



Estudio clínico sobre la expresión de biomarcadores en pacientes con riesgo de desarrollo de aterosclerosis

Ricardo Arturo Albertini.

Tesis (Dr. en Medicina y Cirugía) --Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas,
2019.

Aprobada: 26 de julio de 2019

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

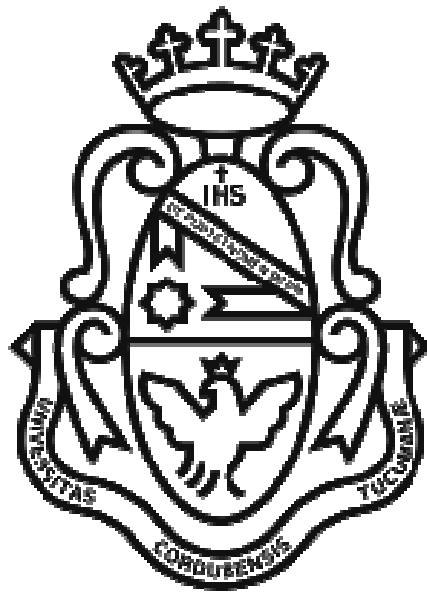
Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Estudio clínico sobre la expresión de biomarcadores en pacientes con riesgo de desarrollo de aterosclerosis by Ricardo Arturo Albertini is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional License.

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
MEDICINA Y CIRUGÍA**

Ricardo Arturo Albertini



**Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina**

2019

**Estudio clínico sobre la expresión de
biomarcadores en pacientes con riesgo de
desarrollo de Ateroesclerosis**

Integrantes de la Comisión de Seguimiento de Tesis Doctoral:

Prof. Dr. Gustavo A. CHIABRANDO (Director de Tesis),

Prof. Dr. Marcelo Augusto YORIO

(Co-Director de Tesis)

Prof. Dra. Ruth A. FERNANDEZ

Prof. Dra. Silvia Graciela CORREA

La presente tesis doctoral fue realizada en el Hospital Privado Universitario de Córdoba y en la Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología CIBICI- CONICET y financiada a través de los siguientes subsidios: Préstamo BID PICTO-GLAXO 2012 0084 y Fundación Ciencias Biomédicas de Córdoba (FUCIBICO).

Artículo 28: La Facultad de Ciencias médicas no se hace solidaria con las opiniones de esta tesis.

ABREVIATURAS Y SIGLAS	1
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1 Aterosclerosis: importancia clínica.....	10
1.2 Aterosclerosis: una enfermedad inflamatoria crónica.....	10
1.3 Aterosclerosis: herramientas enfocadas en prevención primaria	14
1.4 Los monocitos de sangre periférica en la aterosclerosis.....	16
1.5 Biomarcadores moleculares en la aterosclerosis	17
1.5.1 Receptores depuradores (scavengers).....	17
1.5.2 Integrinas.....	19
1.6 Receptores de LDL: LRP1	20
1.6.1 Aspectos generales de la estructura, expresión y función del LRP1.	20
1.6.2 LRP1 en aterosclerosis.....	23
1.7 Aterosclerosis, monocitos y LRP1	26
1.8 HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	28
1.9 OBJETIVO GENERAL.....	28
1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
2.1 Diseño clínico.....	30
2.1.1 Criterios de inclusión.....	30
2.1.2 Criterios de exclusión.....	30
2.1.3 Historia clínica completa	31
2.2 Parámetros hematológicos, bioquímicos y citometría de flujo.....	32
2.3 Ecografía doppler carotídea	34
2.4 Tomografía coronaria	34
2.5 Definición de grupos de estudio	35
2.5.1 Individuos del grupo de bajo riesgo.....	35
2.5.2 Individuos del grupo intermedio	36
2.5.3 Individuos del grupo patológico.....	36
2.6 Ecuación de predicción de riesgo coronario a 10 años de Framingham.....	36
2.7 Ecuación de predicción de riesgo cardiovascular general a 10 años de Framingham.....	36

2.8 Ecuación de predicción de riesgo cardiovascular a 30 años de Framingham	37
2.9 Ecuación de predicción de riesgo para enfermedad cardiovascular aterosclerótica de las cohortes combinadas	37
2.10 Ecuación de predicción de riesgo coronario del estudio ARIC que incluye ecografía carotídea	38
2.11 Tratamiento estadístico de datos.....	38
3. RESULTADOS	39
3.1 Caracterización clínica de los individuos enrolados al estudio.....	39
3.2 Generación de los grupos de estudios (GE)	48
3.3 Análisis de la distribución de subpoblaciones monocitarias.....	54
3.4 Evaluación de marcadores monocíticos en los Grupos de Estudios	57
3.4.1 Nivel de expresión de CD11b.....	58
3.4.2 Nivel de expresión de CD11c.....	60
3.4.3 Nivel de expresión de CD36	62
3.4.4 Conclusiones sobre los biomarcadores analizados.....	64
3.5 Nivel de expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos.....	64
3.5.1 Conclusiones sobre los niveles de expresión de LRP1 monocitario.....	70
4. DISCUSIÓN.....	71
4.1 Clasificación de individuos a partir de la aplicación de ecuaciones predictoras de riesgo cardiovascular	72
4.2 Clasificación de individuos a partir de factores de riesgo cardiovascular y evidencia imagenológica de aterosclerosis subclínica.....	74
4.3 Los monocitos y la aterosclerosis	76
4.4 Biomarcadores expresados en monocitos de sangre periférica de aterosclerosis subclínica	78
4.4.1 Expresión Monocitaria de CD36.....	78
4.4.2 Expresión monocitaria de CD11b y CD11c	79
4.5 LRP1 en la aterosclerosis.....	81
4.6 Expresión monocitaria de LRP1	83
4.7 Conclusiones.....	84
4.8 Perspectivas.....	84
5. REFERENCIAS.....	88
6. PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A EVENTOS CIENTÍFICOS.....	97
6.1 Revistas científicas internacionales con referato.....	97
6.2 Congresos y Reuniones Científicas.....	97

ABREVIATURAS Y SIGLAS

ABCA1	<i>ATP-Binding Cassette A1</i>
ABCG1	<i>ATP-Binding Cassette G1</i>
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ACV	Accidente Cerebrovascular
ADP	Adenosín difosfato
α_2 M	alfa 2 macroglobulina
AMP	Adenosín monofosfato
Apo	Apolipoproteína
ARIC	<i>Atherosclerosis Risk in Communities</i>
ASCVD	<i>Atherosclerotic Cardiovascular Disease</i>
ATP III	<i>Adult Treatment Panel III</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
CCR2	<i>C-C Chemokine Receptor type 2</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Cdc 42	<i>Cell division cycle 42</i>
CX3CR1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>
Dab 1	<i>Disabled-1</i>
ECC	Ecuación de las Cohortes Combinadas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EIM	Engrosamiento del complejo íntima-media
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>

FGF 2	<i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FRS	<i>Framingham Risk Score</i>
FRS 10 CV	Ecuación de predicción de riesgo cardiovascular general a 10 años de Framingham
FRS 10 D	Ecuación de predicción de riesgo coronario a 10 años de Framingham
FRS 30 IMC D	Ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal de Framingham
FRS 30 IMC G	Ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal de Framingham
FRS 30 L D	Ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos de Framingham
FRS 30 L D a	Ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos de Framingham versión adaptada
FRS 30 L G	Ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos de Framingham
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
HCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HTA	Hipertensión arterial
IAM	Infarto Agudo de Miocardio
ICAM 1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>

IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
IMF	Intensidad media de fluorescencia
IL 8	Interleucina 8
JAM-1	<i>Junctional Adhesion Molecule 1</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LDLR	<i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LFA 1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
Lox 1	<i>Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
Ly6C	<i>Lymphocyte antigen 6 Complex, locus C1</i>
Mac 1	<i>Macrophage-1 antigen</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP 1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i>
MEGF	<i>Multiple Epidermal Growth Factor</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
MT 1	<i>Membrane Type 1</i>
NADPH	<i>Dihyronicotinamide-adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NHLBI	<i>National Heart, Lung, and Blood Institute</i>
NPxY	Asparagina- Prolina- x es algún aminoácido- Tirosina
PAI 1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
PAC	Placa Aterosclerótica Carotídea
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>

PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i>
PTB	<i>Phosphotyrosine Binding Domain</i>
PZP	<i>Pregnancy Zone Protein</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
SR A1	<i>Scavenger receptor type 1</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>urokinase type Plasminogen Activator</i>
uPAR	<i>urokinase type Plasminogen Activator Receptor</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>

RESUMEN

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es la principal causa de mortalidad global a nivel mundial. La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica arterial, en la cual el reclutamiento de monocitos a la pared vascular es un evento clave en su patogénesis. En este proceso participan distintos receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos. El receptor LRP1 (del inglés *Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*) pertenece a la familia del receptor LDL, se expresa en monocitos y participa principalmente en el metabolismo de las lipoproteínas, en vías de señalización intracelular y en procesos de migración celular.

El principal objetivo de esta tesis fue establecer el nivel de expresión de determinados biomarcadores, entre ellos LRP1, CD36, CD11b y CD11c, presentes en la superficie celular de monocitos de sangre periférica de pacientes con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Con este propósito se enrolaron 227 individuos de 20 a 59 años de edad sin antecedentes de enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, tratamiento con drogas hipolipemiantes, cuadro febril en el último mes o embarazo actual. A partir de muestras de sangre venosa periférica se determinaron parámetros bioquímicos y hematológicos, y por citometría de flujo se midieron los niveles absolutos y relativos de subpoblaciones monocitarias así como de LRP1, CD36, CD11b y CD11c. A cada individuo se le realizó ecografía doppler carotídea y tomografía coronaria no contrastada y se estimó el riesgo cardiovascular aplicando ecuaciones de Framingham a 10 y 30 años y cohortes combinadas. A partir de ello se clasificaron 3 grupos de estudio (GE): i) GE de bajo riesgo, con imágenes negativas y sin factores de riesgo evidentes; ii) GE intermedio, con imágenes negativas y con factor de riesgo cardiovascular; y iii) GE patológico, con aterosclerosis subclínica imagenológica.

Los principales resultados generales, expresados como valores de mediana, fueron: edad 43 años, presión arterial sistólica 120 mm Hg, índice de masa corporal 25,6 kg/m², colesterol total 191 mg/dl y glucemia 98 mg/dl. La prevalencia de factores de riesgo cardiovascular fue para hipertensión arterial

20,3%, dislipidemia 57,3%, tabaquismo actual 22,0% y síndrome metabólico 21,1%. Se detectó aterosclerosis subclínica por imágenes en el 36,1% de los individuos. La distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias mostró un predominio de monocitos clásicos (86%) sobre monocitos no clásicos (7%) y monocitos intermedios (6%). La distribución de las subpoblaciones monocitarias no mostró diferencias significativas entre los GE. Los biomarcadores CD11b y CD36 monocitarios presentaron una mayor expresión en subpoblaciones monocitarias clásicas, mientras que CD11c mostró niveles similares en subpoblaciones intermedias. El CD11c tuvo una tendencia de menor expresión en monocitos totales y no clásicos en el GE patológico respecto al GE de bajo riesgo, mientras que CD36 siguió la misma tendencia en monocitos no clásicos del GE de bajo riesgo en relación con los GE intermedio y patológico. En cuanto al LRP1 monocitario, este biomarcador mostró una mayor expresión en subpoblaciones monocitarias intermedias y clásicas. No obstante, la expresión de LRP1 en monocitos totales y subpoblaciones clásicas fue significativamente menor en los GE patológico e intermedio con respecto al GE de bajo riesgo.

Estos resultados en su conjunto permiten concluir que individuos con aterosclerosis subclínica presentaron una significativa disminución en la expresión de LRP1 en monocitos clásicos y totales. El resto de los biomarcadores así como la distribución de las subpoblaciones monocitarias sólo mostraron una débil o nula tendencia de variación frente a la presencia de aterosclerosis subclínica. Estos hallazgos posicionan al LRP1 como un biomarcador temprano de aterosclerosis subclínica, demostrando un comportamiento diferencial en los monocitos de sangre periférica de individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

ABSTRACT

Atherosclerotic cardiovascular disease is the leading cause of global mortality worldwide. Atherosclerosis is a chronic inflammatory arterial disease, in which the recruitment of monocytes to the vascular wall is a key event in its pathogenesis. Different cell adhesion receptors and chemotactic factors participate in this process. The receptor LRP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) belongs to the LDL receptor family, is expressed in monocytes and participates mainly in the lipoprotein metabolism, intracellular signaling pathways and cell migration processes.

The main objective of this thesis was to establish the expression level of certain biomarkers, including LRP1, CD36, CD11b and CD11c, expressed on the cell surface of peripheral blood monocytes of patients with different risks of atherosclerotic cardiovascular disease. For this purpose, 227 individuals aged 20 to 59 years without a history of cardiovascular disease, diabetes mellitus, treatment with lipid-lowering drugs, fever in the last month or current pregnancy were enrolled. Biochemical and haematological parameters were determined from peripheral venous blood samples, and absolute and relative levels of monocyte subpopulations as well as LRP1, CD36, CD11b and CD11c were measured by flow cytometry. Carotid doppler ultrasonography and non-contrasted coronary tomography were performed. The cardiovascular risk, applying Framingham equations at 10 and 30 years and combined cohorts, was estimated. Considering these data, three study groups (SG) were classified: i) low risk SG, with negative images and without evident risk factors; ii) intermediate SG, with negative images and with at least one cardiovascular risk factor; and iii) pathological SG, with subclinical imaging atherosclerosis.

The main general results, expressed as median values, were: age 43 years, systolic blood pressure 120 mmHg, body mass index 25.6 kg/m², total cholesterol 191 mg/dl and glycemia 98 mg/dl. The prevalence of cardiovascular risk factors was 20.3% for hypertension, 57.3% dyslipidemia, 22.0% current smoking and 21.1% metabolic syndrome. Subclinical atherosclerosis was detected by imaging in 36.1% of individuals. The relative distribution of the monocyte subpopulations showed a higher proportion of classical monocytes

(86%) with respect to non-classical (7%) and intermediate monocytes (6%). The distribution of the monocyte subpopulations did not show significant differences among the SG. The CD11b and CD36 monocyte biomarkers showed greater expression in classical monocytes, while CD11c had similar values in intermediate subpopulations. CD11c had a tendency of lower expression in total and non-classical monocytes in pathological SG compared to low risk SG, while CD36 followed the same trend in non-classical monocytes of low risk SG in relation to the intermediate and pathological SG. For the LRP1 monocyte, this biomarker showed greater expression in intermediate and classical monocyte subpopulations. However, the expression of LRP1 in total monocytes and classical subpopulations was significantly lower in the pathological and intermediate SG with respect to the low risk SG.

These results taken together allow to conclude that individuals with subclinical atherosclerosis presented a significant decrease in the expression of LRP1 in classical and total monocytes. By contrast, CD11b, CD11c, and CD36 biomarkers only showed a weak or null tendency of variation against the presence of subclinical atherosclerosis. Thus, LRP1 may be considered an early biomarker of subclinical atherosclerosis, demonstrating a differential behavior in peripheral blood monocytes of individuals with different risks of developing atherosclerotic cardiovascular disease.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Ateroesclerosis: importancia clínica

La ateroesclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica de la pared vascular que afecta a las arterias musculares y elásticas de tamaño mediano y grande. Presenta un largo período de latencia y una expresión clínica diversa según los territorios vasculares comprometidos así como el grado y velocidad de la oclusión arterial. Las manifestaciones clínicas más comunes son: i) la cardiopatía isquémica caracterizada por el infarto agudo de miocardio y la angina de pecho, secundaria a la afección de las arterias coronarias, ii) el accidente cerebrovascular isquémico y la crisis isquémica transitoria por compromiso de las arterias que irrigan el sistema nervioso central, iii) la claudicación intermitente y la gangrena en miembros inferiores por enfermedad arterial periférica, iv) la dilatación aneurismática de la aorta, v) la isquemia mesentérica por compromiso de la circulación esplácnica, y vi) la estenosis de la arteria renal (1). La enfermedad cardiovascular ateroesclerótica es una causa líder en mortalidad global a nivel mundial, producto de sus dos principales complicaciones: la cardiopatía isquémica y el infarto cerebral isquémico, lo cual se repite en nuestras estadísticas nacionales tanto como en las de los países desarrollados (Estadísticas vitales. Información básica año 2014. Ministerio de Salud de la Nación. BS As Argentina Diciembre 2015. ISSN 1668-9054 Serie 5 N 58) (2,3).

Existen distintos factores de riesgo cardiovascular que predisponen a la aparición y progresión de las lesiones ateroescleróticas. Se los puede clasificar en factores de riesgo modificables y no modificables. Entre los primeros se destacan la hipertensión arterial, la hipercolesterolemia, la Diabetes Mellitus, el tabaquismo, la obesidad y el sedentarismo. Entre los no modificables sobresalen la edad y el sexo (≥ 45 años en hombres y ≥ 55 años en mujeres) y la historia familiar de enfermedad coronaria precoz (antecedente de un familiar masculino de primer grado que antes de los 55 años o de un familiar femenino de primer grado que antes de los 65 años padecieron un infarto agudo de miocardio o muerte súbita). La aplicación de estos factores de riesgo en distintas ecuaciones matemáticas nos permite en la práctica médica diaria

predecir la aparición de eventos cardiovasculares e indicar medidas de prevención primaria (4).

1.2 Aterosclerosis: una enfermedad inflamatoria crónica

La aterosclerosis es reconocida actualmente como una enfermedad inflamatoria crónica en lugar de una mera enfermedad metabólica generada por el depósito de colesterol de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (del inglés *Low Density Lipoprotein*) en la pared vascular (5). Las lipoproteínas son moléculas formadas por lípidos y proteínas que transportan principalmente colesterol y triglicéridos hacia y desde los tejidos. Ellas desempeñan un rol fundamental en la fisiopatogenia de la aterosclerosis y en la génesis de las *foam cells*. Tienen una estructura organizada en un centro de lípidos hidrofóbicos (ésteres de colesterol y triglicéridos) y una capa externa constituida de proteínas (las apolipoproteínas) y de lípidos hidrofílicos (colesteroles no esterificados y fosfolípidos). Se las clasifica según su densidad relativa en quilomicrones, VLDL, IDL (del inglés *Intermediate Density Lipoprotein*), LDL y HDL. Los lípidos de la dieta son absorbidos y procesados por los enterocitos e ingresan a los vasos linfáticos como quilomicrones. La lipoproteína lipasa hidroliza a los triglicéridos de los quilomicrones circulantes, aportando ácidos grasos libres a los tejidos. Adicionalmente se transfieren fosfolípidos, colesterol y apolipoproteínas a las partículas de HDL, generando quilomicrones remanentes que son captados por los hepatocitos. Las apolipoproteínas participan en la estructura, en las funciones y en el metabolismo de las lipoproteínas, activando enzimas y actuando como ligandos de receptores celulares de superficie. La ApoE es una glucoproteína sintetizada principalmente en el hígado, se asocia a las lipoproteínas y participa en su captación vía endocitosis mediada por receptor. La ApoE interacciona con los miembros de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad, principalmente con VLDL-R y LRP1 que intervienen en la captación hepática de lipoproteínas remanentes enriquecidas en esta apolipoproteína (6,7). Los ratones deficientes en ApoE constituyen un modelo apropiado para investigar el proceso aterosclerótico, puesto que desarrollan de manera espontánea hipercolesterolemia y ateromas en las paredes vasculares, proceso que se acelera al someterlos a una dieta rica en grasa. Una limitación de este modelo

es la baja frecuencia de rotura de las placas y producción de eventos trombóticos (8,9). Si bien la acumulación de lípidos amorfos (colesterol no esterificado) en la matriz extracelular de la capa íntima de la pared vascular precede a la acumulación de células inflamatorias, son estas células las principales protagonistas en la génesis de las lesiones ateroscleróticas (10). Distintos factores de riesgo cardiovascular generan por diversos mecanismos la disfunción endotelial, caracterizada por un fenotipo proinflamatorio y protrombótico de las células endoteliales que conducen a una disminución en la producción y biodisponibilidad del óxido nítrico y alteraciones en la reactividad vascular.

El óxido nítrico tiene un rol clave en la homeostasis vascular al disminuir la adhesividad leucocitaria, favorecer la relajación vascular e inhibir la activación, adhesión y agregación plaquetarias. La hipertensión arterial (principal causa de generación de especies de oxígeno reactivo y de angiotensina II), la Diabetes Mellitus (responsable de generar productos finales de glicación avanzada, adipocinas y especies de oxígeno reactivo), la hipercolesterolemia (con producción de lipoproteínas modificadas y oxidadas), y el tabaquismo (productor de toxinas y radicales libres) actúan de manera perjudicial sobre las células endoteliales (11). Estos estímulos nocivos aumentan la permeabilidad endotelial y la adhesividad al endotelio de los leucocitos y plaquetas circulantes, además de la producción y liberación de citocinas, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas, favoreciendo un estado procoagulante. Las células endoteliales bajo este ambiente expresan en su membrana plasmática moléculas de adhesión integrantes de la superfamilia de las inmunoglobulinas [ICAM-1 (del inglés *Intercellular Adhesion Molecule 1*) y VCAM-1 (del inglés *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*)] y de la familia de las selectinas (E-selectina y P-selectina), las cuales facilitan la adhesión de monocitos, linfocitos y plaquetas al interactuar con sus respectivos receptores, entre ellos, las integrinas LFA-1 (del inglés *Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), Mac-1 (del inglés *Macrophage-1 antigen*) y VLA-4 (del inglés *Very Late Antigen-4*), y la sialomucina PSGL-1 (del inglés *P-Selectin Glycoprotein Ligand-1*) (12). En el caso de los monocitos, luego del rodamiento (*rolling*) y adhesión sobre el endotelio, siguen su migración al interior de la capa

íntima de la pared vascular, proceso facilitado por la presencia de LDL oxidadas, la proteína quimiotáctica de monocitos MCP 1 (del inglés *Monocyte Chemoattractan Protein 1*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGF (del inglés *Platelet Derived Growth Factor*), la interleucina 8 (IL 8) y la osteopontina. Los monocitos se diferencian a macrófagos en la íntima vascular, y a través de diferentes receptores depuradores o *scavengers* acumulan y almacenan en su interior partículas lipídicas, transformándose en células espumosas (*foam cells*) y generando así las estrías grasas en la pared vascular. En esta etapa también se activan los linfocitos T al interactuar con los macrófagos y secretan TNF α y β (del inglés *Tumor Necrosis Factor*) e interferón γ potenciando el estado proinflamatorio. Los efectos hemodinámicos también influyen en la fisiopatogenia de la aterosclerosis y en la localización arterial de las lesiones (12). Se conoce que el flujo laminar pulsátil favorece la instalación de un fenotipo ateroprotector endotelial, evento contrario cuando existe un flujo turbulento con disminución de la fuerza de cizallamiento (*shear stress*) como existe en las zonas de curvaturas, bifurcaciones o ramificaciones arteriales, sitios de ubicación predilectos de las lesiones ateroscleróticas (11).

A partir de que las células musculares lisas migran a la íntima a través del accionar de los factores de crecimiento PDGF, FGF2 (del inglés *Fibroblast Growth Factor 2*) y TGF β (del inglés *Transforming Growth Factor β*), éstas elaboran fibras colágenas y forman una capa fibromuscular que rodea a las células inflamatorias y al centro necrótico compuesto por lípidos y restos de células apoptóticas, produciendo el ateroma con capa fibrosa. Las lesiones ateroscleróticas ingresan a una etapa con manifestaciones clínicas secundarias a lesiones que estenosan la luz vascular en forma progresiva por el crecimiento intraluminal de la placa, como sucede con la angina de esfuerzo, si comprometen el territorio de las arterias coronarias, o la claudicación intermitente, si afectan las arterias de los miembros inferiores, o por fenómenos trombóticos secundarios a erosiones de la placa, o a la ruptura de la capa fibrosa de placas vulnerables que expone el centro necrótico a la luz vascular activando así a las plaquetas y a la cascada de la coagulación, con oclusión trombótica de la luz vascular, exteriorizándose como angina inestable o infarto agudo de miocardio cuando sucede en las arterias coronarias (13).

1.3 Ateroesclerosis: herramientas enfocadas en prevención primaria

Este proceso de ateroesclerosis en las arterias musculares y elásticas se desarrolla desde las primeras décadas de la vida, con un extenso período subclínico que genera una gran oportunidad para implementar medidas preventivas. En el marco de la prevención primaria de esta patología existen diferentes predictores de morbilidad y mortalidad cardiovasculares, los cuales son aplicados por las guías internacionales para la toma de decisiones terapéuticas, entre los que se destacan las reconocidas ecuaciones de riesgo de Framingham (14-16) y la reciente ecuación de cohortes combinadas (*Pooled cohort risk equation*) para la estimación del riesgo de enfermedad cardiovascular ateroesclerótica o ASCVD (del inglés *Atherosclerotic Cardiovascular Disease*) (17). Estas ecuaciones utilizan distintas variables (edad, sexo, raza, colesterol total, colesterol HDL [del inglés *High Density Lipoprotein*], presión arterial sistólica, tabaquismo, Diabetes Mellitus y tratamiento antihipertensivo) para predecir la aparición de diferentes eventos cardiovasculares (infarto agudo de miocardio, muerte coronaria, insuficiencia cardíaca, y accidentes cerebrovasculares no fatales y fatales) en distintos horizontes de tiempo (10 años a 30 años). Sin embargo, la utilización de estos predictores tiene ciertas limitaciones, una de ellas, y quizás la más importante en nuestro medio, es la necesidad de su validación en poblaciones diferentes a las que dieron origen a los valores de corte para los distintos niveles de riesgo. Se conoce además que las ecuaciones que predicen a 10 años subestiman el riesgo cardiovascular en adultos jóvenes y en las mujeres. En un estudio realizado en adultos jóvenes que padecieron infarto agudo de miocardio, la mitad de los pacientes carecía o sólo tenía un factor de riesgo cardiovascular mayor y sólo una minoría clasificaba como grupo de alto riesgo según la ecuación de Framingham a 10 años (18). Similar hallazgo se encontró en una población de mayor edad con coronariopatía, en la que menos de la mitad de los pacientes tenía 2 o más factores de riesgo convencionales a pesar de haber padecido un evento isquémico cardíaco (19). En este marco, han surgido distintos parámetros bioquímicos, celulares e imagenológicos que podrían mejorar la capacidad predictiva de estas ecuaciones.

Diferentes métodos por imágenes revelan la existencia de lesiones ateroscleróticas en arterias de pacientes que aún no han padecido clínica cardiovascular. La aterosclerosis subclínica, detectada por ecografía doppler carotídea o por tomografía coronaria, se ha reconocido como un predictor independiente de riesgo cardiovascular, lo cual le otorga un rol en la prevención primaria de la enfermedad aterosclerótica (20,21).

La ecografía doppler en las arterias carótidas investiga la presencia de engrosamiento del complejo íntima-media (EIM) y de placa aterosclerótica carotídea (PAC). El EIM es medido considerando la distancia entre las interfaces íntima-luminal y medial-adventicial de la pared vascular carotídea. Esta evaluación se focaliza en la zona distal de la arteria carótida común, en el bulbo carotídeo y en la zona proximal de la arteria carótida interna. Si bien están publicados en la literatura múltiples trabajos con diferencias en su metodología de evaluación (segmentos carotídeos evaluados, puntos de corte de EIM y definición de PAC) lo cual dificulta su comparación (22), el EIM carotídeo se asocia con una mayor incidencia de cardiopatía isquémica y de accidente cerebrovascular (23,24). También estas asociaciones se repiten, aunque con mayor fuerza, para la presencia de PAC (25,26). En base a estos hallazgos, se generó una ecuación para estimar el riesgo de padecer infarto agudo de miocardio, revascularización coronaria o muerte de etiología coronaria, incorporando entre sus variables al valor del EIM y a la presencia o ausencia de PAC, con el objetivo de mejorar su capacidad predictiva (27).

A su vez, la tomografía coronaria es una tomografía computada sin contraste limitada al tórax que localiza y cuantifica los depósitos patológicos de calcio en las arterias coronarias epicárdicas con un umbral de definición de calcio de 130 unidades Hounsfield. La calcificación vascular adquiere importancia por ser un sello distintivo de la aterosclerosis. Se inicia en zonas con alta inflamación, especialmente en los centros necróticos ricos en *debris* celulares, como focos de microcalcificaciones, que luego progresan de tamaño, alcanzando el umbral de detección tomográfico. *Agatston et al* desarrollaron un puntaje de calcio (*score* de calcio) basado en el producto del área de placa calcificada por la densidad de la lesión cálcica máxima definida como 1 si presentaba 130 a 199 unidades Hounsfield, 2 para 200 a 299, 3 para 300 a 399 y 4 si superaba 400

(28). Un puntaje de 0 significa ausencia de placa calcificada, de 1 a 10 la presencia de una calcificación mínima, de 11 a 100 una calcificación leve, de 101 a 400 una calcificación moderada y mayor de 400 una calcificación severa. La tomografía coronaria es un fuerte predictor no sólo de eventos cardíacos isquémicos, si no de infarto cerebral, riesgo que incrementa con valores mayores de puntajes de calcio, independientemente de los factores de riesgo tradicionales (29,30) . Adicionalmente, el puntaje de calcio incrementa el poder de discriminación y mejora la clasificación de los individuos en relación con dichas ecuaciones (31). Si bien un *score* de calcio de 0 no descarta aterosclerosis, pues el paciente puede tener placas no calcificadas, este valor está relacionado con un muy bajo índice de eventos coronarios (29). Se debe tener en cuenta que la realización de una tomografía coronaria implica una exposición a irradiación de un 1 mSv aproximadamente por estudio.

La utilización de estos métodos complementarios imagenológicos en conjunto con las ecuaciones de riesgo cardiovascular puede mejorar el poder de discriminación de dichas ecuaciones. Sin embargo, debido a la complejidad técnica y al alto costo de estas pruebas diagnósticas es necesaria la correcta selección de los pacientes que se beneficiarían con su aplicación.

1.4 Los monocitos de sangre periférica en la aterosclerosis

Las células inflamatorias con mayor protagonismo en las primeras etapas de la aterosclerosis son los monocitos de sangre periférica. Estos leucocitos son un grupo heterogéneo de células que se clasifican en diversas subpoblaciones según la expresión diferencial de proteínas de superficie celular. En ratones se los divide según el nivel de expresión de los marcadores de superficie Ly6C (del inglés *Lymphocyte antigen 6 Complex*) y CD43 (del inglés *Cluster of Differentiation*) en tres subpoblaciones monocitarias: clásica (Ly6C⁺⁺CD43⁺), intermedia (Ly6C⁺⁺CD43⁺⁺) y no clásica (Ly6C⁺CD43⁺⁺) (32). Los monocitos clásicos murinos tienen alta expresión en su membrana plasmática del receptor de quimiocina CCR2 (del inglés *C-C Chemokine Receptor type 2*) cuyo ligando es el MCP 1 que participa en la migración monocitaria a la pared vascular. Estos monocitos poseen alta capacidad de fagocitosis y de producir sustancias proinflamatorias, diferenciándose a macrófagos M1 inflamatorios en la pared vascular. Mientras que los monocitos no clásicos murinos patrullan el endotelio,

expresan principalmente al receptor de quimiocina CX₃CR1 y se diferencian a macrófagos M2 en la pared vascular, en donde secretan citocinas antiinflamatorias y participan en tareas de reparación tisular (33). En humanos, los monocitos de sangre periférica se subdividen en tres subpoblaciones en base a la expresión de dos marcadores de superficie: el receptor del complejo de lipopolisacáridos CD14 y el receptor de baja afinidad para Fc (región constante de los anticuerpos) CD16 (FcγRIII): monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻), monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺) y monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (32). Los monocitos clásicos humanos expresan en su membrana plasmática al receptor de quimiocina CCR2, tienen gran capacidad fagocítica y de producción de agentes antimicrobianos, siendo la subpoblación monocitaria más frecuente (> 80% del total de monocitos en sangre periférica). Los monocitos intermedios humanos expresan el receptor de quimiocina CCR5, tienen la capacidad proinflamatoria de producir radicales libres, TNFα e IL1β, la propiedad de captar LDL oxidadas y poseen funciones proangiogénicas. Por último, los monocitos no clásicos humanos expresan el receptor de quimiocina CX₃CR1 y principalmente realizan tareas de patrullaje sobre la superficie endotelial (34).

La participación en diferentes e importantes etapas de la génesis inflamatoria de la aterosclerosis instala a los monocitos como potenciales biomarcadores celulares precoces de esta enfermedad.

1.5 Biomarcadores moleculares en la aterosclerosis

1.5.1 Receptores depuradores (scavengers). Las *foam cells* son células protagónicas de las lesiones ateroscleróticas que se originan de los macrófagos intimaes y de las células musculares lisas vasculares. Los macrófagos captan e internalizan a las LDL oxidadas a través de distintos receptores *scavengers* que incluyen a CD36, SR-A1 (del inglés *Scavenger Receptor A1*) y LOX-1 (del inglés *Lectin-like oxLDL receptor-1*). En el interior del macrófago, los lisosomas catabolizan a las LDL oxidadas hidrolizando los ésteres de colesterol y generando colesterol libre. Las moléculas de colesterol libre son reesterificadas dentro del retículo endoplásmico y almacenadas en gotas lipídicas o *lipid droplets*. Los macrófagos por hidrólisis secundaria de estas moléculas de colesterol esterificado generan nuevamente colesterol libre

que interactuará con proteínas de transporte ubicadas en la membrana plasmática que producen el eflujo celular lipídico. Estos transportadores de colesterol son ABCA1 (del inglés *ATP-Binding Cassette A1*), ABCG1 y SR-BI, y tienen como aceptores de sus moléculas de colesterol al HDL y a la apolipoproteína A1 (ApoA1). El excesivo influjo de LDL oxidadas a los macrófagos, con la acumulación de ésteres de colesterol y la reducción del eflujo de colesterol libre genera la formación de *foam cells* (35).

El CD36 es una glucoproteína constituida por un dominio extracelular flanqueado por dos dominios de transmembrana, que forma parte de la familia de receptores *scavengers* clase B y se expresa en diversos tipos celulares, entre los que se destacan monocitos, macrófagos, plaquetas, eritrocitos, células endoteliales, adipocitos y células musculares (36). Diversos ligandos interactúan con este receptor, entre ellos LDL oxidadas, fosfolípidos oxidados, ácidos grasos de cadenas largas, trombospondina, células apoptóticas y eritrocitos infectados con *Plasmodium malariae*. Además, su expresión está aumentada por interleucinas proinflamatorias como las IL-1, IL-4 e IL-18 (37).

El CD36 interviene activamente en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas, producto de la endocitosis de lipoproteínas oxidadas, contribuyendo a la generación de *foam cells* en la capa intimal de la pared vascular. Esto fue demostrado en estudios con ratones deficientes en ApoE y CD36 y alimentados con dietas ricas en grasa, donde se observó una disminución cercana al 80% de lesiones ateroscleróticas aórticas en comparación con lo producido en ratones sólo deficientes en ApoE. Evento similar se observó en macrófagos peritoneales deficientes en CD36 y ApoE, los cuales presentaron una menor acumulación de LDL oxidadas y formación de *foam cells* (38). Además, se conoce que las LDL oxidadas inhiben la migración de macrófagos, un proceso dependiente del receptor CD36 quien activa una cascada de señales intracelulares, lo cual facilita el atrapamiento de estas células en la pared vascular (39).

Las anteriores características funcionales del CD36 en la génesis de *foam cells* y en la inhibición de la migración de macrófagos lo transforman en un potencial biomarcador molecular de aterosclerosis.

1.5.2 Integrinas. En el proceso de migración de los monocitos desde la luz vascular al interior de la capa íntima participan receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos. En las etapas iniciales de contacto y rodamiento de los monocitos con la superficie endotelial las selectinas juegan un rol primordial, estableciendo interacciones reversibles y de corta duración con sus ligandos, mientras que en las etapas de adhesión firme, locomoción y transmigración endotelial monocitaria las integrinas cumplen un papel protagónico (40).

Las integrinas son glucoproteínas de transmembrana compuestas por dos subunidades (α y β) asociadas a través de uniones no covalentes. Cada subunidad posee un dominio extracelular, uno de transmembrana y una fracción pequeña intracitoplasmática que se relaciona con proteínas del citoesqueleto y participa en procesos de señalización interna. Se conocen en los mamíferos 18 subunidades α y 8 subunidades β , cuya combinación produce 24 diferentes integrinas que están presentes en diversas células. Se las clasifica en subfamilias según la subunidad β común ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 7$). La expresión de los tipos de integrinas difiere entre las clases de leucocitos, destacándose las subfamilias $\beta 1$ y $\beta 2$ en los monocitos. La subfamilia $\beta 2$, presente sólo en leucocitos, se caracteriza por tener como subunidad β común a CD18, que se une a cuatro subunidades α diferentes: αL (CD11a), αM (CD11b), αX (CD11c) y αD , generando las moléculas LFA-1 (CD11a/CD18), Mac-1 (CD11b/CD18), p150/95 (CD11c/CD18) y $\alpha D\beta 2$. De estos receptores de integrinas $\beta 2$, los tres primeros: LFA-1, Mac-1 y p150/95 se expresan en monocitos (40,41).

La integrina LFA-1 tiene como ligandos a las moléculas de adhesión ICAM-1, -2, -3, -4 e ICAM-5 y JAM-1 (del inglés *Junctional Adhesion Molecule-1*). Se destaca su participación junto con ICAM-1 en la etapa de adhesión firme de los monocitos a la capa endotelial. La integrina Mac-1 es capaz de reconocer y unir múltiples moléculas como la fracción C3bi del complemento, el fibrinógeno, el factor X, ICAM-1/ICAM-4 y JAM-3. En la etapa de locomoción desempeña un

rol importante ligada al ICAM-1. Los ligandos de la integrina p150/95 son VCAM-1, ICAM-1, ICAM-2 y las moléculas extracelulares como el fibrinógeno, el colágeno, los lipopolisacáridos y la fracción C3bi del complemento. Esta $\beta 2$ integrina actúa en forma cooperativa con otra $\beta 1$ integrina, VLA-4, que participa en la etapa de adhesión firme monocitaria interaccionando con VCAM-1 (42). En modelos murinos deficientes en ApoE, la hipercolesterolemia incrementa la expresión de CD11c, mientras que la ausencia de CD11c en estos mismos ratones disminuye la adhesión firme monocitaria, reduce la acumulación de macrófagos en lesiones ateroscleróticas e inhibe el desarrollo de aterosclerosis (43).

En base a estos conocimientos sobre las integrinas y su rol en las interacciones de los monocitos con las células endoteliales, principalmente en las etapas de adhesión y trans migración endotelial, se las considera como potenciales biomarcadores tempranos de aterosclerosis.

1.6 Receptores de LDL: LRP1

1.6.1 Aspectos generales de la estructura, expresión y función del LRP1.

La familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad comprende un grupo de receptores endocíticos que participan en el metabolismo de las lipoproteínas. El receptor LRP1 (del inglés *Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1*), también conocido como receptor de α_2 macroglobulina o CD91, es un miembro destacado de esta familia de receptores, presentando similitudes en su diseño estructural con otros miembros como el receptor de LDL, el VLDL (del inglés *Very Low Density Lipoprotein*), el receptor apoE tipo 2, el LRP1B, el LRP2 y el MEGF7 (del inglés *Multiple Epidermal Growth Factor-like domains 7*) (44). En la última década el LRP1 ha sido propuesto como un factor molecular clave en el desarrollo de la aterosclerosis (44,45). A su vez, los monocitos de sangre periférica son los únicos leucocitos que expresan LRP1 en su superficie celular (46). Es un receptor presente en diferentes células, que interacciona con múltiples ligandos y que cumple funciones de endocitosis y transducción de señales intracelulares.

El LRP1 es sintetizado como una simple cadena polipeptídica de 600 kDa, que será escindido en el complejo de Golgi por endoproteasas tipo furina en dos

subunidades de diferente peso molecular: una de 515 kDa o subunidad α y otra de 85 kDa o subunidad β . La subunidad α N-terminal es enteramente extracelular y se une a la subunidad β C-terminal por una asociación no covalente. La subunidad β tiene un pequeño dominio extracelular, un segmento transmembrana y otro citoplasmático (47). En la subunidad α se encuentran cuatro motivos de unión a ligandos ricos en cisteína, denominados I a IV. Los motivos II y IV interaccionan con la mayoría de los ligandos. Estos motivos están relacionados a cuatro dominios homólogos al precursor del factor de crecimiento epidérmico (48). En dos segmentos de la región citoplasmática de la subunidad β del LRP1 está la secuencia de aminoácidos NPxY que media el agrupamiento de este receptor en cavidades de membrana plasmática revestidas de la proteína clatrina. Esta secuencia NPxY cobra importancia por su capacidad de interaccionar con proteínas adaptadoras citosólicas que poseen dominios proteicos PTB (del inglés *Phosphotyrosine Binding Domain*), agentes claves para activar las vías de señalización intracelular (49).

De la extensa lista de ligandos que se unen al LRP1 se destacan: las proteínas relacionadas con el metabolismo de las lipoproteínas (ej: quilomicrones remanentes, VLDL remanentes, β VLDL, lipoproteína lipasa, lipasa hepática), los factores de crecimiento (ej: PDGF, TGF β), las proteasas y sus complejos con inhibidores [ej: complejos proteasa/ α_2 macroglobulina, proteasa/PZP (del inglés *Pregnancy Zone Protein*), trombina/antitrombina III, trombina/ cofactor II de heparina, tPA /PAI-1 (del inglés *tissue Plasminogen Activator/ Plasminogen Activator Inhibitor-1*), uPA/PAI-1 (del inglés *urokinase type Plasminogen Activator*), metaloproteinasas MMP-9 y MMP-13 (del inglés *Matrix Metalloproteinase*), aprotinina], la proteína precursora β amiloide y proteínas de matriz (ej: fibronectina) (44).

El LRP1 internaliza estos ligandos utilizando el mecanismo de endocitosis mediada por receptor pero con rutas citoplasmáticas diferentes según el caso. Por ejemplo, la exotoxina A producida por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, pertenece a la familia de las ADP ribosiltransferasas y se une al receptor LRP1 en la superficie celular e ingresa a la célula para alcanzar el retículo endoplásmico por dos vías diferentes: la vía mediada por el receptor

KDEL y la vía *sorting* dependiente de lípidos. En la primera, luego de unirse al LRP1, se internaliza a través de vesículas cubiertas por clatrina y en el ambiente endosomal temprano, gracias al pH ácido, se disocia del receptor y es clivada por la acción de una enzima furina en dos fragmentos. Posteriormente alcanza el endosoma tardío y gracias a una vía regulada por Rab9, una GTPasa de la superfamilia RAS, llega a la red *trans* del Golgi en donde se une al receptor KDEL y finalmente es transportada al retículo endoplasmático. En la segunda opción, la exotoxina A ligada al LRP1 se asocia a microdominios resistentes a detergente y es internalizada vía caveolina. Desde los caveosomas pasa a los endosomas tempranos gracias a Rab5, allí es fragmentada e ingresa a la red *trans* del Golgi arribando luego al retículo endoplasmático (50).

También el destino intracelular de sus ligandos es diferente, como se observa con la α_2 macroglobulina (α_2 M) y la apoE. Los complejos proteasa/ α_2 M son internalizados por LRP1, este receptor es reciclado mientras que el ligando es degradado por los lisosomas. Respecto a la ApoE, proveniente principalmente de la endocitosis de lipoproteínas remanentes, es internalizada por LRP1 a partir de lo cual se disocia en los endosomas tempranos. No obstante, luego de la disociación con el receptor, la ApoE no sigue una ruta de degradación sino que se une a partículas HDL internalizadas temporariamente, permitiendo así su reciclado (51).

No sólo el dominio extracelular del LRP1 interacciona con diversos ligandos, también el segmento intracelular de la subunidad β interactúa con proteínas citoplasmáticas como la proteína adaptadora Dab 1 (del inglés *Disabled-1*), capaz de regular la migración y diferenciación postmitótica de neuronas durante el desarrollo cerebral, la proteína Shc y la proteína FE 65, otra proteína adaptadora que también se relaciona con la proteína precursora amiloide APP (del inglés *Amiloid Precursor Protein*) (52,53). Estas proteínas participan en la regulación del tráfico celular o en vías de señalización intracelular íntimamente asociadas con la Enfermedad de Alzheimer.

El LRP1 interviene en diferentes acciones según su expresión tisular y los ligandos con los que interactúe. Una de ellas es su participación en el

clearance de los complejos proteasas/inhibidores. Por ende, es el receptor hepático clave para depurar los complejos proteasas/ α_2 M circulantes. Las glucoproteínas plasmáticas antiproteasas α_2 M y PZP pertenecen a la familia de las α macroglobulinas. La α_2 M está compuesta por cuatro subunidades idénticas que se ensamblan en una estructura tetramérica. Cada subunidad posee una región aminoacídica denominada *bait* que puede ser clivada por la mayoría de las endopeptidasas, lo cual genera un cambio conformacional de la α_2 M. Este cambio conformacional activa la función antiproteasa de esta macroglobulina, permitiendo el atrapamiento molecular de diferentes proteasas y excluyéndolas de acceder a sus sustratos (54). Adicionalmente se exponen dominios de reconocimiento de receptor carboxiterminales que interactúan con LRP1 para la posterior endocitosis de los complejos proteasas/ α_2 M (55). Esta función endocítica del LRP1 de los complejos proteasas/inhibidores le permite participar en la regulación de la actividad proteolítica extracelular, tanto a nivel de la circulación general como a nivel tisular. Por lo tanto, el LRP1 al intervenir en el *clearance* de las proteasas, juega un rol fundamental en la migración celular, en la remodelación de la matriz extracelular y en la estabilidad de las lesiones ateroscleróticas.

También LRP1 es uno de los receptores que participan en la remoción de la circulación de los complejos de serpinas (inhibidores de serino-proteasas) con sus enzimas proteolíticas, sobresaliendo los complejos formados por trombina/antitrombina-III, trombina/cofactor-II de heparina y tripsina/ α_1 antitripsina (56). En investigaciones llevadas a cabo en blastocitos murinos se demostró que la deficiencia homocigota de LRP1 altera la viabilidad del embrión, con lo cual es fundamental para el normal desarrollo embrionario, probablemente asociado con el *clearance* del complejo uPA/PAI-1 (57,58).

1.6.2 LRP1 en aterosclerosis. El LRP1 participa en la endocitosis de diferentes lipoproteínas, destacándose los quilomicrones remanentes, las β -VLDL enriquecidas en ApoE, y los complejos de lipoproteínas ricas en triglicéridos con lipoproteína lipasa y lipasa hepática (59,60). Experimentos realizados en ratones demuestran que la inactivación del LRP1 aumenta los niveles sanguíneos de lipoproteínas remanentes (61). Paralelamente, en ensayos con ratones de edad avanzada, que presentan una reducción en la

expresión hepática de VLDL-R y del LRP1, se observó un *clearance* lentificado de los quilomicrones remanentes (62). También la inactivación del LRP1 en células hepáticas de ratones deficientes de LDL-R produjo un incremento de las concentraciones plasmáticas de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas remanentes (6). Estos trabajos demuestran el rol del LRP1 en el metabolismo de las lipoproteínas protagónicas en el desarrollo de aterosclerosis.

Las LDL en contacto con la matriz extracelular arterial sufren modificaciones de agregación y oxidación. Estas LDL agregadas ingresan a los macrófagos, se acumulan en su interior como colesterol esterificado y los transforman en *foam cells*. Estudios realizados en macrófagos derivados de monocitos humanos expuestos a LDL agregadas, revelaron que la inhibición del LRP1 evita la acumulación intracelular de LDL, demostrando que el LRP1 participa en la captación de estas lipoproteínas modificadas en los macrófagos (63). También el LRP1 media la captación selectiva del colesterol esterificado en las LDL agregadas por las células musculares lisas vasculares humanas, efecto que disminuye cuando se inhibe este receptor (64). En concordancia, un estudio desarrollado en arterias coronarias humanas evidenció mayor expresión de LRP1 y mayor captación de LDL agregadas entre las células musculares lisas vasculares de lesiones ateroscleróticas con respecto a células musculares lisas vasculares de áreas no ateroscleróticas (65). Además las LDL agregadas incrementan la expresión de LRP1 en cultivos de células musculares lisas vasculares humanas, impacto que igualmente se observa *in vivo* en aortas de animales porcinos hipercolesterolémicos (66).

Las LDL oxidadas se generan a partir de las LDL nativas bajo el efecto de diversos sistemas enzimáticos oxidativos, como son las lipoxigenasas, las mieloperoxidasas y la NADPH-oxidasa. Las lipoxigenasas son enzimas que catalizan la incorporación de oxígeno a los ácidos grasos poliinsaturados originando derivados hidroperóxidos. Una de ellas, la 12/15 lipoxigenasa se encuentra en los macrófagos, puede oxidar ácidos grasos libres, fosfolípidos y colesterol esterificados e interactúa con el LRP1 en la oxidación de las LDL mediada por células. Las LDL circulantes se unen a este receptor, transfiriendo selectivamente ésteres de colesterol de las LDL a la membrana plasmática vía LRP1 sin realizar endocitosis ni degradación de la lipoproteína, y

posteriormente tiene lugar la oxidación por la 12/15 lipoxigenasa, enzima citosólica que se transloca a la membrana plasmática para cumplir este proceso (67,68). La relación del LRP1 con las LDL oxidadas y agregadas implica un rol adicional en la generación de lesiones ateroscleróticas.

La participación del LRP1 en la fisiopatogenia de la aterosclerosis no se limita únicamente al *clearance* de las lipoproteínas remanentes, ni a la captación de las LDL agregadas. Su presencia en diversos tipos celulares y su interacción con múltiples ligandos le permiten participar en otras funciones. Un estudio realizado en ratones deficientes de LDL-R y ApoE, a los cuales se le sumó la inactivación génica selectiva de LRP1 hepático, correlacionó con un incremento del área de lesión aterosclerótica, a pesar de menores niveles de colesterol y triglicéridos plasmáticos, pero con un aumento de los valores de lipoproteína lipasa, factor VIII, factor de Von Willebrand y tPA. Estos hallazgos podrían ser explicados por el rol del LRP1 hepático en mantener bajos niveles circulantes de ligandos proaterogénicos (69). En modelos murinos deficientes de LDL-R con presencia constitutiva de ApoE, la ausencia selectiva de LRP1 en macrófagos promovió aterogénesis, incrementando la acumulación de células apoptóticas y reclutamiento de monocitos inflamatorios, lo cual demuestra un efecto independiente de este tipo de apolipoproteína (70). En este mismo modelo animal también se observó que la progresión del desarrollo de lesiones ateroscleróticas estuvo asociado con la instalación de un estado proinflamatorio, incrementando la secreción de MCP1 y TNF α , en consonancia con el aumento de la celularidad monocitaria en la pared aórtica proximal. Además se acrecentó la actividad enzimática de MMP-9, una metaloproteinasa clave en la remodelación de la matriz extracelular y en la evolución de placas ateroscleróticas inestables (71,72).

Otra función del LRP1 es suprimir la activación del receptor del PDGF, colaborando en la integridad de la pared vascular. El PDGF es un potente mitógeno de fibroblastos y células musculares lisas, que por medio de la activación de su receptor y de las quinasas de la familia Src, produce una fosforilación transitoria de los residuos de tirosina del segmento NPxY de la región citoplasmática del LRP1, lo cual incrementa la asociación con la proteína adaptadora Shc, quien participa en las vías de señalización de Ras y de c-Myc

(73). La inactivación del LRP1 en células musculares lisas vasculares murinas produce una sobreexpresión y activación del receptor del PDGF favoreciendo la disrupción de la lámina elástica, la proliferación de células musculares lisas, la formación de aneurismas y el desarrollo de aterosclerosis inducido por colesterol en la pared vascular (74).

El TGF β participa en procesos de angiogénesis, diferenciación, proliferación, migración y apoptosis celular. Se une a receptores del tipo serina/treonina quinasas, formando un complejo de señalización activo de ligandos diméricos junto a dos tipos de receptores TGF β , los cuales fosforilan proteínas intracelulares Smad. Estas proteínas se unirán con otra proteína, Smad 4, y translocarán al núcleo para regular la transcripción de determinados genes (75). Asimismo el TGF β es un ligando del LRP1, y en modelos murinos de células musculares lisas deficientes de LRP1 se observó un incremento de la señalización del TGF β , con un aumento concomitante en la expresión y activación del receptor del PDGF y de los niveles de trombospondina, MMP-2 y MMP-9, moléculas que también activan al TGF β . Como resultado de la activación del TGF β se detectaron alteraciones en la capa elástica de la pared vascular, fibrosis vascular, elongación y distensión de la aorta, un fenotipo similar al síndrome de Marfan (76).

1.7 Aterosclerosis, monocitos y LRP1

En relación a la aterosclerosis, la extravasación y diapédesis de los monocitos desde la luz vascular al interior de la pared arterial, la proliferación de los macrófagos en la pared vascular y la migración de las células musculares lisas desde la capa media a la íntima son hitos fundamentales en su fisiopatogenia. En igual sentido, la migración de los leucocitos es primordial para cumplir sus funciones en dicha lesión aterosclerótica. Las células pueden migrar de forma individual o colectiva, manteniendo en este último caso las uniones célula-célula. Con respecto a la migración individual existen dos modos básicos: el ameboidal y el mesenquimal. En el modo ameboidal las células mantienen su forma esferoidal o elipsoidal, se desplazan rápidamente, no establecen focos de adhesión firmes con el medio extracelular ni requieren una proteólisis focalizada, lo cual caracteriza a la motilidad de desplazamiento de la mayoría de los leucocitos (77). Diferente es el modo mesenquimal, con desplazamiento

más lento, que requiere la utilización de enzimas proteolíticas sobre la matriz extracelular circundante y presenta adhesiones más firmes con su sustrato. En este modo las células adquieren una forma fusada, con polarización celular y repetición de ciclos de protrusión en el frente de avance, adhesión al sustrato, contracción del cuerpo celular y retracción de la parte posterior para movilizarse. Las células en su polo delantero generan protrusiones de su membrana celular, anchas lamelipodias constituidas por redes de filamentos de actina y puntiagudas filopodias con filamentos paralelos de actina. En el proceso de polarización existe una activación diferencial de una familia de enzimas guanosina trifosfatasa, las GTPasas, destacándose Rac, Rho y Cdc42 que median la protrusión del borde delantero (78,79). Este modo mesenquimal es utilizado típicamente por los fibroblastos, macrófagos y células musculares lisas vasculares (80-83).

El LRP1 presenta una activa participación en la regulación de la migración mesenquimal de diversas células al interactuar con distintos ligandos y receptores celulares. En fibroblastos embrionarios murinos, la deficiencia de LRP1 aceleró la migración celular en superficies con vitronectina y fibronectina, secundario al aumento tanto de los niveles de uPA como de la expresión en superficie del receptor uPAR, demostrando un rol regulatorio del LRP1 sobre el sistema uPA/uPAR (44,83-86). Nuestro grupo de investigación demostró en macrófagos que la α_2M activada al interactuar con LRP1 induce la migración celular en modo mesenquimal, con producción de protrusiones celulares, distribución de MT1-MMP y polimerización de actina en dichas protrusiones, formación de adhesiones focales y aumento de actividad de endocitosis y reciclado endocítico de β_1 integrina en relación al incremento de internalización de LRP1 (87). Anteriormente se había demostrado que la α_2M activada induce la expresión y secreción de MMP-9 en líneas celulares derivadas de macrófagos a través de la interacción con LRP1, como resultado de la activación dependiente de la proteína quinasa PKC, de las vías de señalización intracelulares MAPK-ERK1/2 y del factor de transcripción NF- κ B, además de facilitar un influjo de calcio extracelular (88). En base a estos ensayos previos descritos, es claro el papel que cumple el receptor LRP1 en la migración celular, un evento clave para el desarrollo de lesiones ateroscleróticas.

En contraste con el estado actual de conocimiento sobre la participación de LRP1 en macrófagos y células musculares lisas vasculares, la función de este receptor en monocitos durante el desarrollo de la aterosclerosis es aún incierta. Datos propios demuestran que LRP1 es exclusivamente expresado por monocitos de sangre periférica dentro de la población leucocitaria global, y a su vez dentro de los monocitos está presente proporcionalmente en mayor medida en monocitos clásicos e intermedios (46). Esta expresión diferencial de LRP1 en monocitos “inflamatorios” podría tener al menos dos implicancias en la participación de este componente celular durante el desarrollo aterosclerótico. Por un lado, la capacidad de regular el proceso de adhesión y diapédesis de los monocitos dado que una pérdida en la expresión de LRP1 en monocitos clásicos e intermedios podría exacerbar los procesos adhesivos de estas células al disminuir el proceso endocítico de integrinas que median la adhesión de los monocitos con células endoteliales (89,90). Otra instancia, al igual que lo demostrado en macrófagos (91), es que la pérdida de LRP1 en monocitos clásicos e intermedios promueva la expresión de factores proinflamatorios, exacerbando dicho componente en el proceso inicial de la aterosclerosis. Más allá de la necesidad de responder estos interrogantes sobre las acciones de LRP1 en monocitos durante el desarrollo de la aterosclerosis, posicionan a este receptor monocitario como un potencial biomarcador temprano en aterosclerosis.

1.8 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los niveles de expresión de LRP1 en monocitos de sangre periférica, en asociación con otros marcadores monocíticos, podrían ser utilizados como biomarcadores tempranos de la formación de la placa de ateroma.

1.9 OBJETIVO GENERAL:

Establecer el nivel de expresión de determinados biomarcadores presentes en monocitos de sangre periférica de individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

1.10 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

A través de un estudio clínico observacional se propusieron alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1) Establecer el nivel de expresión de LRP1 y otros marcadores (CD36, CD11b, CD11c) en la población total de monocitos de sangre periférica de individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

2) Determinar los niveles porcentuales de las subpoblaciones de monocitos: clásica (CD14⁺⁺/CD16⁻), intermedia (CD14⁺⁺/CD16⁺) y no clásica (CD14⁺/CD16⁺⁺) así como la expresión diferencial de los marcadores antes mencionados (LRP1, CD36, CD11b, CD11c) en dichas subpoblaciones monocitarias en individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Diseño clínico

A cada uno de los individuos que ingresaron al estudio se le confeccionó una historia clínica completa, se le extrajo una muestra de sangre por venopunción luego de un período de ayunas de al menos 12 horas y se le realizaron una ecografía doppler carotídea y una tomografía coronaria no contrastada. Con todos estos datos recolectados se completó una ficha para cada paciente y se le estimó el riesgo de padecer distintos eventos cardiovasculares aplicando las ecuaciones de Framingham a 10 y 30 años, las de las cohortes combinadas a 10 años y a lo largo de la vida, y la ecuación de riesgo coronario del estudio *ARIC* (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*) que incluye la ecografía doppler carotídea.

2.1.1 Criterios de inclusión. Se incluyeron en este estudio a los individuos de 20 a 59 años de edad, que consultaron al servicio de clínica médica del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba (Córdoba, Argentina), que aceptaron participar en este estudio, que no cumplían con ningún criterio de exclusión y que habían previamente leído, comprendido y firmado el consentimiento informado bajo la aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigación en Salud (CIEIS HP 4/2013) del Hospital Privado Centro Médico de Córdoba.

2.1.2 Criterios de exclusión. Se excluyeron del estudio a los individuos que presentaban alguna de las siguientes características:

1) Antecedentes de enfermedad cardiovascular (IAM, angina estable, angina inestable, cirugía de revascularización miocárdica, angioplastia coronaria, ACV isquémico, ACV hemorrágico, crisis isquémica transitoria, insuficiencia cardíaca, arteriopatía periférica o enfermedad de la aorta y arterias asociadas).

2) Antecedentes de diabetes mellitus tipo 1 o tipo 2.

3) Individuos bajo tratamiento actual o previo con drogas hipolipemiantes (fibratos, ezetimibe, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A reductasa, ácido nicotínico, colestiramina).

4) Mujeres embarazadas.

5) Mujeres bajo tratamiento actual con anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal.

6) Individuos que hayan padecido cuadro febril en el último mes.

2.1.3 Historia clínica completa. A cada individuo que se incluyó en este estudio, se le realizó una historia clínica completa con anamnesis y examen físico para obtener las siguientes variables:

1) Edad expresada en años.

2) Sexo: masculino o femenino.

3) Hipertensión arterial (HTA) fue definida como una presión arterial sistólica \geq 140 mmHg y/o una presión arterial diastólica \geq 90 mmHg en al menos 2 mediciones previas separadas temporalmente o que se encuentre bajo tratamiento actual con medicación antihipertensiva.

4) Tabaquista actual fue definido como aquel individuo que consumió al menos un cigarrillo en el mes previo al momento del enrolamiento.

5) No tabaquista fue considerado a aquel individuo que nunca había consumido tabaco.

6) Ex tabaquista fue designado a aquel individuo que al momento del enrolamiento no había consumido tabaco en el mes previo, pero sí lo había hecho antes. Se lo dividió en 2 subgrupos según si el período de abstinencia había comenzado hacía más de 5 años o menos de 5 años.

7) Antecedente familiar de coronariopatía precoz fue considerado cuando un familiar masculino de primer grado que antes de los 55 años o de un familiar femenino de primer grado que antes de los 65 años padecieron un infarto agudo de miocardio o muerte súbita.

8) Mujer menopáusica fue calificada cuando tenía el cese permanente de la menstruación, determinado de manera retrospectiva tras 12 meses consecutivos de amenorrea, sin causas patológicas y como resultado de la pérdida de actividad folicular ovárica.

9) Sedentarismo fue asignado cuando el individuo realizaba menos de 3 horas semanales de actividad física.

10) Antecedente de dislipidemia fue definido cuando el individuo tenía colesterol total ≥ 200 mg/dl, colesterol HDL < 40 mg/dl en varones ó < 50 mg/dl en mujeres, o triglicéridos ≥ 150 mg/dl.

11) El síndrome metabólico fue definido cuando por lo menos tres de los siguientes factores estaban presentes: perímetro de cintura abdominal ≥ 102 cm en hombres y ≥ 88 cm en mujeres; triglicéridos ≥ 150 mg/dl; colesterol HDL < 50 mg/dl en mujeres y < 40 mg/dl en hombres; presión arterial $\geq 130/85$ mm Hg y glucemia en ayunas ≥ 100 mg/dl, de acuerdo a los criterios fijados por *American Heart Association/NHLBI* (del inglés, *National Heart, Lung, and Blood Institute*) (92).

12) Registro de antecedentes personales patológicos clínicos y quirúrgicos, además del consumo actual de cualquier medicación.

13) El peso fue expresado en kilogramos y la talla fue expresada en metros. El índice de masa corporal fue calculado como el peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la altura en metros; considerando como obesidad a un índice de masa corporal ≥ 30 kg/m², sobrepeso entre 25 a 29,9 kg/m² y normopeso entre 18,5 a 24,9 kg/m², de acuerdo con la definición del *NHLBI* (93).

14) Los valores de presiones arteriales sistólica y diastólica fueron obtenidos luego de permanecer sentado y en reposo unos minutos previos. Se expresaron en mmHg.

15) El perímetro de cintura abdominal fue expresado en centímetros, fue obtenido con el paciente en posición de pie al final de una espiración normal, con los brazos relajados a cada lado y la medida fue tomada a la altura de la línea media axilar, en el punto imaginario que se encuentra entre la parte inferior de la última costilla y el punto más alto de la cresta iliaca.

2.2 Parámetros hematológicos, bioquímicos y citometría de flujo

Se extrajeron 10 ml de sangre periférica de vena del antebrazo, empleando material estéril y descartable y bajo consentimiento escrito y firmado. 4 ml de

sangre fueron anticoagulados con ácido etilendiaminotetraacético-tripotásico (EDTA-K3): 2 ml para analizar parámetros hematológicos y 2 ml para los ensayos de citometría de flujo. De los 6 ml restantes se obtuvo suero para parámetros bioquímicos.

La medición de los diferentes parámetros bioquímicos y hematológicos fue realizada mediante la utilización de test diagnósticos comerciales y validados, los cuales fueron provistos por Roche Diagnostics. Se midieron glucemia, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, triglicéridos, creatinina, proteína C reactiva, hemoglobina glicada, insulina basal, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, eritrocitos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, ApoA, ApoB y lipoproteína a.

La medición de LRP1 se realizó a través del ensayo de citometría de flujo previamente optimizado en nuestro grupo de trabajo utilizando un citómetro de flujo BD FACSCalibur (46). A través de este ensayo también se determinaron los valores absolutos y relativos de las subpoblaciones monocitarias. Los otros marcadores monocíticos (CD11b, CD11c y CD36) se determinaron por ensayos de citometría de flujo empleando la misma estrategia de análisis que la utilizada para LRP1. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-LRP1 conjugado con ficoeritrina (PE) para detectar LRP1 en subpoblaciones monocitarias por citometría de flujo (clon MCA1965; isotipo: ratón IgG1; AbD Serotec, Oxford, Reino Unido). La sangre entera fue extraída en tubos colectores de plástico con EDTA-K3 (DVS, No. 1213752.5; Buenos Aires, Argentina), y las muestras fueron preparadas para citometría de flujo dentro de los 30 minutos. Aproximadamente 50 µl de sangre entera fue adicionado a un tubo de 5 ml de fondo redondo de poliestireno (No. 352008; BD Biosciences), y 1 µl de cada anticuerpo marcado con fluorocromo antígeno específico (dilución 1:50) fue agregado. La muestra fue incubada posteriormente por 20 minutos a 4 °C a oscuras. La lisis de eritrocitos fue realizada utilizando una solución de lisis (*Lysing Buffer* No. 555899; BD Pharm Lyse) por 15 minutos. Primero, los leucocitos CD45 positivos fueron visualizados en un gráfico SSC versus CD45, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CD45 conjugado con PE.Cy5 (clon J.33; isotipo: ratón IgG1; Beckam Coulter, Krefeld, Alemania). Luego los monocitos fueron seleccionados a partir de todos los leucocitos CD45 positivos

usando un gráfico SSC versus LRP1, mientras que las subpoblaciones monocitarias fueron identificadas con un gráfico CD14 versus CD16, en base a la cuantificación de su expresión diferencial, empleando un anticuerpo monoclonal anti-CD14 conjugado con FITC (clon RMO52; isotipo: ratón IgG2a; Beckam Coulter, Krefeld, Alemania) y un anticuerpo monoclonal anti-CD16 conjugado APC.Cy7 (clon 3G8; isotipo: ratón IgG1; BD Biosciences, San José, California, Estados Unidos). La intensidad de media de fluorescencia (IMF) para LRP1 en monocitos clásicos, intermedios y no clásicos fue determinada del patrón de distribución celular obtenido del gráfico CD14 versus CD16.

2.3 Ecografía doppler carotídea

El estudio de ecografía doppler carotídea fue realizado utilizando un equipo 2D ultrasonido Accuvix V10, Samsung Medison Co. Ltd. (Seúl, Corea del Sur) con transductor lineal de frecuencia variable de 7 a 12 MHz. Se examinaron en forma bilateral el segmento distal de la arteria carótida común, el bulbo carotídeo y el segmento proximal de la arteria carótida interna. Adicionalmente se exploró el origen de las arterias subclavias. El espesor carotídeo de la íntima-media surgió de la distancia entre el borde luminal de la íntima y el borde externo de la media de la pared arterial carotídea en un modo B de imagen ecográfica. El EIM fue especificado cuando el espesor íntima-media fue de 1,0 mm o mayor. La presencia de placa carotídea fue definida como: a) espesor de la pared anormal (espesor de la íntima-media > 1,5 mm); b) estructura anormal (protrusiones hacia el lumen, pérdida de alineación con la pared adyacente); y c) ecogenicidad de la pared anormal, según los criterios establecidos por el estudio *Atherosclerosis Risk in Communities* (94). El resultado de ecografía doppler carotídea se consideró anormal cuando se detectó una placa carotídea y/o el espesor de íntima-media anormal. Todas las ecografías doppler carotídeas fueron realizadas por una sola médica imagenóloga experta en ecografía doppler.

2.4 Tomografía coronaria

La tomografía coronaria sin contraste fue realizada en un tomógrafo helicoidal multidetector Toshiba Aquilion fabricado por Toshiba America Medical Systems, Inc. (Tustin, CA, Estados Unidos) equipado con 16 detectores en filas. El

paciente fue ubicado sobre la mesa de examen del tomógrafo en decúbito dorsal y se le colocaron unos electrodos en el tórax que estaban conectados a un electrocardiógrafo para coordinar la secuencia de adquisición de imágenes durante la diástole al 80 % del intervalo RR del paciente y mientras contenía la respiración. Las mujeres previo al estudio fueron estudiadas para determinar embarazo por test de hormona gonadotrofina coriónica (HCG) por ELISA. Sólo fueron realizados los estudios de tomografía coronaria con test de HCG negativos. Las imágenes fueron analizadas por un solo médico imagenólogo usando un *software* de puntaje cálcico validado. El umbral de definición de calcio fue de 130 unidades Hounsfield con un área de ≥ 3 pixeles adyacentes (al menos 1 mm²). Se determinó el puntaje cálcico coronario total para cada sujeto, basado en el número de lesiones calcificadas detectadas, utilizando el método de Agatston. Este puntaje se obtuvo realizando el producto del área de placa calcificada por la densidad de la lesión cálcica máxima (de 1 a 4 basado en unidades Hounsfield). Se definió como anormal a un puntaje cálcico > 0 . Se clasificó a las calcificaciones coronarias según el puntaje obtenido: un valor de 0 significó ausencia de placa calcificada, de 1 a 10 la presencia de una calcificación mínima, de 11 a 100 una calcificación leve, de 101 a 400 una calcificación moderada y $>$ de 400 una calcificación severa.

2.5 Definición de grupos de estudio

Para el análisis general de nuestra población, se definieron tres grupos de estudio:

2.5.1 Individuos del grupo de bajo riesgo: aquellos individuos que cumplían con todos los siguientes criterios: colesterol total < 200 mg/dl, glucemia < 100 mg/dl, colesterol HDL ≥ 40 mg/dl en varones ó ≥ 50 mg/dl en mujeres, triglicéridos < 150 mg/dl, presión arterial sistólica < 140 mm Hg, presión arterial diastólica < 90 mm Hg, sin antecedentes de HTA, sin tabaquismo actual o al menos con 5 años de abstinencia tabáquica vigente, sin antecedentes de coronariopatía familiar precoz, creatinina sérica $< 1,2$ mg/dl, sin apnea del sueño conocida, sin hipotiroidismo conocido, sin consumo de anticonceptivos orales, terapia de reemplazo hormonal o finasteride en el último

mes, con un índice de masa corporal < 25 y con ecografía doppler carotídea y tomografía coronaria normales.

2.5.2 Individuos del grupo intermedio: aquellos individuos que no alcanzaban a cumplir con todos los criterios para bajo riesgo y que poseían ecografía doppler carotídea y tomografía coronaria normales.

2.5.3 Individuos del grupo patológico: aquellos individuos que poseían evidencia imagenológica de aterosclerosis subclínica por ecografía doppler carotídea anormal (presencia de EIM o PAC) y/o por tomografía coronaria anormal (puntaje de calcio ≥ 1).

2.6 Ecuación de predicción de riesgo coronario a 10 años de Framingham

Se empleó la ecuación de predicción de riesgo coronario a 10 años de Framingham (FRS 10 D) en todos los individuos entre 20 a 59 años de edad, usando las siguientes variables: edad, sexo, presión arterial sistólica en mm Hg, colesterol total en mg/dl, colesterol HDL en mg/dl, tabaquismo actual y tratamiento antihipertensivo presente. Se predijo el riesgo para IAM o muerte coronaria, y se definió como categorías de bajo riesgo a valores < 10%, de riesgo intermedio entre 10% a 20%, y de alto riesgo a valores > 20% (16).

2.7 Ecuación de predicción de riesgo cardiovascular general a 10 años de Framingham

Se utilizó la ecuación de predicción de riesgo cardiovascular general a 10 años de Framingham (FRS 10 CV) en todos los individuos entre 30 a 59 años de edad, aplicando las siguientes variables: sexo, edad, presión arterial sistólica en mm Hg, colesterol total en mg/dl, colesterol HDL en mg/dl, tabaquismo actual, diabetes mellitus y tratamiento antihipertensivo vigente. Se estimó el riesgo para eventos cardiovasculares generales: IAM, muerte coronaria, insuficiencia coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca, claudicación intermitente, ACV isquémico, ACV hemorrágico y crisis isquémica transitoria. Se definió como categorías de bajo riesgo a valores < 6%, de riesgo intermedio entre 6% a 20%, y de alto riesgo a valores > 20% (14).

2.8 Ecuación de predicción de riesgo cardiovascular a 30 años de Framingham

Se aplicó la ecuación de predicción de riesgo cardiovascular a 30 años de Framingham (FRS 30) en todos los individuos entre 20 a 59 años de edad, utilizando las siguientes variables: sexo, edad, índice de masa corporal, presión arterial sistólica en mm Hg, colesterol total en mg/dl, colesterol HDL en mg /dl, diabetes mellitus, tabaquismo actual y tratamiento antihipertensivo actual. Se calculó el riesgo para eventos cardiovasculares duros (IAM, muerte coronaria, ACV fatal y ACV no fatal) (FRS 30 D) y para eventos cardiovasculares generales (IAM, muerte coronaria, ACV fatal, ACV no fatal, insuficiencia coronaria, angina de pecho, insuficiencia cardíaca, crisis isquémica transitoria y claudicación intermitente) (FRS 30 G) usando los modelos de riesgo basados en lípidos (FRS 30 L) y en índice de masa corporal (FRS 30 IMC). Se consideró como categorías de bajo riesgo a los valores < 12%, de riesgo intermedio entre 12% y 40%, y alto riesgo a los valores > 40% (15).

2.9 Ecuación de predicción de riesgo para enfermedad cardiovascular aterosclerótica de las cohortes combinadas

Se utilizó la ecuación de predicción de riesgo a 10 años para enfermedad cardiovascular aterosclerótica surgida de las cohortes combinadas (ECC 10), de acuerdo a lo establecido por las guías de *American College of Cardiology/American Heart Association*, en todos los individuos de 40 a 59 años de edad, y la ecuación de predicción de riesgo a lo largo de la vida ó 30 años para enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ECC LV) en todos los individuos de 20 a 59 años de edad. Se emplearon las siguientes variables: edad, sexo, raza, presión arterial sistólica en mm Hg, colesterol total en mg/dl, colesterol HDL en mg/dl, diabetes mellitus, tabaquismo actual y tratamiento antihipertensivo corriente, para predecir el desarrollo del primer evento cardiovascular aterosclerótico duro: IAM no fatal, muerte coronaria, ACV fatal y ACV no fatal. En referencia a la ECC 10, se determinó como categorías de bajo riesgo a los valores < 5%, de riesgo intermedio entre 5% a 7,4%, y de alto riesgo a los valores $\geq 7,5\%$ (17). En relación a la ECC LV, se consideró como

categorías de bajo riesgo a las cifras < 12%, de riesgo intermedio entre 12% a 40%, y de alto riesgo a las cifras > 40%.

2.10 Ecuación de predicción de riesgo coronario del estudio ARIC que incluye ecografía carotídea

Se calculó la ecuación de predicción de riesgo a 10 años para eventos coronarios del estudio ARIC que incluye ecografía carotídea en individuos de 45 a 59 años. Se utilizaron las siguientes variables: edad, sexo, presión arterial sistólica en mm Hg, colesterol total en mg/dl, colesterol HDL en mg/dl, diabetes mellitus, tabaquismo corriente, tratamiento antihipertensivo actual, espesor promedio de los complejos íntima-media carotídeos en mm y presencia de placa carotídea, para predecir IAM, revascularización coronaria y muerte coronaria. Se clasificó como categorías de bajo riesgo a los valores < 5%, intermedio bajo entre 5% a 9%, intermedio alto entre 10% a 20%, y alto riesgo a los valores > 20% (27).

2.11 Tratamiento estadístico de datos

El análisis de distribución normal de los diferentes parámetros bioquímicos, antropométricos y clínicos, entre otros, en los distintos grupos de estudios y clasificaciones fueron realizados utilizando el Test de Shapiro–Wilk. Considerando que los resultados de estos análisis de normalidad, en una proporción de los parámetros, arrojó que la distribución no es normal, el análisis estadístico descriptivo se realizó empleando diferentes pruebas o test no paramétricos. La comparación estadística binaria de las medianas se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney, mientras que en situaciones donde las medianas fueron más de dos, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. Los datos se expresaron como mediana \pm cuartilo 25-75. El coeficiente de correlación de Spearman fue utilizado como una medida de la correlación (la asociación o interdependencia) entre dos variables aleatorias (tanto continuas como discretas). Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos. El análisis estadístico fue realizado mediante la utilización del software Infostat y GraphPad Prism 5.0.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización clínica de los individuos enrolados al estudio.

Desde el mes de Abril del 2014 hasta Julio del 2015 se enrolaron 254 individuos, de los cuales 227 cumplieron con todos los criterios de inclusión y exclusión definidos para este estudio (ver sección 2.5 de Materiales y Métodos). Básicamente, la edad promedio, expresada en términos de mediana, de los individuos fue de 43 años, con un predominio de varones (60,1%). La mediana de presión arterial sistólica fue de 120 mm Hg, con una mediana de índice de masa corporal de 25,6 kg/m². En relación con los principales parámetros bioquímicos, las medianas fueron para colesterol total de 191 mg/dl, glucemia de 98 mg/dl, creatinina plasmática de 0,99 mg/dl y leucocitos de 6.400/μl. En el análisis comparativo de los valores antropométricos y bioquímicos entre sexos, los varones fueron más jóvenes ($p < 0,0001$), con mayores valores de presión arterial sistólica ($p < 0,001$), diastólica ($p < 0,0001$), peso ($p < 0,0001$), índice de masa corporal ($p = 0,004$), cintura abdominal ($p < 0,0001$), colesterol LDL ($p = 0,03$), triglicéridos ($p < 0,0001$), ApoB ($p = 0,01$), glucemia ($p = 0,0003$), creatininemia ($p < 0,0001$) y monocitos totales relativos ($p = 0,0020$) y absolutos ($p = 0,0029$), mientras que las mujeres presentaron mayores valores de colesterol HDL ($p < 0,0001$) y de ApoA ($p < 0,0001$). Un análisis completo de los parámetros clínicos, antropométricos y bioquímicos es presentado en las Tablas 1 y 2.

TABLA 1. Características clínicas de los individuos enrolados según sexos.

	General n 227	Masculino n 137	Femenino n 90	p valor
Edad (años)	43 (34 - 51)	39 (31 - 48,5)	47,5 (40 - 53,2)	< 0,0001
PAS (mm Hg)	120 (110 - 122)	120 (110 - 130)	110 (110 - 120)	0,0016
PAD (mm Hg)	80 (80 - 88)	84 (80 - 90)	80 (70 - 80)	< 0,0001
Peso (kg)	75,6 (65 - 84,7)	80,5 (73,5 - 91,5)	64,6 (57,3 - 74,2)	< 0,0001
IMC (Kg/m ²)	25,6 (23,2 - 28,6)	26 (24 -29)	24,5 (21,8 - 27,7)	0,0041
Cintura abdominal (cm)	90 (85 - 99)	93 (88 - 100)	87 (80 - 95)	< 0,0001

PAS: presión arterial sistólica; **PAD:** presión arterial diastólica; **IMC:** índice de masa corporal. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico empleando el test de Mann Whitney.

TABLA 2. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los individuos enrolados según sexos.

	General	Masculino	Femenino	p-Valor
Colesterol total (mg/dl)	191 (167 – 215)	191 (168 – 210)	191 (167 – 222)	0,5612
Colesterol HDL (mg/dl)	52 (39 – 64)	44 (36 – 54)	63 (51 – 75)	< 0,0001
Colesterol LDL (mg/dl)	119 (99 – 139)	123 (104 – 143)	113 (95 – 137)	0,0359
Triglicéridos (mg/dl)	91 (65 - 143)	110 (76 – 155)	76 (57 – 108)	< 0,0001
ApoA (mg/dl)	129 (112 – 145)	120 (110 – 134)	141 (126 – 163)	< 0,0001
ApoB (mg/dl)	70 (57 – 88)	73 (59,5 – 93)	68 (53 – 82)	0,0113
Lp(a) (mg/dl)	31 (14 – 88)	28,5 (12 – 90)	32 (18 – 78)	0,3812
Glucemia (mg/dl)	98 (93 – 103)	99 (95 - 104)	95 (90 – 101)	0,0003
Insulina (UI/l)	6,3 (4,5 – 9,8)	6,5 (4,7 – 10,2)	5,5 (4,4 – 9,2)	0,0894
HbA1C (%)	5,4 (5,2 – 5,6)	5,4 (5,2 – 5,6)	5,5 (5,2 – 5,6)	0,8697
PCR (mg/dl)	0,13 (0,07 – 0,21)	0,13 (0,07 – 0,21)	0,12 (0,06 – 0,25)	0,8746
Creatinina (mg/dl)	0,99 (0,82 – 1,13)	1,08 (1 – 1,17)	0,8 (0,72 – 0,88)	< 0,0001
Leucocitos (10 ³ /μl)	6,4 (5,4 – 7,5)	6,5 (5,5 – 7,7)	6,3 (5,2 – 7,3)	0,0989
Monocitos (10 ³ /μl)	539 (427 – 675)	570 (469 – 708)	508 (374 – 632)	0,0029
Monocitos (%)	8 (7 – 10)	9 (7 – 10)	8 (7 – 10)	0,0020

HDL: lipoproteína de alta densidad; **LDL:** lipoproteína de baja densidad; **ApoA:** apolipoproteína A, **ApoB:** apolipoproteína B; **Lp(a):** lipoproteína (a); **HbA1C:** hemoglobina glicada; **PCR:** proteína C reactiva. Valores expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de p < 0,05 son considerados significativos desde un punto de vista estadístico empleando el test de Mann Whitney.

En relación con la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular de la totalidad de los individuos enrolados, el 20,3% fueron hipertensos, el 57,3% dislipidémicos, el 22% tabaquistas corrientes, el 8,4% informó antecedentes de coronariopatía familiar precoz, el 38,8% fueron prediabéticos, el 15,9% tuvieron obesidad, el 42,3% sobrepeso y el 21,1% alcanzaron los criterios de síndrome metabólico. En comparación con las mujeres, los varones presentaron mayor frecuencia de sobrepeso (p = 0,0062) y prediabetes (p = 0,0033) (Figura 1).

Con respecto a las ecuaciones de riesgo cardiovascular en el grupo total de individuos (Tabla 3), las medianas de las estimaciones calculadas fueron para FRS 10 D 1%, FRS 10 CV 4,5%, FRS 30 L D 10%, FRS 30 IMC D 12%, FRS 30 L G 20%, FRS 30 IMC G 21%, ECC 10 2,3%, ECC LV 39% y ARIC 3,6%. En comparación con las mujeres, los varones tuvieron valores mayores significativos en todas las ecuaciones de riesgo (p < 0,05 a < 0,0001), excepto en la estimación de FRS 30 IMC G donde la diferencia entre sexos no fue significativa (p = 0,06).

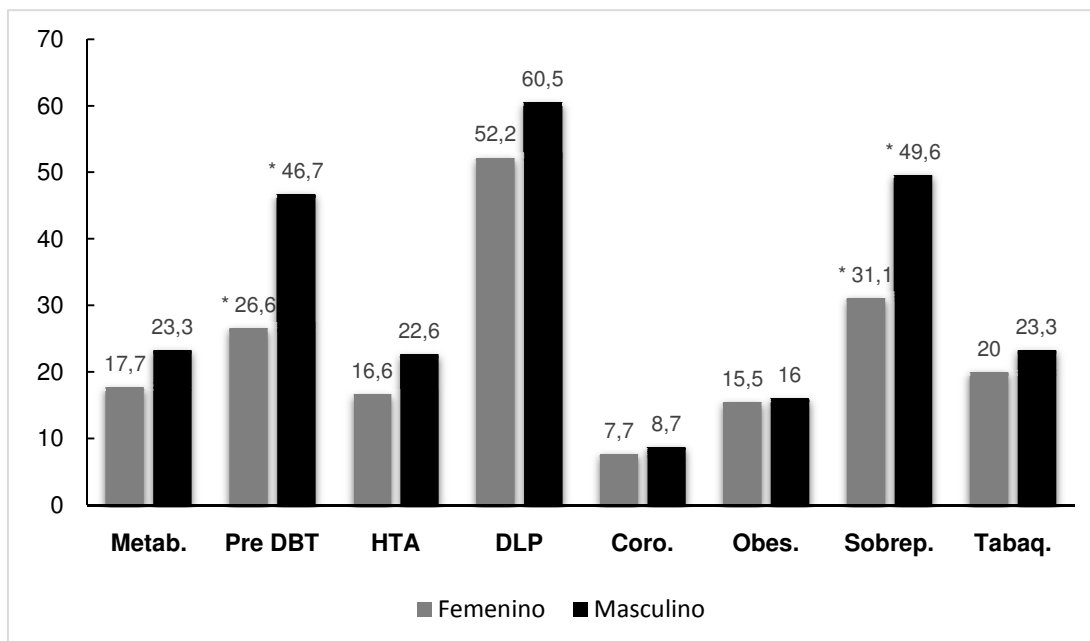


FIGURA 1. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular según sexos.

Metab: síndrome metabólico; **Pre DBT:** prediabetes; **HTA:** hipertensión arterial; **DLP:** dislipidemia, **Coro:** coronariopatía familiar precoz; **Obes:** obesidad; **Sobrep:** sobrepeso; **Tabaq:** tabaquista corriente. Valores en el eje de ordenadas están expresados en porcentajes. * p < 0,01 calculado por test de Fisher.

TABLA 3. Estimaciones de las ecuaciones de riesgo de los individuos enrolados según sexos.

Ecuaciones	General	Masculino	Femenino	p valor
FRS 10 D	1,0 (0,9 – 3,0) (n 227)	2,0 (0,9 – 6,0) (n 137)	0,9 (0,9 – 1,0) (n 90)	< 0,0001
FRS 10 CV	4,5 (2,6 – 8,4) (n 188)	5,7 (3,1 – 9,7) (n 109)	3,6 (1,7 – 5,8) (n 79)	< 0,0001
FRS 30 L D	10,0 (5,0 – 19,0) (n 227)	11,0 (6,0 – 22,0) (n 137)	9,0 (3,0 – 16,0) (n 90)	0,0012
FRS 30 IMC D	12,0 (6,0 – 21,0) (n 227)	13,0 (7,5 – 22,0) (n 137)	9,5 (5,0 – 16,0) (n 90)	0,0037
FRS 30 L G	20,0 (10,0 – 33,0) (n 227)	20,0 (12,0 – 35,0) (n 137)	18,5 (7,0 – 30,0) (n 90)	0,0306
FRS 30 IMC G	21,0 (13,0 – 32,0) (n 227)	21,0 (14,0 – 35,0) (n 137)	19,5 (11,0 – 31,0) (n 90)	0,0629
ECC 10	2,3 (1,0 – 4,6) (n 137)	4,1 (1,7 – 6,4) (n 67)	1,3 (0,4 – 2,7) (n 70)	< 0,0001
ECC LV	39,0 (27,0 – 50,0) (n 227)	46,0 (36,0 – 50,0) (n 137)	39,0 (27,0 – 39,0) (n 90)	< 0,0001
ARIC	3,6 (1,8 – 6,3) (n 99)	6,3 (4,4 – 9,5) (n 45)	2,0 (1,0 – 3,1) (n 54)	< 0,0001

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **ARIC:** ecuación de riesgo coronario a 10 años del estudio ARIC (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*). Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de p < 0,05 son considerados significativos desde un punto de vista estadístico empleando el test de Mann Whitney.

En la distribución de los resultados obtenidos a través de las ecuaciones a 10 años predominó el grupo de bajo riesgo, mientras que en las ecuaciones

generales a 30 años o más sobresalió el grupo de riesgo intermedio. En la única ecuación donde el grupo de alto riesgo superó un tercio de los individuos estudiados fue en la ECC LV, ocupando el segundo lugar después de los de riesgo intermedio en la estratificación de esta ecuación (Figura 2).

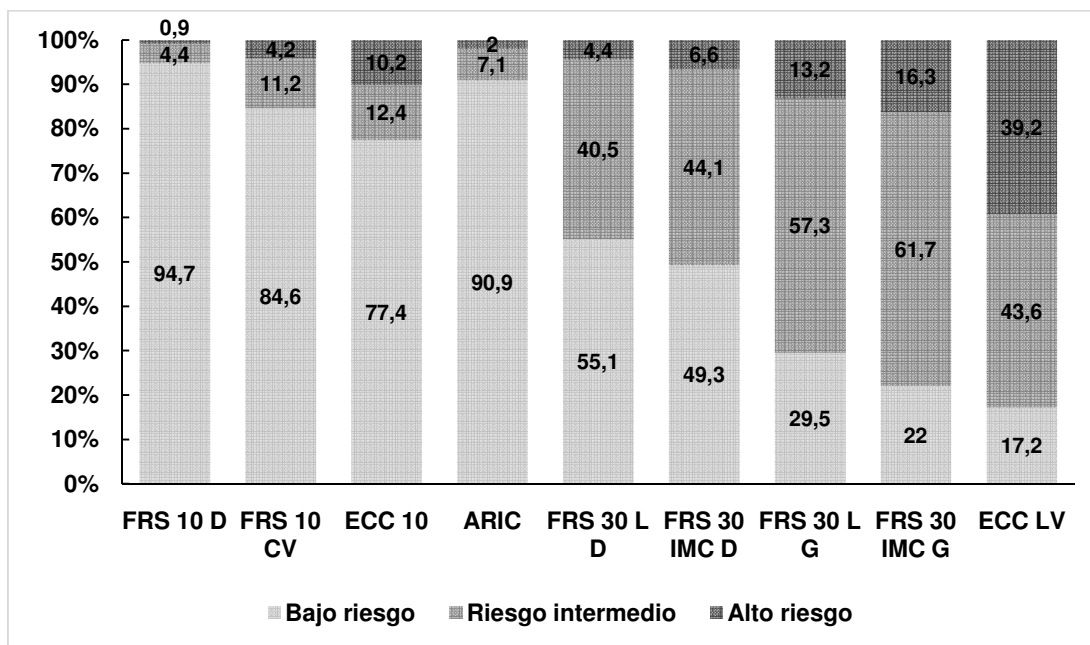


FIGURA 2. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular del grupo total de individuos enrolados.

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **ARIC:** ecuación de riesgo coronario a 10 años del estudio ARIC (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*). Los valores en el eje de las ordenadas son expresados en porcentajes.

Si bien el predominio mayoritario del grupo de bajo riesgo en las ecuaciones a 10 años se mantuvo en ambos sexos, los varones presentaron porcentajes mayores que las mujeres en los grupos de riesgo intermedio y alto (Figura 3).

En las ecuaciones de eventos cardiovasculares duros a 30 años la proporción de individuos de bajo riesgo disminuyó principalmente en los varones. En cuanto a las ecuaciones de eventos cardiovasculares L generales a 30 años, el porcentaje del grupo de riesgo intermedio superó a los porcentajes de los otros grupos de riesgo. En la ECC LV, el porcentaje del grupo de riesgo intermedio predominó entre las mujeres y el porcentaje del grupo de alto riesgo entre los varones (Figura 4).

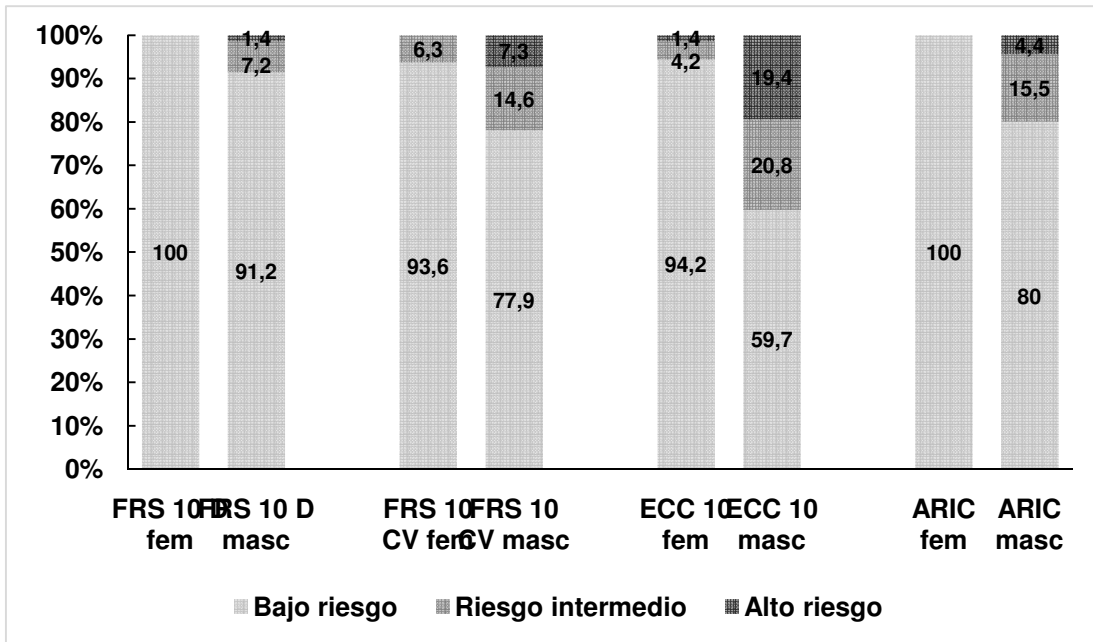


FIGURA 3. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 10 años según sexos.

FRS: Score de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **ARIC:** ecuación de riesgo coronario a 10 años del estudio ARIC (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*); **fem:** femenino; **masc:** masculino. Los valores en el eje de las ordenadas son expresados en porcentajes.

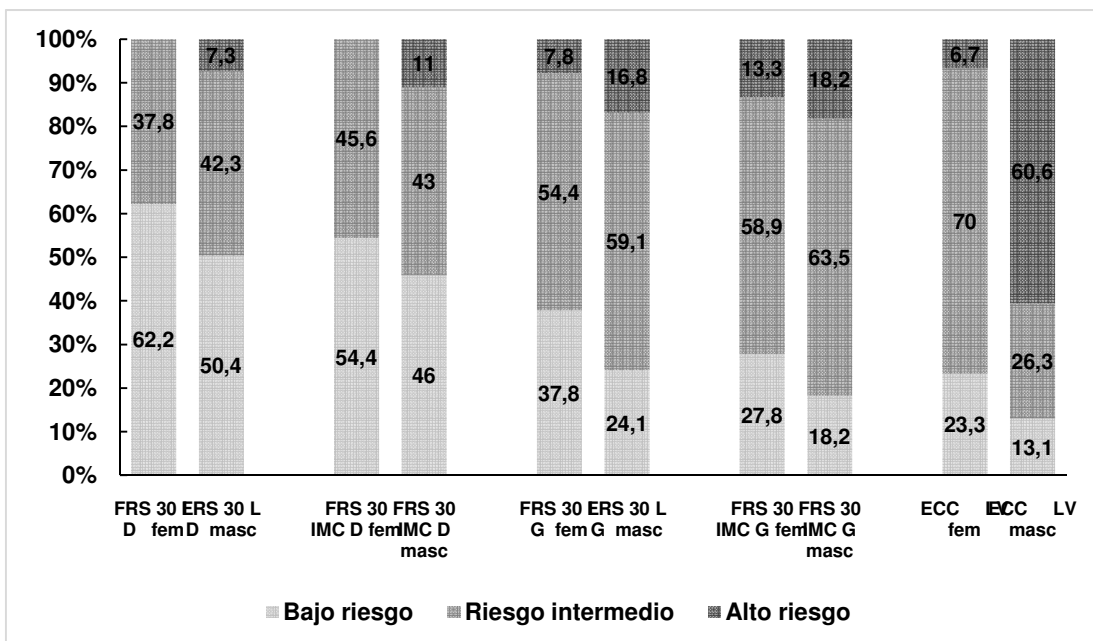


FIGURA 4. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 30 años o más según sexos.

FRS: Score de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **fem:** femenino; **masc:** masculino. Los valores en el eje de las ordenadas son expresados en porcentajes.

Entre los 227 individuos se detectó aterosclerosis subclínica por imágenes en 82 de ellos (36,1%). De esta proporción con imágenes positivas presentaron un hallazgo ecográfico carotídeo anormal 61 individuos (26,9% del total) a expensas mayoritaria del EIM (25,1% del total) respecto a los individuos que presentaron únicamente PAC (7,5% del total), lo cual representó que 4 individuos de los 17 que presentaron PAC no tuvieron EIM simultáneamente. Finalmente, 40 individuos presentaron CAC (17,7% del total), de los cuales 19 también tuvieron una ecografía carotídea anormal (Figura 5).

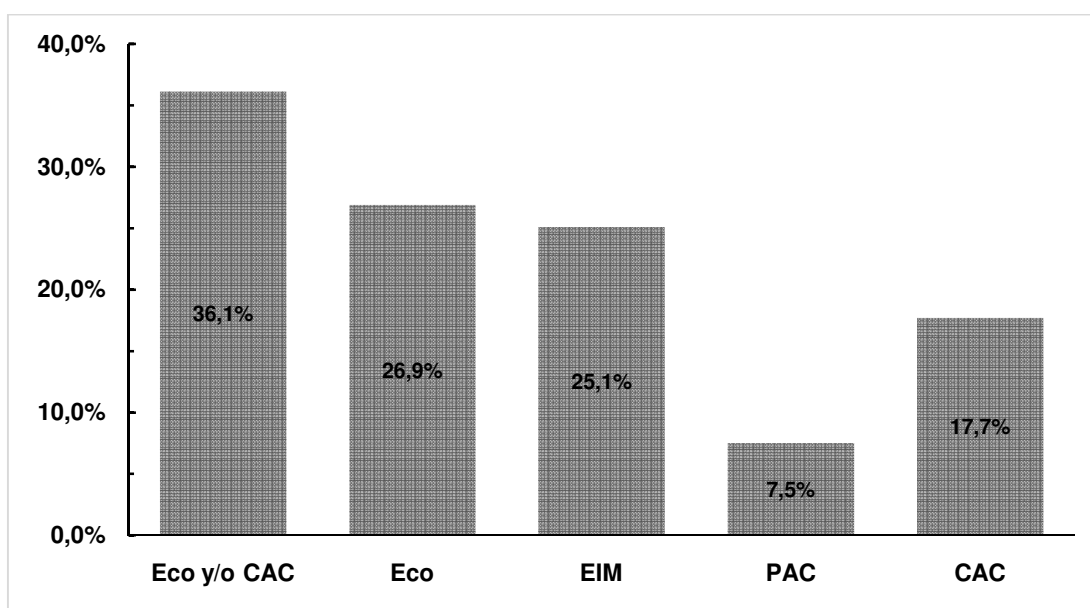


FIGURA 5. Prevalencia de aterosclerosis subclínica imagenológica en el grupo total de individuos enrolados.

Eco: ecografía carotídea patológica; **CAC:** calcificación coronaria; **EIM:** engrosamiento del complejo íntima media; **PAC:** placa aterosclerótica carotídea. Los valores en el eje de las ordenadas son expresados en porcentajes.

Entre las 90 mujeres, 29 (32,2%) tuvieron aterosclerosis subclínica por imágenes, 28 con ecografías anormales (con mayoría de EIM: 25 casos, e incluso de los 10 casos con PAC 7 también mostraron EIM) y 5 con CAC (4 de estas 5 mujeres presentaron ecografía anormal simultánea) (Figura 6).

Al realizar análisis comparativos por grupos etarios, 42/90 mujeres tuvieron una edad igual o superior a los 49 años, de las cuales 27 (64,3%) presentaron aterosclerosis subclínica, 26 con ecografías anormales (EIM 23 casos y PAC 9 casos) y 5 con CAC (el caso más joven tuvo 49 años de edad), con valores de puntaje cálcico coronario total entre 2 a 78. A su vez, 48/90 mujeres tuvieron edades menores a 49 años de las cuales sólo 2 presentaron ecografías

anormales con EIM (4,2%), una mujer de 44 años con EIM y PAC, y otra de 46 años con EIM, sin encontrar casos con CAC.

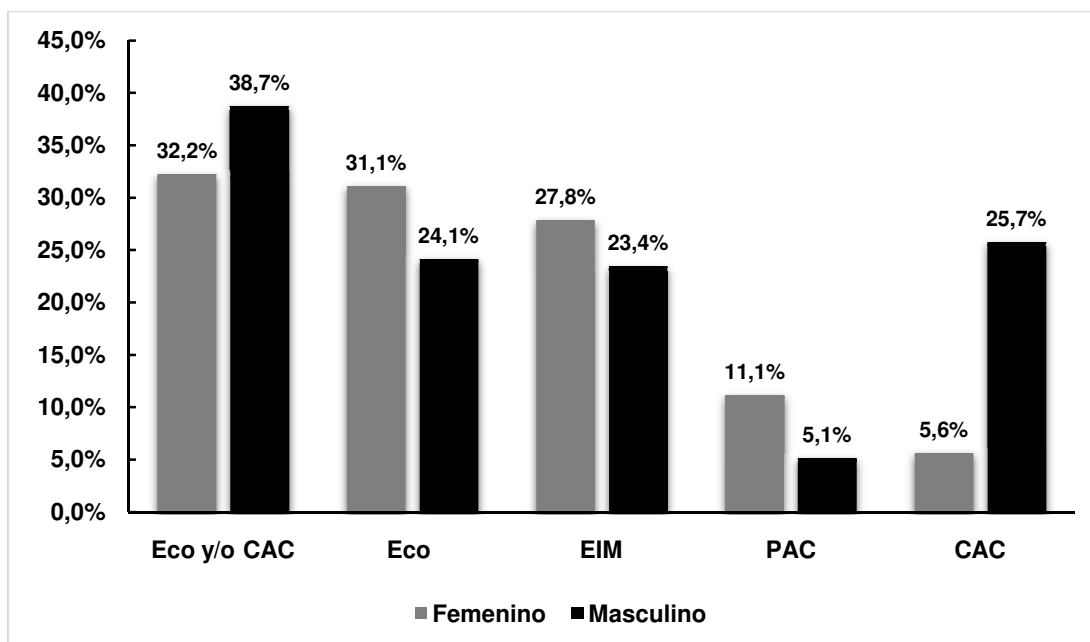


FIGURA 6. Prevalencia de aterosclerosis subclínica imagenológica según sexos.
Eco: ecografía carotídea patológica; **CAC:** calcificación coronaria; **EIM:** engrosamiento del complejo íntima media; **PAC:** placa aterosclerótica carotídea. Los valores en el eje de las ordenadas son expresados en porcentajes.

A su vez, entre los 137 varones se detectó aterosclerosis subclínica por imágenes en 53 de ellos (38,7%), de los cuales 33 tuvieron ecografías anormales (32 con EIM y 7 con PAC; sólo uno no tuvo EIM concomitante) y 35 con CAC (Figura 7). A diferencia de las mujeres, 20 de los 35 individuos con CAC no presentaron alteraciones ecográficas simultáneas. Al analizarlos en grupos etarios, 34/137 tuvieron edades iguales o superiores a los de 49 años, de los cuales 26 (76,5%) presentaron aterosclerosis subclínica con 17 de ellos con ecografías anormales (17 casos con EIM y 6 casos con PAC simultánea) y 20 con CAC. Finalmente, 103/137 fueron menores de 49 años, de los cuales 27 (26,2%) presentaron aterosclerosis subclínica, con 16 ecografías anormales (15 casos con EIM, el menor de 34 años de edad, y 1 caso con PAC de 41 años de edad), y 15 casos con CAC. Respecto a los individuos con CAC, el más joven de 29 años tuvo un puntaje cálcico coronario total de 1, mientras que el individuo de menor edad en superar los 100 puntos de CAC tuvo 47 años.

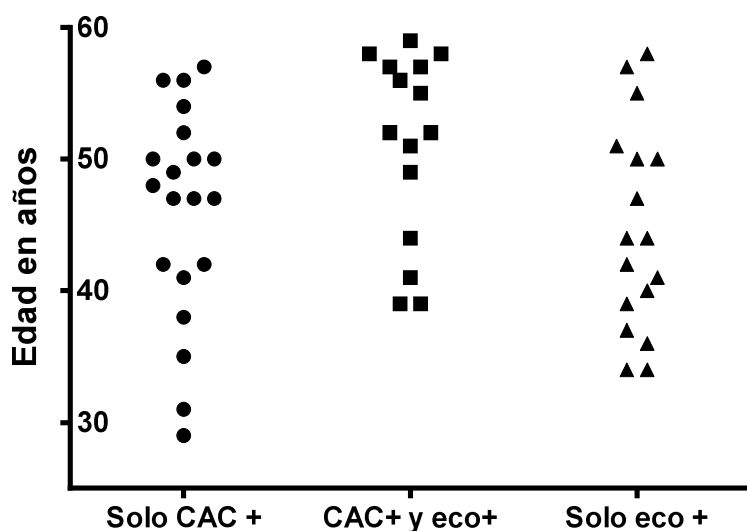


FIGURA 7. Distribución de aterosclerosis subclínica en varones según edad.
CAC: calcificación coronaria; **eco:** ecografía carotídea patológica.

Cuando se compararon la presencia de aterosclerosis subclínica con las estimaciones de riesgo cardiovascular se detectó que la aparición de imágenes anormales fue más frecuente en todas las ecuaciones dentro del grupo de alto riesgo en comparación a los grupos de bajo riesgo. Sin embargo en este último grupo en las ecuaciones de predicción a 10 años alrededor de un tercio de los individuos (entre el 33,5% al 44,3% según la ecuación) presentó aterosclerosis subclínica (Tabla 4). Por el contrario, en las ecuaciones de predicción a 30 años, menos del 15% (entre el 0% al 14,4% según la ecuación) de los individuos que clasificaron en el grupo de bajo riesgo tuvo alteraciones imagenológicas de aterosclerosis subclínica (Tabla 5).

TABLA 4. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 10 años versus aterosclerosis subclínica.

Ecuaciones de riesgo y sus grupos		Ausencia de aterosclerosis subclínica	Presencia de aterosclerosis subclínica
FRS 10 D	Bajo riesgo n (%)	143 (66,5%)	72 (33,5%)
	Riesgo intermedio n (%)	2 (20%)	8 (80%)
	Alto riesgo n (%)	0 (0%)	2 (100%)
FRS 10 CV	Bajo riesgo n (%)	99 (62,3%)	60 (37,7%)
	Riesgo intermedio n (%)	7 (33,3%)	14 (66,7%)
	Alto riesgo n (%)	1 (12,5%)	7 (87,5%)
ECC 10	Bajo riesgo n (%)	59 (55,7%)	47 (44,3%)
	Riesgo intermedio n (%)	5 (29,4%)	12 (70,6%)
	Alto riesgo n (%)	3 (21,4%)	11 (78,6%)

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años.

TABLA 5. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 30 años o más versus aterosclerosis subclínica.

Ecuaciones de riesgo y sus subgrupos		Ausencia de aterosclerosis subclínica	Presencia de aterosclerosis subclínica
FRS 30 L D	Bajo riesgo n (%)	107 (85,6%)	18 (14,4%)
	Riesgo intermedio n (%)	37 (40,2%)	55 (59,8%)
	Alto riesgo n (%)	1 (10%)	9 (90%)
FRS 30 IMC D	Bajo riesgo n (%)	97 (86,6%)	15 (13,4%)
	Riesgo intermedio n (%)	46 (46%)	54 (54%)
	Alto riesgo n (%)	2 (13,3%)	13 (86,7%)
FRS 30 L G	Bajo riesgo n (%)	66 (98,5%)	1 (1,5%)
	Riesgo intermedio n (%)	71 (54,6%)	59 (45,4%)
	Alto riesgo n (%)	8 (26,7%)	22 (73,3%)
FRS 30 IMC G	Bajo riesgo n (%)	50 (100%)	0 (0%)
	Riesgo intermedio n (%)	82 (58,6%)	58 (41,4%)
	Alto riesgo n (%)	13 (35,1%)	24 (64,9%)
ECC LV	Bajo riesgo n (%)	34 (87,2%)	5 (12,8%)
	Riesgo intermedio n (%)	62 (62,6%)	37 (37,4%)
	Alto riesgo n (%)	49 (55%)	40 (45%)

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida.

Al realizar análisis de curva ROC, las ecuaciones de riesgo cardiovascular con mejor área bajo la curva, lo cual podría ser considerado como un indicador de exactitud diagnóstica para aterosclerosis subclínica, fueron FRS 30 L G (0,83) y FRS 30 L D (0,83), mientras que las ecuaciones a 10 años mostraron menores valores, tales son los casos ECC 10 (0,73) y ECC LV (0,65) (Tabla 6).

TABLA 6. Ecuaciones de riesgo cardiovascular versus curvas ROC.

Ecuaciones	Área bajo la curva	Error standard	Youden índice
FRS 30 L G	0,832	0,030 (0,772- 0,891)	18
FRS 30 L D	0,832	0,031 (0,772-0,892)	8
FRS 30 IMC G	0,817	0,031 (0,756- 0,877)	18
FRS 30 IMC D	0,817	0,031 (0,757- 0,877)	10
FRS 10 D	0,792	0,032 (0,729-0,856)	0,9
FRS 10 CV	0,775	0,038 (0,7-0,849)	3,3
ECC 10	0,736	0,043 (0,651- 0,82)	1,5
ECC LV	0,655	0,039 (0,577- 0,732)	36

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **ROC:** del inglés *receiver operating characteristic*.

3.2 Generación de los grupos de estudios (GE).

Al clasificar los individuos por grupos de estudio (GE), según lo definido en la sección Materiales y Métodos, en donde se tuvo en cuenta la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica, 21/227 individuos calificaron para el GE de bajo riesgo, 82/227 para el grupo patológico y los restantes 124/227 para el grupo intermedio. En comparación con el grupo de bajo riesgo, el grupo patológico presentó valores mayores significativos en edad, PAS, PAD, IMC, cintura abdominal, colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos, glucemia, HbA1C, insulina, ApoB y PCR, mientras que fueron menores en colesterol HDL y ApoA. No se detectaron diferencias significativas en el nivel de leucocitos, ni en las cifras absolutas y relativas de monocitos totales en sangre periférica. A excepción de la edad y de los niveles de ApoA, el mismo comportamiento tuvo el grupo intermedio al confrontarlo con el grupo de bajo riesgo (Tabla 7 y Tabla 8).

TABLA 7. Características clínicas de los grupos de estudios generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

	GE bajo riesgo (n=21)	GE intermedio (n=124)	GE patológico (n=82)	p valor BR/P (M-W)	p valor BR/In (M-W)	p valor In/P (M-W)	p valor (K-W)
Edad (años)	40 (27 – 44)	38 (29,2 – 46,7)	50,5 (44 – 55,2)	< 0,0001	0,3569	< 0,0001	< 0,0001
PAS (mm Hg)	110 (105 – 115)	120 (110 – 124,3)	120 (110 – 130)	0,0006	0,0027	0,3774	0,0033
PAD (mm Hg)	78 (70 – 80)	80 (80 – 86)	82 (80 – 90)	< 0,0001	0,0002	0,0956	< 0,0001
Peso (kg)	56,8 (53,5 – 65,5)	76,1 (67 – 85,1)	78,4 (67,9 – 88,3)	< 0,0001	< 0,0001	0,6014	< 0,0001
IMC (Kg/m ²)	22,5 (19,7 – 23,4)	25,6 (23,6 – 28,1)	26,7 (24,2 – 29,6)	< 0,0001	< 0,0001	0,0808	< 0,0001
Cintura abdominal (cm)	77 (73,5 – 83)	90 (85 – 99)	94,5 (89 – 100)	< 0,0001	< 0,0001	0,0179	< 0,0001

PAS: presión arterial sistólica; **PAD:** presión arterial diastólica; **IMC:** índice de masa corporal; **GE:** grupo de estudio **BR:** bajo riesgo; **P:** patológico; **In:** intermedio; **M-W:** test de Mann Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Al analizar la presencia de factores de riesgo entre los diferentes GE generados se observó, y como era de esperar, diferencias significativas entre el grupo de bajo riesgo y los otros dos grupos en casos de HTA, dislipidemia, tabaquismo actual, prediabetes, síndrome metabólico, coronariopatía familiar precoz, sobrepeso y obesidad. Al comparar con el grupo intermedio, el grupo patológico

tuvo una prevalencia mayor de síndrome metabólico ($p = 0,0013$) y de HTA ($p = 0,0266$) (Figura 8).

TABLA 8. Parámetros hematológicos y bioquímicos de los grupos de estudios generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

	GE bajo riesgo	GE intermedio	GE patológico	p valor BR/P (M-W)	p valor BR/In (M-W)	p valor P/In (M-W)	p valor (K-W)
Colesterol total (mg/dl)	162 (142 – 184)	189 (167 – 210)	197 (180 – 232)	< 0,0001	0,0002	0,0143	< 0,0001
Colesterol HDL (mg/dl)	64 (56 – 74)	52 (40 – 64)	49 (37 – 58)	< 0,0001	0,0007	0,0887	0,0001
Colesterol LDL (mg/dl)	86 (76 – 102)	117 (96 – 136)	127 (110 – 154)	< 0,0001	< 0,0001	0,0019	< 0,0001
Triglicéridos (mg/dl)	54 (50 – 72)	92 (65 – 132)	111 (78 – 172)	< 0,0001	< 0,0001	0,0205	< 0,0001
ApoA (mg/dl)	140 (131 – 154)	129 (112 – 148)	125 (110 – 140)	0,0046	0,0661	0,1167	0,0187
ApoB (mg/dl)	49 (40 – 64)	68 (54 – 83)	80 (67 – 103)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Lp (a) (mg/dl)	30 (17 – 65)	32 (12 – 83)	32 (15 – 91)	0,7511	0,8540	0,9587	0,9661
Glucemia (mg/dl)	92 (86 – 96)	98 (92 – 102)	100 (95 – 107)	< 0,0001	< 0,0001	0,0076	< 0,0001
Insulina (UI/l)	4,6 (3,3 – 6,4)	6,3 (4,5 – 9,7)	7,0 (4,9 – 11,0)	0,0007	0,0036	0,2636	0,0033
HbA1C (%)	5,1 (5,0 – 5,5)	5,4 (5,2 – 5,6)	5,5 (5,3 – 5,8)	0,0002	0,0077	0,0342	0,0008
PCR (mg/dl)	0,09 (0,05 – 0,1)	0,12 (0,06 – 0,20)	0,16 (0,10 – 0,27)	0,0002	0,0346	0,0114	0,0007
Creatinina (mg/dl)	0,87 (0,77 – 0,9)	1,0 (0,85 – 1,20)	1,0 (0,81 – 1,10)	0,0052	0,0005	0,3741	0,0030
Leucocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	6,0 (5,2 – 6,7)	6,5 (5,5 – 7,5)	6,4 (5,5 – 7,8)	0,0590	0,1197	0,5831	0,1776
Monocitos ($10^3/\mu\text{l}$)	480 (365 – 729)	556 (442 – 679)	528 (425 – 661)	0,4529	0,3399	0,6341	0,5896
Monocitos (%)	8,0 (7,0 – 11,0)	9,0 (7,0 – 10,0)	8,0 (7,0 – 9,0)	0,8964	0,3617	0,0438	0,1228

HDL: lipoproteína de alta densidad; **LDL:** lipoproteína de baja densidad; **ApoA:** apolipoproteína A; **ApoB:** apolipoproteína B; **Lp(a):** lipoproteína (a); **HbA1C:** hemoglobina glicada; **PCR:** proteína C reactiva; **GE:** grupo de estudio, **BR:** bajo riesgo; **P:** patológico; **In:** intermedio; **M-W:** test de Mann Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

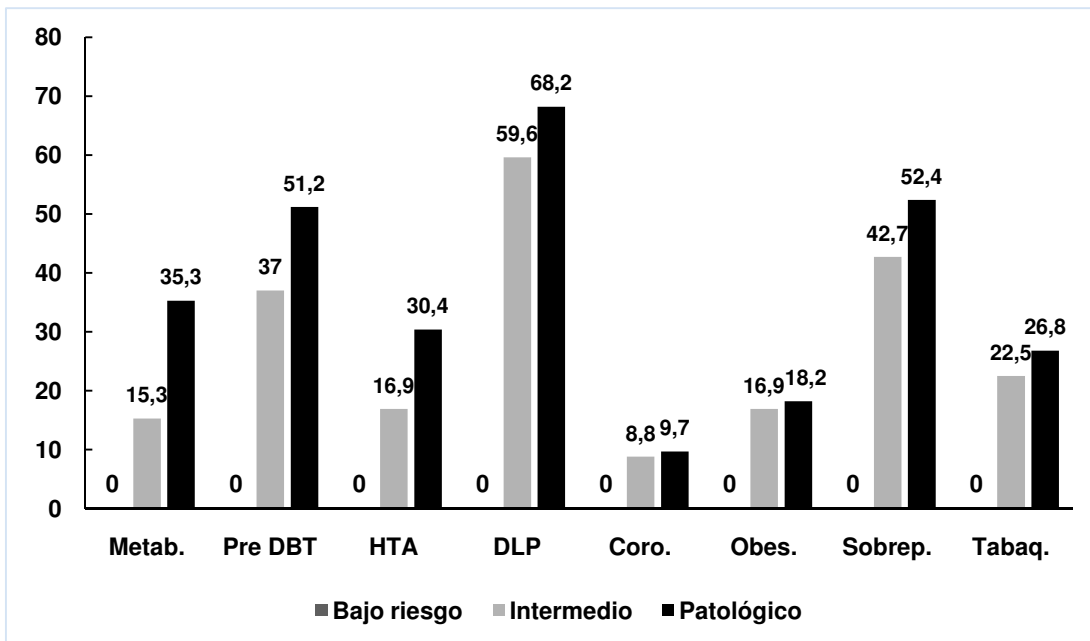


FIGURA 8. Prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Metab: síndrome metabólico; **Pre DBT:** prediabetes; **HTA:** hipertensión arterial; **DLP:** dislipidemia; **Coro:** coronariopatía familiar precoz; **Obes:** obesidad; **Sobrep:** sobrepeso; **Tabaq:** tabaquista corriente. Los valores son expresados en porcentajes.

Al comparar las estimaciones de las ecuaciones de riesgo en los diferentes GE, se observó que en el GE de bajo riesgo los escores fueron significativamente menores en comparación a las de los otros dos GE. De igual manera sucedió al contrastar las estimaciones de los escores entre el GE intermedio con su contraparte patológico (Tabla 9).

Al confrontar los individuos clasificados en los diferentes GE con las estimaciones obtenidas con cada ecuación de riesgo cardiovascular observamos que las ecuaciones a 10 años no permitieron discriminar los diferentes GE puesto que las ecuaciones para bajo riesgo estratificaron el 100% de los individuos en el GE de bajo riesgo, >85% en el GE intermedio y >67% en el GE patológico. Del mismo modo las ecuaciones para alto riesgo mostraron un bajo poder de estratificación puesto que un muy bajo porcentaje de individuos (no mayor al 16%) fueron incluidos en los GE intermedio y patológico (Figura 9).

TABLA 9. Estimaciones de las diferentes ecuaciones de riesgo cardiovascular en relación con los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

	GE de bajo riesgo	GE intermedio	GE patológico	p valor BR/P (M-W)	p valor BR/In (M-W)	p valor In/P (M-W)	p valor (K- W)
FRS 10 D	0,9 (0,9 - 0,9) (n 21)	1,0 (0,9 - 2,0) (n 124)	3,0 (1,0 - 6,0) (n 82)	< 0,0001	0,0003	< 0,0001	< 0,0001
FRS 10 CV	1,5 (0,8 -1,9) (n 14)	3,3 (2,1 - 6,2) (n 93)	6,7 (4,4 -11,0) (n 81)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
FRS 30 L D	3,0 (1,5 - 5,0) (n 21)	8,0 (4,3 - 15,0) (n 124)	19,0 (12,0 - 26,0) (n 82)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
FRS 30 IMC D	4,0 (2,0 - 6,5) (n 21)	9,0 (5,0 - 15,0) (n 124)	18,0 (13,0 - 28,0) (n 82)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
FRS 30 L G	6,0 (3,5 -10,0) (n 21)	14,0 (9,0 - 25,0) (n 124)	33,0 (22,0 -42,0) (n 82)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
FRS 30 IMC G	9,0 (4,0 - 13,0) (n 21)	17,0 (10,0 - 26,0) (n 124)	31,0 (23,0- 45,0) (n 82)	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
ECC 10	0,2 (0,2- 0,5) (n 11)	1,5 (0,8 - 4,2) (n 56)	3,0 (1,7 - 5,8) (n 70)	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	< 0,0001
ECC LV	8,0 (8,0 - 27,0) (n 21)	39,0 (29,0 - 50,0) (n 124)	39,0 (39,0 - 50,0) (n 82)	< 0,0001	< 0,0001	0,0072	< 0,0001
ARIC	0,6 (0,5 - 0,7) (n 3)	2,6 (1,4 - 4,5) (n 37)	4,7 (2,5 - 7,1) (n 59)	< 0,0001	0,0054	0,0019	0,0002

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **ARIC:** ecuación de riesgo coronario a 10 años del estudio ARIC (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*); **GE:** grupo de estudio; **BR:** bajo riesgo; **P:** patológico; **In:** intermedio; **K-W:** test de Kruskal Wallis; **M-W:** test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Al cotejar los GE con las ecuaciones a 30 años para eventos duros, más del 95% de los individuos incluidos en el GE de bajo riesgo clasificó como de bajo riesgo con las estimaciones ecuacionales. Mientras tanto, hasta dos tercios (entre el 68% al 81%) de los individuos clasificados en el GE patológico fueron estratificados como de riesgo cardiovascular intermedio (aprox. 67%) y alto riesgo (aprox. 15%) con las estimaciones ecuacionales (Figura 10).

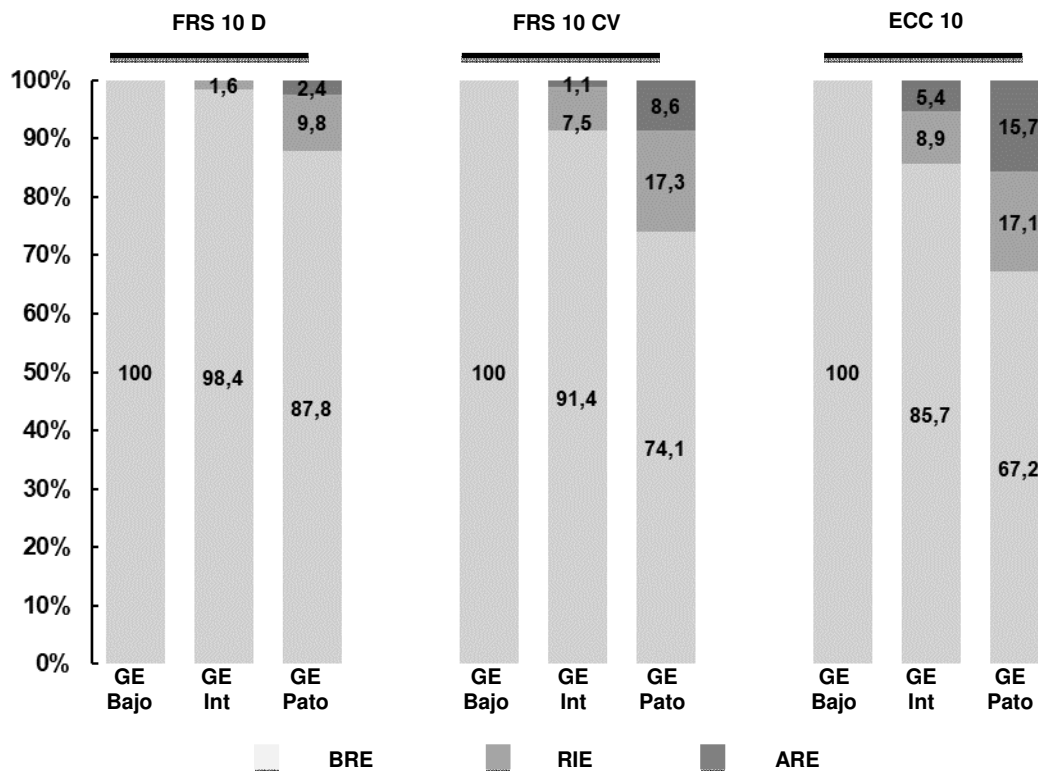


FIGURA 9. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 10 años en los grupos de estudios generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 10 D:** ecuación de riesgo coronario a 10 años; **FRS 10 CV:** ecuación de riesgo cardiovascular general a 10 años; **ECC 10:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a 10 años; **GE Bajo:** grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int:** grupo de estudio intermedio; **GE Pato:** grupo de estudio patológico. **BRE:** Bajo riesgo ecuacional; **RIE:** riesgo intermedio ecuacional; **ARE:** alto riesgo ecuacional. Los valores son expresados en porcentajes.

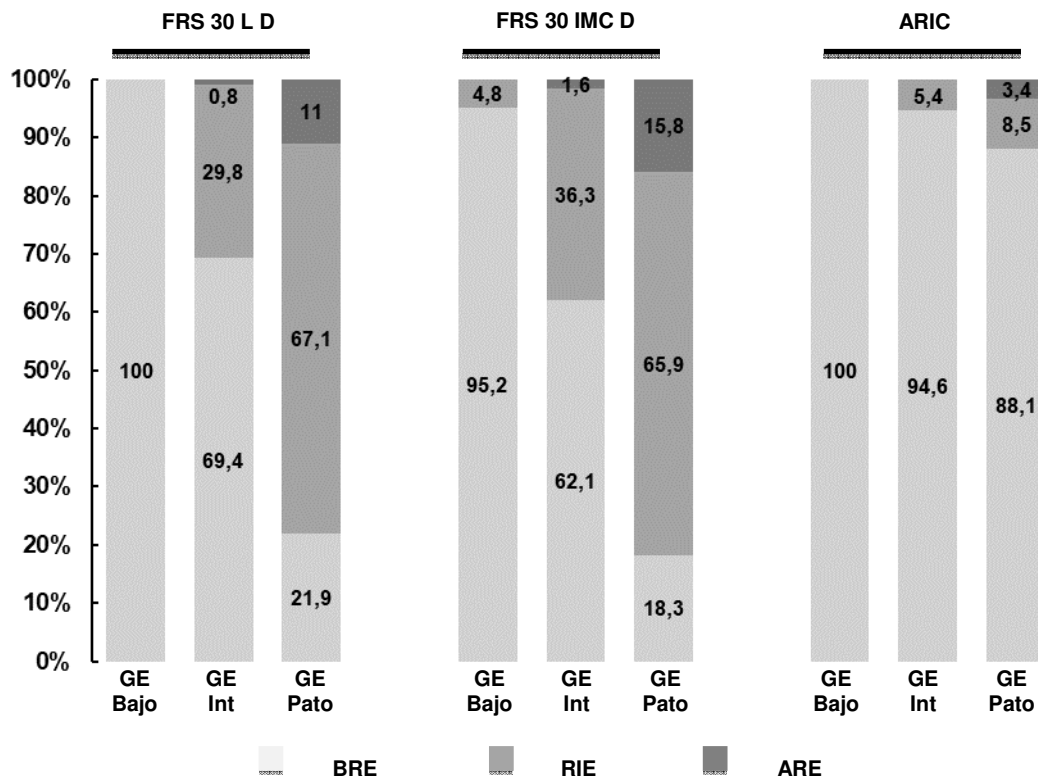


FIGURA 10. Estratificación de tres ecuaciones de riesgo cardiovascular a 30 años en los grupos de estudios generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según índice de masa corporal; **ARIC:** ecuación de riesgo coronario a 10 años del estudio ARIC (del inglés *Atherosclerosis Risk in Study*); **GE Bajo:** grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int:** grupo de estudio intermedio; **GE Pato:** grupo de estudio patológico. **BRE:** Bajo riesgo ecuacional; **RIE:** riesgo intermedio ecuacional; **ARE:** alto riesgo ecuacional. Los valores son expresados en porcentajes.

En relación a las ecuaciones a 30 años o más para eventos cardiovasculares, los individuos del GE de bajo riesgo se distribuyeron entre los grupos de bajo riesgo ecuacional (85,7% en el FRS 30 CV L, 66,7% en el FRS 30 CV IMC L y 52,4% en el ECC LV) y de riesgo intermedio ecuacional (14,3%, 33,3% y 47,6% respectivamente). Por el contrario, para el GE patológico sobresalieron el grupo de riesgo intermedio ecuacional (72% en FRS 30 CV L y 70,7% en FRS 30 CV IMC) y el grupo de alto riesgo ecuacional (ECC LV 48,8%) (Figura 11).

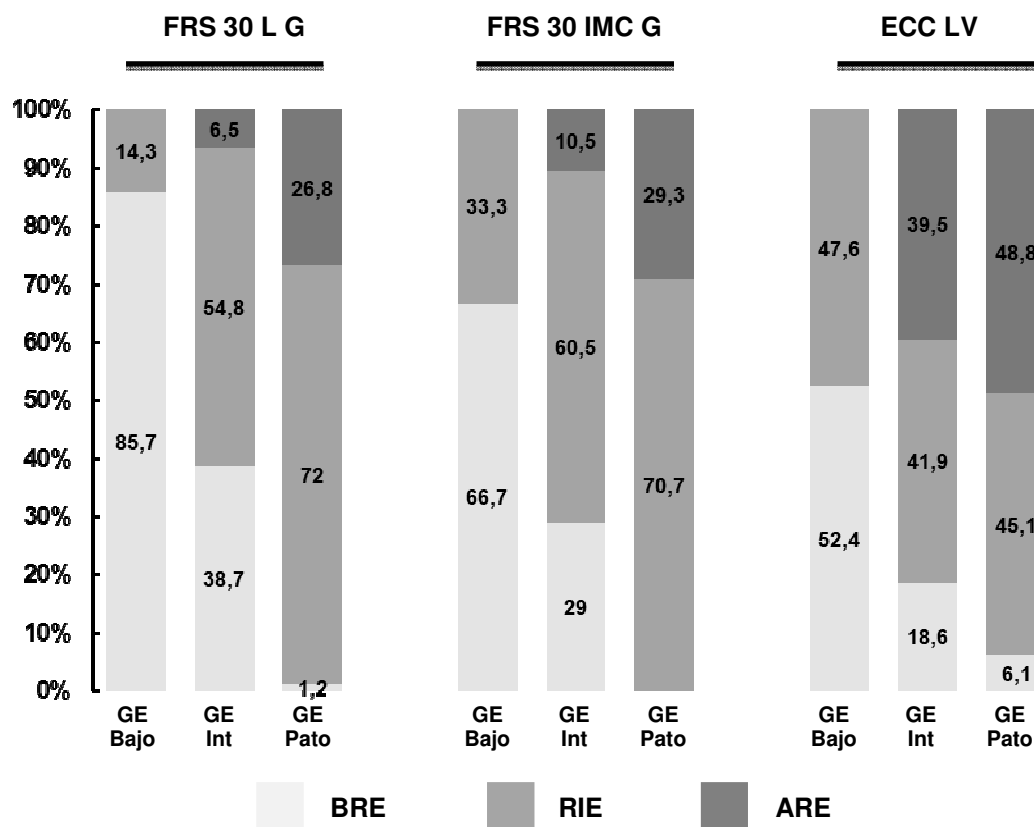


FIGURA 11. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 30 años o más en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **FRS 30 IMC G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según índice de masa corporal; **ECC LV:** ecuación de riesgo de cohortes combinadas para enfermedad cardiovascular aterosclerótica a lo largo de la vida; **GE Bajo:** grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int:** grupo de estudio intermedio; **GE Pato:** grupo de estudio patológico. **BRE:** Bajo riesgo ecuacional; **RIE:** riesgo intermedio ecuacional; **ARE:** alto riesgo ecuacional. Los valores son expresados en porcentajes.

3.3 Análisis de la distribución de subpoblaciones monocitarias.

La evaluación de la distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias en muestras de sangre periférica en el total de los individuos enrolados mostró un claro predominio de monocitos clásicos (mediana 86%) sobre monocitos no clásicos (mediana 7%) y monocitos intermedios (mediana 6%) (Figura 12).

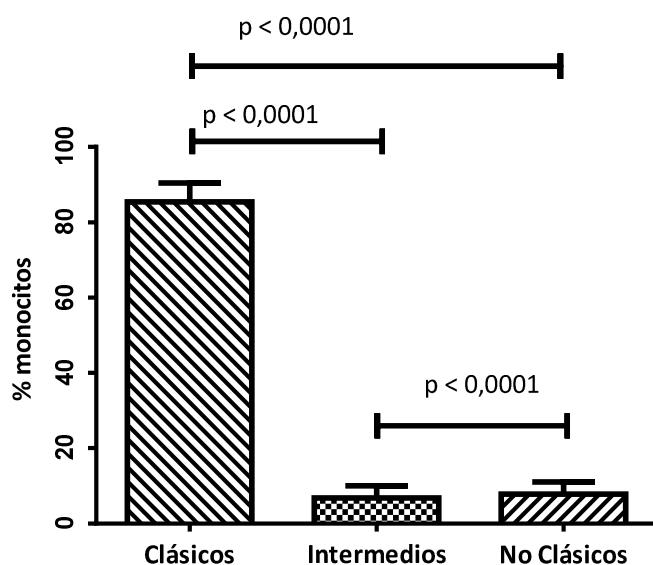


FIGURA 12. Distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias de sangre periférica en la totalidad de los individuos enrolados.

Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico calculado por el test de Mann Whitney.

Por el contrario, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al analizar la distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias según sexos (Tabla 10).

TABLA 10. Distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias según sexos.

Subpoblación Monocitaria	Masculino n 137	Femenino n 90	p valor (M-W)
Monocitos no clásicos (%)	8,0 (6,0 – 10,0)	7,0 (5,0 – 9,2)	0,1495
Monocitos intermedios (%)	7,0 (5,0 – 8,0)	6,0 (4,0 – 7,2)	0,0769
Monocitos clásicos (%)	85,0 (82,0 – 88,0)	86,2 (82,0 – 90,0)	0,1439

M-W: test de Mann Withney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Sin embargo, al examinar el recuento absoluto de los monocitos en cada subpoblación se encontraron diferencias significativas entre los sexos con

mayores valores para los hombres en monocitos no clásicos ($p = 0,0020$), intermedios ($p = 0,0005$) y clásicos ($p = 0,0096$) (Tabla 11).

TABLA 11. Distribución absoluta de las subpoblaciones monocitarias según sexos.

Subpoblación Monocitaria	General n 227	Masculino n 137	Femenino n 90	p valor: (M-W)
Monocitos no clásicos (μ/L)	39,0 (27,0 – 51,0)	42,0 (28,5 – 58,0)	33,5 (25,5 – 46,0)	0,0020
Monocitos intermedios (μ/L)	34,0 (23,0 – 46,0)	38,0 (26,0 – 47,0)	26,5 (20,75 – 40,0)	0,0005
Monocitos clásicos (μ/L)	460,0 (358,0 – 580,0)	480,0 (395,5 – 598,5)	413,0 (316,8 – 543,0)	0,0096

M-W: test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Por otra parte, al analizar el recuento relativo de las subpoblaciones monocitarias en los grupos ecuacionales generados por el FRS 30 L G, se observó un menor porcentaje de monocitos no clásicos en el grupo de bajo riesgo en comparación con los grupos de riesgo intermedio ($p = 0,0049$) y alto riesgo ($p = 0,0075$) concomitante con un mayor porcentaje de monocitos clásicos en el grupo de bajo riesgo en relación con los grupos de riesgo intermedio ($p = 0,0012$) y alto riesgo ($p = 0,0145$) (Tabla 12).

TABLA 12. Distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias según la estratificación del FRS 30 L G.

Subpoblación monocitaria	Grupo de bajo riesgo (n 67)	Grupo de riesgo intermedio (n 130)	Grupo de alto riesgo (n 30)	p valor B/A (M-W)	p valor B/I (M-W)	p valor I/A (M-W)	p Valor (K-W)
Monocitos no clásicos (%)	7,0 (5,0 – 8,0)	8,0 (6,0 – 10,0)	9,0 (6,0 – 10,2)	0,0075	0,0049	0,4552	0,0060
Monocitos intermedios (%)	6,0 (4,0 – 8,0)	7,0 (5,0 – 8,0)	7,0 (5,0 – 8,0)	0,1660	0,0262	0,8634	0,0769
Monocitos clásicos (%)	88,0 (84,0 – 90,0)	85,0 (82,0 – 88,0)	85,0 (81,7 – 8,0)	0,0145	0,0012	0,7264	0,0030
Monocitos totales (%)	9,0 (7,0 – 11,0)	8,0 (7,0 – 10,0)	8,0 (7,0 – 9,0)	0,1030	0,3492	0,2628	0,2461

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **K-W:** test de Kruskal Wallis; **M-W:** test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Al comparar el recuento absoluto de las subpoblaciones monocitarias entre diferentes grupos de riesgo generados a partir de las estimaciones obtenidas por FRS 30 L G, se observó una disminución en la mediana de monocitos no clásicos en el grupo de individuos con bajo riesgo respecto a los grupos de riesgo intermedio ($p = 0,0050$) y de alto riesgo ($p = 0,0208$). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en el recuento absoluto de los

monocitos intermedios y clásicos en relación con los tres grupos ecuacionales de riesgo (Tabla 13).

TABLA 13. Distribución absoluta de las subpoblaciones monocitarias según la estratificación del FRS 30 L G.

Subpoblación monocitaria	Grupo de bajo riesgo n 67	Grupo de riesgo intermedio n 130	Grupo de alto riesgo n 30	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: I/A (M-W)	p valor: (K-W)
Monocitos no clásicos (μ/L)	33,0 (24,0 - 43,0)	42,5 (27,7 - 53,2)	43,0 (28,5 - 66,5)	0,0208	0,0050	0,5089	0,0093
Monocitos intermedios (μ/L)	29,0 (21,0 - 40,0)	35,0 (23,0 - 47,0)	37,0 (28,5 - 50,7)	0,0779	0,0644	0,5444	0,1017
Monocitos clásicos (μ/L)	468,0 (359,0 - 577,0)	455,5 (354,8 - 582,0)	461,0 (344,3 - 627,8)	0,9366	0,6926	0,8576	0,9218
Monocitos totales (μ/L)	567,0 (416,0 - 670,0)	536,0 (429,0 - 672,8)	526,5 (420,3 - 762,5)	0,7665	0,9554	0,7682	0,9493

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **K-W:** test de Kruskal Wallis; **M-W:** test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Cuando se comparó la distribución de las subpoblaciones monocitarias en relación a los GE, no se observaron diferencias significativas en la cantidad relativa de los monocitos clásicos, no clásicos e intermedios entre los tres GE (bajo riesgo/ intermedio/ patológico) (Tabla 14).

TABLA 14. Distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Subpoblación monocitaria	GE bajo riesgo n 21	GE intermedio n 124	GE patológico n 82	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K-W)
Monocitos no clásicos (%)	7,0 (6,5 - 8,0)	7,0 (5,0 - 9,8)	8,0 (6,0 - 10,0)	0,1519	0,9318	0,0715	0,1438
Monocitos intermedios (%)	6,0 (4,5 - 10,0)	6,0 (5,0 - 8,0)	7,0 (5,0 - 8,0)	0,7415	0,3101	0,1408	0,2619
Monocitos clásicos (%)	87 (83 - 89)	86 (83 - 90)	85 (82 - 89)	0,4813	0,6001	0,0405	0,1216

GE: grupo de estudio; **BR:** GE bajo riesgo; **In:** GE intermedio; **P:** GE patológico; **K-W:** test de Kruskal Wallis; **M-W:** test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Del mismo modo, los valores absolutos de las subpoblaciones de monocitos no mostraron diferencias significativas entre los GE de bajo riesgo, intermedio y patológico (Tabla 15).

TABLA 15. Distribución absoluta de las subpoblaciones monocitarias según los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Subpoblación monocitaria	GE bajo riesgo n 21	GE intermedio n 124	GE patológico n 82	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K-W)
Monocitos no clásicos (μ/L)	33,0 (26,0 - 47,0)	37,5 (26,25 -49,75)	42,5 (28,0 - 54,0)	0,1249	0,5126	0,1486	0,1962
Monocitos intermedios (μ/L)	36,0 (20,5 - 49,0)	32,5 (23,0 -44,75)	36,0 (23,0 - 47,0)	0,7932	0,9034	0,3703	0,6806
Monocitos clásicos (μ/L)	410,0 (315,5 -603,5)	479,0 (364,8 -590,5)	451,5 (354,8 -573,5)	0,4383	0,2773	0,4092	0,4374

GE: grupo de estudio; BR: GE bajo riesgo; In: GE intermedio; P: GE patológico; K-W: test de Kruskal Wallis; M-W: test de Mann Whitney. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

Aunque la diferencia de los valores absolutos de las subpoblaciones de monocitos entre mujeres y varones en la totalidad de los individuos resultó significativa, no se observó similar comportamiento cuando estas comparaciones fueron efectuadas entre los GE agrupados por sexo. Los valores de significancia estadística calculada por el test no paramétrico de Kruskal-Wallis fueron: entre los varones, monocitos no clásicos ($p=0,1293$), monocitos intermedios ($p= 0,4565$) y monocitos clásicos ($p= 0,9509$), y entre las mujeres: monocitos no clásicos ($p= 0,7493$), monocitos intermedios ($p= 0,7409$) y monocitos clásicos ($p= 0,1349$).

En conclusión, se puede afirmar que las mediciones relativa y absoluta de las subpoblaciones de monocitos de sangre periférica no mostraron diferencias sustanciales entre los diferentes GE. Solamente en el grupo de bajo riesgo ecuacional generado por FRS 30 L G, los monocitos no clásicos tuvieron menores valores absolutos y relativos en comparación con las otras dos subpoblaciones monocitarias.

3.4 Evaluación de marcadores monocíticos en los Grupos de Estudios.

A través de la tecnología de Citometría de Flujo se procedió a identificar y medir diferentes marcadores moleculares que se expresan en la superficie celular de monocitos de sangre periférica, así como su expresión diferencial en las distintas subpoblaciones, en los individuos constituyentes de los diferentes GE. Entre ellos se midió la expresión de LRP1 en conjunto con otros marcadores, tales como CD11b, CD11c y CD36.

3.4.1 Nivel de expresión de CD11b. Al medir la expresión de CD11b en subpoblaciones de monocitos en la totalidad de los individuos enrolados se observó una mayor cantidad de este marcador en monocitos clásicos en comparación a lo expresado en monocitos intermedios y no clásicos (Figura 13).

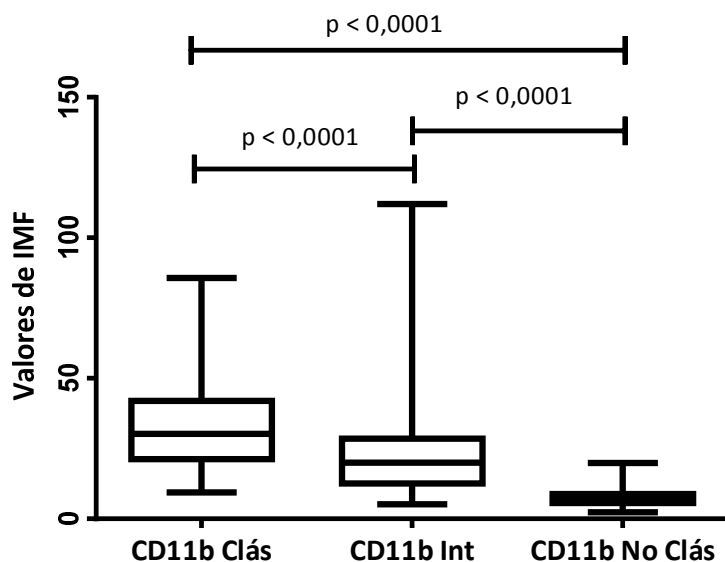


FIGURA 13. Expresión diferencial de CD11b según subpoblaciones monocitarias.

IMF: intensidad media de fluorescencia (expresado en unidades relativas); **Clás**: monocitos clásicos; **Int**: monocitos intermedios; **No Clás**: monocitos no clásicos. Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico calculado por el test de Mann Whitney.

Al contrastar su expresión según sexos, las mujeres presentaron una tendencia a valores mayores de CD11b respecto a los varones en las distintas subpoblaciones de monocitos, aunque esta diferencia fue significativa sólo en los monocitos no clásicos ($p = 0,0475$) (Tabla 16).

TABLA 16. Expresión diferencial de CD11b en las subpoblaciones monocitarias en los individuos enrolados al GE según sexos.

Biomarcador expresado en monocitos	General n 226	Masculino n 136	Femenino n 90	p valor :
CD11b / Monocitos no clásicos	7,0 (5,6 – 8,8)	6,6 (5,4 – 8,6)	7,2 (5,8 – 9,1)	0,0475
CD11b/ Monocitos intermedios	20,0 (12,7 – 28,5)	19,2 (12,7 – 27,1)	22,4 (12,5 – 31,5)	0,3080
CD11b / Monocitos clásicos	30,2 (21,3 – 42,0)	29,2 (21,5 – 41,4)	32,7 (21,0 – 43,0)	0,5131
CD11b / Monocitos totales	24,7 (17,0 – 32,9)	23,8 (16,4 – 32,2)	25,9 (17,6 – 35,4)	0,3469

El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado a través del test de Mann-Whitney.

Cuando la comparación de la expresión de CD11b en monocitos se efectuó en individuos agrupados por las estimaciones obtenidas a través del cálculo del

FRS 30 L G, no se observaron diferencias significativas para ninguna subpoblación monocitaria en relación con cada grupo de riesgo ecuacional (Tabla 17).

TABLA 17. Expresión diferencial de CD11b en las subpoblaciones monocitarias según la estratificación de riesgo estimado por FRS 30 L G.

Biomarcador expresado en monocitos	Grupo de bajo riesgo n 67	Grupo de riesgo intermedio n 129	Grupo de alto riesgo n 30	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: A/I (M-W)	p valor: (K-W)
CD11b / monocitos no clásicos	7,1 (5,8 – 9,0)	6,9 (5,6 – 8,8)	6,9 (4,9 – 8,8)	0,4023	0,3554	0,7137	0,5643
CD11b / monocitos Intermedios	20,8 (12,4 – 28,1)	19,6 (12,8 – 28,0)	17,8 (12,6 – 32,2)	0,9923	0,7978	0,9677	0,9729
CD11b / monocitos clásicos	31,6 (21,8 – 43,7)	30,1 (20,3 – 40,1)	29,9 (23,7 – 44,0)	0,9799	0,5083	0,6338	0,7615
CD11b / monocitos totales	25,7 (17,9 – 35,7)	24,4 (15,5 – 31,7)	22,5 (17,8 – 34,0)	0,6234	0,2828	0,8946	0,5709

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **M-W:** test de Mann-Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Finalmente, al comparar la expresión de CD11b en las distintas subpoblaciones monocitarias según los GE generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica, se observó una significativa disminución en la expresión de este marcador en los monocitos intermedios de los individuos agrupados en el GE intermedio en comparación a los GE de bajo riesgo ($p = 0,0330$) y patológico ($p = 0,0113$). Cuando se comparó la expresión de CD11b en monocitos clásicos y no clásicos entre los distintos grupos de GE las diferencias no fueron significativas (Tabla 18).

TABLA 18. Expresión diferencial de CD11b en subpoblaciones monocitarias en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Biomarcador expresado en monocitos	GE bajo riesgo n 21	GE intermedio n 123	GE patológico n 82	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K-W)
CD11b / Monocitos no clásicos	8,0 (5,6 – 8,5)	6,6 (5,6 – 8,8)	7,5 (5,6 – 9,1)	0,9465	0,3684	0,1739	0,3314
CD11b / Monocitos intermedios	24 (14 – 36)	18 (11 – 26)	23 (14 – 32)	0,5192	0,0330	0,0113	0,0119
CD11b / Monocitos clásicos	38 (22 – 51)	29 (20 – 40)	30 (23 – 43)	0,2599	0,1049	0,3098	0,2010
CD11b / Monocitos totales	30 (19 – 41)	24 (16 – 32)	25 (18 – 34)	0,1814	0,0499	0,3861	0,1380

GE: grupo de estudio; BR: GE bajo riesgo; In: GE intermedio; P: GE patológico; M-W: test de Mann-Whitney; K-W: test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

3.4.2 Nivel de expresión de CD11c. Al comparar la expresión de CD11c en la totalidad de los individuos enrolados se pudo observar que este marcador se expresa en mayor medida en monocitos intermedios respecto a lo medido en monocitos no clásicos y clásicos (Figura 14), sin manifestar diferencias significativas entre sexos (Tabla 19).

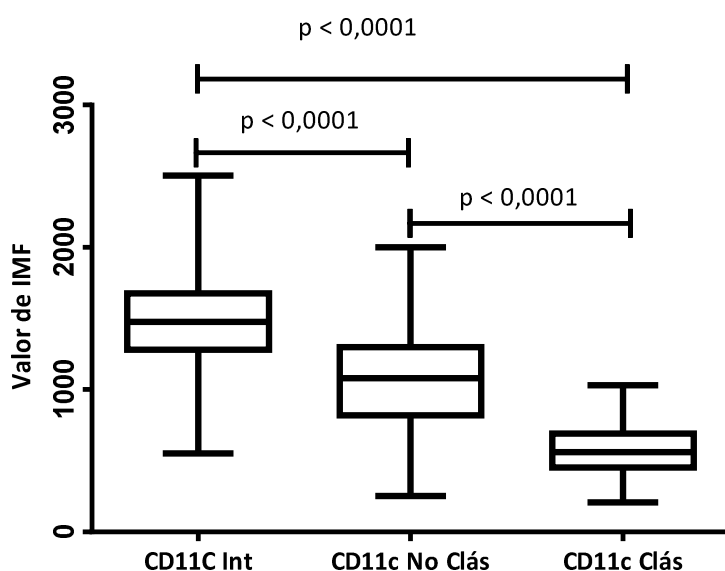


FIGURA 14. Expresión diferencial de CD11c según subpoblaciones monocitarias. IMF intensidad media de fluorescencia (expresado en unidades relativas); Clás monocitos clásicos; Int monocitos intermedios; No Clás monocitos no clásicos. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann Whitney.

TABLA 19. Expresión diferencial de CD11c en las subpoblaciones monocitarias en los individuos enrolados al GE según sexos.

Biomarcador en monocitos	General n 97	Masculino n 58	Femenino n 39	p valor
CD11c / monocitos no clásicos	1080 (818 – 1297)	1026 (792 – 1338)	1122 (878 – 1254)	0,8076
CD11c / monocitos intermedios	1477 (1281 – 1676)	1412 (1262 – 1656)	1518 (1353 – 1793)	0,1016
CD11c / monocitos Clásicos	559 (453 – 690)	545 (412 – 653)	604 (468 – 703)	0,2516
CD11c / monocitos totales	596 (446 – 709)	560 (428 – 710)	622 (483 – 711)	0,3820

El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado a través del test de Mann-Whitney.

Del mismo modo que con CD11b, cuando se comparó la expresión de CD11c en subpoblaciones monocitarias en individuos agrupados por las estimaciones obtenidas por la ecuación de FRS 30 L G, se observó una menor expresión significativa del CD11c en el grupo de riesgo intermedio en relación al grupo de bajo riesgo en los monocitos intermedios y en los monocitos totales, con tendencias no significativas en los monocitos no clásicos y clásicos (Tabla 20).

TABLA 20. Expresión diferencial de CD11c en las subpoblaciones monocitarias según la estratificación de riesgo estimado por FRS 30 L G.

Biomarcador en monocitos	Grupo de bajo riesgo n 24	Grupo de riesgo intermedio n 61	Grupo de alto riesgo n 12	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: A/I (M-W)	p valor: (K-W)
CD11c / monocitos no clásicos	1218 (1044 – 1500)	1017 (770 – 1256)	1058 (777 – 1368)	0,1526	0,0166	0,5935	0,0507
CD11c / monocitos intermedios	1647 (1412 – 1968)	1412 (1261 – 1638)	1529 (1297 – 1754)	0,4078	0,0130	0,2400	0,0355
CD11c / monocitos clásicos	626 (500 – 773)	525 (399 – 643)	587 (503 – 703)	0,6973	0,0367	0,1274	0,0602
CD11c / monocitos totales	662 (559 – 775)	537 (419 – 697)	543 (506 – 726)	0,2070	0,0173	0,3396	0,0457

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); FRS 30 L G: ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; B: bajo riesgo; I: riesgo intermedio; A: alto riesgo; M-W: test de Mann-Whitney; K-W: test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Al analizar la expresión de CD11c en subpoblaciones monocitarias en los individuos que constituyeron los diferentes GE no se observaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, el análisis de CD11c entre los

grupos cuya significancia fue cercana a una $p < 0,05$, la comparación binaria arrojó niveles de expresión de este marcador significativamente menores en monocitos totales y no clásicos en el GE patológico respecto al GE de bajo riesgo (Tabla 21).

TABLA 21. Expresión diferencial de CD11c en las subpoblaciones monocitarias en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Biomarcador en monocitos	GE bajo riesgo n 9	GE intermedio n 48	GE patológico n 40	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K-W)
CD11c / monocitos no clásicos	1246 (1130 – 1425)	1147 (772 – 1365)	1020 (849 – 1224)	0,0149	0,1800	0,3112	0,0856
CD11c / monocitos intermedios	1606 (1307 – 1937)	1460 (1263 – 1665)	1468 (1288 – 1670)	0,3259	0,4566	0,7839	0,6276
CD11c / monocitos clásicos	643 (564 – 796)	562 (411 – 701)	534 (456 – 664)	0,0463	0,1202	0,5978	0,1558
CD11c / monocitos totales	711 (640 – 766)	598 (419 – 706)	536 (450 – 656)	0,0160	0,0868	0,4615	0,0777

GE: grupo de estudio; BR: GE bajo riesgo; In: GE intermedio; P: GE patológico; M-W: test de Mann-Whitney; K-W: test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

3.4.3 Nivel de expresión de CD36. Cuando se analizó la expresión monocitaria de CD36 en los individuos enrolados se observó una mayor expresión en monocitos clásicos en contraste a lo hallado en monocitos intermedios y no clásicos (Figura 15).

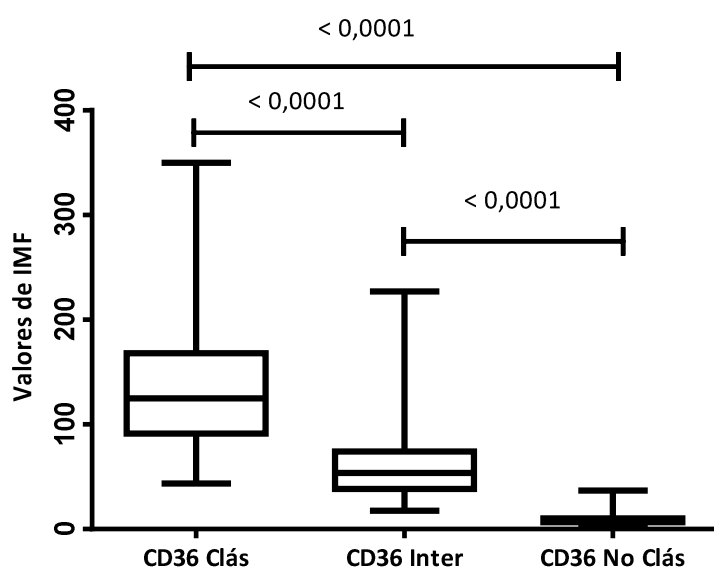


FIGURA 15. Expresión diferencial de CD36 según subpoblaciones monocitarias.

IMF intensidad media de fluorescencia (expresado en unidades relativas); Clás monocitos clásicos; Int monocitos intermedios; No Clás monocitos no clásicos. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann Whitney.

Al confrontar la expresión de CD36 según sexos, se encontró que las mujeres presentaron niveles mayores de CD36 en los monocitos no clásicos que los varones ($p = 0,0045$), mientras que las diferencias de expresión en los monocitos intermedios y clásicos no fueron significativas (Tabla 22).

TABLA 22. Expresión diferencial de CD36 en las subpoblaciones monocitarias en los individuos enrolados al GE según sexos.

Biomarcador en monocitos	General n 226	Masculino n 136	Femenino n 90	p valor
CD36 / monocitos no clásicos	8,0 (6,6 – 10,2)	7,5 (6,5 – 9,7)	8,7 (7,0 – 10,9)	0,0045
CD36/ monocitos intermedios	53,7 (38,4 – 74,2)	51,5 (37,7 – 71,6)	55,5 (38,3 – 80,0)	0,4163
CD36/ monocitos clásicos	125 (91,3 – 168,0)	124,5 (87,8 – 170,8)	125,0 (96,7 – 162,0)	0,7427
CD36/ monocitos totales	91,3 (65,8 – 117,0)	90,9 (62,4 – 118,8)	92,1 (69,9 – 116,0)	0,7000

El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado a través del test de Mann-Whitney.

Al comparar la expresión de CD36 en monocitos de individuos agrupados por las estimaciones ecuacionales obtenidas del FRS 30 L G, no se encontraron diferencias significativas en cada subpoblación monocitaria en relación con cada grupo de riesgo ecuacional (Tabla 23).

TABLA 23. Expresión diferencial de CD36 en las subpoblaciones monocitarias según la estratificación de riesgo estimado por FRS 30 L G.

Biomarcador en monocitos	Grupo de bajo riesgo n 67	Grupo de riesgo intermedio n 129	Grupo de alto riesgo n 30	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: A/I (M-W)	p valor: (K-W)
CD36 / monocitos no clásicos	8,2 (6,6 – 11,0)	8,4 (7,0 – 9,9)	7,2 (6,4 – 11,2)	0,3807	0,5507	0,3656	0,5496
CD36 / monocitos intermedios	55,6 (42,6 – 69,3)	49,9 (35,4 – 69,1)	61,8 (37,1 – 101,0)	0,4406	0,1518	0,0925	0,1330
CD36 / monocitos clásicos	130,0 (101,0 – 172,0)	121,0 (86,8 – 162,0)	142,0 (98,2 – 204,8)	0,5774	0,2321	0,1567	0,2466
CD36 / monocitos totales	95,3 (72,9 – 126,0)	85,0 (61,2 – 110,5)	91,7 (68,8 – 125,5)	0,8114	0,0289	0,2065	0,0712

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **M-W:** test de Mann-Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Al cotejar la expresión del CD36 en las subpoblaciones monocitarias según los GE generados se detectó una tendencia de valores menores de expresión de CD36 en los monocitos no clásicos del grupo de bajo riesgo en relación con los grupos intermedio y patológico (Tabla 24).

TABLA 24. Expresión diferencial de CD36 en las subpoblaciones monocitarias en los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Biomarcador en monocitos	GE bajo riesgo n 21	GE intermedio n 124	GE patológico n 81	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K - W)
CD36 / monocitos no clásicos	6,8 (5,9 – 8,8)	8,4 (6,7 – 10,0)	8,0 (7,0 – 9,9)	0,0530	0,0310	0,7726	0,0934
CD36 / monocitos intermedios	58 (41 – 76)	53 (38 – 72)	52 (38 – 76)	0,4333	0,4602	0,8877	0,7196
CD36 / monocitos clásicos	136 (111 – 178)	124 (92 – 170)	124 (87 – 162)	0,3797	0,4204	0,7434	0,6453
CD36 / monocitos totales	100 (76 – 124)	92 (69 – 117)	87 (60 – 117)	0,2581	0,4434	0,3401	0,4077

GE: grupo de estudio; BR: GE bajo riesgo; In: GE intermedio; P: GE patológico; M-W: test de Mann-Whitney; K-W: test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

3.4.4 Conclusiones sobre los biomarcadores analizados. El CD11b mostró una expresión diferencial entre las subpoblaciones monocitarias, mayor en los monocitos clásicos y menor en los monocitos no clásicos. No se detectaron diferencias en las subpoblaciones monocitarias entre los GE de bajo riesgo y patológico. Sólo se manifestó una menor expresión en los monocitos intermedios del GE intermedio en relación con los otros dos GE.

El CD11c mostró una expresión diferencial entre las subpoblaciones monocitarias, mayor en los monocitos intermedios y menor en los monocitos clásicos. Hubo una tendencia de una menor expresión en monocitos totales y no clásicos en el GE patológico respecto al GE de bajo riesgo.

El CD36 mostró una expresión diferencial entre las subpoblaciones monocitarias, mayor en los monocitos clásicos y menor en los monocitos no clásicos. Además se detectó una tendencia de menores valores de expresión en los monocitos no clásicos del GE de bajo riesgo en relación con los GE intermedio y patológico.

3.5 Nivel de expresión de LRP1 en subpoblaciones de monocitos

El análisis de la expresión de LRP1 en la superficie celular de subpoblaciones de monocitos en la totalidad de los individuos enrolados mostró valores

superiores en monocitos intermedios (mediana de IMF de 70,2 (60,9 – 86,2)), seguido por la expresión en monocitos clásicos (mediana 54,3 (47,4 – 63,8)) y monocitos no clásicos (mediana 36,8 (30,3 – 46,0)).

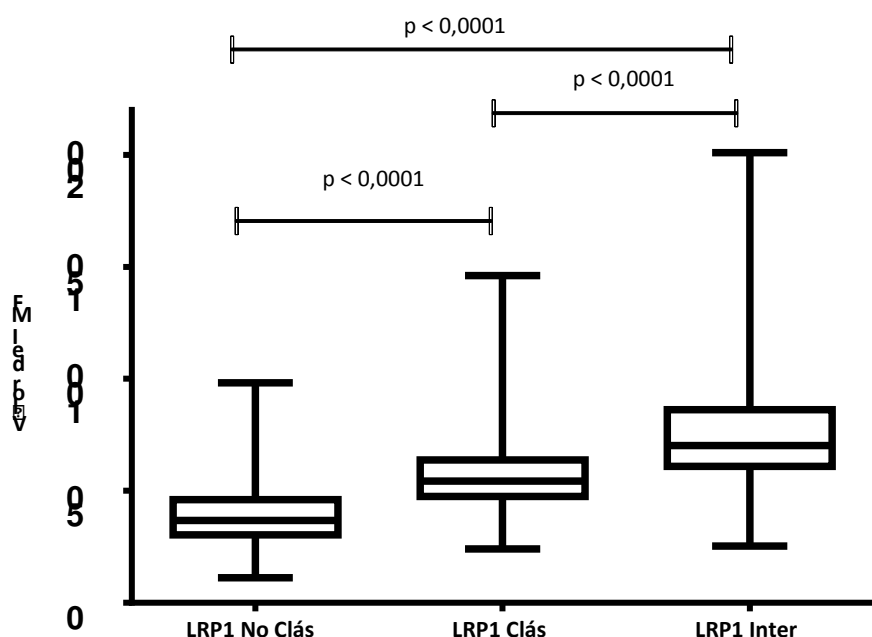


FIGURA 16. Expresión diferencial de LRP1 según subpoblaciones monocitarias.

IMF intensidad media de fluorescencia (expresado en unidades relativas); **Clás** monocitos clásicos; **Int** monocitos intermedios; **No Clás** monocitos no clásicos. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann-Whitney.

Al comparar la expresión de LRP1 en las subpoblaciones monocíticas según sexos, los valores obtenidos fueron similares con diferencias no significativas (Tabla 25).

TABLA 25. Expresión diferencial de LRP1 en la superficie celular de las subpoblaciones monocitarias según sexos.

Biomarcador en monocitos	Masculino n 137	Femenino n 90	p valor
LRP1/ monocitos no clásicos	38,4 (31,5 – 46,3)	34,1 (28,9 – 43,9)	0,1345
LRP1/ monocitos intermedios	70,2 (60,9 – 88,8)	69,9 (60,8 – 83,2)	0,4032
LRP1/ monocitos clásicos	54,2 (47,4 – 65,9)	54,4 (47,3 – 62,2)	0,7217
LRP1/ monocitos totales	52,7 (44,0 – 60,2)	51,7 (41,5 – 60,5)	0,5277

El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado a través del test de Mann-Whitney.

Al comparar los valores de LRP1 de cada subpoblación monocitaria con los diferentes grupos de riesgo, generados a partir de las estimaciones obtenidas por la ecuación FRS 30 L D, sólo se halló una tendencia de aumento en los valores de LRP1 en monocitos totales del grupo de bajo riesgo en comparación

con los niveles obtenidos en el grupo de riesgo intermedio en el mismo tipo celular (Tabla 26).

TABLA 26. Expresión diferencial de LRP1 en subpoblaciones monocitarias según la estratificación riesgo por FRS 30 L D.

Biomarcador en monocitos	Grupo de bajo riesgo n 125	Grupo de riesgo intermedio n 92	Grupo de alto riesgo n 10	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: I/A (M-W)	p valor: (K-W)
LRP1 / monocitos no clásicos	39 (31 - 49)	34 (29 - 44)	38 (30 - 50)	0,9654	0,0520	0,3780	0,1373
LRP1 / monocitos intermedios	71 (61 - 90)	69 (61 - 84)	62 (57 - 98)	0,6383	0,2900	0,8745	0,5436
LRP1 / monocitos clásicos	56 (48 - 67)	52 (46 - 62)	50 (43 - 62)	0,2821	0,0411	0,7541	0,0937
LRP1 / monocitos Totales	54 (45 - 62)	48 (41 - 59)	47 (41 - 60)	0,2955	0,0187	0,8964	0,0510

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L D:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **M-W:** test de Mann-Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Por otra parte, al confrontar la expresión de LRP1 en las distintas subpoblaciones monocitarias de los grupos de riesgo estimados a partir de la ecuación FRS 30 L G, no se encontraron diferencias significativas (Tabla 27).

TABLA 27. Expresión diferencial de LRP1 en las subpoblaciones monocitarias según la estratificación de riesgo estimada a través de la ecuación FRS 30 L G.

Biomarcador en monocitos	Grupo de bajo riesgo n 67	Grupo de riesgo intermedio n 130	Grupo de alto riesgo n 30	p valor: B/A (M-W)	p valor: B/I (M-W)	p valor: I/A (M-W)	p valor: (K-W)
LRP1 / monocitos no clásicos	41 (30 - 50)	36 (31 - 44)	34 (28 - 47)	0,2392	0,2560	0,4760	0,3547
LRP1 / monocitos intermedios	72 (61 - 90)	70 (61 - 85)	64 (54 - 84)	0,2770	0,7210	0,2716	0,4775
LRP1 / monocitos clásicos	56 (49 - 70)	54 (47 - 61)	50 (43 - 65)	0,1500	0,1165	0,6069	0,1993
LRP1 / monocitos totales	53 (46 - 66)	53 (42 - 59)	47 (42 - 61)	0,1130	0,1141	0,5606	0,1739

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L G:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares generales a 30 años según lípidos; **B:** bajo riesgo; **I:** riesgo intermedio; **A:** alto riesgo; **M-W:** test de Mann-Whitney; **K-W:** test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

Por el contrario, cuando se analizaron los valores de expresión de LRP1 en cada subpoblación monocitaria proveniente de los individuos que conforman los GE generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica, se observaron valores mayores de LRP1 en todas las subpoblaciones monocitarias del GE de bajo riesgo con respecto a los otros GE intermedio y patológico (Tabla 28). De otro modo, se observó una significativa disminución de LRP1 en la superficie celular de monocitos totales (Figura 17) así como en monocitos clásicos (Figura 18) en el GE patológico respecto al GE

de bajo riesgo. Esta pérdida de LRP1 en dicho grupo fue en términos de significancia estadística menos evidente en monocitos intermedios (Figura 19) y no clásicos (Figura 20). Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de LRP1 en cada subpoblación monocitaria entre los GE intermedio y patológico (Tabla 28).

TABLA 28. Expresión diferencial de LRP1 en las subpoblaciones monocitarias según los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Biomarcador en monocitos	GE bajo riesgo n 21	GE intermedio n 124	GE patológico n 82	p valor: BR/P (M-W)	p valor: BR/In (M-W)	p valor: P/In (M-W)	p valor: (K – W)
LRP1 / monocitos no clásicos	49 (33 – 59)	37 (30 – 45)	35 (30 – 45)	0,0073	0,0088	0,6114	0,0206
LRP1 / monocitos Intermedios	88 (71 – 103)	69 (60 – 85)	68 (61 – 82)	0,0032	0,0024	0,8859	0,0083
LRP1 / monocitos clásicos	67 (58 – 79)	54 (47 – 62)	52 (44 – 60)	< 0,0001	0,0001	0,3204	0,0002
LRP1 / monocitos totales	63 (57 – 74)	52 (43 – 59)	49 (42 – 59)	< 0,0001	0,0002	0,4140	0,0004

GE: grupo de estudio; BR: GE bajo riesgo; In: GE intermedio; P: GE patológico; M-W: test de Mann-Whitney; K-W: test de Kruskal Wallis. El nivel de expresión se define en términos de Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) medido por Citometría de Flujo del modo que se detalla en la sección Materiales y Métodos. Los valores son expresados en medianas (percentiles 25-75). El valor de $p < 0,05$ se considera significativo.

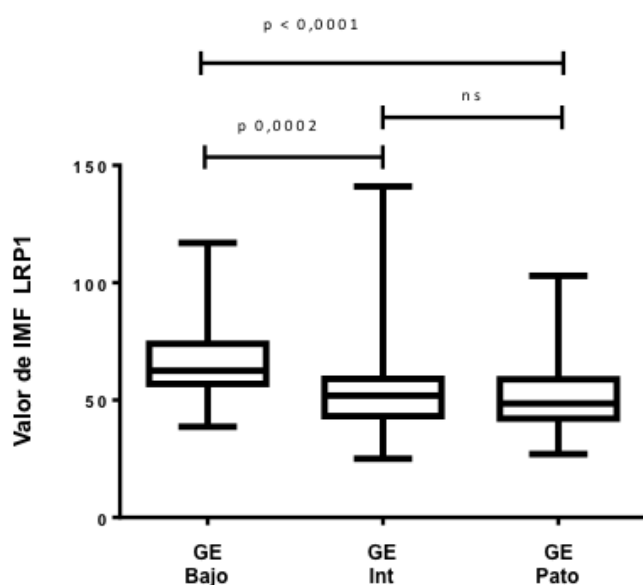


FIGURA 17. Expresión diferencial de LRP1 en monocitos totales en los diferentes grupos de estudio originados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

IMF: intensidad media de fluorescencia; GE Bajo: grupo de estudio de bajo riesgo; GE Int: grupo de estudio intermedio; GE Pato: grupo de estudio patológico. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann-Whitney.

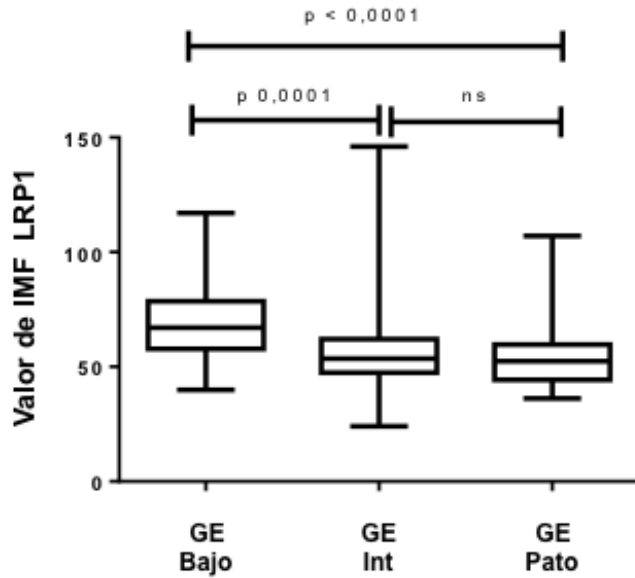


FIGURA 18. Expresión diferencial de LRP1 en monocitos clásicos en los diferentes grupos de estudio originados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

IMF: intensidad media de fluorescencia; **GE Bajo**: grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int**: grupo de estudio intermedio; **GE Pato**: grupo de estudio patológico. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann-Whitney.

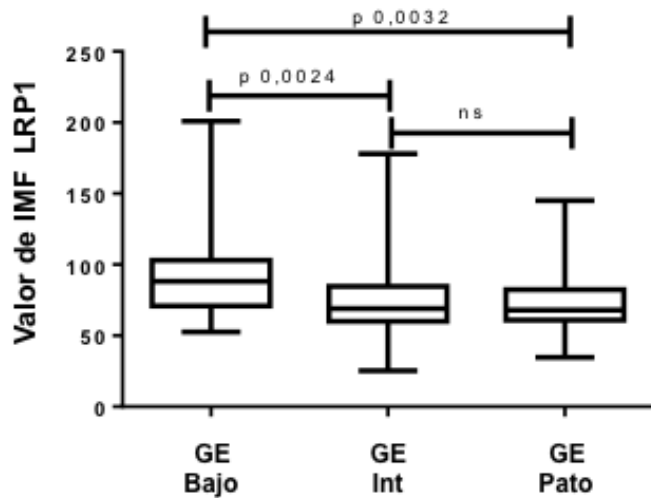


FIGURA 19. Expresión diferencial de LRP1 en monocitos intermedios en los diferentes grupos de estudio originados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

IMF: intensidad media de fluorescencia; **GE Bajo**: grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int**: grupo de estudio intermedio; **GE Pato**: grupo de estudio patológico. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann-Whitney.

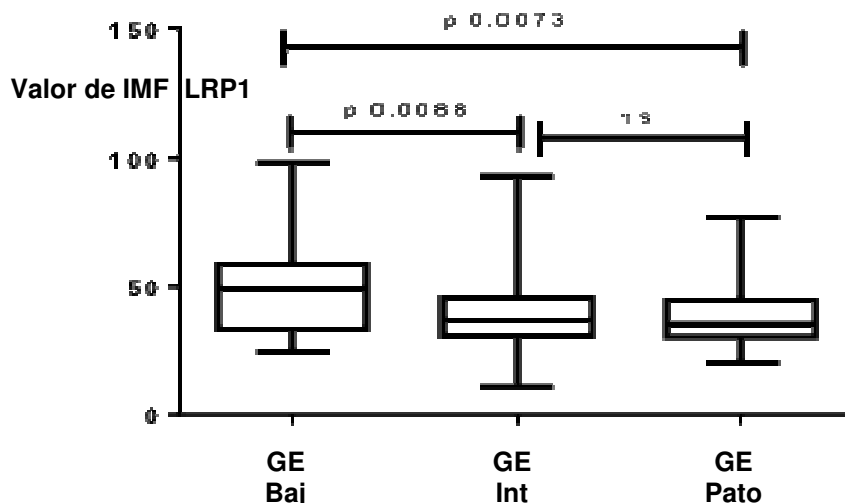


FIGURA 20. Expresión diferencial de LRP1 en monocitos no clásicos en los diferentes grupos de estudio originados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

IMF: intensidad media de fluorescencia; **GE Bajo**: grupo de estudio de bajo riesgo; **GE Int**: grupo de estudio intermedio; **GE Pato**: grupo de estudio patológico. El valor de $p < 0,05$ se considera significativo calculado por el test de Mann-Whitney.

En término de establecer alguna asociación entre la disminución de LRP1 en monocitos clásicos con los diferentes parámetros bioquímicos, antropométricos y clínicos determinados en la totalidad de los individuos enrolados, el análisis de correlación binaria no arrojó valores de r significativos (Tabla 29).

Tabla 29. Correlación en la expresión de LRP1 en los individuos enrolados.

	Spearman r	Intervalo de confianza	p valor
Colesterol total	-0,10	-0,24 to 0,029	0,1147
Colesterol LDL	-0,076	-0,21 to 0,059	0,2544
Colesterol HDL	0,031	-0,10 to 0,16	0,6432
Triglicéridos	-0,12	-0,25 to 0,015	0,0731
ApoA	-0,024	-0,16 to 0,11	0,7175
ApoB	-0,099	-0,23 to 0,035	0,1358
Lp (a)	-0,15	-0,28 to -0,0098	0,0306
Glucemia	0,052	-0,083 to 0,18	0,4388
HbA1C	-0,040	-0,17 to 0,094	0,5443
PCR	-0,12	-0,25 to 0,017	0,0772
PAS	-0,069	-0,20 to 0,066	0,3024
PAD	-0,065	-0,20 to 0,070	0,3328
IMC	-0,12	-0,25 to 0,017	0,0782
Cintura abdominal	-0,095	-0,23 to 0,040	0,1564

HDL: lipoproteína de alta densidad; **LDL**: lipoproteína de baja densidad; **ApoA**: apolipoproteína A, **ApoB**: apolipoproteína B; **Lp (a)**: lipoproteína (a); **HbA1C**: hemoglobina glicada; **PCR**: proteína C reactiva; **PAS**: presión arterial sistólica; **PAD**: presión arterial diastólica; **IMC**: índice de masa corporal. Valores de $p < 0,05$ son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

No obstante, cuando dicha correlación se realizó considerando los individuos agrupados en los GE de bajo riesgo y patológico (excluyendo los individuos del

GE intermedio) se pudo observar una correlación negativa y significativa entre LRP1 y colesterol LDL, triglicéridos, ApoB, PCR, IMC y cintura abdominal, mientras que un valor de r positivo y significativo fue obtenido con colesterol HDL (Tabla 30).

TABLA 30. Correlación en la expresión de LRP1 en los individuos del grupo de estudio de bajo riesgo y del grupo de estudio patológico.

	Spearman r	Intervalo de confianza	p valor
Colesterol total	-0,15	-0,34 to 0,047	0,1218
Colesterol LDL	-0,22	-0,40 to -0,019	0,0278
Colesterol HDL	0,22	0,024 to 0,40	0,0242
Triglicéridos	-0,27	-0,45 to -0,077	0,0055
ApoA	0,18	-0,017 to 0,37	0,0642
ApoB	-0,24	-0,42 to -0,046	0,0134
Lp (a)	-0,12	-0,32 to 0,082	0,2260
Glucemia	-0,17	-0,35 to 0,033	0,0913
HbA1C	-0,13	-0,32 to 0,072	0,1955
PCR	-0,25	-0,43 to -0,054	0,0106
PAS	-0,087	-0,28 to 0,11	0,3840
PAD	-0,16	-0,35 to 0,038	0,1018
IMC	-0,29	-0,46 to -0,096	0,0030
Cintura abdominal	-0,35	-0,51 to -0,16	0,0003

HDL: lipoproteína de alta densidad; **LDL:** lipoproteína de baja densidad; **ApoA:** apolipoproteína A, **ApoB:** apolipoproteína B; **Lp (a):** lipoproteína (a); **HbA1C:** hemoglobina glicada; **PCR:** proteína C reactiva; **PAS:** presión arterial sistólica; **PAD:** presión arterial diastólica; **IMC:** índice de masa corporal. Valores de p < 0,05 son considerados significativos desde un punto de vista estadístico.

3.5.1 Conclusiones sobre los niveles de expresión de LRP1 monocitario.

Considerando los resultados obtenidos se concluye que: i) el LRP1 mostró una expresión diferencial en la superficie celular de subpoblaciones monocitarias, siendo mayor en los monocitos intermedios y clásicos y en menor medida en los monocitos no clásicos; ii) la expresión de LRP1 en monocitos clásicos mostró una disminución significativa en los individuos enrolados en el GE patológico respecto a los del GE de bajo riesgo; y iii) esta disminución de LRP1 en monocitos clásicos correlacionó con aquellos parámetros bioquímicos y antropométricos que constituyen factores de riesgo de desarrollo de enfermedad aterosclerótica.

4. DISCUSIÓN

La aterosclerosis es la principal causa de mortalidad global mundial debido a sus dos principales manifestaciones clínicas: cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular isquémico. (Estadísticas vitales. Información básica año 2014. Ministerio de Salud de la Nación. Bs As Argentina Diciembre 2015. ISSN 1668-9054 Serie 5 N 58). La aterosclerosis se exterioriza clínicamente cuando existe un estado avanzado de estenosis arterial o de forma abrupta por la generación de un trombo luminal o una hemorragia aguda en la placa aterosclerótica. Además, esta enfermedad, definida como un proceso inflamatorio crónico, se caracteriza por tener un largo período de evolución subclínica, y en algunos pacientes su primera manifestación clínica es un evento cardiovascular fatal. Por lo tanto, la prevención primaria de aterosclerosis emerge como un instrumento fundamental sanitario para modificar la historia natural de esta patología en la etapa subclínica. En este sentido, surgen como herramientas de tamizaje para aterosclerosis subclínica los métodos imagenológicos de ecografía doppler arterial y tomografía coronaria sin contraste junto con diversos biomarcadores moleculares sanguíneos y celulares. Sobre este último aspecto, en este trabajo de tesis se propuso investigar el nivel de expresión de potenciales biomarcadores moleculares de aterosclerosis subclínica que están presentes en las diferentes subpoblaciones de monocitos de sangre periférica en individuos con distintos niveles de riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular (ECV). Para ello, fue necesario establecer criterios bioquímicos, antropométricos y clínicos para alcanzar una adecuada clasificación de los individuos con diversos riesgos de ECV, incluyendo aquellos con evidente diagnóstico imagenológico de aterosclerosis subclínica, así como el comportamiento de los niveles de las subpoblaciones monocitarias de sangre periférica en función del nivel de riesgo establecido.

Dado el carácter multifactorial que desencadena la aterosclerosis y la ECV, es fundamental poder establecer grupos de estudio control y patológico. Para ello, se procedió a enrolar individuos adultos menores de 60 años, sin eventos cardiovasculares conocidos, los cuales fueron estratificados siguiendo dos

criterios: *i*) por aplicación de ecuaciones predictoras de morbilidad y mortalidad cardiovasculares, y *ii*) por la presencia de factores de riesgo cardiovascular tradicionales y de aterosclerosis subclínica imagenológica (ecografía doppler carotídea con EIM / PAC y tomografía coronaria con CAC).

4.1 Clasificación de individuos a partir de la aplicación de ecuaciones predictoras de riesgo cardiovascular.

Las ecuaciones para estimar el riesgo de padecer ECV son importantes en la práctica clínica corriente para decidir el enfoque terapéutico preventivo de esta patología (95). Una de las más utilizadas es el FRS 10 D, enfocada en predecir en un horizonte a 10 años la aparición de IAM o muerte coronaria, pero fue establecida a partir del análisis de una población de origen étnico caucásico norteamericano, constituyendo así una importante limitación al ser aplicada en poblaciones con otros orígenes étnicos y culturales (96). Además, se conoce que FRS 10 D subestima el riesgo coronario en adultos jóvenes, en particular mujeres (15). Posteriormente la ACC/AHA propuso la ecuación denominada ECC 10, para predecir a 10 años el desarrollo de un evento cardiovascular aterosclerótico duro: IAM no fatal, muerte coronaria, ACV fatal y ACV no fatal, la cual fue calibrada y validada en una población caucásica y afroamericana. Si bien esta ecuación adiciona a los eventos cerebrovasculares y a la población afroamericana, sigue careciendo hasta el presente de una validación en la población de origen hispano (17). Asimismo, tanto FRS 10 D como ECC 10 sobreestiman el riesgo para ECV en población hispana (97,98). Es por ello, que como una primera conclusión surge la necesidad de calibrar y validar estas ecuaciones de riesgo cardiovascular previo a la aplicación en nuestra población.

Por otra parte, en este trabajo de tesis establecimos que las ecuaciones de FRS 10 D y ECC 10 presentan un bajo poder de discriminación de aterosclerosis subclínica en los grupos ecuacionales de bajo riesgo (categoría dominante en nuestra población de estudio) puesto que se obtuvieron valores predictivos negativos del 66,5% y 55,7% respectivamente. Este resultado tiene un alto impacto en la práctica de una medicina enfocada en la prevención de las complicaciones cardiovasculares ateroscleróticas, posicionando en una

situación desfavorable a estas dos ecuaciones en el tamizaje de aterosclerosis subclínica entre adultos no mayores, pues presentan en su principal grupo ecuacional, el de bajo riesgo (77,4% para ECC 10 y 94,7% para FRS 10 D) un alto índice de casos falsos negativos (44,3% y 33,5% respectivamente). Esto implicaría categorizar erróneamente como sana a un tercio de nuestra población de adultos no mayores, cuando en realidad tiene aterosclerosis subclínica definida por métodos imagenológicos, y perder la oportunidad de instaurar medidas preventivas que podrían modificar la historia natural de esta enfermedad. Estos hallazgos fueron coincidentes con los valores de predicción informados por otros estudios internacionales, tal es el caso de lo establecido por Karim y col., donde evidenciaron un 69% de aterosclerosis subclínica en individuos residentes de los Estados Unidos de América conteniendo sólo 11% de hispanos (99); Laing y col. con un 32 % entre individuos mexicanos americanos (100); y el estudio de Masson y col., realizado en residentes de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, donde detectaron placa carotídea en el 19% de los individuos en el grupo de bajo riesgo (101).

No obstante, en este trabajo de tesis cuando se aplicaron ecuaciones a horizontes más largos (30 años), se encontró una mejor asociación predictiva con la presencia de aterosclerosis subclínica. Valores predictivos negativos del 98,5% y 100% fueron calculados para la presencia de aterosclerosis subclínica en individuos clasificados como de bajo riesgo (<12%) al aplicar las ecuaciones FRS 30 L G y FRS 30 IMC G, respectivamente. En consonancia con nuestro estudio, Laing y col., utilizando la ecuación FRS 30 L G no detectaron aterosclerosis subclínica en el grupo de bajo riesgo (100). Del mismo modo, Masson y col., aplicando la ecuación FRS 30 IMC G, sólo observaron placa carotídea en el 3% del grupo de bajo riesgo (101).

De este modo, se deduce que en pacientes menores de 60 años, y que tengan un riesgo inferior al 12% calculado por estas ecuaciones con horizontes a 30 años, evitaría la solicitud de métodos complementarios imagenológicos para el tamizaje de aterosclerosis subclínica. Este hallazgo es de gran importancia para una práctica clínica ambulatoria preventiva que no siempre tiene accesibilidad a estos recursos tecnológicos modernos. Sin embargo, esta

recomendación sólo sería aplicable a menos de un tercio de esta población, pues un 22% según FRS 30 IMC G y un 29,5% según FRS 30 L G clasificarían como grupo de bajo riesgo ecuacional. Entre los dos tercios restantes, una prevalencia de aterosclerosis subclínica cercana al 50% nos obliga a solicitar aún estudios imagenológicos.

4.2 Clasificación de individuos a partir de factores de riesgo cardiovascular y evidencia imagenológica de aterosclerosis subclínica.

Como consecuencia de que las ecuaciones de riesgo no permiten discriminar la presencia de aterosclerosis subclínica, en el presente estudio utilizamos los métodos imagenológicos junto con los factores de riesgo cardiovascular para generar básicamente tres grupos de estudio (GE): *i*) el GE de bajo riesgo, presentando imágenes negativas y sin factores de riesgo evidentes; *ii*) el GE intermedio, establecido a partir de no presentar imágenes de aterosclerosis pero evidenciando la presencia de al menos un factor de riesgo cardiovascular; y *iii*) el GE patológico, caracterizado en individuos con imágenes de aterosclerosis positivas (EIM, PAC y/o CAC).

En el presente estudio se detectó aterosclerosis subclínica imagenológica en el 36,1% de individuos enrolados (32,2% entre las mujeres y 38,7% entre los varones), con una distribución diferente de las imágenes patológicas según sexos. Con respecto a las mujeres, 28 de las 29 con aterosclerosis subclínica tuvieron ecografías carotídeas anormales, mientras que sólo una mujer de 59 años presentó CAC con ecografía carotídea normal. Las otras 4 mujeres con CAC también tuvieron ecografías carotídeas anormales concomitantes. La mujer más joven con ecografía carotídea anormal tuvo 44 años, mientras que la más joven con CAC tuvo 49 años. Ninguna mujer con CAC superó un puntaje de Agatston de 100. A partir de estos hallazgos se deduce que entre las mujeres adultas no mayores la tomografía coronaria produce un reducido aporte al tamizaje de aterosclerosis subclínica en relación a la ecografía carotídea. Si esta tendencia se mantiene en estudios de tamizaje de aterosclerosis subclínica con mayor número de participantes, uno podría sugerir que en mujeres adultas no mayores, en especial las menores de 50 años, el método de primera elección sería la ecografía doppler carotídea, sin

necesidad de solicitar tomografía coronaria, disminuyendo significativamente los costos de la práctica médica.

En contraposición, en los varones del GE patológico la aterosclerosis subclínica fue detectada únicamente por CAC en el 38% de los casos, mientras que por ecografía carotídea los casos alcanzaron el 33% y por los dos procedimientos simultáneamente en el 29%. Además, en los varones se manifestó la aterosclerosis subclínica a una edad menor en comparación a las mujeres: 29 años para CAC y 34 años para ecografía carotídea anormal. Estos resultados justificarían en varones el uso de los dos métodos imagenológicos para el tamizaje de aterosclerosis subclínica, iniciando la búsqueda a partir de la cuarta década de vida, mientras que en las mujeres la ecografía doppler carotídea tendría mayor rédito comenzando a partir de la quinta década.

En la literatura internacional se describen estudios enfocados a investigar la presencia de aterosclerosis subclínica a través de métodos imagenológicos en individuos sin enfermedad cardiovascular conocida. Entre ellos, se destaca el informe basado en los estudios CARDIA (del inglés *Coronary Artery Risk Development in Young Adults*) y MESA (del inglés *Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis*) donde se analizó la presencia de aterosclerosis subclínica en adultos jóvenes (rango etario 20 a 50 años) con bajo riesgo cardiovascular a corto plazo (puntaje estimado por FRS 10 D menor al 10%) encontrando una prevalencia de CAC en varones del 13,4% (CARDIA) y 26,3% (MESA) y en mujeres del 4,6% (CARDIA) y 19,1% (MESA) (102). Estos resultados son comparables con los obtenidos en nuestro estudio, realizado sobre un subgrupo de individuos con características similares a este informe, puesto que hallamos una prevalencia de CAC en varones del 17,8% y en mujeres del 1,8%.

En otro estudio, denominado PESA (del inglés *Progression of Early Subclinical Atherosclerosis*), se focalizó la presencia de aterosclerosis subclínica, en diferentes territorios vasculares, en individuos con edades entre 40 a 54 años (103). En nuestro estudio, al analizar un subgrupo etario similar al PESA, encontramos un menor porcentaje de placas carotídeas (6% versus 36% en varones y 14% versus 24% en mujeres), un mayor porcentaje de CAC en

varones (39% versus 25%) y un porcentaje similar de CAC en mujeres (4% versus 5%). Si bien estos estudios incorporaron un número mayor de participantes originarios del hemisferio norte, nuestras tendencias también reflejan la importante prevalencia de la aterosclerosis subclínica en estos grupos etarios.

Por lo tanto, concluimos que los criterios de estratificación de riesgo cardiovascular a través de ecuaciones presentan limitaciones en la clasificación de individuos con aterosclerosis subclínica, siendo no obstante las ecuaciones a horizontes a 30 años las que presentan un mayor valor predictivo negativo de aterosclerosis subclínica en individuos con bajo riesgo. A su vez, la combinación de métodos imagenológicos con factores de riesgo cardiovascular permiten alcanzar un nivel confiable de estratificación de individuos con diferentes riesgos de desarrollar aterosclerosis subclínica.

4.3 Los monocitos y la aterosclerosis.

Los monocitos de sangre periférica cumplen una función clave en las etapas iniciales de la aterosclerosis. Estos leucocitos son un grupo heterogéneo de células que se clasifican en tres subpoblaciones según la expresión en la superficie celular del grupo o *cluster* de diferenciación CD14 y CD16 en: *i*) monocitos clásicos (CD14⁺⁺CD16⁻); *ii*) monocitos intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺); y *iii*) monocitos no clásicos (CD14⁺CD16⁺⁺) (32). Su protagonismo en las etapas fundamentales de la génesis inflamatoria de la aterosclerosis, convierte a los monocitos de sangre periférica en potenciales biomarcadores celulares de esta enfermedad. No obstante, en este trabajo de tesis no se observaron diferencias significativas en los porcentajes ni en los valores absolutos de monocitos totales tanto en los individuos clasificados por GE como en los agrupados por riesgo ecuacional. La distribución de las subpoblaciones monocitarias en todos los individuos enrolados al estudio demostró un franco predominio de monocitos clásicos ($\approx 86\%$) sobre las otras subpoblaciones intermedias ($\approx 6\%$) y no clásicas ($\approx 7\%$). Cuando dicho análisis se efectuó comparativamente entre sexos, se observó que aunque la distribución relativa de las subpoblaciones monocitarias fue similar, los hombres presentaron un recuento absoluto de monocitos en cada subpoblación

mayor respecto a las mujeres. En términos cuantitativos estos hallazgos presentan coincidencias con otros estudios previamente publicados (104-106).

Al analizar el recuento relativo de las subpoblaciones monocitarias en los grupos de riesgo ecuacionales, se observó un menor porcentaje de monocitos no clásicos con un concomitante incremento en el porcentaje de monocitos clásicos en el grupo de bajo riesgo respecto a los otros grupos de riesgo clasificados por FRS 30 L G. En términos del recuento absoluto de las subpoblaciones monocitarias sólo se observó una disminución significativa de monocitos no clásicos en el grupo de bajo riesgo en comparación con los otros grupos de riesgo establecidos por esta misma ecuación. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la cantidad relativa ni absoluta de los monocitos clásicos, no clásicos e intermedios entre los GE de bajo riesgo, intermedio y patológico. Estos hallazgos son coincidentes con los obtenidos en el estudio I LIKE HOME (del inglés *Inflammation, Lipoprotein Metabolism and Kidney Damage in early atherogenesis—The Homburg Evaluation*) el cual analizó un grupo etario similar. Este estudio encontró una correlación positiva entre el recuento de monocitos no clásicos y el índice de masa corporal pero no entre las subpoblaciones monocitarias y el espesor de la íntima media carotídea (107).

En forma similar, otro estudio (*Malmö Diet and Cancer Study*) no observó correlación entre los monocitos clásicos y la extensión basal de la aterosclerosis investigada por ecografía carotídea, pero sí obtuvo una correlación negativa significativa entre el porcentaje de monocitos intermedios y no clásicos y el espesor de la íntima media en la arteria carótida común (108).

Por el contrario, nuestros resultados difieren de un reciente estudio que también investigó la relación de las subpoblaciones monocitarias con la presencia de lesiones ateroscleróticas coronarias, aunque este trabajo investigó una población más añosa, con un mayor riesgo ecuacional estimado por Framingham a 10 años, incluyó pacientes diabéticos, no excluyó pacientes bajo tratamiento farmacológico hipolipemiente y utilizó arteriografía coronaria tomográfica para detectar lesiones ateroscleróticas estenosantes y la presencia de placas coronarias (calcificadas, no calcificadas y mixtas). En esta

investigación el recuento de monocitos clásicos se correlacionó mejor con el score de placas no calcificadas. Similar situación se observó con el recuento de monocitos intermedios y los scores de calcio total, de placas mixtas y de placas calcificadas. Con respecto a la estenosis coronaria severa, sólo el recuento de los monocitos intermedios en su cuartil superior permaneció como predictor independiente (109).

Por lo tanto, los resultados de este trabajo de tesis y de otros estudios, permiten inferir que las mediciones relativas y absolutas de monocitos totales o de sus correspondientes subpoblaciones arrojan resultados que de alguna manera son poco claros y en algunos casos contradictorios, lo cual podría deberse a las diferencias procedimentales utilizadas para estas mediciones así como variaciones sustanciales entre los grupos de estudios. No obstante, en este estudio se deduce que tanto los niveles relativos como absolutos de las subpoblaciones monocitarias no permiten diferenciar a individuos con distinto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

4.4 Biomarcadores expresados en monocitos de sangre periférica de aterosclerosis subclínica.

4.4.1 Expresión Monocitaria de CD36: El receptor *scavenger* CD36 participa en la fisiopatogenia de la aterosclerosis, a través de una incrementada expresión en macrófagos, lo cual media principalmente la activación del proceso inflamatorio, la formación de *foam cells* y la inhibición de la migración macrofágica (110). Sin embargo, también se ha demostrado que la disminución de la expresión de CD36 a nivel de macrófagos se correlaciona con un aumento de los niveles de triglicéridos y quilomicrones remanentes, lo cual produce una reducida utilización y consecuente incremento de depósitos intracelulares de lípidos (111). Por lo tanto, la sobreexpresión como la deficiencia del CD36 pueden favorecer el desarrollo de aterosclerosis (110).

Con respecto a este biomarcador, en el presente trabajo de tesis se demostró una expresión diferencial de CD36 en la superficie celular de las tres subpoblaciones monocitarias, siendo mayor en los monocitos clásicos respecto a las otras dos subpoblaciones. Entre estas dos últimas subpoblaciones CD36 se expresó en mayor medida en monocitos intermedios en comparación a los

monocitos no clásicos. Cuando analizamos el comportamiento del CD36 entre las subpoblaciones monocitarias de los grupos ecuacionales generados por el FRS 30 L G no se detectaron diferencias significativas. A su vez, la expresión monocitaria de CD36 entre los diferentes GE sólo mostró una tendencia de menores valores de expresión en los monocitos no clásicos en el GE de bajo riesgo en relación con los GE intermedio y patológico. En consecuencia, estos resultados no arrojan diferencias estadísticas significativas en la expresión de CD36 monocitario entre individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

Estos hallazgos de CD36 en subpoblaciones monocitarias estuvieron en consonancia con los resultados obtenidos por otros estudios previos (112). Del mismo modo, un subgrupo del estudio *CARE FOR HOME* detectó un menor nivel de expresión de CD36 en los monocitos no clásicos en comparación con los otros dos subtipos monocitarios, en individuos con enfermedad renal crónica y enfermedad cardiovascular (113). Similares resultados obtuvo un estudio que comparó pacientes con enfermedad coronaria estable respecto a individuos saludables (114,115).

4.4.2 Expresión monocitaria de CD11b y CD11c: Las integrinas son glicoproteínas de transmembrana que participan en el proceso de migración monocitaria desde la luz vascular a la capa íntima de la pared vascular, principalmente en las etapas de adhesión firme, locomoción y transmigración endotelial monocitaria. Están compuestas por dos subunidades (α y β), de las cuales una subunidad $\beta 2$ (CD18) al unirse a las cadenas αM (CD11b) y αX (CD11c) genera a las moléculas Mac-1 (CD11b/CD18) y p150/95 (CD11c/CD18) respectivamente (38, 39). La integrina Mac-1 desempeña un rol importante en la etapa de locomoción ligado al ICAM-1. La integrina p150/95 en forma cooperativa con otra $\beta 1$ integrina, el VLA-4, participa en la etapa de adhesión firme monocitaria interaccionando con VCAM-1 (40). Tanto por el rol que cumplen en las etapas de la migración monocitaria como en su capacidad de formar complejos con las integrinas hacen de CD11b y CD11c potenciales biomarcadores de etapa temprana de desarrollo de la aterosclerosis.

En el presente estudio, la expresión en la superficie celular de CD11b mostró ser diferencial entre las tres subpoblaciones monocitarias, siendo mayor en los monocitos clásicos que en las otras dos subpoblaciones, y entre estas dos últimas mostró una mayor expresión en monocitos intermedios que en no clásicos. Cuando se analizó el comportamiento de CD11b entre las subpoblaciones monocitarias de los grupos ecuacionales generados por el FRS 30 L G no se detectaron diferencias significativas. En cuanto al comportamiento de CD11b entre los diferentes GE, sólo se observó una significativa disminución en su expresión en los monocitos intermedios de los individuos agrupados en el GE intermedio en comparación a los otros dos GE, lo cual no tiene importancia clínica al no permitir diferenciar la presencia de la ausencia de lesiones ateroscleróticas. No se encontró diferencias en la expresión de CD11b en monocitos clásicos y no clásicos entre los diferentes GE. Un hallazgo similar de expresión diferencial del CD11b entre las subpoblaciones monocitarias fue reportado por otros estudios con un mayor nivel en monocitos clásicos e intermedios en comparación a los monocitos no clásicos (112,114,116).

En cuanto a la expresión diferencial del CD11c se midió un nivel superior en los monocitos intermedios que en las otras dos subpoblaciones, siendo en estas dos últimas mayor en los monocitos no clásicos que en los clásicos. Del mismo modo, cuando se contrastó la expresión de CD11c en subpoblaciones monocitarias en individuos separados según los grupos ecuacionales generados por FRS 30 L G, se detectó una menor expresión del CD11c en el grupo de riesgo intermedio en relación al grupo de bajo riesgo, alcanzando diferencias estadísticas en los monocitos intermedios y en los monocitos totales, con tendencias decrecientes no significativas en los monocitos no clásicos y clásicos. Finalmente, al examinar la expresión de CD11c en subpoblaciones monocitarias en los individuos que constituyeron los diferentes GE, no se observaron diferencias significativas entre los grupos, con una tendencia, aunque no significativa, de menores medianas en monocitos totales y no clásicos en el GE patológico respecto al GE de bajo riesgo. Esta expresión diferencial del CD11c entre las subpoblaciones monocitarias también fue

reportado por otros estudios, con mayor nivel en monocitos intermedios y no clásicos en comparación a los monocitos clásicos (114-116).

Estos hallazgos en CD11b y CD11c expresados en monocitos de sangre periférica, limitan su rol como biomarcadores precoces de aterosclerosis en esta población etaria estudiada, pues no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles entre individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

En síntesis, en este trabajo de tesis se demostró que los biomarcadores monocitarios CD36, CD11b y CD11c tuvieron niveles diferenciales de expresión entre las subpoblaciones monocitarias, siendo el CD36 y CD11b con mayor expresión en monocitos clásicos, mientras que el CD11c presentó una mayor expresión en los monocitos intermedios (tabla 31).

TABLA 31. Expresión diferencial de los biomarcadores CD36, CD11b y CD11c en subpoblaciones monocitarias.

Biomarcadores monocitarios	Subpoblación monocitaria clásica	Subpoblación monocitaria intermedia	Subpoblación monocitaria no clásica
CD36	+++	++	+
CD11b	+++	++	+
CD11c	+	+++	++

+ representa una unidad arbitraria del nivel de expresión del biomarcador monocitario

Sin embargo, al analizar la expresión de estos biomarcadores en las subpoblaciones monocitarias de individuos agrupados en los diferentes GE, originados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica, no se observaron diferencias significativas entre el GE de bajo riesgo y el GE patológico.

4.5 LRP1 en la aterosclerosis

El LRP1 es un receptor que se expresa en diferentes células y tiene la capacidad de reconocer un alto número de ligandos (alrededor de 40) y desempeñar funciones de endocitosis y transducción de señal intracelular (117). El LRP1 participa en la captación hepática de lipoproteínas remanentes enriquecidas en ApoE, sobresaliendo los quilomicrones remanentes y las β

VLDL enriquecidas en ApoE (7). Tanto en estudios realizados en macrófagos como en células musculares lisas vasculares humanas el LRP1 participa en la captación de las LDL agregadas y la posterior generación de *foam cells* (63,118). El LRP1 interacciona con el receptor de insulina, regulando así su señalización intracelular que corriente abajo promueve la captación extracelular de glucosa (119). Esta capacidad de regular la actividad de la homeostasis de glucosa a través del receptor de insulina es mediada a su vez por la translocación del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática celular, el cual es el principal mecanismo dependiente de insulina para la captación y metabolismo de glucosa en células musculares y adipocitos (120). Esta participación del LRP1 en el metabolismo de las lipoproteínas y en la homeostasis de la glucemia lo relacionan con la fisiopatogenia del síndrome metabólico, un importante factor de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis (121).

El LRP1 modula la migración de diversas células al interactuar con distintos ligandos y receptores celulares, como sucede con el sistema uPA/uPAR (83), con PDGF/PDGF-R1 y con su ligando ApoE (66). LRP1 induce la migración celular en modo mesenquimal en líneas celulares derivadas de macrófagos (87) y a través de la activación del receptor del PDGF y TGF β colabora activamente en diversos mecanismos que preservan la integridad de la pared vascular (74,76). En referencia a la relación de LRP1 con la aterosclerosis, se ha establecido que este receptor se expresa abundantemente en la lesión aterosclerótica, tanto a nivel de células musculares lisas y macrófagos como en las propias *foam cells* (63,74,76,122). Recientemente se ha informado que la pérdida de LRP1 a nivel de macrófagos constituye un mecanismo de activación de la inflamación puesto que induce una marcada expresión de diversos factores proinflamatorios, tales como TNF- α e Interleucina 1- β , entre otros (91). Estos estudios, en su conjunto constituyen evidencias directas sobre la participación de LRP1 en el desarrollo de la aterosclerosis, aunque su rol como protector o inductor de la patología es aún incierto. A pesar de que se han publicado múltiples trabajos que estudiaron al LRP1 y su expresión y funcionalidad en diversas células y su relación con la aterosclerosis, poco se conoce sobre su participación en los monocitos de sangre periférica. Nuestro

grupo de trabajo demostró que el LRP1 se expresa en forma preferencial en los monocitos en relación a las otras subpoblaciones leucocitarias de sangre periférica (neutrófilos y linfocitos), lo cual lo posicionó como un tercer marcador de identificación monocitaria, junto a los marcadores CD86 y HLA-DR. En ese artículo, también demostramos que la expresión de la superficie celular de LRP1 representa solamente el 20% del contenido celular total en cada subpoblación de monocitos. Además establecimos la variación biológica dentro del individuo de las subpoblaciones de monocitos circulantes en donantes sanos, obteniendo valores de 21%, 20% y 17% para monocitos no clásicos, intermedios y clásicos, respectivamente. También se obtuvieron valores similares de variación biológica para LRP1 medidos en cada subpoblación de monocitos, lo que sugiere que su variabilidad está influenciada principalmente por la variación biológica intrínseca de los monocitos circulantes (46).

4.6 Expresión monocitaria de LRP1.

En el presente trabajo de tesis se demostró que el LRP1 tuvo una expresión diferencial en la superficie celular de las subpoblaciones de monocitos en la totalidad de los individuos enrolados a este estudio, siendo superior en los monocitos clásicos e intermedios respecto a lo acontecido en monocitos no clásicos. Dicha expresión monocitaria de LRP1 no mostró diferencias significativas al comparar entre sexos. De manera similar, al comparar los valores de LRP1 de cada subpoblación monocitaria con los diferentes grupos surgidos de las ecuaciones de riesgo cardiovascular FRS 30 L G y FRS 30 L D no se revelaron diferencias estadísticamente significativas. Por el contrario, se detectaron cambios significativos en los valores de expresión de LRP1 en cada subpoblación monocitaria según los GE generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica. En esta comparación se observó que LRP1 experimentó una disminución significativa en su expresión en monocitos totales de sangre periférica en individuos integrantes del GE patológico e intermedio respecto a los de bajo riesgo. Al analizar esta expresión en las subpoblaciones se encontró que esta pérdida de LRP1 en individuos con aterosclerosis subclínica fue más significativa en monocitos clásicos comparado con las otras subpoblaciones monocitarias. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de LRP1 en cada

subpoblación monocitaria entre los GE intermedio y patológico, lo cual podría deberse a que el GE intermedio esté conformado por individuos con diferente riesgo potencial de desarrollar aterosclerosis subclínica (tabla 32).

TABLA 32. Expresión diferencial del biomarcador LRP1 en las subpoblaciones monocitarias según los grupos de estudio generados por la presencia de factores de riesgo y de aterosclerosis subclínica.

Biomarcador según subpoblaciones monocitarias	Grupo de estudio: bajo riesgo	Grupo de estudio: intermedio	Grupo de estudio: patológico
LRP1 / monocitos clásicos	+++	++	+
LRP1 / monocitos intermedios	++++	+++	+++
LRP1 / monocitos no clásicos	++	+	+
LRP1 / monocitos totales	+++	++	++

+ representa una unidad arbitraria del nivel de expresión del biomarcador monocitario

Estos hallazgos posicionan al LRP1 como un biomarcador temprano de aterosclerosis subclínica, demostrando un comportamiento diferencial no sólo entre las subpoblaciones monocitarias, también en los monocitos de sangre periférica de individuos con distintos riesgos de desarrollar enfermedad cardiovascular aterosclerótica.

4.7 Conclusiones.

Considerando la totalidad de los hallazgos de este trabajo de tesis, la conclusión central es que el LRP1 monocitario se posiciona como un biomarcador temprano de aterosclerosis subclínica, con una expresión disminuída en monocitos de sangre periférica en individuos con lesiones ateroscleróticas detectadas por imágenes, lo cual se asocia con otros factores de riesgo de ECV. En este sentido, la disminución de LRP1 correlacionó de manera negativa con los niveles plasmáticos de colesterol LDL y triglicéridos y en forma positiva con colesterol HDL. Estas correlaciones son congruentes con la fisiopatogenia de la aterosclerosis y con los resultados de esta tesis: mayores valores de colesterol LDL, menores valores de colesterol HDL y menor expresión de LRP1 monocitario entre los individuos del GE patológico en relación a los individuos del GE de bajo riesgo. Finalmente, estos cambios de expresión de LRP1 monocitario se produjeron en ausencia de

modificaciones de otros biomarcadores celulares en monocitos, tales son los casos de CD11b, CD11c y CD36, los cuales tienen una activa participación en el desarrollo y formación de la placa ateromatosa.

Este comportamiento diferencial de LRP1 fue evidente entre los individuos del GE de bajo riesgo y los del GE patológico, en contraste a lo observado en los individuos del GE intermedio. En este último grupo, el LRP1 monocitario presentó una gran dispersión de valores, superponiéndose con los intervalos determinados para los otros dos GE. De este modo, surge la necesidad de establecer nuevas estrategias experimentales de estudio que permitan de manera longitudinal establecer la aparición o no de enfermedad aterosclerótica en función de la expresión inicial de LRP1 monocitario. En este sentido, hipotetizamos que individuos del GE intermedio con baja expresión de LRP1 desarrollarían aterosclerosis subclínica detectada por imágenes en un tiempo menor que aquellos individuos con elevada expresión inicial de LRP1.

4.8. Perspectivas.

Esta hipótesis se fundamenta en la premisa de que el descenso de la expresión de LRP1 monocitario sería anterior cronológicamente a la aparición en imágenes de lesiones ateroscleróticas. En la práctica clínica, si se confirma que el descenso de la expresión de LRP1 posiciona en un grupo de mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis, en estos individuos se podría iniciar medidas terapéuticas preventivas en etapas más precoces. En esta línea de investigación, sería posible desarrollar un algoritmo de tamizaje y manejo de aterosclerosis subclínica aplicable en la consulta ambulatoria médica, enfocado a un diagnóstico precoz para anticipar las medidas de prevención higiénico-dietéticas y farmacológicas, con un uso racional de recursos tecnológicos y económicos. En primer lugar, uno debería estimar el riesgo de eventos cardiovasculares duros utilizando la ecuación de Framingham a 30 años basada en lípidos (FRS 30 L D), pero con valores de cortes de grupos ecuacionales adaptados a nuestro medio, surgidos de la aplicación del índice de Youden en la base de datos generados por esta tesis y recientemente publicada en una revista internacional con referato (123). A partir de estos cálculos, en lugar de las cifras 12/40 para definir los grupos ecuacionales de

bajo, intermedio y alto riesgos, utilizaríamos 9/40, es decir, <9 pertenece al grupo de bajo riesgo, de 9 a 40 al grupo de riesgo intermedio y >40 al grupo de alto riesgo. Estas nuevas cifras permitirían mejorar en nuestra población estudiada el valor predictivo negativo para tamizaje de aterosclerosis subclínica de los grupos ecuacionales de bajo riesgo surgidos de FRS 30 L D y de FRS 30 L D adaptada de un 85,6% a un 95,7% respectivamente. De esta manera, se podría evitar la solicitud de métodos imagenológicos para tamizaje de aterosclerosis subclínica en el 45,4% de nuestra población investigada de adultos no mayores, con un ahorro significativo de recursos (Tabla 33).

TABLA 33. Estratificación de las ecuaciones de riesgo cardiovascular a 30 años versus aterosclerosis subclínica.

Ecuaciones de riesgo y sus subgrupos		Ausencia de aterosclerosis subclínica	Presencia de aterosclerosis subclínica
FRS 30 L D	Bajo riesgo n (%)	107 (85,6%)	18 (14,4%)
	Riesgo intermedio n (%)	37 (40,2%)	55 (59,8%)
	Alto riesgo n (%)	1 (10%)	9 (90%)
FRS 30 L D a	Bajo riesgo n (%)	89 (95,7%)	4 (4,3%)
	Riesgo intermedio n (%)	55 (44,4%)	69 (55,6%)
	Alto riesgo n (%)	1 (10%)	9 (90%)

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); FRS 30 L D: ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos; FRS 30 L D a: ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos versión adaptada. Datos surgidos de la publicación Albertini RA y col. (123).

En un segundo paso, en aquellos que clasifiquen como riesgo intermedio ecuacional, se solicitaría en base al sexo de este grupo etario una ecografía carotídea (sexo femenino) o los dos métodos imagenológicos (ecografía carotídea y tomografía coronaria, sexo masculino) en búsqueda de aterosclerosis subclínica. Y por último, si no se detectaron lesiones ateroscleróticas por imágenes, uno realizaría un análisis para determinar la expresión de LRP1 en monocitos de sangre periférica por citometría de flujo. En aquellos individuos que se detecte una expresión disminuída de este biomarcador, se podría instaurar medidas preventivas, en el caso que el estudio de investigación confirme que una expresión disminuída de LRP1 monocitario antecede a la aparición de lesiones ateroscleróticas visibles por imágenes (Figura 21).

Por lo tanto, proponemos que niveles disminuídos de LRP1 en monocitos de sangre periférica constituyen un factor de riesgo de desarrollo de aterosclerosis y ECV.

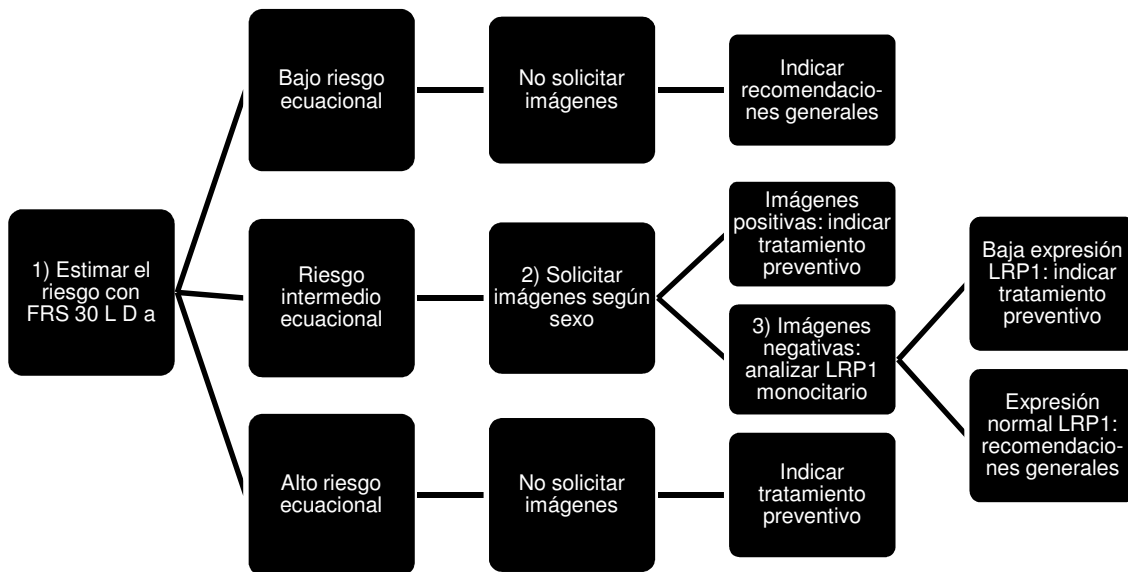


FIGURA 21. Algoritmo propuesto de tamizaje y manejo de aterosclerosis subclínica en individuos adultos no mayores.

FRS: Escore de riesgo de Framingham (del inglés *Framingham risk score*); **FRS 30 L D a:** ecuación de riesgo para eventos cardiovasculares duros a 30 años según lípidos adaptada.

5. REFERENCIAS

1. Herrington, W., Lacey, B., Sherliker, P., Armitage, J., and Lewington, S. (2016) Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease. *Circ Res* **118**, 535-546
2. Benjamin, E. J., Blaha, M. J., Chiuve, S. E., Cushman, M., Das, S. R., Deo, R., de Ferranti, S. D., Floyd, J., Fornage, M., Gillespie, C., Isasi, C. R., Jimenez, M. C., Jordan, L. C., Judd, S. E., Lackland, D., Lichtman, J. H., Lisabeth, L., Liu, S., Longenecker, C. T., Mackey, R. H., Matsushita, K., Mozaffarian, D., Mussolino, M. E., Nasir, K., Neumar, R. W., Palaniappan, L., Pandey, D. K., Thiagarajan, R. R., Reeves, M. J., Ritchey, M., Rodriguez, C. J., Roth, G. A., Rosamond, W. D., Sasson, C., Towfighi, A., Tsao, C. W., Turner, M. B., Virani, S. S., Voeks, J. H., Willey, J. Z., Wilkins, J. T., Wu, J. H., Alger, H. M., Wong, S. S., Muntner, P., American Heart Association Statistics, C., and Stroke Statistics, S. (2017) Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e146-e603
3. Collaborators, G. B. D. C. o. D. (2017) Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* **390**, 1151-1210
4. Beswick, A. D., Brindle, P., Fahey, T., and Ebrahim, S. (2008). in *A Systematic Review of Risk Scoring Methods and Clinical Decision Aids Used in the Primary Prevention of Coronary Heart Disease (Supplement)*, London. pp
5. Libby, P., and Hansson, G. K. (2015) Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res* **116**, 307-311
6. Rohlmann, A., Gotthardt, M., Hammer, R. E., and Herz, J. (1998) Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest* **101**, 689-695
7. Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K. K. (1989) The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* **341**, 162-164
8. Meir, K. S., and Leitersdorf, E. (2004) Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1006-1014
9. Collado, A. P.-A., L.; Escudero, P.; Piqueras, L.; Blanes, J. I.; Sanza, M. J. (2015) El ratón deficiente en apolipoproteína E, un modelo traslacional para el estudio de la aterosclerosis. *Angiología* **67**, 10
10. Simionescu, N., Vasile, E., Lupu, F., Popescu, G., and Simionescu, M. (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* **123**, 109-125
11. Gimbrone, M. A., Jr., and Garcia-Cardena, G. (2016) Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res* **118**, 620-636
12. Woollard, K. J., and Geissmann, F. (2010) Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* **7**, 77-86
13. Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* **340**, 115-126
14. D'Agostino, R. B., Sr., Vasan, R. S., Pencina, M. J., Wolf, P. A., Cobain, M., Massaro, J. M., and Kannel, W. B. (2008) General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation* **117**, 743-753
15. Pencina, M. J., D'Agostino, R. B., Sr., Larson, M. G., Massaro, J. M., and Vasan, R. S. (2009) Predicting the 30-year risk of cardiovascular disease: the framingham heart study. *Circulation* **119**, 3078-3084
16. Expert Panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in, A. (2001) Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education

- Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* **285**, 2486-2497
17. Goff, D. C., Jr., Lloyd-Jones, D. M., Bennett, G., Coady, S., D'Agostino, R. B., Sr., Gibbons, R., Greenland, P., Lackland, D. T., Levy, D., O'Donnell, C. J., Robinson, J. G., Schwartz, J. S., Shero, S. T., Smith, S. C., Jr., Sorlie, P., Stone, N. J., Wilson, P. W., and American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice, G. (2014) 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* **63**, 2935-2959
 18. Akosah, K. O., Schaper, A., Cogbill, C., and Schoenfeld, P. (2003) Preventing myocardial infarction in the young adult in the first place: how do the National Cholesterol Education Panel III guidelines perform? *Journal of the American College of Cardiology* **41**, 1475-1479
 19. Khot, U. N., Khot, M. B., Bajzer, C. T., Sapp, S. K., Ohman, E. M., Brener, S. J., Ellis, S. G., Lincoff, A. M., and Topol, E. J. (2003) Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* **290**, 898-904
 20. Polak, J. F., Pencina, M. J., Pencina, K. M., O'Donnell, C. J., Wolf, P. A., and D'Agostino, R. B., Sr. (2011) Carotid-wall intima-media thickness and cardiovascular events. *N Engl J Med* **365**, 213-221
 21. Hecht, H. S. (2015) Coronary artery calcium scanning: past, present, and future. *JACC. Cardiovascular imaging* **8**, 579-596
 22. Naqvi, T. Z., and Lee, M. S. (2014) Carotid intima-media thickness and plaque in cardiovascular risk assessment. *JACC. Cardiovascular imaging* **7**, 1025-1038
 23. Chambless, L. E., Heiss, G., Folsom, A. R., Rosamond, W., Szklo, M., Sharrett, A. R., and Clegg, L. X. (1997) Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *American journal of epidemiology* **146**, 483-494
 24. Bots, M. L., Hoes, A. W., Koudstaal, P. J., Hofman, A., and Grobbee, D. E. (1997) Common carotid intima-media thickness and risk of stroke and myocardial infarction: the Rotterdam Study. *Circulation* **96**, 1432-1437
 25. Mathiesen, E. B., Johnsen, S. H., Wilsgaard, T., Bonna, K. H., Lochen, M. L., and Njolstad, I. (2011) Carotid plaque area and intima-media thickness in prediction of first-ever ischemic stroke: a 10-year follow-up of 6584 men and women: the Tromso Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **42**, 972-978
 26. Johnsen, S. H., Mathiesen, E. B., Joakimsen, O., Stensland, E., Wilsgaard, T., Lochen, M. L., Njolstad, I., and Arnesen, E. (2007) Carotid atherosclerosis is a stronger predictor of myocardial infarction in women than in men: a 6-year follow-up study of 6226 persons: the Tromso Study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **38**, 2873-2880
 27. Nambi, V., Chambless, L., Folsom, A. R., He, M., Hu, Y., Mosley, T., Volcik, K., Boerwinkle, E., and Ballantyne, C. M. (2010) Carotid intima-media thickness and presence or absence of plaque improves prediction of coronary heart disease risk: the ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities) study. *J Am Coll Cardiol* **55**, 1600-1607
 28. Agatston, A. S., Janowitz, W. R., Hildner, F. J., Zusmer, N. R., Viamonte, M., Jr., and Detrano, R. (1990) Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *Journal of the American College of Cardiology* **15**, 827-832
 29. Arad, Y., Goodman, K. J., Roth, M., Newstein, D., and Guerci, A. D. (2005) Coronary calcification, coronary disease risk factors, C-reactive protein, and atherosclerotic cardiovascular disease events: the St. Francis Heart Study. *Journal of the American College of Cardiology* **46**, 158-165
 30. Gibson, A. O., Blaha, M. J., Arnan, M. K., Sacco, R. L., Szklo, M., Herrington, D. M., and Yeboah, J. (2014) Coronary artery calcium and incident cerebrovascular events in an asymptomatic cohort. The MESA Study. *JACC. Cardiovascular imaging* **7**, 1108-1115

31. Yeboah, J., McClelland, R. L., Polonsky, T. S., Burke, G. L., Sibley, C. T., O'Leary, D., Carr, J. J., Goff, D. C., Greenland, P., and Herrington, D. M. (2012) Comparison of novel risk markers for improvement in cardiovascular risk assessment in intermediate-risk individuals. *JAMA* **308**, 788-795
32. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y. J., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., and Lutz, M. B. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* **116**, e74-80
33. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X. F., and Wang, H. (2014) Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomarker research* **2**, 1
34. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Schirmer, S. H., Sester, M., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012) Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* **217**, 1273-1284
35. Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., and Orekhov, A. N. (2017) Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *Journal of molecular medicine*
36. Febbraio, M., Hajjar, D. P., and Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* **108**, 785-791
37. Choromanska, B., Mysliwiec, P., Choromanska, K., Dadan, J., and Chabowski, A. (2017) The role of CD36 receptor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Advances in clinical and experimental medicine : official organ Wroclaw Medical University*
38. Febbraio, M., Podrez, E. A., Smith, J. D., Hajjar, D. P., Hazen, S. L., Hoff, H. F., Sharma, K., and Silverstein, R. L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest* **105**, 1049-1056
39. Park, Y. M., Febbraio, M., and Silverstein, R. L. (2009) CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest* **119**, 136-145
40. Finney, A. C., Stokes, K. Y., Pattillo, C. B., and Orr, A. W. (2017) Integrin signaling in atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci* **74**, 2263-2282
41. Barreiro, O., and Sanchez-Madrid, F. (2009) Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Revista espanola de cardiologia* **62**, 552-562
42. Sadhu, C., Ting, H. J., Lipsky, B., Hensley, K., Garcia-Martinez, L. F., Simon, S. I., and Staunton, D. E. (2007) CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *J Leukoc Biol* **81**, 1395-1403
43. Wu, H., Gower, R. M., Wang, H., Perrard, X. Y., Ma, R., Bullard, D. C., Burns, A. R., Paul, A., Smith, C. W., Simon, S. I., and Ballantyne, C. M. (2009) Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* **119**, 2708-2717
44. Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E., and Strickland, D. K. (2008) LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *Physiol Rev* **88**, 887-918
45. Boucher, P., and Herz, J. (2011) Signaling through LRP1: Protection from atherosclerosis and beyond. *Biochem Pharmacol* **81**, 1-5
46. Ferrer, D. G., Jaldin-Fincati, J. R., Amigone, J. L., Capra, R. H., Collino, C. J., Albertini, R. A., and Chiabrando, G. A. (2014) Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **85**, 601-610

47. Herz, J., Kowal, R. C., Goldstein, J. L., and Brown, M. S. (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J* **9**, 1769-1776
48. Herz, J., and Strickland, D. K. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784
49. Uhlik, M. T., Temple, B., Bencharit, S., Kimple, A. J., Siderovski, D. P., and Johnson, G. L. (2005) Structural and evolutionary division of phosphotyrosine binding (PTB) domains. *J Mol Biol* **345**, 1-20
50. Michalska, M., and Wolf, P. (2015) Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Frontiers in microbiology* **6**, 963
51. Laatsch, A., Panteli, M., Sornsakrin, M., Hoffzimmer, B., Grewal, T., and Heeren, J. (2012) Low density lipoprotein receptor-related protein 1 dependent endosomal trapping and recycling of apolipoprotein E. *PLoS One* **7**, e29385
52. Trommsdorff, M., Gotthardt, M., Hiesberger, T., Shelton, J., Stockinger, W., Nimpf, J., Hammer, R. E., Richardson, J. A., and Herz, J. (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. *Cell* **97**, 689-701
53. Trommsdorff, M., Borg, J. P., Margolis, B., and Herz, J. (1998) Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**, 33556-33560
54. Rehman, A. A., Ahsan, H., and Khan, F. H. (2013) alpha-2-Macroglobulin: a physiological guardian. *J Cell Physiol* **228**, 1665-1675
55. van Leuven, F. (1984) Human alpha 2 macroglobulin. *Mol Cell Biochem* **58**, 121-128
56. Kounnas, M. Z., Church, F. C., Argraves, W. S., and Strickland, D. K. (1996) Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* **271**, 6523-6529
57. Herz, J., Clouthier, D. E., and Hammer, R. E. (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **71**, 411-421
58. Herz, J., Couthier, D. E., and Hammer, R. E. (1993) Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell* **73**, 428
59. Kowal, R. C., Herz, J., Goldstein, J. L., Esser, V., and Brown, M. S. (1989) Low density lipoprotein receptor-related protein mediates uptake of cholesteryl esters derived from apoprotein E-enriched lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5810-5814
60. Chappell, D. A., Fry, G. L., Waknitz, M. A., Muhonen, L. E., Pladet, M. W., Iverius, P. H., and Strickland, D. K. (1993) Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans. *J Biol Chem* **268**, 14168-14175
61. Willnow, T. E., Sheng, Z., Ishibashi, S., and Herz, J. (1994) Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science* **264**, 1471-1474
62. Field, P. A., and Gibbons, G. F. (2000) Decreased hepatic expression of the low-density lipoprotein (LDL) receptor and LDL receptor-related protein in aging rats is associated with delayed clearance of chylomicrons from the circulation. *Metabolism: clinical and experimental* **49**, 492-498
63. Llorente-Cortes, V., Royo, T., Otero-Vinas, M., Berrozpe, M., and Badimon, L. (2007) Sterol regulatory element binding proteins downregulate LDL receptor-related protein (LRP1) expression and LRP1-mediated aggregated LDL uptake by human macrophages. *Cardiovasc Res* **74**, 526-536

64. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Camino-Lopez, S., Costales, P., and Badimon, L. (2006) Cholesteryl esters of aggregated LDL are internalized by selective uptake in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 117-123
65. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Berrozpe, M., and Badimon, L. (2004) Intracellular lipid accumulation, low-density lipoprotein receptor-related protein expression, and cell survival in vascular smooth muscle cells derived from normal and atherosclerotic human coronaries. *European journal of clinical investigation* **34**, 182-190
66. Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Sanchez, S., Rodriguez, C., and Badimon, L. (2002) Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* **106**, 3104-3110
67. Xu, W., Takahashi, Y., Sakashita, T., Iwasaki, T., Hattori, H., and Yoshimoto, T. (2001) Low density lipoprotein receptor-related protein is required for macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by 12/15-lipoxygenase. *J Biol Chem* **276**, 36454-36459
68. Zhu, H., Takahashi, Y., Xu, W., Kawajiri, H., Murakami, T., Yamamoto, M., Iseki, S., Iwasaki, T., Hattori, H., and Yoshimoto, T. (2003) Low density lipoprotein receptor-related protein-mediated membrane translocation of 12/15-lipoxygenase is required for oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *J Biol Chem* **278**, 13350-13355
69. Espirito Santo, S. M., Pires, N. M., Boesten, L. S., Gerritsen, G., Bovenschen, N., van Dijk, K. W., Jukema, J. W., Princen, H. M., Bensadoun, A., Li, W. P., Herz, J., Havekes, L. M., and van Vlijmen, B. J. (2004) Hepatic low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency in mice increases atherosclerosis independent of plasma cholesterol. *Blood* **103**, 3777-3782
70. Yancey, P. G., Ding, Y., Fan, D., Blakemore, J. L., Zhang, Y., Ding, L., Zhang, J., Linton, M. F., and Fazio, S. (2011) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 prevents early atherosclerosis by limiting lesional apoptosis and inflammatory Ly-6Chigh monocytosis: evidence that the effects are not apolipoprotein E dependent. *Circulation* **124**, 454-464
71. Overton, C. D., Yancey, P. G., Major, A. S., Linton, M. F., and Fazio, S. (2007) Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse. *Circ Res* **100**, 670-677
72. Hu, L., Boesten, L. S., May, P., Herz, J., Bovenschen, N., Huisman, M. V., Berbee, J. F., Havekes, L. M., van Vlijmen, B. J., and Tamsma, J. T. (2006) Macrophage low-density lipoprotein receptor-related protein deficiency enhances atherosclerosis in ApoE/LDLR double knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 2710-2715
73. Loukinova, E., Ranganathan, S., Kuznetsov, S., Gorlatova, N., Migliorini, M. M., Loukinov, D., Ulery, P. G., Mikhailenko, I., Lawrence, D. A., and Strickland, D. K. (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced tyrosine phosphorylation of the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). Evidence for integrated co-receptor function between LRP and the PDGF. *J Biol Chem* **277**, 15499-15506
74. Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W. P., Anderson, R. G., and Herz, J. (2003) LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science* **300**, 329-332
75. Byfield, S. D., and Roberts, A. B. (2004) Lateral signaling enhances TGF-beta response complexity. *Trends Cell Biol* **14**, 107-111
76. Boucher, P., Li, W. P., Matz, R. L., Takayama, Y., Auwerx, J., Anderson, R. G., and Herz, J. (2007) LRP1 functions as an atheroprotective integrator of TGFbeta and PDGF signals in the vascular wall: implications for Marfan syndrome. *PLoS ONE* **2**, e448
77. Friedl, P. (2004) Preshaping and plasticity: shifting mechanisms of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 14-23

78. Friedl, P., and Wolf, K. (2010) Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J Cell Biol* **188**, 11-19
79. Sadok, A., and Marshall, C. J. (2014) Rho GTPases: masters of cell migration. *Small GTPases* **5**, e29710
80. Reig, G., Pulgar, E., and Concha, M. L. (2014) Cell migration: from tissue culture to embryos. *Development* **141**, 1999-2013
81. Cao, C., Lawrence, D. A., Li, Y., Von Arnim, C. A., Herz, J., Su, E. J., Makarova, A., Hyman, B. T., Strickland, D. K., and Zhang, L. (2006) Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. *EMBO J* **25**, 1860-1870
82. Bujo, H., and Saito, Y. (2006) Modulation of smooth muscle cell migration by members of the low-density lipoprotein receptor family. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 1246-1252
83. Weaver, A. M., Hussaini, I. M., Mazar, A., Henkin, J., and Gonias, S. L. (1997) Embryonic fibroblasts that are genetically deficient in low density lipoprotein receptor-related protein demonstrate increased activity of the urokinase receptor system and accelerated migration on vitronectin. *J Biol Chem* **272**, 14372-14379
84. Nykjaer, A., Kjoller, L., Cohen, R. L., Lawrence, D. A., Garni-Wagner, B. A., Todd, R. F., 3rd, van Zonneveld, A. J., Gliemann, J., and Andreasen, P. A. (1994) Regions involved in binding of urokinase-type-1 inhibitor complex and pro-urokinase to the endocytic alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Evidence that the urokinase receptor protects pro-urokinase against binding to the endocytic receptor. *J Biol Chem* **269**, 25668-25676
85. Gonias, S. L., Gaultier, A., and Jo, M. (2011) Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1). *Current pharmaceutical design* **17**, 1962-1969
86. Kozlova, N., Jensen, J. K., Chi, T. F., Samoylenko, A., and Kietzmann, T. (2015) PAI-1 modulates cell migration in a LRP1-dependent manner via beta-catenin and ERK1/2. *Thromb Haemost* **113**, 988-998
87. Ferrer, D. G., Dato, V. A., Fincati, J. R. J., Lorenc, V. E., Sanchez, M. C., and Chiabrand, G. A. (2017) Activated alpha2 -Macroglobulin Induces Mesenchymal Cellular Migration Of Raw264.7 Cells Through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1. *J Cell Biochem* **118**, 1810-1818
88. Caceres, L. C., Bonacci, G. R., Sanchez, M. C., and Chiabrand, G. A. (2010) Activated alpha(2) macroglobulin induces matrix metalloproteinase 9 expression by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 through MAPK-ERK1/2 and NF-kappaB activation in macrophage-derived cell lines. *J Cell Biochem* **111**, 607-617
89. Rabiej, V. K., Pflanzner, T., Wagner, T., Goetze, K., Storck, S. E., Eble, J. A., Weggen, S., Mueller-Klieser, W., and Pietrzik, C. U. (2016) Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediated endocytosis of beta1-integrin influences cell adhesion and cell migration. *Exp Cell Res* **340**, 102-115
90. Ferrer, D. G., Actis Dato, V., Jaldin Fincati, J. R., Lorenc, V. E., Sanchez, M. C., and Chiabrand, G. A. (2016) Activated alpha2 -Macroglobulin Induces Mesenchymal Cellular Migration of Raw264.7 Cells through Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1. *J Cell Biochem*
91. Mantuano, E., Brifault, C., Lam, M. S., Azmoon, P., Gilder, A. S., and Gonias, S. L. (2016) LDL receptor-related protein-1 regulates NFkappaB and microRNA-155 in macrophages to control the inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 1369-1374
92. Alberti, K. G., Eckel, R. H., Grundy, S. M., Zimmet, P. Z., Cleeman, J. I., Donato, K. A., Fruchart, J. C., James, W. P., Loria, C. M., Smith, S. C., Jr., International Diabetes Federation Task Force on, E., Prevention, National Heart, L., Blood, I., American Heart, A., World Heart, F., International Atherosclerosis, S., and International Association for

- the Study of, O. (2009) Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640-1645
93. (1998) Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* **6 Suppl 2**, 51S-209S
 94. Li, R., Duncan, B. B., Metcalf, P. A., Crouse, J. R., 3rd, Sharrett, A. R., Tyroler, H. A., Barnes, R., and Heiss, G. (1994) B-mode-detected carotid artery plaque in a general population. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **25**, 2377-2383
 95. Batsis, J. A., and Lopez-Jimenez, F. (2010) Cardiovascular risk assessment--from individual risk prediction to estimation of global risk and change in risk in the population. *BMC Med* **8**, 29
 96. Cortes-Bergoderi, M., Thomas, R. J., Albuquerque, F. N., Batsis, J. A., Burdiat, G., Perez-Terzic, C., Trejo-Gutierrez, J., and Lopez-Jimenez, F. (2012) Validity of cardiovascular risk prediction models in Latin America and among Hispanics in the United States of America: a systematic review. *Rev Panam Salud Publica* **32**, 131-139
 97. Go, A. S., Mozaffarian, D., Roger, V. L., Benjamin, E. J., Berry, J. D., Borden, W. B., Bravata, D. M., Dai, S., Ford, E. S., Fox, C. S., Franco, S., Fullerton, H. J., Gillespie, C., Hailpern, S. M., Heit, J. A., Howard, V. J., Huffman, M. D., Kissela, B. M., Kittner, S. J., Lackland, D. T., Lichtman, J. H., Lisabeth, L. D., Magid, D., Marcus, G. M., Marelli, A., Matchar, D. B., McGuire, D. K., Mohler, E. R., Moy, C. S., Mussolino, M. E., Nichol, G., Paynter, N. P., Schreiner, P. J., Sorlie, P. D., Stein, J., Turan, T. N., Virani, S. S., Wong, N. D., Woo, D., Turner, M. B., American Heart Association Statistics, C., and Stroke Statistics, S. (2013) Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **127**, e6-e245
 98. Jimenez-Corona, A., Lopez-Ridaura, R., Williams, K., Gonzalez-Villalpando, M. E., Simon, J., and Gonzalez-Villalpando, C. (2009) Applicability of Framingham risk equations for studying a low-income Mexican population. *Salud Publica Mex* **51**, 298-305
 99. Karim, R., Hodis, H. N., Detrano, R., Liu, C. R., Liu, C. H., and Mack, W. J. (2008) Relation of Framingham risk score to subclinical atherosclerosis evaluated across three arterial sites. *The American journal of cardiology* **102**, 825-830
 100. Laing, S. T., Smulevitz, B., Vatcheva, K. P., Rentfro, A. R., McPherson, D. D., Fisher-Hoch, S. P., and McCormick, J. B. (2012) High prevalence of subclinical atherosclerosis by carotid ultrasound among Mexican Americans: discordance with 10-year risk assessment using the Framingham risk score. *Echocardiography* **29**, 1224-1232
 101. Arturo, M. W. S. D. K. J. C. (2011) Función de Framingham a 30 años basada en el índice de masa corporal. Utilidad en la estratificación del riesgo cardiovascular y en el diagnóstico de placa aterosclerótica carotídea. *Rev Argent Cardiol* **79**, 514-520.
 102. Berry, J. D., Liu, K., Folsom, A. R., Lewis, C. E., Carr, J. J., Polak, J. F., Shea, S., Sidney, S., O'Leary, D. H., Chan, C., and Lloyd-Jones, D. M. (2009) Prevalence and progression of subclinical atherosclerosis in younger adults with low short-term but high lifetime estimated risk for cardiovascular disease: the coronary artery risk development in young adults study and multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circulation* **119**, 382-389
 103. Fernandez-Friera, L., Penalvo, J. L., Fernandez-Ortiz, A., Ibanez, B., Lopez-Melgar, B., Laclaustra, M., Oliva, B., Mocoroa, A., Mendiguren, J., Martinez de Vega, V., Garcia, L., Molina, J., Sanchez-Gonzalez, J., Guzman, G., Alonso-Farto, J. C., Guallar, E., Civeira, F., Sillesen, H., Pocock, S., Ordovas, J. M., Sanz, G., Jimenez-Borreguero, L. J., and Fuster, V. (2015) Prevalence, Vascular Distribution, and Multiterritorial Extent of Subclinical

- Atherosclerosis in a Middle-Aged Cohort: The PESA (Progression of Early Subclinical Atherosclerosis) Study. *Circulation* **131**, 2104-2113
104. Gratchev, A., Sobenin, I., Orekhov, A., and Kzhyshkowska, J. (2012) Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology* **217**, 476-482
 105. Zawada, A. M., Rogacev, K. S., Schirmer, S. H., Sester, M., Bohm, M., Fliser, D., and Heine, G. H. (2012) Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology*
 106. Wong, K. L., Yeap, W. H., Tai, J. J., Ong, S. M., Dang, T. M., and Wong, S. C. (2012) The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res* **53**, 41-57
 107. Rogacev, K. S., Ulrich, C., Blomer, L., Hornof, F., Oster, K., Ziegelin, M., Cremers, B., Grenner, Y., Geisel, J., Schlitt, A., Kohler, H., Fliser, D., Girndt, M., and Heine, G. H. (2010) Monocyte heterogeneity in obesity and subclinical atherosclerosis. *European heart journal* **31**, 369-376
 108. Berg, K. E., Ljungcrantz, I., Andersson, L., Bryngelsson, C., Hedblad, B., Fredrikson, G. N., Nilsson, J., and Bjorkbacka, H. (2012) Elevated CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes predict cardiovascular events. *Circulation. Cardiovascular genetics* **5**, 122-131
 109. Lo, S. C., Lee, W. J., Chen, C. Y., and Lee, B. C. (2017) Intermediate CD14⁽⁺⁺⁾CD16⁽⁺⁾ monocyte predicts severe coronary stenosis and extensive plaque involvement in asymptomatic individuals. *Int J Cardiovasc Imaging* **33**, 1223-1236
 110. Zhao, L., Varghese, Z., Moorhead, J. F., Chen, Y., and Ruan, X. Z. (2018) CD36 and lipid metabolism in the evolution of atherosclerosis. *British medical bulletin* **126**, 101-112
 111. Love-Gregory, L., and Abumrad, N. A. (2011) CD36 genetics and the metabolic complications of obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14**, 527-534
 112. Wong, K. L., Tai, J. J., Wong, W. C., Han, H., Sem, X., Yeap, W. H., Kourilsky, P., and Wong, S. C. (2011) Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* **118**, e16-31
 113. Rogacev, K. S., Zawada, A. M., Emrich, I., Seiler, S., Bohm, M., Fliser, D., Woollard, K. J., and Heine, G. H. (2014) Lower Apo A-I and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte counts that predict cardiovascular events in chronic kidney disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**, 2120-2127
 114. Idzkowska, E., Eljaszewicz, A., Miklasz, P., Musial, W. J., Tycinska, A. M., and Moniuszko, M. (2015) The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol* **82**, 163-173
 115. Tallone, T., Turconi, G., Soldati, G., Pedrazzini, G., Moccetti, T., and Vassalli, G. (2011) Heterogeneity of human monocytes: an optimized four-color flow cytometry protocol for analysis of monocyte subsets. *J Cardiovasc Transl Res* **4**, 211-219
 116. Sulicka, J., Surdacki, A., Mikolajczyk, T., Strach, M., Gryglewska, B., Cwiklinska, M., Balwierz, W., Guzik, T., and Grodzicki, T. K. (2013) Elevated markers of inflammation and endothelial activation and increased counts of intermediate monocytes in adult survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Immunobiology* **218**, 810-816
 117. May, P., Bock, H. H., and Herz, J. (2003) Integration of endocytosis and signal transduction by lipoprotein receptors. *Sci STKE* **2003**, PE12
 118. Costales, P., Fuentes-Prior, P., Castellano, J., Revuelta-Lopez, E., Corral-Rodriguez, M. A., Nasarre, L., Badimon, L., and Llorente-Cortes, V. (2015) K Domain CR9 of Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor-related Protein 1 (LRP1) Is Critical for Aggregated LDL-induced Foam Cell Formation from Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem* **290**, 14852-14865
 119. Liu, C. C., Hu, J., Tsai, C. W., Yue, M., Melrose, H. L., Kanekiyo, T., and Bu, G. (2015) Neuronal LRP1 regulates glucose metabolism and insulin signaling in the brain. *J Neurosci* **35**, 5851-5859

120. Jaldin-Fincati, J. R., Pavarotti, M., Frendo-Cumbo, S., Bilan, P. J., and Klip, A. (2017) Update on GLUT4 Vesicle Traffic: A Cornerstone of Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab* **28**, 597-611
121. Actis Dato, V., and Chiabrando, G. A. (2018) The Role of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 in Lipid Metabolism, Glucose Homeostasis and Inflammation. *Int J Mol Sci* **19**
122. Castellano, J., Aledo, R., Sendra, J., Costales, P., Juan-Babot, O., Badimon, L., and Llorente-Cortes, V. (2011) Hypoxia stimulates low-density lipoprotein receptor-related protein-1 expression through hypoxia-inducible factor-1alpha in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1411-1420
123. Albertini, R. A., Ferrer, D. G., Romagnoli, P. A., Tinti, M. E., Amigone, J. L., Capra, R., and Chiabrando, G. A. (2017) Association between cardiovascular disease risk scores and subclinical atherosclerosis prevalence in non-elderly adult patients from Argentina. *Int J Cardiovasc Imaging*

6 Publicaciones y Presentaciones a Eventos Científicos.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados o presentados en:

6.1 Revistas científicas internacionales con referato

Ferrer DG, Jaldin Fincati JR, Amigone JL, Capra RH, Collino CJ, Albertini RA, Chiabrando GA. Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulation. Decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. *Cytometry* 85, 601-610; 2014.

Albertini RA, Ferrer DG, Romagnoli PA, Tinti ME, Amigone JL, Capra R, Chiabrando GA. Association between cardiovascular disease risk scores and subclinical atherosclerosis prevalence in non-elderly adult patients from Argentina. *Int J Cardiovasc Imaging*. 33,1521-1529; 2017.

6.2 Congresos y Reuniones Científicas

“Identificación de subpoblaciones de monocitos humanos basada en la expresión diferencial monocítica de LRP1”, autores: Ferrer DG; Jaldín Fincati JR; Amigone JL; Collino CJG; Albertini RA; Chiabrando GA, presentado en las XIX Jornadas Científicas de la Sociedad de Biología de Córdoba, llevadas a cabo entre el 8 al 10 de Agosto de 2013, La Falda, Argentina.

“LRP1 se expresa diferencialmente en subpoblaciones de monocitos de sangre periférica y presenta niveles disminuídos en monocitos clásicos de pacientes con lesión aterosclerótica carotídea respecto a individuos sanos”, autores: Albertini R; Ferrer D; Amigone JL; Tinti M; Collino CJ; Capra RH; Chiabrando

GA, presentado en la LVIII Reunión científica anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), llevada a cabo entre el 20 al 23 de Noviembre de 2013, Mar del Plata, Argentina. Este trabajo logró el Primer premio Póster Área Cardiovascular de este congreso.

“LRP1 expression is downregulated in human and mouse monocyte subpopulations during atherosclerotic processes”, autores: Albertini R; Ferrer D; Amigone JL; Collino CJ; Tinti M; Capra RH; Castro C; Chiabrando GA, presentado en el 17 International Symposium on Atherosclerosis (ISA), llevado a cabo entre el 23 al 26 de Mayo de 2015, Amsterdam, Holanda.