pore opening protects against ischemia-reperfusion injury, making modulation of CypD activity a potentially important therapeutic goal [16].

CypC has a key role in inflammation related to macrophages activation and has been recently proposed by our group as a novel biomarker in acute CAD patients [17]. In addition, a significant correlation between traditional cardiovascular risk factors and CypC levels were observed in this group of patients [17]. Nevertheless, multiple biomarkers in CAD (troponins, N-terminal pro-brain natriuretic peptide and others) play a key role for diagnosing and prognostication in the acute phase of the events, losing prominence in chronic CAD. We suggest that Cyps could be a marker of coronary disease beyond the acute coronary event, so we studied its levels and the relation with other CAD biomarkers in the acute and chronic phase of CAD.

The aim of the present study was to explore the relationship between Cyps and ischemic heart disease in acute and chronic CAD patients.

Materials and Methods

Population study

This is an observational prospective study where 125 subjects (40 patients with acute CAD, 40 patients with chronic CAD and 45 control volunteers) were consecutively enrolled. Acute CAD was defined as unstable angina, non-ST segment myocardial infarction or ST-segment myocardial infarction according current European Society of Cardiology (ESC) practical clinical guidelines [18, 19]. Chronic CAD was defined as an ischemic heart disease clinically stable without a rise of myocardial biomarkers, as the ESC guidelines defined [20]. Patients were recruited at the Cath-Lab Unit after confirm that they had CAD. All acute CAD patients were admitted to hospital due to an acute coronary syndrome, and all chronic CAD patients were outpatients who came to make a coronary angiography due to clinical indication.

Peripheral blood samples were obtained from all subjects. The blood was centrifuged (3,000 rpm, 10 min at 4 °C) and supernatants were collected and stored at -80 °C until Cyps analysis. After thawed at room temperature, these supernatants were used to measure levels of Cyps (CypA, CypB, CypC and CypD) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. Absorbance measurements were done in a microplate reader at 450 and 540 nm for CypA, CypB and CypC, and at 450 nm in the case of CypD. Samples were always run by duplicate. The range of determination was 3.12 - 200 ng/mL for CypA; 31.25 - 2,000 pg/mL for CypB; 23.5 - 1,500 pg/mL for CypC and 62.5 - 4,000 pg/mL for CypD. Serum levels below the lower limit of quantification were undetectable and therefore were considered as 0 pg/mL for statistical analysis. The intra and inter-assay coefficients of variation of the ELISA kits were < 10%. No cross reactivity was observed between Cyp antibodies. Human cyclophilin A ELISA kit (CSB-E09920H), human cyclophilin B ELISA kit (CSB-E11218H) and human cyclophilin C ELISA kit (CSB-EL018473HU) were obtained by Cusabio. Human Cyclophilin D ELISA kit (E-EL-H1936) was from Elabscience.

Levels of serum interferon γ (IFN-γ), interleukin (IL)-1β, IL-2, IL-6, IL-8, tumor necrosis factor α (TNF-α) and metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 were determined in serum samples using a magnetic bead-based multiplex immunoassay (Milliplex® Map Kit) according to manufacturer's instructions. Human high sensitivity T cell magnetic bead panel Milliplex® map kit (#HSTCMAG-28SK; #HSTCMAG28SPMX13; #HSTCMAG28SOMX21; #HSTCMAG28PMX13BK and #HSTCMAG28PMX21BK) and human MPP magnetic bead panel 2 Milliplex® map kit (#HMMP2MAG-55K) were purchased from Merck (Madrid, Spain).

Clinical characteristics were obtained for all the patients and control volunteers from their medical history.

The institutional and regional ethical board approved the study (reference: 2016/508, approved date: December 19, 2016, according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki). Participants in the present study were informed and a voluntarily written informed consent was obtained from all of them.

Statistics

SPSS24 for windows was used for the statistical analysis. Categorical variables were presented as percentages and continuous variables were presented as means ± standard error of the mean (SEM). Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors correction) was first performed as a normality test.

Comparisons between three groups (controls, acute CAD and chronic CAD) were made; comparisons between the controls and CAD patients were also made.

Statistical significance in qualitative variables was calculated with Chi-square test. Those continuous variables with normal distribution were compared between two groups using a Student's *t*-test (including Levene's test to assess the equality of variance), otherwise the non-parametric Mann-Whitney test was used. Differences between three groups were calculated using analysis of variance (ANOVA) test.

Receiver-operating-characteristic curves (ROC) were constructed to assess the sensitivity and specificity of Cyps and were used to obtain optimal cut-off points for Cyps in relation to CAD.

Three models of parsimonious logistic regression were constructed to evaluate if relationship between Cyps and CAD was independent of other factors related to CAD.

Results

We studied 125 subjects (mean age 57.8 ± 14.5 years; 72.8% male): 40 acute CAD patients (35 men and five women), 40 chronic CAD patients (33 men and seven women) and 45 control volunteers without CAD (23 men and 22 women). The same measurements were done in both populations (CAD patients and controls) and results were compared.

Baseline characteristics and biochemical data were col-

 Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics

	Controls (n = 45)	Coronary artery disease		P value			
		Chronic (n = 40)	Acute (n = 40)	Between three groups	CAD vs. controls	Chronic CAD vs. acute CAD	Chronic CAD vs. controls
Gender (male)	51.1% (23)	82.5% (33)	87.5% (35)	< 0.001	< 0.001	0.531	0.002
Age	45.6 ± 1.5	65.2 ± 1.8	64.2 ± 1.9	< 0.001	< 0.001	0.713	< 0.001
LVEF (%)	-	54.2 ± 10.3	55.6 ± 8.7	-	-	0.528	-
Cardiovascular risk factors							
Hypertension	6.7% (3)	60.0% (24)	47.5% (19)	< 0.001	< 0.001	0.262	< 0.001
Dyslipidemia	13.3% (6)	77.5% (31)	67.5% (27)	< 0.001	< 0.001	0.317	< 0.001
Active smoker	4.5% (2)	17.5% (7)	37.5% (15)	0.001	0.002	0.045	0.079
Diabetes	2.2% (1)	35% (14)	20% (8)	< 0.001	0.001	0.248	< 0.001
Family history of CAD	4.4% (2)	12.5% (5)	17.5% (7)	0.768	0.651	0.531	0.616
Medications							
AAS	0% (0)	77.5% (31)	15% (6)	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001
Clopidogrel	0% (0)	12.5% (12)	7.5% (3)	0.04	0.05	0.712	0.020
Statins	11.1% (5)	75% (30)	42.5% (17)	< 0.001	< 0.001	0.003	0.100
Number of coronary artery vessels with significant stenosis							
0	0 (0%)	2.5% (1)[a]	0% (0)	< 0.001	< 0.001	0.219	< 0.001
1	0 (0%)	35% (14)	47.5% (19)				
2	0 (0%)	22.5% (9)	30% (12)				
3	0 (0%)	40.5 (16)	22.5% (9)				
Type of coronary artery revascularization							
None	100% (45)	7.5% (3)	2.5% (1)	< 0.001	< 0.001	0.405	< 0.001
PCI	0% (0)	82.5% (33)	92.5% (37)				
CABG	0% (0)	10% (4)	5% (2)				
Complete coronary artery revascularization							
Yes	0% (0)	40% (16)	70% (28)	< 0.001	< 0.001	0.007	< 0.001
Laboratory parameters							
Total cholesterol (mg/dL)	201.14 ± 26.98	149.7 ± 33.06	177.05 ± 41.55	< 0.001	< 0.001	0.006	< 0.001
LDL (mg/dL)	120.77 ± 24.44	81.85 ± 26.32	108.0 ± 34.17	< 0.001	< 0.001	0.001	< 0.001
HDL (mg/dL)	57.77 ± 15.28	41.15 ± 7.91	36.53 ± 7.95	< 0.001	< 0.001	0.024	< 0.001
TG (mg/dL)	107.17 ± 40.16	133.78 ± 45.91	164.0 ± 69.69	< 0.001	< 0.001	0.053	0.018
hsCRP (mg/dL)	0.49 ± 0.5	8.33 ± 11.64	43.45 ± 45.31	0.001	0.007	0.050	0.040
ALT (U/L)	22.06 ± 2.38	33.14 ± 19.47	33.32 ± 22.75	0.029	0.008	0.973	0.013
WBC (number/µL)	6,632.35 ± 320.45	7,305.25 ± 1,958.07	10,383.50 ± 4,732.36	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.155
Lymphocytes (number/µL)	2,139.39 ± 113.98	2,030.75 ± 788.78	1,982.50 ± 1,167.70	0.806	0.539	0.829	0.599
Neutrophils (number/µL)	3,757.58 ± 293.36	4,347.5 ± 1,543.06	7,462.50 ± 4,238.39	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.112
Monocytes (number/µL)	548.48 ± 23.08	641.75 ± 222.98	730.00 ± 315.58	0.010	0.037	0.153	0.047
Hemoglobin (g/dL)	13.88 ±1.30	14.33 ± 1.54	14.65 ± 1.54	0.068	0.037	0.326	0.145
Platelet (number/µL)	229,147 ± 52,606	188,250.0 ± 55,290.72	221,925.0 ± 77,988.62	0.013	0.072	0.029	0.002
Glucose (mg/dL)	90.5 ± 32.4	120.28 ± 48.55	110.8 ± 19.97	0.002	0.001	0.259	0.002

LVEF: left ventricular ejection fraction; AAS: acetylsalicylic acid; PCI: percutaneous coronary intervention; CABG: coronary artery bypass graft; LDL: low-density lipoprotein; HDL: high-density lipoprotein; TG: triglycerides; hsCRP: high sensitivity C-reactive protein; ALT: alanine aminotransferase; WBC: white blood cells; SEM: standard error of the mean. [a]Severe milking in left anterior descending coronary artery. Data values are shown as mean ± SEM. Significant differences: P < 0.05.

Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lected in the three groups and showed in Table 1.

Patients with CAD compared with controls had more traditional cardiovascular risk factors. Triglycerides (TG), high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) and alanine transaminase (ALT) were significantly increased in CAD patients while cholesterol values were significantly decreased, according to statin treatment in this very high-risk population. HsCRP levels were significantly increased in acute CAD vs. chronic CAD patients (43.45 ± 45.31 mg/dL vs. 8.33 ± 11.64 mg/dL; P = 0.05), as well as between acute and chronic CAD and control group respectively (43.45 ± 45.31 mg/dL and 8.33 ± 11.64 mg/dL vs. 0.49 ± 0.5 mg/dL; P = 0.007), with no significant correlation between Cyps and hsCRP serum levels among the groups. In the case of blood cell count, white blood cell, neutrophils, monocytes and hemoglobin were significantly increased in CAD patients as well as glucose levels, while lymphocytes and platelets were not modified. No differences between acute CAD and chronic CAD were observed in the number of coronary vessels involved in CAD and in left ventricular ejection fraction. Otherwise, we observed a significant difference in the complete coronary artery revascularization (70% acute CAD vs. 40% chronic CAD; P = 0.007). Serum levels of CypA, CypB, CypC and CypD are showed in Table 2. Considering CAD patients as a group, CypA levels were significantly increased in CAD patients (6.65 ± 0.75 ng/mL compared with control subjects: 2.53 ± 0.53 ng/mL; P < 0.001). No significant differences were noted between acute CAD group and chronic CAD group (7.80 ±1.30 ng/mL vs. 5.52 ± 0.76 ng/mL; P = 0.134). The CypC levels in CAD patients were significantly higher compared with control subjects (32.42 ± 3.71 pg/mL vs. 9.38 ± 1.51 pg/mL; P < 0.001), but there were no differences between acute and chronic CAD groups (34.28 ± 5.77 pg/mL vs. 30.56 ± 4.73 pg/mL; P = 0.620). Also, there were no differences between CAD patients and control groups in CypB and CypD levels. No significant differences in the plasma levels of IL-2, IL-6, TNF-α, and MMP-9 were observed when CAD patients and controls were compared. IL-1β shows high levels in CAD patients (with no differences between groups: 3.94 ± 0.42 pg/mL in chronic CAD vs. 3.73 ± 0.37 pg/mL in acute CAD; P = 0.69) than controls (2.71 ± 0.17 pg/mL; P < 0.001). IL-6 levels were significantly increased in acute CAD vs. chronic CAD patients (8.08 ± 1.59 pg/mL vs. 3.95 ± 0.59 pg/mL; P = 0.019) as well as between acute CAD and control group (8.08 ± 1.59 pg/mL vs. 4.04 ± 0.33 pg/mL; P = 0.015). In the case of IL-8 a significant decrease in CAD patients' serum levels were observed (6.86 ± 0.88 pg/mL for CAD patients vs. 8.17 ± 0.65 pg/mL for control subjects; P = 0.037). The same happens when IFN-γ levels were measured, since a decrease in CAD patients (27.5 ± 2.4 pg/mL in chronic CAD and 27.4 ± 2.7 pg/mL in acute CAD) vs. controls (34.3 ± 2.8 pg/mL; P = 0.03) was observed. MMP-2 levels were significantly decreased, from 120,317 ± 5,068 ng/mL in control subjects to 100,152 ± 3,820 ng/mL in CAD patients (P = 0.003), with no differences between CAD groups (95,434 ± 5,691 ng/mL in acute CAD group vs. 106,524 ± 5,010 ng/mL in chronic CAD group; P = 0.148).

Cyps levels were linked with traditional cardiovascular risk factors. CypA was significantly linked to hypertension, dyslipidemia, smoking, being male and being over 50 years old. CypB was linked to hypertension and being female. How-

Table 2. Cyclophilins and Inflammatory Markers

	Controls	Coronary artery disease		P value			
		Chronic	Acute	Between three groups	CAD vs. controls	Chronic CAD vs. acute CAD	Chronic CAD vs. controls
Cyclophilins (Cyps)							
CypA (ng/mL)	2.53 ± 0.53	5.52 ± 0.759	7.80 ± 1.30	< 0.001	< 0.001	0.134	0.001
CypB (pg/mL)	140.2 ± 32.7	181.0 ± 28.2	208.8 ± 44.8	0.387	0.204	0.601	0.353
CypC (pg/mL)	9.38 ± 1.5	30.56 ± 4.7	34.28 ± 5.8	< 0.001	< 0.001	0.620	< 0.001
CypD (pg/mL)	125.14 ± 20.5	117.74 ± 11.5	97.68 ± 10.7	0.433	0.431	0.205	0.756
CypC > 17.5 (pg/mL)	13.3% (6)	57.5% (29)	72.5% (23)	< 0.001	< 0.001	0.245	< 0.001
Inflammatory markers							
IFN-γ (pg/mL)	34.3 ± 2.8	27.5 ± 2.4	27.4 ± 2.7	0.102	0.032	0.989	0.73
IL-1β (pg/mL)	2.71 ± 0.17	3.94 ± 0.42	3.73 ± 0.37	0.012	0.001	0.695	0.009
IL-2 (pg/mL)	4.38 ± 0.44	4.87 ± 0.52	4.97 ± 0.51	0.648	0.356	0.891	0.473
IL-6 (pg/mL)	4.04 ± 0.33	3.95 ± 0.59	8.08 ± 1.59	0.003	0.093	0.019	0.893
IL-8 (pg/mL)	8.17 ± 0.65	6.70 ± 0.56	7.02 ± 0.75	0.241	0.037	0.738	0.96
TNF-α (pg/mL)	10.72 ± 0.47	9.76 ± 0.67	9.27 ± 0.64	0.201	0.088	0.605	0.234
MMP-2 (ng/mL)	120,317 ± 5,068	106,524 ± 5,010	95,434 ± 5,691	0.004	0.003	0.148	0.256
MMP-9 (ng/mL)	258,804 ± 15,582	245,000 ± 18,292	221,371 ± 20,436	0.333	0.240	0.392	0.565

CAD: coronary artery disease; Cyp: cyclophilin; IFN-γ: interferon γ; IL: interleukin; TNF-α: tumor necrosis factor α; MMP: metalloproteinase; SEM: standard error of the mean. Data values are shown as mean ± SEM. Significant differences: P < 0.05.

Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

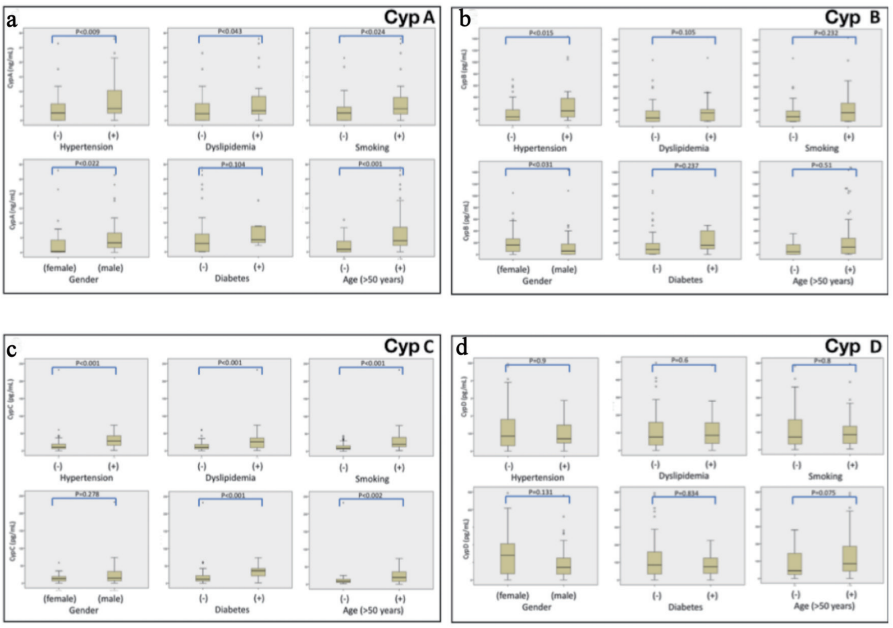


Figure 1. Serum Crps levels ((a) CypA, (b) CrpB, (c) CypC, (d) CypD) in patients with CAD and the relationship with traditional cardiovascular risk factors. Frequency plots: data represented as Cyp levels in x-axis, versus traditional cardiovascular risk factors (hypertension, dyslipidemia, smoking, gender, diabetes and age > 50 years) in y-axis. CAD: coronary artery disease; Crps: cyclophilins.

ever, CypC was significantly linked to hypertension, dyslipidemia, smoking, diabetes and being over 50, but not being male. Finally, CypD was not linked to the traditional cardiovascular risk factors involved in our study (Fig. 1).

ROC curves were calculated on the basis of Cyps levels, using CAD presence or absence as state variable. Higher sensitivity and selectivity values were obtained with CypC. The area under the ROC curve (AUC) (c-statistic) calculated was 0.85, showing a significant value ($P < 0.001$) of CypC as predictor of CAD. For CypA and CypB, AUC was also significant, 0.74 and 0.65 respectively, with less predictive power, while CypD values are not useful to predict CAD (AUC: 0.56).

In our study, the optimal cut-off point as CAD marker was CypC > 17.5 pg/mL, and we recently proposed this value as a novel biomarker of CAD in acute CAD patients [17]. Using this CypC cut-off point, we observed that it was present in 72.5% of acute CAD patients, and 57.5% in chronic CAD patients but only in 11.1% of controls subjects. We also observed that this cut-off point is significantly linked to older age, hypertension, dyslipidemia and presence of CAD and more extensive CAD (Table 3).

The cut-off point of Cyp > 17.5 pg/mL for the diagnosis of CAD had a sensibility of 63.7% and a specificity of 88.9% with a positive predictive value of 91.1% and a negative predictive value of 58.0%. We made three models of logistic regression, with variables that had shown a significant link with the presence of CAD in univariable analysis, in order to explore if this cut-off point was independent from the presence of CAD. This multivariable analysis confirms the strong association of CypC > 17.5 pg/mL cut-off point with CAD (odds ratio (OR): 56.4; $P = 0.019$) even when we adjusted with potential confounding factors. Also, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), age and male gender are significantly linked to CAD (Table 4).

Discussion

Inflammation has a key role in cardiovascular diseases, and Cyps are implicated in this mechanism [7, 10]. CypA plasma levels have been confirmed as biomarkers for CAD, even with prognosis impact in long-term follow-up [9]. On the other hand, the rest of Cyps are not well known yet, and their relationship with CAD is a fact worth studying further. In our study, we described the serum levels of four Cyps and eight inflammation markers in patients with CAD (acute CAD and chronic CAD) and controls, with the objective of looking for association with CAD.

CypA is released to the extracellular media in response to inflammation. CypA is involved in multiple processes such as endothelial dysfunction, modulation of smooth muscle cells,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 3. Univariate Analysis of CypC ≥ 17.5 pg/mL: Clinical Characteristics

	CypC < 17.5	CypC ≥ 17.5	P value
Gender (male)	68.1% (47)	21.4% (12)	0.191
Age	52.8 ± 1.8	64.0 ± 1.6	< 0.001
LVEF (%)	54.4 ± 2.1	55.3 ± 1.3	0.697
Cardiovascular risk factors			
Hypertension	27.5% (19)	48.2% (27)	0.017
Dyslipidemia	36.2% (25)	69.6% (39)	< 0.001
Active smoker	16.2% (11)	23.2% (13)	0.324
Diabetes	13.0% (9)	21.4% (12)	0.212
Family history of CAD	15.8% (6)	15.4% (8)	0.958
Medications			
AAS	23.2% (16)	37.5% (21)	0.081
Clopidogrel	1.4% (1)	12.5% (7)	0.022
Statins	36.2% (25)	48.2% (27)	0.176
Coronary artery disease			
Yes	42.0% (29)	91.1% (51)	< 0.001
No	58.0% (40)	8.9% (5)	
Number of coronary artery vessels with significant stenosis			
0	58.0% (40)	10.7% (6)	< 0.001
1	21.7% (15)	32.1% (18)	
2	7.2% (5)	28.6% (16)	
3	13.0% (9)	28.6% (16)	
Type of coronary artery revascularization			
None	58.0% (40)	16.1% (9)	< 0.001
PCI	40.6% (28)	75.0% (42)	
CABG	1.4% (1)	8.9% (5)	
Complete coronary artery revascularization			
No	72.5% (50)	55.4% (31)	0.46
Yes	27.5% (19)	44.6% (25)	
Readmission for coronary artery disease			
No	82.8% (24)	80.4% (41)	0.794
Yes	17.2% (5)	19.6% (10)	

LVEF: left ventricular ejection fraction; AAS: acetylsalicylic acid; PCI: percutaneous coronary intervention; CABG: coronary artery bypass graft. Significant differences: P < 0.05.

fibroblast and cardiac hypertrophy [2, 5]. Even more, CypA levels can be used to predict all-cause death, rehospitalization, and coronary revascularization in patients with CAD [9]. Also, in patients with acute myocardial infarction, platelet-bound CypA was significantly decreased compared with patients with stable CAD [21]. In our study, CypA levels were significantly increased in CAD patients, in the same line of previous studies [9, 14].

CypB has a crucial role against ROS and pro-inflammatory status, and their levels were associated with metabolic syndrome, vascular function and heart failure [2, 6]. Even though, in our study, we do not find any difference between CAD patients and controls in CypB levels.

Cyp C has a key role in inflammation and has been recently published by our group as a novel biomarker in acute CAD patients [17]. The main finding of this study is that in our population, CypC is strongly correlated with the presence of chronic and acute CAD and with a cut-off point of CypC > 17.5 pg/mL; we can classify patients of CAD with high sensibility of 63.7% and specificity of 88.9%. In our study, the cut-off point of > 17.5 pg/mL was associated with more extensive CAD (two or three coronary vessels with significant stenoses in 56% of cases vs. 20.2% in patients with lower levels) and related to the need for coronary revascular-

 Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 4. Multivariate Analysis: CypC > 17.5 pg/mL and Related Factors With Presence of CAD

	OR	OR CI 95%	P value
Model 1: CypC > 17.5 and clinical variables			
CypC > 17.5	56.808	4.85 - 665	0.001
Age	1.153	1.05 - 1.26	0.002
Gender (male)	45.4	3.13 - 498	0.005
Hypertension	13.044	1.25 - 135	0.032
Dyslipidemia	9.420	1.55 - 57.1	0.015
Smoker	18.616	1.75 - 198	0.015
Model 2: CypC > 17.5 and analytical variables			
CypC > 17.5	22.6	3.77 - 136	0.001
Total cholesterol	0.830	0.751 - 0.918	0.001
LDL	1.170	1.05 - 1.30	0.003
TG	1.051	1.03 - 1.08	0.000
Model 3: CypC > 17.5 and clinical and analytical variables			
CypC > 17.5	30.7	3.85 - 245	0.001
Total cholesterol	0.963	0.938 - 0.989	0.005
Gender (male)	40.7	4.32 - 383	0.001
Age	1.215	1.095 - 1.348	< 0.001

CypC: cyclophilin C; LDL: low-density lipoprotein; TG: triglycerides; OR: odds ratio; OR CI 95%: odds ration confidence interval 95%. Significant differences: P < 0.05.

ization procedures (86.9% vs. 42%, respectively). Therefore, in relation to patients with higher CypC levels, it is a promising and significant marker of complex and diffuse CAD. In addition, CypC levels were correlated with age and higher prevalence of hypertension and dyslipidemia. Moreover, it is the first study showing a significant link between CypC levels with chronic CAD, adding additional information to the classic CAD biomarkers, which only increases in the acute scenario.

CypD has been shown to be also associated with inflammation, atherosclerosis and diabetes. The inhibition of CypD is postulated as a cardio-protection target in ischemia-reperfusion myocardial injury [22]. In our study, no differences in CypD levels were observed between CAD groups.

The pro-inflammatory cytokines play a pivotal role in atherosclerosis. IL-1β is a cytokine that is central to the inflammatory response and that drives the IL-6 signaling pathway. In our study, CAD patients had significantly higher IL-1β serum levels than controls. The CANTOS trial (Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcome Study) provided the first evidence that targeting inflammation in humans with ischemic heart disease could improve clinical outcomes. Treatment with the anti-IL-1β antibody canakinumab significantly reduced recurrent cardiovascular events in individuals with stable CAD well treated with standard-of-care measures [23]. In addition, in a recent study, High levels of IL-1β were more often present in patients with acute coronary syndrome vs. controls (55% vs. 40% vs. 34%, P < 0.001), and were predictive for all-cause mortality (adjusted hazard ratio (HR): 1.45; 95% CI: 1.16 - 1.82, P < 0.001) [24].

IL-6 plays a central role in inflammation and tissue injury, and long-term IL-6 plasma levels are linked with CAD risk as strongly as some other major established risk factors [25]. In our study, acute CAD patients had significantly higher IL-6 serum levels than chronic CAD patients. It was recently published that IL-6 was higher in patients with functionally relevant CAD as compared to those without (1.56 pg/mL vs. 1.30 pg/mL, P < 0.001) [26]. On the other hand, IL-8 is the other cytokine that is involved in the ischemic heart disease and in the post-ischemic tissue repair processes and thus is considered to exert beneficial effects on cardiac function [27]. In this study, patients with CAD had significantly lower levels of IL-8 than controls. Finally, we identify lower levels of IFN-γ in CAD patients vs. controls. It is known that despite its strong proinflammatory effects, IFN-γ also exhibits anti-inflammatory characteristics and, accordingly, is able to manipulate the secretion of both pro- as well as anti-inflammatory signaling molecules.

Taking into account all these observations, it is possible that serum levels of CypC > 17.5 pg/mL could apply as a possible CAD biomarker in the future.

Limitations

In this preliminary study, the number of patients studied is small; even so the significance of the relationship between CypC and the presence of CAD is very relevant. Another limitation is the difference in traditional cardiovascular risk factors between the healthy volunteer group and the CAD group. In

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

this regard, we made a multivariate analysis including these variables to confirm the independent relationship between CypC and CAD.

Conclusions

CypA and CypC levels are increased in CAD patients. No differences in Cyps serum levels between acute and chronic CAD patients were found. High CypC serum levels could be a novel biomarker in CAD patients correlating with a more severe disease.

Acknowledgments

We appreciated the support of Dr. Emilio Paredes for statistical analysis.

Financial Disclosure

This study has received funding from the following FEDER co-funded grants: Conselleria de Cultura, Educacion e Ordenacion Universitaria Xunta de Galicia, 2017 GRC GI-1682 (ED431C 2017/01); Ministerio de Ciencia e Innovacion ISCIII/PI16/01816, ISCIII/PI16/01830, ISCIII/PI19/00879 and ISCIII/PI19/001248; and from European Union POCTEP 0161-Nanoeaters-1-E-1, Interreg AlertoxNet EAPA-317-2016, Interreg Agritox EAPA-998-2018 and H2020 778069- EMERTOX. Sandra Gegunde was supported by a fellowship from FIDIS, Spain.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Informed Consent

All subjects provided written informed consent.

Author Contributions

JB, AA and CGJ has designed and performed the study. JB, AA, EA and LB have drafted the manuscript and did critical editing. JB, AA, SG, RA, MSA, ATF and RRV have assisted and supported in sample collection and subsequent analysis with statistics. JB, AA, LB and CGJ have carefully supervised this manuscript preparation and writing.

Data Availability

The authors declare that data supporting the findings of this study are available within the article.

References

1. Goikuria H, Vandenbroeck K, Alloza I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. Cytokine Growth Factor Rev. 2018;39:62-70.
2. Perrucci GL, Gowran A, Zanobini M, Capogrossi MC, Pompilio G, Nigro P. Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res. 2015;106(3):353-364.
3. Singh K, Winter M, Zouhar M, Rysanek P. Cyclophilins: less studied proteins with critical roles in pathogenesis. Phytopathology. 2018;108(1):6-14.
4. Ramachandran S, Venugopal A, Kutty VR, A V, G D, Chitrasree V, Mullassari A, et al. Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease. Cardiovasc Diabetol. 2014;13:38.
5. McClements L, Annett S, Yakkundi A, Robson T. The role of peptidyl prolyl isomerases in aging and vascular diseases. Curr Mol Pharmacol. 2015;9(2):165-179.
6. Zhang H, Fan Q, Xie H, Lu L, Tao R, Wang F, Xi R, et al. Elevated serum cyclophilin B levels are associated with the prevalence and severity of metabolic syndrome. Front Endocrinol (Lausanne). 2017;8:360.
7. von Ungern-Sternberg SNI, Zernecke A, Seizer P. Extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN (CD147) in cardiovascular disease. Int J Mol Sci. 2018;19(2).
8. Satoh K. Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. Tohoku J Exp Med. 2015;235(1):1-15.
9. Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, Nogi M, et al. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017;37(4):685-693.
10. Xue C, Sowden MP, Berk BC. Extracellular and intracellular cyclophilin A, native and post-translationally modified, show diverse and specific pathological roles in diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018;38(5):986-993.
11. Cheng F, Yuan W, Cao M, Chen R, Wu X, Yan J. Cyclophilin A Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis via the AKT/Nox2 Pathway. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:2717986.
12. Rurali E, Pilato CA, Perrucci GL, Scopece A, Stadiotti I, Moschetta D, Casella M, et al. Cyclophilin A in arrhythmogenic cardiomyopathy cardiac remodeling. Int J Mol Sci. 2019;20(10).
13. Hoffmann H, Schiene-Fischer C. Functional aspects of extracellular cyclophilins. Biol Chem. 2014;395(7-8):721-735.
14. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, Tatebe S, et al. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. Circ J. 2013;77(2):447-455.
15. Liu X, Du H, Chai Q, Jia Q, Liu L, Zhao M, Li J, et al. Blocking mitochondrial cyclophilin D ameliorates TSH-impaired defensive barrier of artery. Redox Biol.

Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018;15:418-434.
16. Porter GA, Jr., Beutner G. Cyclophilin D, somehow a master regulator of mitochondrial function. Biomolecules. 2018;8(4).
17. Alfonso A, Bayon J, Gegunde S, Alonso E, Alvarino R, Santas-Alvarez M, Testa-Fernandez A, et al. High Serum Cyclophilin C levels as a risk factor marker for Coronary Artery Disease. Sci Rep. 2019;9(1):10576.
18. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: task force for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2016;37(3):267-315.
19. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 2018;39(2):119-177.
20. Task Force Members, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, et al. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. Eur Heart J. 2013;34(38):2949-3003.
21. Seizer P, Fuchs C, Ungern-Sternberg SN, Heinzmann D, Langer H, Gawaz M, May AE, et al. Platelet-bound cyclophilin A in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. Platelets. 2016;27(2):155-158.
22. Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. J Mol Cell Cardiol. 2015;78:80-89.
23. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. N Engl J Med. 2017;377(12):1119-1131.
24. Schofer N, Ludwig S, Rubsamen N, Schnabel R, Lackner KJ, Ruprecht HJ, Bickel C, et al. Prognostic impact of Interleukin-1 receptor antagonist in patients with documented coronary artery disease. Int J Cardiol. 2018;257:24-29.
25. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, Wensley F, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. PLoS Med. 2008;5(4):e78.
26. Walter J, Tanglay Y, du Fay de Lavallaz J, Strebel I, Boeddinghaus J, Twerenbold R, Doerflinger S, et al. Clinical utility of circulating interleukin-6 concentrations in the detection of functionally relevant coronary artery disease. Int J Cardiol. 2019;275:20-25.
27. Bartekova M, Radosinska J, Jelemensky M, Dhalla NS. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. Heart Fail Rev. 2018;23(5):733-758.

Articles © The authors | Journal compilation © Cardiol Res and Elmer Press Inc™ | www.cardiologyres.org

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Información de la revista: Según Journal Citations Reports. Clarivate.

Cyclophilins in Ischemic Heart Disease: Differences Between Acute and Chronic Coronary Artery Disease Patients

Jeremías Bayón[a], Amparo Alfonso[b], Sandra Gegunde[b], Eva Alonso[b, c], Rebeca Alvariño[b], Melisa Santás-Álvarez[a], Ana Testa-Fernández[a], Ramón Rios-Vázquez[a], Luis M. Botana[b] y Carlos González- Juanatey[a]

[a]Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003, Lugo, Spain.

[b]Pharmacology Department, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain

[c]Fundacion Instituto de Investigacion Sanitario Santiago de Compostela (FID- IS), Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003 Lugo, Spain

Revista: Cardiology Research. **ISSN:** 1923-2829

Fecha de la publicación: 1 de agosto de 2020

Enlace: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7430890/pdf/cr-11-319.pdf

Doi: 10.14740/cr1120

Editorial: Elmer Press Inc. 9225 Leslie ST, STE 201, Ontario, Richmond Hill L4B 3H6, Canada.

Indicios de calidad:

Factor de Impacto (2020): 0,24

Categoría (2020): Cardiac & Cardiovascular Systems (161 de 196) Cuartil: Q4

Contribución del doctorando:

Jeremias Bayón realizó la selección de sujetos del estudio, la extracción de sangre, la recolección de datos de la historia clínica y la redacción, revisión y edición del artículo.

Autorización de la revista/editorial

Copyright 2020, Bayon et al.

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

I.3.- Increase of serum cyclophilin C levels in the follow-up of coronary artery disease: A biomarker and possible clinical predictor

Resumen:

Objetivo: Este estudio tiene como objetivo investigar los cambios en los niveles séricos de Cyp C y su relación con los eventos cardiovasculares a los 12 meses de seguimiento en pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC).

Métodos: El estudio incluyó un total de 125 sujetos (40 pacientes con EAC aguda, 40 pacientes con EAC crónica y 45 voluntarios de control) y analizamos los niveles de CypC en plasma desde el inicio hasta los 6 y 12 meses para una mejor comprensión de su comportamiento en la aterosclerosis.

Resultados: Se demostró que los niveles séricos de CypC aumentaron gradualmente en pacientes con EAC (30,63 pg/mL ± 3,77 al inicio, 38,70 pg/mL ± 6,41 a los 6 meses [p = 0,25] y 47,27 pg/mL ± 5,65 a los 12 meses [p = 0,007]). Además, los niveles séricos de CypC durante el seguimiento fueron un predictor significativo de EAC (C-estadística 0,76 a los 6 meses y 0,89 a los 12 meses; p < 0,001). A pesar de ello, no hubo asociación significativa entre Cyp C y eventos cardiovasculares, pero los niveles séricos de CypC tendieron a ser más altos en pacientes que sufrieron eventos cardiovasculares durante el seguimiento (29,02 pg/mL ± vs. 79,96 pg/mL ± 22,18; p = 0,029). En este sentido, los niveles plasmáticos de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) > 2,3 mg/L más NT-proBNP > 300 pg/mL juntos fueron predictores significativos de eventos cardiovasculares durante el seguimiento en pacientes con EAC con niveles de CypC > 17,5 pg/mL (p = 0,048).

Conclusiones: En conjunto, nuestros resultados sugieren que los niveles séricos de CypC aumentan durante el seguimiento en pacientes con EAC y podría ser un nuevo biomarcador con un posible valor pronóstico en combinación con hsCRP y NT- proBNP.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Archivos de Cardiología de México

PERMANYER

Check for updates

RESEARCH ARTICLE

Increase of serum cyclophilin C levels in the follow-up of coronary artery disease: A biomarker and possible clinical predictor

Aumento de niveles séricos de Ciclofilina C en el seguimiento de la enfermedad arterial coronaria: un biomarcador y posible predictor clínico

*Jeremías Bayón[1], Amparo Alfonso[2], Melisa Santás-Álvarez[1], Eva Alonso[2,3], Ana Testa-Fernández[1], Ramón Ríos-Vázquez[1], Raymundo Ocaranza-Sánchez[1], Rosa A. Abellás-Sequeiros[1], Juliana Elices-Teja[1], Luis Botana[2], and Carlos González-Juanatey[1]**

[1]Department of Cardiology, Hospital Universitario Lucus Augusti; [2]Department of Pharmacology, School of Veterinary, Universidad de Santiago de Compostela; [3]Santiago de Compostela Health Research Institute Foundation (FIDIS), Hospital Universitario Lucus Augusti. Lugo, Spain

Abstract

Objective: *This study is aimed at investigating the changes in serum CypC levels and their relationship with cardiovascular events at 12 months of follow-up in coronary artery disease (CAD) patients.* **Methods:** *The study included a total of 125 subjects (40 patients with acute CAD, 40 patients with chronic CAD, and 45 control volunteers) and we analyzed plasma CypC levels from baseline to 6 and 12 months for a better understanding of its behavior in atherosclerosis.* **Results:** *Serum CypC levels were shown to be gradually increased in CAD patients (30.63 pg/mL ± 3.77 at baseline, 38.70 pg/mL ± 6.41 at 6 months [p = 0.25], and 47.27 pg/mL ± 5.65 at 12 months [p = 0.007]). In addition, serum CypC levels during the follow-up were a significant predictor of CAD (c-statistic 0.76 at 6 months and 0.89 at 12 months; p < 0.001). Despite it, there was no significant association between CypC and cardiovascular events, but serum CypC levels tended to be higher in patients suffering cardiovascular events during the follow-up (29.02 pg/mL ± 6.39 vs. 79.96 pg/mL ± 22.18; p = 0.029). In this regard, plasma levels of high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) > 2.3 mg/L plus NT-proBNP > 300 pg/mL together were significant predictors of cardiovascular events during the follow-up in CAD patients with CypC levels >17.5 pg/mL (p = 0.048).* **Conclusions:** *Taken together, our results suggest that serum CypC levels increase during the follow-up in CAD patients and could be a novel biomarker with a possible prognostic value in combination with hsCRP and NT-proBNP.*

Key words: *Coronary artery disease. Inflammation. Cyclophilin. Biomarkers.*

Resumen

Objetivo: *Este estudio tiene como objetivo investigar los cambios en los niveles séricos de CypC y su relación con eventos cardiovasculares a los 12 meses de seguimiento en pacientes con EAC.* **Método:** *El estudio incluyó un total de 125 sujetos (40 pacientes con EAC aguda, 40 pacientes con EAC crónica y 45 voluntarios de control) y se analizaron los niveles*

Correspondence:
*Carlos González-Juanatey
E-mail: carlos.gonzalez.juanatey@sergas.es

Date of reception: 26-10-2020
Date of acceptance: 05-07-2021
DOI: 10.24875/ACM.20000498

Available online: 30-09-2021
Arch Cardiol Mex (Eng). (ahead of print)
www.archivoscardiologia.com

1405-9940 / © 2021 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Published by Permanyer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Arch Cardiol Mex (Eng). (ahead of print)

plasmáticos de CypC desde el inicio hasta los 6 y 12 meses para comprender mejor su comportamiento en la aterosclerosis. **Resultados:** *Se demostró que los niveles séricos de CypC aumentaron gradualmente en pacientes con CAD [(30.63 pg/ml ± 3.77 al inicio del estudio, 38.70 pg/ml ± 6.41 a los 6 meses (p = 0.25) y 47.27 pg/ml ± 5.65 a los 12 meses (p = 0,007)]. Además, los niveles séricos de CypC durante el seguimiento fueron un predictor significativo de EAC (estadístico c 0.76 a los 6 meses y 0.89 a los 12 meses; p < 0.001). A pesar de ello, no hubo asociación significativa entre CypC y eventos cardiovasculares, pero los niveles séricos de CypC tendieron a ser más altos en los pacientes que sufrieron eventos cardiovasculares durante el seguimiento (29.02 pg/mL ± 6.39 vs. 79.96 pg/mL ± 22.18; p = 0.029). En este sentido, los niveles plasmáticos de hsCRP > 2.3 mg/L más NT-proBNP> 300 pg/ml juntos fueron predictores significativos de eventos cardiovasculares durante el seguimiento en pacientes con EAC con niveles de CypC > 17.5 pg/ml (p = 0.048).* **Conclusiones:** *Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que los niveles séricos de CypC aumentan durante el seguimiento en pacientes con EAC y podría ser un nuevo biomarcador con un posible valor pronóstico en combinación con hsCRP y NT-proBNP.*

Palabras clave: *Enfermedad arterial coronaria. Inflamación. Ciclofilinas. Biomarcadores.*

Introduction

Traditional cardiovascular risk factors (CVRFs) are well known for their association with the presence and prognosis of coronary artery disease (CAD)[1]. Although multiple risk scores were developed to predict CAD with CVRF, new biomarkers play an important role in cardiovascular prognosis. It was reported that plasma levels of N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP)[2] and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP)[3] are related to cardiovascular events. There is a link between these biomarkers and the inflammatory condition and atherosclerosis as the cornerstone of CAD is indeed an inflammatory disease[4].

Cyclophilins (Cyps), a subfamily of immunophilins of peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, have been implicated in various cellular processes and involved in oxidative stress[5]. Some of them, such as CypA[6], CypB[7], and CypD[8], have been associated with atherosclerotic disease. It has been published that high serum CypC levels are a possible novel biomarker for diagnosing CAD, with a good correlation using a cutoff point of 17.5 pg/mL[9].

Serum CypA levels are significantly higher in patients with CAD in proportion to the severity of disease[10]. Moreover, CypA levels 1 month after acute myocardial infraction have an impact on the prognosis[11]. These findings suggest that Cyps play a continuous role in the CAD and they could be sensitive follow-up biomarkers. Since CypCs have been rarely studied in this field, we analyzed the serum CypC levels of CAD patients from baseline to 6 and 12 months for a better understanding of its behavior during the follow-up in atherosclerosis. This study is aimed at investigating the changes in serum CypC levels and assess if the cutoff point of 17.5 pg/mL keeps the ability to discriminate CAD throughout the 12-month follow-up.

Methods

Population study

The study included a total of 125 subjects (40 patients with acute CAD, 40 patients with chronic CAD, and 45 control volunteers) that were enrolled following the same protocol reported in our previous study[9]. Acute CAD was defined as unstable angina, non-ST-segment myocardial infarction (STEMI), or STEMI according to the current European Society of Cardiology (ESC) Practical Clinical Guidelines[12,13]. Chronic CAD was defined as a clinically stable syndrome without an increase in myocardial biomarkers, as defined in the ESC guidelines[14]. The institutional and regional ethics committee approved the study (Reference: 2016/508, Approval date: December 19, 2016) according to the principles outlined in the Helsinki Declaration. Informed oral and written consent was given by all the subjects participating in this study.

Blood sampling protocol and Cyps measurements

Peripheral blood was obtained from subjects and analyzed as previously described[9]. The blood was centrifuged (3000 rpm, 10 min at 4°C) and supernatants were collected and stored at −80°C until Cyps analysis. After thawed at room temperature, these supernatants were used to measure CypC levels using an ELISA kit. Absorbance measurements were taken using a microplate reader at 450 and 540 nm. Samples were always run in duplicate. The measurement range was 23.5-1.500 pg/mL for CypC. Serum levels below the lower limit of quantitation were undetectable and were therefore considered as 0 pg/mL for statistical analysis. The

2
USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

intra- and inter-assay coefficients of variation of the ELISA kits were < 10%. No cross-reactivity was observed between Cyp antibodies. The human cyclophilin C ELISA kit (CSB-EL018473HU) was obtained from Cusabio.

Baseline measurements

The electronic medical history was reviewed to obtain all clinical data relative to patients. Clinical characteristics and laboratory values, including NT-proBNP and hsCRP, were collected.

Statistical analysis

SPSS 24 for Windows was used for the statistical analysis. Categorical variables were presented as percentages and continuous variables were presented as means ± SEM. Kolmogorov–Smirnov (with Lilliefors correction) was first performed as a normality test. Statistical significance in qualitative variables was calculated using the Chi-square test. Continuous variables with normal distribution were compared between two groups using the Student's t-test (including Levene's test); otherwise, the non-parametric Mann–Whitney U-test was used. Differences between three groups were calculated using the ANOVA test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were generated to assess the sensitivity and specificity of CypC.

Results

The study included 125 subjects (40 patients with acute CAD, 40 patients with chronic CAD, and 45 control volunteers) with a mean age 57.8 ± 14.5 years and 72.8% were male. Patients with CAD had more CVRF as compared to the controls. In the results of the laboratory tests, white blood cells, neutrophils, monocytes, hemoglobin, and glucose were significantly increased in CAD patients. Comparing acute to chronic CAD, a significant difference was seen in only CVRF (active smoker 37.5% vs. 17.5%; p = 0.045). The clinical characteristics of the sample are given in table 1. CypC levels (mean ± SD) were analyzed at baseline, at 6 months, and at 12 months (Fig. 1). The mean follow-up was 64.76 ± 22.16 months. NT-proBNP and hsCRP were measured in 74 CAD patients (37 chronic CAD and 37 acute CAD), with a mean of 463 ± 1699 pg/mL for NT-proBNP and 3.20 ± 6.46 mg/L for hsCRP, and no significant differences between the two groups.

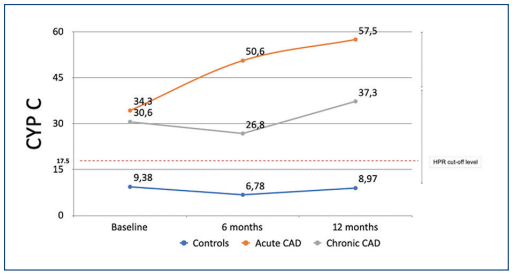


Figure 1. Serum CypC values (mean) along 6- and 12-month follow-up. CypC: cyclophilin C; CAD: coronary artery disease.

CypC levels were significantly higher in CAD patients than in the controls: 32.42 pg/mL ± 3.71 versus 9.38 pg/mL ± 1.51 (p < 0.001), but there were no differences between the acute and chronic CAD groups (34.28 pg/mL ± 5.77 vs. 30.56 pg/mL ± 4.73; p = 0.620). CypC ≥ 17.5 pg/mL was present in 72.5% of acute CAD cases, 57.5% of chronic CAD cases, albeit only in 11.1% of controls. We assessed several differences in the clinical characteristics and CVRF in CAD patients between CypC < 17.5 pg/mL and CypC ≥ 17.5 pg/mL. CypC ≥ 17.5 pg/mL was associated with an older age (64.0 ± 1.6 vs. 52.8 ± 1.8 years; p < 0.001), hypertension (48.2% vs. 27.5%; p = 0.017), dyslipidemia (69.6% vs. 36.2%; p < 0.001), and a higher number of coronary arteries with significant stenosis (91.1% vs. 42%; p < 0.001).

We collected the CypC levels from all patients, except 2 patients (1.6%) at 6 months and 7 patients (5.6%) at 12 months. A significant predictive value of serum CypC levels was found during the 6- and 12-month follow-up. The area under the curve (AUC) (c-statistic) calculated was 0.85, with a significant value (p < 0.001) of CypC as a predictor of CAD at baseline. The AUC was 0.76 at 6 months and 0.89 at 12 months, persisting as a good predictor of CAD (p < 0.001) (Fig. 2).

The analysis of CypC levels during the period evidenced that it gradually increased in the CAD group (30.63 pg/mL ± 3.77 at baseline, 38.70 pg/mL ± 6.41 at 6 months [p = 0.25], and 47.27 pg/mL ± 5.65 at 12 months [p = 0.007]). CypC did not rise in the control group over 12 months (9.4 pg/mL ± 1.5 baseline vs. 9.0 pg/mL ± 1.1; p = ns).

Seventeen of the 80 patients with CAD were admitted with acute coronary syndrome (ACS), 11 patients in the first 12 months, and 6 after that. Four patients were admitted for heart failure, three of them in the first 12 months of follow-up. Patients who experienced a cardiovascular event in the follow-up had 3 times higher CypC levels than

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 1. Demographic and clinical characteristics

Variables	Controls (n=45)	Coronary artery disease		p	
		Chronic (n=40)	Acute (n=40)	Between three groups	Chronic CAD versus acute CAD
Gender (male)	51.1% (23)	82.5% (33)	87.5% (35)	<0.001	0.531
Age	45.6±1.5	65.2±1.8	64.2±1.9	<0.001	0.713
LVEF (%)	--	54.2±10.3	55.6±8.7	--	0.528
Cardiovascular risk factors					
Hypertension	6.7% (3)	60.0% (24)	47.5% (19)	<0.001	0.262
Dyslipidemia	13.3% (6)	77.5% (31)	67.5% (27)	<0.001	0.317
Active smoker	4,5% (2)	17.5% (7)	37.5% (15)	0.001	0.045
Diabetes	2.2% (1)	35% (14)	20% (8)	<0.001	0.248
Family history of CAD	4.4% (2)	12.5% (5)	17.5% (7)	0.768	0.531
Medications					
ASA	0% (0)	77.5% (31)	15% (6)	<0.001	<0.001
Clopidogrel	0% (0)	12.5% (12)	7.5% (3)	0.04	0.712
Statins	11.1% (5)	75% (30)	42.5% (17)	<0.001	0.003
Number of coronary artery vessels with significant stenosis					
0	0 (0%)	2.5% (1) *	0% (0)	<0.001	0.219
1	0 (0%)	35% (14)	47.5% (19)		
2	0 (0%)	22.5% (9)	30% (12)		
3	0 (0%)	40.5 (16)	22.5% (9)		
Type of coronary artery revascularization					
None	100% (45)	7.5% (3)	2.5% (1)	< 0.001	0.405
PCI	0% (0)	82.5% (33)	92.5% (37)		
CABG	0% (0)	10% (4)	5% (2)		
Complete coronary artery revascularization					
Yes	0% (0)	40% (16)	70% (28)	< 0.001	0.007
Laboratory parameters					
Total cholesterol (mg/dL)	201.14 ± 26.98	149.7 ± 33.06	177.05 ± 41.55	<0.001	0.006
LDL (mg/dL)	120.77 ± 24.44	81.85 ± 26.32	108.0 ± 34.17	<0.001	0.001
HDL (mg/dL)	57.77 ± 15.28	41.15 ± 7.91	36.53 ± 7.95	<0.001	0.024
TG (mg/dL)	107.17 ± 40.16	133.78 ± 45.91	164.0 ± 69.69	<0.001	0.053
CRP (mg/dL)	0.49 ± 0.5	8.33 ± 11.64	43.45 ± 45.31	0.001	0.050
ALT (U/L)	22.06 ± 2.38	33.14 ± 19.47	33.32 ± 22.75	0.029	0.973
WBC (number/µL)	6632.35 ± 320.45	7305,25 ± 1958.07	10383.50 ± 4732.36	<0.001	<0.001
Lymphocytes (number/µL)	2139.39 ± 113.98	2030.75 ± 788.78	1982.50 ± 1167.70	0.806	0.829
Neutrophils (number/µL)	3757.58 ± 293.36	4347.5 ± 1543.06	7462.50 ± 4238.39	<0.001	<0.001
Monocytes (number/µL)	548.48 ± 23.08	641.75 ± 222.98	730.00 ± 315.58	0.010	0.153
Hemoglobin (g/dL)	13.88±1.30	14.33 ± 1.54	14.65 ± 1.54	0.068	0,326
Platelet	229147±52606	188250.0 ± 55290.72	221925.0 ± 77988.62	0.013	0.029
Glucose (mg/dL)	90.5±32.4	120.28 ± 48.55	110.8 ± 19.97	0.002	0.259

ALT: alanine aminotransferase; ASA: acetylsalicylic; BNP: brain natriuretic peptic; CABG: coronary artery bypass graft; CAD: coronary artery disease; CRP: C-reactive protein; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein; LVEF: left ventricular ejection fraction; n/p: not apply; PCI: percutaneous coronary intervention; TG: triglyceride; WBC: white blood cell.

those who did not (29.02 pg/mL ± 6.39 vs. 79.96 pg/mL ± 22.18; p =0.029). Furthermore, in CAD patients, CypC increased more in those who had a second cardiovascular event during the 12-month follow-up, although this was not significant probably due to the lack of events (CypC 23.0 pg/mL ± 6.6 baseline vs. CypC 83.5 pg/mL ± 24.1;

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Table 2. CypC cutoff of 17.5 pg/mL and cardiovascular events during follow-up

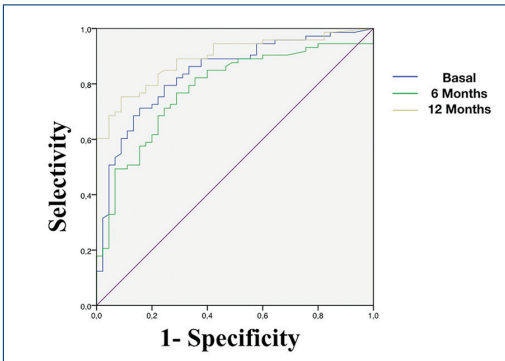
Events	Acute CAD			Chronic CAD		
	CypC ≥17.5	BNP >300	PCR >2.3	CypC ≥17.5	BNP >300	PCR >2.3
ACS						
Yes	17.9% (5)	10.0% (1)	0%	26.1% (6)	27.3% (3)	60.0% (10)
No	82.1% (23)	90.0% (9)	100% (11)	73.9% (17)	72.7% (8)	40.0% (4)
HF						
Yes	7.1% (2)	20.0% (2)	18.2% (2)	4.3% (1)	9.1% (1)	10.0% (1)
No	92.9% (26)	80.0% (8)	81.8% (9)	95.7% (22)	90.9% (11)	90.0% (9)

ACS: acute coronary syndrome; BNP: brain natriuretic peptide; CAD: coronary artery disease; CypC: cyclophilin C; CRP: C-reactive protein; HF: heart failure.

p = ns). The CypC cutoff of 17.5 pg/mL did not prove effective in predicting events in patients with CAD (Table 2). Only when considering ACS or HF together did we observe 23.2% (13 patients) in the CypC ≥ 17.5 pg/mL group versus 10.1% (7 patients) in the CypC < 17.5 pg/mL group (p = 0.047). Nevertheless, CypC persisted as a good diagnostic tool to discriminate between patients with and without CAD during the follow-up.

Considering CypC as a predictor of any cardiovascular event (ACS and/or HF) in the follow-up, we did not observe any statistical significance, but there was a tendency to difference.

Kaplan–Meier curves showed significant differences in the cardiovascular event prediction during the follow-up using a hsCRP cutoff point of 2.3 mg/L and a NT-proBNP cutoff point of 300 pg/mL. In this regard, plasma levels of hsCRP > 2.3 mg/L plus NT-proBNP > 300 pg/mL combined were significant predictors of cardiovascular events during the follow-up in CAD patients with levels of CypC > 17.5 pg/mL (p = 0.048) (Fig. 3).



Predictive Values of CypC basal, at 6 months and at 12 months.

	Sensibility	Specificity	PPV	NPV	AUC	CI 95% AUC
Basal	0,64	0,89	0,91	0,58	0,850	0,780-0,919
6 months	0,55	0,82	0,84	0,51	0,766	0,681-0,852
12 months	0,75	0,91	0,93	0,70	0,893	0,837-0,947

Figure 2. Area under the curve of CypC ≥ 17.5 pg/mL at baseline, at 6 months, and at 12 months. AUC-COR: area under the curve; 95% CI AUC: 95% confidence interval area under the curve; NPV: negative predictive value; PPV: positive predictive value.

Discussion

The major findings of our study are that serum CypC levels were a good biomarker of CAD as have been published[9] and that this correlation persisted over the 12-month follow-up. The previous studies correlated higher plasma CypA levels with CAD and it had a prognostic impact to predict mortality, readmission, and the need for coronary artery revascularization[11] CypA is secreted from vascular smooth cells in response to oxidative stress[15] and it has been reported that CypA may also be secreted from macrophages, lymphocytes, and platelets[16,17]. As it has been shown that CypA levels are increased proportionally to CAD severity[10], there is no information about serum CypC levels and their role in CAD overtime.

Serum hsCRP and uric acid levels have been correlated with complex CAD, mainly with the Syntax score[18]. Furthermore, serum hsCRP levels on admission in patients with ACS could predict the severity and complexity of coronary atherosclerosis together with multivessel CAD, left ventricular ejection fraction, and troponin levels[19]. A retrospective analysis of 2.867 consecutive patients who underwent percutaneous coronary intervention for stable CAD evaluated the association between baseline hsCRP and both all-cause and cancer deaths, concluding that elevated baseline hsCRP was significantly associated with cancer mortality in patients with stable CAD[20]. A recent

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

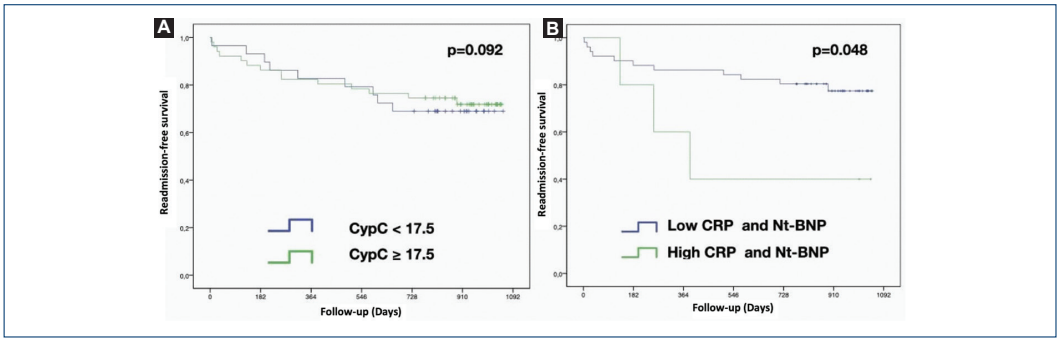


Figure 3. (A and B) Kaplan–Meier curves differences in the cardiovascular events prediction during the follow-up using a high-sensitivity C-reactive protein cutoff point of 2.3 mg/L and a NT-proBNP cutoff point of 300 pg/mL.

meta-analysis concluded that, comparing high to low serum levels of hsCRP in the general population, the relative risk was significantly higher (1.25 for cancer-related mortality, 2.03 for cardiovascular mortality, and 1.75 for all-cause mortality) in the highest level group[21].

Other meta-analyses showed that elevated circulating interleukin-6 levels were independently associated with a risk of cardiovascular and all-cause mortality in the general elderly population, considered as over 60s[22]. Several biomarkers, such as hsCRP and NT-proBNP, have been correlated with increased global mortality in the general population and they are strong predictors of cardiovascular events in patients with stable CAD[20,23,24].

However, CypC, as an endoplasmic reticulum cyclophilin, plays a major role in the inflammation and cellular oxidation status by the regulation of redox homeostasis in the endoplasmic reticulum[25]. These findings may be related to atherosclerotic disease, promoting macrophage release of pro-inflammatory cytokines in the vascular wall and endothelial dysfunction. Cyps have not been adequately studied in chronic CAD scenarios. We considered that CypC could play a key role in CAD, from the acute phase of the disease to the last phases in the follow-up of these patients.

We highlighted that serum CypC levels were high in patients with CAD and they remained high over the 12-month follow-up and could be a novel biomarker in these patients. There was no significant association with cardiovascular events, because of the small number of patients, but serum CypC levels were generally higher in patients suffering cardiovascular events during this time. In addition, the combination of different cardiovascular risk biomarkers in CAD patients could be a good option for monitoring the risk during the follow-up. In our study, the combination of high levels of CypC > 17 pg/mL, added to high levels of hsCRP > 2.3 mg/L plus NT-proBNP > 300 pg/mL, was significant predictors of cardiovascular events at 12 months in these CAD patients.

However, our study has limitations related to the small sample size, so further studies with a larger sample size are needed to support the results obtained in the current study.

Conclusions

Our data demonstrated that serum CypC levels increase during the follow-up in CAD patients. CypC could have a role as a novel biomarker in CAD patients, with a possible prognostic value in combination with other biomarkers (hsCRP and NT-proBNP). Thus, further analyses with more patients may show the possible prognostic value of CypC in CAD patients.

Acknowledgments

We appreciate the collaboration of the subjects who participated in this study and the great work of the cardiology department nurses.

Funding

This study has received funding from the following FEDER cofunded grants. From Consellería de Cultura, Educación e ordenación Universitaria Xunta de Galicia, 2017 GRC GI-1682 (ED431C 2017/01). From CDTI and Technological Funds, supported by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, AGL2014-58210-R, AGL2016-78728-R (AEI/FEDER, UE), ISCIII/

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PI16/01816, ISCIII/PI16/01830 and RTC-2016-5507-2, ITC-20161072. From European Union POCTEP 0161- Nanoeaters-1-E-1, Interreg AlertoxNet EAPA-317-2016, and H2020 778069-EMERTOX.

Conflicts of interest

The authors do not present conflicts of interest regarding the present work.

Ethical disclosures

Protection of human and animal subjects. The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this study.

Confidentiality of data. The authors declare that they have followed the protocols of their work center on the publication of patient data.

Right to privacy and informed consent. The authors declare that no patient data appear in this article.

References

1. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silvershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. Circulation. 1998;97:1837-47.
2. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Omland T. Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. N Engl J Med. 2004;350:655-63.
3. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: from concept to clinical practice to clinical benefit. Am Heart J. 2004;148:S19-26.
4. Goikuria H, Vandenbroeck K, Alloza I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. Cytokine Growth Factor Rev. 2018;39:62-70.
5. Perrucci GL, Gowran A, Zanobini M. Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res. 2015;106:353-64.
6. Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Korosawa R, et al. Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin a in patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017;37:685-93.
7. Zhang H, Fan Q, Xie H, Lu L, Tao R, Wang F, et al. Elevated serum cyclophilin B levels are associated with the prevalence and severity of metabolic syndrome. Front Endocrinol. 2017;8:360.
8. Liu X, Du H, Chai Q, Jia Q, Lu L, Zhao M, et al. Blocking mitochondrial cyclophilin D ameliorates TSH-impaired defensive barrier of artery. Redox Biol. 2018;15:418-34.
9. Alfonso A, Bayón J, Gegunde S, Alonso E, Alvariño R, Santás-Alvarez M, et al. High serum cyclophilin C levels as a risk factor marker for coronary artery disease. Sci Rep. 2019;9:10576.
10. Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, et al. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. Circ J. 2013;77:447-55.
11. Huang CH, Chang CC, Kuo CL, Huang CS, Lin CS, Liu CS. Decrease in plasma cyclophilin A concentration at 1 month after myocardial infarction predicts better left ventricular performance and synchronicity at 6 months: a pilot study in patients with ST elevation myocardial infarction. Int J Biol Sci. 2015;11:38-47.
12. Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthelemy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J. 2021;42:1289-367.
13. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: the task force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European society of cardiology (ESC). Eur Heart J. 2018;39:119-77.
14. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. The task force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European society of cardiology (ESC). Eur Heart J. 2020;41:407-77.
15. Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011;301:H287-96.
16. Seizer P, Ungern-Sternberg SN, Schönberger T, Brost O, Münzer P, Schmidt EM, et al. Extracellular cyclophilin a activates platelets via EMMPRIN (CD147) and PI3K/Akt signaling, which promotes platelet adhesion and thrombus formation *in vitro* and *in vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35:655-63.
17. Seizer P, Geisler T, Bigalke B, Schneider M, Klingel K, Kandolf R, et al. EMMPRIN and its ligand cyclophilin A as novel diagnostic markers in inflammatory cardiomyopathy. Int J Cardiol. 2013;163:299-304.
18. Xing Y, Guo JT, Gai LY, Liu B, Luo DL. Association of uric acid and C-reactive protein with the severity of coronary artery disease using SYNTAX score and clinical SYNTAX score. Heart Surg Forum. 2019;22:E247-52.
19. Karadeniz M1, Duran M, Akyel A, Yarlioglues M, Öcek AH, Celik IE, et al. High sensitive CRP level is associated with intermediate and high syntax score in patients with acute coronary syndrome. Int Heart J. 2015;56:377-80.
20. Endo H, Dohi T, Funamizu T, Shitara J, Wada H, Doi S, et al. Long-term predictive value of high-sensitivity C-reactive protein for cancer mortality in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Circ J. 2019;83:630-6.
21. Li Y, Zhong X, Cheng G, Zhao C, Zhang L, Hong Y, et al. Hs-CRP and all-cause, cardiovascular, and cancer mortality risk: a meta-analysis. Atherosclerosis. 2017;259:75-82.
22. Li H, Liu W, Xie J. Circulating interleukin-6 levels and cardiovascular and all-cause mortality in the elderly population: a meta-analysis. J Arch Gerontol Geriatr. 2017;73:257-62.
23. Oluleye OW, Folsom AR, Nambi V, Lutsey PL, Ballantine CM. Troponin T, B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and cause-specific mortality. Ann Epidemiol. 2013;23:66-73.
24. Mishra RK, Beatty AL, Jaganath R, Regan M, Wu AH, Whooley MA. B-type natriuretic peptides for the prediction of cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease: the heart and soul study. J Am Heart Assoc. 2014;3:e000907.
25. Stocki P, Chapman DC, Beach LA, Williams DB. Depletion of cyclophilins B and C leads to dysregulation of endoplasmic reticulum redox homeostasis. J Biol Chem. 2014;289:23086-96.

Información de la revista: Según Journal Citations Reports. Clarivate.

Increase of serum cyclophilin C levels in the follow-up of coronary artery disease: A biomarker and possible clinical predictor

Jeremías Bayón[1], Amparo Alfonso[2], Melisa Santás-Álvarez[1], Eva Alonso[2, 3], Ana Testa-Fernández[1], Ramón Rios-Vázquez[1], Raymundo Ocaranza-Sánchez[1], Rosa A. Abellás-Sequeiros[1], Juliana Elices-Teja[1], Luis M. Botana[2] y Carlos González- Juanatey[1]

[1]Cardiology Department, Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003, Lugo, Spain.

[2]Pharmacology Department, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002, Lugo, Spain

[3]Fundacion Instituto de Investigacion Sanitario Santiago de Compostela (FID- IS), Hospital Universitario Lucus Augusti, 27003 Lugo, Spain

Revista: Archivos de Cardiología de México. **ISSN:** 1405-9940

Fecha de la publicación: 30 de septiembre de 2021

Enlace: https://www.archivoscardiologia.com/files/acm_22_92_2_189-195.pdf

Doi: 10.24875/ACM.20000498

Editorial: Permanyer. Arquímides, 190-Colonia Polanco Miguel Hidalgo, 11560, Ciudad de México. México. INST NACIONAL CARDIOLOGIA IGNACIO CHAVEZ. Dept publicaciones, Juan Badiano no 1, Col. Seccion XVI, Delegacion Tlalpan, Mexico City, DF 00000, México

Indicios de calidad:

Factor de Impacto (2021): 0,06

Categoría (2021): Cardiac & Cardiovascular Systems (187 de 208) Cuartil: Q4

Contribución del doctorando:

Jeremias Bayón realizó la selección de sujetos del estudio, la extracción de sangre, la recolección de datos de la historia clínica y la redacción, revisión y edición del artículo.

Autorización de la revista/editorial

Correspondence:
*Carlos González-Juanatey
E-mail: carlos.gonzalez.juanatey@sergas.es

Date of reception: 26-10-2020
Date of acceptance: 05-07-2021
DOI: 10.24875/ACM.20000498

Available online: 30-09-2021
Arch Cardiol Mex. 2022;92(2):189-195
www.archivoscardiologia.com

1405-9940 / © 2021 Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez. Published by Permanyer. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

SECCIÓN II: ASOCIACIÓN DE CYPS CON FACTORES DE RIESGO ATEROSCLERÓTICO

II.1- Association of cyclophilins and cardiovascular risk factors in coronary artery disease

Resumen:

Las ciclofilinas son proteínas chaperonas que juegan un papel importante en la transducción de señales. Entre ellas, las ciclofilinas A, B, C y D se asociaron ampliamente con la inflamación y con las enfermedades cardiovasculares. Las ciclofilinas A y C se han propuesto como biomarcadores de la enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, se sabe menos sobre su relación con los factores de riesgo cardiovascular. Por lo tanto, el objetivo este estudio fue determinar la asociación entre las ciclofilinas A, B, C y D y los factores de riesgo cardiovascular de enfermedad arterial coronaria. Se midieron los niveles séricos de ciclofilinas en 167 sujetos (subdivididos según la presencia de factores de riesgo cardiovascular). Este estudio revela que la ciclofilina A y C están elevadas en pacientes independientemente de la presencia de factores de riesgo. Además, la ciclofilina B está elevada en pacientes varones con hipertensión, diabetes tipo 2 o niveles elevados de glucosa. Además, las ciclofilinas A, B y C se correlacionaron significativamente con factores de riesgo cardiovascular, pero solo la ciclofilina B se asoció con la diabetes tipo 2. El análisis multivariante refuerza el valor predictivo de ~~la presencia~~ de enfermedad coronaria de ciclofilina A (>8,2 ng/mL) y ciclofilina C (>17,5 pg/mL) junto con factores de riesgo cardiovascular como el tabaco, hipertensión, dislipidemia y niveles elevados de glucosa y colesterol. Además, el riesgo de enfermedad arterial coronaria aumenta en presencia de niveles de ciclofilina B por encima de 63,26 pg/mL y con hipertensión o dislipidemia en pacientes masculinos. En consecuencia, los niveles séricos de ciclofilinas A y C se refuerzan como biomarcadores útiles para la enfermedad de las arterias coronarias, mientras que la ciclofilina B es un biomarcador valioso en la población masculina cuando los pacientes también padecen hipertensión o dislipidemia.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

frontiers | Frontiers in Physiology

TYPE Original Research
PUBLISHED 01 March 2023
DOI 10.3389/fphys.2023.1127468

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Michaela Kozakova,
Esaote, Italy

REVIEWED BY
Pasquale Mone,
Local Health Authority Avellino, Italy
Evgeny Bezsonov,
Russian Academy of Medical Sciences, Russia

*CORRESPONDENCE
Amparo Alfonso,
amparo.alfonso@usc.es

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to Vascular Physiology, a section of the journal Frontiers in Physiology

RECEIVED 19 December 2022
ACCEPTED 16 February 2023
PUBLISHED 01 March 2023

CITATION
Gegunde S, Alfonso A, Alvariño R, Pérez-Fuentes N, Bayón-Lorenzo J, Alonso E, Ocaranza-Sánchez R, Abellás-Sequeiros RA, Santás-Álvarez M, Vieytes MR, Juanatey-González C and Botana LM (2023), Association of cyclophilins and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Front. Physiol.* 14:1127468. doi: 10.3389/fphys.2023.1127468

COPYRIGHT
© 2023 Gegunde, Alfonso, Alvariño, Pérez-Fuentes, Bayón-Lorenzo, Alonso, Ocaranza-Sánchez, Abellás-Sequeiros, Santás-Álvarez, Vieytes, Juanatey-González and Botana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Association of cyclophilins and cardiovascular risk factors in coronary artery disease

Sandra Gegunde[1,2], Amparo Alfonso[1,2]*, Rebeca Alvariño[1,2], Nadia Pérez-Fuentes[1,2], Jeremías Bayón-Lorenzo[2,3], Eva Alonso[2,4], Raymundo Ocaranza-Sánchez[2,3], Rosa Alba Abellás-Sequeiros[2,3], Melisa Santás-Álvarez[2,3], Mercedes R. Vieytes[5], Carlos Juanatey-González[2,3] and Luis M. Botana[1,2]

[1]Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain, [2]Grupo Investigación Biodiscovery, IDIS, Lugo, Spain, [3]Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, Spain, [4]Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (FIDIS), Lugo, Spain, [5]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

Cyclophilins are chaperone proteins that play important roles in signal transduction. Among them, cyclophilins A, B, C, and D were widely associated with inflammation and cardiovascular diseases. Cyclophilins A and C have been proposed as coronary artery disease biomarkers. However, less is known about their relationship with cardiovascular risk factors. Therefore, this study aimed to determine the association between cyclophilin A, B, C, and D and cardiovascular risk factors in coronary artery disease. Serum levels of cyclophilins were measured in 167 subjects (subdivided according to cardiovascular risk factors presence). This study reveals that cyclophilin A and C are elevated in patients regardless of the risk factors presence. Moreover, cyclophilin B is elevated in male patients with hypertension, type 2 diabetes, or high glucose levels. In addition, cyclophilins A, B, and C were significantly correlated with cardiovascular risk factors, but only cyclophilin B was associated with type 2 diabetes. The multivariate analysis strengthens the predictive value for coronary artery disease presence of cyclophilin A (>8.2 ng/mL) and cyclophilin C (>17.5 pg/mL) along with the cardiovascular risk factors tobacco, hypertension, dyslipidemia, and high glucose and cholesterol levels. Moreover, the risk of coronary artery disease is increased in presence of cyclophilin B levels above 63.26 pg/mL and with hypertension or dyslipidemia in male patients. Consequently, cyclophilins A and C serum levels are reinforced as useful coronary artery disease biomarkers, meanwhile, cyclophilin B is a valuable biomarker in the male population when patients are also suffering from hypertension or dyslipidemia.

KEYWORDS

cyclophilins, cardiovascular disease, inflammation, cardiovascular risk factors, type 2 diabetes, dyslipidemia

Abbreviations: CAD: coronary artery disease; CI: confidence interval; CVD: cardiovascular disease; Cyp: cyclophilin; DL: dyslipidemia; ER: endoplasmic reticulum; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; Hs-CRP: high-sensitivity C-reactive; HTA: hypertension; IR: ischemia-reperfusion; LDL: low-density lipoprotein; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; MI: myocardial infarction; mPTP: mitochondrial permeability transition pore; NPV: negative predictive value; OR: odds ratio; PC: principal component; PPIase: peptidyl-prolyl cis/trans isomerase; PPV: positive predictive value; ROC: receiver-operating-characteristic curves; T2D: type 2 diabetes; TG: triglycerides.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1 Introduction

Coronary artery disease (CAD) is one of the main causes of death in the world, despite the latest advances in prevention, diagnosis, and treatment (Zhou et al., 2016). CAD is an atherosclerotic cardiovascular disease (CVD) with an inflammatory component. In this sense, atherosclerosis is a chronic inflammatory disorder of the arteries promoted by lipids. Atherosclerotic plaques are mainly located in the intima of medium and large arteries. During the atherosclerosis plaque development, endothelial cells, lymphocytes, smooth muscle cells, and macrophages are involved, from the early formation of foam cells to the development and consolidation of plaques (Wolf and Ley, 2019). Moreover, modifications of low-density lipoprotein (LDL), such as oxidation or desialylation, enhance the intracellular accumulation of cholesterol or triglycerides and are implicated in the inflammatory process (Aguilar Diaz de Leon et al., 2021). When the atherosclerotic plaque grows up the lumen of arteries decreases, reducing the blood flow (Bezsonov et al., 2021). This pathology is a continuous process throughout human life, it normally begins at an early age, but it is not until years later that clinical symptoms begin to appear (Fulop et al., 2018). This progressive disorder is clinically manifested by stable or unstable angina, myocardial infarction (MI), or sudden myocardial death (Malakar et al., 2019). Hypertension (HTA), diabetes, cigarette smoking, hyperglycemia, and lipid abnormalities are the main modifiable risk factors for CAD (Wolf and Ley, 2019; Mone et al., 2021; Cui et al., 2022). Diabetes, especially type 2 diabetes (T2D), is the major risk factor involving CAD. Moreover, 75% of patients with T2D die due to CVD complications, including CAD (Naito and Miyauchi, 2017). Diabetes is a metabolic chronic disease with an inflammatory component in response to high blood glucose levels (McKinley, 2019). HTA is a common comorbidity in patients with diabetes. The association of T2D, hyperglycemia, and HTA increases the possibility of cardiovascular events, being together a high cardiovascular risk. Therefore, the early diagnosis of CAD and its risk factors is critical for enhancing both prevention and treatment, especially in patients with T2D or HTA (Thomopoulos et al., 2014). In this regard, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), d-dimer, fibrinogen, and brain atrial natriuretic peptide are used as predictors of CVD events (Ndrepepa et al., 2013; Gul et al., 2016). Nevertheless, these biomarkers are not specific, and they are generally elevated in inflammatory diseases (Wang et al., 2006).

In this sense, the search for new specific biomarkers has led to the study of cyclophilins (Cyps). This family of proteins, also known as immunophilins, has peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase). These proteins act as molecular chaperones and are involved in cell signaling and protein folding and trafficking. High levels of extracellular cyclophilins have been found in several inflammatory-based diseases, such as rheumatoid arthritis or sepsis. Moreover, among them, CypA, B, C, and D have been associated with atherosclerosis and CVD (Aumuller et al., 2010; Kumari et al., 2013; Perrucci et al., 2015). Both CypA and B are secreted upon inflammatory stimulus and oxidative stress by several cells (Satoh et al., 2010). Extracellularly, these proteins have a pathological role in human CVD. They act as cytokines and have chemoattractant activity for immune cells (Perrucci et al., 2015). CypA stimulates the adhesion, migration, and differentiation of monocytes participating in atherosclerosis progression (Ramachandran et al., 2016). Moreover, CypA mediates inflammation, ROS generation, and matrix degradation in CVD by binding to the membrane receptor CD147 (Sanchez et al., 2016; Chen et al., 2018). CypA has been described as a biomarker with a high diagnosis and prognosis value for CAD (Satoh et al., 2013; Ohtsuki et al., 2017). Furthermore, CypA levels are correlated with the severity of the disease (Xue et al., 2018). Extracellular CypB, in addition to producing immune cell chemotaxis, also induces their adhesion to damaged tissues, aggravating the inflammatory process. High CypB serum levels have been found in patients with rheumatoid arthritis and metabolic syndrome (Zhang et al., 2017). However, despite the relationship of this protein with inflammatory processes, no changes in CypB levels were found in patients with CAD (Alfonso et al., 2019; Bayon et al., 2020). Fewer is known about CypC. Nevertheless, our group has identified high CypC levels in the serum of both acute and chronic CAD patients (Alfonso et al., 2019; Bayon et al., 2020). Furthermore, after 12 months, CypC serum levels remain elevated in these patients (Bayon et al., 2021). In addition, CypC is upregulated in a rat model of brain ischemia (Shimizu et al., 2005). Although the extracellular functions of this protein are unknown, there is a clear correlation between CypC and CVD. Besides, high intracellular levels of CypA, B, and C in human T-cells were recently associated with CAD (Gegunde et al., 2021). CypD has a key role in chronic inflammation and CVD. This protein is the main regulator of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and the mitochondrial calcium homeostasis. However, CypD has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders, muscular dystrophy, and ischemia-reperfusion (IR) injury in the heart, brain, and kidney (Galber et al., 2020). Moreover, mitochondrial DNA mutations are implicated in several diseases, including atherosclerosis (Bezsonov et al., 2021). Nevertheless, likewise CypB, serum CypD levels remain unchanged in CAD patients (Alfonso et al., 2019; Bayon et al., 2020).

The key step in preventing major cardiovascular events is to keep the cardiovascular risk factors under control. Therefore, knowing the implications of CypA, B, C, and D in CVD, this study aimed to deeply investigate their relationship with cardiovascular risk factors in CAD patients, to better understand the disease and predict major events.

2 Methods

2.1 Population study

An observational study about serum levels of Cyps and their association with cardiovascular risk factors was conducted in patients with CAD. CAD patients were referred from the Cardiology Department of Hospital Universitario Lucus Augusti in Lugo, Spain, from January 2021 to December 2021 (Figure 1). A total of 118 patients with CAD were included in the study. CAD disease was defined as prior MI, coronary revascularization, or angiographic documentation of any significant coronary artery stenosis. Coronary angiograms were evaluated by experienced cardiologists, who were blinded to the patient data. A narrowing of the artery lumen by more than 51% of the diameter was

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3389/fphys.2023.1127468

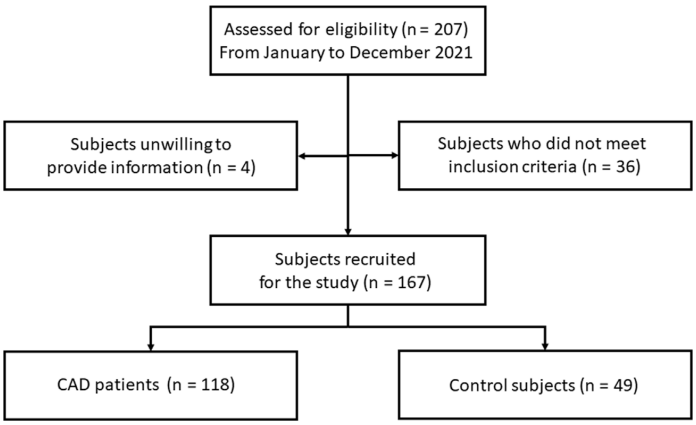


FIGURE 1
Flow chart of the study. CAD: coronary artery disease.

considered clinically significant for CAD. Critically or hemodynamically unstable patients, patients with valvular disease, or congestive heart failure were excluded. Also, 49 control volunteers were included in the study. Control volunteers were subjects without known atherosclerosis disease, with normal angiography findings, normal serum cardiac biomarkers, and without cardiovascular risk factors. Participants with chronic or acute inflammatory diseases, cancer, autoimmune diseases, and rheumatic disease were excluded. Initially, it was 65 subjects in the control group, but only 49 met the inclusion criteria. All participants belong to the public healthcare area of Lugo, Spain. The population to be studied was designed according to CAD prevalence in this area. The institutional and regional ethical board approved the study according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Voluntary written informed consent was obtained from the participants in the present study.

2.2 Baseline measurements

Information on general vital status, significant clinical data, and medical history were obtained from all participants. Also, they respond to the personal questionnaire. HTA, T2D, dyslipidemia (DL), tobacco, age, and sex (male) were assessed as cardiovascular risk factors. The lipid-lowering, antihypertensive, hypoglycemic, and antiaggregant or antiplatelet drug consumption was considered. Hypertension was considered when blood pressure was ≥ 140/90 mmHg. Diabetes was considered when fasting glucose levels were ≥ 126 mg/dL or if hypoglycemic treatment or insulin was used. DL was considered if low-density lipoprotein cholesterol (LDLc) levels were ≥ 140 mg/dL or high-density lipoprotein cholesterol (HDLc) levels were ≤ 40 mg/dL, or if an antilipidemic treatment was used. Biochemical parameters (levels of glucose, HDLc, and LDLc) were measured in the Analysis Service from Lucus Augusti Hospital using an ADVIA Clinical Chemistry System (Siemens Healthcare).

2.3 Blood sampling protocol

Peripheral blood samples were obtained from each patient as before described (Alfonso et al., 2019). Briefly, Blood samples were allowed to clot for 20 min at room temperature before being centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 4 °C. Serum supernatant fractions are collected and stored at −80°C until needed for Cyps level analysis. Samples were thawed once.

Measurement of Cyclophilin A, B, C, and D serum levels.

Levels of serum CypA (Human Cyclophilin A ELISA kit; CSB-E09920H; Cusabio), CypB (Human Cyclophilin B ELISA kit; CSB-E11218H: Cusabio), CypC (Human Cyclophilin C ELISA kit; CSB-EL018473HU; Cusabio) and CypD (Human Cyclophilin D ELISA kit; E-EL-H1936; Elabscience) were measured using ELISA regarding manufacturer's instructions and as described before (Alfonso et al., 2019). Before carrying out the ELISA experiments for the measurement of Cyp levels, serum samples were brought to room temperature, vortexed, and centrifuged. Absorbance measurements were done in a microplate reader at 450 and 540 nm for CypA, B, and C, and 450 nm in the case of CypD). The range of determination was 3.12–200 ng/mL for CypA; 31.25–2,000 pg/mL for CypB; 23.5–1,500 pg/mL for CypC and 62.5–4,000 pg/mL for CypD. Serum levels below the lower limit of determination were undetectable and were considered as 0 pg/mL for statistical analysis. The intra and inter-assay coefficients of variation of the ELISA kits were < 10%. No cross-reactivity was observed between Cyp antibodies.

2.4 Statistical analysis

Participants were divided according to cardiovascular risk presence. Summary statistics were generated and presented as percentages for categorical variables and mean ± SEM for continuous variables. Normality was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test (with Lilliefors correction). Continuous

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TABLE 1 demographic, and biochemical characteristics.

	Control subjects (n = 49)	CAD patients (n = 118)	
Sex (male) (%)	53.06	82.2	
Age (years)	56.3 ± 1.45	63.69 ± 1.15	
Laboratory parameters			***p*-value**
Total cholesterol (mg/dL)	201.14 (±4.56)	171.35 (±5.09)	<0.001
LDLc (mg/dL)	120.77 (±4.13)	103.44 (±4.30)	<0.001
HDLc (mg/dL)	57.77 (±2.58)	37.99 (±1.11)	<0.001
TG (mg/dL)	107.17 (±6.78)	154.81 (±8.39)	<0.001
Glucose (mg/gL)	90.54 (±5.48)	125.47 (±5.20)	<0.001

Data are shown as average ± SEM, or as a percentage. CAD: coronary artery disease; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; TG: triglycerides. Student's t-test or Mann-Whitney test were used to perform statistical analysis. Categorical variables were compared using X^2 test. Significant differences: $p < 0.05$.

variables with normal distribution were compared between groups using a *t*-test (including Levene´s test to assess the equality of variance). Non-parametric variables were compared using the Mann-Whitney test. Categorical variables were compared using the Pearson χ2 test. To compare the differences between the groups, ANOVA or the Kruskal-Wallis (in the case of non-parametric variables) test was used, followed by *post hoc* tests. Correlations between Cyps levels and cardiovascular risk factors were analyzed using bivariate analysis with Spearman rank correlation coefficient in the case of categorical variables (sex, age >50 years, active smoker, DL, HTA, T2D, glucose >100 mg/dL, TG > 200 mg/dL, total cholesterol >200 mg/dL, LDLc >100 mg/dL, and HDLc <50 mg/dL) and the principal component analysis was used for calculating the correlations between numeral variables (laboratory parameters of glucose, triglycerides; TG, total cholesterol, LDLc, and HDLc). After a significant crude correlation was found, multiple linear regression models with a subsequent backward stepwise were used to assess the association of CypA, CypB, CypC, and/or CypD serum levels with cardiovascular risk factors. All stepwise selection models used a $p < 0.05$ level for entry and a $p < 0.10$ for removal. The variables included in these models were based on the previous simple regression models. The association was measured by the odds ratio (OR) and their 95% confidence interval (CI). To obtain the cut-off points of CypB levels for logistic regression, receiver-operating-characteristic curves (ROC) were used. Statistical analyses were performed using SPSS software version 25.0 (IBM Corp, NY, United States). $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3 Results

A total of 167 subjects were enrolled in the present study, as Figure 1 shows. Among all, 118 were diagnosed with CAD (82% men) and 49 belonged to the control group (53% men). The demographic, clinical, and biochemical data of the participants were collected and the most relevant data for this study were summarized in table 1. Then, the CAD population was divided according to the presence of cardiovascular risk factors sex (male), tobacco, HTA, DL, and T2D. Among the patients diagnosed with CAD, 33 are active smokers, 64 have HTA, 85 have DL, and 27 are suffering from T2D. Therefore, CypA, B, C, and D levels were first measured in the population with no associated risk factors (Figure 2). In this population, CypA serum levels were significantly high in CAD patients (6.80 ± 1.6 ng/mL) compared with controls (2.42 ± 0.48 ng/mL; $p < 0.001$). In the case of serum CypB levels, no statistical differences were observed when controls (114.91 ± 29.32 pg/mL) were compared with the CAD group (107.07 ± 19.94 pg/mL). Like CypA, CypC was a threefold increase in CAD subjects compared to control subjects ($p < 0.001$). Finally, no significant changes in CypD levels of control subjects *versus* CAD patients were observed.

Therefore, the next step was to evaluate Cyps levels according to cardiovascular risk factors (sex, tobacco, DL, HTA, and T2D) presence. When the total population was divided according to sex, there were no differences in CypA or CypC levels between control women and control men (Figures 3A, C). Furthermore, there were no statistical differences between the serum levels of CypA or CypC in women and men with CAD. Nevertheless, both CypA and CypC were increased in women with CAD when compared with control women (Figures 3A, C, $p < 0.001$). Moreover, CypA and CypC levels were higher in men with CAD than in male controls (Figures 3A, C, $p < 0.001$). CypB levels increased 4-fold in control women compared to control men (Figure 3B, $p < 0.01$). However, CypB levels were higher in men with CAD compared to women with CAD or men without CAD ($p < 0.001$). Serum levels of CypD remain unchanged in all groups.

There is a discrepancy in serum CypB levels between males and females. These differences between sex could be due to female hormones. In this sense, CypB has been associated with gene expression of hormone receptors in women (Fang et al., 2009). Consequently, to avoid interferences, only the male population was used in subsequent studies for CypB. Therefore, the serum CypB levels were re-evaluated in the male population with no associated risk factors. In this population, CypB serum levels were significantly elevated in CAD patients (194.31 ± 25.52 pg/mL) compared with controls (64.24 ± 23.06 pg/mL; $p < 0.001$; data not shown).

Then, CAD patients were divided based on smoking status (no smoker, active smoker, and ex-smoker; Figure 4). Although CypA and CypC levels were increased in CAD patients compared to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

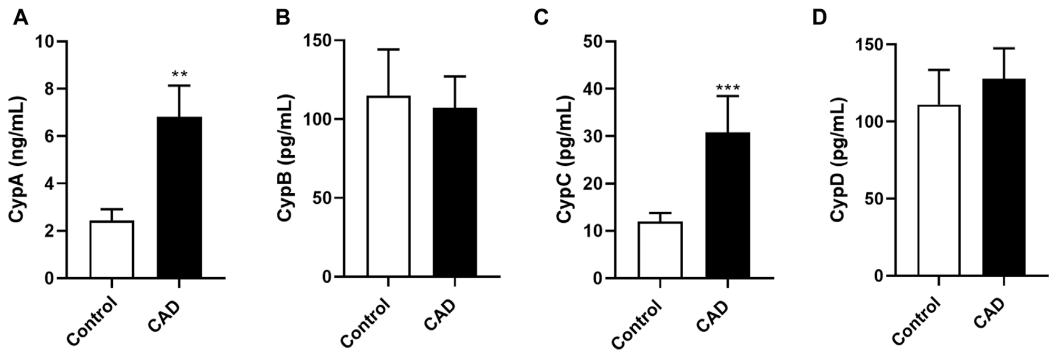


FIGURE 2
Cyclophilin A, B, C, and D serum levels in control subjects and patients with coronary artery disease with no associated risk factor. Serum levels of CypA **(A)**, CypB **(B)**, CypC **(C)** and CypD **(D)** in control subjects (n = 49) and CAD patients (n = 16) with any associated risk factor. Data are shown as mean ± SD. The values are shown as the difference between control subjects versus CAD patients, $^{**}p < 0.01$ and $^{***}p < 0.001$ using the Mann-Whitney test. CAD: coronary artery disease; CypA; cyclophilin A; CypB: cyclophilin B; CypC: cyclophilin C; CypD: cyclophilin **(D)**.

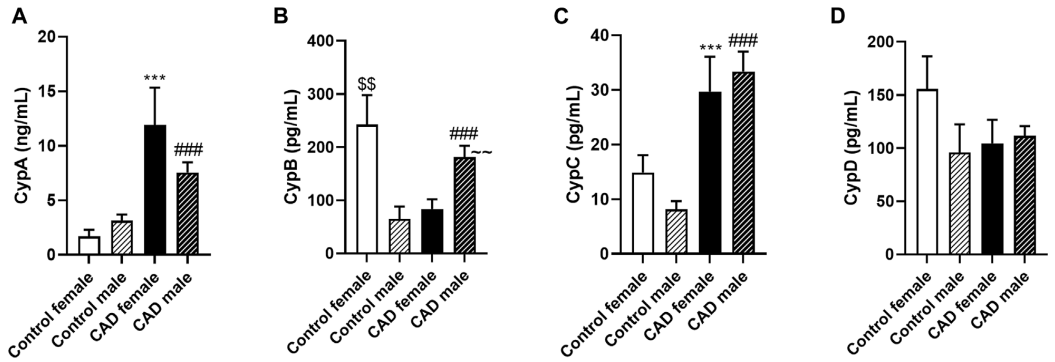


FIGURE 3
Cyclophilin A, B, C, and D serum levels in control subjects and patients with coronary artery disease subdivided according to sex. Serum levels of CypA **(A)**, CypB **(B)**, CypC **(C)** and CypD **(D)** in control female subjects (n = 23), control male (n = 26), male CAD patients (n = 97) female CAD patients (n = 21). Data are shown as mean ± SD. The values are shown as the difference between control female subjects versus female CAD patients, $^{***}p < 0.001$, or bewteen control male subjects versus male CAD patients, $^{###}p < 0.001$, or between control female versus control male, $\$\$$ $p < 0.01$, or between female CAD patients versus male CAD patients, ~~ $p < 0.01$ using the Mann-Whitney test. CAD: coronary artery disease; CypA; cyclophilin A; CypB: cyclophilin B; CypC: cyclophilin C; CypD: cyclophilin **(D)**.

controls (Figures 4A, C, $p < 0.001$), no differences were found between CAD groups according to smoking status. In the male population, CypB was significantly elevated in CAD patients compared to controls (Figure 4B, $p < 0.001$). However, no differences in CypB levels were found among CAD patients based on smoking status. Moreover, no significant variances in CypD serum levels between CAD groups or between control and CAD groups were observed (Figure 4D). Afterward, HTA was considered. In this study population, CypA and C levels were augmented in the serum of all CAD patients compared to controls, regardless of the presence of this risk factor (Figures 4E, G). Moreover, CypB levels were also augmented (in the male population) in CAD patients with or without HTA *versus* controls (Figure 4F; $p < 0.01$). Despite the CypB serum levels were increased in CAD patients with HTA than in CAD patients without HTA, this difference was not statistically significant. Nevertheless, no major differences were found regarding CypD levels in this population (Figure 4H). Next, Cyps levels were measured in CAD patients in the presence or absence of the cardiovascular risk factor T2D. Both CypA and CypC were constant in CAD patients regardless of the presence of T2D, meanwhile, these levels were statistically increased in both CAD

10.3389/fphys.2023.1127468

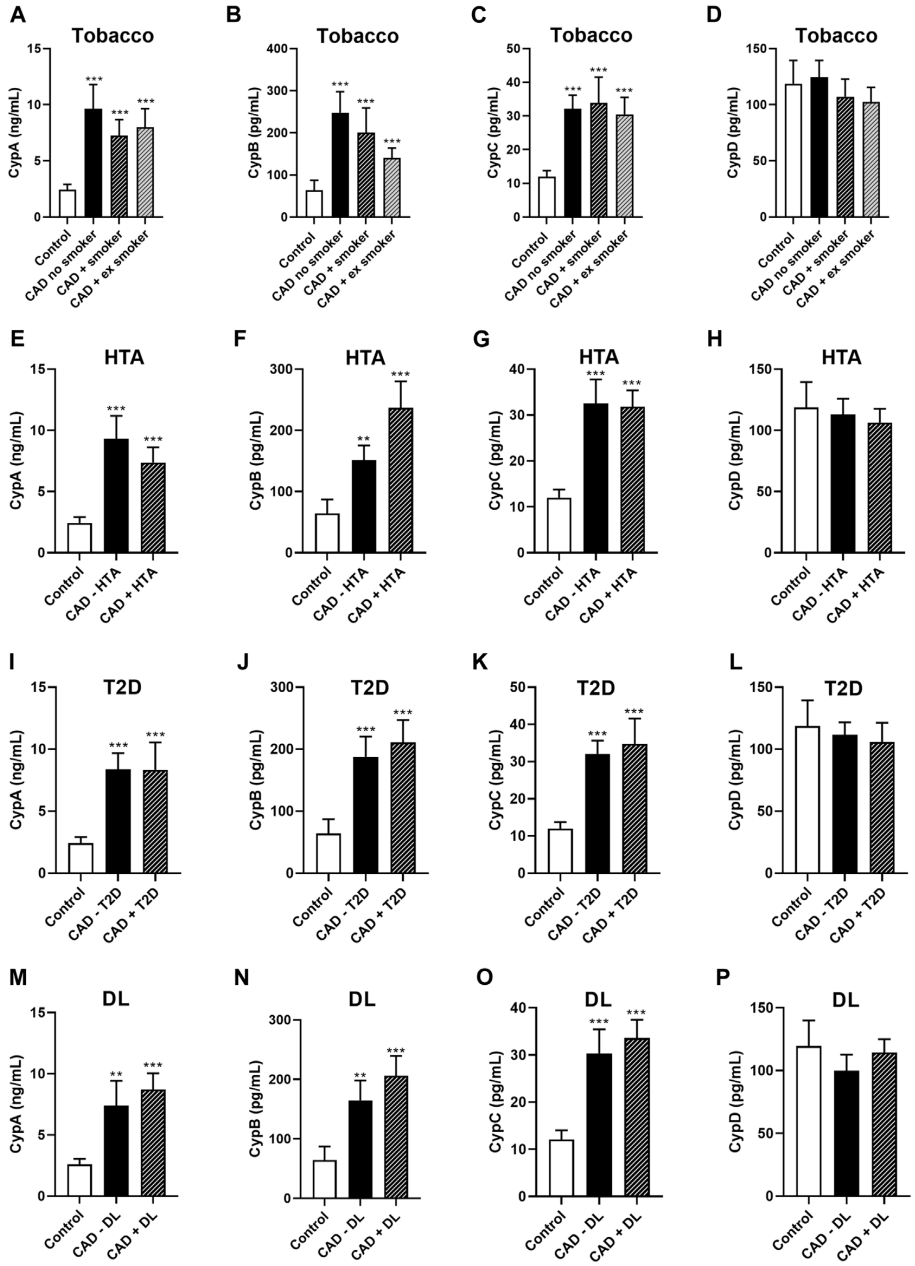


FIGURE 4
Cyclophilin A, B, C, and D serum levels in control subjects and patients with coronary artery disease subdivided according to smoking status, HTA, T2D, or DL. Serum levels of CypA **(A)**, CypB (in male population) **(B)**, CypC **(C)**, and CypD **(D)** in controls (n = 49, *n = 26), CAD patients no smokers (n = 50, *n = 33), smoker CAD patients (n = 29, *n = 27) and ex-smoker CAD patients (n = 39, n = 37). Serum levels of CypA **(E)**, CypB (in male population) **(F)**, CypC **(G)**, and CypD **(H)** in controls (n = 49, *n = 26), CAD patients without HTA (n = 54, *n = 46), and CAD patients with HTA (n = 64, *n = 51). Serum levels of CypA **(I)**, CypB (in male population) **(J)**, CypC **(K)**, and CypD **(L)** in controls (n = 49, *n = 26), CAD patients without T2D (n = 91, *n = 73), and CAD patients with T2D (n = 27, n = 24). Serum levels of CypA **(N)**, CypB (in male population) **(M)**, CypC **(O)**, and CypD **(P)** in controls (n = 49, *n = 26), CAD patients without DL (n = 85, *n = 72), and CAD patients with DL (n = 33, *n = 25). ANOVA or the Kruskal-Wallis (in the case of non-parametric variables) test was used, followed by *post hoc* tests. *Studies of CypB in the male population. CAD: coronary artery disease; CypA; cyclophilin A; CypB: cyclophilin B; CypC: cyclophilin C; CypD: cyclophilin D; DL: dyslipidemia; HTA: hypertension: T2D: type 2 diabetes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3389/fphys.2023.1127468

TABLE 2 Correlations between cyclophilins and cardiovascular risk factors.

Correlations	CypA	CypB*	CypC	CypD
CypA	1	-	0.326 ($p < 0.001$)	
CypB	-	1	-	-
CypC	0.326 ($p < 0.001$)	-	1	
CypD		-		1
Sex (male)	0.251 ($p = 0.002$)	-		
Age (> 50 years)	0.381 ($p < 0.001$)	0.304 ($p < 0.001$)	0.274 ($p < 0.001$)	
Active smoker	0.220 ($p = 0.006$)		0.172 ($p = 0.030$)	
HTA		0.304 ($p < 0.001$)	0.255 ($p = 0.001$)	
DL	0.248 ($p = 0.002$)	0.199 ($p = 0.016$)	0.257 ($p = 0.001$)	
T2D		0.203 ($p = 0.036$)		
Glucose (> 100 mg/dL)	0.216 ($p = 0.007$)	0.249 ($p = 0.009$)	0.347 ($p < 0.001$)	
Total Cholesterol (> 200)				0.178 ($p = 0.025$)
LDLc (> 100 mg/dL)				
HDLc (< 50 mg/dL)				

Spearman's correlation coefficient. DL: dyslipidemia. T2D: type 2 diabetes; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; HTA: hypertension; TG: triglycerides. Significant differences $p < 0.05$. N = 167. n = 167. *n = 123.

groups compared to control levels (Figures 4I, K; $p < 0.001$). CypB was also augmented in the male population with CAD plus T2D and CAD patients without T2D compared with the control group (Figure 4J; $p < 0.001$). Nevertheless, CypD serum levels were unaltered in all groups (Figure 4L). Finally, Cyps levels were measured according to DL status in CAD patients. CypA and CypC levels were statistically elevated in CAD patients with or without DL compared to controls (Figures 4m and 4o, $p < 0.01$). CypB was also increased in male CAD patients regardless of DL status (Figure 4n; $p < 0.01$). Meanwhile, there was no change in CypD levels in DL patients relative to non-DL patients or controls (Figure 4p). Therefore, CypA and C were elevated in general in CAD patients regardless of the presence of cardiovascular risk factors. Meanwhile, CypB was raised in female controls, while in the CAD group, it was increased in men.

Subsequently, the correlation between Cyps levels and cardiovascular risk factors was calculated. Bivariate correlation analysis was used to assess the correlation between Cyps and categorical variables (sex–male-, age >50 years, active smoker, HTA, DL, T2D, glucose levels >200 mg/dL, total cholesterol levels >200 mg/dL, LDLc levels >100 mg/dL and HDLc levels <50 mg/mL). The cut-off of biochemical parameters was chosen following the recommendations of the European guidelines for CVD prevention (Visseren et al., 2021). Bivariate correlation analysis shows, in table 2, a positive correlation between CypA and CypC, sex, age >50 years, active smoker, DL, and glucose >100 mg/dL ($p < 0.007$). CypB was associated, in the male population, with age >50 years, HTA, DL, T2D and glucose >100 mg/dL. Moreover, CypC was positively associated with CypA, age >50 years, active smoker, HTA, DL, and glucose >100 mg/dL ($p < 0.05$). Nevertheless, CypD was only correlated with total cholesterol >200 mg/dL.

Then, the principal component analysis (PCA) was carried out to identify the grouping patterns and correlations among the laboratory parameters (glucose, TG, total cholesterol, LDLc, and HDLc) and CypA, C, and D (Figure 5A). Two principal components (PC) with eigenvalues >1 explained 49.96% of the total variances. PC 1 represents the variation for total cholesterol and LDLc levels and PC2 for TG and CypC. The ordination showed pronounced differentiation between total cholesterol and LDLc with glucose, TG and CypA, and CypC. CypA and C were closer to TG. Moreover, HDLc was negatively correlated with glucose, TG, CypA, and CypC. Therefore, CypA and C are associated with glucose and TG serum levels and negatively associated with HDLc levels. Then the PCA was done in the male population to assess the correlations between CypB and the laboratory parameters (Figure 5B). Two PC represent a 60.90% variation of the dataset (eigenvalues >1). PC 1 represents the variation for Total Cholesterol and LDLc, meanwhile PC 2 for TG and HDLc. The PCA showed differentiation between TG, CypB, and glucose with total cholesterol and LDLc. Furthermore, CypB was close to TG and glucose and negatively correlated with HDLc. In this sense, CypB was associated with TG and glucose and negatively associated with HDLc.

Given these results, the next step was to study the relationship between risk factors and Cyps in the presence of CAD. For this purpose, the cut-off points of Cyps for CAD presence were used. Cut-off points for CypA >8.2 ng/mL and C > 17.5 pg/mL were obtained from ROC curves of our preliminary study and validated in the present study in CAD patients with or without cardiovascular risk factors associated (Alfonso et al., 2019). The cut-off for CypA > 8.2 ng/mL had a specificity of 95.5% and a sensitivity of 32.5% with a positive predictive value (PPV) of 86.7% and a negative predictive value (NPV) of 60.9%. The cut-off point for CypC >17.5 pg/mL provided a specificity of 88.6% and a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3389/fphys.2023.1127468

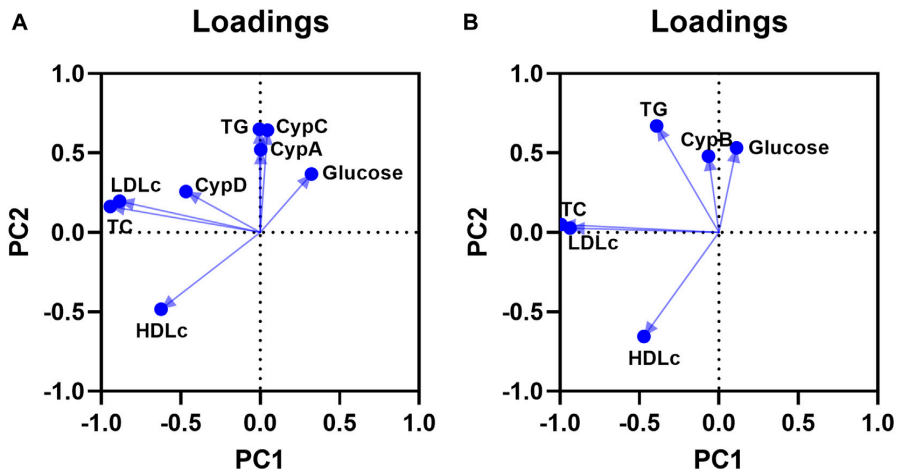


FIGURE 5
Principal component analysis (PCA) plot for CypA, C and D, and laboratory parameters **(A)**. Grouping of the variables in two principal components. PCA was performed using TG, total cholesterol, LDLc, HDLc, glucose, CypA, C, and D serum levels. The two PC are shown, and the percentage of variation accounted for PC1 is 29.87% and for PC2 is 20.09%. n = 167. PCA plot for CypB and laboratory parameters in male population **(B):** PCA was performed using TG, total cholesterol, LDLc, HDLc, glucose and CypB serum levels. The two PC are shown, and the percentage of variation accounted for PC1 is 37.65% and for PC2 is 23.25%. n = 123. CypA: cyclophilin A; CypB: cyclophilin B; CypC: cyclophilin **(C)** CypD: cyclophilin D; LDLc: low-density lipoprotein cholesterol; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; TC: total cholesterol; TG: triglycerides.

TABLE 3 Logistic regression analysis for the association of risk factors and cyclophilin A and C with CAD.

	Univariate analysis		Multivariate analysis (Zhou et al., 2016)		Multivariate analysis (Wolf and Ley, 2019)		Multivariate analysis (Aguilar Diaz de Leon et al., 2021)	
Variable	OR [95% CI]	*p*-value	OR [95% CI]	*p*-value	OR [95% CI]	*p*-value	OR [95% CI]	*p*-value
Active smoker	7.47 [3.31–16.86]	<0.001	36.03 [4.75–272.79]	0.001	39.54 [4.81–324.63]	0.001	53.22 [5.69–497.78]	<0.001
HTA	18.17 [5.35–61.72]	<0.001	5.98 [1.22–29.20]	0.027	7.08 [1.10–45.39]	0.039	7.40 [1.13–48.36]	0.037
DL	18.46 [7.18–47.44]	<0.001	20.57 [5.00–84.50]	<0.001	24.49 [4.73–126.78]	<0.001	19.35 [3.59–104.28]	0.001
Glucose (> 100 mg/dL)	35.15 [8.34-156-64]	<0.001	86.79 [11.99–627.94]	<0.001	50.45 [6.72–378.55]	<0.001	57.85 [6.81–490.90]	<0.001
Total Cholesterol (> 200)	0.30 [0.14–0.65]	0.002	0.13 [0.02–0.72]	0.020	0.08 [0.01–0.596]	0.013	0.06 [0.00–0.50]	0.010
CypA (> 8.2 ng/mL)	3.58 [1.18–10.87]	0.024	4.54 [0.496–41.70]	0.180			5.70 [0.53–60.51]	0.148
CypC (>17.5 ng/mL)	9.57 [4.07–22,49]	<0.001			16.51 [2.90–93.80]	0.002	18.02 [3.06–105.89]	0.001

Univariate and multivariate analysis. Multivariate analysis one included: Active smoker, HTA, DL, glucose >100 mg/dL, total cholesterol >200 mg/dL, and CypA >8.2 ng/mL; Cox and Snell R^2: 0.541; Nagelkerke R^2: 0.775. Multivariate analysis two included: Active smoker, HTA, DL, glucose >100 mg/dL, total cholesterol >200 mg/dL, and CypC >17.4 pg/mL; Cox and Snell R^2: 0.576; Nagelkerke R^2: 0.821. Multivariate analysis three included: Active smoker, HTA, DL, glucose >100 mg/dL, total cholesterol >200 mg/dL, CypA >8.2 ng/mL, and CypC >17.5 pg/mL; Cox and Snell R^2: 0.584; Nagelkerke R^2: 0.830. CAD: coronary artery disease; CI: confidence interval; CypA: cyclophilin A; CypC: cyclophilin C; DL: dyslipidemia; HTA: hypertension; OD: odds ratio. Significant differences $p < 0.05$. n = 167.

sensitivity of 70% with a PPV of 84.8% and NPV of 76.5% (Alfonso et al., 2019). In the case of CypB, a cut-off point >63.26 pg/mL was calculated in the present study in the male population using ROC curves (data not shown). This cut-off point has a specificity of 78.3% and a sensitivity of 66.7% with a PPV of 91.8% and NPV of 60.86%. Meanwhile, from the ROC curve analysis, the cut-off point for CypD could not be obtained, because it does not significantly predict the presence of CAD. Therefore, CypD was not used in the following analyses.

Then, the cardiovascular risk factors and Cyps were combined in a single-logistic regression model. So, using the presence or absence of CAD as a state variable, univariate analyses were performed. Then, to check if Cyps cut-off points could predict the presence of CAD, a univariate analysis was done (Table 3). CypA >8.2 ng/mL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

10.3389/fphys.2023.1127468

TABLE 4 Logistic regression analysis for the association of risk factors and cyclophilin B with CAD.

	Multivariate analysis (Zhou et al., 2016)		Multivariate analysis (Wolf and Ley, 2019)	
Variable	OR [95% CI]	*p*-value	OR [95% CI]	*p*-value
Active smoker	13.06 [2.32–73.50]	0.004	10.20 [2.12–49.05]	0.004
HTA			8.24 [1.29–52.45]	0.025
DL	8.10 [1.65–39.58]	0.010		
Glucose (> 100 mg/dL)	23.27 [2.67–202.56]	0.004	22.43 [2.43–206.74]	0.006
CypB (> 63.26 ng/mL)	9.10 [1.79–46.16]	0.008	7.29 [1.56–33.95]	0.011

Multivariate analysis one included: active smoker, DL, glucose >50 mg/dL, and CypB >63.26 pg/mL; Cox and Snell R^2: 0.454; Nagelkerke R^2: 0.701. Multivariate analysis two included: active smoker, HTA, glucose >50 mg/dL, and CypB >63.26 pg/mL. Cox and Snell R^2: 0.445; Nagelkerke R^2: 0.688. CAD: coronary artery disease; CI: confidence interval; CypB: cyclophilin B; DL: dyslipidemia; HDLc: high-density lipoprotein cholesterol; OD: odds ratio. Significant differences $p < 0.05$. n = 123.

were correlated with the presence of CAD with an OR of 3.58 (p = 0.024). Moreover, the risk of suffering from CAD was increased more than 9 times ($p < 0.001$) when the levels of CypC were >17.5 pg/mL. In the univariate analysis, the tobacco, HTA, DL, and high glucose levels were also correlated with the presence of CAD (with OR > 7; $p < 0.001$). As table 3 (analysis 1) shows when the multivariate analysis was performed with the risk factors tobacco, HTA, DL, and the biochemical parameters glucose (cut-off point >100 mg/dL) and total cholesterol (cut-off point >200 mg/dL) with CypA, this Cyp misses its correlation with the presence of CAD, meanwhile the risk factors (active smoker, HTA, DL, and glucose >100 mg/dL) were significantly associated with CAD ($p < 0.027$). Moreover, total cholesterol >200 mg/dL was negatively associated with the disease. When CypC was included, instead of CypA (table 3, analysis 2), a strong association of CypC >17.5 pg/mL with the presence of CAD (OR = 16.51; $p = 0.002$) together with the risk factors was observed. Furthermore, when CypA and CypC were combined with these risk factors the OR value for CypC was increased (Table 3, analysis three; OR = 18.02; $p < 0.001$) and was significantly associated with the presence of CAD and risk factors. The association between the active smoker, HTA, DL, and CAD when CypA and CypC are present in the multivariate analysis was in line with previous results (Alfonso et al., 2019). However, it is the first time that these Cyps were significantly correlated with serum levels of total cholesterol (>200 mg/dL) or glucose (>100 mg/dL) and CAD presence.

Finally, CypB > 63.26 pg/mL showed a significant interaction when it was combined with tobacco, DL, and glucose (<100 mg/dL) with an OR of 9.10 (table 4, analysis one; $p = 0.008$). Also, these risk factors are significantly linked to CAD ($p < 0.05$). Moreover, the risk factor CypB continues to have prognostic value along with tobacco, HTA, and glucose (<100 mg/dL) (Table 4, analysis two; OR = 7.29; $p = 0.011$) for CAD. Therefore, the risk of CAD is increased in presence of CypA levels above 8.2 ng/mL or CypC above 17.5 pg/mL along with other cardiovascular risk factors. Furthermore, in the presence of CypB levels above 63.26 pg/mL and risk factors along with HTA or DL the risk of CAD is also elevated. Consequently, CypA and C serum levels are reinforced as useful CAD biomarkers in the general population. Meanwhile, CypB is a valuable biomarker of CAD when patients are also suffering from HTA or DL in males.

4 Discussion

In the last 40 years, the number of CAD cases has been increasing. Nevertheless, despite advances in diagnosis and treatments, CAD is the leading cause of morbidity and mortality of CVD in western countries. This condition, which is associated with atherosclerosis, contributes to MI, heart failure, and sudden death. In addition to being an individual health burden, CVD is the costliest disease in Western Hemisphere (Slavin et al., 2021). Therefore, improving the means to identify patients at risk is necessary to enhance healthcare and maximize resource management. Circulating factors such as LDLc, hs-CRP, or atrial natriuretic peptide are established and used as serum biomarkers to evaluate the risk for adverse cardiac events. Nevertheless, as was previously mentioned, these circulating factors are frequently elevated in inflammation or in subjects without CVD (Wang et al., 2006). In this sense, in the present study, we evaluated the serum CypA, B, C, and D levels in CAD patients and their association with cardiovascular risk factors.

In the last years, Cyps were associated with CVD. In this sense, CypA mediates the progression of atherosclerosis by inducing the formation of foam cells and promoting adhesion, migration, and differentiation of monocytes, and activating endothelial cells (Ramachandran et al., 2016). Moreover, this protein mediates inflammation and contributes to the damage in IR and myocardial remodeling processes (Seizer et al., 2014). In the present study, high levels of CypA were found in the serum of patients with CAD. Furthermore, as was expected this protein was positively associated in CAD patients independently of the presence of cardiovascular risk factors. These data are consistent with previous studies, including data from our group (Satoh et al., 2013; Ramachandran et al., 2014; Bayon et al., 2020). In this sense, high levels of CypA provide prognostic information on the severity of CAD (Satoh et al., 2013; Alfonso et al., 2019). As with CypA, in the present study, CypC was also elevated in patients with CAD. Lately, our group has proposed CypC levels >17.5 pg/mL as a new biomarker of CAD and has described its correlation with cardiovascular risk factors (Alfonso et al., 2019; Bayon et al., 2020; Bayon et al., 2021). Nevertheless, this is the first time that the association of CypC with high glucose and total cholesterol serum levels has been described in CAD patients. Although little is known about the extracellular functions of CypC, it has been recurrently

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

related to inflammation and CVD. This protein participates in the endoplasmic reticulum (ER) homeostasis and is involved in B and T-cell differentiation and macrophage activation (Paiva et al., 2021). Furthermore, increased CypC levels were found after focal cerebral ischemia (Shimizu et al., 2005). Therefore, the present data strengthen the relationship of CypC with inflammation and CVD. Moreover, both CypA and C were associated with HTA, DL, and tobacco in CAD patients with a robust OR when other cardiovascular risk factors were also included, reinforcing the predictive value of these proteins in CAD.

CypB participates in physiological processes, such as calcium and ER homeostasis, collagen folding, and prolactin signaling (Zhao et al., 2017). Nevertheless, CypB has been related to cancer, neuroinflammation, and CVD, among others. Also, this immunophilin participates in the pathogenesis of atherosclerosis and HTA by promoting vascular smooth muscle cell growth and ROS generation (Perrucci et al., 2015). In the present study, CypB serum levels were higher in females than in male controls. This sex-difference in serum Cyps levels could be due to distinct hormone and gene expression in women (Fang et al., 2009). Sex-based differences are also noted in the atherosclerosis scenario. In this sense, estrogen has a cardioprotective effect in women, however, these protective effects disappeared after menopause (Vakhtangadze et al., 2021). Therefore, CypB cannot be used as a biomarker in women. To avoid interferences, only the male population was used in the studies of CypB. In this population, CypB was elevated in patients with CAD, associating this protein with CAD for the first time. Moreover, CypB serum levels were significantly elevated in patients with CAD and T2D or HTA, being the first time to be related to diabetes. Furthermore, multivariate logistic regression analysis demonstrates that CypB >63.26 pg/mL is a risk factor for the presence of CAD along with HTA, DL, and high glucose serum levels in males. Moreover, there is a correlation between CypB serum levels and T2D. Thus, high serum levels of CypB in patients with CAD might provide prognostic information on T2D status. Moreover, CypB was also implicated in other metabolic or hormone-mediated processes. In this regard, it has been demonstrated its relationship with the atrial natriuretic peptide, prolactin, and metabolic syndrome, among others (Rycyzyn et al., 2000; Zhang et al., 2021). Therefore, the high CypB levels could have a metabolic and/or hormone course. On the other hand, CypB has been also correlated with glucose levels above 100 mg/dL. Hyperglycaemia can contribute to microvascular dysfunction and MI, increasing the risk of rehospitalization for chest pain, regardless of diabetic status (Mone et al., 2021; Mone et al., 2023). Furthermore, the management and control of glucose levels are beneficial in reducing long-term mortality after acute myocardial infarction (Cui et al., 2022).

The immunophilin CypD also plays an important function in atherosclerosis and CAD. This protein is the main regulator of mitochondrial pore opening, which upon inflammation or oxidative stress leads to mitochondrial dysfunction (Amanakis and MurphyCyclophilin, 2020). The mitochondrial pore and thus CypD, are implicated in IR injury in the heart, brain, and kidney. Therefore, this Cyp has a key role in chronic inflammation and numerous cardiovascular diseases (Perrucci et al., 2015). However, in the present study, no differences were found in serum CypD levels of patients with CAD. These data are in line with the previous data of our group (Alfonso et al., 2019; Bayon et al., 2020). This may be indicating that the role of CypD in CAD is mainly intracellular rather than extracellular. Nonetheless, further studies should be done to better understand the extracellular role of this protein and its relevance in CVD.

Former screening and therapeutic guidelines focus on cholesterol as the primary biomarker of CVD. Normally, LDLc levels above 100 mg/dL and HDLc levels below 40 mg/dL are considered cardiovascular risk factors (Vekic et al., 2022). However, in this study, LDLc levels were lower in CAD patients than in controls, due to statin treatment. Therefore, Cyps have a better prognostic for CAD presence in this study population. Additionally, Cyps levels could be used to assess the therapeutic effects of medical treatments. In this sense, treatment to control atherosclerosis risk factors also decreased CypA levels in patients with CAD (Satoh et al., 2013).

In conclusion, the present study validates the prognostic value of CypA and CypC in CAD and reinforces their relationship with cardiovascular risk factors. Furthermore, it demonstrates for the first time that CypB levels above 63.26 pg/mL have the potential as a biomarker for CAD when male patients suffer from DL or HTA. Moreover, CypB is correlated with T2D and other cardiovascular risk factors. In this sense, Cyp levels could be used for the diagnosis of CAD disease. Moreover, CypA, B, and C could serve as potential novel therapeutic strategies for CAD.

Study limitations

Some limitations should be addressed. The study population was relatively small for T2D patients. Nevertheless, in this small population, the results were statistically significant. In this sense, this limitation did not influence the reliability of the results of the present study. Moreover, women with diabetes are more likely to have cardiovascular disease than men. In this sense, further analysis in a larger population, including more women, will clarify the importance of Cyps in CAD. In addition, there was an effect of the consumption of lipid-lowering agents on LDLc levels, since LDLc levels were lower in patients with CAD than in the control group.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by This study was reviewed and approved by the institutional and regional ethical boards according to the Declaration of Helsinki (Reference: 2016/508, Approved date: 19 December 2016). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author contributions

SG: investigation, formal analysis, interpretation of data, and drafted the work; AA: conceptualization, supervision, methodology,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

funding acquisition, project administration, and writing review. RA: methodology and investigation. NPF: methodology and investigation. JBL, ROS, RAAS, MSA: sample collection. EA: conceptualization and methodology. MRV: validation. CJG: funding acquisition, project administration, and writing review. LMB: validation, supervision, and writing review. All authors have approved the submitted version.

Funding

The research leading to these results has received funding from the following FEDER cofunded-grants. From Campus Terra (USC), BreveRiesgo (2022-PU011), CLIMIGAL (2022- PU016). From Conselleria de Cultura, Educacion e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia, GRC (ED431C 2021/01). From Ministerio de Ciencia e Innovación ISCIII/PI19/001248, ISCIII/PI19/00879, PID 2020-11262RB-C21 and Grant CPP 2021-008447 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by The European Union NextGenerationEU/PRT. From European Union Interreg Agritox EAPA-998-2018, and H2020 778069-EMERTOX. SG was supported by a postdoctoral fellowship from Campus Terra co-funded by Xunta de Galicia and Universidad de Santiago de Compostela, Spain. R.A. was supported by a postdoctoral fellowship from Xunta de Galicia (ED481B-2021-038), Spain. NP.F. was supported by a predoctoral fellowship from FIDIS, Spain.

Acknowledgments

This work could not have been done without the invaluable collaboration of the staff at the Servicio Vixilancia da Saúde from Universidad de Santiago de Compostela (Andrea Vidal Dopazo) and the nurses of Cardiology Department from Hospital Universitario Lucus Augusti (Maria Jesús Basanta-Castro, Maria del Carmen Cabarcos Leal, Clara Jimenez-Serrano, Leonor Ortega-Fernández, Maria Jesús Palacios Pool and Sofía Seco-Aldegunde).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

References

Aguilar Diaz de Leon, J. S., Glenn, H. L., Knappenberger, M., and Borges, C. R. (2021). Oxidized-desialylated low-density lipoprotein inhibits the antitumor functions of lymphokine activated killer cells. *J. Cancer* 12 (16), 4993–5004. doi:10.7150/jca.55526

Alfonso, A., Bayon, J., Gegunde, S., Alonso, E., Alvarino, R., Santas-Alvarez, M., et al. (2019). High serum cyclophilin C levels as a risk factor marker for coronary artery disease. *Sci. Rep.* 9 (1), 10576. doi:10.1038/s41598-019-46988-x

Amanakis, G., and MurphyCyclophilin, E. D. (2020). Cyclophilin D: An integrator of mitochondrial function. *Front. Physiol.* 11, 595. doi:10.3389/fphys.2020.00595

Aumuller, T., Jahreis, G., Fischer, G., and Schiene-Fischer, C. (2010). Role of prolyl cis/trans isomers in cyclophilin-assisted *Pseudomonas syringae* AvrRpt2 protease activation. *Biochemistry* 49 (5), 1042–1052. doi:10.1021/bi901813e

Bayon, J., Alfonso, A., Gegunde, S., Alonso, E., Alvarino, R., Santas-Alvarez, M., et al. (2020). Cyclophilins in ischemic heart disease: Differences between acute and chronic coronary artery disease patients. *Cardiol. Res.* 11 (5), 319–327. doi:10.14740/cr1120

Bayon, J., Alfonso, A., Santas-Alvarez, M., Alonso, E., Testa-Fernandez, A., Rios-Vazquez, R., et al. (2021). Increase of serum cyclophilin C levels in the follow-up of coronary artery disease: A biomarker and possible clinical predictor. *Arch. Cardiol. Mex.* 42. doi:10.1093/eurheartj/ehab724.3275

Bezsonov, E. E., Sobenin, I. A., and Orekhov, A. N. (2021). Immunopathology of atherosclerosis and related diseases: Focus on molecular biology. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (8), 4080. doi:10.3390/ijms22084080

Chen, B., Shen, J., Zheng, G. R., Qiu, S. Z., Yin, H. M., Mao, W., et al. (2018). Serum cyclophilin A concentrations and prognosis of acute intracerebral hemorrhage. *Clin. Chim. Acta* 486, 162–167. doi:10.1016/j.cca.2018.08.002

Cui, K., Fu, R., Yang, J., Xu, H., Yin, D., Song, W., et al. (2022). Admission blood glucose and 2-year mortality after acute myocardial infarction in patients with different glucose metabolism status: A prospective, nationwide, and multicenter registry. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 13, 898384. doi:10.3389/fendo.2022.898384

Fang, F., Flegler, A. J., Du, P., Lin, S., and Clevenger, C. V. (2009). Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. *Am. J. Pathol.* 174 (1), 297–308. doi:10.2353/ajpath.2009.080753

Fulop, T., Witkowski, J. M., Olivieri, F., and Larbi, A. (2018). The integration of inflammaging in age-related diseases. *Semin. Immunol.* 40, 17–35. doi:10.1016/j.smim.2018.09.003

Galber, C., Acosta, M. J., Minervini, G., and Giorgio, V. (2020). The role of mitochondrial ATP synthase in cancer. *Biol. Chem.* 401 (11), 1199–1214. doi:10.1515/hsz-2020-0157

Gegunde, S., Alfonso, A., Alvarino, R., Alonso, E., Gonzalez-Juanatey, C., and Botana, L. M. (2021). Crosstalk between cyclophilins and T lymphocytes in coronary artery disease. *Exp. Cell Res.* 400 (2), 112514. doi:10.1016/j.yexcr.2021.112514

Gul, C., Marwat, Z. I., Israr, M., Hanif, R., and Arshad, M. (2016). C-reactive protein level in coronary artery disease and its correlation with serum D-dimer. *J. Ayub Med. Coll. Abbottabad* 28 (4), 725–729.

Kumari, S., Roy, S., Singh, P., Singla-Pareek, S. L., and Pareek, A. (2013). Cyclophilins: Proteins in search of function. *Plant Signal Behav.* 8 (1), e22734. doi:10.4161/psb.22734

Malakar, A. K., Choudhury, D., Halder, B., Paul, P., Uddin, A., and Chakraborty, S. (2019). A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics. *J. Cell Physiol.* 234 (10), 16812–16823. doi:10.1002/jcp.28350

McKinley, M. C. (2019). Effect of vitamin D and omega-3 supplements on systemic inflammation. *Clin. Chem.* 65 (12), 1469–1470. doi:10.1373/clinchem.2019.312272

Mone, P., Gambardella, J., Minicucci, F., Lombardi, A., Mauro, C., and Santulli, G. (2021). Hyperglycemia drives stent restenosis in STEMI patients. *Diabetes Care* 44 (11), e192–e193. doi:10.2337/dc21-0939

Mone, P., Lombardi, A., Salemme, L., Cioppa, A., Popusoi, G., Varzideh, F., et al. (2023). Stress hyperglycemia drives the risk of hospitalization for chest pain in patients with ischemia and nonobstructive coronary arteries (INOCA). *Diabetes Care* 46 (2), 450–454. doi:10.2337/dc22-0783

Naito, R., and Miyauchi, K. (2017). Coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Int. Heart J.* 58 (4), 475–480. doi:10.1536/ihj.17-191

Ndrepepa, G., Braun, S., King, L., Fusaro, M., Keta, D., Cassese, S., et al. (2013). Relation of fibrinogen level with cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 111 (6), 804–810. doi:10.1016/j.amjcard.2012.11.060

Ohtsuki, T., Satoh, K., Omura, J., Kikuchi, N., Satoh, T., Kurosawa, R., et al. (2017). Prognostic impacts of plasma levels of cyclophilin A in patients with coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (4), 685–693. doi:10.1161/ATVBAHA.116.308986

Paiva, R. S., Ramos, C. V., Azenha, S. R., Alves, C., Basto, A. P., Graca, L., et al. (2021). Peptidylprolyl isomerase C (Ppic) regulates invariant Natural Killer T cell (iNKT) differentiation in mice. *Eur. J. Immunol.* 51, 1968–1979. doi:10.1002/eji.202048924

Perrucci, G. L., Gowran, A., Zanobini, M., Capogrossi, M. C., Pompilio, G., and Nigro, P. (2015). Peptidyl-prolyl isomerases: A full cast of critical actors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 106 (3), 353–364. doi:10.1093/cvr/cvv096

Ramachandran, S., Venugopal, A., Kutty, V. R., Vinitha, A., Divya, G., Chitrasree, V., et al. (2014). Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease. *Cardiovasc Diabetol.* 13, 38. doi:10.1186/1475-2840-13-38

Ramachandran, S., Vinitha, A., and Kartha, C. C. (2016). Cyclophilin A enhances macrophage differentiation and lipid uptake in high glucose conditions: A cellular mechanism for accelerated macro vascular disease in diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 15 (1), 152. doi:10.1186/s12933-016-0467-5

Rycyzyn, M. A., Reilly, S. C., O'Malley, K., and Clevenger, C. V. (2000). Role of cyclophilin B in prolactin signal transduction and nuclear retrotranslocation. *Mol. Endocrinol.* 14 (8), 1175–1186. doi:10.1210/mend.14.8.0508

Sanchez, J. A., Alfonso, A., Rodriguez, I., Alonso, E., Cifuentes, J. M., Bermudez, R., et al. (2016). Spongionella secondary metabolites, promising modulators of immune response through CD147 receptor modulation. *Front. Immunol.* 7, 452. doi:10.3389/fimmu.2016.00452

Satoh, K., Fukumoto, Y., Sugimura, K., Miura, Y., Aoki, T., Nochioka, K., et al. (2013). Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. *Circ. J.* 77 (2), 447–455. doi:10.1253/circj.cj-12-0805

Satoh, K., Nigro, P., and Berk, B. C. (2010). Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: A mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxid. Redox Signal* 12 (5), 675–682. doi:10.1089/ars.2009.2875

Seizer, P., Gawaz, M., and May, A. E. (2014). Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res.* 102 (1), 17–23. doi:10.1093/cvr/cvu035

Shimizu, T., Imai, H., Seki, K., Tomizawa, S., Nakamura, M., Honda, F., et al. (2005). Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 25 (3), 325–337. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600029

Slavin, S. D., Khera, R., Zafar, S. Y., Nasir, K., and Warraich, H. J. (2021). Financial burden, distress, and toxicity in cardiovascular disease. *Am. Heart J.* 238, 75–84. doi:10.1016/j.ahj.2021.04.011

Thomopoulos, C., Parati, G., and Zanchetti, A. (2014). Effects of blood pressure lowering on outcome incidence in hypertension: 3. Effects in patients at different levels of cardiovascular risk--overview and meta-analyses of randomized trials. *J. Hypertens.* 32 (12), 2305–2314. doi:10.1097/HJH.0000000000000380

Vakhtangadze, T., Singh Tak, R., Singh, U., Baig, M. S., and Bezsonov, E. (2021). Gender differences in atherosclerotic vascular disease: From lipids to clinical outcomes. *Front. Cardiovasc Med.* 8, 707889. doi:10.3389/fcvm.2021.707889

Vekic, J., Zeljkovic, A., Al Rasadi, K., Cesur, M., Silva-Nunes, J., Stoian, A. P., et al. (2022). Glucose metabolism disorders: Challenges and opportunities for diagnosis and treatment. *Metabolites* 12 (2), 712. doi:10.3390/metabo12080712

Visseren, F. L. J., Mach, F., Smulders, Y. M., Carballo, D., Koskinas, K. C., Back, M., et al. (2021). 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Eur. Heart J.* 42 (34), 3227–3337. doi:10.1093/eurheartj/ehab484

Wang, T. J., Gona, P., Larson, M. G., Tofler, G. H., Levy, D., Newton-Cheh, C., et al. (2006). Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N. Engl. J. Med.* 355 (25), 2631–2639. doi:10.1056/NEJMoa055373

Wolf, D., and Ley, K. (2019). Immunity and inflammation in atherosclerosis. *Circ. Res.* 124 (2), 315–327. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.313591

Xue, C., Sowden, M. P., and Berk, B. C. (2018). Extracellular and intracellular cyclophilin A, native and post-translationally modified, show diverse and specific pathological roles in diseases. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38 (5), 986–993. doi:10.1161/ATVBAHA.117.310661

Zhang, H., Fan, Q., Xie, H., Lu, L., Tao, R., Wang, F., et al. (2017). Elevated serum cyclophilin B levels are associated with the prevalence and severity of metabolic syndrome. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8, 360. doi:10.3389/fendo.2017.00360

Zhang, W., Li, S., Lou, J., Li, H., Liu, M., Dong, N., et al. (2021). Atrial natriuretic peptide promotes uterine decidualization and a TRAIL-dependent mechanism in spiral artery remodeling. *J. Clin. Invest* 51 (20), 131–136. doi:10.3760/cma.j.cn112155-20191127-00116

Zhao, K., Li, J., He, W., Song, D., Zhang, X., Zhang, D., et al. (2017). Cyclophilin B facilitates the replication of Orf virus. *Virol. J.* 14 (1), 114. doi:10.1186/s12985-017-0781-x

Zhou, M., Wang, H., Zhu, J., Chen, W., Wang, L., Liu, S., et al. (2016). Cause-specific mortality for 240 causes in China during 1990-2013: A systematic subnational analysis for the global burden of disease study 2013. *Lancet* 387 (10015), 251–272. doi:10.1016/S0140-6736(15)00551-6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Información de la revista: Según Journal Citations Reports. Clarivate.

Association of cyclophilins and cardiovascular risk factors in coronary artery disease

Sandra Gegunde[1, 2], Amparo Alfonso[1, 2], Rebeca Alvariño[1, 2], Nadia Pérez-Fuentes[1, 2], Jeremías Bayón-Lorenzo[2, 3], Eva Alonso[2, 4], Raymundo Ocaranza-Sánchez[2, 3], Rosa A. Abellás-Sequeiros[2, 3], Melisa Santás-Álvarez[2, 3], Mercedes R. Vieytes[5], Carlos González- Juanatey[2,3], Luis M. Botana[1, 2]

[1]Departamento de Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

[2]Grupo Investigación Biodiscovery, IDIS, Lugo, Spain

[3]Servicio de Cardiología, Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo, Spain

[4]Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (FIDIS), Lugo, Spain

[5]Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain

Revista: Frontiers in Physiology. **ISSN:** 1664-042X

Fecha de la publicación: 1 de marzo de 2023

Enlace: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2023.1127468/full

Doi: 10.3389/fphys.2023.1127468

Editorial: Frontiers Media SA. Avenue du Tribunal Federal 34, Lausanne CH-1015, Suiza.

Indicios de calidad:

Factor de Impacto (2021): 4,755

Factor de impacto de 5 años: 5,316

Categoría (2021): Physiology (20 de 81) Cuartil: Q1

Contribución del doctorando:

Jeremias Bayón realizó la selección de sujetos del estudio, la extracción de sangre, la recolección de datos de la historia clínica y la revisión del artículo.

Autorización de la revista/editorial

Copyright © 2023 Gegunde, Alfonso, Alvariño, Pérez-Fuentes, Bayón-Lorenzo, Alonso, Ocaranza-Sánchez, Abellás-Sequeiros, Santás-Álvarez, Vieytes, Juanatey-González and Botana. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.- DISCUSIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.- DISCUSIÓN

Las Cyps se encuentran implicadas de manera directa en la cascada inflamatoria (330) y juegan un papel importante en el plegamiento de proteínas y reparación de éstas, así como controlando el sistema inmunitario, aunque la mayoría de sus funciones permanecen desconocidas (344). Más allá de las funciones proinflamatorias e inmunomoduladoras, también se han relacionado con el envejecimiento, los procesos tumorales, las enfermedades infecciosas y otras del espectro metabólico como la DM o la insuficiencia renal (345).

En el campo de la patología cardiovascular las Cyps constituyen una interesante y novedosa posible diana terapéutica, ya que se han asociado con las ECV (312).

En la presente Tesis Doctoral, se analizaron los niveles plasmáticos de las Cyps (CypA, CypB, CypC y CypD) y de ocho mediadores inflamatorios (IFNγ , IL-1β, IL-2, IL-6, IL-8, TNFα, MMP-2 y MMP-9) en pacientes con enfermedad coronaria, así como en los sujetos control, con el objetivo de valorar la posible asociación entre ambos y con la presencia de EAC.

Las Cyps han sido relacionadas con la aterosclerosis. En el caso de la CypA, sus niveles plasmáticos se han asociado tanto a nivel diagnóstico como a nivel pronóstico con enfermedad coronaria establecida, pudiendo constituir un biomarcador en dicho contexto (326). CypA se libera en respuesta a la inflamación y se encuentra en el medio extracelular como respuesta a las ROS, todo ello regulado por la Rho-kinasa, que influye en la capacidad vasomotora coronaria y en definitiva en el proceso de aterosclerosis (346,347). Se ha demostrado que la CypA está presente en el citoplasma de las plaquetas, siendo liberada despúes de la activación plaquetaria, pudiendo unirse a través de su receptor EMMPRIM (CD147) a células endoteliales, monocitos o macrófagos produciendo un fenómeno de degranulación o sobrexpresión de MMPs (348,349). También se ha observado que en células musculares lisas vasculares, en los procesos de remodelación de actina y en la activación de las señales Rho-ROCK2 en la miosina II, se produce una importante liberación extracelular de CypA (350,351).

Así, CypA tiene un rol en varios procesos implicados en la aterosclerosis, como la permeabilidad y disfunción endotelial, la transformación en fibroblastos de las células del músculo liso vascular, además de su función moduladora en la generación de óxido nítrico (309).

La CypA, se ha estudiado como factor pronóstico en la enfermedad aterosclerótica coronaria, encontrando asociación entre los niveles plasmáticos de CypA y la necesidad de nueva

UDC UNIVERSIDADE

revascularización, hospitalización y muerte por todas las causas (323). Así, en la cardiopatía isquémica la CypA ha sido propuesto como un nuevo biomarcador (326). Además en otros procesos dentro de la enfermedad cardiovascular, como la insuficiencia cardiaca, la CypA también se ha postulado como predictor independiente de eventos cardiovasculares adversos en el seguimiento (352).

Un artículo reciente estudió la correlación de la CypA con la severidad de la EAC. En una corte de 103 sujetos (73 pacientes con EAC y 30 sujetos control) encontraron que los niveles séricos de CypA eran significativamente más altos en sujetos con EAC (38 ng/ml) frente al grupo control (27ng/ml). Además, cuando dividían a los sujetos con EAC en función de la severidad de la misma, en enfermedad de un vaso, enfermedad de dos vasos o enfermedad de tres vasos, encontraban diferencias estadísticamente significativas en los grupos de afectación de dos vasos (39 ± 1,8 ng/dl) y de tres vasos (50 ± 2,9 ng/dl) frente a los controles (27 ±1,0 ng/dl), demostrando que las concentraciones de CypA se correlacionan con la severidad de la EAC. En el caso de la afectación de un único vaso coronario, aunque los niveles de CypA fueron más elevados frente al grupo control (30,4 ±1,7 ng/dl frente 27 ±1,0 ng/dl) no se encontró significación estadística. También se observó que el AUC de CypA para el diagnóstico de EAC mostraba unos valores de 0,83, superiores incluso al AUC de la PCR de 0,78, lo que corroboraba el adecuado papel de CypA como biomarcador de EAC (353).

La Cyp A se comporta como un agonista plaquetario, encontrándose una mayor concentracción plasmática en pacientes con HTA e hipercolesterolemia y demostrándose que la CypA unida a plaquetas en el síndrome coronario agudo presentaban niveles más bajos en comparación con aquellos pacientes con enfermedad coronaria en fase estable (354). La posible explicación a este fenómeno, en apariencia contradictorio, podría deberse a que CypA podría ser internalizada por las plaquetas activadas. En esta línea, se ha demostrado que los niveles séricos de CypA pueden ser determinantes en la concentración de MMP-9 y que ambos son determinantes en la aterogénesis de la enfermedad coronaria estable, independientemente de la presencia o no de DM tipo 2 (355). Se ha publicado recientemente un estudio en el que se demuestra que la CypA expresada en la superficie plaquetaria se ha asociado con un aumento de mortalidad por todas las causas, así como su polimorfismo CypA PPIA rs6850 se ha asociado a reinfarto de miocardio, en aquellos pacientes con EAC sintomática (356).

En la presente Tesis Doctoral se objetivó que los niveles de CypA estaban significativamente aumentados en pacientes con EAC, tal como ya ha sido demostrado en trabajos previos (323).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cuando se estudió su correlación con los factores de riesgo cardiovascular clásicos (Tabaquismo, HTA, sexo masculino, dislipemia, edad > 50 años y DM tipo2) se observó que los niveles de CypA aumentaron significativamente por la presencia de dislipemia, HTA, tabaquismo, edad de 50 años o más y en sexo masculino, pero no en pacientes con DM tipo 2. En cuanto a la correlación con marcadores inflamatorios se muestra una asociación con todos los marcadores inflamatorios estudiados a excepción de la MMP-2 . En esta línea, estudios previos exploraron la asociación de PCR y CypA en pacientes con cardiopatía isquémica o en DM tipo2, encontrándose elevación plasmática de los niveles de CypA y de PCR en ambos caos (311,326).

La CypB tiene un papel fundamental en los procesos proinflamatorios y en la quimiotaxis de las células inflamatorias. En la esfera cardiovascular, se han asociado niveles altos de CypB con síndrome metabólico, así como con la activación de las células musculares lisas vasculares y su función vasomotora mediada por los radicales libres de oxígeno (313,357).

En nuestros datos se observa que los niveles de CypB aumentaron significativamente en pacientes con EAC y cuando se estudió su correlación con los factores de riesgo cardiovascular, se demostró una asociación con el sexo masculino y la HTA aunque no con el resto. En cuanto a la correlación de CypB con los mediadores inflamatorios CypB se asoció con IL-1β, IL-6 y MMP-9.

La CypC contribuye a la homeostasis redox del retículo endoplásmico explicando el rol de CypC en la oxidación celular y en la inflamación (315). Un trabajo reciente propuso que la proteína asociada a CypC (un ligando endógenos de CypC) y la desfosforilación de la calcineurina fosfatasa de NFATc1(Factor Nuclear de células T activadas 1) regulan las respuestas a endotoxinas y la activación macrofágica en la inflamación provocada por la isquemia (317).

El análisis de la CypC en la presente Tesis Doctoral, mostró que los niveles plasmáticos de CypC aumentaron significativamente en pacientes con EAC (hasta tres veces en relación al grupo control) y este aumento en la concentración de CypC se asoció con las otras Cyps así como con aumento de IL-6, implicada entre otras acciones en la desestabilización de la placa de ateroma (230). Los niveles de CypC se correlacionaron significativamente con todos los factores de riesgo cardiovascular estudiados salvo con el sexo masculino, no encontrando diferencias entre hombres y mujeres.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, se observó en nuestra población de estudio, que la CypC se correlaciona significativamente con la presencia de EAC con un punto de corte de CypC > 17,5 pg/mL. Así, con dicho umbral, podemos clasificar a los pacientes de EAC con una sensibilidad del 63,7% y una especificidad del 88,9% en pacientes con EAC en fase aguda a tiempo cero. Además, los niveles de CypC > 17,5 pg/mL se correlacionan con una EAC más extensa (enfermedad coronaria multivaso en el 56% de los casos frente al 20,2% en pacientes con niveles por debajo de 17,5 pg/mL) así como con la necesidad de procedimientos de revascularización coronaria (86,9% frente a 42%). Analizando aquellos pacientes con enfermedad coronaria fuera de contexto de Síndrome Coronario Agudo, se demostró que niveles elevados de CypC se correlacionaban también con la EAC crónica.

La CypD se ha relacionado de manera directa con la regulación y apertura del poro de la membrana mitocondrial y la apoptosis de miocardiocitos y su posible inhibición se ha estudiado en modelos celulares de lesión por isquemia-reperfusión cardiaca postinfarto de miocardio (358,359). En nuestro estudio no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de CypD entre los sujetos con EAC y el grupo control, así como tampoco con ninguno de los factores de riesgo cardiovascular estudiados.

Para evaluar la sensibilidad y especificidad de los valores de Cyps como diagnóstico de EAC se construyeron curvas ROC. La CypC mostró los valores más elevados de sensibilidad y especificidad con área bajo la curva (AUC) de 0,891; ($p < 0,001$), mostrándose por tanto como un buen predictor de EAC. En cuanto a CypA, el AUC fue de 0,748 ($p<0,001$) con moderada precisión para predecir EAC y para CypB el AUC fue de 0,655 (p 0,014) presentando unos valores muy modestos como predictor de EAC . Al analizar CypD se observa que sus valores no presentan utilidad como predictor de EAC (AUC= 0,526; p 0,687).

Un metaanálisis recientemente publicado, demostró que la CypC se asociaba de manera consistente con la EAC tanto en fase aguda como crónica. Al analizar de forma global el área ROC para la CypC como biomarcador de diagnóstico de EAC se observó que AUC=0,880 (IC del 95% 0,844-0,917; $p<0,001$), unos valores en la línea de los expuestos en la presente Tesis Doctoral (360).

Al realizar un análisis más exhaustivo de las Cyps y su relación con los factores de riesgo cardiovascular, se compararon los niveles de las Cyps según el sexo, hábito tabáquico, hiperlipemia, HTA y DM tipo2 en un estudio en el que se amplió el tamaño muestral. No se encontraron diferencias en los niveles de CypA o CypC entre las mujeres y hombres, aunque

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tanto los niveles de CypA como CypC aumentaron en pacientes con EAC en comparación con el grupo control. Los niveles de CypB aumentaron 4 veces en las mujeres del grupo control en comparación con los hombres del grupo control ($p < 0,01$), esta diferencia de sexo en los niveles séricos podría deberse a una expresión distinta de hormonas y genes en las mujeres (361). Sin embargo, los niveles de CypB fueron más altos en los hombres con EAC en comparación con las mujeres con EAC o los hombres sin EAC ($p < 0,001$). Los niveles séricos de CypD permanecieron sin cambios en todos los grupos.

Al analizar el hábito tabáquico, se dividieron los pacientes con EAC en no fumador, fumador activo y exfumador sin encontrar diferencias significativas en las Cyps. En relación a la HTA, los niveles de CypA y CypC estaban aumentados en todos los pacientes con EAC en comparación con los controles, independientemente de la presencia de este factor de riesgo. Además, los niveles plasmáticos de CypB también aumentaron en los varones, en pacientes con EAC con o sin HTA frente a los controles ($p < 0,001$), aunque sin presentar diferencias dentro del grupo de EAC con y sin HTA. Al analizar la CypD no se encontraron diferencias significativas. En el análisis de la DM tipo 2, tanto CypA como CypC se mantuvieron elevadas en pacientes con EAC independientemente de la presencia o ausencia de DM tipo 2 ($p < 0,001$). Los niveles de CypB también aumentan en varones con EAC independientemente de la presencia de DM tipo 2 ($p < 0,001$) , mientras que de nuevo los niveles séricos de CypD no mostraban diferencias en ninguno de los grupos estudiados. Finalmente, se analizaron los niveles plasmáticos de Cyps en función de la presencia de hiperlipemia demostrando niveles elevados de CypA y CypC en pacientes con EAC independientemente de la presencia o ausencia de hiperglicemia en comparación con los controles ($p < 0,01$). La CypB también aumentó en varones con EAC independientemente del estado de hiperlipemia ($p < 0.01$), mientras que no se objetivaron cambios en los niveles de CypD. Se clasificaron los factores de riesgo en variables categóricas con puntos de corte según las recomendaciones de las guías Europeas de la Sociedad de Cardiología de prevención cardiovascular (30) en sexo masculino, edad > 50 años, fumador activo, HTA, Hiperlipemia, DM tipo 2, niveles de glucosa > 100 mg/dL, niveles de colesterol total > 200 mg/dL, niveles de LDLc >100 mg/dL y niveles de HDLc < 50 mg/mL. Al realizar el análisis de correlación bivariada se observó una correlación positiva entre CypA y la CypC, y las variables sexo masculino, edad > 50 años, tabaquismo activo, Hiperlipemia y glucosa > 100 mg/dL ($p < 0,007$). La CypB se asoció, en la población masculina, con edad > 50 años, hiperlimemia, HTA, DM tipo 2 y glucosa> 100 mg/dL, siendo la primera vez que se

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

asocia CypB con DM tipo 2. La CypC se correlaciona positivamente con CypA, edad > 50 años, tabaquismo activo, dislipemia, HTA y glucosa > 100 mg/dl ($p < 0,05$). Por otro lado, CypD solo se correlacionó con colesterol total > 200 mg/dL ($p= 0,025$).

Se analizaron también los factores de riesgo cardiovascular y los niveles plasmáticos de Cyps combinándolos en un modelo de regresión logística en función de la presencia o ausencia de EAC. Utilizando el punto de corte de CypA > 8,2 ng/mL, esta se asoció con la presencia de EAC con un OR de 3,58 ($p = 0,024$). En este sentido, se observó que con niveles plasmáticos de CypC > 17,5 pg/mL, el riesgo de padecer EAC se incrementaba más de 9 veces (OR= 9,57; $p < 0,001$). El tabaquismo, la dislipemia, la HTA y los niveles elevados de glucosa también se asociaron de manera significativas con la presencia de EAC ($p < 0,001$). Además, en presencia de niveles de CypB superiores a 63,26 pg/mL y factores de riesgo cardiovascular como ser fumador, dislipemia, niveles serios de glucosa > 100 mg/dl y HTA, el riesgo de EAC también es elevado (OR=9,1; p=0,008). En resumen, los niveles séricos de CypA y CypC se mantienen como biomarcadores útiles de EAC en la población general, mientras que CypB muestra un patrón prometedor en pacientes varones con dislipemia, HTA o alteración del metabolismo de la glucosa. Además, existe una correlación entre los niveles séricos de CypB y DM tipo 2, de tal manera que en pacientes con EAC podrían proporcionar información pronóstica relevante.

La IL-1β es una citoquina fundamental para la respuesta inflamatoria y que impulsa la vía de señalización de IL-6. En nuestro estudio, los pacientes con EAC aguda tenían niveles séricos de IL-1β significativamente más altos que los controles. En el estudio CANTOS, el tratamiento con el anticuerpo anti-IL-1β canakinumab, redujo significativamente los eventos cardiovasculares recurrentes en individuos con EAC estable (239). Ha sido recientemente publicado que los niveles elevados de IL-1β se asocian con más frecuencia a pacientes con síndrome coronario agudo que a los controles (55% vs 34%; $P < 0,001$) así como a una mayor mortalidad ([HR] ajustado): 1,45; IC del 95%: 1,16 - 1,82, $P < 0,001$) (362).

La IL-6 presenta un rol importante en la inflamación y en la lesión tisular y los niveles plasmáticos elevados de IL-6 están relacionados con el riesgo de EAC (363). En nuestro trabajo, cuando analizamos a aquellos pacientes con síndrome coronario agudo, éstos mostraban niveles más altos de IL-6 respecto a los pacientes con EAC crónica (8.08 ± 1.59 pg/mL frente a 3.95 ± 0.59 pg/mL; $P = 0.019$), en probable relación al estado proinflamatorio acusado del escenario agudo. Además, otros estudios apoyan que los niveles plasmáticos de IL-6 son mayores en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pacientes con EAC funcionalmente relevante en comparación con aquellos que no la presentan (1,56 pg/mL frente a 1,30 pg/mL, P < 0,001) (364).

Otra citocina, como es la IL-8 está implicada en la cardiopatía isquémica y en los mecanismos de remodelado tras lesión isquémica miocárdica. (365). En nuestro estudio, los pacientes con EAC tenían niveles significativamente más bajos de IL-8 frente a los controles (6.86 ± 0.88 pg/mL vs. 8.17 ± 0.65 pg/mL; P = 0.037).

Las metaloproteasas son una amplia familia de endopetidasas extracelulares dependientes de Zinc, responsables de la degradación de la matriz extracelular en las placas de ateroma y de la agregación de múltiples proteínas circulantes, funcionando como una potente citocina en el proceso inflamatorio. (366). La MMP-9, también conocida como Gelatinasa B, es una colagenasa tipo IV, que constituye la forma más compleja dentro de su familia (367). La MMP-9 se ha asociado a una mayor incidencia de EAC en la población en general (368), e incluso en aquellos pacientes que ya presentaban EAC a formas más complejas y ectásicas y a una mayor mortalidad cardiovascular (279,369). La Cyp A y su ligando CD147 regulan la producción de MMP-9 durante la formación de la célula espumosa en la placa de ateroma, pudiendo constituir este complejo una diana terapéutica futura en pacientes con EAC (370).

En la presente tesis doctoral, no se observan diferencias significativas en los niveles de MMP-9 entre los sujetos con EAC y los controles (221.37 ± 20.44 vs 256.85 ± 45.81; p= 0,087) probablemente influido por el escaso tamaño muestral.

Por otro lado, la MMP-2, al igual que la MMP-9 se ha asociado a la inestabilidad de la placa de ateroma y así, se han visto que niveles séricos más elevados se encuentran en pacientes con síndrome coronario agudo respecto a aquellos estables y también se ha demostrado que la asociación con PCR es más acusada con la MMP-9 que con la MMP-2. Algunos autores postulan que dicha asociación (MMP-9 y PCR) podría constituir un prometedor biomarcador de inestabilización de placa de ateroma (371). En esta línea, se promueve que las MMP, más allá de ser un biomarcador, podrían incluso constituir una futura diana terapéutica al estar involucradas en los principales procesos de rotura de placa (372).

En los últimos años se ha dado gran relevancia a los polimorfismos y variantes genéticas de las MMP y su posible implicación en formas más agresivas de aterosclerosis, aunque un reciente metanálisis no ha encontrado asociación significativa entre dichos genotipos de MMP-2 y la presencia de EAC (373). Lo que si parece estar más claro es la implicación de la MMP-2 en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

evolución y formación de enfermedad aterosclérotica ectásica, como ha sido demostrado en experimentos con animales (374).

En la presente Tesis Doctoral, se observaron niveles más bajos de MMP-2 en la población con EAC (120.9 ng/mL ± 5.11 vs 95.43 ng/ mL ± 5.69 ; (P < 0.001). Esto puede explicarse en parte en base a la teoría que mantienen varios autores de que algunas MMP (por ejemplo MMP-2, MMP-3 y MMP-9) al promover el crecimiento de células musculares lisas vasculares estabilizarían la integridad de la capsula fibrosa y por tanto podrían ser un marcador de enfermedad coronaria estable, mientras que otras MMP (por ejemplo MMP-7, MMP-12, MMP-13 y MMP-14) al provocar la muerte de dichas células musculares lisas y provocar una mayor degradación de la matriz extracelular podrían asociarse a desestabilización de placa a un mayor nivel que el resto de las MMP (366).

El IFN-γ es una de las citocinas que también están implicadas en la génesis de la EAC, a través de su capacidad para inducir genes pro-inflamatorios (p. ej., VCAM-1, ICAM-1), moléculas de señalización celular (CD80, CD40, factor tisular...) en los monocitos, células musculares lisas y células del endotelio vascular (310).

En general, se piensa que el IFN-γ en las placas de ateroma favorece la desestabilización de las mismas por el estímulo intenso inflamatorio que produce, sobre todo en aquella patología asociada a hiperplasia de células musculares lisas, como en casos de EAC asociada al trasplante cardiaco (376). Se ha visto que tanto los niveles de IFN-γ , como sus variantes genómicas o polimorfismos se asocian a la aterosclerosis coronaria (306) y se ha estudiado su influencia sobre todo a nivel de enfermedad coronaria post-trasplante cardiaco (377) y en casos de restenosis tras implante de stents coronarios (378). Es por tanto, el IFN-γ un actor principal en la cardiopatía isquémica estable y en el equilibrio de los procesos de daño y reperfusión miocárdica. En nuestro estudio no encontramos diferencias o identificamos tendencia a niveles más bajos de IFN-γ en pacientes con EAC frente a controles (27.43 ± 2.65 vs 34.26 ± 2.89; P=0,073) , aunque sin alcanzar significación estadística

En la presente Tesis Doctoral se estudió la evolución de los marcadores inflamatorios y de las Cyps durante 6 y 12 meses (tabla 2) y se observó que los niveles altos de Cyps persistían asociados a EAC en los pacientes y concretamente, en el caso de la CypC esta correlación persistió durante los 12 meses de seguimiento. Como en análisis previos, los niveles de CypC a los 12 meses fueron más altos en el grupo de EAC que en el grupo control (32,42 pg/mL ± 3,71 versus 9,38 pg/mL ± 1,51; p < 0,001), aunque sin objetivarse diferencias dentro del grupo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de EAC estable frente a EAC aguda (30,56 pg/mL ± 4,73 vs 34,28 pg/mL ± 5,77; p = 0,620). Cuando analizamos durante el seguimiento a 12 meses a los pacientes en función de si presentan niveles de CypC ≥ 17,5 pg/ml, observamos que dichos niveles elevados estaban presentes en el 72,5% del subgrupo de EAC aguda, en el 57,5% de EAC estable y solamente en el 11% del grupo control, hecho que refuerza la hipótesis de que podría constituir un biomarcador de EAC y que perdura en el tiempo.

En esta misma línea y estableciendo el punto de corte de 17,5 pg/ml, se estudiaron los dos grupos CypC < 17,5 pg/mL y CypC ≥ 17,5 pg/mL. El grupo de CypC ≥ 17,5 pg/mL se asoció con mayor edad (64,0 ± 1,6 vs 52,8 ± 1,8 años; p < 0,001), HTA (48,2% vs 27,5%; p = 0,017), dislipidemia (69,6% vs 36,2% ; p < 0,001) y mayor número de lesiones coronarias significativas (91,1% vs 42%; p < 0,001). Cabe resaltar que la fuerte asociación a un mayor número de vasos coronarios enfermos obedece a la mayor carga de enfermedad y a la alta sensibilidad que tiene la CypC como posible biomarcador de EAC.

Los niveles de CypC se analizaron al inicio del estudio, a los 6 meses y a los 12 meses. En cuanto a las concentraciones de CypC, no hubo diferencias en el grupo control, mientras que se observó un aumento de los niveles en el grupo EAC, más acusado incluso cuando se analizaba el grupo con síndrome coronario agudo. (EAC estable 30.56 pg/mL ± 5,47 basal; 26,76 pg/mL ± 4,63 a los 6 meses; 37,32 pg/mL ± 6,01 a 12 meses vs EAC aguda 34.28 pg/mL ± 5.77 basal; 50,64 ± 8,71 a los 6 meses; 57,49 ± 7,55 a los 12 meses). Este hecho refrenda nuestra hipótesis de que la CypC podría ser un biomarcador de EAC en todo el espectro de pacientes con EAC, a diferencia de las Troponinas que fundamentalmente se emplean en el síndrome coronario agudo. Analizando el valor predictivo de la CypC ≥ 17,5 pg/mL se encontró un área bajo la Curva basalmente de 0,85, a los 6 meses de 0,76 y a los 12 meses de 0,89 (p<0,001), valores que refuerzan el papel de la CypC como posible predictor en la EAC. Así a los 12 meses se encontró una sensibilidad del 75%, una especificidad del 91%, un Valor Predictivo Positivo del 93% y un valor Predictivo Negativo del 70%, valores muy adecuados en el diagnóstico de EAC.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2.- Evolución de los valores de Ciclofilinas en el seguimiento.

	Valores (media ± SEM)			p		
	Basal	6 meses	12 meses	Basal vs 6 meses	Basal vs 12 meses	6 meses vs 12 meses
Controles (n=45)						
CypA (ng/ml)	2,52± 3,04	4,43± 2,77	4,31± 4,59	0,005	0,004	0,877
CypB (pg/ml)	140,2± 219,2	179,2± 126,4	176,8± 130,8	0,177	0,209	0,896
CypC (pg/ml)	9,38± 10,09	10,92± 11,72	8,97± 7,65	0,468	0,833	0,367
CypD (pg/ml)	125,1± 137,5	83,7± 145,2	68,5± 85,8	0,048	0,033	0,410
Enfermedad Arterial Coronaria Aguda (n=40)						
CypA (ng/ml)	7,95 ± 8,15	7,12 ± 14,08	6,53 ± 4,02	0,756	0,262	0,944
CypB (pg/ml)	210,2± 286,7	235,3± 189,7	221,2± 198,6	0,614	0,949	0,616
CypC (pg/ml)	34,2 ± 36,9	50,6 ± 75,8	57,5± 57,0	0,223	0,042	0,707
CypD (pg/ml)	97,5± 68,5	112,3± 135,1	103,0± 100,5	0,525	0,657	0,931
Enfermedad Arterial Coronaria Crónica (n=40)						
CypA (ng/ml)	5,55± 4,86	6,79± 5,34	8,75± 6,73	0,129	0,004	0,033
CypB (pg/ml)	173,9± 175,1	198,9± 199,4	230,7±191,7	0,368	0,060	0,175
CypC (pg/ml)	27,0± 20,1	26,8± 21,4	37,3± 36,1	0,949	0,062	0,123
CypD (pg/ml)	118,2± 73,7	148,0± 106,8	102,6± 82,9	0,076	0,241	0,012

Se analizaron además durante los 12 primeros meses (seguimiento medio fue de 64,76 ± 22,16 meses) los eventos cardiovasculares entre todos los pacientes y se encontraron 17 eventos isquémicos que requirieron ingreso. Aquellos pacientes que sufrieron un evento cardiovascular durante el seguimiento presentaban hasta tres veces valores más altos de CypC (29.02 pg/mL ± 6.39 vs. 79.96 pg/mL ± 22.18; p =0.029). Cuando analizamos el grupo con EAC, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se observaba una tendencia al aumento en los niveles de CypC en aquellos pacientes que sufrían un segundo evento cardiovascular (23.0 pg/mL ± 6.6 vs. 83.5 pg/mL ± 24.1; p= n.s.), en parte posiblemente debido al reducido tamaño muestral.

En resumen, las Cyps no se han estudiado adecuadamente en escenarios crónicos de la EAC y en nuestro estudio se demuestra que concretamente, la CypC podría estar involucrada de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

manera directa en la EAC, desde la fase aguda de la enfermedad hasta las últimas fases del seguimiento de estos pacientes, ya que los niveles séricos de CypC eran altos en pacientes con EAC y se mantuvieron altos durante el seguimiento a 12 meses. Además, se demuestra que la correlación CypC≥ 17,5 pg/mL con EAC, se mantiene constante a lo largo del tiempo, como muestran los valores de AUC en tiempo cero 0,85, a los seis meses 0,77 y a los 12 meses 0,89 ($p<0,01$).

En el seguimiento a 12 meses también se monitorizaron los niveles de Proteina C reactiva de alta sesibilidad (PCR-hs) y los niveles de NT-proBNP. En nuestro trabajo, el NT-proBNP y PCR-hs en 74 pacientes con EAC (37 EAC crónica y 37 EAC aguda), presentaron una media de 463 ± 1699 pg/mL para NT-proBNP y 3,20 ± 6,46 mg/L para hPCR-hs y sin diferencias significativas entre los dos grupos de EAC. Se ha demostrado que los niveles séricos de PCR-hs se correlacionan con EAC compleja (379). Aún más, los niveles séricos de PCR-hs (junto a la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y los niveles de troponina) al ingreso en pacientes con síndrome coronario agudo podrían predecir la gravedad y la complejidad de la aterosclerosis coronaria (380).

Además, estos biomarcadores (PCR-hs, NT-proBNP y Troponinas) han sido evaluados en largas cortes de pacientes, como los del estudio PLATO (Platelet Inhibition and Patient Outcomes), demostrando que no sólo son útiles en EAC aterosclerótica obstructiva, sino también en el contexto de MINOCA (Infarto de Miocardio con enfermedad coronaria no obstructiva). Así al compararlos con los pacientes con EAC, el grupo MINOCA presenta concentraciones de biomarcadores con una mayor respuesta inflamatoria inicial, un grado similar de disfunción miocárdica y menor lesión miocárdica, así como una más rápida recuperación de la misma (381).

Por otro lado, en el contexto del Síndrome Coronario Agudo con Elevación del ST, se observó que tanto la PCR-hs como las Troponinas, eran predictoras de obstrucción microvascular , mientras que el NT-proBNP se asoció en menor medida (382). Varios biomarcadores, como PCR-hs yNT-proBNP, se han correlacionado con un aumento global de la mortalidad en la población general y son predictores consistentes de eventos cardiovasculares en pacientes con EAC (383,384). Recientemente, en una cohorte de 2193 pacientes con EAC se compararon a nivel pronóstico (muerte cardiovascular e IAM) los niveles plasmáticos de Troponina I de alta sensibilidad (TnI-hs), PCR-hs y NT-proBNP, durante una mediana de tiempo de 3,8 años de seguimiento. Los tres biomarcadores se asociaron de manera significativa con el objetivo del

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estudio (HR de 1,39 [IC 95 %: 1,24-1,57, p < 0,001] para TnI-hs, 1,41 [IC 95%: 1,24-1,60, p < 0,001] para PCR-hs, y 1,64 [IC 95%: 1,39-1,92, p < 0,001] para NT-proBNP). Posteriormente tras ajustar su modelo de regresión, únicamente el NT-proBNP logró mantenerse de manera significativa como predictor (HR 1,47 [IC del 95 %: 1,19-1,82, p < 0,001]) (385). Este poder pronóstico del BNP también se observó en un estudio multicéntrico, en el que los pacientes con BNP inicial > 100 pg/mL tuvieron una mortalidad y eventos cardiovasculares más altos que aquellos con BNP ≤ 100 pg/mL, concluyendo que el BNP puede identificar de forma independiente a los pacientes con que pudieran beneficiarse de terapias cardiológicas más intensivas (386).

En otro orden de cosas, en aquellos pacientes con EAC establecida y función ventricular conservada, se demostró que la Troponina T elevada era predictor de muerte súbita cardiaca (HR 2,9; p = 0,002) así como la PCR-hs (HR 2,4; p = 0,004) y en menor medida el NT-proBNP (HR 1,9; p = 0,046) (387).

Con respecto a la Troponina, un estudio reciente ha tratado de demostrar como los niveles de Troponina I y Troponina T se asocian a mayor gravedad en la EAC y los eventos cardiovasculares futuros incluida la mortalidad. Así, en dicho estudio, se incluyeron 1829 pacientes estables sometidos a coronariografía, seguidos durante 4,4 años y se objetivó que, la HTA, el tabaquismo actual, la función renal medida mediante la tasa de filtrado glomerular, la PCR-hs, el NT-proBNP y la gravedad de la EAC valorada mediante puntuación SYNTAX, se asociaron en el modelo de regresión logística con los niveles de Troponina de alta sensibilidad. Tras ajustar por los factores de riesgo cardiovascular y demás predictores, concluyeron que la Troponina T y la Troponinan I se asociaron de forma independiente con la mortalidad por todas las causas, pero sólo la Troponina I lo hizo además con los eventos cardiovasculares adversos durante el seguimiento (388).

La relación entre la PCRhs y el NT-proBNP ha sido demostrada en estudios previos en base a que ambos están presentes en el escenario de inflamación que acontece en la EAC. Así, en un reciente estudio en más de 800 pacientes con EAC estable, se observó que el 42,7% presentaban niveles elevados de PCRhs, bajando al 32,9% en aquellos con LDL-c < 70 mg/dl. En ambos grupos (LDL-c > o < de 70 mg/dl), se obserbó que el NT-proBNP se asociaba de manera significativa a altos niveles de PCRhs (OR 2.57; p <0.0001 vs OR 3.49; p =0.007 respectivamente), siendo más potente esta asociación en el grupo de LDL colesterol < 70 mg/dl (389).

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En la presente Tesis Doctoral, la combinación de niveles altos de CypC ≥ 17,5 pg/mL, junto a valores elevados de PCR-hs > 2,3 mg/L y niveles de NT-proBNP > 300 pg/mL, fueron predictores significativos de eventos cardiovasculares, ingresos por síndrome coronario agudo o insuficiencia cardiaca, a los 12 meses en estos pacientes con EAC (p = 0.048).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6.- CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6.- CONCLUSIONES

1.- La CypA y la CypC están elevadas en el suero de pacientes con EAC aguda y se correlacionan con marcadores inflamatorios como la IL-1β y la IL-6 y con factores de riesgo de enfermedad como el tabaco, la HTA o la dislipidemia.

2.- Los niveles elevados de CypC, con punto de corte ≥ 17,5 pg/mL, discriminan de manera significativa aquellos pacientes con EAC respecto al grupo control, por lo tanto la CypC podría considerarse un biomarcador de EAC.

3.- Los niveles de CypC en suero persisten elevados durante 12 meses de seguimiento en pacientes con EAC y podrían asociarse con eventos cardiovasculares durante dicho seguimiento.

4.- La capacidad diagnóstica de EAC de la CypC persiste durante el seguimiento a 12 meses con área bajo la curva AUC de 0,85 basal, 0,77 a los 6 meses y 0,89 a los 12 meses de seguimiento.

5.- Un valor de CypC ≥ 17,5 pg/mL junto con niveles de PCR-hs > 2,3 mg/L y de NT-proBNP> 300 pg/mL son buenos biomarcadores pronóstico de eventos cardiovasculares a 12 meses en pacientes con EAC.

6.- Un valor de CypB ≥ 63,26 pg/mL es un adecuado biomarcador de EAC en pacientes varones con dislipemia, HTA o alteración del metabolismo de la glucosa, especialmente DM tipo 2, donde podrían proporcionar información pronóstica relevante.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7.- BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7.- BIBLIOGRAFÍA

1.Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. J Am Coll Cardiol. 22 de diciembre de 2020;76(25):2982-3021.

2.Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. Eur Heart J. 14 de enero de 2020;41(3):407-77.

3.Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL, et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. Circulation. 8 de abril de 2014;129(14):1483-92.

4.Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. J Am Coll Cardiol. 4 de julio de 2017;70(1):1-25.

5.Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, et al. Acute Myocardial Infarction: Changes in Patient Characteristics, Management, and 6-Month Outcomes Over a Period of 20 Years in the FAST-MI Program (French Registry of Acute ST-Elevation or Non-ST-Elevation Myocardial Infarction) 1995 to 2015. Circulation. 14 de noviembre de 2017;136(20):1908-19.

6.Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. Circulation. 5 de marzo de 2019;139(10):e56-528.

7.Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M, Knot J, Aaberge L, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. Eur Heart J. abril de 2010;31(8):943-57.

8.Steg PG, Greenlaw N, Tendera M, Tardif JC, Ferrari R, Al-Zaibag M, et al. Prevalence of anginal symptoms and myocardial ischemia and their effect on clinical outcomes in outpatients with stable coronary artery disease: data from the International Observational CLARIFY Registry. JAMA Intern Med. octubre de 2014;174(10):1651-9.

9.Sorbets E, Fox KM, Elbez Y, Danchin N, Dorian P, Ferrari R, et al. Long-term outcomes of chronic coronary syndrome worldwide: insights from the international CLARIFY registry. Eur Heart J. 14 de enero de 2020;41(3):347-56.

10.Virtanen M, Vahtera J, Singh-Manoux A, Elovainio M, Ferrie JE, Kivimäki M. Unfavorable and favorable changes in modifiable risk factors and incidence of coronary heart disease: The Whitehall II cohort study. Int J Cardiol. 15 de octubre de 2018;269:7-12.

11.Jernberg T, Johanson P, Held C, Svennblad B, Lindbäck J, Wallentin L, et al. Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction. JAMA. 27 de abril de 2011;305(16):1677-84.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

12.Hashim MJ. Principles of family medicine and general practice - defining the five core values of the specialty. J Prim Health Care. diciembre de 2016;8(4):283-7.

13.Barquera S, Pedroza-Tobías A, Medina C, Hernández-Barrera L, Bibbins-Domingo K, Lozano R, et al. Global Overview of the Epidemiology of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. Arch Med Res. julio de 2015;46(5):328-38.

14.Nichols M, Townsend N, Scarborough P, Rayner M. Trends in age-specific coronary heart disease mortality in the European Union over three decades: 1980-2009. Eur Heart J. octubre de 2013;34(39):3017-27.

15.Bambra C, Eikemo TA. Welfare state regimes, unemployment and health: a comparative study of the relationship between unemployment and self-reported health in 23 European countries. J Epidemiol Community Health. febrero de 2009;63(2):92-8.

16.Alvarez-Galvez J, Rodero-Cosano ML, Motrico E, Salinas-Perez JA, Garcia-Alonso C, Salvador-Carulla L. The impact of socio-economic status on self-rated health: study of 29 countries using European social surveys (2002-2008). Int J Environ Res Public Health. 25 de febrero de 2013;10(3):747-61.

17.O'Donovan MR, Gapp C, Stein C. Burden of disease studies in the WHO European Region-a mapping exercise. Eur J Public Health. 1 de agosto de 2018;28(4):773-8.

18.Gheorghe A, Griffiths U, Murphy A, Legido-Quigley H, Lamptey P, Perel P. The economic burden of cardiovascular disease and hypertension in low- and middle-income countries: a systematic review. BMC Public Health. 6 de agosto de 2018;18(1):975.

19.Stewart S, Murphy NF, Murphy N, Walker A, McGuire A, McMurray JJV. The current cost of angina pectoris to the National Health Service in the UK. Heart Br Card Soc. agosto de 2003;89(8):848-53.

20.Rinkūnienė E, Petrulionienė Ž, Dženkevičiūtė V, Gimžauskaitė S, Mainelis A, Puronaitė R, et al. Trends in Cigarette Smoking among Middle-Aged Lithuanian Subjects Participating in the Primary Prevention Program between 2009 and 2016. Med Kaunas Lith. 12 de mayo de 2019;55(5):E130.

21.Ackermann G, Kirschner M, Guggenbühl L, Abel B, Klohn A, Mattig T. Measuring success in obesity prevention: a synthesis of Health Promotion Switzerland's long-term monitoring and evaluation strategy. Obes Facts. 2015;8(1):17-29.

22.Nowbar AN, Gitto M, Howard JP, Francis DP, Al-Lamee R. Mortality From Ischemic Heart Disease. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. junio de 2019;12(6):e005375.

23.Nupponen M, Pahkala K, Juonala M, Magnussen CG, Niinikoski H, Rönnemaa T, et al. Metabolic syndrome from adolescence to early adulthood: effect of infancy-onset dietary counseling of low saturated fat: the Special Turku Coronary Risk Factor Intervention Project (STRIP). Circulation. 17 de febrero de 2015;131(7):605-13.

24.Aminde LN, Cobiac LJ, Veerman JL. Potential impact of a modest reduction in salt intake on blood pressure, cardiovascular disease burden and premature mortality: a modelling study. Open Heart. 2019;6(1):e000943.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

25.Jørgensen T, Jacobsen RK, Toft U, Aadahl M, Glümer C, Pisinger C. Effect of screening and lifestyle counselling on incidence of ischaemic heart disease in general population: Inter99 randomised trial. BMJ. 9 de junio de 2014;348:g3617.

26.Si S, Moss JR, Sullivan TR, Newton SS, Stocks NP. Effectiveness of general practice-based health checks: a systematic review and meta-analysis. Br J Gen Pract J R Coll Gen Pract. enero de 2014;64(618):e47-53.

27.Løkkegaard T, Andersen JS, Jacobsen RK, Badsberg JH, Jørgensen T, Pisinger C. Psychological consequences of screening for cardiovascular risk factors in an un-selected general population: results from the Inter99 randomised intervention study. Scand J Public Health. febrero de 2015;43(1):102-10.

28.Chamnan P, Simmons RK, Khaw KT, Wareham NJ, Griffin SJ. Estimating the population impact of screening strategies for identifying and treating people at high risk of cardiovascular disease: modelling study. BMJ. 23 de abril de 2010;340:c1693.

29.Goldstein JL, Brown MS. A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. Cell. 26 de marzo de 2015;161(1):161-72.

30.Visseren FLJ, Mach F, Smulders YM, Carballo D, Koskinas KC, Bäck M, et al. 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. Eur Heart J. 7 de septiembre de 2021;42(34):3227-337.

31.Aktas MK, Ozduran V, Pothier CE, Lang R, Lauer MS. Global risk scores and exercise testing for predicting all-cause mortality in a preventive medicine program. JAMA. 22 de septiembre de 2004;292(12):1462-8.

32.Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. BMJ. 26 de junio de 2004;328(7455):1519.

33.Prescott E, Hippe M, Schnohr P, Hein HO, Vestbo J. Smoking and risk of myocardial infarction in women and men: longitudinal population study. BMJ. 4 de abril de 1998;316(7137):1043-7.

34.Huxley RR, Woodward M. Cigarette smoking as a risk factor for coronary heart disease in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. Lancet Lond Engl. 8 de octubre de 2011;378(9799):1297-305.

35.GBD 2017 Risk Factor Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet Lond Engl. 10 de noviembre de 2018;392(10159):1923-94.

36.Lv X, Sun J, Bi Y, Xu M, Lu J, Zhao L, et al. Risk of all-cause mortality and cardiovascular disease associated with secondhand smoke exposure: a systematic review and meta-analysis. Int J Cardiol. 15 de noviembre de 2015;199:106-15.

37.Gupta R, Gupta S, Sharma S, Sinha DN, Mehrotra R. Risk of Coronary Heart Disease Among Smokeless Tobacco Users: Results of Systematic Review and Meta-Analysis of Global Data. Nicotine Tob Res Off J Soc Res Nicotine Tob. 1 de enero de 2019;21(1):25-31.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

38.Prescott E, Scharling H, Osler M, Schnohr P. Importance of light smoking and inhalation habits on risk of myocardial infarction and all cause mortality. A 22 year follow up of 12 149 men and women in The Copenhagen City Heart Study. J Epidemiol Community Health. septiembre de 2002;56(9):702-6.

39.Kotseva K, Wood D, De Backer G, De Bacquer D, Pyörälä K, Keil U, et al. EUROASPIRE III: a survey on the lifestyle, risk factors and use of cardioprotective drug therapies in coronary patients from 22 European countries. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil Off J Eur Soc Cardiol Work Groups Epidemiol Prev Card Rehabil Exerc Physiol. abril de 2009;16(2):121-37.

40.Kotseva K, Wood D, De Bacquer D, De Backer G, Rydén L, Jennings C, et al. EUROASPIRE IV: A European Society of Cardiology survey on the lifestyle, risk factor and therapeutic management of coronary patients from 24 European countries. Eur J Prev Cardiol. abril de 2016;23(6):636-48.

41.Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US), Office on Smoking and Health (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General [Internet]. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010 [citado 10 de octubre de 2022]. (Publications and Reports of the Surgeon General). Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53017/

42.He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost MR, Hughes J, Whelton PK. Passive smoking and the risk of coronary heart disease--a meta-analysis of epidemiologic studies. N Engl J Med. 25 de marzo de 1999;340(12):920-6.

43.Woolf KJ, Zabad MN, Post JM, McNitt S, Williams GC, Bisognano JD. Effect of nicotine replacement therapy on cardiovascular outcomes after acute coronary syndromes. Am J Cardiol. 1 de octubre de 2012;110(7):968-70.

44.Chow CK, Jolly S, Rao-Melacini P, Fox KAA, Anand SS, Yusuf S. Association of diet, exercise, and smoking modification with risk of early cardiovascular events after acute coronary syndromes. Circulation. 16 de febrero de 2010;121(6):750-8.

45.Pisinger C, Døssing M. A systematic review of health effects of electronic cigarettes. Prev Med. diciembre de 2014;69:248-60.

46.McRobbie H, Bullen C, Hartmann-Boyce J, Hajek P. Electronic cigarettes for smoking cessation and reduction. Cochrane Database Syst Rev. 2014;(12):CD010216.

47.Bullen C, Howe C, Laugesen M, McRobbie H, Parag V, Williman J, et al. Electronic cigarettes for smoking cessation: a randomised controlled trial. Lancet Lond Engl. 16 de noviembre de 2013;382(9905):1629-37.

48.Etter JF, Bullen C. A longitudinal study of electronic cigarette users. Addict Behav. febrero de 2014;39(2):491-4.

49.Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet Lond Engl. 15 de diciembre de 2012;380(9859):2224-60.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

50.Chow CK, Teo KK, Rangarajan S, Islam S, Gupta R, Avezum A, et al. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in rural and urban communities in high-, middle-, and low-income countries. JAMA. 4 de septiembre de 2013;310(9):959-68.

51.Forouzanfar MH, Liu P, Roth GA, Ng M, Biryukov S, Marczak L, et al. Global Burden of Hypertension and Systolic Blood Pressure of at Least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. JAMA. 10 de enero de 2017;317(2):165-82.

52.NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants. Lancet Lond Engl. 7 de enero de 2017;389(10064):37-55.

53.Lip GYH, Coca A, Kahan T, Boriani G, Manolis AS, Olsen MH, et al. Hypertension and cardiac arrhythmias: executive summary of a consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and ESC Council on Hypertension, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLEACE). Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother. 1 de octubre de 2017;3(4):235-50.

54.Rovio SP, Pahkala K, Nevalainen J, Juonala M, Salo P, Kähönen M, et al. Cardiovascular Risk Factors From Childhood and Midlife Cognitive Performance: The Young Finns Study. J Am Coll Cardiol. 9 de mayo de 2017;69(18):2279-89.

55.Lewington S, Clarke R, Qizilbash N, Peto R, Collins R, Prospective Studies Collaboration. Age-specific relevance of usual blood pressure to vascular mortality: a meta-analysis of individual data for one million adults in 61 prospective studies. Lancet Lond Engl. 14 de diciembre de 2002;360(9349):1903-13.

56.Whelton SP, McEvoy JW, Shaw L, Psaty BM, Lima JAC, Budoff M, et al. Association of Normal Systolic Blood Pressure Level With Cardiovascular Disease in the Absence of Risk Factors. JAMA Cardiol. 1 de septiembre de 2020;5(9):1011-8.

57.Franklin SS, Khan SA, Wong ND, Larson MG, Levy D. Is pulse pressure useful in predicting risk for coronary heart Disease? The Framingham heart study. Circulation. 27 de julio de 1999;100(4):354-60.

58.Franklin SS, Lopez VA, Wong ND, Mitchell GF, Larson MG, Vasan RS, et al. Single versus combined blood pressure components and risk for cardiovascular disease: the Framingham Heart Study. Circulation. 20 de enero de 2009;119(2):243-50.

59.Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM, Hirsch AT, Ikeda Y, Mas JL, et al. International prevalence, recognition, and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. JAMA. 11 de enero de 2006;295(2):180-9.

60.Berry JD, Dyer A, Cai X, Garside DB, Ning H, Thomas A, et al. Lifetime risks of cardiovascular disease. N Engl J Med. 26 de enero de 2012;366(4):321-9.

61.Ji H, Niiranen TJ, Rader F, Henglin M, Kim A, Ebinger JE, et al. Sex Differences in Blood Pressure Associations With Cardiovascular Outcomes. Circulation. 16 de febrero de 2021;143(7):761-3.

62.Ji H, Kim A, Ebinger JE, Niiranen TJ, Claggett BL, Bairey Merz CN, et al. Sex Differences in Blood Pressure Trajectories Over the Life Course. JAMA Cardiol. 1 de marzo de 2020;5(3):19-26.

USC UNIVERSIDADE

63.Borghi C, Rosei EA, Bardin T, Dawson J, Dominiczak A, Kielstein JT, et al. Serum uric acid and the risk of cardiovascular and renal disease. J Hypertens. septiembre de 2015;33(9):1729-41; discussion 1741.

64.van Dis I, Geleijnse JM, Boer JM, Kromhout D, Boshuizen H, Grobbee DE, et al. Effect of including nonfatal events in cardiovascular risk estimation, illustrated with data from The Netherlands. Eur J Prev Cardiol. marzo de 2014;21(3):377-83.

65.Katta N, Loethen T, Lavie CJ, Alpert MA. Obesity and Coronary Heart Disease: Epidemiology, Pathology, and Coronary Artery Imaging. Curr Probl Cardiol. marzo de 2021;46(3):100655.

66.Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, et al. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. Diabetes Care. abril de 2001;24(4):683-9.

67.NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128·9 million children, adolescents, and adults. Lancet Lond Engl. 16 de diciembre de 2017;390(10113):2627-42.

68.Sun YQ, Burgess S, Staley JR, Wood AM, Bell S, Kaptoge SK, et al. Body mass index and all cause mortality in HUNT and UK Biobank studies: linear and non-linear mendelian randomisation analyses. BMJ. 26 de marzo de 2019;364:l1042.

69.Global BMI Mortality Collaboration null, Di Angelantonio E, Bhupathiraju S, Wormser D, Gao P, Kaptoge S, et al. Body-mass index and all-cause mortality: individual-participant-data meta-analysis of 239 prospective studies in four continents. Lancet Lond Engl. 20 de agosto de 2016;388(10046):776-86.

70.Emerging Risk Factors Collaboration, Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, et al. Separate and combined associations of body-mass index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. Lancet Lond Engl. 26 de marzo de 2011;377(9771):1085-95.

71.Glovaci D, Fan W, Wong ND. Epidemiology of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. Curr Cardiol Rep. 4 de marzo de 2019;21(4):21.

72.Emerging Risk Factors Collaboration, Sarwar N, Gao P, Seshasai SRK, Gobin R, Kaptoge S, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. Lancet Lond Engl. 26 de junio de 2010;375(9733):2215-22.

73.Peters SAE, Huxley RR, Woodward M. Diabetes as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 64 cohorts, including 775,385 individuals and 12,539 strokes. Lancet Lond Engl. 7 de junio de 2014;383(9933):1973-80.

74.Constantino MI, Molyneaux L, Limacher-Gisler F, Al-Saeed A, Luo C, Wu T, et al. Long-term complications and mortality in young-onset diabetes: type 2 diabetes is more hazardous and lethal than type 1 diabetes. Diabetes Care. diciembre de 2013;36(12):3863-9.

75.Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. Diabetes Care. enero de 2015;38(1):140-9.

76.Authors/Task Force Members, Rydén L, Grant PJ, Anker SD, Berne C, Cosentino F, et al. ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD: the Task Force on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and developed in collaboration with the European Association for the Study of Diabetes (EASD). Eur Heart J. octubre de 2013;34(39):3035-87.

77.Li G, Zhang P, Wang J, An Y, Gong Q, Gregg EW, et al. Cardiovascular mortality, all-cause mortality, and diabetes incidence after lifestyle intervention for people with impaired glucose tolerance in the Da Qing Diabetes Prevention Study: a 23-year follow-up study. Lancet Diabetes Endocrinol. junio de 2014;2(6):474-80.

78.Wannamethee SG, Shaper AG, Whincup PH, Lennon L, Sattar N. Impact of diabetes on cardiovascular disease risk and all-cause mortality in older men: influence of age at onset, diabetes duration, and established and novel risk factors. Arch Intern Med. 14 de marzo de 2011;171(5):404-10.

79.Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. Lancet Lond Engl. 1 de septiembre de 2012;380(9844):807-14.

80.Emerging Risk Factors Collaboration, Di Angelantonio E, Kaptoge S, Wormser D, Willeit P, Butterworth AS, et al. Association of Cardiometabolic Multimorbidity With Mortality. JAMA. 7 de julio de 2015;314(1):52-60.

81.Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes Study Group, Gerstein HC, Miller ME, Byington RP, Goff DC, Bigger JT, et al. Effects of intensive glucose lowering in type 2 diabetes. N Engl J Med. 12 de junio de 2008;358(24):2545-59.

82.Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. Lancet Lond Engl. 8 de octubre de 2005;366(9493):1267-78.

83.Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. The Lancet. junio de 2010;375(9731):2073-81.

84.Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C yuan. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. N Engl J Med. 23 de septiembre de 2004;351(13):1296-305.

85.Weiner DE, Tighiouart H, Elsayed EF, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. The Framingham predictive instrument in chronic kidney disease. J Am Coll Cardiol. 17 de julio de 2007;50(3):217-24.

86.Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, et al. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. Lancet Diabetes Endocrinol. julio de 2015;3(7):514-25.

USC DE COMPOSTELA

87.Bundy JD, Chen J, Yang W, Budoff M, Go AS, Grunwald JE, et al. Risk factors for progression of coronary artery calcification in patients with chronic kidney disease: The CRIC study. Atherosclerosis. abril de 2018;271:53-60.

88.London GM, Marchais SJ, Guérin AP, Métivier F. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. Curr Opin Nephrol Hypertens. noviembre de 2005;14(6):525-31.

89.Campean V, Neureiter D, Varga I, Runk F, Reiman A, Garlichs C, et al. Atherosclerosis and vascular calcification in chronic renal failure. Kidney Blood Press Res. 2005;28(5-6):280-9.

90.Sarnak MJ, Amann K, Bangalore S, Cavalcante JL, Charytan DM, Craig JC, et al. Chronic Kidney Disease and Coronary Artery Disease: JACC State-of-the-Art Review. J Am Coll Cardiol. 8 de octubre de 2019;74(14):1823-38.

91.Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. noviembre de 2009;9 Suppl 3:S1-155.

92.Wanner C, Tonelli M, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Lipid Guideline Development Work Group Members. KDIGO Clinical Practice Guideline for Lipid Management in CKD: summary of recommendation statements and clinical approach to the patient. Kidney Int. junio de 2014;85(6):1303-9.

93.Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, Catapano AL. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. J Am Coll Cardiol. 4 de septiembre de 2018;72(10):1141-56.

94.Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, et al. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Eur Heart J. 21 de agosto de 2017;38(32):2459-72.

95.Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, et al. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. Lancet Lond Engl. 13 de noviembre de 2010;376(9753):1670-81.

96.Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators, Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. Lancet Lond Engl. 11 de agosto de 2012;380(9841):581-90.

97.Pencina KM, Thanassoulis G, Wilkins JT, Vasan RS, Navar AM, Peterson ED, et al. Trajectories of Non-HDL Cholesterol Across Midlife: Implications for Cardiovascular Prevention. J Am Coll Cardiol. 9 de julio de 2019;74(1):70-9.

98.Holmes MV, Asselbergs FW, Palmer TM, Drenos F, Lanktree MB, Nelson CP, et al. Mendelian randomization of blood lipids for coronary heart disease. Eur Heart J. 1 de marzo de 2015;36(9):539-50.

99.REVEAL Collaborative Group, Bowman L, Chen F, Sammons E, Hopewell JC, Wallendszus K, et al. Randomized Evaluation of the Effects of Anacetrapib through Lipid-

modification (REVEAL)-A large-scale, randomized, placebo-controlled trial of the clinical effects of anacetrapib among people with established vascular disease: Trial design, recruitment, and baseline characteristics. Am Heart J. mayo de 2017;187:182-90.

100.Collins R, Armitage J, Parish S, Sleigh P, Peto R, Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol-lowering with simvastatin in 5963 people with diabetes: a randomised placebo-controlled trial. Lancet Lond Engl. 14 de junio de 2003;361(9374):2005-16.

101.Tabas I, Williams KJ, Borén J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. Circulation. 16 de octubre de 2007;116(16):1832-44.

102.Borén J, Williams KJ. The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. Curr Opin Lipidol. octubre de 2016;27(5):473-83.

103.Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. N Engl J Med. 23 de mayo de 2013;368(21):2004-13.

104.Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 19 de mayo de 2011;473(7347):317-25.

105.Skålén K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hultén LM, Wiklund O, Innerarity TL, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature. 13 de junio de 2002;417(6890):750-4.

106.Chung AK, Das SR, Leonard D, Peshock RM, Kazi F, Abdullah SM, et al. Women have higher left ventricular ejection fractions than men independent of differences in left ventricular volume: the Dallas Heart Study. Circulation. 28 de marzo de 2006;113(12):1597-604.

107.Maas AHEM, Rosano G, Cifkova R, Chieffo A, van Dijken D, Hamoda H, et al. Cardiovascular health after menopause transition, pregnancy disorders, and other gynaecologic conditions: a consensus document from European cardiologists, gynaecologists, and endocrinologists. Eur Heart J. 7 de marzo de 2021;42(10):967-84.

108.Roberts WC. Relationship Between Coronary Thrombosis and Myocardial Infarction. Mod Concepts Cardiovasc Dis. febrero de 1972;41(2):7-10.

109.Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 19 de diciembre de 2002;420(6917):868-74.

110.Letts LG. Leukotrienes: role in cardiovascular physiology. Cardiovasc Clin. 1987;18(1):101-13.

111. ..Libby P, Lee RT. Matrix matters. Circulation. 17 de octubre de 2000;102(16):1874-6.

112.Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. Curr Opin Lipidol. octubre de 1998;9(5):471-4.

113.Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 de septiembre de 2002;22(9):1370-80.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

114.Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. Nat Med. abril de 2003;9(4):458-62.

115.Clarkson TB, Prichard RW, Morgan TM, Petrick GS, Klein KP. Remodeling of coronary arteries in human and nonhuman primates. JAMA. 26 de enero de 1994;271(4):289-94.

116.Arnett EN, Isner JM, Redwood DR, Kent KM, Baker WP, Ackerstein H, et al. Coronary artery narrowing in coronary heart disease: comparison of cineangiographic and necropsy findings. Ann Intern Med. septiembre de 1979;91(3):350-6.

117.Moise A, Théroux P, Taeymans Y, Waters DD, Lespérance J, Fines P, et al. Clinical and angiographic factors associated with progression of coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. marzo de 1984;3(3):659-67.

118.Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, et al. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. Circulation. 4 de febrero de 1997;95(3):594-9.

119.Asakura M, Ueda Y, Yamaguchi O, Adachi T, Hirayama A, Hori M, et al. Extensive development of vulnerable plaques as a pan-coronary process in patients with myocardial infarction: an angioscopic study. J Am Coll Cardiol. abril de 2001;37(5):1284-8.

120.Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. Circulation. abril de 1985;71(4):699-708.

121.Cesari M, Sartori MT. [Fibrinolysis in ischemic cardiopathy: the role of plasminogen activator inhibitor 1]. Cardiol Rome Italy. enero de 1999;44(1):25-32.

122.Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. Circulation. 15 de octubre de 1996;94(8):2013-20.

123.Goldstein JA, Demetriou D, Grines CL, Pica M, Shoukfeh M, O'Neill WW. Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. N Engl J Med. 28 de septiembre de 2000;343(13):915-22.

124.Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease. Circulation. 8 de febrero de 2000;101(5):570-80.

125.Lim HS, Felmeden D, Lip GYH. Angiotensin II-mediated vascular inflammation: the balance between vascular endothelial growth factor and angiopoietins. Hypertens Dallas Tex 1979. febrero de 2005;45(2):e3.

126.Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. Circulation. 16 de diciembre de 1997;96(12):4219-25.

127.Zhang X, Liu X, Shang H, Xu Y, Qian M. Monocyte chemoattractant protein-1 induces endothelial cell apoptosis in vitro through a p53-dependent mitochondrial pathway. Acta Biochim Biophys Sin. octubre de 2011;43(10):787-95.

128.Virella G, Atchley D, Koskinen S, Zheng D, Lopes-Virella MF, DCCT/EDIC Research Group. Proatherogenic and proinflammatory properties of immune complexes prepared with

purified human oxLDL antibodies and human oxLDL. Clin Immunol Orlando Fla. octubre de 2002;105(1):81-92.

129.Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvart R, Brozek J, Haulon S, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. Cell Metab. agosto de 2007;6(2):137-43.

130.Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med. 7 de noviembre de 2011;17(11):1410-22.

131.Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. Arterioscler Thromb J Vasc Biol. febrero de 1993;13(2):197-204.

132.Antoniades C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 ligand system: linking inflammation with atherothrombosis. J Am Coll Cardiol. 18 de agosto de 2009;54(8):669-77.

133.Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. Nat Rev Immunol. enero de 2010;10(1):36-46.

134.Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. junio de 2007;27(6):1248-58.

135.Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardeña G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. Ann N Y Acad Sci. mayo de 2000;902:230-9; discussion 239-240.

136.Libby P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. J Lipid Res. abril de 2009;50 Suppl:S352-357.

137.Hiatt WR, Armstrong EJ, Larson CJ, Brass EP. Pathogenesis of the limb manifestations and exercise limitations in peripheral artery disease. Circ Res. 24 de abril de 2015;116(9):1527-39.

138.Vasan RS. Biomarkers of cardiovascular disease: molecular basis and practical considerations. Circulation. 16 de mayo de 2006;113(19):2335-62.

139.NACB LMPG Committee Members, Myers GL, Christenson RHM, Cushman M, Ballantyne CM, Cooper GR, et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice guidelines: emerging biomarkers for primary prevention of cardiovascular disease. Clin Chem. febrero de 2009;55(2):378-84.

140.Kahan T, Forslund L, Held C, Björkander I, Billing E, Eriksson SV, et al. Risk prediction in stable angina pectoris. Eur J Clin Invest. febrero de 2013;43(2):141-51.

141.Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. Circulation. 5 de marzo de 2002;105(9):1135-43.

142.Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Pennells L, Wood AM, White IR, et al. C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. N Engl J Med. 4 de octubre de 2012;367(14):1310-20.

143.Tzoulaki I, Siontis KC, Evangelou E, Ioannidis JPA. Bias in associations of emerging biomarkers with cardiovascular disease. JAMA Intern Med. 22 de abril de 2013;173(8):664-71.

USC DE COMPOSTELA

144.Ioannidis JPA, Tzoulaki I. Minimal and null predictive effects for the most popular blood biomarkers of cardiovascular disease. Circ Res. 2 de marzo de 2012;110(5):658-62.

145.Kooter AJ, Kostense PJ, Groenewold J, Thijs A, Sattar N, Smulders YM. Integrating information from novel risk factors with calculated risks: the critical impact of risk factor prevalence. Circulation. 9 de agosto de 2011;124(6):741-5.

146.Würtz P, Havulinna AS, Soininen P, Tynkkynen T, Prieto-Merino D, Tillin T, et al. Metabolite profiling and cardiovascular event risk: a prospective study of 3 population-based cohorts. Circulation. 3 de marzo de 2015;131(9):774-85.

147.Willeit P, Welsh P, Evans JDW, Tschiderer L, Boachie C, Jukema JW, et al. High-Sensitivity Cardiac Troponin Concentration and Risk of First-Ever Cardiovascular Outcomes in 154,052 Participants. J Am Coll Cardiol. 1 de agosto de 2017;70(5):558-68.

148.Agewall S, Giannitsis E, Jernberg T, Katus H. Troponin elevation in coronary vs. non-coronary disease. Eur Heart J. febrero de 2011;32(4):404-11.

149.Takeda S, Yamashita A, Maeda K, Maéda Y. Structure of the core domain of human cardiac troponin in the Ca(2+)-saturated form. Nature. 3 de julio de 2003;424(6944):35-41.

150.Schreier T, Kedes L, Gahlmann R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. J Biol Chem. 5 de diciembre de 1990;265(34):21247-53.

151.Tate JR, Bunk DM, Christenson RH, Katrukha A, Noble JE, Porter RA, et al. Standardisation of cardiac troponin I measurement: past and present. Pathology (Phila). 2010;42(5):402-8.

152.Filatov VL, Katrukha AG, Bulargina TV, Gusev NB. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. Biochem Biokhimiia. septiembre de 1999;64(9):969-85.

153.Adams JE, Schechtman KB, Landt Y, Ladenson JH, Jaffe AS. Comparable detection of acute myocardial infarction by creatine kinase MB isoenzyme and cardiac troponin I. Clin Chem. julio de 1994;40(7 Pt 1):1291-5.

154.Lee TH, Rouan GW, Weisberg MC, Brand DA, Cook EF, Acampora D, et al. Sensitivity of routine clinical criteria for diagnosing myocardial infarction within 24 hours of hospitalization. Ann Intern Med. febrero de 1987;106(2):181-6.

155.Adams JE, Bodor GS, Dávila-Román VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. Circulation. julio de 1993;88(1):101-6.

156.Jaffe AS, Landt Y, Parvin CA, Abendschein DR, Geltman EM, Ladenson JH. Comparative sensitivity of cardiac troponin I and lactate dehydrogenase isoenzymes for diagnosing acute myocardial infarction. Clin Chem. noviembre de 1996;42(11):1770-6.

157.Ottani F, Galvani M, Nicolini FA, Ferrini D, Pozzati A, Di Pasquale G, et al. Elevated cardiac troponin levels predict the risk of adverse outcome in patients with acute coronary syndromes. Am Heart J. diciembre de 2000;140(6):917-27.

158.Mair J, Puschendorf B, Michel G. Clinical significance of cardiac contractile proteins for the diagnosis of myocardial injury. Adv Clin Chem. 1994;31:63-98.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

159.Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. septiembre de 2000;36(3):959-69.

160.Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. Eur Heart J. septiembre de 2000;21(18):1502-13.

161.Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, et al. Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med. 31 de octubre de 1996;335(18):1342-9.

162.Okamatsu K, Takano M, Sakai S, Ishibashi F, Uemura R, Takano T, et al. Elevated troponin T levels and lesion characteristics in non-ST-elevation acute coronary syndromes. Circulation. 3 de febrero de 2004;109(4):465-70.

163.Newby LK, Christenson RH, Ohman EM, Armstrong PW, Thompson TD, Lee KL, et al. Value of serial troponin T measures for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndromes. The GUSTO-IIa Investigators. Circulation. 3 de noviembre de 1998;98(18):1853-9.

164.Ohman EM, Armstrong PW, Christenson RH, Granger CB, Katus HA, Hamm CW, et al. Cardiac troponin T levels for risk stratification in acute myocardial ischemia. GUSTO IIA Investigators. N Engl J Med. 31 de octubre de 1996;335(18):1333-41.

165.Lüscher MS, Thygesen K, Ravkilde J, Heickendorff L. Applicability of cardiac troponin T and I for early risk stratification in unstable coronary artery disease. TRIM Study Group. Thrombin Inhibition in Myocardial ischemia. Circulation. 21 de octubre de 1997;96(8):2578-85.

166.Licka M, Zimmermann R, Zehelein J, Dengler TJ, Katus HA, Kübler W. Troponin T concentrations 72 hours after myocardial infarction as a serological estimate of infarct size. Heart Br Card Soc. junio de 2002;87(6):520-4.

167.Panteghini M, Cuccia C, Bonetti G, Giubbini R, Pagani F, Bonini E. Single-point cardiac troponin T at coronary care unit discharge after myocardial infarction correlates with infarct size and ejection fraction. Clin Chem. septiembre de 2002;48(9):1432-6.

168.Giannitsis E, Müller-Bardorff M, Lehrke S, Wiegand U, Tölg R, Weidtmann B, et al. Admission troponin T level predicts clinical outcomes, TIMI flow, and myocardial tissue perfusion after primary percutaneous intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction. Circulation. 7 de agosto de 2001;104(6):630-5.

169.Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjöld A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. Am Heart J. octubre de 2004;148(4):574-81.

170.Weber M, Mitrovic V, Hamm C. B-type natriuretic peptide and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide - Diagnostic role in stable coronary artery disease. Exp Clin Cardiol. 2006;11(2):99-101.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

171.Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature. 3 de marzo de 1988;332(6159):78-81.

172.Saper CB, Hurley KM, Moga MM, Holmes HR, Adams SA, Leahy KM, et al. Brain natriuretic peptides: differential localization of a new family of neuropeptides. Neurosci Lett. 2 de enero de 1989;96(1):29-34.

173.de Lemos JA, McGuire DK, Drazner MH. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. Lancet Lond Engl. 26 de julio de 2003;362(9380):316-22.

174.Hosoda K, Nakao K, Mukoyama M, Saito Y, Jougasaki M, Shirakami G, et al. Expression of brain natriuretic peptide gene in human heart. Production in the ventricle. Hypertens Dallas Tex 1979. junio de 1991;17(6 Pt 2):1152-5.

175.Takeda T, Kohno M. Brain natriuretic peptide in hypertension. Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens. diciembre de 1995;18(4):259-66.

176.Wahl HG, Graf S, Renz H, Fassbinder W. Elimination of the cardiac natriuretic peptides B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP by hemodialysis. Clin Chem. junio de 2004;50(6):1071-4.

177.Blankenberg S, McQueen MJ, Smieja M, Pogue J, Balion C, Lonn E, et al. Comparative impact of multiple biomarkers and N-Terminal pro-brain natriuretic peptide in the context of conventional risk factors for the prediction of recurrent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. Circulation. 18 de julio de 2006;114(3):201-8.

178.Omland T, Richards AM, Wergeland R, Vik-Mo H. B-type natriuretic peptide and long-term survival in patients with stable coronary artery disease. Am J Cardiol. 1 de enero de 2005;95(1):24-8.

179.Wallentin L, Eriksson N, Olszowka M, Grammer TB, Hagström E, Held C, et al. Plasma proteins associated with cardiovascular death in patients with chronic coronary heart disease: A retrospective study. PLoS Med. enero de 2021;18(1):e1003513.

180.Anand IS, Fisher LD, Chiang YT, Latini R, Masson S, Maggioni AP, et al. Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). Circulation. 11 de marzo de 2003;107(9):1278-83.

181.Natriuretic Peptides Studies Collaboration null, Willeit P, Kaptoge S, Welsh P, Butterworth A, Chowdhury R, et al. Natriuretic peptides and integrated risk assessment for cardiovascular disease: an individual-participant-data meta-analysis. Lancet Diabetes Endocrinol. octubre de 2016;4(10):840-9.

182.Mueller T, Gegenhuber A, Poelz W, Haltmayer M. Diagnostic accuracy of B type natriuretic peptide and amino terminal proBNP in the emergency diagnosis of heart failure. Heart Br Card Soc. mayo de 2005;91(5):606-12.

183.Lindahl B, Lindbäck J, Jernberg T, Johnston N, Stridsberg M, Venge P, et al. Serial analyses of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: a Fragmin and fast Revascularisation during In Stability in Coronary artery disease (FRISC)-II substudy. J Am Coll Cardiol. 15 de febrero de 2005;45(4):533-41.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

184.Kociol RD, Horton JR, Fonarow GC, Reyes EM, Shaw LK, O'Connor CM, et al. Admission, discharge, or change in B-type natriuretic peptide and long-term outcomes: data from Organized Program to Initiate Lifesaving Treatment in Hospitalized Patients with Heart Failure (OPTIMIZE-HF) linked to Medicare claims. Circ Heart Fail. septiembre de 2011;4(5):628-36.

185.Daniels LB, Laughlin GA, Clopton P, Maisel AS, Barrett-Connor E. Minimally elevated cardiac troponin T and elevated N-terminal pro-B-type natriuretic peptide predict mortality in older adults: results from the Rancho Bernardo Study. J Am Coll Cardiol. 5 de agosto de 2008;52(6):450-9.

186.Stone GW, Sabik JF, Serruys PW, Simonton CA, Généreux P, Puskas J, et al. Everolimus-Eluting Stents or Bypass Surgery for Left Main Coronary Artery Disease. N Engl J Med. 8 de diciembre de 2016;375(23):2223-35.

187.Omland T. Can Circulating B-Type Natriuretic Peptide Concentrations Guide Treatment of Obstructive Left Main Coronary Artery Disease? Circulation. 31 de julio de 2018;138(5):479-82.

188.Redfors B, Chen S, Crowley A, Ben-Yehuda O, Gersh BJ, Lembo NJ, et al. B-Type Natriuretic Peptide Assessment in Patients Undergoing Revascularization for Left Main Coronary Artery Disease: Analysis From the EXCEL Trial. Circulation. 31 de julio de 2018;138(5):469-78.

189.Milojevic M, Head SJ, Parasca CA, Serruys PW, Mohr FW, Morice MC, et al. Causes of Death Following PCI Versus CABG in Complex CAD: 5-Year Follow-Up of SYNTAX. J Am Coll Cardiol. 5 de enero de 2016;67(1):42-55.

190.Liu CY, Heckbert SR, Lai S, Ambale-Venkatesh B, Ostovaneh MR, McClelland RL, et al. Association of Elevated NT-proBNP With Myocardial Fibrosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). J Am Coll Cardiol. 26 de diciembre de 2017;70(25):3102-9.

191.Omland T, Sabatine MS, Jablonski KA, Rice MM, Hsia J, Wergeland R, et al. Prognostic value of B-Type natriuretic peptides in patients with stable coronary artery disease: the PEACE Trial. J Am Coll Cardiol. 17 de julio de 2007;50(3):205-14.

192.Stewart RAH, Kirby A, White HD, Marschner SL, West M, Thompson PL, et al. B-Type Natriuretic Peptide and Long-Term Cardiovascular Mortality in Patients With Coronary Heart Disease. J Am Heart Assoc. 5 de julio de 2022;11(13):e024616.

193.Arinzon Z, Peisakh A, Schrire S, Berner Y. C-reactive protein (CRP): an important diagnostic and prognostic tool in nursing-home-associated pneumonia. Arch Gerontol Geriatr. 2011;53(3):364-9.

194.Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. Clin Chem. marzo de 2001;47(3):403-11.

195.Pepys MB, Hirschfield GM. C-reactive protein: a critical update. J Clin Invest. junio de 2003;111(12):1805-12.

196.Kivimäki M, Kawachi I. Regarding the relationship between the inflammatory marker C-reactive protein and coronary heart disease. Am J Epidemiol. 1 de julio de 2013;178(1):154-5.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

197.Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am J Epidemiol. 15 de septiembre de 1996;144(6):537-47.

198.Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJP, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. N Engl J Med. 20 de noviembre de 2008;359(21):2195-207.

199.Solomon DH, Karlson EW, Rimm EB, Cannuscio CC, Mandl LA, Manson JE, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in women diagnosed with rheumatoid arthritis. Circulation. 11 de marzo de 2003;107(9):1303-7.

200.Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? Hypertens Dallas Tex 1979. julio de 2004;44(1):6-11.

201.Williams TN, Zhang CX, Game BA, He L, Huang Y. C-reactive protein stimulates MMP-1 expression in U937 histiocytes through Fc[gamma]RII and extracellular signal-regulated kinase pathway:: an implication of CRP involvement in plaque destabilization. Arterioscler Thromb Vasc Biol. enero de 2004;24(1):61-6.

202.Ridker PM, Koenig W, Fuster V. C-reactive protein and coronary heart disease. N Engl J Med. 15 de julio de 2004;351(3):295-8; author reply 295-298.

203.Ouchi N, Kihara S, Funahashi T, Nakamura T, Nishida M, Kumada M, et al. Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. Circulation. 11 de febrero de 2003;107(5):671-4.

204.Koschinsky ML, Marcovina SM. Structure-function relationships in apolipoprotein(a): insights into lipoprotein(a) assembly and pathogenicity. Curr Opin Lipidol. abril de 2004;15(2):167-74.

205.Boffa MB, Marcovina SM, Koschinsky ML. Lipoprotein(a) as a risk factor for atherosclerosis and thrombosis: mechanistic insights from animal models. Clin Biochem. mayo de 2004;37(5):333-43.

206.Nielsen LB. Atherogenecity of lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein: insight from in vivo studies of arterial wall influx, degradation and efflux. Atherosclerosis. abril de 1999;143(2):229-43.

207.Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, McConnell JP, Lennon RJ, Kornman KS, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. N Engl J Med. 7 de julio de 2005;353(1):46-57.

208.Deb A, Caplice NM. Lipoprotein(a): new insights into mechanisms of atherogenesis and thrombosis. Clin Cardiol. mayo de 2004;27(5):258-64.

209.O'Donoghue ML, Fazio S, Giugliano RP, Stroes ESG, Kanevsky E, Gouni-Berthold I, et al. Lipoprotein(a), PCSK9 Inhibition, and Cardiovascular Risk. Circulation. 19 de marzo de 2019;139(12):1483-92.

210.Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, et al. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. Eur Heart J. diciembre de 2010;31(23):2844-53.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

211.Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. N Engl J Med. 7 de febrero de 2013;368(6):503-12.

212.Kamstrup PR, Nordestgaard BG. Elevated Lipoprotein(a) Levels, LPA Risk Genotypes, and Increased Risk of Heart Failure in the General Population. JACC Heart Fail. enero de 2016;4(1):78-87.

213.Clarke R, Peden JF, Hopewell JC, Kyriakou T, Goel A, Heath SC, et al. Genetic variants associated with Lp(a) lipoprotein level and coronary disease. N Engl J Med. 24 de diciembre de 2009;361(26):2518-28.

214.Kamstrup PR, Tybjærg-Hansen A, Nordestgaard BG. Extreme lipoprotein(a) levels and improved cardiovascular risk prediction. J Am Coll Cardiol. 19 de marzo de 2013;61(11):1146-56.

215.Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, et al. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. Eur Heart J. 1 de enero de 2020;41(1):111-88.

216.Ling M, Murali M. Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. Clin Lab Med. diciembre de 2019;39(4):579-90.

217.Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. Am J Pathol. marzo de 2001;158(3):1039-51.

218.Volanakis JE, Kaplan MH. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea pig complement by CRP complexes: requirement for human C1q. J Immunol Baltim Md 1950. julio de 1974;113(1):9-17.

219.Marder SR, Chenoweth DE, Goldstein IM, Perez HD. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. J Immunol Baltim Md 1950. mayo de 1985;134(5):3325-31.

220.Ali H. Regulation of human mast cell and basophil function by anaphylatoxins C3a and C5a. Immunol Lett. 18 de enero de 2010;128(1):36-45.

221.Rus HG, Niculescu F, Constantinescu E, Cristea A, Vlaicu R. Immunoelectron-microscopic localization of the terminal C5b-9 complement complex in human atherosclerotic fibrous plaque. Atherosclerosis. julio de 1986;61(1):35-42.

222.Mauer J, Denson JL, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. Trends Immunol. febrero de 2015;36(2):92-101.

223.Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. Cell. 11 de agosto de 1989;58(3):573-81.

224.Kaneda M, Odaka T, Suetake H, Tahara D, Miyadai T. Teleost IL-6 promotes antibody production through STAT3 signaling via IL-6R and gp130. Dev Comp Immunol. octubre de 2012;38(2):224-31.

225.Lim GB. Coronary artery disease: IL-6 signaling linked with CHD. Nat Rev Cardiol. 3 de abril de 2012;9(6):313.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

226.Bernberg E, Ulleryd MA, Johansson ME, Bergström GML. Social disruption stress increases IL-6 levels and accelerates atherosclerosis in ApoE-/- mice. Atherosclerosis. abril de 2012;221(2):359-65.

227.Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. Cardiol Rev. junio de 2014;22(3):147-51.

228.Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. N Engl J Med. 1 de abril de 2004;350(14):1387-97.

229.Stapp JM, Sjoelund V, Lassiter HA, Feldhoff RC, Feldhoff PW. Recombinant rat IL-1beta and IL-6 synergistically enhance C3 mRNA levels and complement component C3 secretion by H-35 rat hepatoma cells. Cytokine. 21 de abril de 2005;30(2):78-85.

230.Held C, White HD, Stewart RAH, Budaj A, Cannon CP, Hochman JS, et al. Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. J Am Heart Assoc. 24 de octubre de 2017;6(10):e005077.

231.Ridker PM, Lüscher TF. Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. Eur Heart J. 14 de julio de 2014;35(27):1782-91.

232.Kaptoge S, Seshasai SRK, Gao P, Freitag DF, Butterworth AS, Borglykke A, et al. Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. Eur Heart J. marzo de 2014;35(9):578-89.

233.Chen SL, Liu Y, Lin L, Ye F, Zhang JJ, Tian NL, et al. Interleukin-6, but not C-reactive protein, predicts the occurrence of cardiovascular events after drug-eluting stent for unstable angina. J Intervent Cardiol. abril de 2014;27(2):142-54.

234.Koyama K, Yoneyama K, Mitarai T, Ishibashi Y, Takahashi E, Kongoji K, et al. Association between inflammatory biomarkers and thin-cap fibroatheroma detected by optical coherence tomography in patients with coronary heart disease. Arch Med Sci AMS. 19 de junio de 2015;11(3):505-12.

235.García-Moll X, Carlos Kaski J. [Ischemic cardiopathy: inflammation markers and the cardiovascular risk]. Rev Esp Cardiol. noviembre de 1999;52(11):990-1003.

236.Bendtzen K. Biological properties of interleukins. Allergy. mayo de 1983;38(4):219-26.

237.Biasucci LM, Liuzzo G, Fantuzzi G, Caligiuri G, Rebuzzi AG, Ginnetti F, et al. Increasing levels of interleukin (IL)-1Ra and IL-6 during the first 2 days of hospitalization in unstable angina are associated with increased risk of in-hospital coronary events. Circulation. 27 de abril de 1999;99(16):2079-84.

238.Kaski JC. [Inflammation, infection and coronary artery disease: myths and realities. Special XXXV Conference of the National Congress of the Spanish Society of Cardiology]. Rev Esp Cardiol. octubre de 2000;53(10):1311-7.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

239.Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. N Engl J Med. 21 de septiembre de 2017;377(12):1119-31.

240.Ridker PM, Libby P, MacFadyen JG, Thuren T, Ballantyne C, Fonseca F, et al. Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). Eur Heart J. 7 de octubre de 2018;39(38):3499-507.

241.Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M. Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. Circulation. 26 de enero de 1999;99(3):420-6.

242.Cavusoglu E, Marmur JD, Yanamadala S, Chopra V, Hegde S, Nazli A, et al. Elevated baseline plasma IL-8 levels are an independent predictor of long-term all-cause mortality in patients with acute coronary syndrome. Atherosclerosis. octubre de 2015;242(2):589-94.

243.Velásquez IM, Frumento P, Johansson K, Berglund A, de Faire U, Leander K, et al. Association of interleukin 8 with myocardial infarction: results from the Stockholm Heart Epidemiology Program. Int J Cardiol. 1 de marzo de 2014;172(1):173-8.

244.Lin CY, Lin CC, Hwang B, Chiang BN. The changes of interleukin-2, tumour necrotic factor and gamma-interferon production among patients with Kawasaki disease. Eur J Pediatr. enero de 1991;150(3):179-82.

245.Ding R, Gao W, Ostrodci DH, He Z, Song Y, Ma L, et al. Effect of interleukin-2 level and genetic variants on coronary artery disease. Inflammation. diciembre de 2013;36(6):1225-31.

246.Jaworska-Wilczyńska M, Magalska A, Piwocka K, Szymański P, Kuśmierczyk M, Wąsik M, et al. Low interleukin-8 level predicts the occurrence of the postpericardiotomy syndrome. PloS One. 2014;9(10):e108822.

247.Wang X, Chai H, Wang Z, Lin PH, Yao Q, Chen C. Serum amyloid A induces endothelial dysfunction in porcine coronary arteries and human coronary artery endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. diciembre de 2008;295(6):H2399-2408.

248.Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuzzi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med. 18 de agosto de 1994;331(7):417-24.

249.Ye RD, Sun L. Emerging functions of serum amyloid A in inflammation. J Leukoc Biol. diciembre de 2015;98(6):923-9.

250.Johnson BD, Kip KE, Marroquin OC, Ridker PM, Kelsey SF, Shaw LJ, et al. Serum amyloid A as a predictor of coronary artery disease and cardiovascular outcome in women: the National Heart, Lung, and Blood Institute-Sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE). Circulation. 17 de febrero de 2004;109(6):726-32.

251.Harb TS, Zareba W, Moss AJ, Ridker PM, Marder VJ, Rifai N, et al. Association of C-reactive protein and serum amyloid A with recurrent coronary events in stable patients after healing of acute myocardial infarction. Am J Cardiol. 15 de enero de 2002;89(2):216-21.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

252.Getz GS, Krishack PA, Reardon CA. Serum amyloid A and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. octubre de 2016;27(5):531-5.

253.Maier W, Altwegg LA, Corti R, Gay S, Hersberger M, Maly FE, et al. Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. Circulation. 22 de marzo de 2005;111(11):1355-61.

254.Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Cavusoglu E, Marmur JD. Membrane-associated CD40L and sCD40L in atherothrombotic disease. Thromb Haemost. septiembre de 2003;90(3):377-84.

255.Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. Cell Mol Life Sci CMLS. enero de 2001;58(1):4-43.

256.Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. Nature. 9 de julio de 1998;394(6689):200-3.

257.Hoving S, Heeneman S, Gijbels MJJ, te Poele JAM, Pol JFC, Gabriels K, et al. Anti-inflammatory and anti-thrombotic intervention strategies using atorvastatin, clopidogrel and knock-down of CD40L do not modify radiation-induced atherosclerosis in ApoE null mice. Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol. octubre de 2011;101(1):100-8.

258.Xu B lao, Bei C hua, Wang R, Lei X xia. [Serum sCD40L detection for risk evaluation of acute coronary syndromes]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. noviembre de 2006;26(11):1656-7.

259.Pamukcu B, Lip GYH, Snezhitskiy V, Shantsila E. The CD40-CD40L system in cardiovascular disease. Ann Med. agosto de 2011;43(5):331-40.

260.Sato N, Kashima K, Tanaka Y, Shimizu H, Mori M. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on generation of oxygen-derived free radicals and myeloperoxidase activity in neutrophils from poorly controlled NIDDM patients. Diabetes. enero de 1997;46(1):133-7.

261.Liu C, Xie G, Huang W, Yang Y, Li P, Tu Z. Elevated serum myeloperoxidase activities are significantly associated with the prevalence of ACS and High LDL-C levels in CHD patients. J Atheroscler Thromb. 2012;19(5):435-43.

262.Yunoki K, Naruko T, Inaba M, Inoue T, Nakagawa M, Sugioka K, et al. Gender-specific correlation between plasma myeloperoxidase levels and serum high-density lipoprotein-associated paraoxonase-1 levels in patients with stable and unstable coronary artery disease. Atherosclerosis. diciembre de 2013;231(2):308-14.

263.Jones CB, Sane DC, Herrington DM. Matrix metalloproteinases: a review of their structure and role in acute coronary syndrome. Cardiovasc Res. 1 de octubre de 2003;59(4):812-23.

264.Rodríguez JA, Orbe J, Páramo JA. [Metalloproteases, vascular remodeling and atherothrombotic syndromes]. Rev Esp Cardiol. septiembre de 2007;60(9):959-67.

265.Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. Circ Res. 22 de febrero de 2002;90(3):251-62.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

266.Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF-alpha. Am J Physiol Cell Physiol. abril de 2004;286(4):C779-784.

267.Newby AC. Do metalloproteinases destabilize vulnerable atherosclerotic plaques? Curr Opin Lipidol. octubre de 2006;17(5):556-61.

268.Liang J, Liu E, Yu Y, Kitajima S, Koike T, Jin Y, et al. Macrophage metalloelastase accelerates the progression of atherosclerosis in transgenic rabbits. Circulation. 25 de abril de 2006;113(16):1993-2001.

269.Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. Expert Rev Cardiovasc Ther. marzo de 2007;5(2):265-82.

270.Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczynska H, Sharma SK, et al. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. Circulation. 5 de octubre de 2004;110(14):2032-8.

271.Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. septiembre de 2006;26(9):1948-57.

272.Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, Schoen FJ, Poole AR, Billinghurst RC, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. Circulation. 18 de mayo de 1999;99(19):2503-9.

273.Ferroni P, Basili S, Martini F, Cardarello CM, Ceci F, Di Franco M, et al. Serum metalloproteinase 9 levels in patients with coronary artery disease: a novel marker of inflammation. J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res. septiembre de 2003;51(5):295-300.

274.Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PR, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. A potential role in acute plaque disruption. Stroke. enero de 2000;31(1):40-7.

275.Uzui H, Harpf A, Liu M, Doherty TM, Shukla A, Chai NN, et al. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. Circulation. 10 de diciembre de 2002;106(24):3024-30.

276.Fitzsimmons PJ, Forough R, Lawrence ME, Gantt DS, Rajab MH, Kim H, et al. Urinary levels of matrix metalloproteinase 9 and 2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Atherosclerosis. septiembre de 2007;194(1):196-203.

277.Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. Stroke. junio de 2006;37(6):1399-406.

278.Ogata T, Shibamura H, Tromp G, Sinha M, Goddard KAB, Sakalihasan N, et al. Genetic analysis of polymorphisms in biologically relevant candidate genes in patients with abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg. junio de 2005;41(6):1036-42.

279.Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, et al. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. Circulation. 1 de abril de 2003;107(12):1579-85.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

280.Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. Am Heart J. febrero de 2001;141(2):211-7.

281.Longo GM, Xiong W, Greiner TC, Zhao Y, Fiotti N, Baxter BT. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. J Clin Invest. septiembre de 2002;110(5):625-32.

282.Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. Circulation. 4 de febrero de 2003;107(4):598-603.

283.Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, et al. Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? QJM Mon J Assoc Physicians. diciembre de 2002;95(12):787-96.

284.Nilsson L, Hallén J, Atar D, Jonasson L, Swahn E. Early measurements of plasma matrix metalloproteinase-2 predict infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. Heart Br Card Soc. enero de 2012;98(1):31-6.

285.McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. Nat Rev Cardiol. junio de 2009;6(6):410-7.

286.Zhang H, Park Y, Wu J, Chen X ping, Lee S, Yang J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci Lond Engl 1979. febrero de 2009;116(3):219-30.

287.Goodwin BL, Pendleton LC, Levy MM, Solomonson LP, Eichler DC. Tumor necrosis factor-alpha reduces argininosuccinate synthase expression and nitric oxide production in aortic endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. agosto de 2007;293(2):H1115-1121.

288.Zernecke A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. Cardiovasc Res. 1 de mayo de 2010;86(2):192-201.

289.Gonzálvez M, Ruiz-Ros JA, Pérez-Paredes M, Lozano ML, García-Almagro FJ, Martínez-Corbalán F, et al. [Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction]. Rev Esp Cardiol. diciembre de 2007;60(12):1233-41.

290.Schulz R, Heusch G. Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? Circulation. 17 de marzo de 2009;119(10):1355-7.

291.Mielczarek-Palacz A, Sikora J, Kondera-Anasz Z, Smycz M. [Changes in concentrations of tumor necrosis factor TNF and its soluble receptors type 1 (sTNF-r1) and type 2 (sTNF-R2) in serum of patients with ST-segment elevation myocardial infarction]. Wiadomosci Lek Wars Pol 1960. 2011;64(2):71-4.

292.Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Båvenholm P, Ericsson CG, et al. Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. Metabolism. enero de 1998;47(1):113-8.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

293.Luo J guang. [Relationship between serum IL-8 hsCRP, TNF-α and coronary lesions in CHD patients]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol. agosto de 2010;26(8):789-91.

294.Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, Novikov Y, et al. Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? Isr Med Assoc J IMAJ. julio de 2008;10(7):494-8.

295.Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R, Czyzycka E, Wojtarowicz A, Bińczak-Kuleta A, et al. Plasma concentrations of TNF-alpha and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. Tissue Antigens. noviembre de 2009;74(5):386-92.

296.Morange PE, Tregouet DA, Godefroy T, Saut N, Bickel C, Rupprecht HJ, et al. Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha (TNF) and the TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) genes in relation to cardiovascular mortality: the AtheroGene study. J Mol Med Berl Ger. octubre de 2008;86(10):1153-61.

297.Caixeta AM, Brito FS, Costa MA, Serrano CV, Petriz JL, Da Luz PL. Enhanced inflammatory response to coronary stenting marks the development of clinically relevant restenosis. Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv. 1 de marzo de 2007;69(4):500-7.

298.Isaacs A, Lindenmann J. Pillars Article: Virus Interference. I. The Interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957. 147: 258-267. J Immunol Baltim Md 1950. 1 de septiembre de 2015;195(5):1911-20.

299.Maher SG, Romero-Weaver AL, Scarzello AJ, Gamero AM. Interferon: cellular executioner or white knight? Curr Med Chem. 2007;14(12):1279-89.

300.Uzé G, Monneron D. IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family. Biochimie. 2007;89(6-7):729-34.

301.de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. J Biol Chem. 13 de julio de 2007;282(28):20053-7.

302.Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. Annu Rev Immunol. 1997;15:749-95.

303. ..... Sen GC. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol. 2001;55:255-81.

304.Rao A. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. Immunol Today. junio de 1994;15(6):274-81.

305.Xu Y, Shao B. Circulating lncRNA IFNG-AS1 expression correlates with increased disease risk, higher disease severity and elevated inflammation in patients with coronary artery disease. J Clin Lab Anal. septiembre de 2018;32(7):e22452.

306.Wang H, Zhang N, Li G, Xu B. Proinflammatory cytokine IFN-γ, lncRNA BANCR and the occurrence of coronary artery disease. Life Sci. 15 de agosto de 2019;231:116510.

307.Goikuria H, Vandenbroeck K, Alloza I. Inflammation in human carotid atheroma plaques. Cytokine Growth Factor Rev. febrero de 2018;39:62-70.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

308.González-Gay MA, González-Juanatey C. Inflammation: NSAIDs and cardiovascular risk in arthritis. Nat Rev Cardiol. febrero de 2017;14(2):69-70.

309.Perrucci GL, Gowran A, Zanobini M, Capogrossi MC, Pompilio G, Nigro P. Peptidyl-prolyl isomerases: a full cast of critical actors in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res. 1 de junio de 2015;106(3):353-64.

310.Fujimoto K, Chen Y, Polonsky KS, Dorn GW. Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances beta-cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 1 de junio de 2010;107(22):10214-9.

311.Ramachandran S, Venugopal A, Kutty VR, A V, G D, Chitrasree V, et al. Plasma level of cyclophilin A is increased in patients with type 2 diabetes mellitus and suggests presence of vascular disease. Cardiovasc Diabetol. 7 de febrero de 2014;13:38.

312.McClements L, Annett S, Yakkundi A, Robson T. The Role of Peptidyl Prolyl Isomerases in Aging and Vascular Diseases. Curr Mol Pharmacol. 2015;9(2):165-79.

313.Zhang H, Fan Q, Xie H, Lu L, Tao R, Wang F, et al. Elevated Serum Cyclophilin B Levels Are Associated with the Prevalence and Severity of Metabolic Syndrome. Front Endocrinol. 2017;8:360.

314.Satoh K. Cyclophilin A in cardiovascular homeostasis and diseases. Tohoku J Exp Med. enero de 2015;235(1):1-15.

315.Stocki P, Chapman DC, Beach LA, Williams DB. Depletion of cyclophilins B and C leads to dysregulation of endoplasmic reticulum redox homeostasis. J Biol Chem. 15 de agosto de 2014;289(33):23086-96.

316.von Ungern-Sternberg SNI, Zernecke A, Seizer P. Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer EMMPRIN (CD147) in Cardiovascular Disease. Int J Mol Sci. 8 de febrero de 2018;19(2):E507.

317.Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, et al. Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. Brain Res. 23 de junio de 2011;1397:55-65.

318.Hausenloy DJ, Lim SY, Ong SG, Davidson SM, Yellon DM. Mitochondrial cyclophilin-D as a critical mediator of ischaemic preconditioning. Cardiovasc Res. 1 de octubre de 2010;88(1):67-74.

319.Pottecher J, Guillot M, Belaidi E, Charles AL, Lejay A, Gharib A, et al. Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. J Vasc Surg. abril de 2013;57(4):1100-1108.e2.

320.Devalaraja-Narashimha K, Diener AM, Padanilam BJ. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury. Am J Physiol Renal Physiol. septiembre de 2009;297(3):F749-759.

321.Li J, Yan Z, Fang Q. A Mechanism Study Underlying the Protective Effects of Cyclosporine-A on Lung Ischemia-Reperfusion Injury. Pharmacology. 2017;100(1-2):83-90.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

322.Hokari M, Kuroda S, Iwasaki Y. Pretreatment with the ciclosporin derivative NIM811 reduces delayed neuronal death in the hippocampus after transient forebrain ischaemia. J Pharm Pharmacol. abril de 2010;62(4):485-90.

323.Ohtsuki T, Satoh K, Omura J, Kikuchi N, Satoh T, Kurosawa R, et al. Prognostic Impacts of Plasma Levels of Cyclophilin A in Patients With Coronary Artery Disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. abril de 2017;37(4):685-93.

324.Hoffmann H, Schiene-Fischer C. Functional aspects of extracellular cyclophilins. Biol Chem. julio de 2014;395(7-8):721-35.

325.Bukrinsky M. Extracellular cyclophilins in health and disease. Biochim Biophys Acta. octubre de 2015;1850(10):2087-95.

326.Satoh K, Fukumoto Y, Sugimura K, Miura Y, Aoki T, Nochioka K, et al. Plasma cyclophilin A is a novel biomarker for coronary artery disease. Circ J Off J Jpn Circ Soc. 2013;77(2):447-55.

327.Liu X, Du H, Chai Q, Jia Q, Liu L, Zhao M, et al. Blocking mitochondrial cyclophilin D ameliorates TSH-impaired defensive barrier of artery. Redox Biol. mayo de 2018;15:418-34.

328.Singh K, Winter M, Zouhar M, Ryšánek P. Cyclophilins: Less Studied Proteins with Critical Roles in Pathogenesis. Phytopathology. enero de 2018;108(1):6-14.

329.Goodson N, Marks J, Lunt M, Symmons D. Cardiovascular admissions and mortality in an inception cohort of patients with rheumatoid arthritis with onset in the 1980s and 1990s. Ann Rheum Dis. noviembre de 2005;64(11):1595-601.

330.Xue C, Sowden MP, Berk BC. Extracellular and Intracellular Cyclophilin A, Native and Post-Translationally Modified, Show Diverse and Specific Pathological Roles in Diseases. Arterioscler Thromb Vasc Biol. mayo de 2018;38(5):986-93.

331.Cheng F, Yuan W, Cao M, Chen R, Wu X, Yan J. Cyclophilin A Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation-Induced Apoptosis via the AKT/Nox2 Pathway. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:2717986.

332.Ramachandran S, Vinitha A, Kartha CC. Cyclophilin A enhances macrophage differentiation and lipid uptake in high glucose conditions: a cellular mechanism for accelerated macro vascular disease in diabetes mellitus. Cardiovasc Diabetol. 3 de noviembre de 2016;15(1):152.

333.Anandan V, Thankayyan Retnabai SK, Jaleel A, Thulaseedharan T, Mullasari A, Pillai MR, et al. Cyclophilin A induces macrophage apoptosis and enhances atherosclerotic lesions in high-fat diet-fed hyperglycemic rabbits. FASEB BioAdvances. mayo de 2021;3(5):305-22.

334.Anandan V, Thulaseedharan T, Suresh Kumar A, Chandran Latha K, Revikumar A, Mullasari A, et al. Cyclophilin A Impairs Efferocytosis and Accelerates Atherosclerosis by Overexpressing CD 47 and Down-Regulating Calreticulin. Cells. 20 de diciembre de 2021;10(12):3598.

335.Rurali E, Pilato CA, Perrucci GL, Scopece A, Stadiotti I, Moschetta D, et al. Cyclophilin A in Arrhythmogenic Cardiomyopathy Cardiac Remodeling. Int J Mol Sci. 15 de mayo de 2019;20(10):E2403.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

336.Shimizu T, Imai H, Seki K, Tomizawa S, Nakamura M, Honda F, et al. Cyclophilin C-associated protein and cyclophilin C mRNA are upregulated in penumbral neurons and microglia after focal cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab. marzo de 2005;25(3):325-37.

337.Porter GA, Beutner G. Cyclophilin D, Somehow a Master Regulator of Mitochondrial Function. Biomolecules. 14 de diciembre de 2018;8(4):E176.

338.Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. N Engl J Med. 31 de julio de 2008;359(5):473-81.

339.Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. N Engl J Med. 10 de septiembre de 2015;373(11):1021-31.

340.Collet JP, Thiele H, Barbato E, Barthélémy O, Bauersachs J, Bhatt DL, et al. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. Eur Heart J. 7 de abril de 2021;42(14):1289-367.

341.Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). Eur Heart J. 7 de enero de 2018;39(2):119-77.

342.Williams B, Mancia G, Spiering W, Agabiti Rosei E, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. Eur Heart J. 1 de septiembre de 2018;39(33):3021-104.

343.Uno H, Cai T, Pencina MJ, D'Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. Stat Med. 10 de mayo de 2011;30(10):1105-17.

344.Kumari S, Roy S, Singh P, Singla-Pareek SL, Pareek A. Cyclophilins: proteins in search of function. Plant Signal Behav. enero de 2013;8(1):e22734.

345.Harikishore A, Yoon HS. Immunophilins: Structures, Mechanisms and Ligands. Curr Mol Pharmacol. 2015;9(1):37-47.

346.Satoh K, Shimokawa H, Berk BC. Cyclophilin A: promising new target in cardiovascular therapy. Circ J Off J Jpn Circ Soc. noviembre de 2010;74(11):2249-56.

347.Satoh K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Rho-kinase: important new therapeutic target in cardiovascular diseases. Am J Physiol Heart Circ Physiol. agosto de 2011;301(2):H287-296.

348.Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, Kislinger T, Belton O, McRedmond JP, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. Blood. 15 de marzo de 2004;103(6):2096-104.

349.Schmidt R, Bültmann A, Fischel S, Gillitzer A, Cullen P, Walch A, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) is a novel receptor on platelets, activates platelets,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and augments nuclear factor kappaB-dependent inflammation in monocytes. Circ Res. 15 de febrero de 2008;102(3):302-9.

350.Tang FC, Wang HY, Ma MM, Guan TW, Pan L, Yao DC, et al. Simvastatin attenuated rat thoracic aorta remodeling by decreasing ROCK2-mediated CyPA secretion and CD147-ERK1/2-cyclin pathway. Mol Med Rep. diciembre de 2017;16(6):8123-9.

351.Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, Matoba T, Berk BC. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells. Circ Res. 31 de marzo de 2006;98(6):811-7.

352.Zuern CS, Müller KAL, Seizer P, Geisler T, Banya W, Klingel K, et al. Cyclophilin A predicts clinical outcome in patients with congestive heart failure undergoing endomyocardial biopsy. Eur J Heart Fail. febrero de 2013;15(2):176-84.

353.Manaswini N, Sreedevi NN, Thummala S, Saibaba KSS, Mohammed N, Satish OS. Association of Serum Cyclophilin A Levels with Severity of Coronary Artery Disease. J Lab Physicians. septiembre de 2022;14(3):253-9.

354.Seizer P, Fuchs C, Ungern-Sternberg SNIV, Heinzmann D, Langer H, Gawaz M, et al. Platelet-bound cyclophilin A in patients with stable coronary artery disease and acute myocardial infarction. Platelets. 2016;27(2):155-8.

355.Ebrahim HF, Abdel Hamid FF, Haykal MA, Soliman AF. Cyclophilin A and matrix metalloproteinase-9: Their relationship, association with, and diagnostic relevance in stable coronary artery disease. Vascular. abril de 2020;28(2):212-21.

356.Rath D, von Ungern-Sternberg S, Heinzmann D, Sigle M, Monzien M, Horstmann K, et al. Platelet surface expression of cyclophilin A is associated with increased mortality in patients with symptomatic coronary artery disease. J Thromb Haemost JTH. enero de 2020;18(1):234-42.

357.Liao DF, Jin ZG, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. 7 de enero de 2000;275(1):189-96.

358.Kato M, Akao M, Matsumoto-Ida M, Makiyama T, Iguchi M, Takeda T, et al. The targeting of cyclophilin D by RNAi as a novel cardioprotective therapy: evidence from two-photon imaging. Cardiovasc Res. 15 de julio de 2009;83(2):335-44.

359.Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. J Mol Cell Cardiol. enero de 2015;78:80-9.

360.Motawea KR, Elhalag RH, Rouzan SS, Talat NE, Reyad SM, Chébl P, et al. Cyclophilin C as a novel diagnostic and prognostic biomarker of Coronary artery diseases. A Systematic review and Meta-analysis. Curr Probl Cardiol. 18 de mayo de 2023;101812.

361.Fang F, Flegler AJ, Du P, Lin S, Clevenger CV. Expression of cyclophilin B is associated with malignant progression and regulation of genes implicated in the pathogenesis of breast cancer. Am J Pathol. enero de 2009;174(1):297-308.

362.Schofer N, Ludwig S, Rübsamen N, Schnabel R, Lackner KJ, Ruprecht HJ, et al. Prognostic impact of Interleukin-1 receptor antagonist in patients with documented coronary artery disease. Int J Cardiol. 15 de abril de 2018;257:24-9.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

363.Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, Sarwar N, Wood A, Angleman SB, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. PLoS Med. 8 de abril de 2008;5(4):e78.

364.Walter J, Tanglay Y, du Fay de Lavallaz J, Strebel I, Boeddinghaus J, Twerenbold R, et al. Clinical utility of circulating interleukin-6 concentrations in the detection of functionally relevant coronary artery disease. Int J Cardiol. 15 de enero de 2019;275:20-5.

365.Bartekova M, Radosinska J, Jelemensky M, Dhalla NS. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. Heart Fail Rev. septiembre de 2018;23(5):733-58.

366.Johnson JL. Metalloproteinases in atherosclerosis. Eur J Pharmacol. 5 de diciembre de 2017;816:93-106.

367.Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol. 2001;17:463-516.

368.Welsh P, Whincup PH, Papacosta O, Wannamethee SG, Lennon L, Thomson A, et al. Serum matrix metalloproteinase-9 and coronary heart disease: a prospective study in middle-aged men. QJM Mon J Assoc Physicians. octubre de 2008;101(10):785-91.

369.Dogan A, Tuzun N, Turker Y, Akcay S, Kaya S, Ozaydin M. Matrix metalloproteinases and inflammatory markers in coronary artery ectasia: their relationship to severity of coronary artery ectasia. Coron Artery Dis. diciembre de 2008;19(8):559-63.

370.Seizer P, Gawaz M, May AE. Cyclophilin A and EMMPRIN (CD147) in cardiovascular diseases. Cardiovasc Res. 1 de abril de 2014;102(1):17-23.

371.Zeng B, Prasan A, Fung KC, Solanki V, Bruce D, Freedman SB, et al. Elevated circulating levels of matrix metalloproteinase-9 and -2 in patients with symptomatic coronary artery disease. Intern Med J. junio de 2005;35(6):331-5.

372.Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. Int J Mol Sci. 31 de mayo de 2020;21(11):3946.

373.Shi Y, Zhang J, Tan C, Xu W, Sun Q, Li J. Matrix Metalloproteinase-2 Polymorphisms and Incident Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis. Medicine (Baltimore). julio de 2015;94(27):e824.

374.Dahi S, Karliner JS, Sarkar R, Lovett DH. Transgenic expression of matrix metalloproteinase-2 induces coronary artery ectasia. Int J Exp Pathol. febrero de 2011;92(1):50-6.

375.Leon MLA, Zuckerman SH. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al. octubre de 2005;54(10):395-411.

376.Wang Y, Bai Y, Qin L, Zhang P, Yi T, Teesdale SA, et al. Interferon-gamma induces human vascular smooth muscle cell proliferation and intimal expansion by phosphatidylinositol 3-kinase dependent mammalian target of rapamycin raptor complex 1 activation. Circ Res. 14 de septiembre de 2007;101(6):560-9.

377.Tellides G, Pober JS. Interferon-gamma axis in graft arteriosclerosis. Circ Res. 16 de marzo de 2007;100(5):622-32.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

378.Li J jun. Inflammatory response, drug-eluting stent and restenosis. Chin Med J (Engl). 20 de marzo de 2008;121(6):566-72.

379.Xing Y, Guo JT, Gai LY, Liu B, Luo DL. Association of Uric Acid and C-reactive Protein with the Severity of Coronary Artery Disease Using SYNTAX Score and Clinical SYNTAX Score. Heart Surg Forum. 3 de junio de 2019;22(3):E247-52.

380.Karadeniz M, Duran M, Akyel A, Yarlıoğlueş M, Öcek AH, Çelik İE, et al. High Sensitive CRP Level Is Associated With Intermediate and High Syntax Score in Patients With Acute Coronary Syndrome. Int Heart J. 2015;56(4):377-80.

381.Hjort M, Eggers KM, Lakic TG, Lindbäck J, Budaj A, Cornel JH, et al. Biomarker Concentrations and Their Temporal Changes in Patients With Myocardial Infarction and Nonobstructive Compared With Obstructive Coronary Arteries: Results From the PLATO Trial. J Am Heart Assoc. 3 de enero de 2023;12(1):e027466.

382.Feistritzer HJ, Reinstadler SJ, Klug G, Reindl M, Wöhrer S, Brenner C, et al. Multimarker approach for the prediction of microvascular obstruction after acute ST-segment elevation myocardial infarction: a prospective, observational study. BMC Cardiovasc Disord. 28 de noviembre de 2016;16(1):239.

383.Oluleye OW, Folsom AR, Nambi V, Lutsey PL, Ballantyne CM, ARIC Study Investigators. Troponin T, B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and cause-specific mortality. Ann Epidemiol. febrero de 2013;23(2):66-73.

384.Mishra RK, Beatty AL, Jaganath R, Regan M, Wu AHB, Whooley MA. B-type natriuretic peptides for the prediction of cardiovascular events in patients with stable coronary heart disease: the Heart and Soul Study. J Am Heart Assoc. 22 de julio de 2014;3(4):e000907.

385.Nikorowitsch J, Ojeda F, Lackner KJ, Schnabel RB, Blankenberg S, Zeller T, et al. Head-to-Head Comparison of the Incremental Predictive Value of The Three Established Risk Markers, Hs-troponin I, C-Reactive Protein, and NT-proBNP, in Coronary Artery Disease. Biomolecules. 4 de marzo de 2020;10(3):394.

386.Kotecha D, Flather MD, Atar D, Collins P, Pepper J, Jenkins E, et al. B-type natriuretic peptide trumps other prognostic markers in patients assessed for coronary disease. BMC Med. 3 de abril de 2019;17(1):72.

387.Lepojärvi ES, Huikuri HV, Piira OP, Kiviniemi AM, Miettinen JA, Kenttä T, et al. Biomarkers as predictors of sudden cardiac death in coronary artery disease patients with preserved left ventricular function (ARTEMIS study). PloS One. 2018;13(9):e0203363.

388.Bay B, Goßling A, Blaum CM, Kroeger F, Koppe L, Lorenz T, et al. Association of High-Sensitivity Troponin T and I Blood Concentrations With All-Cause Mortality and Cardiovascular Outcome in Stable Patients-Results From the INTERCATH Cohort. J Am Heart Assoc. 6 de septiembre de 2022;11(17):e024516.

389.Peikert A, Kaier K, Merz J, Manhart L, Schäfer I, Hilgendorf I, et al. Residual inflammatory risk in coronary heart disease: incidence of elevated high-sensitive CRP in a real-world cohort. Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc. marzo de 2020;109(3):315-23.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8.- ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO I. DECLARACIONES

ASPECTOS ÉTICOS Y DE BUENA CONDUCTA EN LA INVESTIGACIÓN CLÍNICA

El doctorando declara que esta tesis doctoral se llevó a cabo siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki y las normas de buenas prácticas (NBP) en investigación del servicio gallego de salud (SERGAS). Todos los pacientes que aceptaron participar dieron su consentimiento y otorgaron el formulario de consentimiento informado firmado por escrito (Ver Anexo II). El Comité Ético de Investigación de Santiago-Lugo aprobó el protocolo de los estudios relacionados con esta tesis doctoral (número de código. 2016/508 y 2019/639) (Ver Anexo III).

CONFLICTOS DE INTERES

El doctorando declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

Fdo.: Jeremías Bayón Lorenzo

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO II. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS

HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares.
INVESTIGADOR *Carlos González Juanatey*
CENTRO: Hospital Universitario Lucus Augusti

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea puede llevar el documento, consultarlo con otras personas y tomarse el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con los profesionales sanitarios que le atienden ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es la finalidad del estudio?

Estudiar si la concentración en sangre de una nueva familia de proteínas llamadas ciclofilinas puede servir como marcador de diagnóstico y prognóstico de enfermedad arterial coronaria.

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque está diagnosticado de enfermedad arterial coronaria o si es grupo control porqué no padece el problema/enfermedad objeto de estudio.

¿En qué consiste mi participación?

Su participación consiste en permitirnos el acceso a su Historia Clínica para recoger los datos necesarios para el estudio. Será tratado siguiendo la práctica clínica habitual, incluida la recopilación de datos clínicos estándar, el examen físico y la extracción de sangre incluidos en su revisión médica.

Se le extraerá una muestra adicional de 5 ml en el momento de la admisión o el chequeo médico junto con los incluidos en la práctica clínica habitual para la medición de Cyps y mediadores inflamatorios en suero sanguíneo.

Su participación tomará un total estimado de 5 minutos en las revisiones del departamento de cardiología de HULA o en el momento de su admisión para tomar una muestra de sangre adicional para el proyecto de investigación.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o dejar de participar. En cualquier caso, se le informará de los motivos de su retiro.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Su participación no implica molestias adicionales a las de la práctica asistencial habitual más allá de la extracción de un tubo adicional de sangre de 5 ml en su revisión habitual.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la implicación de esta familia de proteínas en la enfermedad cardiovascular y validar si tienen o non potencial diagnóstico Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

Información referente a datos/muestras:

La obtención, tratamiento, conservación, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto en el Reglamento General de Protección de Datos (Reglamento UE 2016-679 del Parlamento europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016) y la normativa española sobre protección de datos de carácter personal vigente.

La institución en la que se desarrolla esta investigación es la responsable del tratamiento de sus datos pudiendo contactar con el Delegado/a de Protección de Datos a través de los siguientes medios: correo electrónico delegado.proteccion.datos@sergas.gal

Los datos/muestras necesarios para llevar a cabo este estudio serán recogidos y conservados de modo:

- **Seudonimizados** (Codificados), la seudonimización es el tratamiento de datos personales de manera tal que no pueden atribuirse a un/a interesado/a sin que se use información adicional. En este estudo solamente el equipo investigador conocerá el código que permita saber su identidad.

La normativa que regula el tratamiento de datos de personas, le otorga el derecho a acceder a sus datos, oponerse, corregirlos, cancelarlos, limitar su tratamiento, restringir o solicitar la supresión de los mismos. También puede solicitar una copia de éstos o que ésta sea remitida a un tercero (derecho de portabilidad).

Para ejercer estos derechos puede Ud. dirigirse al Delegado/a de Protección de Datos del centro a través de los medios de contacto antes indicados o al investigador/a principal de este estudio en el correo electrónico: delegado.proteccion.datos@sergas.gal

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Así mismo, Ud. tiene derecho a interponer una reclamación ante la Agencia Española de Protección de Datos, cuando considere que alguno de sus derechos no haya sido respetado.

Únicamente el equipo investigador y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos en el estudio. Se podrá transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información se transmita a otros países, se realizará con un nivel de protección de datos equivalente, como mínimo, al establecido por la normativa española y europea.

Al terminar este estudio, y conforme a la normativa, sus muestras biológicas serán:

- **Destruídas**

Al terminar este estudio, y conforme a la normativa, sus datos serán:

- **Destruídos**

- **Anonimizados**, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra/datos, no pudiendo ser identificada ni siquiera por el equipo investigador.

Usted podrá solicitar la destrución o anonimización de sus datos en cualquier momento, dirigiéndose al investigador principal. Si bien, esto no será de aplicación a los datos resultantes de los análisis que ya hayan sido realizados

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por polo Dr Carlos González Juanatey con fondos aportados por el Instituto de Salud Carlos III

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar. Es posible que de los resultados del estudio o estudios se deriven productos comerciales o patentes; en este caso, Ud. no participará de los beneficios económicos originados.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con Carlos González Juanatey en el teléfono *982296809* y/o correo electrónico Carlos.Gonzalez.Juanatey@sergas.es

Muchas gracias por su colaboración

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO:_ Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares.

Yo, _____

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

***Una vez terminado el estudio*, LOS DATOS recogidos acepto que sean:**

☐ Eliminados.

☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.

Fdo.: El/la participante,	Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento
Nombre y apellidos: _____	Nombre y apellidos: _____
Fecha:	Fecha:

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN *(para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)*

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares.

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- *Se le leyó a _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.*
- *Comprende que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.*

Una vez terminado el estudio, LOS DATOS recogidos acepta que sean

☐ Eliminados.

☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.

Fdo.: El/la testigo	Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento
Nombre y apellidos: _____	Nombre y apellidos: _____
Fecha:	Fecha:

Deberán firmarse tres modelos, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvo la muestra, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares.

Yo, _____ (nombre y apellidos), representante legal de

_____ (nombre y apellidos):

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

Una vez terminado el estudio, LOS DATOS recogidos acepto que sean:

☐ Eliminados.

☐ Anonimizados para usos futuros en otras investigaciones.

Fdo.: El/la representante legal,	Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento
Nombre y apellidos: _____	Nombre y apellidos: _____
Fecha:	Fecha:

Deberán firmarse tres modelos, uno será entregado al participante, otro será conservado en el centro en el que se obtuvo la muestra, y el tercero será conservado por el responsable del estudio de investigación

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXO III. INFORMES COMITÉ DE ÉTICA

INFORMES DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Se adjuntan los informes del Comité de Ética de la Investigación de los dos proyectos en los que se ha enmarcado la presente tesis doctoral en los que se utilizan muestras humanas:

-Proyecto: papel de las ciclofilinas y de sus receptor EMPRIM (CD147) en las enfermedades ateroscleróticas y su modulación con compuestos de origen marino. PI16.01816. **Código de Registro**: 2016/508

-Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares. **Código de Registro**: 2019/639

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 19/12/2016 o estudo:

Título: Papel das ciclofilinas e o seu receptor EMPRIM (CD147) nas enfermidades ateroscleróticas e a súa modulación con compostos de orixe mariño
Promotor: Carlos González Juanatey
Tipo de estudo: Outros
Código de Rexistro: 2016/508

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo **polo/a investigador/a do centro**:

Centros	Investigadores Principais
Hospital Universitari Lucus Augusti	Carlos González Juanatey

En Santiago de Compostela, a 19 de decembro de 2016
O secretario

XUNTA DE GALICIA · SECRETARÍA XERAL TÉCNICA · SECRETARÍA DO COMITÉS DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN · CONSELLERÍA DE SANIDADE

Juan M. Vázquez Lago

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaria Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaria Xeral. Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es

galicia

Juan M. Vázquez Lago, Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo,

FAI CONSTAR QUE:

1. O Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo cumpre tanto na súa composición coma nos seus PNTs os requisitos legais vixentes (R.D 1090/2015 de ensaios clínicos, e a Lei 14/2007 de Investigación Biomédica).

2. A composición actual do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo é:

Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta). Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Juan M. Vázquez Lago (Secretario). Médico especialista en Medicina Preventiva e Saúde Pública. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Francisco Campos Pérez. Investigador. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Daniel De La Iglesia García. Médico especialista en Dixestivo. Área de Xestión Integrada de Santiago.
Ricardo García Martínez. Licenciado en Dereito. Área de Xestión Integrada de Lugo.
Victor Herrán Carreira. Paciente, ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.
María Jesús Lamas Díaz. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.
María Isabel Loza García. Licenciada en Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.
Guillermo José Prada Ramallal. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago. Fundación "Ramón Domínguez". Santiago
Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago.
María Jesús Wandosell Picatoste. Diplomada en Enfermería. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Para que conste onde proceda, e a petición do promotor / investigador, en Santiago de Compostela, a 19 de decembro de 2016.

O Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago Lugo,

XUNTA DE GALICIA SECRETARÍA XERAL TÉCNICA CONSELLERÍA DE SANIDADE

Juan M. Vázquez Lago

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo

galicia

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Ana Estany Gestal, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo,

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 15 de enero de 2020 el estudio**:**

> **Título:** Niveles de ciclofilinas como biomarcadores de enfermedad coronaria (CAD). Evaluación de inhibidores específicos de ciclofilinas como protectores cardiovasculares.
> **Versión:** 1.0
> **Promotor/a**: Carlos González Juanatey, María Amparo Alfonso Rancaño
> **Investigador/a:** Carlos González Juanatey
> **Código de Registro**: 2019/639

Y que este Comité, tomando en consideración la pertinencia del estudio, el conocimiento disponible, los requisitos legales aplicables y los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité, emite un dictamen **FAVORABLE** para la realización del citado estudio.

NOTA: Se le recuerda que en el caso de que en este estudio se recluten pacientes, el equipo investigador debe tener disponible el Documento de Consentimiento Informado (Hojas de Información y Hojas de Firma) tanto en *galego* como en castellano en el momento de comenzar el reclutamiento.

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Comité de Ética de la Investigación
Santiago Lugo

galicia

Y HACE CONSTAR QUE:

1.- El Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo cumple tanto en su composición como en sus PNTs los requisitos legales vigentes.

2.- La composición actual del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo es:

Presidente
Juan Manuel Vázquez Lago. Médico especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública. Área de Gestión Integrada de Santiago**.**

Vicepresidenta
Pilar Rodríguez Ledo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Secretaria
Ana Estany Gestal. Licenciada en Farmacia. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Secretario Suplente
Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.

Vocales
María José Alfaro Águila-Real. Paciente experta. Lugo
Francisco Campos Pérez. Biólogo. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica de Atención Primaria. Área de Gestión Integrada de Santiago.
Ricardo García Martínez. Licenciado en Derecho. Área de Gestión Integrada de Lugo.
Jaime Gulín Dávila. Farmacéutico especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Gestión Integrada de Lugo.
Guillermo José Prada Ramallal Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago. Fundación Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.
Jesús Prego Domínguez. Enfermero. Área de Gestión Integrada de Santiago.
María Mercedes Rodicio García. Médico especialista en Pediatría. Área de Gestión Integrada de Lugo.
Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacología Clínica. Área de Gestión Integrada de Santiago.
Sandra Vidal Martínez. Enfermera. Área de Gestión Integrada de Santiago

Para que conste donde proceda, y a petición de quien proceda, en Santiago de Compostela,

La Secretaria del Comité Territorial de Ética de la Investigación de Santiago Lugo,

Xacobeo 2021

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

La enfermedad arterial coronaria es la principal causa de muerte en países occidentales y la infamación juega un papel fundamental en su patogénesis, cobrando las cicloflinas protagonismo en los últimos años como moléculas implicadas. Por lo tanto, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es explorar el perfl de cicloflinas (CypA, CypB, CypC y CypD) y de marcadores de infamación, en pacientes con enfermedad arterial coronaria aguda y crónica, con/sin factores de riesgo, con el fin de establecer nuevos biomarcadores relacionados con la aterosclerosis. Además, se han seguido a los pacientes durante 12 meses para evaluar la capacidad diagnóstica de las cicloflinas a lo largo de tiempo. Finalmente, se ha estudiado la relación de las ciclofilinas con los factores de riesgo cardiovascular clásicos.