



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA.**

---

**EFFECTO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE IL-1 Y DEL  
ANTAGONISTA DE SU RECEPTOR EN RESTENOSIS EN  
PACIENTES CON STENTS CORONARIOS.**

**T E S I S**

**Que para obtener el Título de:**

**BIOLOGA**

*Presenta:*

**KARLA MAGNOLIA SUÁREZ SÁNCHEZ**

**DIRECTOR: Dr. GILBERTO VARGAS ALARCON.**

**ASESOR:**

**Dr. ALBERTO MONROY GARCÍA.**



**MÉXICO, D.F.**

**AGOSTO**

**2007**



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.

# **INDICE**

## **I. RESUMEN**

### **1. INTRODUCCIÓN**

#### 1.1 ENFERMEDAD DE LAS ARTERIAS CORONARIAS

1.1.1 INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS

1.1.2 LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

1.1.2.1 Factores derivados del endotelio

1.1.2.1 Mecanismos de disfunción endotelial

1.1.3 EL INICIO DE LA LESIÓN: LA ESTRÍA GRASA

1.1.4 INFLAMACIÓN

1.1.5 FORMACIÓN DE CELULAS ESPUMOSAS

1.1.6 PLACA FIBROSA

1.1.7 LESIONES AVANZADAS Y TROMBOSIS

1.1.8 DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO MEDICO DE LA ENFERMEDAD  
CORONARIA

#### 1.2 RESTENOSIS

1.2.1 DEFINICIÓN ANGIOGRÁFICA DE RESTENOSIS

1.2.2 RESTENOSIS CLÍNICA

1.2.3 INCIDENCIA DE LA RESTENOSIS

1.2.4 PATOGENIA DE LA RESTENOSIS

1.2.4.1 Fases del proceso restenótico

1.2.5 FACTORES PREDICTIVOS DE RESTENOSIS

1.2.6 DISPOSITIVOS MECANICOS PARA PREVENIR LA RESTENOSIS

1.2.6.1 PRÓTESIS INTRACORONARIA

1.2.6.1 Resultados del stent

1.2.7 RESTENOSIS INTRA-STENT

1.2.8 INFLAMACION Y RESTENOSIS

#### 1.3 INTERLEUCINA-1

1.3.1 GENES DE LOS LIGANDOS DE LA FAMILIA DE IL-1 Y SUS  
POLIMORFISMOS

1.3.2 ESTRUCTURA PROTÉICA Y SECRECIÓN.

1.3.3 RECEPTORES

1.3.4 SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

## **2. JUSTIFICACIÓN**

## **3. OBJETIVOS**

3.1 OBJETIVO GENERAL

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

## **4. HIPÓTESIS**

## **5. METODOLOGÍA**

5.1 POBLACIÓN ESTUDIADA

5.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

5.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

5.4 EXTRACCIÓN DEL DNA: AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL DNA TOTAL

5.5 DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN IL-1 (IL-1B-511) Y DEL ANTAGONISTA DE SU RECEPTOR (RN.6/2C>G)

5.6 DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN IL-1F10.3 Y DEL ANTAGONISTA DE SU RECEPTOR (RN.4T>C, RN.6/1C>T)

5.7 DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO IL1R VNTR

5.8 ANALISIS DE RESULTADOS

## **6. RESULTADOS**

## **7. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

## **8. CONCLUSIONES**

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

## **ABREVIACIONES**

**AAS** Ácido Acetil Salicílico

**ACTP** Angioplastia coronaria transluminal percutánea

**ADP** adenosina difosfato

**AHA** American Heart Association

**Ang II** angiotensina II

**AMPc** Monofosfato cíclico de adenosina

**apo B** apoproteína B

**B-FGF** Factor del crecimiento de los fibroblastos básico (B-FGF)

**CCS** Sociedad Cardiovascular Canadiense

**CET** catéter de extracción transluminal

**CML** células musculares lisas

**Cox** ciclooxigenasa

**CPK** Creatinfosfocinasa

**EC** Enfermedades coronarias

**ECA** enzima convertidora de angiotensina

**ECV** Enfermedades Cardiovasculares

**EDCF** factor contráctil prostanoide derivado del endotelio

**EGF** Factor de crecimiento epidérmico

**eNOS** Óxido Nítrico Sintasa endotelial

**ERDF** factor de relajación derivado del endotelio

**GM-CSF** factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

**HDL** lipoproteínas de alta densidad

**ICAM-1** moléculas de adhesión intercelulares

**ICE** enzima convertidora de IL1- $\beta$

**IL-1** Interleucina 1

**INF- $\gamma$**  interferón gamma

**iNOS** óxido Nítrico sintasa inducible

**LDL** lipoproteínas de baja densidad

**LDL-ox** lipoproteína de baja densidad oxidada

**M-CSF** factor estimulante de colonias de monocitos

**MCP-1** proteína quimiotáctica de monocitos-1

**MMP** metaloproteinasas

**NF-κB** factor de transcripción kappa B  
**NHLBI** National Heart Lung and Blood  
**NO** óxido nítrico  
**NOS** óxido nítrico sintasa  
**PAI-1** inhibidor de t-PA tipo 1  
**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa  
**PDGF** factor de crecimiento derivado de plaquetas  
**PGI<sub>2</sub>** prostaciclina  
**RFLP** Restriction Fragment Length Polymorphism  
**REIS** Restenosis intra-stent  
**TF** Factor tisular  
**TNF-α** factor de necrosis tumoral-α  
**TXA<sub>2</sub>** tromboxano A<sub>2</sub>  
**TXB<sub>2</sub>** tromboxano B<sub>2</sub>  
**t-PA** activador tisular de plasminógeno  
**VCAM-1** moléculas de adhesión de células vasculares  
**VLDL** lipoproteínas de muy baja densidad  
**VNTR**. Número variable de repeticiones en tándem

## II. RESUMEN

La restenosis es una de las principales complicaciones de la implantación de stents coronarios. La frecuencia de restenosis varía según el stent implantado, se sugiere que esta diferencia en la respuesta a la implantación del stent depende de factores genéticos propios de cada individuo. Se sabe que el proceso de restenosis involucra de forma importante al fenómeno inflamatorio. Se ha propuesto que las citocinas proinflamatorias podrían jugar un papel importante en la fisiopatogenia de la restenosis, en particular se ha reportado una expresión elevada de interleucina 1 (IL-1) en respuesta al daño vascular. Debido al papel de la IL-1 en la patología vascular, a la importante participación del proceso inflamatorio en la restenosis y a la participación de la IL-1 en las enfermedades inflamatorias crónicas, el objetivo del presente trabajo fue establecer el papel que juegan los polimorfismos del gen de IL-1 y del antagonista de su receptor en el desarrollo de la restenosis intra stents. Para esto estudiamos 6 sitios polimórficos ubicados en los genes de IL-1 y en el antagonista de su receptor. Se incluyeron 114 pacientes, tratados con implantación de stent, y con control angiográfico 6 meses después para determinar las características de las lesiones y la presencia o ausencia de REIS (obstrucción > 50% del diámetro luminal). Los polimorfismos de IL-1 se determinaron por técnicas moleculares. Las comparaciones entre los grupos se realizaron usando la prueba de Chi cuadrada y el riesgo relativo se evaluó como razón de momios. De los 114 pacientes incluidos, 40 presentaron REIS y 74 no presentaron REIS. Al realizar el análisis multivariado se encontraron como predictores independientes de REIS la variante TT del alelo IL1-B511 ( $p < 0.000$ ). Estos resultados sugieren que la variante previamente descrita del alelo IL1-B511 se asocia con la presencia de REIS coronaria y es un factor predictor independiente sobre otras características clínicas y angiográficas.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ENFERMEDAD DE LAS ARTERIAS CORONARIAS

Las últimas estadísticas publicadas en el 2004 por la OMS calculan que cada año mueren 16,7 millones de personas en todo el mundo a causa de las enfermedades cardiovasculares. Esto supone más de un tercio de la mortalidad anual mundial. Casi la mitad de las muertes anuales en la unión europea son causadas por enfermedades cardiovasculares (ECV) y de estas casi la mitad son por enfermedades coronarias (EC).

La OMS predice que para el año 2020 habrá 11,1 millones de muertes por ECV. Estas predicciones señalan que la mortalidad de ECV en todos los países desarrollados se incrementará un 120% en mujeres y un 137% en el caso de los hombres. Las predicciones para las dos próximas décadas multiplican por tres la mortalidad existente por ECV en Latinoamérica y el medio Oriente, un ratio de aumento que excede el de cualquier otra región <sup>(1)</sup>.

En México, la secretaria de salud en su último reporte publicado en el 2005 sobre defunciones por grupo de edad coloca a las enfermedades cardíacas, como la tercera causa de muerte en edad productiva (15 a 64 años) y la segunda causa en edad posproductiva (65 años en adelante) <sup>(2)</sup>.

Los costes económicos de las enfermedades cardiovasculares son diversos: desde el coste individual y familiar que suponen los cuidados médicos y el tiempo de baja laboral, hasta los costes que suponen para los gobiernos y la disminución de la productividad.

La patogenia de la enfermedad coronaria implica dos procesos independientes: la aterosclerosis y la trombosis, que definimos como aterotrombosis, principal causa subyacente de la manifestación clínica de la ECV.

En los últimos años se han realizado muchos esfuerzos para intentar determinar de forma no invasiva el riesgo de presentar un primer evento isquémico para poder realizar correctamente estrategias de prevención primaria y para identificar las personas con mayores probabilidades de presentar un nuevo episodio coronario agudo (prevención secundaria). De esta forma se ha ido conociendo que además de los factores de riesgo clásicos (tabaco, diabetes mellitus, hipercolesterolemia) la inflamación tiene un papel crucial en la aterogénesis y en la progresión rápida de la enfermedad coronaria <sup>(3)</sup>.

### 1.1.1 INFLAMACIÓN Y ATEROSCLEROSIS.

La inflamación se caracteriza por un desplazamiento de fluidos y células desde el compartimento vascular hacia el tejido extravascular en respuesta a un estímulo nocivo. Los estímulos inflamatorios inducen una reacción sistémica conocida como 'respuesta de fase aguda', que disminuirá y desaparecerá cuando el estímulo inflamatorio se resuelva. Sin embargo, cuando el estímulo persiste se establece un proceso inflamatorio crónico que puede ocasionar lesiones tisulares persistentes. Las células inmunológicas involucradas en estos procesos son macrófagos, linfocitos y células plasmáticas, y la lesión a nivel arterial ocasionada por la inflamación es la aterosclerosis <sup>(2)</sup>.



La aterosclerosis es un fenómeno patológico caracterizado por una respuesta inflamatorio-proliferativa de la pared vascular a diferentes agentes lesivos. Las lesiones ateroscleróticas progresan de manera crónica y asintomática a lo largo de los años y tardíamente pueden provocar sintomatología clínica como resultado de una reducción crónica o aguda (aterotrombosis) de la luz arterial. Esta patología afecta principalmente la capa íntima de las arterias de calibre mediano y grande, tales como la aorta, arterias femorales, carótidas, cerebrales, coronarias y renales. <sup>(4)</sup>

#### 1.1.2 EL INICIO DE LA LESIÓN: LA ESTRÍA GRASA

Las primeras lesiones ateroscleróticas macroscópicamente visibles son las estrías grasas, las cuales pueden ya manifestarse en la aorta y en las arterias coronarias durante las primeras décadas de vida y consisten básicamente en una acumulación de lípidos en la íntima vascular <sup>(5)</sup>. El primer evento en la aterosclerosis es la acumulación de LDL en la matriz subendotelial (Fig. 1). Esta acumulación es mayor si los niveles de LDL circulante son mayores, y tanto el transporte como la retención de LDL están aumentados. Las LDL difunden pasivamente entre las uniones de las células endoteliales, y su retención en la pared arterial parece que está relacionada con las interacciones entre un constituyente de las LDL, la apolipoproteína B (ApoB), y los proteoglicanos de la matriz <sup>(6)</sup>. Además, otras lipoproteínas que contienen ApoB llamadas lipoproteínas(a) se pueden acumular en la íntima y producir aterosclerosis. Las lipoproteínas(a), partículas parecidas a las LDL pero que contienen un polipéptido adicional que está ligado a la ApoB por un puente disulfuro, parecen ser particularmente aterogénicas debido a sus efectos adicionales sobre la fibrinólisis y el crecimiento de las células musculares <sup>(7)</sup>.

Las LDL nativas no son captadas suficientemente rápido por los macrófagos para generar las células espumosas, por lo que se ha propuesto que las LDL son, de alguna forma, modificadas en la pared arterial. Así, las LDL sufren modificaciones incluyendo oxidación, lipólisis, proteólisis y agregación, y estas modificaciones contribuyen a la inflamación y a la formación de las células espumosas.

Una de las modificaciones más significativas que producen la lesión temprana de la pared vascular, es la oxidación lipídica como resultado de su exposición a las células vasculares. Estas modificaciones, inicialmente, producen LDL oxidadas, con capacidad pro-inflamatoria pero que no están suficientemente modificadas para ser reconocidas por los receptores barreadores de macrófagos <sup>(8)</sup>.

Algunos estudios recientes han demostrado que la interacción de CD40 con su ligando CD40L (CD154) contribuye de manera importante al desarrollo de las lesiones avanzadas <sup>(17)</sup>. En un primer momento se reconoció que esta interacción era esencial para las reacciones inmunológicas en las que estaban implicadas las células T y B, pero hoy se sabe que el CD40 también se expresa en los macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas. Esta interacción resulta así, en la producción de citocinas inflamatorias, proteasas degradantes de matriz y moléculas de adhesión.

Existen diversos factores que contribuyen al desarrollo de las lesiones fibrosas, incluyendo niveles elevados de homocisteína, la hipertensión y las hormonas. Por una parte, los niveles elevados de homocisteína parecen que dañan las células endoteliales y que estimulan la proliferación de las células vasculares musculares lisas <sup>(18)</sup>. Por otra parte, los efectos de la elevada presión arterial en la aterosclerosis parecen que están mediados por los componentes del sistema renina-angiotensina, por ejemplo, la angiotensina II estimula directamente el crecimiento de las células musculares lisas y la producción de matriz extracelular. Ensayos llevados a cabo en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), indicaron que la presión sanguínea elevada estimula la expresión de PDGF, un potente mitógeno. En cuanto a las hormonas, los estrógenos tienen múltiples propiedades antiaterogénicas, incluyendo efectos sobre las lipoproteínas plasmáticas y la estimulación de prostaciclina y de la producción de NO <sup>(19)</sup>.

La infección por citomegalovirus se ha asociado con la aterosclerosis y con la restenosis tras una angioplastia. El posible mecanismo propuesto es la estimulación de la migración de las células musculares por el receptor US28 del virus <sup>(20)</sup>.

#### 1.1.6 LESIONES AVANZADAS Y TROMBOSIS

La aparición de los eventos coronarios trombóticos se ha asociado principalmente con la composición y vulnerabilidad de la placa más que con la severidad de la estenosis (Figura 4). Las placas que son vulnerables tienen generalmente capas fibrosas delgadas un número considerable de células inflamatorias. Las células T, por ejemplo, producen IFN- $\gamma$  que inhibe la producción de matriz y los macrófagos producen varias proteasas que la degradan, incluyendo colagenasa intersticial, gelatinasa y estromolosa <sup>(21)</sup>. La ruptura de la placa ocurre frecuentemente en los bordes de la misma, ricos en células espumosas, sugiriendo que los factores que contribuyen a la inflamación pueden también influir en la trombosis. Así, es notable que la incidencia de infarto de miocardio o de accidentes vasculares aumenta durante las infecciones agudas <sup>(22)</sup>.

La estabilidad de las lesiones ateroscleróticas puede también estar influenciada por la calcificación y la neovascularización, rasgos ambos de las lesiones avanzadas. La calcificación de la íntima es un proceso en el que células parecidas a pericitos secretan una estructura matricial que subsecuentemente se va calcificando, siendo semejante a una formación ósea. Este proceso está regulado por oxiesteroles y citocinas <sup>(52)</sup>. El crecimiento de pequeños vasos desde la media, puede constituir un conducto para la entrada de células inflamatorias <sup>(23)</sup>.

La trombogenicidad de la lesión dependería de la presencia del factor tisular, una proteína clave en la iniciación de la cascada de coagulación. La producción de este factor por las células endoteliales y los macrófagos, está aumentada por las LDL oxidadas, las infecciones o por la interacción CD40-CD40L en las células inflamatorias.

luminal significativo o restenosis angiográfica, y para describir la recurrencia de signos y síntomas de isquemia después de una angioplastia exitosa, o restenosis clínica.

### 1.2.1 DEFINICIÓN ANGIOGRÁFICA DE RESTENOSIS.

Uno de los obstáculos principales y más resistentes a la hora de abordar el tema de la restenosis es la falta de acuerdo respecto a una definición angiográfica que permita disponer de una medida de la variación de la intensidad de la estenosis en el periodo evolutivo de una ACTP (Tabla I).

#### **Tabla I.** Definiciones angiográficas de restenosis.

NHLBI 1 (Holmes 1984)	Incremento > 30% de la estenosis en el momento del seguimiento angiográfico con respecto a la inmediata tras la ACTP.
NHLBI 2 (Holmes 1984)	Estenosis < 50% inmediata post-ACTP que se incrementa hasta > 70% de severidad en el momento del seguimiento angiográfico.
NHLBI 3 (Holmes 1984)	Incremento de la estenosis en el momento del seguimiento hasta llegar a ser < 10% de la que existía antes de la dilatación.
NHLBI 4 (Holmes 1984)	Perdida de < 50% de lo ganado tras la ACTP.
Definición 5 (Leimgruber 1986)	Estenosis < 50% inmediata post-ACTP que se incrementa hasta ser > 50% de severidad en el momento del seguimiento angiográfico.
Definición 6 (Nobuyoshi 1988)	Deterioro en el momento del seguimiento angiográfico de > 0,5 mm en el diámetro luminal mínimo conseguido tras la dilatación.
Definición 7 (Serruys 1988)	Deterioro en el momento del seguimiento angiográfico de > 0,72 mm en el diámetro luminal mínimo conseguido tras la dilatación.

NHLBI 1, 2, 3 y 4 son los criterios de restenosis establecido por el National Heart Lung and Blood Institute de EEUU.

Aunque existe un solapamiento entre las definiciones, no todos los pacientes que están incluidos en una definición lo están en las otras. A la hora de evaluar y comparar los resultados de los diferentes estudios clínicos, nos encontramos con la gran limitación de que cada uno ha utilizado diferentes definiciones y metodologías para la detección y definición de la restenosis.

En la actualidad la definición de restenosis mas aceptada es la presencia de estenosis >50% del diámetro luminal en el seguimiento angiográfico, medido por angiografía cuantitativa.

### 1.2.2 RESTENOSIS CLINICA.

La restenosis se presenta en cierta medida en todos los individuos después de intervenciones coronarias. Debido a que la extensión del reestrechamiento angiográfico sigue una distribución normal, todas las definiciones angiográficas de restenosis son arbitrarias, a menos que estén ligadas a parámetros clínicos. La recurrencia clínica de restenosis coronaria se puede presentar como angina, prueba de esfuerzo positiva, infarto agudo de miocardio o bien puede no dar lugar a síntomas. No existe una

correlación estrecha entre la definición angiográfica de restenosis y la situación clínica del paciente. Se ha observado en diferentes estudios que la presencia o ausencia de síntomas en el seguimiento tras una angioplastia tiene un valor limitado para detectar restenosis angiográfica. La restenosis esta presente en solo el 45-85% de los pacientes sintomáticos, y presentan restenosis angiográfica del 4-39% de los pacientes asintomáticos.<sup>(26)</sup>

En la práctica clínica para la detección de restenosis se utiliza la prueba de esfuerzo. Si se obtiene una prueba negativa la probabilidad de restenosis es baja. El valor predictivo de la prueba de esfuerzo esta limitado por la elevada tasa de falsos positivo (prueba positiva en ausencia de restenosis). Diversos estudios muestran que la sensibilidad de la prueba de esfuerzos convencional es del 54%, con una especificidad del 72% en la detección de restenosis. Con la utilización de trazadores isotópicos la sensibilidad aumenta al 80% pero la especificidad se reduce al 52%<sup>(27)</sup>. Debido a la impresión de los signos clínicos y el bajo valor predictivo positivo de las pruebas de detección de isquemia, la angiografía coronaria es la mejor evaluación de restenosis, además nos permite conocer el tipo de restenosis y la existencia de progresión de la enfermedad aterosclerótica.

### 1.2.3 INCIDENCIA DE RESTENOSIS.

Los estudios de seguimiento angiográfico han permitido conocer el tiempo de desarrollo de la restenosis. Dos importantes estudios han evaluado de forma longitudinal el fenómeno de restenosis mediante angiografía coronaria. Nobuyoshi y col (1988)<sup>(28)</sup> sometieron a angiografía secuencial a 229 pacientes al primer mes, 3, 6 y 12 meses de la realización de una angioplastia coronaria. Durante el primer mes el 11% de los pacientes evolucionaron a restenosis. La mayoría de restenosis ocurrieron dentro de los tres primeros meses (39% ± 6%), con un ligero incremento hasta los seis meses (45% ± 6%). Estos mismos investigadores (1991) en estudios histológicos demostraron que la restenosis es predominantemente dentro de los 6 meses después de la angioplastia.

En otro estudio seriado angiográfico, Serryus y cols. (1989)<sup>(29)</sup>, en 342 pacientes observaron que la incidencia de restenosis dependía de la definición utilizada. Sin embargo, para cada definición la mayoría de los casos de restenosis ocurrían dentro de los tres primeros meses.

Los hallazgos de que la mayor tasa de restenosis ocurre dentro de los seis primeros meses se basan en diferentes estudios con nuevas técnicas y estrategias que incluyen, además del balón, procedimientos tales como la aterectomía coronaria y stent.

La definición de restenosis utilizada es el factor más importante que influirá en la tasa de la restenosis. Otros factores que se relacionan con la tasa de restenosis entre distintos estudios son variables clínicas (presencia de enfermedad multivazo, angina inestable, oclusión); así como variables angiográficas (dilatación en lesiones complejas o en pequeños vasos).

En series con un gran numero de pacientes, la tasa de restenosis es del 30 al 40%. Así, en la serie de Nobuyoshi y cols., la restenosis a los seis meses en pacientes con

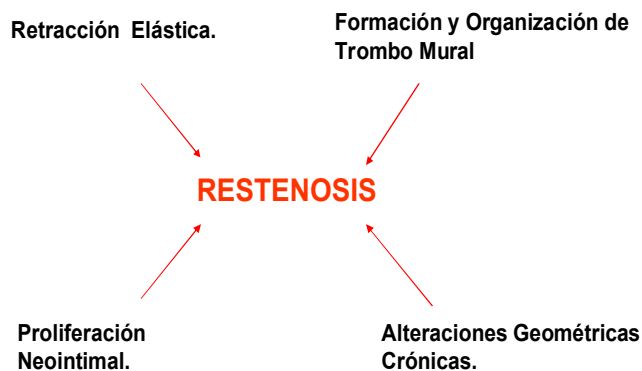
enfermedad de un vaso fue del 48%, siendo similar a la observada en la enfermedad multivaso. En un estudio aleatorio con tratamiento antiplaquetario <sup>(30)</sup>; la tasa de restenosis, definida como pérdida del diámetro luminal mínimo > 50% de la ganancia post-angioplastia, fue del 46%. En esta serie el seguimiento angiográfico fue correcto. Las pérdidas en el seguimiento son una de las causas más importantes de una elevada tasa de restenosis. Se considera que para evitar sesgos, el seguimiento angiográfico debe realizarse en el 80% de los pacientes.

#### 1.2.4 PATOGENIA DE LA RESTENOSIS.

El tratamiento con balón de la aterosclerosis coronaria comporta la compresión de la placa con formación de fisuras, fracturas y pequeñas disecciones que se producen en los planos de menor grado de distensibilidad. Estas líneas de disección aumentan la luz efectiva del flujo arterial, se extienden por la intima y llegan a penetrar hasta la media en los casos en los que se rompe la lámina elástica interna. Al mismo tiempo la capa media y la adventicia se distienden para acomodar el tamaño de la arteria a la del balón completamente inflado.

El proceso de reparación en la pared arterial de este daño producido por el inflado de balón, es lo que conduce a la restenosis. Se caracteriza por una proliferación neointimal con migración de células musculares lisas desde la capa media a la intima <sup>(31)</sup>.

Sobre la base de los datos obtenidos de modelos experimentales y de las evidencias en patología humana, observaciones angiográficas y de ecografía intravascular existen 4 mecanismos de restenosis. (Fig. 4).



**Figura 4.** Mecanismos de restenosis.

##### 1) Retroceso Elástico.

La retracción elástica es una propiedad natural de los vasos intactos en respuesta a la distensión. El retroceso elástico sucede en los minutos-horas que siguen a la angioplastia con balón, como consecuencia de las propiedades elásticas de la pared vascular no dañada en respuesta a su sobredistensión. Diversos estudios han demostrado que este retroceso precoz de la pared aumenta la posibilidad de restenosis. La pérdida de

la luz del vaso >10% se asocia a una tasa de restenosis del 73%. Por el contrario, cuando la pérdida de luz es <10%, la tasa de restenosis es únicamente del 9% <sup>(32)</sup>.

La aparición de las endoprótesis coronarias (stent) ha resuelto prácticamente el problema de retroceso elástico puesto que al poseer una estructura rígida permite obtener una mayor ganancia luminal con un retroceso elástico mínimo o inexistente <sup>(32)</sup>.

## 2) Formación y organización del trombo mural.

El endotelio vascular juega un papel importante en la regulación del tono vasomotor, la trombosis y la inflamación mediante la liberación de sustancias vasoactivas. La lesión endotelial que ocasiona la angioplastia coronaria provoca la pérdida de estas propiedades antitrombóticas, aumenta la secreción de factores procoagulantes (trombina y factor tisular) y estimula la trombogénesis.

Uno de los factores principales en el proceso de formación del trombo es el desgarro de la lámina elástica interna y de la media por el balón. Esto provoca la liberación de los constituyentes de la pared y los componentes de la matriz extracelular al torrente sanguíneo, lo que ocasiona la liberación de las plaquetas y sus sustancias vasoactivas tanto endoteliales como intraplaquetarias (tabla II). Las plaquetas activadas liberan las sustancias almacenadas en sus gránulos alfa, que estimulan la vasoconstricción, la quimiotaxis y la activación de plaquetas vecinas. La agregación plaquetar activa la producción de numerosos factores que parecen ser los responsables de la estimulación, migración y proliferación de las células musculares lisas <sup>(33)</sup>. Además, las plaquetas agregadas aceleran la conversión de protrombina en trombina, la cual participa en la formación del trombo, la migración de monocitos y neutrófilos; y en la estimulación de la liberación de endotelina y factor tisular endotelial, que tiene efecto mitógeno sobre las células musculares lisas <sup>(34)</sup>.

**Tabla II.** Parámetros relacionados con la proliferación intimal.

- TROMBINA
- TROMBOXANO A<sub>2</sub>
- SEROTONINA
- INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO (PAI-1)
- FACTOR DEL CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS. (PDGF)
- FACTOR TRANSFORMADOR DEL B-CRECIMIENTO (TGF-B)
- FACTOR DEL CRECIMIENTO DE LOS FIBROBLASTOS BÁSICO (B-FGF)
- FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)
- INTERLEUCINA 1
- PROTEÍNA QUIMIOTÁCTICA MONOCITARIA-1 (MCP-1)

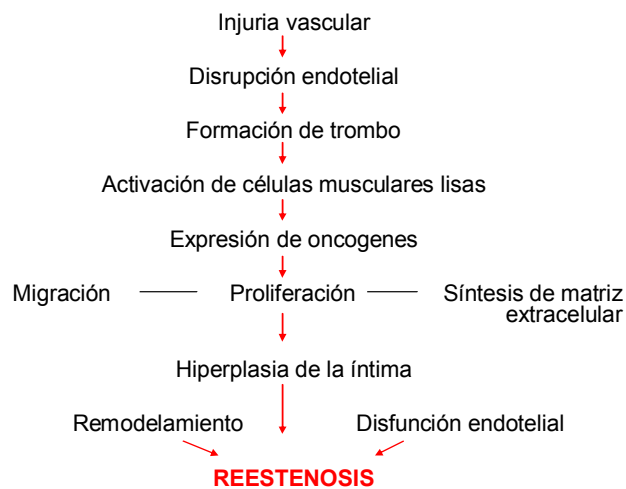
PDGF: potente mitógeno para células de origen mesénquimal.

La intensidad de la respuesta trombogénica depende del grado de daño vascular, del área de la superficie arterial expuesta, y del tipo de sustrato. Estos parámetros condicionan a su vez la respuesta reparativa neointimal<sup>(35)</sup>.

### 3) Proliferación neointimal.

Esta fase final de la cicatrización vascular corresponde a la proliferación de las células musculares lisas y a la acumulación de matriz extracelular producida por las mismas. Las células musculares de la media son activadas por los factores quimiotácticos anteriormente mencionados. Además, la distensión de la pared arterial es un potente estímulo para la activación y crecimiento de las células musculares lisas<sup>(36)</sup>. Estas células una vez activadas sufren una transformación fenotípica característica, pasan de forma contráctil a una secretora, que es la responsable de la secreción de la matriz extracelular (proteoglicanos), base de la hiperplasia intimal (Fig. 5).

Posteriormente las células musculares lisas migran a través de fisuras en la lámina elástica interna hacia la intima. El tiempo de duración de esta migración hacia la intima no se conoce. Existen pocos estudios que identifiquen las moléculas implicadas en este proceso. La migración celular probablemente se inicia con el reconocimiento de proteínas de la matriz extracelular por los receptores de adhesión de superficie celular conocidos como integrinas. Estudios experimentales han demostrado que el bloqueo de las integrinas inhibe la migración de las células musculares lisas<sup>(37)</sup>.



**Figura 5.** Patogenia de la hiperplasia neointimal

Se ha mostrado que cuando mas profundo y extenso es el daño efectuado sobre la pared arterial, se producen y liberan mas cantidad de factores de crecimiento, y en consecuencia la respuesta proliferativa neointimal es muy extensa.<sup>(38, 39)</sup>

### 4) Remodelado arterial y restenosis.

Se define remodelado a los cambios que se producen en el tamaño del vaso a los pocos meses de realización de una angioplastia coronaria. En términos de preservación de la luz arterial, el remodelado arterial puede ser favorable (adaptativo) o desfavorable (patológico) <sup>(40)</sup>.

El remodelado perfecto sería aquel en que el área del vaso se expande en igual o mayor medida que el área de hiperplasia intimal sin producirse pérdida de la luz del vaso. El remodelado favorable ocurre cuando la expansión del vaso compensa solo parcialmente el crecimiento intimal, produciendo una ligera disminución del diámetro luminal. El remodelado desfavorable o patológico ocurre cuando no existen cambios en el tamaño de la pared arterial o aparece una constricción del vaso con la proliferación de la intima e importante disminución de la luz arterial <sup>(41)</sup>.

Así pues, el estrechamiento de la luz vascular después de una angioplastia coronaria depende del remodelado y del crecimiento intimal.

En el caso de remodelado constrictivo el estrechamiento será mayor que cuando se produce únicamente proliferación neointimal. <sup>(42)</sup>.

### 1.2.5 DISPOSITIVOS MECÁNICOS PARA REDUCIR LA RESTENOSIS

El efecto beneficioso de la angioplastia se obtiene al aumentar la luz del vaso coronario mediante inflado del balón a expensas de ocasionar fracturas y aplastamiento de la placa arteriosclerótica contra la pared arterial, así como disecciones ó fisuras de la capa intimal y distensión de la capa media. Con ello se consigue normalmente un aumento de la luz vascular pero generalmente con una geometría endoluminal irregular y en ocasiones subóptima <sup>(44, 45)</sup>. Por otro lado, el daño tisular ocasionado desencadena una respuesta proliferativa de reparación que contribuye a la restenosis del vaso. Así pues, la eficacia de la angioplastia está limitada por diversos factores: la obtención de una luz inadecuada, el riesgo de oclusión aguda, y restenosis a largo plazo. Asimismo, a éstos factores se deben añadir la imposibilidad de abordar determinadas lesiones. Debido a estas limitaciones, además de la mejoría de las características del catéter-balón de angioplastia, se han desarrollado multitud de dispositivos con el fin de mejorar los resultados primarios y prevenir la restenosis. En general, estos dispositivos se basan en la extracción de la placa aterosclerótica (aterectomía), el corte longitudinal y radial "controlado" de la placa (cutting balloon), la disolución del tejido (láser), y en la prevención del retroceso elástico y tratamiento de complicaciones tales como la disección (stent).

#### 1.2.5.1 Prótesis intracoronaria

La prótesis intracoronaria ó stent ha comportado un gran avance en el campo del intervencionismo coronario. La mayoría de modelos consisten en un tubo de acero inoxidable cuya función es servir de andamiaje de la pared arterial, lo que fija el segmento arterial dilatado y optimiza la geometría luminal. De todos los nuevos dispositivos de revascularización percutánea, el stent es sin duda el que más impacto ha



producido en el mundo de la cardiología intervencionista, y está cambiando las indicaciones, estrategia y resultados del intervencionismo coronario.

Charles Dotter en los años sesenta sugirió que la utilización de estructuras rígidas intravasculares para "entablillar" las arterias dilatadas optimizaría su reparación y su permeabilidad a largo plazo. No obstante la implantación coronaria de stents no fue viable hasta mediados de los ochenta al desarrollarse nuevos sistemas de implantación con catéteres. El stent fue utilizado por primera vez por Sigwart en Lausana (Suiza) en 1986, y por Roubin y Schwartz en 1987 en los EEUU.

Al inicio de los noventa la experiencia inicial con el stent no fue muy favorable, debido a dificultades técnicas de la implantación y a la existencia de una alta tasa de oclusión aguda y de complicaciones hemorrágicas, derivadas del régimen de anticoagulación utilizado. Posteriormente la experiencia con el stent fue mejorando progresivamente. La publicación en 1994 de los estudios aleatorios BENESTENT y STRESS en los que se comparaba la angioplastia convencional con el stent Palmaz-Schatz en lesiones de novo respaldaron y favorecieron la expansión del stent. En ambos estudios quedó reflejado que el stent reducía el número de muertes, infartos de miocardio y nuevas revascularizaciones. Asimismo, redujo la tasa de restenosis en las lesiones coronarias de novo (32% *versus* 18%). No obstante la oclusión aguda y las complicaciones vasculares asociadas a la anticoagulación agresiva seguían siendo un problema.

La incorporación de la ecografía intravascular en el laboratorio de hemodinámica puso de manifiesto la falta de aposición del stent a la pared vascular como consecuencia de una implantación con presiones bajas. La implantación del stent a presiones superiores a la nominal (>12 atmósferas) redujo de forma importante la tasa de oclusión aguda.

El stent Palmaz-Schatz fue el primero que se comercializó. Su principal inconveniente era la rigidez y es que se debía de montar sobre el balón de angioplastia. En diversos estudios, con la implantación de este stent, se evidenció un número menor de complicaciones isquémicas agudas y una disminución de la tasa de restenosis en relación con la angioplastia convencional <sup>(46)</sup>.

En general, el stent ideal debería recurrir cinco condiciones básicas: 1) bajo perfil y alta flexibilidad longitudinal, 2) gran capacidad de expansión, 3) alta rigidez transversal post-expansión, que neutralice la capacidad elástica de la pared del vaso, 4) máxima resistencia a la corrosión y al efecto de flexión-torsión de las contracciones cardiacas, 5) alta biocompatibilidad para que la reacción trombótica y la inducción de proliferación miointimal sean mínimas. Sin embargo, en la actualidad es difícil que todas estas propiedades se reúnan en un mismo stent. Así pues, por ejemplo, una mejoría de la flexibilidad puede ir en detrimento de la fuerza radial del stent, y viceversa.

El stent se utiliza principalmente en cuatro situaciones clínicas:

- 1) En el tratamiento de la oclusión o amenaza de oclusión por disección postangioplastia.
- 2) Electivamente en lesiones de novo para reducir la tasa restenosis.
- 3) Optimización del resultado angiográfico obtenido con el balón.
- 4) Tratamiento de la restenosis después de una angioplastia previa.

### 1.2.5.2 Resultados del stent.

El empleo del stent en el tratamiento de la restenosis de las lesiones coronarias tratados con angioplastia se basa en la hipótesis de que la retracción elástica y el remodelado tardío de la pared arterial puede ser evitada con el stent.

Los estudios aleatorios en lesiones de novo, comparando los resultados con balón en relación con el stent, han sido fundamentales en la difusión del empleo del stent. Los principales estudios son el BENESTENT, STRESS Y START, cuya metodología es similar, y todos ellos compararon la angioplastia convencional con el stent en lesiones de novo. Un metaanálisis reciente <sup>(47)</sup> analizó las complicaciones mayores (muerte, infarto y revascularización) a los 6 meses de seguimiento y el porcentaje de restenosis angiográfica de dichos estudios aleatorios. En los tres estudios analizados las lesiones a tratar tenían un diámetro de referencia del vaso de al menos 3mm. El estudio BENESTENT solo incluyó a pacientes con angina estable, mientras que el 47% de los pacientes del estudio STRESS y el 72% del estudio SART presentaban angina inestable.

Los resultados de este metaanálisis fueron que la incidencia de muerte e infarto agudo de miocardio fue similar en ambos grupos (seguimiento de 6 meses). En cambio, la necesidad de una segunda revascularización fue inferior en los pacientes tratados con stents, observándose una reducción del 35% en este grupo de pacientes. Se objetivó una reducción de la tasa de restenosis del 31% con el stent frente al balón convencional en este tipo de lesiones.

### 1.2.6 RESTENOSIS INTRA-STENT.

La restenosis intra-stent se define como la aparición de una reducción de luz  $>50\%$  en el interior del stent. La verdadera prevalencia de restenosis intra-stent no está establecida <sup>(48)</sup>. Analizando las series con mayor número de casos incluidos y con un seguimiento angiográfico sistemático, la incidencia global de la restenosis intra-stent se puede cifrar de alrededor del 28%, oscilando según las series entre un 9,9 % y un 32,8 % <sup>(49)</sup>. Esta gran variabilidad se ve influida principalmente por el tipo de lesiones abordadas. Las series que incluyen arterias de un calibre  $<3$  mm el porcentaje de restenosis se incrementa (32%-47%), y si además se incluyen lesiones largas ( $>15$ mm) esta incidencia puede alcanzar una tasa de restenosis del 58%.

Existen diferentes patrones de restenosis intra-stent, observándose una respuesta diferente al tratamiento según el patrón. Se han usado varias clasificaciones según la longitud ó proporción del stent restenosado, la más utilizada clasifica las restenosis en focales ó difusas. Se define restenosis focal cuando la longitud de la restenosis es  $<10$  mm y difusa cuando dicha longitud es  $>10$ mm <sup>(50)</sup>. Las restenosis difusas se han subdividido en intra-stent, cuando sólo afectan al interior del stent y en proliferativa cuando además afectan también al segmento de referencia (distal ó proximal).

Estudios histológicos en animales han mostrado que el crecimiento intimal está relacionado con el trauma que sufre la pared del vaso durante la implantación del stent. En un modelo porcino, Schwartz y cols (1992) describieron una clasificación histológica con 4 niveles de daño dependiendo de la profundidad de penetración del

stent. Estos autores observaron una correlación significativa entre la hiperplasia intimal y el daño vascular post-angioplastia ( $r=0,85$ ). Esta correlación fue confirmada en otro estudio similar realizado por Carter y cols con un coeficiente de correlación de  $r = 0.72$ <sup>(51)</sup>. Asimismo, se ha observado que comparado con el balón, la aterectomía u otras técnicas consiguen una importante ganancia aguda, pero es a expensas de un importante daño de la pared. Ello se traduce durante el seguimiento en un aumento proporcional de la respuesta proliferativa, asociado habitualmente a un remodelamiento negativo de la pared arterial, ocasionando una reducción importante de la luz a los seis meses. La implantación de stent previene el recoil y el remodelamiento negativo. Sin embargo, la pérdida de luz tardía durante el seguimiento también es importante.

#### 1.2.6.1 Factores predictivos de aparición de restenosis intra-stent.

Se han determinado diversos factores relacionados con la aparición de restenosis intra-stent. Dentro de los factores clínicos el más consistente en todos los estudios es la diabetes mellitus<sup>(52)</sup>. Con relación a los factores angiográficos, los más frecuentemente identificados han sido la longitud de la lesión, el calibre de vaso y la localización de la lesión en la arteria descendente anterior. Los factores predictivos relacionados con el procedimiento han sido, un menor diámetro luminal mínimo post- procedimiento y la implantación de múltiples stent en la misma arteria<sup>(53)</sup>. Las dimensiones finales del stent son un factor predictivo importante de restenosis intra-stent. Inflados progresivos del balón a altas presiones permiten un aumento del diámetro luminal mínimo intra-stent y una mejor aposición del stent. Algunos investigadores han sugerido que la implantación a altas presiones puede aumentar la pérdida tardía y favorecer la restenosis intra-stent. Estudios realizados en humanos, con ecografía intravascular, han encontrado una correlación moderada entre el área de hiperplasia intimal y el engrosamiento intimal con el producto tamaño balón / tamaño arteria por máxima presión de inflado.

En resumen, los stent se han convertido en una herramienta común de la cardiología intervencionista y las indicaciones aceptadas para su implantación han ido incrementándose progresivamente. El factor limitante principal en las lesiones que son abordables es la restenosis tardía del stent. Ello ha influido en que la investigación en este terreno sea multidisciplinaria, dinámica y adaptativa al intervencionismo coronario. La incorporación de nuevas técnicas, como la implantación del stent sin predilatación, es un nuevo paso hacia delante en el intervencionismo coronario. Sin embargo, se desconoce el impacto que puede tener dicha técnica sobre el fenómeno de restenosis.

#### 1.2.7 INFLAMACIÓN Y RESTENOSIS.

La índole inflamatoria de las placas de ateroma está hoy fuera de toda duda<sup>(54)</sup>, y cabe pensar que la inflamación también desempeña un papel relevante en la génesis de la restenosis coronaria postangioplastia (ACTP). Los patólogos han descrito, en efecto, la presencia de infiltrados de células inflamatorias (monocitos/macrófagos) e inmunocitos (linfocitos T) en el tejido restenosado<sup>(55)</sup>, y los estudios de seguimiento angiográfico han asociado la aparición de la restenosis con la actividad inflamatoria previa o inducida por la ACTP. Esta actividad inflamatoria se ha detectado clínicamente por la activación de los leucocitos circulantes (monocitos y polimorfo celulares), que expresan moléculas de adhesión en la superficie celular<sup>(56)</sup>, el aumento de las citocinas proinflamatorias, y en particular la interleucina 1, 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), producido por los monocitos activados<sup>(57)</sup>, y por el incremento de las proteínas reactantes de la

fase aguda, como la proteína C reactiva sintetizada en el hígado por efecto de la IL-6. Se desconoce, sin embargo, el origen y la naturaleza de esta inflamación, así como su comportamiento a largo plazo, aunque se ha suscitado recientemente la posibilidad de que la actividad inflamatoria/inmunitaria pudiera estar relacionada con una infección local o sistémica, un fenómeno trombótico o un proceso inmunológico específico sobreañadido <sup>(58)</sup>.

Diversos estudios han encontrado un aumento de las concentraciones de IL-6, y TNF- $\alpha$  a las 24-48 h, lo que revela la aparición de la conocida reacción inflamatoria aguda inducida por el traumatismo vascular, en la que están implicados una serie de fenómenos en cadena. Esta reacción de fase aguda es similar a la descrita en pacientes con angina inestable <sup>(59)</sup>. El aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$  post-ACTP presenta una excelente correlación con los valores basales previos a la intervención, independientemente de que se implante un stent o se practique arterectomía. Esto sugiere que la intensidad de la respuesta aguda podría ser considerada un fiel reflejo de la sensibilidad del sistema inflamatorio/inmunitario a los estímulos responsables de la inflamación. La actividad leucocitaria basal se ha encontrado aumentada en algunos casos, lo que podría corresponder a la presencia de un proceso inflamatorio crónico de fondo, de baja intensidad, que se ha sospechado que desempeña un papel etiológico en la cardiopatía isquémica <sup>(60)</sup>.

Entre los hallazgos más relevantes han sido la comprobación, de que los pacientes que desarrollan restenosis presentan un aumento de la actividad inflamatoria que persiste a los 4-6 meses de la intervención, a juzgar por el incremento de monocitos activados (células inflamatorias) y linfocitos T citotóxicos circulantes (células inmunitarias). Los linfocitos T se han descrito también en la fase aguda de la ACTP y en pacientes con angina inestable <sup>(61)</sup>. La persistencia de este estado inflamatorio crónico podría ser la causa de la progresión de la restenosis, como ha sugerido la frecuente observación de monocitos/macrófagos y de linfocitos T, la mayoría de tipo citotóxico/supresor, en el tejido de la restenosis, similar a la descrita en todo tipo de lesiones de ateroma.

La magnitud de este aumento tardío también parece estar relacionada con la actividad leucocitaria de fondo, previa a la ACTP. Esta hipersensibilidad persistente sería superponible a la descrita en los monocitos a los 6 meses del episodio agudo de angina inestable. Sin embargo, no existe ningún dato que permita explicar la persistencia de la actividad inflamatoria.

Recientemente ha despertado gran interés la posibilidad de que los linfocitos T pudieran formar parte de una respuesta específica autoinmune, que potenciaría la inflamación lo cual establecería cierto parentesco de la enfermedad coronaria con otras enfermedades autoinmunes dependientes de los linfocitos T, como la artritis reumatoide <sup>(32)</sup>. En apoyo a esta hipótesis se ha comprobado que los linfocitos T en la placa de ateroma expresan citocina IL-2 RS, lo que se considera un signo fehaciente de que estas células están activadas por antígenos específicos de la placa, y existe, por tanto, una respuesta inmunitaria local. El aumento de los valores plasmáticos de IL-2 RS se ha descrito en la angina estable o inestable, y se ha sugerido que esta elevación podría servir como marcador de restenosis <sup>(62)</sup>.

Se ha sugerido que la activación leucocitaria aguda podría tener lugar en la microcirculación a causa de episodios de isquemia-reperusión, o de la aparición de

necrosis, o cabría invocar la persistencia de una superficie inflamada en la coronaria intervenida o en otras placas, ya que, al parecer, la activación leucocitaria no se produce durante el paso a través de una estenosis intacta.

La interleucina-1 es un mediador dominante de respuestas inmunoinflamatorias, se ha encontrado como determinante significativo de la hiperplasia íntimal y se ha demostrado que estimula la respuesta trombogénica en células endoteliales así como la producción del factor de crecimiento derivado del endotelio. La angioplastia coronaria evoca una marcada activación de monocitos.

En cuanto a interleucina-1, se ha reportado al Alelo 2 del gene de IL-1ra asociado a una incidencia más baja de restenosis intrastent <sup>(96)</sup>, particularmente en pacientes más jóvenes, esto ha apoyado la relación de la inflamación en el desarrollo de restenosis después de la colocación stent. Otro estudio ha reportado que IL-1ra esta asociado a una reducción significativa de neointima después de la lesión. Esto sugiere que las terapias basadas en el antagonismo de IL-1 puedan modular la respuesta de la lesión de la arteria.

### 1.3 INTERLEUCINA-1

La historia del estudio de la interleucina-1 (IL- 1) comienza a mediados del siglo XX, cuando científicos que trataban de explicar la relación entre fiebre e infección/inflamación descubrieron proteínas que actuaban como pirógenos endógenos. El término interleucina fue creado para referirse a aquellas citocinas que median la comunicación entre leucocitos. El nombre IL-1 se asignó inicialmente a productos de macrófagos, mientras que IL-2 se usó para definir los productos de linfocitos <sup>(63)</sup>.

A mediados de los años 80, el uso de IL-1 recombinante permitió establecer que esta es una citocina pleiotrópica, mediadora de la inflamación y de la respuesta inmune. Actualmente se sabe que la IL-1 pertenece a una superfamilia de citocinas que lleva su nombre, la mayoría con propiedades pro inflamatorias dada su habilidad para estimular la expresión de genes asociados con la inflamación <sup>(64)</sup>. La IL-1 $\beta$ , por ejemplo, aumenta la expresión de los genes de la ciclooxigenasa tipo 2 (COX2), la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y la fosfolipasa A tipo 2 (PLA2) <sup>(65)</sup>.

Se han descubierto diez moléculas ligandos del receptor de IL-1, pero sólo cuatro tienen funciones conocidas: tres agonistas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-18) y un antagonista del receptor, IL-1Ra, el cual se une a los receptores de IL-1 sin producir transducción de una señal <sup>(103)</sup>. La ocurrencia natural de un antagonista del receptor específico parece ser un caso único en la biología de las citocinas <sup>(66)</sup>. Los miembros de la superfamilia de IL-1 han sido designados usando la expresión IL-1F para acuñar el concepto de familia; por ejemplo, IL-1F2 corresponde a IL-1 $\beta$  <sup>(67)</sup> (Tabla VI).

**Tabla VI.** Miembros de la superfamilia de IL-1.

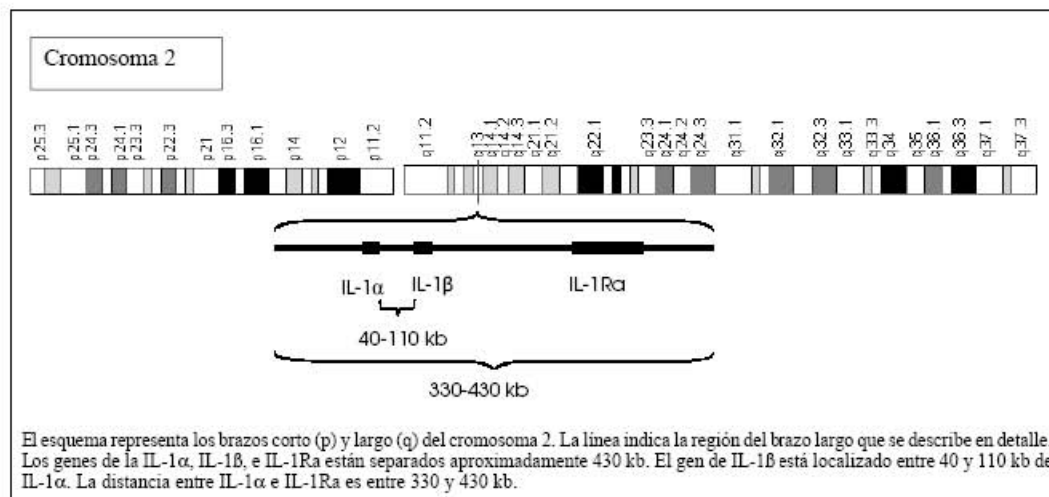
Nuevo nombre	Nombre anterior	Propiedad	Cromosoma
IL-1F1	IL-1 $\alpha$	Agonista	2q
IL-1F2	IL-1 $\beta$	Agonista	2q
IL-1F3	IL-1Ra	Antagonista	2q

IL-1F4	IL-18 factor inductor de Agonista INF $\gamma$ , IL-1 $\gamma$		2q
IL-1F5	IL-1Hy1, FIL-1 $\delta$ , IL-1H $\zeta$ , IL-1RP $\zeta$ , IL-1L1, IL-1 $\delta$	Desconocida	2q
IL-1F6	FIL-1, IL-1 $\epsilon$	Desconocida	2q
IL-1F7	FIL-1 $\zeta$ , IL-1H4, IL-1RP1	Desconocida	2q
IL-1F8	FIL-1h, IL-1H2	Desconocida	2q
IL-1F9	IL1-H1, IL1-RP2	Desconocida	2q
IL-1F10	IL-1Hy2, FKSG75	Desconocida	2q

### 1.3.1 GENES DE LOS LIGANDOS DE LA FAMILIA DE IL-1 Y SUS POLIMORFISMOS

La organización de intrones y exones de los genes de IL-1 sugiere la duplicación de un gen común, hace alrededor de 350 millones de años. Anterior a este gen común IL-1, debió haber existido otro gen ancestral a partir del cual también evolucionaron los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), ya que estas proteínas comparten homologías de aminoácidos, carecen de un péptido señal y forman una estructura terciaria de hojas  $\beta$  plegadas <sup>(68)</sup>.

Los genes de la mayoría de los miembros de la superfamilia de IL-1 están localizados en el brazo largo del cromosoma 2, en la región 2q12-q21. Los genes de la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1Ra están separados aproximadamente 430 kb. Se estima que el gen de IL-1 $\beta$  está localizado entre 40 y 110 kb de IL-1 $\alpha$ . La distancia entre IL-1 $\alpha$  e IL-1Ra es entre 330 y 430 kb <sup>(69)</sup> (Fig. 6).



**Figura 6.** Mapa de la región 2q12-q21.

La IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son codificadas por dos genes distintos de longitudes diferentes (IL-1 $\alpha$ =12 kb; IL-1 $\beta$ =9,7 kb) con organización similar que comprende 7 exones. El mRNA de la IL-1 $\alpha$  tiene una longitud de 2-2,3 kb y el mRNA de la IL-1 $\beta$  una longitud de 1,6-1,7 kb. A nivel de DNA ambos genes muestran una homología de aproximadamente 45% <sup>(107)</sup>. El promotor de la IL-1 $\beta$  es de 10 a 50 veces más fuerte que el de la IL-1 $\alpha$ . No existen cajas TATA en la región promotora del gen de IL-1 $\alpha$  <sup>(70)</sup>. Por el contrario, la región promotora de IL-1 $\beta$  contiene una caja TATA, un motivo típico de los genes inducibles.

El gen de la IL-1Ra tiene 19.6 kb y 5 exones. Existen 3 isoformas conocidas de IL-1Ra: IL-1Ra soluble glicosilado (sIL-1Ra) y dos formas intracelulares no glicosiladas (icIL-1RaI e icIL-1RaII). sIL-1Ra e icIL-1RaI provienen del mismo gen, mediante transcripción alternativa del primer exón. La expresión de sIL-1Ra e icIL-1RaI está regulada por 2 promotores distintos, localizados corriente arriba de cada uno de los primeros exones alternativos con diferentes elementos reguladores de la transcripción. La regulación de la expresión de icIL-1Ra es específica de cada tipo de célula <sup>(71)</sup>.

Los genes de la IL-18, otro miembro de la IL-1F, y de la proteína de unión a la IL-18 (IL-18BP) están localizados en el brazo largo del cromosoma 11, en la región 11q22.2-q22.3. El gen de IL-18 está compuesto de seis exones y cinco intrones, y mide aproximadamente 19,5 kb <sup>(72)</sup>.

### 1.3.2 ESTRUCTURA PROTEICA Y SECRECIÓN.

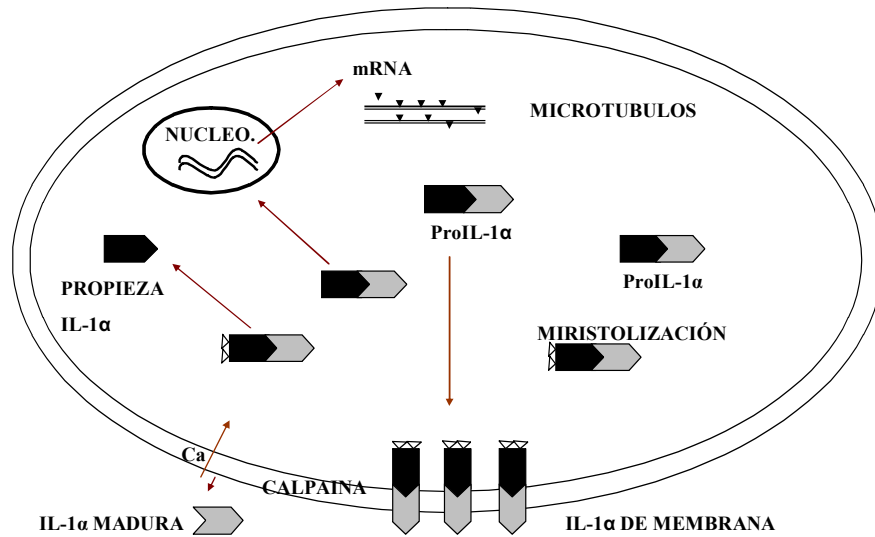
La mayor fuente celular de IL-1, al igual que de factor de necrosis tumoral (TNF), son los fagocitos mononucleares activados. Otras fuentes celulares incluyen neutrófilos, queratinocitos y células endoteliales <sup>(73)</sup>.

La producción de la IL-1 es inducida por productos bacterianos como el lipopolisacárido (LPS) y otras citocinas como el TNF, la IL-2, la IL-3, la IL-12, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de células madre y factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). Otros inductores no microbianos de la secreción de IL-1 son: factores de injuria tisular (hiperosmolaridad, isquemia), sustancias neuroactivas (sustancia P, anfetaminas), moléculas inflamatorias (PCR,  $\alpha$ -1-antitripsina, cristales de urato y de pirofosfato de calcio), factores de la coagulación (plasminógeno, trombina), lípidos (factor activador de plaquetas, LDL oxidadas) y algunos medicamentos como anfotericina-B, bleomicina y colchicina, entre otros <sup>(74)</sup>.

La IL-1 $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  son sintetizadas como precursores sin secuencia líder, es decir, que carecen de una secuencia guía para definir la localización final del producto de la traducción ribosomal. El peso molecular de cada precursor es 31 kD. A diferencia de IL-1Ra, el procesamiento de IL-1 $\alpha$  y de IL-1 $\beta$  hacia formas “maduras” de 17 kD requiere de proteasas celulares específicas <sup>(75)</sup>.

El precursor de la IL-1 $\alpha$  (proIL-1 $\alpha$ ) tiene 271 aminoácidos y es sintetizado en los ribosomas asociados a estructuras del citoesqueleto (microtúbulos), a diferencia de la mayoría de proteínas que son traducidas en el retículo endoplasmático. ProIL-1 $\alpha$  es biológicamente activa y permanece en el citosol debido a la falta de un péptido señal.

Intracelularmente, proIL-1a parece actuar a través de una señal de localización nuclear que se encuentra entre los residuos 70-85 de la región precursora. En la superficie celular, IL-1a se encuentra unida a la membrana mediante una lisina miristoilada en la región pro, esto ocurre tanto adentro como en la superficie celular. Cuando las células mueren se libera pro-IL1a, que puede ser clivada por proteasas extracelulares <sup>(76)</sup>. La forma madura de 159 aminoácidos también se puede producir por acción de enzimas asociadas a la membrana y dependientes de calcio, llamadas calpains (Figura 7). A diferencia de la IL-1 $\beta$ , la IL-1 $\alpha$  no se encuentra en la circulación ni en los fluidos corporales, excepto durante condiciones patológicas <sup>(77)</sup>.

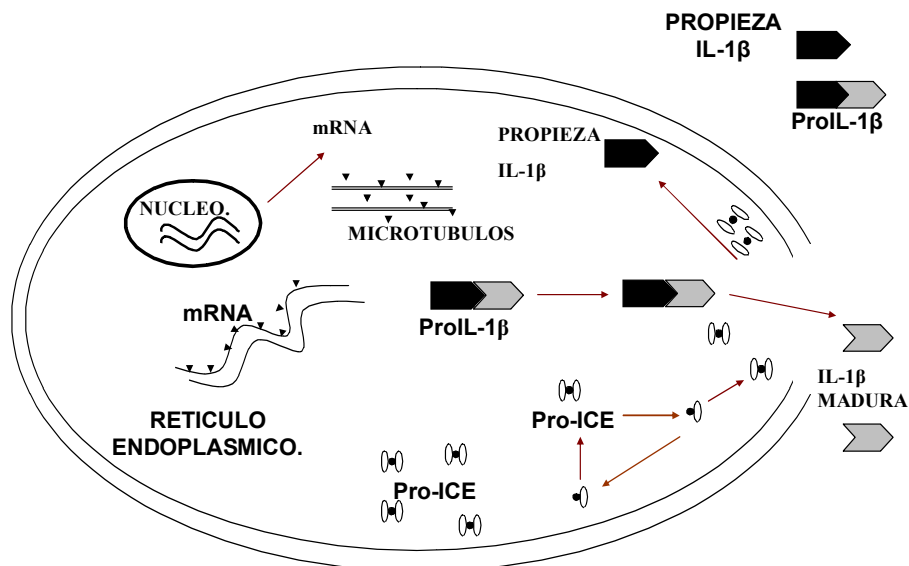


**FIGURA 7. Síntesis de Interleucina-1 $\alpha$ .** El mRNA que codifica para pro-IL-1 $\alpha$  es traducido en ribosomas asociados a microtúbulos. Pro IL-1 $\alpha$  permanece en el citosol, donde ocurre un proceso de miristolización. Luego, pro-IL-1 $\alpha$  es translocada a la membrana celular donde puede ser clivada por calpains mediante un proceso dependiente de calcio, para que finalmente la IL-1 $\alpha$  sea liberada como forma madura de 17 kD. Pro-IL-1 $\alpha$  puede también ser liberada de una célula apoptótica. Tanto la propieza de IL-1 $\alpha$  (aminoácidos 1-115), la cual es liberada durante el clivaje, como la pro-IL-1 $\alpha$  pueden unirse al DNA nuclear.

Después de ser sintetizada, la IL-1 $\beta$  permanece primariamente en el citosol hasta ser clivada y transportada fuera de la célula. La proIL-1 $\beta$  debe ser procesada por la enzima convertidora de IL1- $\beta$  (ICE), también conocida como caspasa-1, para ser funcional. La caspasa-1, además, está implicada en procesos de apoptosis.

La propieza de IL-1 $\beta$  (aminoácidos 1-116) también está miristoilada en los residuos de lisina, pero a diferencia de la IL-1 $\alpha$ , la proIL-1 $\beta$  no tiene forma de membrana y es sólo marginalmente activa. La liberación de IL-1 $\beta$  madura parece estar asociada al clivaje entre los residuos de ácido aspártico-alanina (aminoácidos 116-117) por la ICE (Figura 8). Existen al menos cinco isoformas de ICE (ICE  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ); ICE $\alpha$  está implicada en el autoprosesamiento del precursor de ICE y de proIL-1. La liberación de IL-18 madura, también requiere de la acción de ICE <sup>(78)</sup>.

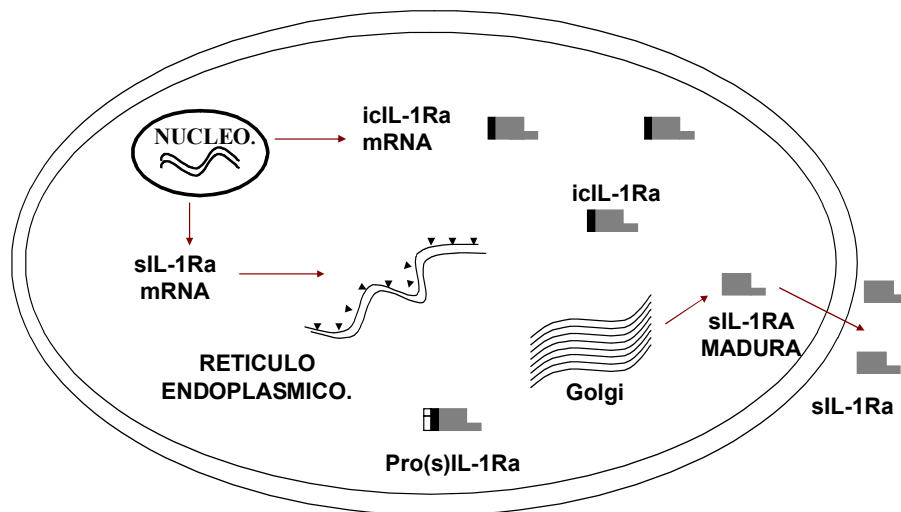




**FIGURA 8. Síntesis de IL-1 $\beta$ .** mRNA que codifica para pro-IL-1 $\beta$  es traducido en polisomas en el citosol asociados con microtúbulos. Pro-IL-1 $\beta$  permanece en el citosol hasta ser clivada por la enzima convertidora de IL-1 $\beta$  (ICE). Antes del clivaje, pro-IL-1 $\beta$  puede ser miristoilada para facilitar su localización en la membrana celular. ICE es traducida en el retículo endoplásmico como un precursor inactivo (pro-ICE), permanece citosólica y requiere dos clivajes internos (también por ICE) para formar un heterodímero enzimáticamente activo. Luego, dos heterodímeros forman un tetrámero en asociación con dos moléculas de pro-IL-1 $\beta$  y el clivaje ocurre. Después del clivaje la IL-1 $\beta$  de 17 kD es secretada al medio extracelular a través de un canal de membrana. La propieza de IL-1 $\beta$  (aminoácidos 1-116) puede encontrarse tanto dentro como fuera de la célula. Una pequeña cantidad de pro-IL-1 $\beta$  puede ser transportada en células intactas, presumiblemente a través del mismo canal. En ausencia de ICE, pro-IL-1 $\beta$  puede ser clivado por proteasas extracelulares.

El precursor de IL-1 $\beta$  puede ser encontrado a nivel extracelular en modelos murinos con inhibidores específicos de la ICE. Se cree que la pro-IL1 $\beta$  es liberada durante la muerte celular y es procesada por proteasas extracelulares (gelatinasa-B, metaloproteinasas 2, 3 y 9) dando lugar a la forma madura biológicamente activa <sup>(79)</sup>.

Al igual que los agonistas de la superfamilia de IL-1, IL-1Ra tiene una estructura cristalográfica de hojas  $\beta$ -plegadas. El sIL-1Ra es traducido como una proteína de 17-kDa de 177 aminoácidos con una secuencia líder de 25 aminoácidos. Después del procesamiento, que incluye clivaje de la secuencia líder y glicosilación, ésta es secretada por la vía clásica de retículo endoplásmico –Golgi– vesículas secretoras, al ambiente extracelular. Las formas intracelulares del IL-1Ra no son glicosiladas, no poseen secuencia líder y permanecen en un compartimento intracelular (Figura 9). El icIL-1Ra II se deriva de la iniciación alternativa de la traducción a partir de mRNA de sIL-1Ra o mRNA de icIL-1Ra II. Dos formas distintas de icIL-1Ra II han sido descritas <sup>(80)</sup>.



**Figura 9. Síntesis de IL-1Ra.** El transcrito primario de pro(s) IL-1Ra (la forma soluble de la proteína) es traducido en el retículo endoplásmico y transportado al aparato de Golgi. Después del clivaje de la secuencia llevadora, sIL-1Ra es secretado de la célula. icIL-1Ra (forma intracelular) es traducido y permanece intracelularmente, donde se cree que inhibe la unión intracelular de IL-1a a receptores nucleares.

### 1.3.3 RECEPTORES

Los receptores de IL-1 (IL-1R) han sido reconocidos como parte de la superfamilia de los receptores IL-1/Toll-Like (TLR), cuyos miembros participan en la respuesta inmune innata y en la inflamación. Esta superfamilia incluye también los receptores de la IL-18 y receptores para productos bacterianos como el LPS derivado de bacterias Gram-negativas y el péptidoglicano derivado de las Gram-positivas.

Con base en la similitud de las secuencias en el dominio extracelular es posible dividir la superfamilia IL-1R/TLR en subgrupos principales:

1. El primero de estos incluye el miembro fundador IL-1R1 y los demás receptores de IL-1. Todos los miembros de este subgrupo contienen dominios extracelulares de inmunoglobulina.
2. El segundo subgrupo se caracteriza por la presencia de series de repetición de leucina (LRRs) en lugar de dominios Ig extracelularmente. El miembro fundador de este grupo es Toll.
3. El tercer subgrupo comprende proteínas citosólicas con dominios TIR, que actúan como adaptadores. Este subgrupo incluye MyD88, dMyD88, xnMyD88, Mal y TRIF<sup>(82)</sup>.

La familia de receptores de IL-1 está formada por 9 miembros, algunos de los cuales permanecen todavía como receptores huérfanos. Como se muestra en la Tabla VIII, la nomenclatura de estos receptores se basa en el orden de su descubrimiento. La proteína

ligadora de IL-18 (IL-18BP) no se incluye en la lista de estos receptores debido a que no se fija a la célula a través de un dominio transmembranal. Probablemente, la IL-18BP representa el receptor señuelo de IL-18 que antes estaba unido a la membrana, en forma similar al receptor señuelo de IL-1 (IL-1RII). La existencia de estos receptores señuelo es un fenómeno único dentro de las citocinas <sup>(83)</sup>.

La IL-1 se une a dos tipos específicos de receptores membranales con consecuencias diferentes para la célula blanco: la unión de IL-1 con el receptor tipo I (IL-1RI) produce un cambio conformacional del receptor generando la transducción de una señal, en tanto que el receptor tipo II (IL-1R2) capta la IL-1, pero no produce señal. El receptor tipo I (IL-1RI) es responsable de todos los efectos biológicos de IL-1. Este receptor es una glicoproteína transmembranal monomérica de 80kDa, que se expresa constitutivamente en los linfocitos T, fibroblastos, condrocitos, células endoteliales y células de músculo liso. La unión de IL-1 a IL-1RI es necesaria pero no suficiente para producir actividad biológica. La transducción de la señal a través de IL-1RI requiere el reclutamiento de la proteína accesoria del receptor de IL-1 (IL-1RacP). Ésta es una proteína de 570 aminoácidos, homóloga de ambos receptores <sup>(84)</sup>.

A pesar de ser el ligando con mayor afinidad por IL-1RI, IL-1Ra no activa la asociación con IL-1RacP, por lo cual no desencadena transducción de la señal. La IL-1 $\beta$  es el ligando con menor afinidad por la forma de membrana de IL-1RI. <sup>(85)</sup>

El IL-1RII es una glicoproteína de 68-kDa con un dominio intracitoplasmático pequeño, en comparación con IL-1RI. Se expresa en las mismas células que IL-1RI, con excepción de las células endoteliales. El IL-1RII no puede transducir una señal y compite con IL-1RI por IL-1. Además, compite por la dimerización con IL-1RacP, sustrayendo esta proteína de los complejos de señalización IL-1/IL-1RI. Esta función regulatoria de IL-1RII puede ser especialmente relevante a bajas concentraciones de IL-1, particularmente de IL-1 $\beta$ , debido a que es el ligando que se une con una mayor afinidad a IL-1RII. La afinidad de IL-1Ra por este receptor es la más baja de los tres ligandos. <sup>(86)</sup>

La IL-1 es una potente citocina inflamatoria e inmunorreguladora. La producción y liberación prolongada de IL-1 y sus efectos biológicos, pueden aumentar el riesgo de daños patológicos. Por lo tanto, la producción de IL-1 debe estar fuertemente regulada a distintos niveles incluyendo la producción, disponibilidad en el sitio de inflamación y función biológica mediada por receptores. A bajas concentraciones de IL-1, el exceso relativo de IL-1RII vs. IL-1RI captura las pocas moléculas de IL-1 disponibles y por lo tanto, no hay señalización. La expresión de IL-1RII puede ser modificada por diversas señales externas. Los agentes antiinflamatorios (IL-4, IL-13, glucocorticoides) pueden regular positivamente la expresión de IL-1RII aumentando la síntesis *de novo* <sup>(87)</sup>.

Las formas solubles de IL-1RI e IL-1RII se producen por proteólisis de los dominios extracelulares de los receptores de membrana. Una metaloproteinasa aún no identificada es la responsable del clivaje de los dominios extracelulares de IL-1RI e IL-1RII. Estas formas solubles pueden ser detectadas en el suero y la orina de personas sanas y también en diferentes fluidos inflamatorios, donde funcionan como amortiguadores naturales de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-1Ra <sup>(88)</sup>.

Los niveles de sIL-1RII son levemente más altos que los de sIL-1RI, tanto en sujetos saludables como en condiciones patológicas. La afinidad de los receptores solubles por IL-1 e IL-1Ra es igual a la de las formas de membrana. Es decir, que para el sIL-1RI el ligando de mayor afinidad es IL-1Ra y el de menor afinidad es IL-1 $\beta$ , y a la inversa para sIL-1RII <sup>(89)</sup>.

El receptor de IL-18 (IL-18R), consiste de dos subunidades: una cadena de señalización, IL-18Ra, y una cadena de unión, IL-18R $\beta$ . Después de la formación de la unión de IL-18 a IL-18Ra, la cadena  $\beta$  es reclutada al complejo. La unión de IL-18 a la cadena  $\beta$ , no ocurre sin la unión previa del ligando a la cadena  $\alpha$ . La coexpresión de estas dos cadenas sólo se da en células Th1 <sup>(90)</sup>.

La proteína ligadora de IL-18 (IL-18BP), funciona como un receptor señuelo de IL-18. Éste es un receptor soluble, que aparentemente ha perdido su dominio transmembranal y que actúa en forma similar a sIL-1RI y sIL-1RII. La alta afinidad de IL-18 por la proteína ligadora, así como las altas concentraciones de esta proteína en la circulación hacen que la mayoría de la IL-18 se encuentre unida a IL-18 BP en sujetos sanos y enfermos <sup>(91, 92)</sup>.

#### 1.3.4 FUNCIÓN BIOLÓGICA.

La interleucina-1 (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) es la citocina “multifuncional” prototípica. La IL-1 afecta a casi todos los tipos celulares y a menudo actúa en conjunto con otras citocinas o pequeñas moléculas mediadoras. Además, es considerada la citocina pro inflamatoria más importante junto con el TNF <sup>(93)</sup> y la acción de estas citocinas es en gran parte redundante.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* han mostrado múltiples efectos biológicos tanto de IL-1 $\alpha$  como de IL-1 $\beta$ , sin mucha especificidad. La base para la gran variedad de propiedades de la IL-1 es el efecto de esta única citocina en la expresión de varios genes, como es el caso de aquellos genes inducibles que responden a retos endógenos o exógenos. Esto incluye la habilidad de IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  para aumentar la expresión de la familia de genes de IL-1. En forma similar, los genes de otras citocinas inflamatorias, factores de crecimiento de linfocitos, factores estimuladores de colonias y factores de crecimiento mesenquimal, son estimulados por IL-1. En contraste, algunos genes expresados constitutivamente son regulados negativamente por IL-1.

La expresión aumentada de COX2, iNOS y PLA2, induce la producción de prostaglandina E2, óxido nítrico y factor activador plaquetario, respectivamente. Estos mediadores son responsables de los principales efectos biológicos de IL-1, que incluyen: aumento de expresión de moléculas de adhesión celular en los sitios de inflamación, activación de fagocitos, coestimulación de células presentadoras de antígenos y linfocitos T, proliferación de linfocitos B, hematopoyesis y resorción ósea. La IL-18, como muchas otras citocinas, actúa tanto en la inmunidad innata como en la adquirida <sup>(94)</sup>.

La IL-18 induce la proliferación de clones Th1 y regula positivamente la expresión de IL-2Ra y la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF por estas células. Además de su

función coestimuladora de citocinas Th1, la IL-18 aumenta la citotoxicidad de las células T <sup>(95)</sup> y estimula la expresión de Fas ligando en las células asesinas naturales (NK). También actúa directamente como una citocina pro inflamatoria induciendo las quimiocinas CC y CXC, IL-8 e IL-18 en sí misma <sup>(115)</sup>. Esta citocina tiene acción sinérgica con IL-12.

## **2. JUSTIFICACION**

Gran parte de la variabilidad del genoma humano se atribuye a los SNPs. La elevada frecuencia de SNPs encontrada en el genoma humano (uno por cada 1.000-2.000 pares de bases) hace que sean de gran utilidad en la caracterización de rasgos fenotípicos y en el estudio de enfermedades <sup>(129)</sup>. En los últimos años se ha propuesto que los SNPs supondrían la nueva generación de marcadores para la identificación de locus asociados a patologías complejas, y se han utilizado en enfermedades como la hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, enfermedad coronaria, diabetes y recientemente con la restenosis. El análisis de la posible asociación de SNPs con el mayor riesgo de desarrollar enfermedades como la restenosis es uno de los principales retos, así como la posible relación con la respuesta a fármacos y con la aparición de efectos adversos.

Desde que fue demostrada la reducción de la tasa de restenosis con stent en comparación con la angioplastia coronaria con balón, su utilización se ha incrementado en forma exponencial. Aunque la tasa de restenosis es menor, esta continúa siendo un problema terapéutico no resuelto.

La etiología de la restenosis ha sido objeto de intenso estudio durante las últimas décadas. Dado que los factores de riesgo clásico sólo explican a lo sumo la mitad de los casos, se están buscando nuevos factores etiológicos en el ámbito de la genética molecular. Los polimorfismos son mutaciones del ADN, que apenas alteran la función de la proteína codificada, pero son frecuentes y pueden ser un factor de riesgo genético cuando el organismo se enfrenta a determinados factores de riesgo ambientales. Los recientes avances en biología molecular han facilitado la detección de numerosos polimorfismos que pueden tener un efecto patógeno, y han hecho pensar en la hipótesis de que la suma de polimorfismos desfavorables y un marco ambiental propicio puede facilitar la aparición de enfermedades típicamente poligénicas y multifactoriales.

En la actualidad se implantan stents en más del 80% de las lesiones tratadas por PCI y se tiene una tasa de REIS de alrededor del 20% para stents convencionales. Esta respuesta parece deberse en parte a diferencias genéticas entre los individuos. El definir marcadores genéticos que permitan predecir REIS en pacientes es fundamental para intentar mejorar las decisiones de tratamiento así como la vigilancia de los pacientes de alto riesgo.

Son pocos los estudios que han investigado la asociación de los polimorfismos de IL-1 con el riesgo de padecer restenosis intra-stent. Entre los polimorfismos que se han estudiado está el IL-1B -511 C/T del cual no se ha encontrado asociación en otras poblaciones <sup>(137)</sup>, IL-1RN-VNTR en donde se encontró que el alelo 2, es protector para restenosis <sup>(138)</sup>. Hasta ahora se desconoce la influencia de estos polimorfismos en la población Mexicana, en el desarrollo de restenosis intra-stent.

### **3. HIPOTESIS**

Considerando que la patogénesis de la restenosis después de la colocación del stent coronario tiene un componente inflamatorio importante, se espera que los polimorfismos del gen de IL-1 y del antagonista de su receptor confieran susceptibilidad al desarrollo de restenosis intra-stent.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Analizar la posible asociación de algún polimorfismo específico en gen de IL-1 y del antagonista de su receptor con restenosis intra-stent en la población mexicana.

### **4.2 Objetivos particulares**

1. Identificar y establecer la frecuencia y distribución de los polimorfismos del gen de IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ -511), IL-1F10 (IL-1F10.3) y del antagonista de su receptor (R/N.4T>C, RN.6/1C>T, RN.6/2C>G, IL-1RVNTR).
2. Comparar la frecuencia y distribución de los distintos alelos detectados en los pacientes con restenosis y los que no la presentan



## **5. MATERIAL Y METODOS**

Para este estudio se reclutaron un total de 114 individuos mexicanos a quienes se les implantó un stent coronario en el Instituto Nacional de Cardiología en el último año y de los cuales se tuvo un seguimiento de control angiográfico al menos 6 meses después de su intervención. La población se dividió en dos grupos: el primer grupo se formó con 40 individuos con restenosis y el grupo control con 74 pacientes que no la presentaron y lo más similares, en cuanto a hábitos al primer grupo. El grupo incluirá 40 pacientes con restenosis y 74 pacientes que no la presentaron. Todos los individuos que participaron en los estudios dieron su consentimiento previo.

### **4.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

- Pacientes mexicanos.
- Antecedente de colocación de al menos un stent sobre un vaso nativo coronario en el Instituto Nacional de Cardiología en los últimos 30 meses.
- Realización de coronariografía de control al menos 6 meses después de la intervención.
- Localización del expediente completo y de los angiogramas coronarios.

### **4.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

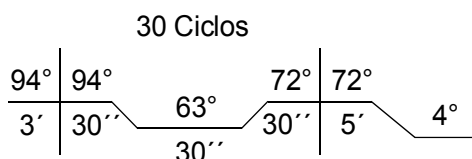
- Incapacidad de comparación de las coronariografías.

Los angiogramas del intervencionismo y de control se evaluaron para determinar presencia de restenosis, por dos médicos adjuntos al servicio de hemodinámica del instituto, que no hayan participado en los cateterismos del enfermo.

Definición operacional: estenosis mayor al 50 % dentro o 2 mm., adyacentes a los bordes externos de un stent. Pérdida mayor al 50 % del lumen obtenido durante la PCI.

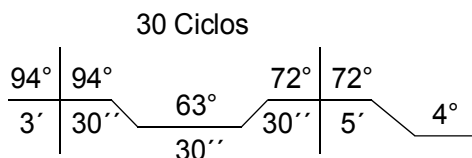
**4.4 Extracción del DNA: Aislamiento y purificación del DNA total.** Se extrajo a partir de sangre periférica mediante la técnica de expulsión salina. El DNA se cuantificó en un espectrofotómetro y se llevó a una concentración de 200ng/ $\mu$ l para ser utilizado.

**4.5 Determinación del polimorfismo del gen IL-1 $\beta$  (IL-1B-511) y del antagonista de su receptor (RN.6/2C>G).** Ambos polimorfismos se determinaron por la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Los sitios polimórficos fueron amplificados utilizando iniciadores específicos (Tabla 6). La reacción de PCR (Amplificación) se realizó en un equipo PCR System 9700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, USA), con las siguientes condiciones de amplificación



Los fragmentos obtenidos fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción Ava I y Fok I respectivamente, durante 4 horas a 37°C. Los tamaños fueron verificados en geles de agarosa al 3%. La asignación de los alelos se realizó al comparar con un marcador de peso molecular conocido.

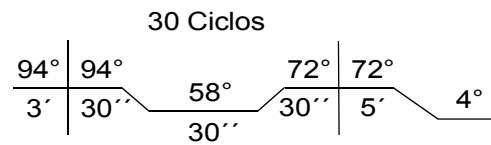
**4.6 Determinación del polimorfismo del gen IL-1F10 (IL-1F10.3) y del antagonista de su receptor (RN.4T>C, RN.6/1C>T).** Cada sitio polimorfito fue amplificado usando la técnica de restricción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un Termociclador EP GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones de amplificación



El amplificado fue purificado a través de una exonucleasa (EXOSAP-IP, clean-up, USB Corporation, USA), posteriormente se llevo a cabo una PCR de secuenciación utilizando los primers específicos para cada región (Tabla 6) con Big Dye Terminador v3.1 (Applied Biosystems) posteriormente las muestras fueron purificadas por medio de columnas de Sephadex G-50 Fine (Amersham Biociences), el producto de la purificación se desnaturalizo con formamida por un periodo de 5 minutos a 95°C, estas muestras fueron analizadas en un secuenciador 3130 con un arreglo de 36cm y polímero POP-7 (Applied Biosystems).

**4.7 Determinación del polimorfismo IL1R VNTR.** Se determino por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando las siguientes condiciones de amplificación

*Efecto de los polimorfismos del gen de IL-1 y del antagonista de su receptor en restenosis en pacientes con stents coronarios.*



Los fragmentos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. La asignación de los alelos se realizó al comparar con un marcador de peso molecular conocido.

<b>IL-1<math>\beta</math></b>	IL-1B-511	5'-ACTTAAGTTTAGGAATCTTCCCACT-3' 5'GAGCTTATCTCCAGGGTTGC-3'
<b>IL-1F10</b>	IL-1F10.3	5'-CAAGGTGGTGATTCAGAGCA-3' 5'-GGGAGGAAAGGGAAGAAGAG-3'
<b>Antagonista de IL-1</b>	R/N.4T>C	5'-ACAAGTTCTGGGGGACACAG-3' 5'-AGACAGACGGGCAAAGTGAC-3'
	RN.6/1C>T	5'-CACCTGCCCATCTTTTGATT-3' 5'-CCTTCGTCAGGCATATTGGT-3'
	RN.6/2C>G	5'-TCTACTTCCAGGAGGACGAGTAGTA-3' 5'-GGAGGCAGAGTCCTGTGACCAGGAT-3'
	IL-1RVNTR	5'-CTCAGCAACACTCCTAT-3' 5'-TCCTGGTCTGCAGGTAA-3'

**Tabla 6.** Iniciadores que fueron utilizados para la secuenciación de los distintos polimorfismos.

Condiciones de reacción de PCR para todos los sitios polimórficos.

H2O	10.8 $\mu$ L
Buffer 10x	2.5 $\mu$ L
DNTP's [10mM]	4.0 $\mu$ L
Primer 1 [10 $\mu$ mol/ $\mu$ l]	2.5 $\mu$ L
Primer 2 [10 $\mu$ mol/ $\mu$ l]	2.5 $\mu$ L

Taq Pol. 5 u/ $\mu$ l	0.125 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> 25mM	1.5 $\mu$ L
DNA 200ng/ $\mu$ l	2.0 $\mu$ L
	<hr/>
	25.0 $\mu$ L

**4.8 Análisis de resultados.** Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron por conteo directo. Las frecuencias en los grupos de estudio fueron comparadas utilizando pruebas estadísticas no paramétricas como la chi-cuadrada y la exacta de Fisher. El valor de p fue corregido multiplicando por el número de comparaciones realizadas y se considerará significativo por debajo de 0.05. El riesgo relativo para cada comparación fue definido como razón de momios utilizando el método de Woolf<sup>(26)</sup>.

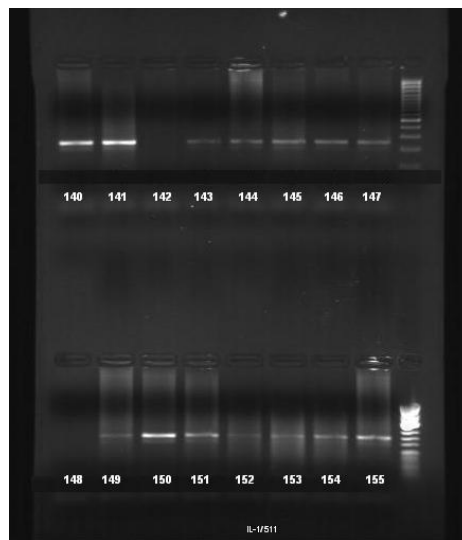
## 6. RESULTADOS.

### IL-1B-511.

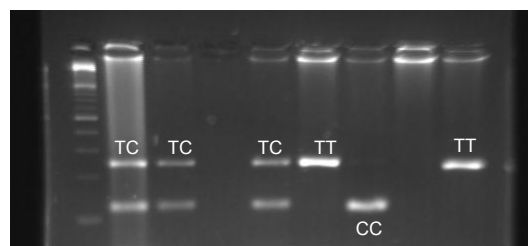
La figura 10 muestra un gel de agarosa al 1.5% en el cual se pueden apreciar los productos de PCR obtenidos al amplificar IL-1 $\beta$ -511 (250 pb). La figura 11 muestra el análisis por RFLPs en donde se observan los sitios de corte y no corte para la enzima Ava I. El genotipo homocigoto para el corte (T/T) o para el no corte (C/C) y el heterocigoto (T/C) en los individuos ahí analizados.

La tabla 7 muestra la distribución de los genotipos de IL-1B-511 en la población general y subdividida en población con restenosis y población control.

En la población total la frecuencia del genotipo T/T es de 0.46, la de T/C de 0.44 y 0.08 la que le corresponde a los homocigotos C/C. No encontramos ningún individuo con restenosis con el genotipo homocigoto C/C. Las frecuencias genotípicas observadas en los dos grupos (Restenosis y no restenosis) fueron congruentes de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg.



**Figura 10.** Gel al 1,5% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, muestra la amplificación de IL-1B-511, marcador estándar Ready-Load 100 bp, amplificado de 250 pb.



**Figura 11.** Perfiles de restricción tras la digestión, del producto de PCR utilizando la enzima Ava I.

**Tabla 7:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1B-511 con restenosis.

<b>IL-1B-511.</b>						
<b>Genotipo</b>	<b>Restenosis</b>		<b>No Restenosis</b>		<b>p</b>	<b>RM(IC95%)</b>
	<b>N</b>	<b>Frec.</b>	<b>N</b>	<b>Frec.</b>		
TT	25	0.625	28	0.378	0.011	2.7 (1.1-6.5)
TC	15	0.375	36	0.486	0.253	0.6 (0.26 -1.4)
CC	0	0	10	0.135	0.014	0 ( 0-0.63)
<b>Alelos</b>						
T	65	0.812	92	0.621	0.003	2.6 (1.3-5.4)
C	15	0.187	56	0.378	0.003	0.3 (0.18-0.75)

La frecuencia del alelo T en los controles fue de 0.6. Los pacientes con restenosis presentaron una frecuencia de 0.8 para este alelo, lo que hace que se detectaran diferencias entre las frecuencias alélicas para ambos grupos. Encontramos que el genotipo homocigoto T/T se asocia con un incremento de riesgo para la restenosis.

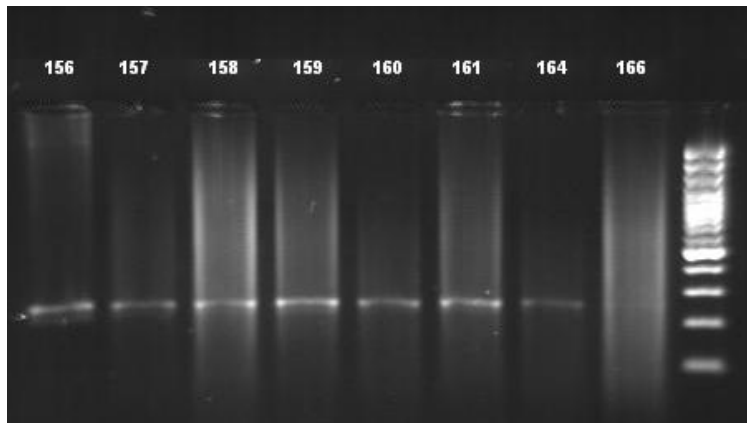
#### **IL-1 RN.6/2C**

En la tabla 8 se muestran las frecuencias genotípicas y alélicas, así como los efectos de los genotipos de IL-1 RN.6/2C sobre el riesgo de restenosis en la población en estudio. No hallamos diferencias entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg, ni en pacientes con restenosis ni en controles.

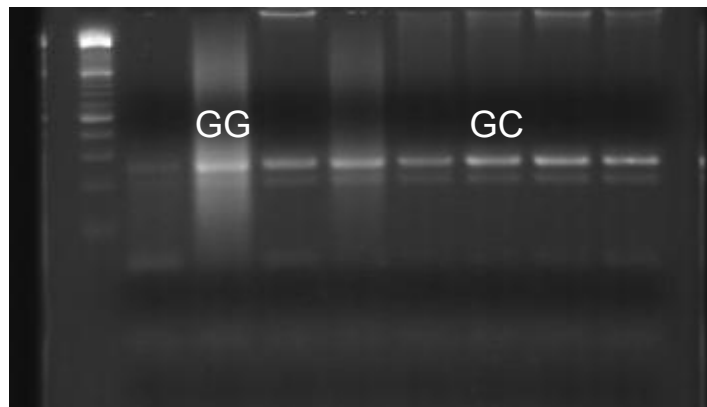
No detectamos diferencias entre las frecuencias alélicas y genotípicas entre ambos grupos.

**Tabla 8:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1RN.6/2C con restenosis

<b>IL-1 RN.6/2C.</b>						
<b>Genotipo</b>	<b>Restenosis</b>		<b>No Restenosis</b>		<b>p</b>	<b>RM(IC95%)</b>
	<b>N</b>	<b>Frec.</b>	<b>N</b>	<b>Frec.</b>		
GG	32	0.8	54	0.729	0.405	1.4 (0.5- 4.3)
GC	7	0.175	20	0.270	0.253	0.5 (0.18-1.6)
CC	1	0.025	0	0	0.171	0
<b>Alelos</b>						
G	71	0.8875	128	0.8648	0.62	1.2 (0.50 -3.2)
C	9	0.1125	20	0.1351	0.62	0.81 (0.30-1.9)



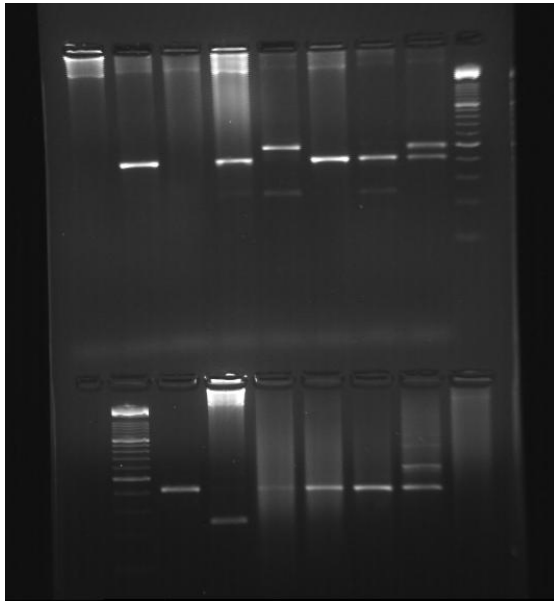
**Figura 12.** Gel al 1,5% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, muestra la amplificación por IL-1 RN.6/2C, marcador estándar Ready-Load 100 bp, amplificado de 240 pb.



**Figura 13.** Perfiles de restricción tras la digestión, del producto de PCR utilizando la enzima Ava I.

### **IL-1R VNTR**

La distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas, en la población total y separada en pacientes con restenosis y sin restenosis, se resume en la tabla 9, donde podemos apreciar que son similares para ambos grupos, indicando que no existe relación entre este polimorfismo y restenosis. Estas frecuencias difieren de las obtenidas en estudios previos (137, 138), en los cuales se detectó al alelo 2 como protector para restenosis. Las frecuencias genotípicas están en equilibrio de Hardy-Weinberg.



Alelo	tamaño
1	410
2	240
3	500
4	325
5	595

**Figura 14.** PCR del polimorfismo IL-1RN-VNTR

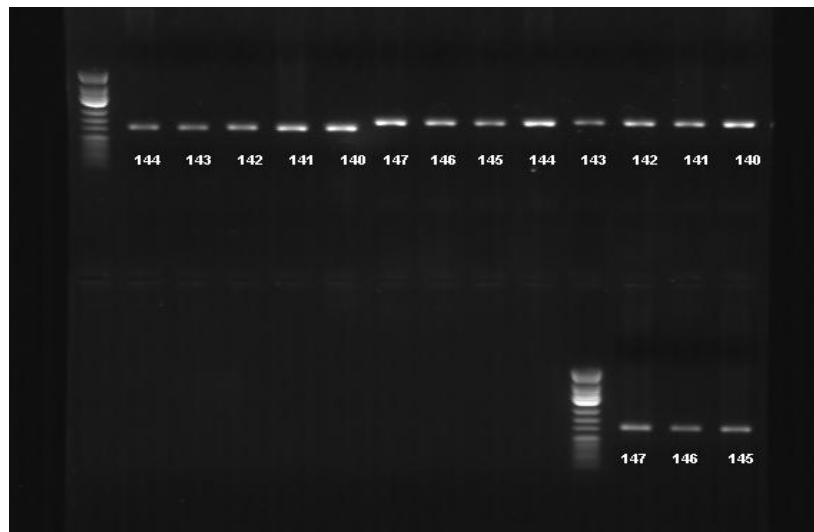
**Tabla 9:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1R VNTR con restenosis.

IL-1R VNTR						
Genotipo	Restenosis		No Restenosis		p	RM(IC95%)
	N	Frec.	N	Frec.		
	40		74			
1,1	25	0.625	47	0.648		
1,2	5	0.125	10	0.135		
1,3	1	0.025	1	0.013		
1,4	1	0.025	1	0.013		
2,2	7	0.175	12	0.162		
2,3	0	0	1	0.013		
3,3	0	0	2	0.027		
4,4	1	0.025	0	0		
<b>Alelos</b>						
1	57	0.7125	106	0.7162	0.952	0.98 (0.51-1.8)
2	19	0.2375	35	0.2364	0.986	1.0 (0.49-1.9)
3	1	0.0125	6	0.0405	0.241	0.2 (.006 -2.5)
4	3	0.0375	1	0.0067	0.09	5.7 (0.44-302)

#### IL-1-C-RN.4T

En la distribución de los genotipos no apreciamos diferencias de carácter significativo. En este polimorfismo las frecuencias genotípicas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg en la población control, pero no es así en la población total ni en los pacientes que desarrollaron restenosis como consecuencia de que en estos últimos, se observa mayor número de heterocigotos que lo esperado.





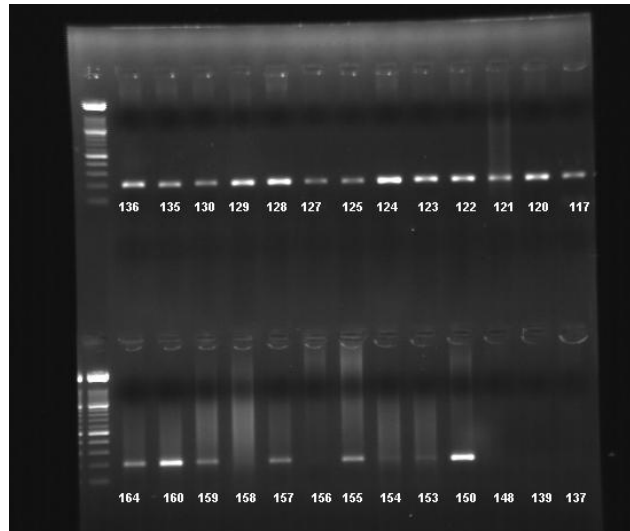
**Figura 15.** Gel al 1,5% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, muestra la amplificación por IL-1-C-RN.4T, marcador estándar Ready-Load 100 bp, amplificado de 300 pb.

**Tabla 10:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1-C-RN.4T con restenosis.

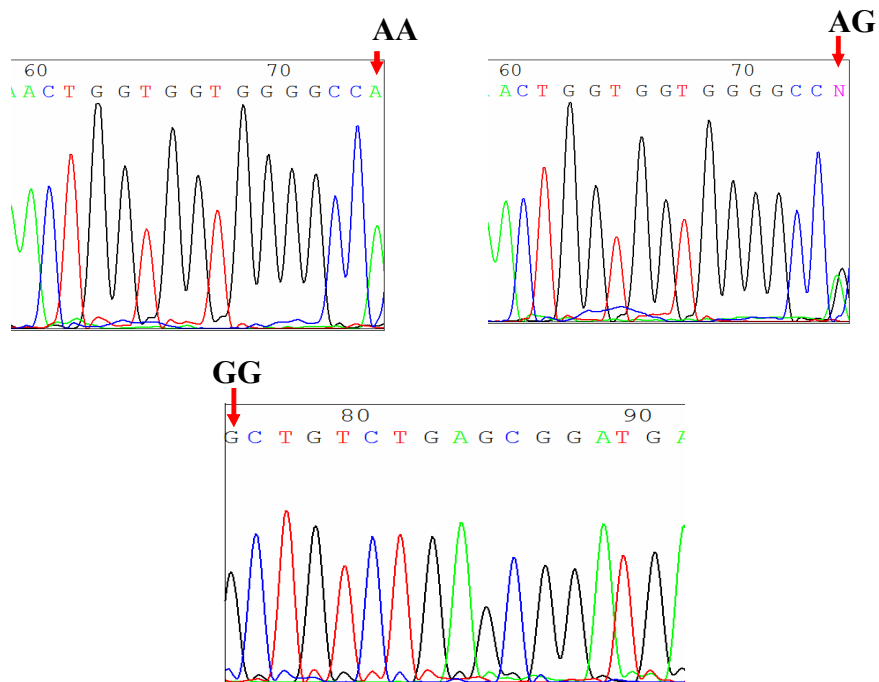
IL-1-C-RN.4T						
	Restenosis		No Restenosis		p	RM(IC95%)
	N	Frec.	N	Frec.		
<b>Genotipo</b>	40		74			
TT	33	0.825	55	0.7432	0.320	1.6 (0.57- 5.07)
TC	3	0.075	16	0.2162	0.053	0.29 (0.05-1.1)
CC	4	0.1	3	0.0405	0.206	2.6 (0.41-18.7)
<b>Alelos</b>						
T	69	0.8625	126	0.851	0.819	1.09 (0.47-2.6)
C	11	0.1375	22	0.148	0.819	0.91 (0.37-2.1)

#### IL-1-D-RN.6/1C

El polimorfismo IL-1-D-RN.6/1C no resulto estar asociado con restenosis, como se puede observar en la tabla 11. La población total no esta en concordancia con el equilibrio de Hardy-Weiberg, como consecuencia de que el genotipo heterocigoto T/C para el grupo control tiene un valor por debajo de lo esperado según el equilibrio.



**Figura 16.** Gel al 1,5% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, muestra la amplificación por PCR IL-1-D-RN.6/1C, marcador estándar Ready-Load 100 bp, amplificado de 200 pb.



**Figura 17.** Análisis de la secuencia del amplificado de IL-1-D-RN.6/1C. Se observa las variantes del genotipo, AA, GA Y GG

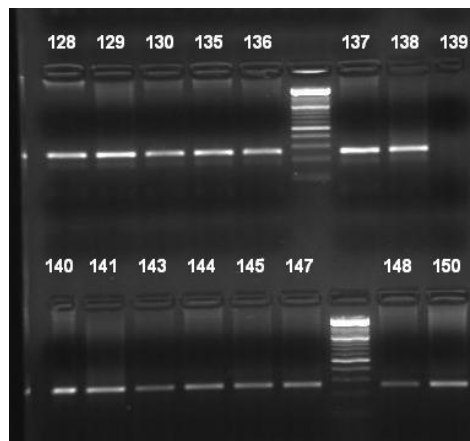
**Tabla 11:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1-D-RN.6/1C con restenosis

*Efecto de los polimorfismos del gen de IL-1 y del antagonista de su receptor en restenosis en pacientes con stents coronarios.*

IL-1-D-RN.6/1C						
Genotipo	Restenosis		No Restenosis		p	RM(IC95%)
	N	Frec.	N	Frec.		
TT	21	0.525	43	0.581	0.56	0.7 (0.34-1.8)
TC	15	0.375	24	0.324	0.58	1.25 (0.51-2.9)
CC	4	0.1	7	0.094	0.92	1.0 (0.21-4.5)
<b>Alelos</b>						
T	57	0.7125	110	0.743	0.61	0.85 (0.44-1.6)
C	23	0.2875	38	0.256	0.61	1.1 (0.60-2.2)

**IL-1F 10.3**

En la tabla 7 se resumen las frecuencias genotípicas y alélicas para este polimorfismo, apreciamos distribuciones genotípicas muy similares y concordantes con lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg.



**Figura 18.** Gel al 1,5% de agarosa teñidos con bromuro de etidio, muestra la amplificación por PCR de IL-1F 10.3, marcador estándar Ready-Load 100 bp, amplificado de 200 pb

**Tabla 7:** Estadística descriptiva y asociación de riesgo de IL-1F 10.3 con restenosis

IL-1F 10.3
------------

*Efecto de los polimorfismos del gen de  $\beta_2$ -1 y del antagonista de su receptor en restenosis en pacientes con stents coronarios.*

<b>Genotipo</b>	<b>Restenosis</b>		<b>No Restenosis</b>		<b>p</b>	<b>RM(IC95%)</b>
	<b>N</b>	<b>Frec.</b>	<b>N</b>	<b>Frec.</b>		
<b>Genotipo</b>	40		74			
TT	27	0.675	48	0.648	0.77	1.1 (0.46-2.7)
TC	11	0.275	25	0.337	0.49	0.74 (0.28-1.8)
CC	2	0.05	1	0.013	0.24	3.8 (0.19-229)
<b>Alelos</b>						
T	65	0.8125	121	0.817	0.924	0.96 (0.45-2.1)
C	15	0.1875	27	0.182	0.924	1.03 (0.47 -2.1)

## **ANALISIS DE RESULTADOS.**

La restenosis sigue siendo la principal limitación de la utilización del stent coronario y de otras intervenciones percutáneas. La restenosis no es un fenómeno al azar, y ciertos pacientes están en el riesgo creciente de desarrollarla <sup>[116]</sup>. Hay varios factores clínicos relacionados que sirven para explicar parte del riesgo para el desarrollo de restenosis <sup>[117]</sup>. Sin embargo, una porción significativa de este proceso no se puede predecir basándose en los factores de riesgo convencionales. Estudios recientes han proporcionado evidencias sobre el papel de los factores genéticos en la determinación del riesgo para el desarrollo de restenosis después de las intervenciones coronarias <sup>[119]</sup>.

En este estudio determinamos la asociación de 6 sitios polimórficos del gen de IL-1 e IL-1RN y restenosis después de la implantación del stent coronario en una serie de 114 pacientes con seguimiento angiográfico de al menos 6 meses después de su intervención. El análisis para elegir a IL-1 como un gen candidato en restenosis intra stent viene de la evidencia del papel de la inflamación en este proceso, el papel central del sistema IL-1 en la regulación inflamatoria, las evidencias previas de polimorfismos de IL-1 e IL-1RN como un factor de riesgo genético en otras enfermedades inflamatorias y de las perspectivas terapéuticas ofrecidas en base a esta citocina.

Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron por conteo directo. Las frecuencias en los grupos de estudio fueron comparadas utilizando la exacta de Fisher. El valor de *p* fue corregido multiplicando por el número de comparaciones realizadas y se considerará significativo por debajo de 0.05.

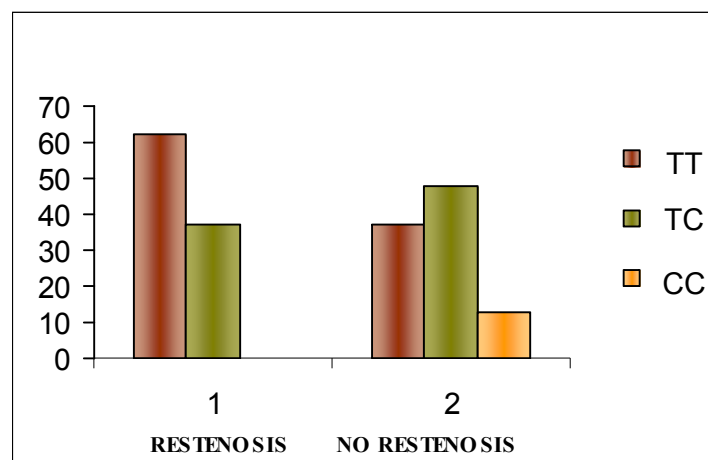
### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1 $\beta$ -511.**

Se han analizado los niveles de IL-1 $\beta$  en plasma obtenido antes y 20 minutos después de la implantación del stent, encontrándose que los niveles IL-1 $\beta$  se encuentran aumentados perceptiblemente después de la implantación. Comprobando que después de la colocación del stent coronario existe una producción de citocinas proinflamatorias que se relaciona posiblemente con la ruptura de la placa y/o el traumatismo del endotelio después del procedimiento <sup>(96)</sup>.

Existen estudios previos que han relacionado este sitio polimórfico, con la susceptibilidad de restenosis intra stent, en los cuales no se encontró ninguna asociación con el desarrollo de restenosis <sup>(96-97)</sup>.

Al analizar el sitio polimórfico IL-1 $\beta$ -511, los resultados obtenidos mostraron diferencias estadísticamente significativas tanto en las frecuencias alélicas como en las frecuencias genotípicas (Figura 19). El valor de *p* al ser menor de 0.05 sugiere que el alelo T y que la presencia del genotipo T/T (*p*<0.01) en el gen esta asociado perceptiblemente a un riesgo mayor de restenosis angiográfica y clínica. La incidencia de restenosis disminuyó en heterocigotos TC (37%) y aun más con el homocigoto CC del cual no hubo ningún paciente con este genotipo que desarrollara restenosis. Contradictoriamente a lo ya publicado, para la población de Caucásicos Daneses, en el cual no hubo diferencias en las frecuencias genotípicas, demostrando que existen diferencias étnicas para la distribución genotípica de este polimorfismo.

En otro estudio aleatorio se investigo los efectos comunes de dos polimorfismos del gen interleucina-1 $\beta$  [IL-1  $\beta$  (- 511) e IL-1  $\beta$  (+3954)] y un polimorfismo del antagonista de su receptor (IL-1RN VNTR) en la inflamación postintervención y la ocurrencia de restenosis. Cuando se analizaron los sitios por separado, no se asoció ninguno de los polimorfismos de inflamación al desarrollo de restenosis. Sin embargo, cuando los genotipos de IL-1B (- 511) y los de IL-1RN VNTR fueron combinados, se observo una relación altamente significativa: los No portadores del alelo 2 de IL-1RN VNTR (IL-1RN\*2), que eran heterocigotos y homocigotos para el alelo T de IL-1B (- 511) exhibieron una respuesta inflamatoria gradualmente creciente y un riesgo más alto de restenosis. En cambio, los portadores del IL-1RN\*2 y el alelo T de IL-1B (- 511) demostraron un resultado perceptiblemente mejor.

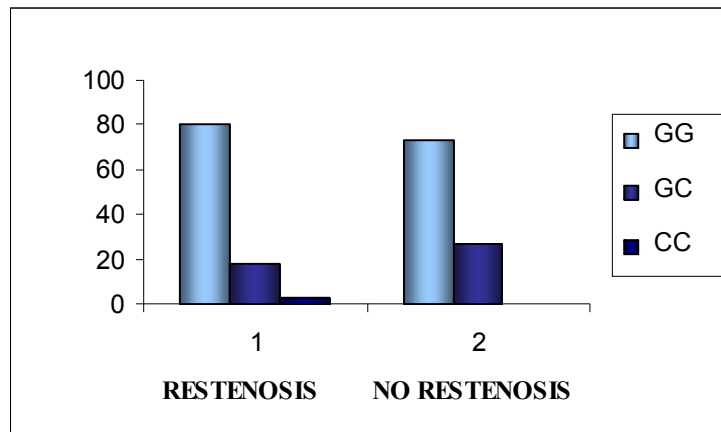


**Figura 19.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1 $\beta$ -511 en los dos grupos de estudio.

Nuestros datos muestran una asociación entre el alelo T y el genotipo TT en nuestra población. Ya que tanto el alelo T como el genotipo TT se encuentran incrementados de manera significativa en nuestros pacientes cuando se comparan contra el grupo de individuos sin restenosis en tanto que las frecuencias del alelo C y el genotipo CC se ven sumamente disminuidas. Por lo que el alelo T y el genotipo TT podrían fungir como marcadores de susceptibilidad genética hacia la restenosis intra stent, mientras que el alelo C y el genotipo CC podrían fungir como marcadores de protección en la susceptibilidad genética a dicha enfermedad.

### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1 RN.6/2**

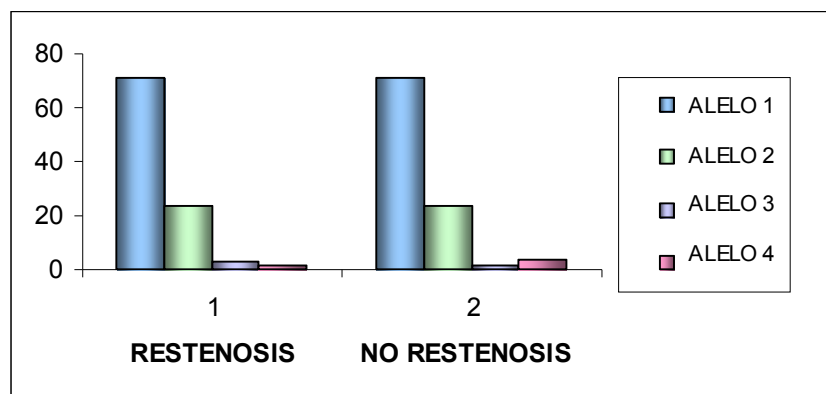
Se determino que no hay diferencias significativas en las frecuencias genotípicas y alélicas entre los dos grupos de acuerdo con el valor obtenido de la prueba de  $X^2$  ( $p=0.40$  para GG,  $p=0.25$  para GC y  $p=0.17$  para CC), por lo tanto el polimorfismo IL-1RN.6/2 no esta relacionado con el riesgo a desarrollar restenosis intra-stent. Este sitio polimórfico no se ha estudiado anteriormente.



**Figura 20.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1RN.6/2 en los dos grupos de estudio

### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1R VNTR.**

En cuanto al polimorfismo IL-1R VNTR, la presencia del alelo 2 se ha demostrado que esta asociada a niveles más altos de la sangre o índices más altos de la producción de IL-1RA pero no en todas las poblaciones <sup>(97)</sup>. Se ha comprobado que la ausencia de esta citosina promueve la formación neointimal en ratones después de la lesión. Estos resultados sugieren que IL-1Ra pueda suprimir otras respuestas vasculares oclusivas de la lesión, tal como aterosclerosis y restenosis después de la angioplastia y que esto confiere protección al desarrollo de restenosis, en nuestro caso las frecuencias alélicas y fenotípicas de ambos grupos fueron similares y estadísticamente no significativas (Para el alelo 1  $p=0.95$ , alelo 2  $p=0.986$ , alelo 3  $p=0.241$  y finalmente para el alelo 4  $p=0.09$ ).



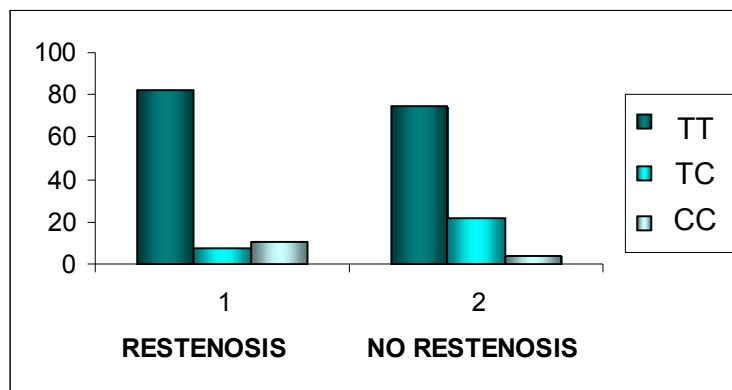
**Figura 21.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1R VNTR en los dos grupos de estudio

En un trabajo publicado anteriormente, donde se asocia este polimorfismo con restenosis intra stent en una población Caucásica <sup>(96)</sup>, encontraron al Alelo 2 del gene de IL-1RA asociado a una incidencia más baja de restenosis después de la implantación del stent coronario, particularmente en pacientes más jóvenes. La frecuencia del Alelo 2 fue de 0.28 con un valor de  $p=0$ . Los portadores del alelo 2 tuvieron un riesgo perceptiblemente más bajo para restenosis. En nuestro caso los resultados son

contradictorios ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas, por lo que este polimorfismo no está asociado al desarrollo de restenosis intra stent.

### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1-C-RN.4T**

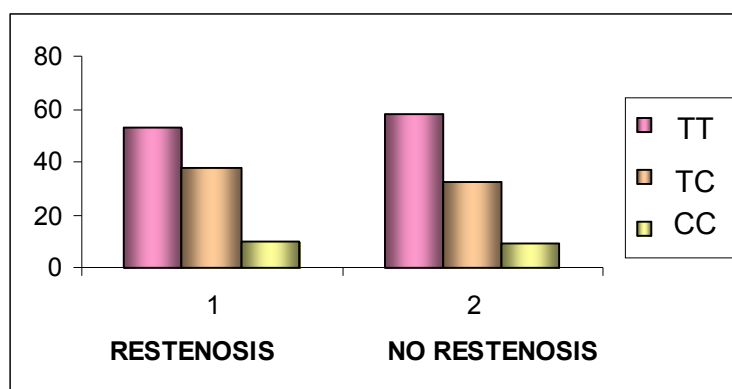
Se observó un incremento en la frecuencia del genotipo TC del polimorfismo IL-1-C-RN.4T, en el grupo de pacientes sin restenosis, siendo de 0.075 para pacientes con restenosis y 0.21 para el grupo control, en donde este genotipo podría estar actuando como protector para el desarrollo de restenosis, esta frecuencia no fue estadísticamente significativa ( $p=0.053$ ), por lo que una de nuestras perspectivas es incrementar el número de muestras, para determinar si es un posible protector al desarrollo de restenosis. Este marcador no había sido estudiado previamente.



**Figura 22.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1C-RN.4T en los dos grupos de estudio

### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1-D-RN.6/1C**

En cuanto a este sitio polimórfico, no encontramos diferencias alélicas y genotípicas, aunque se observó un ligero incremento del genotipo TT, este no fue estadísticamente significativo ( $p=0.56$ ), por lo que no confiere susceptibilidad al desarrollo de restenosis.

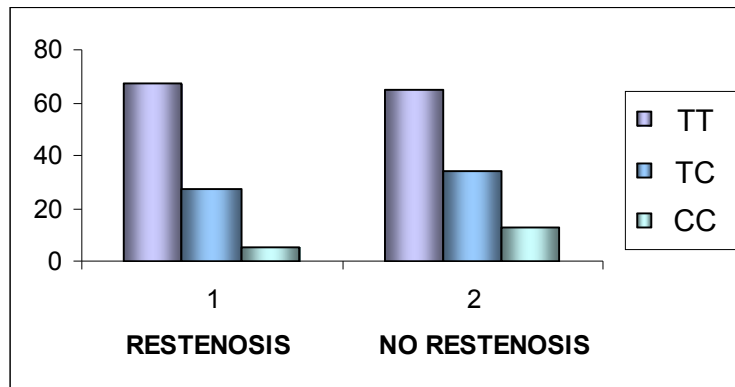


**Figura 23.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1C-RN.4T en los dos grupos de estudio



### **Frecuencias genotípicas y alélicas de IL-1F 10.3**

Como se muestra en la figura 24, para este polimorfismo la distribución de los genotipos y las frecuencias alélicas en ambas poblaciones fueron similares, indicando que no existe relación entre este con el desarrollo de restenosis intra-stent. No existen reportes previos de esta asociación.



**Figura 24.** Distribución de las frecuencias genotípicas del polimorfismo IL-1F 10.3 en los dos grupos de estudio

## **CONCLUSIONES**

De los resultados presentados y la discusión de los mismos se derivan las siguientes conclusiones:

- El polimorfismo del gen IL-1F10 (IL-1F10.3) no afecta la susceptibilidad al desarrollo de restenosis intra stent.
- El genotipo heterocigoto T/T, correspondiente al polimorfismo IL-1B-511, se asocio con un incremento del riesgo de restenosis.
- Los polimorfismos del gen IL-1Ra (R/N.4T>C, RN.6/1C>T, RN.6/2C>G, IL-1RVNTR) no afectan la susceptibilidad a la restenosis en la población mexicana muestreada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. **Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anad S.** Global Burden of Cardiovascular Diseases Part II: Variations in Cardiovascular Disease by Specific Ethnic Groups and Geographic Regions and Prevention Strategies *Circulation*. 2001; 104: 2855-2864.)
2. **Albelda SM, Smith CW, Ward PA.** Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 1994; 8: 504-12.
3. **Ross R.** Atherosclerosis: a defense mechanics gone awry. *Am J Pathol* 1993; 143: 987-1002.
4. **Vane JR, Anggård EE, Botting RM.** Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.
5. **Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insul W, Rosenfield ME, Schaffer SA, Schwarz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the council of arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89:2462-2478.
6. **Boren, J., Olin, K., Lee, I., Chait.** Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J. Clin. Invest* 1998; 101: 2658-2664.
7. **Grainger, D.J., Kemp, P.R., Liu, A.C., Lawn, R.M., Metcalfe, J.C.** Activation of transforming growth factor- $\beta$  is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 1994; 370: 460-462.
8. **Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F., Funk, C.D.** Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J. Clin. Invest.*, 1999; 103: 1597-1604.
9. **Hegele, R.A.** Paraoxonase-genes and disease. *Ann. Med.*, 1999; 31: 217-224.
10. **Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder, G.** Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.*, 2000; 276: 17527-17535.
11. **Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A.M.** RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell*, 1999; 97: 889-901.
12. **Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L., Beaudet, A.L.** P-selectin or intracellular adhesion molecule (ICAM-1) deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 2000; 191: 189-194.
13. **Shih, P.T., Brenan, M.L., Vora, D.K., Territo, M.C., Strahl, D., Elices, M.J., Lusis, A.J., Berliner, J.A.** (1999). Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ Res.*, 84: 345-351.
14. **Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., Charo, I.F.** (1998). Decreased lesion formation in CCR2-I-mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394: 894-897.
15. **Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Hazen, S.L.** Macrophage scavenger receptor CD36 is the major for LDL modified by

- monocyte-generated reactive nitrogen species. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 1095-1108.
16. **Marathe, S., Kuriakose, G., Williams, K.J., Tabas, I.** Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999; 19: 2648-2658.
  17. **Ivandic, B., Castellani, L.W., Wang, X.P., Qiao, J.H., Mehrabian, M., Lusis, A.J.** Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis I. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999; 19: 1284-1290.
  18. **Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K., Silverstein L.** Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105: 1049-1056.
  19. **Schonbeck, U., Mach, F., Sukhova, G.K., Herman, M., Graber, P., Kehry, M.R., Libby, P.** CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.*, 2000a; 156: 7- 14.
  20. **Schönbeck, U., Sukhova, G.K., Shimizu, K., Mach, F., Libby, P.** Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000b; 97: 7458-7463.
  21. **Gerhard, G.T., Duell, P.B.** Homocysteine and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 2000; 10: 417-429.
  22. **Streblov, D.N., Soderberg-Naucler., C., Ruchti, F., Mattison, K., Altschuler, Y., Nelson, J.A.** The human cytomegalovirus chemokine receptor US28 mediates vascular smooth muscle cell migration. *Cell*, 1999; 99: 511-520.
  23. **Libby, P.** Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.*, 1999; 247: 349-358.
  24. **Moultan, K.S., Folkman, J.** In *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (ed. Chien, K. R.) (Saunders, Philadelphia), 1999; 393-410.
  25. **Grüentzig A.** Non Operative Dilatation of Coronary Artery Stenosis: Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *N Eng J Med* 1979; 301:61–69.
  26. **Beatt KJ, Serruys PW, Luitjen HE, et al.** Restenosis after coronary angioplasty: the paradox of increased lumen diameter and restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:258-266.
  27. **Colmes DR Jr, Vlietstra RE, Smith HC, Vetrovec GW, Kent KM, Cowley MJ, Faxon DP, Gruentzig AR, Kelsey SF, Detre KM.** Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and blood institute. *Am J Cardiol* 1984; 53:77C-81C
  28. **[Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H.](#)** Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 229 patients. *J Am Coll Cardiol.* 1988 Sep;12(3):616-23.
  29. **Serruys PW, Zijlstra F, Koning R.** Does successful angioplasty restore coronary flow reserve? *Bibl Cardiol.* 1989;(44):135-52; discussion 152-4. No abstract available.

30. **Califf RM, Ohman EM, Frid DF, et al.** restenosis the clinical Issues. In Topol EJ. Ed Textbook of interventional Cardiology. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990: 363-394.
31. **Hernandez R, Makaya C et al.** Midterm outcome of patients with asymptomatic restenosis after coronary balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1991; 17: 58b-70b.
32. **Chesebro JM, Webster MW, Reeder GS, et al.** Coronary angiography: antiplatelet therapy reduces acute complication but not restenosis. *Circulation* 1999, 80:11-64.
33. **Schwartz RS, Edwards WD, Huber KC, Antoniades LC, Bailey KR, Camrud AR, et al.** Coronary restenosis: prospects for solution and new perspectives from a porcine model. *Mayo Clin Proc* 1993; 68:54-62.
34. **Rodríguez AE, Santaera O, Larribau M, Fernandez M, Sarmiento R, Perez Balino, et al.** Coronary stenting decreases restenosis in lesions with early loss in luminal diameter 24 hours after successful PTCA. *Circulation* 1995; 91: 1397-1402.
35. **Le Breton H, Plow EF, Topol EJ.** Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1643-1651.
36. **Unterberg C, Sandrock D, Nebendhal K, Buchwald AB.** Reduced acute thrombus formation results in decreased neointimal proliferation after coronary angioplasty. *JACC* 1999; 26:1747-1754
37. **Violaris AG, Melkert R, Herman JP, Serruys PW.** Role of angiographically identifiable thrombus on long-term luminal renarrowing after coronary angioplasty: a quantitative angiographic analysis. *Circulation* 1996; 93:889-897.
38. **Ueda M, Becker AE, Tsukada T, Numano F, Fujimoto T.** Fibrocellular tissue response after percutaneous transluminal coronary angioplasty. An immunocytochemical analysis of the cellular composition. *Circulation* 1991; 83: 1327-1332.
39. **Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA.** Regulation of smooth muscle cell growth in injured artery. *J Cardiovas Pharmacol* 1989; 14:12-15.
40. **Mintz GS, Kovach JA, Javier SP, Pichard AD, Kent KM, Popma JJ; Salter LF, Leon MB.** Mechanisms of lumen enlargement after excimer laser coronary angioplasty. An intravascular ultrasound study. *Circulation* 1995, 92:3408-3414.
41. **Schwartz RS, Topol EJ, Serruys PW, Sangiorgi G, Holmes DR Jr.** artery size, neointima, and remodeling: time for some standards. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 32:2087-2094.
42. **Fanelli C, Aronoff R.** Restenosis following coronary angioplasty. *Am Heart J* 1990; 119:357-368.
43. **Lambert M, Bonan R, Cote G, Crepeau J, de Guise P, et al.** Multiple coronary angioplasty : A model to discriminate systemic and procedural factors related to restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1998, 12:310-344.
44. **Massotti M, Serra A, Betriu A.** Stent en lesiones coronarias de novo. Metaanálisis. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50:3-9.
45. **Mintz GS, Hoffmann R, Mehran R, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Popma JJ, Leon MB.** In-stent restenosis: the Washington Hospital Center experience. *Am J Cardiol* 1998; 81(1):7E-13E.
46. **Gomez-Hospital JA, Cequier A, Fernandez Nofrerias E, Mauri J, García del Blanco B, Iraculis E, Jara F, Espulgas E.** Tratamiento de la restenosis

- intra-stent. Situación actual y perspectivas futuras. *Rev Esp Cardiol* 1999, 52:1130-1138.
47. **Kasaoka S, Tobis JM, Akiyama T, Reimers B, Di Mario C, Wong ND, Colombo A.** Angiographic and intravascular ultrasound predictors of in-stent restenosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:1630-1635.
  48. **Ross R.** Atherosclerosis an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;40:115-26.
  49. **Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, Newell J, McMellon C, Gold HK, et al.** Macrophage infiltration predicts reestenosis after coronary interventions in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:3098-102.
  50. **Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB.** In-Stent reestenosis: contribution of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-30.
  51. **Piek JJ, Van der Wal AC, Meuwissen M, Koch KT, Chamuleau SAJ, Teeleing P, et al.** Plaque inflammation in restenotic coronary lesions of patients with stable and unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:963-7.
  52. **Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, Caliguri G, Vitelli A, Altamura S, et al.** Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98:2370-6.
  53. **Linkoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, Deckelbaum LI, Barnathan ES, Patel KK, et al.** Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 2001;104:163-7.
  54. **Buffon A, Liuzzo G, Biasucci I.** Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late reestenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1512-21.
  55. **Gottsauer-Wolf M, Zasmata G, Hornykewycz M.** Plasma levels of C-reactive protein after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 2000;21:1152-8.
  56. **Ramires JAF, Higuchi ML.** *Micoplasma pneumoniae* y *Chlamidia pneumoniae* se asocian con la inflamación y la rotura de las placas coronarias ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(Supl 1):2-9.
  57. **Bermejo García J, Martínez P, Martín Rodríguez JF, de la Torre Carpenente M, Bustamante Bustamante R, Guerrero Peral AB, et al.** Inflamación e infección en la enfermedad coronaria estable y en el síndrome coronario agudo. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:453-9.
  58. **Merino Otermin A, Artaiz Urdaci M, Bregada García J, Riera Sagrera M, Vidal Salvá B, Rodríguez Fernández A.** El eptifibatide reduce los valores de proteína C reactiva tras angioplastia coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:186-9.
  59. **Blum A, Sclarosvsky S, Shohat B.** T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1995;91:20-2.
  60. **Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, et al.** Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996;132:1-8.
  61. **Van der Waal AC, Piek JJ, de Boer OJ, Koch KT, Teeling P, van der Loos CM, et al.** Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart* 1998;80:14-8.

62. **Liuzzo G, Angiolillo DJ, Buffon A, Rizzello V, Colizzi C, Ginnetti F, et al.** Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;103:2236-43.
63. **Dinarello CA.** The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2002; 20: s1-s13.
64. **Dinarello CA, Moldawer LL.** Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Thousands Oaks, Amgen Inc; 1999 p.19-35.
65. **Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP.** Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80- kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *J Biol Chem* 1991; 266: 10331-10336.
66. **Eisenberg SP, Brewer MT, Verderber E, Heimdal P, Brandhuber BJ, Thompson RC.** Interleukin 1 receptor antagonist is a member of the interleukin 1 gene family: evolution of a cytokine control mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 5232-5236.
67. **Dinarello CA.** Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095-2147.
68. **Nicklin MJH, Weith A, Duff GW.** A physical map of the region encompassing the human interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-1 receptor antagonist genes. *Genomics* 1993; 19: 382-384.
69. <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim? 147720>
70. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list\\_uids=27368251&dopt= GenBank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=nucleotide&list_uids=27368251&dopt= GenBank)
71. **Laurincová B.** Interleukin-1 family: from genes to human disease. *Acta Univ. Palacki. Olomuc.* 2000; 143: 19-29.
72. **Kalina U, Ballas K, Koyama N, Kauschat D, Miething C, Arnemann J, et al.** Genomic organization and regulation of the human interleukin-18 gene. *Scand J Immunol* 2000; 52: 525-530.
73. **Arend WP, Gabay C.** Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res* 2000; 2: 245-248.
74. **Gracie JA, Forsey RI, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR et al.** A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999; 104: 1393-1401.
75. **Dayer JM.** Interleukin-18, rheumatoid arthritis, and tissue destruction. *J Clin Invest* 1999; 104: 1337-1339.
76. **Dunne A, O'Neill L.** The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003; 171:re3.
77. **Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF.** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 588-593.
78. **Neumann D, Kollewe C, Martin MU, Boraschi D.** The membrane form of the type II IL-1 receptor accounts for inhibitory function. *J Immunol* 2000; 165: 3350-3357.
79. **Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D et al.** The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol* 1998; 161: 6871-6877.

80. **Cullinan EB, Kwee L, Nunes P, Shuster DJ, Ju G, McIntyre KW et al.** IL-1 receptor accessory protein is an essential component of the IL-1 receptor. *J Immunol* 1998; 161: 5614- 5620.
81. **Debets R, Timans JC, Churakowa T, Zurawski S, de Waal Malefyt R, Moore KW et al.** IL-18 receptors, their roles in ligand binding and function: Anti-IL-1RacPL antibody, a potent antagonist of IL-18. *J Immunol* 2000; 165: 4950- 4956.
82. **Kim SH, Azam T, Yoon DY, Reznikov LL, Novick D, Rubinstein M et al.** Site-specific mutations in the mature form of human IL-18 with enhanced biological activity and decreased neutralization by IL-18 binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 3304-3309.
83. **Wesche H, Korherr C, Kracht M, Falk W, Resch K, Martin MU.** The interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RacP) is essential for IL-1-induced activation of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) and stress activated protein kinases (SAP kinases). *J Biol Chem* 1997; 272: 7727-7731.
84. **Huang J, Gao X, Li S, Cao Z.** Recruitment of IRAK to the interleukin 1 receptor complex requires interleukin 1 receptor accessory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2829-2832.
85. **Jensen LE, Muzio M, Mantovani A, Whitehead AS.** IL-1 signaling cascade in liver cells and the involvement of a soluble form of the IL-1 receptor accessory protein. *J Immunol* 2000; 164: 5277-86.
86. **Swain SL.** Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med* 2001; 194:F11-14.
87. **Miller A.** A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 1998; 16:1215-1217
88. **Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, Kakol JM, Stein LD; et al.** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature* 2001; 409:928-933.
89. **Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, Newell J, McMellon C, Gold HK, et al.** Macrophage infiltration predicts restenosis after coronary interventions in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94:3098-102.
90. **Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB.** In-Stent restenosis: contribution of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:224-30.
91. **Piek JJ, Van der Wal AC, Meuwissen M, Koch KT, Chamuleau SAJ, Teeleing P, et al.** Plaque inflammation in restenotic coronary lesions of patients with stable and unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:963-7.
92. **Libby P, Schwartz D, Brogi E, Taanaka H, Clinton SK.** A cascade model for restenosis: a special case for atherosclerosis progression. *Circulation* 1992;86(Suppl III):47-52.
93. **Ramírez JAF, Higuchi ML.** *Micoplasma pneumoniae* y *Chlamidia pneumoniae* se asocian con la inflamación y la rotura de las placas coronarias ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55(Supl 1):2-9.
94. **Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, et al.** Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of restenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 1996; 335:624-30.
95. **Merino Otermin A, Artaiz Urdaci M, Bregada García J, Riera Sagrera M, Vidal Salvá B, Rodríguez Fernández A.** El eptifibatide reduce los valores de proteína C reactiva tras angioplastia coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:186-9.



- 96. Kastrati A, Koch W, Berger PB, et al.** Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 2168-2173.
- 97. Francis SE, Camp NJ, Burton AJ, et al.** Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism and restenosis after coronary angioplasty. *Heart* 2001; 86: 336-340