



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA

“P53, UN NUEVO MARCADOR TISULAR
DE INESTABILIDAD DE PLACA
ATEROSCLEROSA CORONARIA”

TESIS DE POSTGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO EN LA ESPECIALIDAD DE:

CARDIOLOGÍA

P R E S E N T A :

DR. MOISÉS EMILIO SANTOS GONZÁLEZ

ASESOR DE TESIS :
DR. EUGENIO RUESGA ZAMORA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

[Handwritten signature]



HOSPITAL DE CARDIOLOGIA
C.M.N. SIGLO XXI
DIV DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION.

Dr. Rubén Argüero Sánchez
Director del Hospital de Cardiología
CMN Siglo XXI



HOSPITAL DE CARDIOLOGIA
C.M.N. SIGLO XXI
DIV DE ENSEÑANZA E
INVESTIGACION

Dr. Juan Carlos Necochea Alva
Jefe de la División de Educación e Investigación



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U. N. A. M.

Dr. Alonso Peña González
Subjefe de la División de Educación e Investigación Médica

[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

Dr. Rodolfo Castaño Guerra
Profesor Titular del Curso de Cardiología

[Handwritten signature]

Dr. Eugenio Ruesga Zamora
Asesor de Tesis

Dr. Moisés Emilio Santos González
Autor de Tesis de Especialidad

AGRADECIMIENTOS:

A MIS PADRES POR SER SOPORTE A LA DISTANCIA.

A ADRIANA CAROLA MI AIRE Y MI YO MISMO EN OTRA PERSONA.

A MIS HERMANOS DE QUIENES HE APRENDIDO LO QUE UNE LA SANGRE.

AL E.Z.L.N. POR EXISTIR Y RESISTIR.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE.

Página.

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.	2
OBJETIVO.	5
HIPÓTESIS.	5
MATERIAL Y MÉTODOS	6
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	7
RESULTADOS.	8
CONCLUSIONES.	9
LIMITACIONES.	9
APÉNDICE.	10
BIBLIOGRAFÍA.	16

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN.

OBJETIVO:

El objetivo del presente estudio es determinar la presencia de p53 en placas de aterosclerosis de arterias coronarias relacionadas al infarto y compararlas con placas de arterias coronarias no relacionadas al infarto siendo tomadas del mismo corazón.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Se estudiaron 13 corazones de pacientes fallecidos por infarto agudo del miocardio. De cada corazón se obtuvo un corte representativo de la placa aterosclerosa de la arteria coronaria relacionada al infarto y otro de una placa aterosclerosa en otra arteria coronaria, teniendo así 26 muestras al ser el paciente su propio grupo control.

Las muestras de arterias coronarias se fijaron en formol al 10% y se procesaron para inclusión y corte en parafina. Se realizaron cortes seriados de 8 μ m de espesor. Para la identificación de p53 los cortes se incubaron en un anticuerpo primario de ratón específico para p53 de humano (DAKO) diluido 1:100 en PBS, durante 18 h a 4 °C;

. Los controles positivos de la inmunohistoquímica fueron cortes de carcinoma mamario procesados de la misma manera.

El criterio para considerar positiva a una célula fue que presentara tinción nuclear de color café y que tuviera elementos estructurales para identificarla. La observación se realizó por un biólogo del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Universidad Nacional Autónoma de México, ciego al origen de las arterias, con un microscopio fotónico Olympus.

Se obtuvo del expediente clínico de los pacientes los siguientes parámetros: Sexo, edad, antecedentes de Tabaquismo, Hipertensión Arterial Sistémica, Diabetes y Dislipidemia.

Se analizó la positividad de la célula a p53, su localización dentro de la placa de ateroma, que tipo celular es el positivo, y si es intra o extranuclear. Se cuantificó además el Número de células (+) por campo estudiado.

RESULTADOS:

De los 8 cortes negativos 6 correspondieron a placa relacionada al infarto y 2 a placas no relacionadas con el infarto.

De los 18 cortes positivos, 12 se encontraron en el citoplasma de las cuales 4 se encontraron en placas relacionadas con el infarto y 8 en placas no relacionadas con el infarto; 6 en el núcleo celular de las cuales 5 se encontraron en placas relacionadas con el infarto y 1 en placa no relacionada con el infarto. Se obtuvo así una chi cuadrada no corregida de 3.47 con valor de p 0.0626 y por corrección de Yates una chi cuadrada de 1.95 con valor de p 0.162. La prueba exacta de Fisher mostró una p de 0.080.



INTRODUCCIÓN

La apoptosis es una forma de muerte celular genéticamente programada, en donde por un estímulo durante el desarrollo o un estímulo ambiental, activa un programa genético para implementar una serie específica de eventos que culminan en la muerte y eliminación eficiente de una célula ^(1,2). Está regulado por la acción e interacción de genes específicos y juega un papel importantísimo en la regulación de la celularidad de la pared arterial, estabilidad de la estructura de la pared, y el metabolismo.

Su investigación se ha centrado a los modelos inmunológicos, neuronales y las células tumorales ^(3,4,5). Claramente todos los tejidos tienen diferentes características, sugiriendo que aunque las células pueden expresar genes similares, los efectos de éstos genes pueden ser diferentes entre diversos tipos celulares ^(6,7). El gen que se ha demostrado que participa activamente en la regulación de la apoptosis es el p53 ^(8,9,10,11).

Las células vasculares tienen sus propias señales tanto exógenas como endógenas que determinan la diferenciación, proliferación y apoptosis. Muchos factores biofisiológicos y bioquímicos incluyendo fuerzas mecánicas, reacción al oxígeno, citoquinas, factores de crecimiento, lipoproteínas oxidadas, entre otras, pueden influir en la apoptosis de células vasculares ^(12,13). Diversas moléculas como las caspasas, ligandinas o proteínas, pueden activar las lesiones aterosclerosas e inducir apoptosis favoreciendo con ello la inestabilidad de la placa de aterosclerosis coronario. Disfunción o expresión anormal de estos genes reguladores pueden atenuar o acelerar la apoptosis y afectar la integridad y estabilidad de las placas ^(14,15,16). La apoptosis equilibra el efecto de proliferación celular, por ello las alteraciones de su regulación favorece el desarrollo de varias enfermedades ⁽²⁾.

Existen estudios recientes que muestran que ocurre apoptosis de las células de músculo liso vascular en placas aterosclerosas humanas particularmente en áreas susceptibles a la ruptura promoviendo con ello la inestabilidad de la placa y el subsecuente infarto del miocardio, de ahí que este proceso tiene un papel importante en la proliferación excesiva de la íntima y media de los vasos que conducen a inestabilidad de placa o bien a reestenosis posterior a procedimientos intervencionistas ^(4,16).

Aunque las vías que controlan la apoptosis de células de músculo liso vascular se desconocen, en cultivos de tejido de éstas células se ha demostrado mayor grado de apoptosis en vasos con aterosclerosis, en comparación a los sanos ⁽¹⁸⁾.

En múltiples estudios se ha demostrado que el gen p 53 regula la apoptosis y proliferación de células de músculo liso vascular en placas aterosclerosas.

El gen p53 humano se conoce como el gen supresor tumoral; codifica una fosfoproteína de 393 aminoácidos que es lo que se denomina proteína p53, que interactúa con varias proteínas celulares y virales ^(19,20,21). El gen p53 es el más comúnmente mutado en el cáncer de seres humanos. Su función normal es detener el ciclo celular en respuesta al daño irreversible del DNA. Funcionalmente tiene tres sitios de dominio: (1) El dominio

transcripcional terminal N, (2) El dominio regulatorio terminal C, y (3) El dominio de unión central al DNA. Funcionalmente como un homotetrámero o un complejo de tetrámeros el p53 puede unirse a la cadena trenzada de DNA pudiendo reestablecer y activar enzimas en el sitio de daño del mismo, promoviendo su realineamiento. El p53 es continuamente sintetizado por la célula vascular, tiene una vida media corta por su interacción con el gen MDM2 ^(19,22,23), con quien se regula por un mecanismo de retroalimentación negativa ^(24,25)

Se desconoce como detecta el p53 el daño en el DNA, sin embargo, múltiples evidencias sugieren que es a través de las protein-quinasas activadas por el DNA dañado ^(19,26).

Cuando el DNA se daña, las células reaccionan rápidamente deteniendo la división celular e intentando reparar el daño. El cese del ciclo celular es generado en parte por el p53, con esto, si el daño del DNA es sostenido o demasiado grande para repararlo el p53 inicia la apoptosis. Una mutación o un retardo del p53 puede bloquear "la maquinaria de censado" de daño del DNA haciendo con ello que la célula pueda acumular un DNA dañado durante una replicación normal, por lo tanto, la función del p53 es crítica para mantener una regulación del ciclo celular normal o iniciar la apoptosis en presencia de un ciclo celular anormal ^(19,27). Las señales que inducen a la presencia de p53 en células de músculo liso vascular de placas aterosclerosas son desconocidas. Dentro de la placa, linfocitos T activados y macrófagos secretan citoquinas proinflamatorias incluyendo interleucina 1beta, factor de necrosis tumoral alfa e interferón gamma los cuales en combinación han demostrado que modifican la secreción de óxido nítrico. Diferentes concentraciones de óxido nítrico pueden aumentar o disminuir al p53 unido al DNA y de este modo la activación transcripcional de la apoptosis. Aunque una combinación de citoquinas u óxido nítrico pueden estabilizar al p53 in vitro es incierto si tal combinación existe en suficientes cantidades para estabilizar al p53 en placas aterosclerosas in vivo ^(14,28).

Los macrófagos subendoteliales son un componente celular muy importante de las lesiones aterosclerosas generando las células espumosas con sus efectos físicos ya conocidos tales como el engrosamiento de la íntima, y efectos biológicos tales como el depósito de lipoproteínas y secreción de moléculas biológicamente activas ^(29,30,31).

Se ha demostrado que la aterosclerosis se puede disminuir alterando al macrófago o bien disminuyendo la quimiotaxis de los monocitos.

Existen diversas publicaciones en donde se muestra que el proceso de muerte del macrófago es por apoptosis. Esta apoptosis puede preceder lo que frecuentemente llamamos necrosis y no siempre previene la liberación de contenidos celulares de las células que están muriendo. Un cuerpo apoptoico es el resto de la célula que se autodestruyó, y su fagocitosis puede inhibirse por la presencia de lipoproteínas oxidadas y lípidos en lesiones aterosclerosas ⁽³¹⁾. Así la apoptosis de macrófagos particularmente en lesiones avanzadas puede contribuir a la patología de la lesión aterosclerosa permitiendo con ello la liberación de moléculas peligrosas. Para dirigir éstas hipótesis in vivo, diversos investigadores han iniciado la manipulación genética de moléculas específicas que involucran a la proliferación celular o apoptosis en modelos de ratones ^(32,33). No es sorprendente que el p53 ha sido una de las primeras moléculas examinadas en éste campo. Niveles elevados de p53 favorecen las respuestas antiproliferativas y proapoptoicas por : a) una combinación de activación de genes como el p21 WAF, b) represión de genes (IGF II) y c) Interacción proteína-proteína directa (helicinas y caspasas) ^(11,19,23).

El p 53 se ha utilizado desde los 90^{as} como una herramienta diagnóstica y pronóstica en carcinoma de mama, de hígado, así mismo está bien establecido su efecto a través de la perturbación de la estructura nuclear y su función^(24,34).

En 1999 Tanaka publicó que podría haber una relación entre el citomegalovirus humano y el gen supresor de tumores p53 en el desarrollo de estenosis coronaria ya que la presencia de dicho virus pudiera acelerar la degradación del p53⁽³⁵⁾, así mismo describe el papel de los protooncogenes en la reestenosis coronaria en donde el daño arterial resulta en exposición de células de músculo liso y fibroblastos de adventicia a factores de crecimiento que se unen a receptores de superficie celular específicos, esto activa segundos mensajeros, e induce una expresión de genes inmediatos.^(18,21) Estos factores regulan la transducción de señales, la progresión del ciclo celular, y la muerte celular programada. Nuevas estrategias de tratamiento incluirían: a) la inhibición de la expresión de protooncogenes como lo son éstas proteínas, b) el uso de terapias farmacológicas para bloquear niveles específicos del ciclo de progresión celular. De ahí la importancia de éstas proteínas.

En 1999 Wang publica que algunos miembros del factor de necrosis tumoral que son receptores de superficie celular vascular, iniciaban la apoptosis en determinadas células conteniendo p53⁽³⁶⁾. Guevara es el autor del primer estudio in vivo que analizó el papel del p53 en la aterosclerosis. Analizó esta proteína en ratones con aterosclerosis. Los fibroblastos de éstos ratones presentaron mayor proliferación celular comparados con ratones no ateroscleróticos. El análisis de aorta demostró la presencia de lesiones abultadas e hipercelulares en ratones p53 negativos. Utilizaron además análisis para detectar células apoptoicas, los autores encontraron una muy baja frecuencia de células positivas, concluyendo que el papel del p53 en las lesiones ateroscleróticas se debe a un aumento de la proliferación y no disminución de la apoptosis contribuyen a una lesión mas grande e hipercelular^(37,38).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es determinar la presencia de p53 en placas de aterosclerosis de arterias coronarias relacionadas al infarto y compararlo con placas de arterias coronarias no relacionadas al infarto siendo tomadas del mismo corazón.

HIPÓTESIS

Ho: El gene p53 se encuentra presente en placas de aterosclerosis coronaria responsables de infarto del miocardio que desencadenó la muerte del paciente.

H1: El gene p53 no se encuentra presente en placas de aterosclerosis coronaria responsables de infarto del miocardio que desencadenó la muerte del paciente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO

El objetivo del presente estudio es determinar la presencia de p53 en placas de aterosclerosis de arterias coronarias relacionadas al infarto y compararlo con placas de arterias coronarias no relacionadas al infarto siendo tomadas del mismo corazón.

HIPÓTESIS

Ho: El gene p53 se encuentra presente en placas de aterosclerosis coronaria responsables de infarto del miocardio que desencadenó la muerte del paciente.

H1: El gene p53 no se encuentra presente en placas de aterosclerosis coronaria responsables de infarto del miocardio que desencadenó la muerte del paciente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y METODOS.

Se estudiaron 13 corazones de pacientes fallecidos por infarto agudo del miocardio. De cada corazón se obtuvo un corte representativo de la placa aterosclerosa de la arteria coronaria relacionada al infarto y otro de una placa aterosclerosa en otra arteria coronaria, teniendo así 26 muestras al ser el paciente su propio grupo control.

Las muestras de arterias coronarias se fijaron en formol al 10% y se procesaron para inclusión y corte en parafina.

Se realizaron cortes seriados de 8 μ m de espesor, adheridos a portaobjetos cargados positivamente; los cortes 1, 5, 10 y 15 se utilizaron para inmunohistoquímica, los cortes 2, 6, 11 y 14 se tiñeron con hematoxilina y eosina y los cortes 3, 7, 9 y 13 con tricrómica de Masson. Para la inmunohistoquímica, los cortes se desparafinaron en xilol absoluto (3 cambios de 5 minutos cada uno) y rehidratados en etanol de gradación decreciente hasta agua destilada. Para la recuperación antigénica, los cortes se sumergen en amortiguador de citrato de sodio 10mM (pH 6.0) en vaso de coplin e introducidos en una olla de presión que contenía 1 litro de agua y colocada en una platina térmica a la máxima temperatura durante 20 minutos y luego a temperatura intermedia durante 10 minutos más. Posteriormente se deja escapar el vapor por la válvula, y se abre la olla de presión para dejar que los cortes se enfríen durante 10 minutos y luego se transfirieren a una solución salina de fosfatos (PBS) (pH 7.2) durante 5 min. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realiza con peróxido de hidrógeno al 1% en agua destilada durante 10 minutos y para bloquear sitios inespecíficos se utilizó albúmina sérica bovina al 1% en PBS con tritón X-100 al 0.01% durante 1 h a temperatura ambiente.

Para la identificación de p53 los cortes se incubaron en un anticuerpo primario de ratón específico para p53 de humano (DAKO) diluido 1:100 en PBS, durante 18 h a 4 °C; después de tres lavados con PBS, los cortes se incubaron en un anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-IgG de ratón (ZYMED) sin diluir, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se incubaron en el complejo avidina-peroxidasa durante 30 minutos, el cual se revela con diaminobencidina de acuerdo a los lineamientos del proveedor (ZYMED). Todos los cortes se contratiñeron con hematoxilina de Harris durante 45 segundos, deshidratados hasta xilol absoluto para montar con resina sintética. Los controles positivos de la inmunohistoquímica fueron cortes de carcinoma mamario procesados de la misma manera.

El criterio para considerar positiva a una célula fue que presentara tinción nuclear de color café y que tuviera elementos estructurales para identificarla. La observación se realizó por un biólogo del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Universidad Nacional

Autónoma de México, ciego al origen de las arterias, con un microscopio fotónico Olympus.

Se obtuvo del expediente clínico de los pacientes los siguientes parámetros: Sexo, edad, antecedentes de Tabaquismo, Hipertensión Arterial Sistémica, Diabetes y Dislipidemia.

Se analizó la positividad de la célula a p53, su localización dentro de la placa de ateroma, que tipo celular es el positivo, y si es intra o extranuclear. Se cuantificó además el Número de células (+) por campo estudiado.

Tomamos una muestra de la placa de ateroma coronario de la arteria responsable del infarto que terminó con la vida del paciente, y otra muestra de ateroma de otra arteria coronaria no relacionada al infarto. Se determinará mediante procesos inmunohistoquímicos la presencia de proteína p53 en las muestras estudiadas.

Esperamos encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de placas.

Queremos demostrar si el p53 es un elemento presente en la aterosclerosis coronaria, en la placa inestable y que probablemente se trate de un detonador de la apoptosis que se lleva a cabo en estos pacientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron 26 placas de aterosclerosis coronaria, 13 con placa relacionada al infarto y 13 con placa no relacionada al infarto. Se utilizó el método de Chi cuadrada simple y con corrección de Yates, así como la prueba exacta de Fisher .

Se consideró una $p < 0.1$ como estadísticamente significativa.

Se utilizó el programa informático Epi Info versión 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Autónoma de México, ciego al origen de las arterias, con un microscopio fotónico Olympus.

Se obtuvo del expediente clínico de los pacientes los siguientes parámetros: Sexo, edad, antecedentes de Tabaquismo, Hipertensión Arterial Sistémica, Diabetes y Dislipidemia.

Se analizó la positividad de la célula a p53, su localización dentro de la placa de ateroma, que tipo celular es el positivo, y si es intra o extranuclear. Se cuantificó además el Número de células (+) por campo estudiado.

Tomamos una muestra de la placa de ateroma coronario de la arteria responsable del infarto que terminó con la vida del paciente, y otra muestra de ateroma de otra arteria coronaria no relacionada al infarto. Se determinará mediante procesos inmunohistoquímicos la presencia de proteína p53 en las muestras estudiadas.

Esperamos encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de placas.

Queremos demostrar si el p53 es un elemento presente en la aterosclerosis coronaria, en la placa inestable y que probablemente se trate de un detonador de la apoptosis que se lleva a cabo en estos pacientes.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron 26 placas de aterosclerosis coronaria, 13 con placa relacionada al infarto y 13 con placa no relacionada al infarto. Se utilizó el método de Chi cuadrada simple y con corrección de Yates, así como la prueba exacta de Fisher .

Se consideró una $p < 0.1$ como estadísticamente significativa.

Se utilizó el programa informático Epi Info versión 6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS :

Del total de corazones estudiados, 9 correspondieron al género masculino y 4 al femenino, con un rango de edad de 60 a 88 años y un promedio de 71 años.

El principal factor de riesgo para aterosclerosis fue Hipertensión Arterial Sistémica en 11 casos, seguido de Tabaquismo en 10 casos, Diabetes en 5 casos e Hipercolesterolemia en 3 casos.

La causa más frecuente de muerte fue choque cardiogénico en 8 casos, seguido de disociación electromecánica en 2 casos. Fibrilación ventricular en 2 casos y ruptura cardíaca en 1.

El tiempo de evolución del Infarto del Miocardio fue de 6 horas a 5 días con un promedio de 25 horas. En relación con la localización del infarto: 8 fueron de la pared anterior (5 anterior extenso y lateral alto; 3 anteroseptales).

Para localizar y determinar la extensión de la placa aterosclerosa se revisaron inicialmente los cortes teñidos con Hematoxilina / Eosina y Masson.

Con respecto al estudio microscópico de los cortes para determinar p53: 18 fueron positivos y 8 fueron negativos.

De los 8 cortes negativos 6 correspondieron a placa relacionada al infarto y 2 a placas no relacionadas con el infarto.

De los 18 cortes positivos, 12 se encontraron en el citoplasma de las cuales 4 se encontraron en placas relacionadas con el infarto y 8 en placas no relacionadas con el infarto; 6 en el núcleo celular de las cuales 5 se encontraron en placas relacionadas con el infarto y 1 en placa no relacionada con el infarto. Se obtuvo así una chi cuadrada no corregida de 3.47 con valor de p 0.0626 y por corrección de Yates una chi cuadrada de 1.95 con valor de p 0.162. La prueba exacta de Fisher mostró una p de 0.080.

El tipo de células positivas para p53 fueron: Linfocitos en 12 casos (6 en placas relacionadas con el infarto y 6 en placas no relacionadas), Macrófagos espumosos y Fibroblastos en 5 casos cada uno (con la misma distribución: 3 en placas relacionadas y 2 en placa no relacionada con el infarto), Células de Músculo Liso en 3 casos (2 en placas relacionadas y 1 en placa no relacionada). De las células positivas para p53 se determinó su ubicación dentro del vaso; se encontraron 9 casos localizados en la íntima (5 en placas relacionadas y 4 en placas no relacionadas), 3 en la túnica media (2 en placas relacionadas y 1 en placa no relacionada) y 10 en la adventicia (4 en placas relacionadas y 6 en placas no relacionadas. 4 casos presentaron positividad en 2 capas vasculares.

CONCLUSIONES:

Los hallazgos de la tinción citoplasmática sugieren que la presencia de p53 es un marcador negativo de inestabilidad de placa aterosclerosa ya que se encontró positividad en el doble de placas no relacionadas con el infarto comparadas con las arterias relacionadas con el infarto ($p = 0.0626$), Aunque solamente en 6 casos el núcleo se tñó, en 5 de éstos casos fue en placa relacionada con el infarto ($p < 0.01$), por lo que este dato es más aparentemente más sensible para identificar inestabilidad de placa.

Al analizar los resultados encontramos presencia de p53 en la arteria responsable del infarto solamente cuando se buscó mediante tinción nuclear, sugiriendo que la presencia de p53 en el núcleo indica inestabilidad de la placa aterosclerosa coronaria, contra lo que han publicado otros autores quienes le confieren una función “protectora” a la presencia de p53 y han postulado que al activar la apoptosis disminuye el número de células metabólicamente activas dentro de la placa aterosclerosa y con esto disminuye la producción de enzimas líticas que actúan sobre la capa fibrosa. Cabe la pena destacar que dichos autores determinaron la presencia de p53 únicamente en el citoplasma.

Nuestro trabajo presenta una tendencia a repetir los resultados que otros autores han reportado en arterias de conejos y en carótidas humanas para los cuales se tñó el citoplasma; es sin embargo el primero en reportar los hallazgos en coronarias humanas y utilizar la tinción nuclear además de la citoplasmática para tal fin.

LIMITACIONES:

La limitación principal de nuestro trabajo es el número de pacientes estudiados. Se requieren 147 casos para encontrar diferencias estadísticamente significativas.

La segunda limitación del estudio es que dependemos de otra Institución para el procesamiento de las muestras las cuales por su naturaleza no se realizan en nuestro Hospital.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES:

Los hallazgos de la tinción citoplasmática sugieren que la presencia de p53 es un marcador negativo de inestabilidad de placa aterosclerosa ya que se encontró positividad en el doble de placas no relacionadas con el infarto comparadas con las arterias relacionadas con el infarto ($p = 0.0626$), Aunque solamente en 6 casos el núcleo se tñió, en 5 de éstos casos fue en placa relacionada con el infarto ($p < 0.01$), por lo que este dato es más aparentemente más sensible para identificar inestabilidad de placa.

Al analizar los resultados encontramos presencia de p53 en la arteria responsable del infarto solamente cuando se buscó mediante tinción nuclear, sugiriendo que la presencia de p53 en el núcleo indica inestabilidad de la placa aterosclerosa coronaria, contra lo que han publicado otros autores quienes le confieren una función “protectora” a la presencia de p53 y han postulado que al activar la apoptosis disminuye el número de células metabólicamente activas dentro de la placa aterosclerosa y con esto disminuye la producción de enzimas líticas que actúan sobre la capa fibrosa. Cabe la pena destacar que dichos autores determinaron la presencia de p53 únicamente en el citoplasma.

Nuestro trabajo presenta una tendencia a repetir los resultados que otros autores han reportado en arterias de conejos y en carótidas humanas para los cuales se tñió el citoplasma; es sin embargo el primero en reportar los hallazgos en coronarias humanas y utilizar la tinción nuclear además de la citoplasmática para tal fin.

LIMITACIONES:

La limitación principal de nuestro trabajo es el número de pacientes estudiados. Se requieren 147 casos para encontrar diferencias estadísticamente significativas.

La segunda limitación del estudio es que dependemos de otra Institución para el procesamiento de las muestras las cuales por su naturaleza no se realizan en nuestro Hospital.

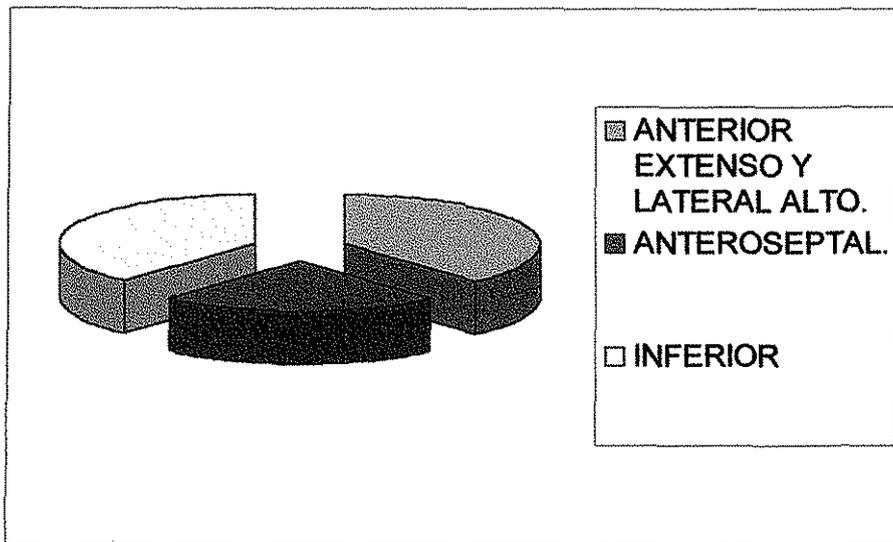
**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

APÉNDICE.

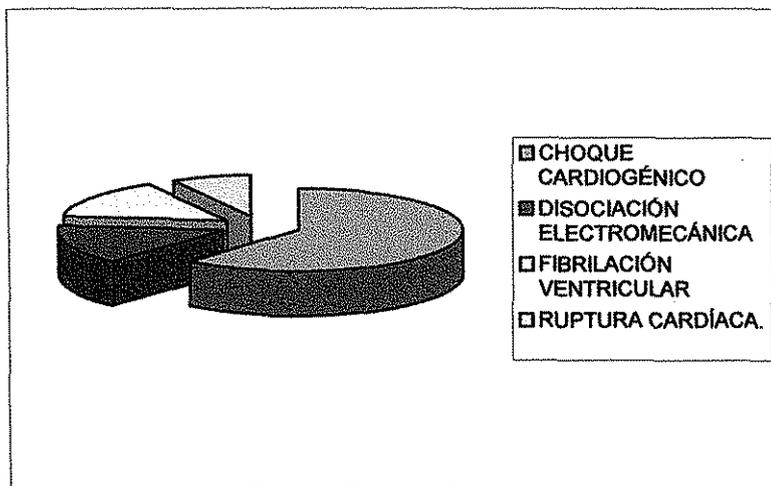
TABLA 1 CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

CASOS	13
HOMBRES	9
MUJERES	4
FACTORES DE RIESGO.	
HIPERTENSIÓN.	11
TABAQUISMO	10
DIABETES	5
DISLIPIDEMIA	3
LOCALIZACIÓN DEL INFARTO:	
ANTERIOR EXTENSO Y LATERAL ALTO	5
ANTEROSEPTAL	3
INFERIOR	5
CAUSA DE MUERTE	
CHOQUE CARDIOGÉNICO	8
DISOCIACIÓN ELECTROMECAÁNICA	2
FIBRILACIÓN VENTRICULAR	2
RUPTURA CARDÍACA	1

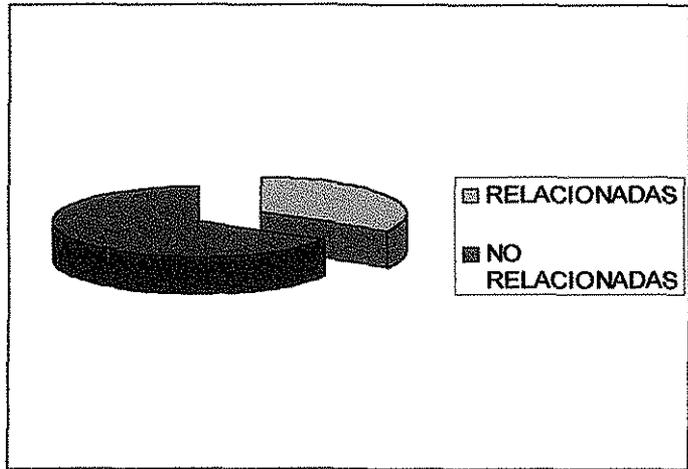
GRAFICA 1. LOCALIZACIÓN DEL INFARTO.



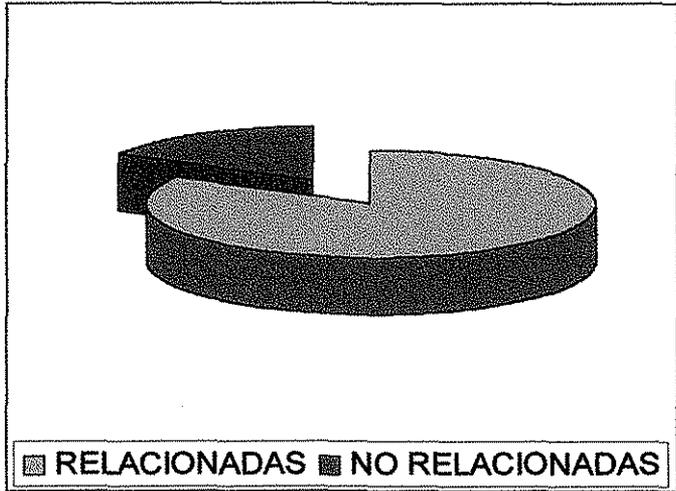
GRAFICA 2. CAUSA DE LA MUERTE.



GRAFICA 3. RESULTADOS DE LA TINCIÓN CITOPLASMÁTICA

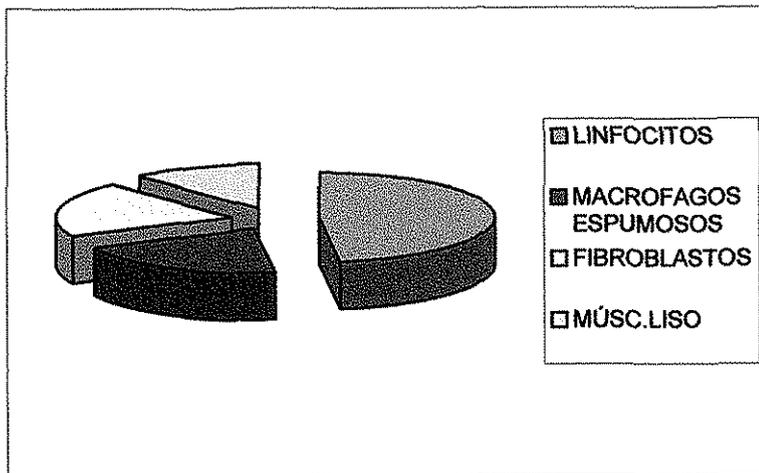


GRAFICA 4. RESULTADOS DE LA TINCIÓN NUCLEAR.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

GRAFICA5. TIPO CELULAR CON EXPRESIÓN POSITIVA PARA P53.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA.

- Littlewood.: A matter of life and cell death. *Science* 1998;281:1317-22.
- Kockx M., Herman A.: Apoptosis in atherogenesis: Implications for plaque destabilization. *Eur Heart J* 1998;19:G23-G28.
- Isner J., Kearney M., Bortman S.: Apoptosis in Human Atherosclerosis and Restenosis. *Circulation* 1995;91:2703-11.
- Darzynkiewicz Z, Bedner E, Traganos F, Murakami T. Critical aspects in the analysis of apoptosis and necrosis. *Hum Cell.* 1998;11:3-12.
- Benneth M., Evan G., Schwartz S.: Apoptosis of c vascular smooth muscle cells derived fom normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1995;95:2266-74.
- Hetts S.To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998;279:300-307.
- Kym Y., Bombeck C.: Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ Res* 1999;84:253-256.
- Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol.* 2000;10:197-202.
- Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol.* 1998;8:359-368.
- Sheikh MS, Fornace AJ. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000;182:171-181.
- Caelles C., Helmborg A.: p53 dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53 target genes. *Nature* 1994;370:220-23.
- Bennett M., Littlewood T., Schwartz S.: Increased Sensivity of Human Vascular Smooth Muscle Cells From Atherosclerotic Plaques to p53 mediated Apoptosis. *Circulation* 1997;81:591-99.
- Nargis N., Mimish L., Manogaran P.: Cellular Radiosensitivity, Radioresistant DNA Sintesis, and Defect in Radioinduction of p53 in Fibroblasts From Atherosclerosis Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 1997;17:947-53.
- Rodriguez C., Ruiz P., Farando S.: Mitogen-Induced p53 Downregulation Precedes Vascular Smooth Muscle Cell Migration From Healthy Tunica Media and Proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2001;21(2):214-219.
- Hsieh J., Kletsas D., Clunn G.: p53, p21 and MDM2 Involment in the Proliferation and Apoptosis in an in Vitro Model fo Conditionally Inmortalized Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* 2000;20(4):973-981.
- Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:4600-4604.
- Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:1519-1522
- Curtiss LK, Boisvert WA. Apolipoprotein E and Atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:243-251.
- Kaelin W., The p53 gene family. *Oncogene* 1999;18:7701-05.
- Lane D. P53 Guardian of the genome: *Nature* 1992;358:15-6.
- Aoki M., Morishita R., Matsushita H.: Importance of p53-bax mediated apoptosis in the regulation of human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997;30:189-190.



Shoemaker M., Levy T.: Prognostic Value of p53 in Non-Small Lung Cancer: Relationship with Proliferating Cell Nuclear Antigen And Cigarette Smoking. *Human Pathology* 1997;28(2):233-237.

Hayakawa K., Mitsushashi N., Saito Y.: The Prognosis Significance of Immunohistochemically Detected p53 Protein Expression in Non-Cell Lung Cancer Treated with Radiation Therapy. *Anticancer Research* 1998;18:3685-88.

Ihling C, Haendeler J, Menzel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, Zeiher AM. Co-expression of p53 and MDM2 in Human Atherosclerosis: Implications for the Regulation of Cellularity of Atherosclerotic Lesions. *J Pathol.* 1998;185:303-312.

Glockzin S, von Knethen A, Scheffner M, Brune B. Activation of the Cell Death Program by Nitric Oxide Involves Inhibition of the Proteasome. *J Biol Chem.* 1999;274:19581-19586.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley A. Mice Deficient for p53 are Developmentally Normal but Susceptible to Spontaneous Tumors. *Nature.* 1992;356:215-221

Bai H., Pollman M., Inishi Y.: Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circulation Research* 1999;85:229-37

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:791-804.

Tabas I. Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1529:164-174.

Libby P, Clinton SK. The role of macrophages in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 1993;4:355-363.

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (*op*) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:8264-8268.

Harvey M, Sands AT, Weiss RS, Hegi ME, Wiseman RW, Pantazis P, Giovannella BC, Tainsky MA, Bradley A, Donehower LA. In vitro Growth Characteristics of Embryo Fibroblasts Isolated from p53-deficient Mice. *Oncogene.* 1993;8:2457-2467.

Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allayee H, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic Evidence for a Common Pathway Mediating Oxidative Stress, Inflammatory Gene Induction, and Aortic Fatty Streak Formation in Mice. *J Clin Invest.* 1994;94:877-884.

Gilchrist R, Lomax ME, Camplejohn RS. The Need for Dynamic Methods for Measuring Cell Cycle Perturbations: a Study in Radiation-Treated Lymphoblastoid Cell Lines of Varying p53 Status. *Cell Prolif.* 1999;32:15-24.

Tanaka K., Zou J, Takeda K.: Effects of Human Cytomegalovirus Immediate-Early Proteins on p53 Mediated Apoptosis in Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Circulation* 1999;99(13):1656-59.

Wang XL., Wang J., Wilkend.: Interactive Effect of the p53 Gene and Cigarette Smoking on Coronary Artery Disease. *Cardiovasc Res* 1997;35(2):250-55.

Guevara NV, Kim HS, Antonova EI, Chan L. The Absence of p53 Accelerates Atherosclerosis by Increasing Cell Proliferation in vivo. *Nat Med.* 1999;5:335-339.

Doppert W., Goblert T., Kotga H., Kim E.: Mutant p53: "Gain of function" through perturbation of nuclear structure and function ? *J Cell Biochem* 2000;35:115-122.

Gordon D., Reidy M., Benditt E.: Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:4600-4610.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ihling C., Szombathy T., Nampoothiri K.: Cystic medial degeneration of the aorta is associated with p53 accumulation, Bax upregulation, apoptotic cell death and cell proliferation. *Heart* 1999;82:286-93.

Benneth M., Evan G., Newby A.: Central role of the c-myc protooncogene in vascular smooth muscle cell proliferation and cell death. *British Heart J* 1993;69:57-62.

Ihling C, Menzel G, Wellens E, Monting JS, Schaefer HE, Zeiher AM. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2218-2224.

Chang M-K, Bergmark C, Laurila A, Horkko S, Han K-H, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:6353-6358.

Buja L., Enteman M.: Modes of myocardial cell injury and cell death ischemic heart disease. *Circulation* 1998;98:1355-57.

Mitchinson MJ, Hardwick SJ, Bennett MR. Cell death in atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol*. 1996;7:324-329.

Narula J., Haider N., Virmani R.: Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335:1182-89.

Olivetti G., Abbi R., Quani F.: Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336:1131-41.

Bombeli T., Karsan A., Tait J.: Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*. 1997;89:2429-2442.

Kockx M., Guido R., De Meyer.: Apoptosis ad related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:2307-2315.

Van Vlijmen BJM, Gerritsen G, Franken AL, Boesten LSM, Kockx MM, Gijbels MJ, Vierboom MP, van Eck M, van de Water B, Van Berkel TJC, Havekes LM. Macrophage p53 Deficiency Leads to Enhanced Atherosclerosis in APOE*3-Leiden Transgenic Mice. *Circulation Research*. 2001;88:780-786.

Smith JD., Trogan E., Ginsberg M., Grigaux C.: Decreased Atherosclerosis in Mice Deficient in Both Macrophage Colony-Stimulating Factor and Apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:8264-8268.

Darley-Usmar VM, Lelchuk R, O'Leary VJ, Knowles M, Rogers MV, Severn A. Oxidation of low-density lipoprotein and macrophage derived foam cells. *Biochem Soc Trans*. 1990;18:1064-1066.

Lemasters JJ. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am J Physiol*. 1999;276:G1-G6.

Kikuchi J, Furukawa Y, Kubo N, Tokura A, Hayashi N, Nakamura M, Matsuda M, Sakurabayashi I. Induction of Ubiquitin-conjugating Enzyme by Aggregated Low Density Lipoprotein in Human Macrophages and its Implications for Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:128-134.

Friedlander P., HauptY., Prives C.: A mutant p53 that discriminates p53 responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* 1996;16:4961-71.

Iacopetta B., Wysocki S. Norman P.: The p53 tumour suppressor gene is overexpressed but not mutated in human atherosclerotic tissue. *Int J Oncol* 1995;7:399-402.

Bombeli T., Schwartz B., Harlan J.: Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood* 1999;93:3831-3838.

Han CY, Pak YK. Oxidation-dependent effects of oxidized LDL: proliferation or cell death. *Exp Mol Med*. 1999;31:165-173

Steinberg D. Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead. *Arteriosclerosis*. 1983;3:283-301.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN