

Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Fundación para la Investigación del Hospital General de Valencia
Servicio de Cardiología

Estudios de Tercer Ciclo. Departamento de Medicina.
Universidad Autónoma de Barcelona

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PGC-1 α regula la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el miocardio tras síndrome coronario agudo”

ALUMNO:
Óscar Fabregat Andrés
Médico Interno Residente de Cardiología

DIRECTOR:
José Antonio Barrabés Riu
Médico Adjunto del Servicio de Cardiología
Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona

Curso académico 2010/2011

**Consorcio Hospital General Universitario de Valencia
Fundación para la Investigación del Hospital General de Valencia
Servicio de Cardiología**

**Estudios de Tercer Ciclo. Departamento de Medicina.
Universidad Autónoma de Barcelona**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

“PGC-1α regula la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el miocardio tras síndrome coronario agudo”

INDICE

- **Certificado del director del trabajo de investigación**
- **Documento de autorización para introducir los trabajos de los alumnos a los depósitos digitales de la UAB y el CBUC**
- **Resumen y palabras clave**
- **Introducción**
- **Métodos**
- **Resultados**
- **Discusión**
- **Conclusiones**
- **Financiación del proyecto y colaboradores**
- **Bibliografía**

CERTIFICAT DEL DIRECTOR DEL TREBALL DE RECERCA

En José Antonio Barrabés Riu, Professor Associat del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona i Metge Adjunt del Servei de Cardiologia de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona

FA CONSTAR,

que el treball titulat: “*PGC-1a regula la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el miocardio tras síndrome coronario agudo*”, ha estat realitzat sota la meva direcció pel llicenciat En Óscar Fabregat Andrés, trobant-se en condicions de poder ser presentat com a treball d'investigació de 12 crèdits, dins el programa de doctorat en Medicina Interna (curs 2010-2011), a la convocatòria de juny.

Signat:

José Antonio Barrabés Riu



Barcelona, a 30 de maig de dos mil onze.

**Document d'autorització per a introduir els Treballs dels alumnes a dipòsits
digitals de la UAB i del CBUC**

Autor: Óscar Fabregat Andrés

DNI: 20245900 N

Com a únic titular dels drets de propietat intel·lectual del treball: “*PGC-1a regula la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el miocardio tras síndrome coronario agudo*”

Autoritzo a la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) i al Consorci de Biblioteques Universitàries de Catalunya (CBUC) a dipositar aquest treball al *Dipòsit de la Recerca de Catalunya (RecerCat)* o qualsevol altre creat per la UAB o el CBUC amb les finalitats de facilitar la preservació i la difusió de la recerca i la investigació universitària.

Per tant, autoritzo a la UAB, i al CBUC a realitzar els actes que siguin necessaris per tal d'introduir el treball als esmentats dipòsits, així com per preservar-lo i donar-li accés mitjançant comunicació pública. Aquestes institucions no estan obligades a reproduir el treball en els mateixos formats o resolucions en què serà dipositat originàriament. La cessió de l'exercici dels drets necessaris per tal de realitzar totes aquestes accions es fa amb caràcter de no exclusivitat, és a dir, sóc lliure de publicar-lo a qualsevol altre lloc.

Declaro que no vulnero cap dret de tercers ja sigui de propietat intel·lectual, industrial, secret comercial o qualsevol altre, en subscriure aquesta autorització, ni en relació al contingut d'aquest treball, de manera que exonero la UAB i el CBUC de qualsevol obligació o responsabilitat davant qualsevol acció legal que es pugui suscitar derivada del treball dipositat.

Finalment declaro que accepto que des del repositori es doni accés al treball mitjançant una llicència *Creative Commons*, “Reconeixement–NoComercial–SenseObraDerivada 2.5 Espanya” amb la qual es permet copiar, distribuir i comunicar públicament l'obra sempre que se'n citin l'autor original i la institució i no se'n faci cap ús comercial ni obra derivada.

Signat:

Óscar Fabregat Andrés



València, a 15 de maig de 2011

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Universidad Autónoma de Barcelona

PGC-1 α regula la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el miocardio tras síndrome coronario agudo

Resumen

Antecedentes y objetivos: El fenómeno de isquemia-reperfusión es en gran parte responsable de la lesión miocárdica tras un SCACEST. PGC-1 α es un coactivador maestro en la regulación del sistema de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo en el miocardio. El objetivo del estudio fue evaluar la activación de la molécula en el proceso de recuperación del tejido miocárdico tras el evento isquémico.

Métodos: En la fase experimental, en un modelo murino analizamos la posibilidad de detectar PGC-1 α en forma de RNA en timocitos y esplenocitos. En la fase clínica, seleccionamos prospectivamente 38 pacientes con diagnóstico de SCACEST sometidos a estrategia de reperfusión. Se extrajeron muestras sanguíneas al ingreso y a las 72 horas, obteniendo RNA a partir de linfocitos aislados. Se analizó mediante PCR la expresión de PGC-1 α y de genes diana del sistema de protección mitocondrial. Se dividió la muestra en dos grupos en función de la presencia o no de inducción de PGC-1 α , comparando en ambos grupos la expresión de enzimas de protección celular y la extensión del infarto estimada por resonancia magnética cardíaca (CRM).

Resultados: En animales, pudo detectarse PGC-1 α en leucocitos y su expresión, así como la de su diana Cyt C, aumentó tras estimulación con IgM. En los pacientes, se detectó inducción de PGC-1 α en los infartos más extensos (necrosis por CRM: 24.91 vs 10.90% de masa ventricular total; $p=0.012$) y con mayor deterioro de la FEVI por ecocardiografía (47.41 vs 53.96%; $p=0.025$), y esta respuesta conllevó la activación de genes de protección celular (expresión post-hipóxica de MnSOD: 32.57 vs 6.46 x-fold; $p=0.017$).

Conclusiones: Los resultados sugieren que PGC-1 α se induce como mecanismo regulador en los pacientes con infartos extensos y peor FEVI, activando en el miocardio genes de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo.

Palabras clave: PGC-1 α , infarto agudo de miocardio, protección miocárdica

Título clave: PGC-1 α se induce en pacientes con SCACEST

1.- Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) siguen siendo la primera causa de muerte en las sociedades occidentales¹⁻². A pesar del descenso en las tasas ajustadas de mortalidad, su prevalencia se ha mantenido constante en las últimas décadas, y las predicciones indican que va a producirse un fuerte incremento en parte debido al aumento de la esperanza de vida y sobre todo a la prevalencia creciente de diabetes y obesidad³. Las ECV suponen además la principal causa de ingresos hospitalarios y de muerte prematura, siendo un origen importante de invalidez y contribuyendo de forma significativa al incremento del coste sanitario⁴.

Dentro de las ECV, la cardiopatía isquémica (CI) es la principal etiología identificable de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental⁵. Su traducción clínica fundamental es el síndrome coronario agudo (SCA), cuyo sustrato etiopatogénico es la enfermedad aterotrombótica⁶, que representa la culminación súbita, mediante la formación de un trombo, de un proceso de evolución lenta y prolongada en los años como es la aterosclerosis.

Así, la aterotrombosis debe considerarse una enfermedad sistémica, heterogénea y multifactorial. En primer lugar, es una enfermedad difusa, ya que supone la afectación simultánea de diferentes territorios vasculares (coronario, cerebral, periférico). En segundo lugar, su evolución es multiforme, ya que pueden encontrarse lesiones arteriales en estadios diferentes en varios lechos arteriales de un mismo sujeto. Y finalmente, se considera plurietiológica, pues se han identificado múltiples factores de riesgo que participan en su desarrollo.

Desde la iniciación de la placa ateromatosa en la infancia hasta su desarrollo en la etapa adulta y su posible complicación producida por rotura de la capa fibrosa, todos sus mecanismos fisiopatológicos están basados en la interacción recíproca del sistema inflamación-trombosis, iniciada con la disfunción endotelial⁷.

El endotelio vascular es un órgano polivalente capaz de percibir los estímulos del ambiente y responder modificando su estado funcional para mantener la homeostasis de la pared vascular⁸. En circunstancias fisiológicas, la superficie endotelial mantiene su microambiente con propiedades antitrombóticas, suprimiendo la migración de células musculares lisas y limitando la permeabilidad a leucocitos circulantes. Bajo la exposición continuada a factores de riesgo cardiovascular, el fenotipo de las células endoteliales cambia, de forma que se hace permeable a las células sanguíneas y macromoléculas, aumenta su afinidad por los macrófagos, promueve la migración de células musculares lisas vasculares y potencia las reacciones protrombóticas. Todas estas respuestas están relacionadas con la producción excesiva de radicales libres de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y se asocian a la pérdida de la bioactividad normal del óxido nítrico (NO), molécula inhibidora de la agregación plaquetaria, con elevada actividad vasodilatadora y una importante función antiinflamatoria.

Los ROS son responsables tanto de la iniciación como de la perpetuación del proceso patológico. Todos y cada uno de los factores de riesgo para el desarrollo de aterosclerosis (dislipemia, hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo e hiperhomocisteinemia) son generadores de estrés oxidativo vascular. El inicio del proceso aterosclerótico como tal es debido al depósito de lípidos oxidados en la pared vascular, que es también consecuencia directa de la excesiva producción de ROS en el endotelio. La eliminación de colesterol oxidado es mucho más lenta que la del colesterol normal⁹.

Una cuestión clave en medicina cardiovascular es determinar como los factores de riesgo causan disfunción metabólica y cómo ésta potencia el estrés oxidativo a nivel endotelial. Los ROS son producidos de forma fisiológica por las mitocondrias como un producto del metabolismo aerobio, desempeñando un papel importante en la señalización y proliferación celular. Sin embargo, cuando sus niveles son excesivos, debido a su gran reactividad, son capaces de dañar de forma irreversible los diferentes componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Esto puede modificar la función celular de forma definitiva, ocasionando mutaciones oncocéntricas o incluso muerte celular apoptótica.

Hoy en día, por tanto, el papel fundamental que juegan los ROS endoteliales en el inicio y desarrollo del proceso aterosclerótico está claramente establecido. Sin embargo, su origen está todavía en debate. Hace ya años quedó demostrado que los niveles altos de glucosa alteran la función mitocondrial, como consecuencia del metabolismo mitocondrial del piruvato, e inducen la producción de ROS mitocondriales en el complejo II¹⁰. Éste trabajo promovió múltiples estudios que establecieron claramente el papel fundamental desempeñado por la disfunción mitocondrial y la producción de ROS en la etiopatogenia de múltiples enfermedades, como trastornos neurodegenerativos comunes (enfermedad de Parkinson¹¹, enfermedad de Alzheimer¹², enfermedad de Huntington¹³, epilepsia¹⁴), arteriosclerosis sistémica¹⁵, diabetes¹⁶, daño por isquemia-reperfusión¹⁷, cáncer¹⁸ y envejecimiento¹⁹. Es por ello crucial el estudio de las causas que desencadenan la producción excesiva de ROS mitocondriales y/o el fallo de los sistemas de detoxificación para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Uno de los objetivos fundamentales del estudio de las enfermedades asociadas a disfunción mitocondrial es el conocimiento de la regulación del sistema de protección frente a estrés oxidativo. Se ha propuesto la regulación por varios factores de transcripción y biomoléculas como el óxido nítrico (NO), que formarían parte de los sistemas de detoxificación celulares. Pero la existencia de un mecanismo coordinado de regulación no se había descrito hasta la publicación de un trabajo²⁰ que mostraba como “*Peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator-1α*” (PGC-1α), un coactivador transcripcional conocido por su función reguladora de la biogénesis mitocondrial y del catabolismo lipídico²¹⁻²², es un regulador maestro del sistema de protección frente a estrés oxidativo mitocondrial en células endoteliales, un papel que es probablemente crítico para la protección del vaso frente al desarrollo de la aterosclerosis. Es probable que dicha regulación tenga carácter sistémico y puede ser particularmente relevante en sistemas celulares con altas tasas metabólicas donde PGC-1α es fundamental para el control del metabolismo energético. Es sabido que coordina al menos parcialmente la expresión de genes que controlan la biogénesis mitocondrial en varios órganos con alta actividad metabólica. Además, regula la termogénesis en tejido adiposo marrón, la gluconeogénesis hepática y la actividad contráctil de las fibras musculares esqueléticas y cardíacas.

Así, en el músculo cardíaco, PGC-1α se ha mostrado determinante en la regulación de varios puntos críticos de su metabolismo energético, incluyendo acciones moduladoras a nivel transcripcional²³⁻²⁴. La evidencia científica indica que tanto PPARα como su principal coactivador fisiológico PGC-1α, especialmente abundante en el miocardio, desempeñan un papel crucial en el control transcripcional de la homeostasis energética cardíaca. El eje PPARα-PGC-1α controla, por una parte, la expresión de los genes implicados en la síntesis de enzimas responsables del metabolismo glucídico y de los ácidos grasos, y por otra, de extrema importancia para el objeto del presente estudio, regula tanto la biogénesis mitocondrial como la transcripción de varias dianas génicas de protección de la organela. Además, la actividad del complejo se ve modificada en

diversas situaciones fisiopatológicas como la hiperglucemia, la hipoxia o el estrés por sobrecarga de volumen²⁵, y dicha alteración puede ser determinante en la regulación del remodelado cardiaco que se desarrolla en las entidades nosológicas relacionadas con dichas condiciones adversas, como son la diabetes, la cardiopatía isquémica o la insuficiencia cardiaca, respectivamente. Por tanto, la modulación metabólica miocárdica a través de estas potenciales dianas terapéuticas resulta muy atractiva, y podría modificar en parte la evolución clínica y el pronóstico de dichas enfermedades²⁶.

Es importante señalar en este momento la interacción de PGC-1 α con el NO, fundamentalmente conocido por su acción vasodilatadora, aunque bien es sabido que sus funciones en la fisiología de la pared vascular van mucho más allá. Se ha propuesto que el precondicionamiento con NO protege a los cardiomiositos del daño por isquemia-reperfusión, un proceso relacionado con la generación de ROS en la mitocondria²⁷, protegiendo también a las células endoteliales de agentes generadores de estrés. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados eran desconocidos hasta el descubrimiento que el NO regula también la expresión del sistema completo mitocondrial de protección frente a estrés a través de la regulación de la expresión de PGC-1 α , siguiendo la vía sGC (guanilato ciclase soluble)/PKG (protein kinase G), una regulación que probablemente es responsable de la actividad protectora/antioxidante del NO²⁸⁻²⁹. Así, ambas moléculas interactúan de forma estrecha, como lo indican los hallazgos siguientes: NO modula la expresión de PGC-1 α tanto positiva como negativamente, la inhibición de la expresión de los niveles PGC-1 α es mediada por PKG, NO regula la expresión del sistema de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo, la regulación del sistema de protección dependiente de NO es mediada directamente por PGC-1 α , y PGC-1 α induce la expresión de eNOS (sintetasa endotelial de NO).

Por tanto, siendo PGC-1 α un coactivador transcripcional maestro en la regulación de genes de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo, y una vez demostrada su importancia en la inhibición de la apoptosis celular en situaciones de isquemia-reperfusión, el presente estudio tratará de establecer su papel en el síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST (SCACEST), situación clínica concreta en la cual el tejido miocárdico afectado es sometido a un estado de isquemia mantenida por oclusión de la arteria coronaria responsable de su perfusión.

Varios estudios previos de investigación básica han creado el escenario necesario para iniciar la presente investigación. Por un lado, ha quedado patente el rol esencial de PGC-1 α en el control del estado energético y la función contrátil del músculo cardíaco³⁰⁻³¹. Estudios con animales han demostrado como los ratones *knock-out* para PGC-1 α , a pesar de mantener el mismo volumen mitocondrial que los individuos *wild-type*, tanto en el músculo esquelético como en el cardíaco, ven reducida la expresión de los diferentes genes de fosforilación oxidativa, y por tanto, la actividad enzimática mitocondrial y los niveles de ATP decrecen significativamente. Esto se traduce en una menor capacidad para incrementar el trabajo cardíaco en respuesta a estímulos químicos y eléctricos. Todos estos datos indican que PGC-1 α es esencial en el desarrollo de una respuesta adecuada del músculo cardíaco al aumento de las demandas de ATP y contractilidad que siguen a los diferentes estímulos fisiológicos del organismo.

La expresión de PGC-1 α es, como vemos, dinámica, y puede inducirse por factores fisiológicos como el frío, el ayuno o el ejercicio físico. Pero además, en el corazón, donde el balance entre la producción de energía y su consumo es literalmente vital, existen ciertas situaciones patológicas de sobrecarga de trabajo prolongada que precisan de una respuesta coordinada a nivel transcripcional. En este sentido, diversos estudios^{25,32,33} han conseguido determinar el papel fundamental de PGC-1 α en modelos

animales de insuficiencia cardiaca, en los cuales se lleva a cabo una constrictión aórtica parcial mínimamente invasiva con el fin de aumentar la poscarga cardíaca. El fallo cardíaco desencadenado por esta sobrecarga de presión mantenida en el tiempo se asocia en los miocardiocitos con el desarrollo de disfunción mitocondrial, caracterizada a su vez por inhibición de la expresión de PGC-1 α y capacidad oxidativa reducida. Por tanto, la regulación a la baja de PGC-1 α puede explicar en parte la patogénesis de esta entidad en los animales *ko* para la molécula. La evidencia creciente atribuye, por tanto, un rol cada vez más importante a los procesos metabólicos y los defectos en su regulación acaecidos en la mitocondria en la patofisiología de la insuficiencia cardiaca.

A partir de estos hallazgos, es creciente el valor potencial de PGC-1 α y los diferentes PPAR como dianas terapéuticas en insuficiencia cardiaca y cardiopatía isquémica. Así por ejemplo, un reciente estudio con el fármaco WY14643, potente agonista PPAR α , demostró por primera vez su potencial efecto cardioprotector en un modelo murino de insuficiencia cardiaca desencadenada por miocarditis aguda viral, a través de la inoculación de EMV (*encephalomyocarditis virus*) según protocolo establecido. Atribuyen este efecto protector a su papel inmunomodulador, reduciendo citocinas inflamatorias y aumentando los niveles de adiponectina y la expresión de UCP3 (uncoupling protein 3), proteína mitocondrial de membrana que regula el transporte transmembrana de protones y se ha relacionado positivamente con el consumo energético miocárdico³⁴.

Otros trabajos enfocados hacia el estudio de la cardiopatía isquémica han demostrado la eficacia de fármacos agonistas de los receptores PPAR, como las tiazolidinedionas, comúnmente conocidas como glitazonas, en disminuir el daño por isquemia-reperfusión en ratones con trastornos metabólicos³⁵, en la atenuación del remodelado ventricular tras modelos experimentales de isquemia miocárdica³⁶, e incluso, en la reducción de la necrosis miocárdica en un modelo animal de infarto agudo de miocardio^{37,38}.

El primero de estos estudios evalúa inicialmente cómo los ratones diabéticos desarrollan una peor respuesta a la isquemia-reperfusión, con mayor tamaño de infarto y mayor infiltrado de células inflamatorias en miocardio. Posteriormente, estudia como el tratamiento oral con pioglitazona durante los 14 días previos al procedimiento es capaz de reducir tanto el tamaño del infarto como el infiltrado inflamatorio, atenuando a su vez la respuesta inflamatoria mediante la reducción en la secreción de ciertas citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alpha). En base a los hallazgos, los autores sugieren que el fármaco puede modular, al menos parcialmente, la disregulación inflamatoria que ocurre durante los procesos de isquemia-reperfusión en los síndromes metabólicos, y que esta respuesta puede tener efecto cardioprotector.

El segundo estudio, basado también en el uso de pioglitazona, demuestra una mejoría significativa de la función cardíaca y el remodelado post-infarto, evaluados por ecocardiografía, en un modelo de isquemia aguda en ratones. Además, los hallazgos en la regulación de proteínas inflamatorias son similares al texto previo. Concluyen igualmente que el efecto protector probablemente se deba a la atenuación en la expresión de citocinas en el ventrículo izquierdo.

En el siguiente de estos estudios, se evalúa de forma más minuciosa la repercusión morfológica de la intervención farmacológica. En ratas sometidas a ligadura transitoria (durante 30 minutos) de la arteria descendente anterior, el uso de rosiglitazona, otro agonista de los receptores PPAR γ , fue capaz de reducir el tamaño del área necrótica, medido por tinción histológica, en un 24% si se administraba de forma oral los 7 días previos al evento, y en un 30% y 37% si se administraba durante el procedimiento de forma intravenosa, a dosis de 1 y 3 mg/kg respectivamente. Además, el fármaco mejoró de forma significativa la disfunción sistólica. Los autores encuentran una inhibición

precoz de la respuesta inflamatoria a través de un menor acúmulo de neutrófilos y macrófagos en el miocardio reperfundido, y una inhibición en la secreción de ciertas citocinas de regulación inmune, atribuyendo el efecto beneficioso de la rosiglitazona a esta capacidad inmunomoduladora.

Finalmente, el último de los estudios investiga el efecto de varios agonistas de estos receptores PPAR: gamma, como rosiglitazona, ciglitazona y pioglitazona, y varios ligandos endógenos; y alfa, como clofibrato y otros ligandos endógenos. Utiliza también un modelo *in vivo* de isquemia miocárdica regional y reperfusión en ratas, y encuentra que todas las moléculas analizadas tienen un efecto favorable reduciendo el tamaño del infarto, siendo éste más llamativo con el ligando endógeno 15D-PGJ2, agonista de PPAR γ . Sus efectos cardioprotectores incluyen: activación de PPAR-alfa y gamma, sobreexpresión de hemoxygenasa 1, menor formación de quemocina MCP-1, inhibición en la expresión de moléculas de adhesión como ICAM-1 y P-selectina e inhibición de la activación isquémico-dependiente de NF- κ B, que a su vez produce reducción en la expresión de iNOS. Por tanto, se concluye que los diferentes ligandos analizados reducen la necrosis producida por la isquemia transitoria, y que este efecto es secundario a su modulación de la respuesta inflamatoria, siendo probablemente más trascendente en pacientes diabéticos.

A parte del grupo de las tiazolidinedionas, se ha evaluado el efecto de otros fármacos que modulan la expresión de PGC-1 α sobre el área de necrosis en modelos animales de infarto de miocardio. Así, un texto reciente³⁹ analiza el efecto de losartan, antagonista de los receptores de la angiotensina II, sobre el miocardio en riesgo tras isquemia inducida. La administración del fármaco por vía oral durante los 14 días posteriores a la ligadura temporal de la arteria coronaria izquierda disminuyó el grado de apoptosis en el área ventricular izquierda subsidiaria de la arteria afecta a través de un aumento en la expresión de PGC-1 α y una mejora consecuente en la integridad de las uniones intercelulares. Además, la fracción de eyección fue significativamente menor en el grupo no tratado.

Nuestro estudio pretende, con un enfoque claramente translacional, complementar estos datos obtenidos en el laboratorio de investigación básica y ayudar a determinar el papel de PGC-1 α en la protección miocárdica tras un síndrome coronario agudo con elevación del ST.

Efectivamente, el daño miocárdico por isquemia-reperfusión es un tema de interés creciente en cardiología. Es sabido que la masa necrótica post-infarto es el principal determinante de la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con historia de cardiopatía isquémica, y que una parte significativa de esta muerte celular se produce durante la fase de reperfusión⁴⁰.

En los últimos años se ha producido un gran avance en la supervivencia y calidad de vida de los pacientes con enfermedad coronaria, debido esencialmente a la capacidad de restaurar el flujo coronario de forma precoz mediante estrategia de reperfusión. Pero a pesar de haber reducido de forma progresiva el tiempo de isquemia, factor esencial en la supervivencia de la célula, y siendo la revascularización coronaria la única alternativa para rescatar al miocárdico de su situación de anoxia, los pacientes con diagnóstico de SCACEST siguen presentando con frecuencia infartos extensos. Ello es debido en parte al daño por reperfusión, según el cual, la propia restauración del flujo sanguíneo desencadena una serie de procesos moleculares en la célula en riesgo que precipitan su muerte.

El daño por reperfusión tiene unas características específicas cuyo conocimiento resulta esencial para su comprensión. Estudios en modelos celulares demuestran el desarrollo de hipercontractura en los miocitos, que supone una desorganización de la

citoarquitectura típica formando en el tejido la imagen histológica de necrosis en bandas de contracción, con acortamiento masivo de los miocitos y desestructuración sarcomérica por rotura de membranas celulares y liberación al medio extracelular de enzimas citosólicas⁴¹. Se considera que está causada por la coincidencia de la reenergización, la cual reactiva la actividad contráctil de las miofibrillas dependiente de ATP, en presencia de una concentración anormalmente elevada de calcio intracelular, producida por la pérdida de su homeostasis durante la isquemia previa, y todo ello genera en presencia de ATP una fuerza contráctil incontrolada y excesiva⁴².

Podemos simplificar el estudio del daño por isquemia-reperfusión a través de un enfoque compartimentalizado: cambios a nivel citosólico, alteraciones en la estructura celular y reacciones en la mitocondria. En el citosol, los desequilibrios iónicos iniciales durante la isquemia incluyen, por un lado, la acidificación progresiva del citoplasma por glucolisis anaerobia, y por otro, el aumento sostenido de la concentración intracelular de calcio por fallo de la bomba Na^+/K^+ del sarcolema, que no opera en ausencia de energía y obliga a la célula a corregir el aumento de Na^+ intracelular a través del intercambiador de membrana Na^+/Ca^+ en su modo reverso, que no requiere energía para su funcionamiento. La restauración del flujo sanguíneo en este contexto celular produce un lavado rápido de catabolitos del medio extracelular, fundamentalmente H^+ , que da lugar a un gradiente de pH entre las células y su entorno, activando mecanismos de corrección que incluyen de nuevo el intercambiador Na^+/Ca^+ , produciendo un influjo adicional de calcio intracelular. Como resultado de todos estos procesos de corrección en cadena, la célula reoxigenada acumula gran cantidad de calcio en su interior, comprometiendo en muchas ocasiones su integridad.

A nivel estructural, las alteraciones celulares pueden resumirse en tres acontecimientos fundamentales: en primer lugar, el desarrollo de edema celular por creación de un gradiente osmótico trasarcolemal secundario al lavado de metabolitos acumulados en el espacio extracelular, que favorece la entrada de agua en el miocito, con aumento de volumen y tendencia a la pérdida de integridad del mismo por fragilidad de la membrana celular; en segundo lugar, la activación de calpaínas, proteasas activadas por calcio, que producen proteólisis de estructuras del citoesqueleto subsarcolemal, y que se hallaban inhibidas por la acidosis durante la fase de isquemia⁴³; y en último lugar, la transmisión de la hipercontractura a los miocitos adyacentes a través de las uniones intercelulares tipo *gap junctions*, que facilitan la propagación célula a célula del daño por reperfusión y contribuyen de forma importante al tamaño final de los infartos⁴⁴.

Finalmente, en las mitocondrias destaca el cambio brusco que se produce en la permeabilidad de sus membranas, fenómeno conocido como transición de permeabilidad mitocondrial, que produce desacoplamiento de la respiración celular y un colapso energético incompatible con la supervivencia celular. Esto se traduce, entre otros procesos, en liberación del citocromo C (CytC), que pone en marcha la cadena de señalización que conduce a la apoptosis celular^{45,46}. La sobreexpresión de iNOS en animales transgénicos tiene efectos cardioprotectores en modelos de isquemia mediante la disminución en la formación de ROS inducidos durante la fase de reperfusión y a través de la inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial⁴⁷. Recordemos que PGC-1 α y NO comparten rutas en la regulación de los mecanismos de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo.

Con todo esto, y a pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el daño por isquemia-reperfusión, los intentos de la investigación biomédica por trasladar estos hallazgos a la práctica clínica han resultado generalmente un fracaso⁴⁸. Casos paradigmáticos incluyen el uso de cariporide o

eniporide, inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ , en ensayos clínicos multicéntricos a gran escala con pacientes diagnosticados de infarto agudo de miocardio o sometidos a cirugía de revascularización coronaria^{49,50,51}, o el uso de fármacos de ingeniería molecular que inhiben la formación de radicales libres de oxígeno, como la enzima superóxido dismutasa (SOD) recombinante⁵². Otros estudios a pequeña escala sí han logrado resultados más esperanzadores. Así, el empleo de ciclosporina A como inhibidor de la transición de permeabilidad mitocondrial en pacientes con SCACEST sometidos a intervención coronaria percutánea consiguió reducir de forma significativa el tamaño del infarto, estimado por niveles plasmáticos de enzimas miocárdicas y mediante resonancia cardiaca⁵³. También con una pequeña muestra, un estudio demostró la importancia del postcondicionamiento isquémico sin uso concomitante de fármacos, en pacientes sometidos a revascularización percutánea primaria. Estos pacientes se beneficiaron del inflado transitorio y repetido del balón de angioplastia previo a la intervención definitiva, ya que presentaron una menor liberación de CK en las 72 horas siguientes, indicativa de un menor tamaño de infarto⁵⁴. Estudios similares de pequeño tamaño muestral obtuvieron resultados en el mismo sentido^{55,56}.

El análisis de los motivos de este fracaso permite establecer una serie de conclusiones, que a modo de lección deberían tenerse en cuenta a la hora de enfocar una investigación orientada hacia la cardioprotección post-isquémica⁵⁷. En primer lugar, la necesidad de utilizar modelos animales de isquemia miocárdica que mimeticen en lo posible la presentación clínica de los pacientes con SCACEST, utilizando por ejemplo animales con hipercolesterolemia o diabetes mellitus inducidas. En segundo lugar, es esencial que los ensayos humanos recluten pacientes dentro de una ventana temporal sintomática estrecha, idealmente entre 2 y 6 horas tras el inicio de la clínica. Con ello se consigue el objetivo de maximizar los cambios de un efecto positivo terapéutico, ya que pacientes revascularizados de forma muy precoz probablemente presenten infartos pequeños y el beneficio adicional de técnicas adjuntas sea mínimo, y por otro lado, pacientes con tiempos de isquemia muy prolongados poseen poco miocardio en riesgo susceptible de ser rescatado. En tercer lugar, y con la misma meta, es fundamental seleccionar pacientes que vayan a desarrollar infartos extensos, ya que a diferencia de los estudios con animales donde la dimensión del infarto puede ser estimada de forma sencilla a través de técnicas histológicas, en humanos probablemente pequeños cambios en el tamaño de la necrosis no puedan ser discriminados con las técnicas de imagen actuales⁵⁸. En cuarto lugar, debe tenerse en cuenta que el tamaño del infarto variará en gran medida en función de la arteria responsable del mismo y la presencia o no de circulación colateral, así como de la eficacia de la angioplastia percutánea. Por tanto, deberían incluirse sólo pacientes con enfermedad significativa del mismo vaso, sin circulación colateral, con la arteria ocluida antes de aplicar el tratamiento y con flujo TIMI 3 tras la intervención. Por último, el diseño de los estudios clínicos no debería enfocarse hacia disminución de la mortalidad como *end point* primario, pues dada la eficacia actual del tratamiento del SCA con elevación de ST y sus bajas tasas de mortalidad en el seguimiento, sería necesario un gran tamaño muestral para alcanzar dicho objetivo.

Así, aunque los retos para llevar a cabo estudios clínicos con el propósito de validar hallazgos de experimentación básica en el campo de la protección miocárdica tras la isquemia-reperfusión son desafiantes, la base científica establecida sugiere con fuerza que el objetivo de la cardioprotección en estos pacientes es alcanzable. Por tanto, adecuadamente orientados, los estudios que persigan este fin son prometedores y de gran relevancia clínica.

Con el aiento de esta suposición, el presente trabajo se diseñó con el objetivo último de dilucidar el papel de PGC-1 α en la protección miocárdica durante los procesos de isquemia-reperfusión, basándonos en el papel maestro de la molécula en la regulación de los procesos mitocondriales frente a situaciones de estrés oxidativo celular.

Para ello, fue necesario en primer lugar diseñar un modelo animal de infarto de miocardio que reprodujera lo mejor posible las condiciones clínicas del proceso. Dado el carácter sistémico de la regulación mitocondrial en situaciones de estrés oxidativo, se creó, en una primera fase del estudio desarrollada en el laboratorio de experimentación básica, un modelo animal de isquemia miocárdica. Con él pudimos establecer la relación entre los niveles de expresión de PGC-1 α en tejido miocárdico tras la oclusión de una arteria coronaria, estimados mediante estudios histológicos, y sus niveles de expresión en células sanguíneas circulantes, en concreto en la población linfocitaria. De esta manera, es posible estimar posteriormente en pacientes la inducción de la molécula en tejido miocárdico a partir de las mediciones realizadas en muestras de sangre periférica.

Dado que los ratones no desarrollan de forma fisiológica placas de ateroma, el estudio de la aterosclerosis en los mismos requiere el uso de modelos *knock-out* para ApoE, polipéptido básico de las lipoproteínas de alta y baja densidad, cuya disfunción o ausencia genera aterosclerosis de manera espontánea por acúmulo de colesterol circulante⁵⁹⁻⁶⁰. Además, tratando de aproximar el papel de la disfunción mitocondrial causada por factores de riesgo cardiovascular como la dislipemia o la hiperglucemia en el desarrollo de aterosclerosis, los ratones son sometidos a dietas ricas en grasa y colesterol, o tratados con estreptotozina para inducir diabetes tipo I. Estas condiciones tratan de mimetizar en lo posible la experimentación animal y la clínica, y son esenciales para la reproducibilidad de los resultados, dado que la diabetes fundamentalmente, pero también otros factores de riesgo clásicos capaces de inducir un síndrome metabólico, favorecen la disfunción en la regulación de PGC-1 α ^{61,62}.

Tras esta fase previa, donde queda definida la correspondencia entre la expresión de la molécula en el lugar de la lesión isquémica y su expresión sistémica, puede diseñarse un estudio clínico en pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST. De esta forma, obteniendo muestras de sangre a la llegada de los pacientes al centro hospitalario, y analizando inmediatamente el nivel de expresión basal de PGC-1 α en la población linfocitaria aislada que como quedó demostrado anteriormente en el modelo animal, seguirá una correlación establecida con la expresión de la molécula en el miocardio, se consigue una información indirecta sobre los procesos moleculares acaecidos en el tejido cardíaco durante el infarto. Con el objetivo de valorar variaciones dinámicas en el nivel de expresión y analizar si existe inducción de la molécula en ciertos pacientes, será necesario obtener una segunda muestra sanguínea tras la fase aguda del evento.

Por otra parte, evaluar el daño miocárdico tras la isquemia por métodos no invasivos resulta todavía un reto tecnológico en la actualidad. Afortunadamente, con el desarrollo y expansión de la resonancia magnética nuclear como método de evaluación de la función y la estructura cardíaca se ha conseguido solventar en alto grado este problema. Así, en los últimos años diversos estudios han examinado el papel de la cardiorresonancia magnética (CRM) en la estimación tanto del tamaño del infarto en los SCA, como del área de miocardio en riesgo^{63,64}. Tras un evento coronario, en el miocardio afectado encontramos dos situaciones bien diferenciadas. Por un lado, tejido necrótico sin posibilidad de recuperación, y por otro, músculo viable, que puede haber recuperado incluso la contractilidad o permanecer disfuncionante pero con potencial de reuperación. La disfunción contráctil secundaria al insulto isquémico a pesar de una

adecuada repercusión se conoce como contusión o aturdimiento miocárdico, que se diferencia clásicamente de la hibernación, otra forma de disfunción contráctil reversible, en la cual la disfunción es debida a la reducción mantenida del flujo coronario, con la consiguiente reducción del metabolismo tisular. En base a la posibilidad de recuperación de este tejido, la capacidad de detectarlo mediante técnicas no invasivas puede ser de gran utilidad en el manejo de estos pacientes.

La CRM tiene la habilidad única de evaluar diferentes patrones de viabilidad miocárdica de probado valor. La valoración de la escara necrótica, de la perfusión coronaria y de la reserva contráctil puede llevarse a cabo de forma fiable y reproducible^{65,66,67}. La imagen directa de la fibrosis miocárdica es posible mediante el uso de secuencias en T1 tras la administración de gadolinio intravenoso, que permite visualizar áreas de tejido brillantes o “con realce”, comúnmente conocidas como zonas de realce tardío de gadolinio (RTG), y que representan en el contexto del SCA, necrosis cardíaca sin posibilidad de recuperación, y por tanto, no viables. Resulta asimismo útil el asesoramiento de la CRM en la evaluación de la reserva contráctil a través de la administración de fármacos inotrópicos como la dobutamina.

Pero quizás el mayor avance de la CRM en el contexto de la investigación sobre protección miocárdica en los SCA ha sido la identificación del miocardio en riesgo basada en la detección de edema cardíaco utilizando secuencias especiales potenciadas en T2^{68,69}. El edema miocárdico es la consecuencia directa del fenómeno inflamatorio desencadenado por el evento isquémico agudo, y representa un aumento del agua intersticial secundario a daño por reperfusión, por afectación del mecanismo de transporte iónico transmembrana que conduce a un aumento celular de sodio⁷⁰. Puede evaluarse en la mayoría de pacientes tras un SCACEST, fácilmente integrado en el estudio habitual de CRM, y aún siendo un hallazgo transitorio, su presencia es casi constante en las fases evolutivas precoces. Por tanto, puede utilizarse para detectar daño miocárdico reciente, pues el RTG no diferencia entre infarto de miocardio agudo y crónico. Pero la principal ventaja del estudio del edema miocárdico es su estrecha correlación con el área de miocardio que ha permanecido isquémica incluso una vez se ha producido la reperfusión, por lo que la cuantificación del tejido necrótico en relación al tejido con edema permite diferenciar el miocardio salvado tras la reperfusión⁷¹. Además, la extensión del edema se ha relacionado con mayores volúmenes ventriculares y mayor disfunción sistólica en la evolución post-infarto, con infartos más extensos y mayor OMV y mayor incidencia de eventos cardiovasculares mayores⁷². Asimismo, el índice de miocardio salvado se relaciona bien con los parámetros pronósticos utilizados en el contexto de los SCA: clínicos, como el tiempo de retraso en la implantación de la terapia de reperfusión; angiográficos, como el flujo TIMI (*Thrombolysis In Myocardial Infarction flow grade before angioplasty*); y electrocardiográficos, como la resolución del ascenso del segmento ST.

En resumen, el estudio de CRM permite, por un lado y a través de secuencias en T1, determinar el tamaño de la necrosis tras el SCA, constituida por tejido no viable y que formará evolutivamente la escara del infarto. Y por otro lado, a través de secuencias especiales potenciadas en T2, permite estimar el área de edema miocárdico, que incluye todo el miocardio en riesgo, viable y no viable, y por tanto, la relación entre ambos parámetros permite estimar la cantidad de miocardio salvado por la reperfusión.

Así pues, a través de un proyecto diseñado en torno a una situación clínica muy prevalente y con importantes implicaciones pronósticas como el SCACEST, se trató de analizar a partir de un extenso trabajo previo en el campo de la experimentación básica, el papel de PGC-1 α en la regulación de la respuesta celular frente a estrés oxidativo en el tejido miocárdico tras el evento coronario. La evaluación de la molécula se basó en

dos pilares fundamentales: la determinación de su nivel de expresión en células sanguíneas, como estimación indirecta de su inducción en el miocardio, a través de análisis de biología molecular; y la estimación tanto del tamaño de la necrosis como del área de miocardio en riesgo en los estudios de CRM.

2.- Métodos

Experimentación básica

Animales

Ratones *knock-out* para PGC-1 α (PGC-1 $\alpha^{-/-}$) C57BL6 fueron suministrados originalmente por el laboratorio del Dr Bruce Spiegelman (Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, Estados Unidos). Posteriormente, se creó una colonia en el animalario del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) de Madrid.

Se utilizaron para los experimentos animales macho C57BL6 PGC-1 $\alpha^{+/+}$ y PGC-1 $\alpha^{-/-}$ de 6 a 8 semanas de vida. Los animales fueron sacrificados según los protocolos del Comité de Uso y Cuidado de Animales del CNIC, y mediante disección aséptica se obtuvo el bazo y el timo.

Obtención y procesado de muestras celulares

Las suspensiones celulares de tejido tímico y esplénico se obtuvieron por lisado mecánico de los órganos utilizando el émbolo de jeringas que contenían una solución fría de PBS suplementado con EDTA (2 mM) y FBS (0.1%). Los eritrocitos de las muestras se eliminaron incubando las células en un báfer (ACK Lysing) durante 5 minutos a 4°C.

Los esplenocitos y timocitos obtenidos, se procesaron posteriormente mediante lavado en un medio de cultivo específico (RPMI 1640, suplementado con 10% de FBS, 10 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina) y filtrado a través de tamiz de nylon de 70 µm.

Finalmente, las células se ajustaron a una concentración final uniforme de 10⁶ células/mL.

La estimulación de células esplénicas se realizó con el fragmento F(ab')₂ de anticuerpo anti-IgM (1 µM/ml; Jackson immunoresearch).

Investigación hospitalaria

Selección muestral

Se seleccionaron consecutivamente 49 pacientes atendidos en nuestro centro hospitalario con diagnóstico de SCACEST y con estrategia terapéutica inicial de reperfusión, durante el período de tiempo comprendido entre marzo y septiembre de 2009. Los criterios de inclusión fueron: episodio de debut, edad inferior a 80 años y terapia de reperfusión farmacológica o mecánica (trombolisis efectiva y coronariografía precoz, ACTP primaria o trombolisis fallida seguida de ACTP de rescate). Siguiendo las guías de práctica clínica de la Sociedad Europea de Cardiología⁷³, se estableció el diagnóstico de infarto agudo de miocardio con elevación persistente del segmento ST en aquellos pacientes que presentaban síntomas isquémicos, elevación persistente del

segmento ST en el electrocardiograma y elevación típica de biomarcadores de necrosis miocárdica. Inicialmente los pacientes fueron informados verbalmente de su participación en el estudio, firmando posteriormente el correspondiente consentimiento informado, aprobado por el Comité de Investigación y Ensayos Clínicos del hospital.

Los criterios iniciales de exclusión fueron: antecedentes de cardiopatía isquémica documentada o de clínica anginosa previa sugerente de enfermedad no filiada, con el fin de evitar sesgos en la determinación de la extensión de la necrosis miocárdica en los estudios de CRM; evolución del evento superior a 150 minutos, desde el inicio del dolor o la sintomatología de sospecha hasta la extracción de la primera muestra sanguínea para el análisis molecular, evitando así en la medida de lo posible que los procesos moleculares de transcripción de RNA y síntesis proteica interfirieran en la situación basal de expresión de las diferentes dianas génicas; y/o finalmente, negativa del paciente a participar en el estudio o a la firma del consentimiento informado.

Procesado y análisis de las muestras

A su llegada al centro, previo a cualquier intervención terapéutica, se obtuvo una muestra de sangre periférica en un volumen no inferior a 5 mL, conservada en recipiente con EDTA y en un lugar refrigerado, con una temperatura mantenida entre 4-8°C, hasta su análisis posterior, siempre antes de las 12 horas. Con el fin de evaluar cambios dinámicos en la expresión de la molécula, la extracción sanguínea se repitió a las 72 horas (+/- 12 horas), siguiendo la misma metodología.

Las muestras se procesaron inicialmente con el objetivo de seleccionar la población linfocitaria. Posteriormente, tras extracción de RNA, se determinó el nivel de expresión de PGC-1 α mediante RT-PCR (retrotranscriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa), permitiendo una comparación interindividual de la misma a través de un análisis semicuantitativo (estimación de la cantidad de molécula en función del nivel de detección de la misma en los ciclos de PCR, hasta un máximo de cuarenta ciclos). Además, se determinó la cantidad de RNA de las diferentes dianas génicas del sistema de protección mitocondrial. En concreto, se analizaron el citocromo C (CytC), como control de la cadena respiratoria mitocondrial, y la enzima de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). Con el objetivo de evidenciar la implicación molecular real del proceso de transcripción, se midió también mediante técnica de Western-Blot la cantidad de proteína sintetizada de cada una de las moléculas descritas.

Datos clínicos durante el ingreso

A nivel clínico, se recogió la siguiente información de los individuos de la muestra durante su ingreso en el servicio de cardiología:

- 1) datos de filiación, procedentes de la unidad de documentación del hospital
- 2) historia clínica del paciente, con todos los antecedentes médicos y quirúrgicos de interés
- 3) datos antropométricos: peso, talla e índice de masa corporal
- 4) factores de riesgo cardiovascular clásicos: hipertensión arterial, dislipemia, diabetes, tabaquismo y otros hábitos tóxicos, antecedentes familiares de cardiopatía
- 5) medicación habitual domiciliaria, por principio activo y dosis
- 6) valores analíticos rutinarios: glucosa en ayunas (media de tres valores, obtenidos durante el ingreso, idealmente en días no consecutivos, y determinada en mg/dL), hemoglobina y hematocrito (media de dos valores durante el ingreso, en mg/dL y % respectivamente), fórmula leucocitaria, incluyendo leucocitos, linfocitos y

monocitos (valores en admisión de urgencias y a las 72 horas, en valores absolutos - miles/mL- y relativos -porcentaje-), proteína C reactiva no ultrasensible (valor en admisión de urgencias, en mg/dL), creatinina y filtrado glomerular según la fórmula MDRD (media de dos valores durante el ingreso, expresado en mg/dL y en mL/kg/minuto respectivamente), perfil lipídico (medida única durante el ingreso, incluyendo colesterol total, HDLc, LDLc y triglicéridos, expresados en mg/dL), hemoglobina glicosilada o Hb1Ac (medida única durante el ingreso, expresada en porcentaje) y enzimas de daño miocárdico (valores pico, expresados en microgramos/mL), incluyendo troponina I no ultrasensible (TnI), creatinkinasa (CK) y creatinkinasa-MB masa (CKMB).

7) localización de la elevación del segmento ST en el momento de la admisión a urgencias, así como la aparición de bloqueo completo de rama izquierda del haz de Hiss (BRIHH) o fibrilación auricular (FA) en el electrocardiograma en cualquier momento del ingreso

8) estrategia de reperfusión utilizada: trombolisis y coronariografía precoz, ACTP primaria o ACTP de rescate

9) número de arterias coronarias enfermas y grado de estenosis en las mismas, considerando estenosis significativa $>50\%$ de la luz del vaso en el caso del tronco de la arteria coronaria izquierda, o bien $>75\%$ del lumen arterial en el caso de los vasos epicárdicos (arteria descendente anterior, arteria circunfleja y arteria coronaria derecha) o sus ramos principales

10) datos del estudio ecocardiográfico, realizado durante el ingreso (entre el tercer y séptimo día tras el evento) de forma indistinta por dos cardiólogos acreditados y experimentados en la técnica; se analizaron medidas referentes al estudio en modo M y 2D (diámetros de ventrículo izquierdo y derecho y aurículas, volúmenes de ventrículo izquierdo y aurícula izquierda, diámetros de grandes vasos); la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) estimada por la fórmula de Simpson, y expresada en porcentaje; el índice de contractilidad segmentaria (ICS), que reconoce 17 segmentos ventriculares izquierdos y puntúa cada uno de ellos del 1 al 4 en función de su movilidad: normal, hipocinesia, acinesia y discinesia respectivamente; también se anotó la presencia de valvulopatías significativas

11) datos de la ergometría en tapiz rodante (en caso de realizarse): se anotaron los METS finales (unidades que representan equivalentes metabólicos de consumo de oxígeno, reproducibles y reconocidas universalmente; 1 MET es igual a 3.5 mL O₂/kg·min), el doble producto basal y máximo (entendido como la multiplicación de la frecuencia cardíaca por la cifra de tensión arterial al inicio y en el pico de esfuerzo), y el resultado clínico (aparición de angina o disnea franca, hipotensión con el esfuerzo o cuadro vegetativo intenso que impide la continuación de la prueba) y eléctrico (descenso del segmento ST de >1 mm (0,1 mV) en dos o más derivaciones precordiales consecutivas, siguiendo un trayecto horizontal o descendente y medido a 80 ms del punto J; así como la elevación del ST o la aparición de arritmias ventriculares)^{74,75}.

Estudios de resonancia cardiaca

Los estudios de CMR se realizaron con una unidad de 1.5 teslas (T) (Magnetom Sonata, Siemens, Erlangen, Alemania) entre el tercer y cuarto día de evolución tras el infarto. Las imágenes funcionales de eje corto y eje largo se obtuvieron utilizando secuencias sincronizadas con electrocardiograma de superficie SSFP (*Steady State Free*

Precesion), con los siguientes parámetros: corte de 8 mm de grosor con 2 mm de separación entre las secuencias en eje corto.

La detección de edema miocárdico se llevó a cabo usando imágenes en eje corto de sangre negra, potenciadas en T2 en los mismos cortes que los utilizados en las secuencias cine, usando una detección multisección HASTE (*Half-Fourier Acquisition Single-shot Turbo spin Echo*), con los siguientes parámetros: intervalo de 2 R-R, con ET de 33 ms e IT de 170 ms, grosor de corte de 8 mm con 2 mm de separación entre los mismos, ángulo de giro de 160°, matriz de 256x151 y ancho de banda de 781 Hz/píxel. En caso de obtener imágenes de pobre calidad, se utilizaron secuencias segmentadas en TSE (*Turbo Spin-Echo*), con los siguientes parámetros: intervalo de 2 R-R, ET de 100 ms e IT de 170 ms, grosor del corte de 8mm con separación entre los mismos de 2 mm, ángulo de giro de 180°, matriz de 256x146 y ancho de banda de 235 Hz/píxel.

Las imágenes de RTG se adquirieron tras administración intravenosa de 0.15 mL/kg de dimeglubina gadobenato 0.5 M. Secuencias SSFP en apnea sincronizadas con electrocardiograma de superficie en eje corto se obtuvieron siguiendo los mismos planos que en las secuencias cine, entre uno y dos minutos después de la administración del contraste, permitiendo discriminar así miocardio normal de miocardio necrótico. Además, permite determinar áreas de obstrucción microvascular. Diez minutos después del contraste, los mismos cortes en eje corte se repitieron ajustando el IT a miocardio normal y usando secuencias SSFP de disparo simple, en apnea, sincronizadas con electrocardiograma, y posteriormente secuencias en apnea 2D y 3D turbo-FLASH (*Fast Low Angle Shot*).

Se utilizó un modelo cardíaco estándar de 17 segmentos para localizar las áreas de edema y las imágenes de RTG obtenidas en los cortes de eje corto y eje largo.

Los defectos de perfusión se describieron visualmente en función del déficit persistente de primer paso de contraste. Se identificaron áreas de alta intensidad en T2 por inspección visual. El hallazgo de áreas de baja intensidad rodeadas de zonas de alta intensidad de señal en estas imágenes se consideró indicativo de OMV. También se definió OMV por la presencia de regiones sin señal dentro áreas de RTG, según inspección visual.

Se consideró transmuralidad la necrosis de >50% del espesor de miocardio. El edema miocárdico y las áreas de RTG se estimaron trazando manualmente las regiones, expresando los valores en porcentaje respecto a la masa miocárdica total, calculada a su vez por el trazado mediante contornos del epicardio y el endocardio. Todas estas mediciones se llevaron a cabo por un mismo cardiólogo en una estación de trabajo especializada (Argus, Siemens, Erlangen, Germany)

Objetivos

El *objetivo principal* del estudio fue caracterizar la participación de PGC-1 α en la respuesta celular frente al estrés oxidativo generado en el tejido miocárdico tras un evento coronario agudo. El estudio de la molécula en el contexto de un SCACEST permite relacionar su nivel de expresión con la respuesta macromolecular en el miocardio, analizando si la inducción de la misma repercute en una mejor respuesta del tejido miocárdico a la isquemia. La consecución de este objetivo requiere dos premisas imprescindibles: por un lado, la capacidad de determinar la expresión de la molécula a nivel periférico, mediante extracción de muestras séricas rutinarias, evaluando posteriormente la posible inducción de sus niveles en la evolución del cuadro clínico; y por otro lado, la estimación tanto del tamaño de la necrosis como del miocardio en riesgo tras el evento, mediante métodos no invasivos.

El primero de los condicionantes requirió estudios experimentales previos, pues no se había aislado ni medido previamente PGC-1 α en muestras clínicas. Así, siguiendo un modelo animal con ratones, se consiguieron determinar las condiciones adecuadas para el procesado de las muestras, correlacionando los niveles de la molécula a nivel periférico con su expresión en tejido miocárdico.

La segunda premisa, cuyo problema radica en la necesidad de caracterizar el tejido miocárdico sin utilizar una técnica cruenta, se subsanó con el uso de la CRM, técnica de imagen no invasiva ni radiante con un amplio soporte en la evidencia científica, que permite determinar de forma fiable tanto el área necrótica como el tejido viable pericicatricial tras un infarto de miocardio^{65,68,69,70}.

Se plantearon asimismo otros *objetivos secundarios*:

- 1) A nivel experimental, determinar la población celular sanguínea más favorable para el estudio de la molécula a nivel sistémico
- 2) Crear un protocolo de extracción y procesado de muestras sanguíneas para la determinación del nivel de expresión sistémico de PGC-1 α
- 3) Correlacionar la variabilidad de los niveles de expresión basales y de inducción de PGC-1 α con el perfil clínico de los pacientes

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete de *software* SPSS (versión 17.0 para Windows, SPSS Inc., Chicago, Illinois, Estados Unidos). La significación estadística se estableció para un valor $p < 0,05$. Las variables continuas se expresan como media \pm desviación estándar, mientras que las variables categóricas se presentan como porcentajes. La correlación de valores se realizó mediante regresión simple lineal. El análisis comparativo se realizó mediante las pruebas adecuadas en función del tipo de variable (dicotómica o continua) y de que su distribución fuera normal o no (χ^2 , t de Student, U de Mann-Whitney).

El estudio se ajusta a los principios establecidos en la Declaración de Helsinki y a la Ley de Protección de Datos Personales.

3.- Resultados

Investigación básica

En primer lugar, con objeto de determinar la población celular óptima que permita estimar cuantitativamente la expresión de PGC-1 α en muestras periféricas, utilizamos un modelo animal con ratones.

Inicialmente, evaluamos si el RNA de PGC-1 α podía detectarse en esplenocitos y timocitos procedente de lisado de células de muestras murinas. Encontramos que aunque el RNA de PGC-1 α se detecta en ambas preparaciones, los niveles de la molécula en los preparados de timocitos era 15 veces superior a las muestras de esplenocitos (véase figura 1).

Posteriormente, testamos si la proteína de PGC-1 α podía asimismo ser detectada en las muestras procesadas de esplenocitos. Encontramos que aparecía una banda proteica del peso molecular esperado para PGC-1 α al realizar un *western-blot* con el anticuerpo específico. Con objeto de asegurar que dicha banda pertenecía a material proteico de PGC-1 α , utilizamos como control negativo una preparación de esplenocitos procedentes de ratones *knock-out* para la molécula (PGC-1 $\alpha^{-/-}$), y confirmamos que la banda desaparecía al realizar el *western-blot* con estos procesados celulares. Concluimos por

tanto que la proteína de PGC-1 α está presente en los esplenocitos de ratones (veáse figura 2).

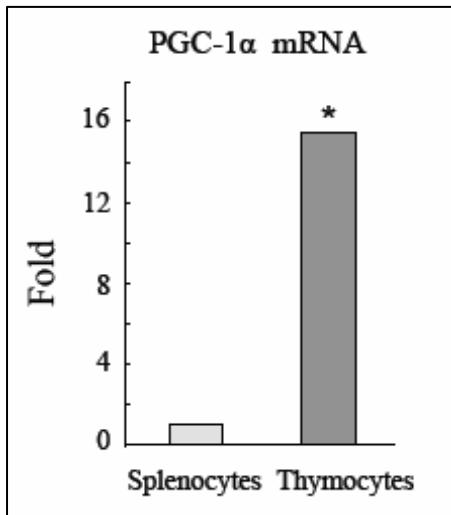


Figura 1. Expresión de PGC-1 α en esplenocitos y timocitos de muestras murinas. *Splenocytes*: esplenocitos; *thymocytes*: timocitos; *Fold*: análisis por pliegues del resultado de la PCR

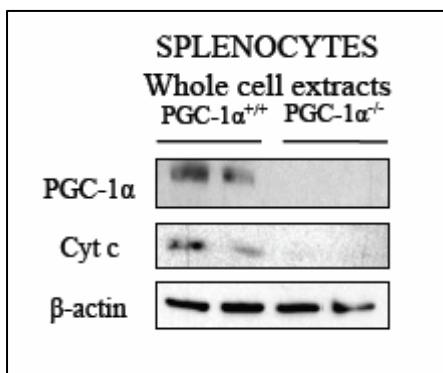


Figura 2. *Western-blot* de esplenocitos murinos, procedentes de extractos celulares procesados. *Splenocytes*: esplenocitos; *Cyt C*: citocromo C, utilizado como control de diana génica de PGC-1 α ; β -*actin*: β -actina, utilizada como control de carga

Además, para evaluar si la proteína de PGC-1 α tenía un papel activo en el control metabólico de los esplenocitos, testamos simultáneamente mediante *western-blot* los niveles de expresión de CytC, diana molecular de PGC-1 α ampliamente caracterizada. CytC es una proteína que forma parte de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, y encontramos que su expresión se hallaba también reducida en ratones PGC-1 $\alpha^{-/-}$, lo que sugiere que PGC-1 α no sólo está presente en esplenocitos murinos, sino que tiene un papel activo en el control metabólico mitocondrial (veáse figura 2).

Finalmente, testamos si los niveles de PGC-1 α se modificaban tras activación linfocitaria. Para ello, examinamos los cambios en los niveles de expresión de PGC-1 α tras estimulación específica de los linfocitos B mediante inmunoglobulina M (α -IgM). Los esplenocitos estimulados con α -IgM mostraron un incremento significativo tanto de los niveles de RNA de PGC-1 α como de CytC, a las 3 horas de la estimulación (veáse

figura 3). Concluimos, por tanto, que la expresión de la molécula y su diana específica se induce por estimulación de linfocitos B.

Estos resultados sugieren que PGC-1 α está presente y tiene un papel activo en linfocitos, y además, que sus niveles y actividad se inducen tras estimulación linfocitaria.

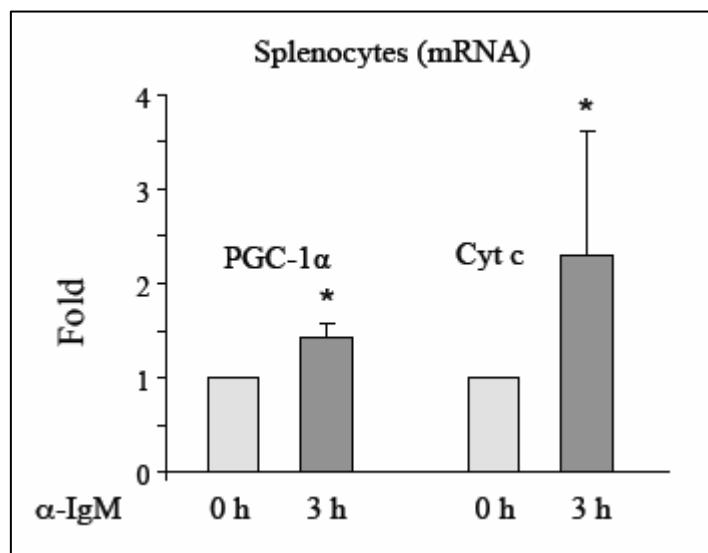


Figura 3. Niveles de PGC-1 α y citocromo C en esplenocitos murinos en situación basal (0 horas) y tras estimulación con inmunoglobulina M (3 horas). *Splenocytes*: esplenocitos; *CytC*: citocromo C; α -IgM: inmunoglobulina M específica; *Fold*: análisis por pliegues del resultado de la PCR

Investigación clínica

Análisis descriptivo

La muestra final incluyó 38 pacientes. Se perdieron en el seguimiento 11 individuos por diferentes causas: hubo 1 muerte antes de las 72 horas de evolución, en 3 pacientes se confirmó tras la inclusión cardiopatía isquémica previa, en 5 pacientes no se realizó el estudio de CRM por distintos motivos, y en 2 pacientes no se consiguió medir la expresión de PGC-1 α a pesar de amplificar las muestras.

La edad media de los individuos del estudio fue 60,9 (+/- 11,3) años, siendo el 84,2% varones. El 55,2% eran fumadores y el 23,7% exfumadores, el 52,6% dislipémicos, el 34,2% diabéticos y el 71,1% hipertensos. El índice de masa corporal medio fue 27,41 kg/m².

Ningún paciente tenía anemia ni insuficiencia renal llamativa (hemoglobina 13,6 +/- 2,1 g/dL y creatinina basal 1,1 +/- 0,2 mg/dL). No fue incluido ningún paciente con bloqueo completo de rama izquierda del haz de Hiss (BCRIHH) ni en fibrilación auricular (FA).

A pesar de la prevalencia de factores de riesgo cardiovascular en la muestra, el tratamiento domiciliario previo de los pacientes no era óptimo. Sólo un 14,8% tomaba un hipolipemiante, un 25,9% tomaba un IECA o un ARA-II, un 14,8% algún diurético y un 25,9% un betabloqueante o calcioantagonista. Merece destacarse que casi la mitad de los pacientes dados de alta con diagnóstico de diabetes no era conocedor de esta patología antes del ingreso.

Todos los individuos de la muestra fueron sometidos a estrategia de reperfusión. El 44,4% de los pacientes recibió tratamiento trombolítico con éxito a su llegada al centro hospitalario, al 25,9% se le realizó angioplastia primaria, y el 29,7% restante fue derivado a angioplastia de rescate.

En cuanto a la localización de los infartos y su gravedad, casi la mitad fue de predominio anterior (44,7%), siendo el porcentaje de enfermedad multivaso (3 ó más vasos con estenosis significativas) del 11,1%. Por arterias, sólo un paciente presentó afectación significativa del tronco común, el 50% de la arteria descendente anterior, el 26,9% de la arteria circunfleja, y el 46,2% de la arteria coronaria derecha.

Se realizó revascularización percutánea en la fase aguda del infarto (con implantación de algún *stent* durante el procedimiento) al 93% de los pacientes, con un tiempo medio de isquemia (dolor-reperfusión) aproximado de tres horas.

En relación a la función ventricular postinfarto, un tercio de los pacientes presentó disfunción ventricular moderada (<45%), y un 7,4% disfunción severa (<35%), según los valores estimados por ecocardiografía. Si tomamos las determinaciones realizadas en los estudios de CRM, la distribución de disfunción sistólica es similar.

Inducción de PGC-1 α

Con el objetivo de evaluar si podíamos detectar inducción en la expresión de PGC-1 α tras un SCACEST, aislamos el RNA de las muestras sanguíneas obtenidas en el momento de admisión a urgencias y a las 72 horas. Los niveles de la molécula se monitorizaron por RT-PCR.

Al analizar los resultados, encontramos que la muestra se segregaba en dos grupos claramente diferenciados. Por un lado, aquellos pacientes en los cuales podía observarse inducción de PGC-1 α , con valores a las 72 horas por encima de la unidad respecto al valor basal obtenido al ingreso. Y por otro lado, el grupo muestral en el cual no se apreciaban cambios en el nivel de expresión de la molécula. Además, los pacientes con inducción de la molécula, podían a su vez subdividirse en dos grupos: aquellos con un nivel de inducción inferior a 10 veces el valor basal, y aquellos con una inducción mayor (véase figura 4).

Con la finalidad de monitorizar la actividad de PGC-1 α , se determinó también la inducción de diferentes genes diana de la molécula, como CytC y MnSOD. Encontramos que tras el evento coronario, no sólo los valores de PGC-1 α aumentaban en el grupo de inducción, sino que también se incrementaban los niveles de RNA de las dos dianas (véase figura 5). Esto sugiere que no sólo aumenta la transcripción de PGC-1 α tras el infarto, sino que su actividad en la regulación transcripcional de otros genes mitocondriales lo hace forma proporcional. Este hecho puede sustentarse en la observación que la inducción tanto de CytC como de MnSOD es significativamente mayor en los pacientes con inducción de la expresión de PGC-1 α superior a 10 veces el valor basal.

Con el objeto de confirmar la significación de esta observación, se monitorizaron los niveles proteicos de CytC, y encontramos que tras el SCACEST, sólo el grupo con mayor inducción de PGC-1 α presentaba elevaciones significativas de la proteína (véase figura 6). Por tanto, esto indica que la inducción de PGC-1 α se traduce en regulación molecular de sus dianas hasta un nivel funcional, como lo es la síntesis proteica.

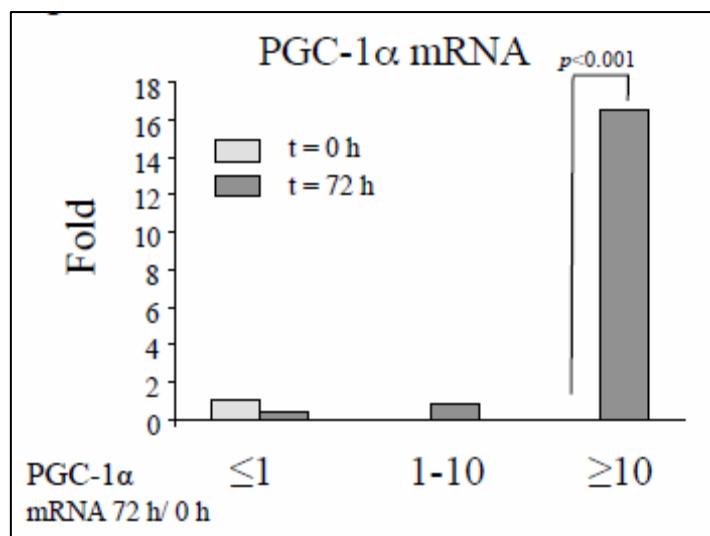


Figura 4. Inducción de PGC-1 α tras SCACEST. Muestra agrupada en función de los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por RT-PCR. t = tiempo, h = horas. Significativo si p<0.05.

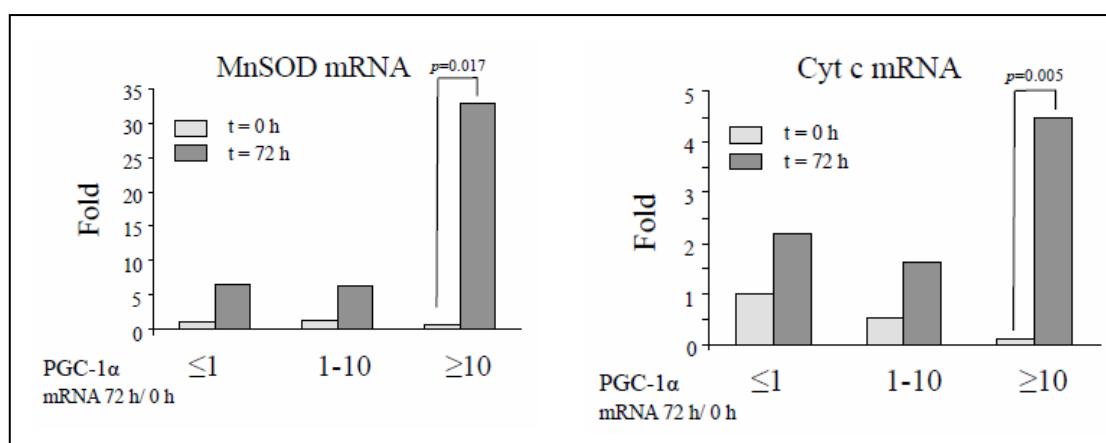


Figura 5. Inducción de MnSOD y CytC tras SCACEST estimada en base a los niveles de RNA al ingreso y a las 72 horas, determinados por RT-PCR. Distribución de la muestra en función de la inducción de PGC-1 α . t = tiempo, h = horas. Significativo si p<0.05

El análisis de la inducción de PGC-1 α y sus dianas tras SCACEST, nos muestra además que el grado de inducción de la molécula se relaciona de forma inversa con los niveles de PGC-1 α y CytC en el ingreso, sugiriendo que la actividad basal reducida de PGC-1 α implicaría inducciones más significativas tras el evento coronario (veáse figura 7).

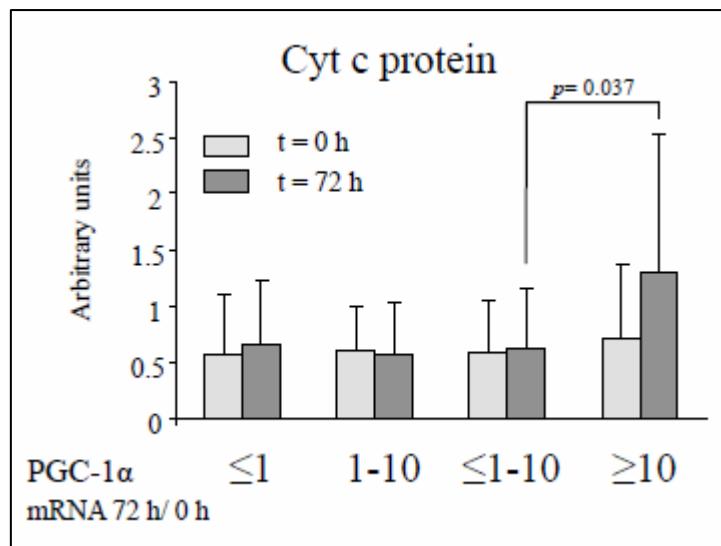


Figura 6. Inducción de los niveles de proteína CytC tras SCACEST. Muestra agrupada en función del nivel de inducción de PGC-1 α . Significativo p<0.05

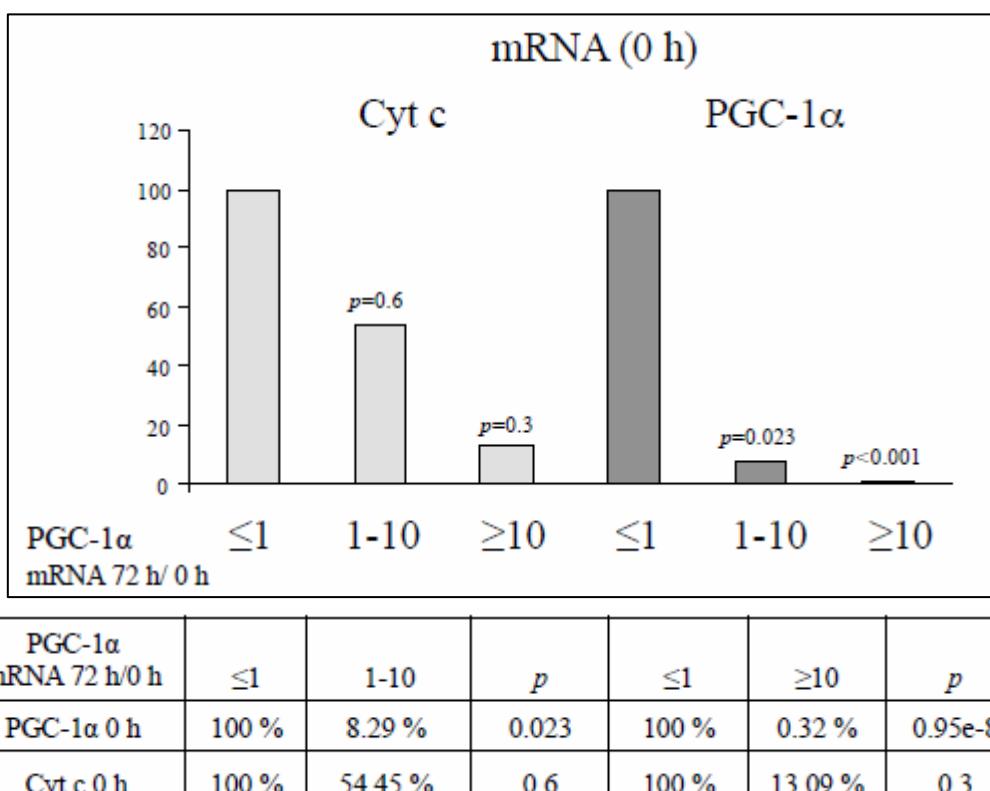


Figura 7. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se correlaciona negativamente con los niveles basales de PGC-1 α . La gráfica muestra el promedio de los niveles de RNA de CytC y PGC-1 α en el momento del ingreso en los tres grupos de inducción de PGC-1 α . Significación p<0.05

Implicación funcional de la inducción de PGC-1 α

Con la finalidad de determinar la repercusión funcional de la inducción de PGC-1 α , se comparó el grado de expresión de la molécula con el tamaño del infarto, en base a las siguientes variables: niveles plasmáticos máximos de TnI y CKMB, FEVI e ICS determinados por ecocardiografía, y porcentaje de necrosis miocárdica estimado a través de estudios de CMR por el área de RTG.

Encontramos que la inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relacionó con picos enzimáticos más elevados (TnI 119.87 vs 63.01 ng/mL, $p=0.039$ y CKMB 474.08 vs 170.73 ng/mL, $p=0.043$; véase figura 8) y áreas de necrosis estimadas por RTG en CMR mayores (porcentaje de área necrótica respecto a masa miocárdica total: 24.91 vs 10.90%; $p=0.012$; véase figura 9), sugiriendo que la inducción de la molécula forma parte de la respuesta celular frente a la isquemia tras el evento coronario.

De forma interesante, observamos además que la inducción de PGC-1 α tiende a ser más frecuente en pacientes con metabolismo glucídico alterado (véase figura 10) y en aquellos con niveles de PCR al ingreso más elevados (figura 8), aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa.

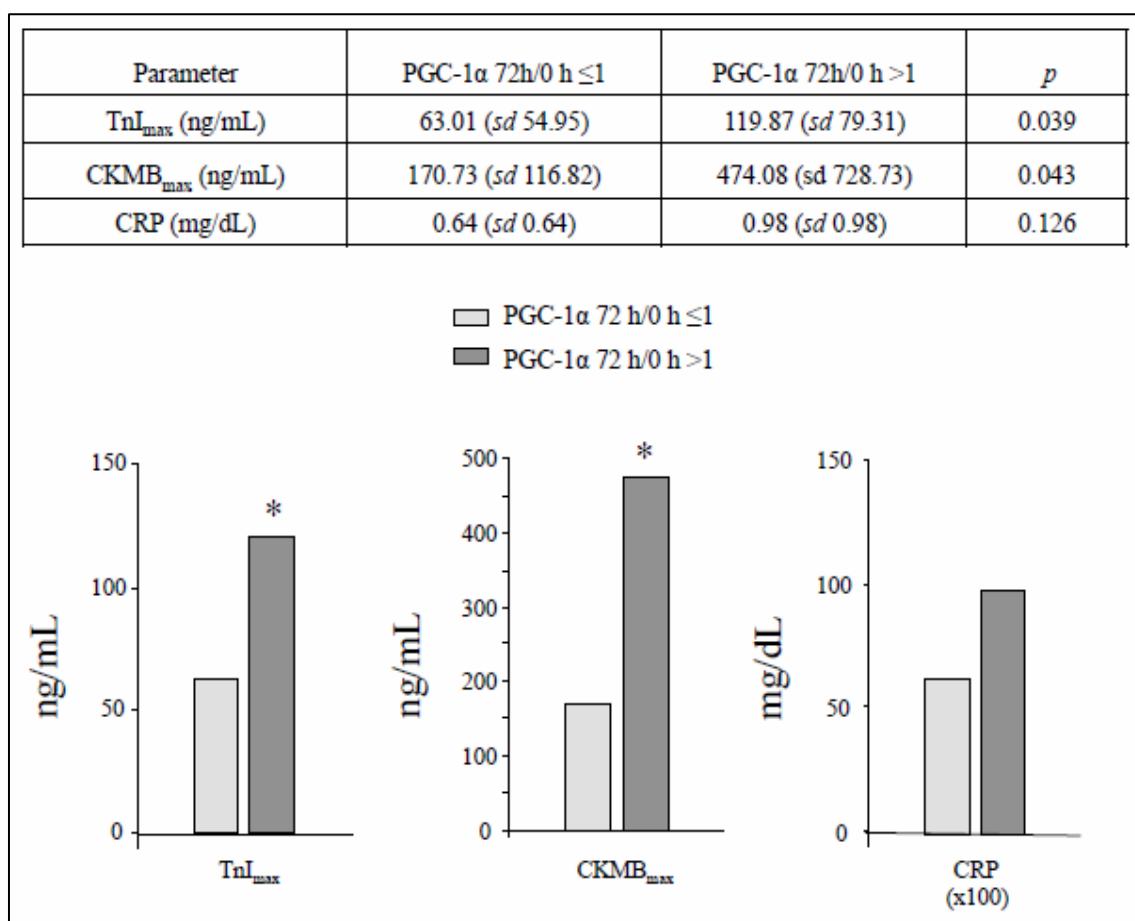


Figura 8. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona positivamente con niveles plasmáticos pico de TnI y CKMB más elevados y con mayores cifras de PCR no ultrasensible (CRP) al ingreso.

Significativo si $p < 0.05$

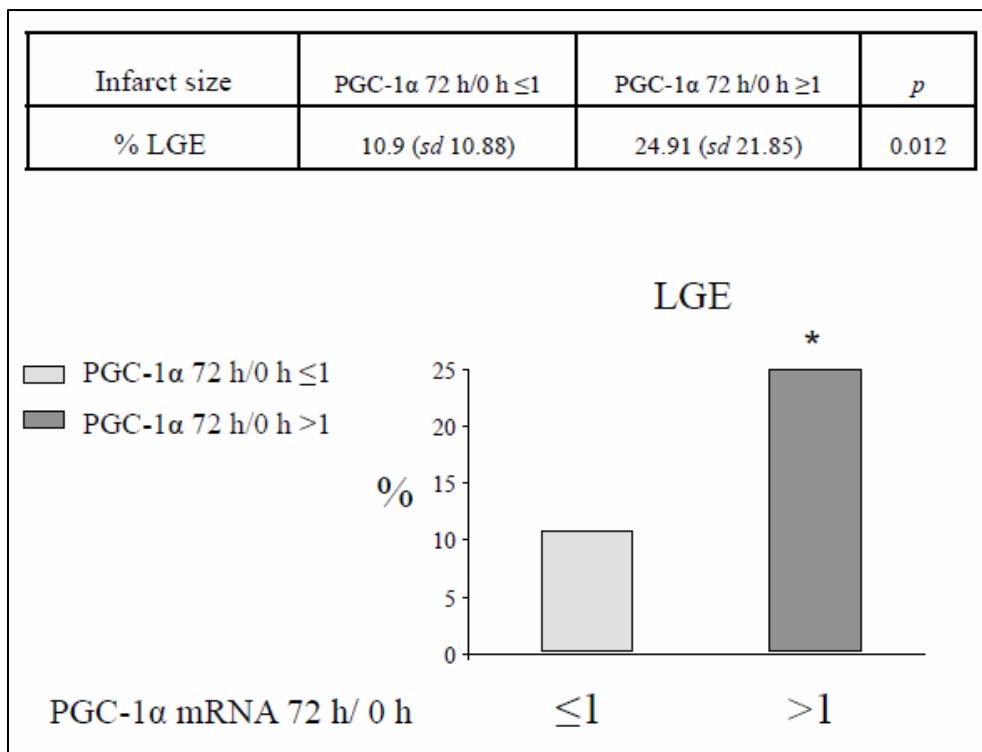


Figura 9. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST se relaciona con mayores áreas de necrosis, estimada mediante RTG en estudios de CRM. %LGE: porcentaje de RTG respecto a masa miocárdica total. Significativo si *p*<0.05

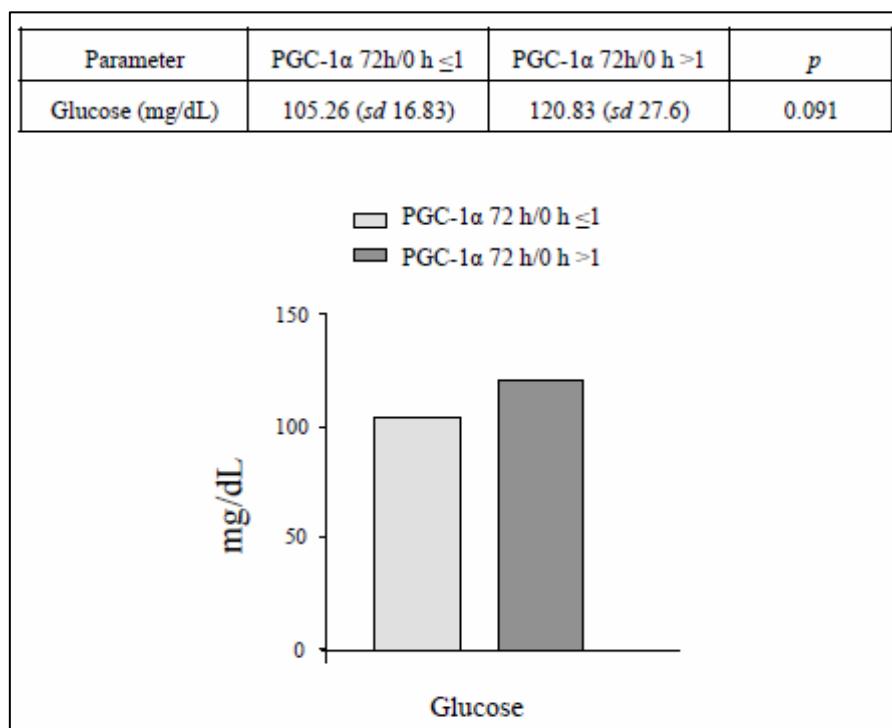


Figura 10. La inducción de PGC-1 α tras SCACEST es más frecuente en pacientes con metabolismo glucídico alterado. Los valores de glucosa expresan la media de tres determinaciones en ayunas durante el ingreso. Significativo si *p*<0.09

Al estudiar los parámetros funcionales ecocardiográficos determinados tras el infarto, encontramos que los pacientes con inducción de PGC-1 α presentaban peor FEVI (47.41 vs 53.96 %, p=0.025) y mayor ICS (1.79 vs 1.43, p=0.013, rango valores 1-4) (veáse figura 11). De forma llamativa, observamos que la disfunción ventricular izquierda es más frecuente en pacientes con intensa inducción de la molécula, independiente de la localización del infarto y a pesar del mayor tamaño de los infartos anteriores en nuestros pacientes (veáse figura 12).

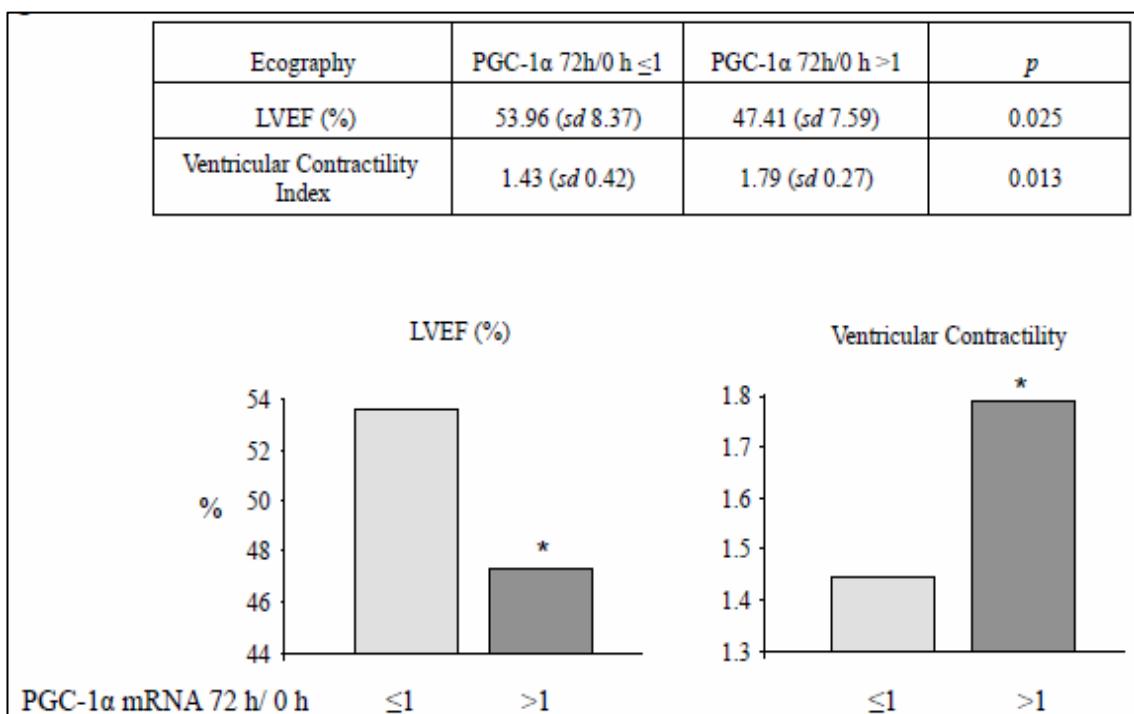


Figura 11. Los pacientes con inducción de PGC-1 α tras SCACEST presentan en la evolución clínica peor FEVI (LVEF) y mayor ICS (ventricular contractility index). Significativo si p<0.05

Activación inmunológica tras el infarto

Con el objeto de evaluar si la inducción observada monitorizaba en algún sentido la respuesta inmune tras el síndrome coronario agudo, decidimos analizar el recuento total de leucocitos, linfocitos y monolitos al ingreso y a las 72 horas. Encontramos, como ya está descrito previamente, que el recuento relativo de linfocitos disminuía en la evolución post-infarto, mientras el recuento de monocitos se veía incrementado, en la muestra global. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de pacientes, sugiriendo que la respuesta observada en PGC-1 α se debe a una regulación específica, y su expresión no es un reflejo de los cambios acontecidos en el número de leucocitos tras el infarto.

No obstante, debemos hacer notar algunas diferencias entre los grupos de carácter menor, ya que el grupo de inducción de la molécula presentó concentraciones de linfocitos mayores, y el incremento de monocitos a las 72 horas fue también más elevado (veáse figura 13 y tabla 1).

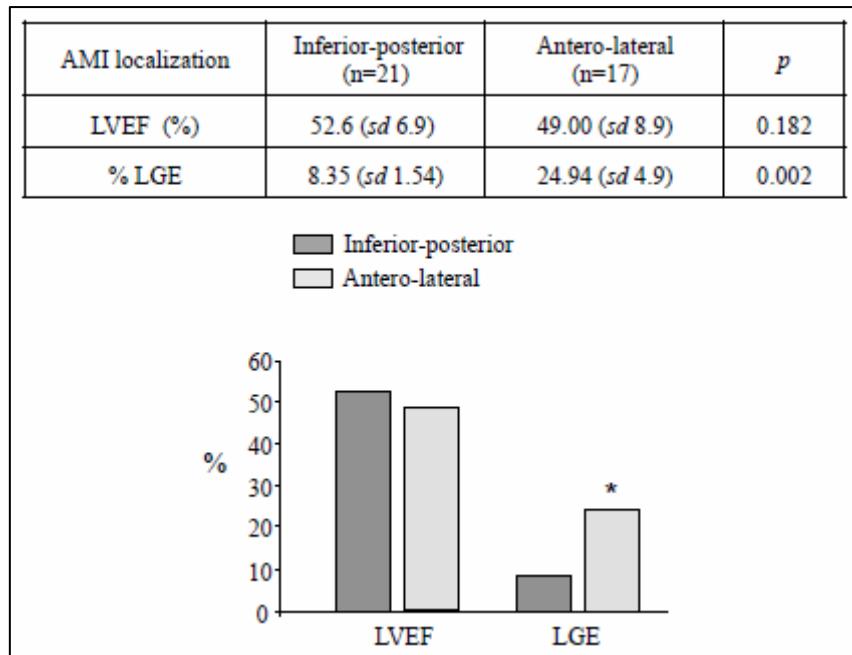


Figura 12. FEVI (LVEF) y RTG (LGE) de los pacientes del estudio en función de la localización del infarto: anterolateral e inferoposterior. FEVI como indicador de función y RTG como indicador de tamaño del infarto. Significativo si $p < 0.05$

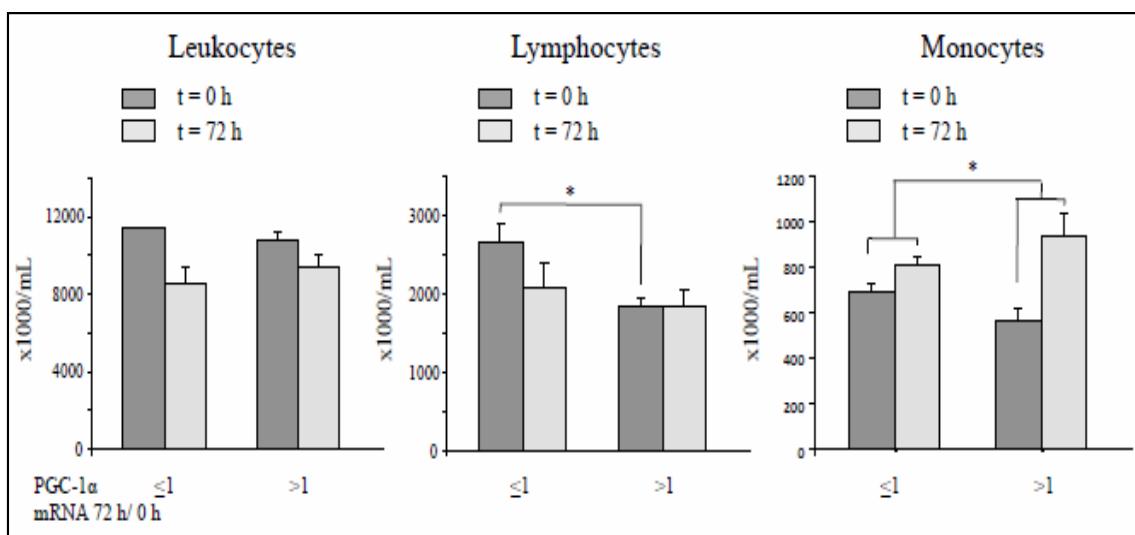


Figura 13. Recuento de leucocitos, linfocitos y monolitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α .

	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h \leq 1 (n= 26)	PGC-1 α mRNA 72 h/ 0 h >1 (n= 12)	p value
<i>White blood cell subtypes</i>			
Leukocytes 0 h (x1000/mL)	11426 (sd 820)	10775 (sd 826)	n.s.
Leukocytes 72 h (x1000/mL)	8584 (sd 413)	9408 (sd 683)	n.s.
(leuko. 72 h -leuko. 0 h)/ leuko. 0 h (%)	-34.3	-19.8	n.s.
Lymphocytes 0 h (x1000/mL)	2665 (sd 227)	1850 (sd 327)	0.04
Lymphocytes 72 h (x1000/mL)	2076 (sd 92)	1825 (sd 245)	n.s.
(lym. 72 h -lym. 0 h)/ lym. 0 h (%)	-29.1	-5.1	n.s.
Monocytes 0 h (x1000/mL)	684 (sd 44)	566 (sd 41)	n.s.
Monocytes 72 h (x1000/mL)	807 (sd 48)	933 (sd 97)	n.s.
(mono. 72 h -mono. 0 h)/ mono. 0 h (%)	10.9	32.1	0.05
Lymphocytes 0 h (%)	24.5 (sd 1.7)	18 (sd 3.2)	n.s.
Lymphocytes 72 h (%)	24.9 (SD +/- 1.33)	19.7 (SD +/- 2.3)	0.04
Monocytes 0 h (%)	6.2 (SD +/- 0.3)	6.1 (SD +/- 0.6)	n.s.
Monocytes 72 h (%)	9.3 (SD +/- 0.3)	9.9 (SD +/- 0.5)	n.s.

Tabla 1. Recuento total y relativo de leucocitos, linfocitos y monocitos al ingreso y a las 72 horas. Análisis comparativo entre grupos en función de la inducción de PGC-1 α . *White blood cell subtypes*: subtipo de leucocitos; *leukocytes*: leucocitos; *lymphocytes*: linfocitos ; *monocytes* : monocitos. Significativo si p<0.05; n.s. : no significativo

☒

Tabla 2. Resumen comparativo de los resultados en función de la inducción de PGC-1 α . Significativo si p<0.05

4.- Discusión

La recuperación de la capacidad oxidativa en los miocardiocitos es crucial durante la fase de reperfusión-recuperación tras un infarto agudo de miocardio. PGC-1 α es un regulador maestro del metabolismo celular oxidativo, con fuerte expresión en tejidos de actividad metabólica elevada como el miocárdico. Sin embargo, a pesar de la evidencia científica en estudios animales donde se ha demostrado el papel cardioprotector de este factor de transcripción, no se había caracterizado hasta el momento la posible implicación funcional de PGC-1 α en la regulación de las diferentes rutas metabólicas tras un evento coronario.

Los resultados del presente estudio sugieren que la monitorización de los niveles plasmáticos de PGC-1 α tras un SCACEST podría utilizarse como un interesante marcador de respuesta miocárdica durante la fase de recuperación del infarto.

Esta hipótesis se basa en el hecho que los pacientes con mayor nivel de expresión basal de la molécula y ausencia de inducción tras el evento, presentan menor necrosis miocárdica en la evolución, mientras los infartos más extensos se relacionan con pacientes que presentaban niveles pobres de expresión transcripcional al ingreso e intensa inducción de PGC-1 α a las 72 horas.

Es importante señalar que la inducción del cofactor se sigue de aumento proporcional en la expresión de las dianas génicas CytC y MnSOD, tanto en expresión de RNA como en síntesis proteica, lo que sirve como indicador de actividad de la molécula. El incremento de MnSOD en situaciones de isquemia-reperfusión es un hecho que reporta efectos protectores en el tejido donde se produce, como la evidencia básica ha demostrado en varios estudios. Por tanto, estos datos sugieren que la inducción de PGC-1 α tiene un carácter cardioprotector, en tanto estimula la expresión de enzimas de detoxificación mitocondrial en condiciones de máximo estrés oxidativo celular, y por tanto, permitirían confirmar el alcance del coactivador en su función regulatoria transcripcional.

Otro concepto importante se deriva de la conclusión según la cual podemos medir los niveles de PGC-1 α de manera fiable mediante PCR a partir de muestras de sangre periférica, y estas mediciones son un buen indicador de la actividad de la molécula. Ningún estudio hasta el momento se había aproximado en la posibilidad de determinar en muestras periféricas los niveles de PGC-1 α en pacientes con diagnóstico de infarto. Por ello, inicialmente, en base al conocimiento de la activación inmunológica que se produce tras un SCACEST, fue necesario evaluar si podía estimarse la expresión de la molécula en linfocitos murinos, tanto en estado basal como tras estimulación con IgM. Estos resultados apoyaron el aislamiento de la población linfocitaria durante el procesado de las muestras humanas para monitorizar la expresión de PGC-1 α , y permitieron, por tanto y de forma adicional, apoyar la hipótesis que la inducción de PGC-1 α en los linfocitos es parte de la activación inmune que sigue a un infarto de miocardio.

En relación a esta respuesta inmune, es sabido que tras un infarto de miocardio aumenta de manera considerable el recuento leucocitario en las primeras horas, producto de una activación inflamatoria en cascada, y se comprobó en nuestra muestra como, efectivamente, los resultados eran congruentes con la evidencia previa, y los pacientes al ingreso presentaban en su mayoría leucocitosis significativa, con detrimento en las cifras globales a las 72 horas. Sin embargo, no había diferencias significativas en la fórmula leucocitaria entre los dos grupos analizados en el estudio, lo que sugiere que la inducción de PGC-1 α es una respuesta específica de los linfocitos, independiente del cambio en el número de leucocitos.

Otro aspecto interesante de los resultados proviene de la observación que la inducción de PGC-1 α tiende a ser más frecuente en los pacientes con metabolismo glucídico alterado y aquellos con niveles más elevados de PCR al ingreso, aunque las diferencias no alcanzan poder estadístico. Recientemente se ha relacionado el incremento plasmático de PCR con un peor pronóstico en pacientes con infarto de miocardio sometidos a estrategia de reperfusión, mostrándose como un potente factor de riesgo en la estratificación de esta población⁷⁶. A pesar de la necesidad de más estudios, nuestro trabajo es coherente con la evidencia previa, y los resultados la apoyan en el sentido que los pacientes con infartos más extensos presentaban niveles más elevados de PCR a su llegada a urgencias. En relación al metabolismo de la glucosa, los resultados son aparentemente contradictorios. Por un lado, estudios previos han demostrado aumento de los niveles de RNA de PGC-1 α en el hígado de pacientes diabéticos⁷⁷, sin embargo, en general, los resultados en pacientes diabéticos son consistentes a la hora de determinar una pérdida de actividad de la molécula⁷⁸. Esta paradoja podría estar relacionada con el hecho demostrado que los pacientes diabéticos tienen generalmente una activación crónica basal del sistema inmune. Así, en nuestra muestra, los pacientes con alteración de la glucosa en ayunas, presentaron niveles basales de PGC-1 α reducidos e infartos más extensos, a pesar de la intensa inducción de la molécula.

Podemos explicar esto cotejando nuestros datos con la línea de la evidencia, donde está ampliamente aceptado que los estados de disfunción metabólica como la diabetes o la dislipemia suponen una depresión crónica de los niveles de expresión de PGC-1 α , y a pesar de la intensa inducción de la molécula que se produce en estos pacientes en situaciones de estrés oxidativo agudo, esta respuesta sería insuficiente debido a la disfunción mitocondrial generalizada que padecen. La definición molecular de esta situación, a través de pruebas que permiten la monitorización de los niveles de PGC-1 α durante la evolución del infarto, podría utilizarse en el futuro como un factor de riesgo añadido en la recuperación clínica de este tipo de pacientes.

Nuestros resultados, en resumen, sugieren que probablemente la actividad de PGC-1 α sea relevante a la hora de limitar el daño miocárdico tras un SCACEST, y que, por tanto, la monitorización de los niveles de expresión plasmáticos durante la evolución del evento resulte útil como marcador molecular de recuperación cardíaca, en cuanto se relaciona de forma significativa con la extensión del infarto.

Sin embargo, el estudio presenta una serie de limitaciones importantes. En primer lugar, no podemos asegurar que las variaciones en los niveles de expresión de PGC-1 α analizadas en linfocitos periféricos, reflejen cambios en la expresión de la molécula y sus dianas génicas en el tejido miocárdico. Además, a pesar que la evidencia previa en experimentación básica sugiere que la inducción de la molécula desempeña un papel en la protección miocárdica, no es posible establecer una relación de causalidad entre la inducción de PGC-1 α y su papel cardioprotector a partir de la observación de dicha asociación. Otra limitación del trabajo es la heterogeneidad de los pacientes, pues se incluyeron infartos de diversa localización y diferentes técnicas de reperfusión.

La dirección futura del proyecto irá encaminada a subsanar estas restricciones. En el laboratorio de investigación experimental, se analizará el grado de expresión de PGC-1 α en tejido miocárdico a partir de muestras histológicas y se relacionará con los niveles periféricos en un modelo murino de infarto agudo de miocardio. En investigación clínica, se relacionarán los niveles plasmáticos de PGC-1 α tras SCACEST con la cantidad de miocardio salvado por la reperfusión a partir de estudios de CRM. Para ello, se realizarán dos estudios de CRM a todos los pacientes del estudio. Un primer estudio en la fase aguda del evento clínico, identificando el área de edema miocárdico, que engloba tejido viable y no viable. Y un segundo estudio a los seis meses en el cual se

determinará el área de RTG, correspondiente a tejido necrótico no viable. La cantidad de miocardio salvado por la reperfusión se estima a partir de la diferencia entre ambas áreas. Por tanto, el objetivo principal de la segunda fase del proyecto será evaluar si la inducción de PGC-1 α tras SCACEST desempeña una función protectora en la recuperación del miocardio.

5.- Conclusiones

PGC-1 α es un coactivador transcripcional con un papel determinante en la regulación de los genes de protección mitocondrial frente a estrés oxidativo. En el modelo animal, podemos estimar la expresión de la molécula y sus dianas génicas en poblaciones celulares de timocitos y esplenocitos, así como su inducción tras estimulación específica. En pacientes con SCACEST, es posible medir los niveles de PGC-1 α a partir de muestras sanguíneas, así como monitorizar su expresión en la evolución del evento. La inducción de la molécula tras el infarto se relaciona con áreas de necrosis más extensas, mayor disfunción ventricular izquierda independientemente de la localización del infarto, y mayor movilización de enzimas de daño miocárdico. La inducción de PGC-1 α , que es más frecuente en pacientes diabéticos y con niveles de PCR más elevados al ingreso, se sigue de un incremento proporcional en la expresión de dianas de protección celular frente a isquemia.

6.- Financiación del proyecto y colaboradores

El trabajo ha sido financiado a través de la concesión de varias becas y proyectos de investigación: proyecto SAF 2009-07599 del Ministerio de Ciencia e Innovación, convocatoria 2009; beca de investigación intramural de la FiHGU, convocatorias 2008 y 2010; y beca de investigación básica de la Sociedad Española de Cardiología, convocatoria 2010. El CNIC recibe además financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación y de la Fundación proCNIC.

El desarrollo del proyecto ha sido posible gracias a la colaboración del Servicio de Cardiología del Hospital General de Valencia con tres unidades de trabajo fundamentales, cuyos coordinadores son: la Dra. María Monsalve, responsable de la línea de investigación básica del proyecto e investigadora principal del grupo de regulación transcripcional de los sistemas de protección frente a estrés oxidativo, del laboratorio de Cardiología Regenerativa del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) Carlos III de Madrid; el Dr. Manuel Mata, responsable del procesado y análisis de las muestras sanguíneas humanas y director del laboratorio de biología molecular de la Fundación para la Investigación del Hospital General Universitario (FiHGU) de Valencia; y el Dr. Jordi Estornell, cardiólogo especialista en tomografía computerizada y resonancia cardíaca, y responsable de los estudios de CRM, de la Unidad de TAC y RMN de Eresa en Valencia.

Bibliografía

1. Jemal A et al. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA*. 2005 Sep 14; 294(10):1255-9
2. Graham I et al. Guías de práctica clínica sobre prevención de la enfermedad cardiovascular: versión resumida. *Rev Esp Cardiol*. 2008; 61(1):e1-e49
3. Foot DK, Lewis RP, Pearson TA, Beller GA. Demographics and cardiology. 1950-2050. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35 (5 Suppl B):B66-80
4. Leal J, Luengo-Fernández R, Gray A, Petersen S, Rayner M. Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union. *Eur Heart J*. 2006; 27:1610-9
5. Moreu-Burgos J, Macaya-Miguel C. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol*. 2007;7(Supl D):19-25
6. Vilariño J, Esper R, Badimón JJ. Fisiopatología de los síndromes coronarios agudos. Tres paradigmas para un nuevo dogma. *Rev Esp Cardiol*. 2004;4 (Supl G):13-24
7. Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90:140-8
8. Khazaei M, Moeien-Afshari F, Laher I. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology*. 2008;15:49-67
9. Glass, C. K., and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104, 503-516
10. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., and Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404, 787-790
11. Betabert, R., Sherer, T. B., Di Monte, D. A., and Greenamyre, J. T. (2002) Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis. *Brain Pathol* 12, 499-510
12. Aliev, G., Smith, M. A., de la Torre, J. C., and Perry, G. (2004) Mitochondria as a primary target for vascular hypoperfusion and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 4, 649-663
13. Milakovic, T., and Johnson, G. V. (2005) Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 280, 30773-30782
14. Liang, L. P., Ho, Y. S., and Patel, M. (2000) Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. *Neuroscience* 101, 563-570
15. Ungvari, Z., Gupte, S. A., Recchia, F. A., Batkai, S., and Pacher, P. (2005) Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 3, 221-229
16. Brownlee, M. (2003) A radical explanation for glucose-induced beta cell dysfunction. *J Clin Invest* 112, 1788-1790
17. Jassem, W., and Heaton, N. D. (2004) The role of mitochondria in ischemia / reperfusion injury in organ transplantation. *Kidney Int* 66, 514-517
18. Modica-Napolitano, J. S., and Singh, K. K. (2004) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion* 4, 755-762
19. Huang, H., and Manton, K. G. (2004) The role of oxidative damage in mitochondria during aging: a review. *Front Biosci* 9, 1100-1117
20. Valle, I., Alvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., Monsalve, M. PGC-1 alpha regulates the mitochondrial antioxidant defence system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Res*. (2005) 66:562-573

21. Puigserver, P. Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha. *Int J Obes (Lond)* 2005;29:Suppl 1:S5-9
22. Benton CR, Wright DC, Bonen A. PGC-1 α -mediated regulation of gene expression and metabolism: implications for nutrition and exercise prescriptions. *Appl Physiol Nutr Metab*.2008;33:843-62.
23. Duncan JG, Finck B. The PPAR α - PGC-1 α Axis Controls Cardiac Energy Metabolism in Healthy and Diseased Myocardium. *PPAR Research*. doi:10.1155/253817. 2008
24. Sano M, Schneider MD. Energizer: PGC-1 α keeps the heart going. *Cell Metabolism*. (2005). Vol 1. 216-18
25. Arany Z, Novikov M, Chin S, Ma Y, Rosenzweig A, Spiegelman, B. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1-alpha. *PNAS*. doi/10.1073. 2006
26. Finck B. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. Review. *Cardiovascular Res*. 2007;73:269-277.
27. Chiueh, C. C., Andoh, T., and Chock, P. B. Induction of thioredoxin and mitochondrial survival proteins mediates preconditioning-induced cardioprotection and neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1042:403-418.
28. Hida, A., Kawakami, A., T, M., Yamosaki, S., Nakashima, K., Tanaka, F., Izumi, Y., Tamai, M., Huang, M., Ida, H., Nakamura, H., Origuchi, T., Ueki, Y., and Eguchi, K. Nitric oxide acts on the mitochondria and protects human endothelial cells from apoptosis. *J Lab Clin Med* 144(3), 148-155. 2004
29. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1 α . *The FASEB Journal*. 1889-91. 2006
30. Arany et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metabolism*. (2005). Vol 1. 259-271
31. Ingwall, JS (2002). Energetic basis for heart failure. In *Heart Failure: A companion to Braunwald's Heart Disease*. D. Mann, ed.
32. Faerber G, Barreto-Perreia F, Schoepe M, Gilsbach R, Schrepper A, Schwarzer M et al. Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: Reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 492-500. Vol 141. 2011
33. Hu P, Zhang D, Swenson L, Chakrabarti G, Abel ED, Litwin SE. Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signalling during pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1261-9
34. Rui C, Fengxia L, Shigeto M, Qian L, Junji M, Jun-ichi Y et al. The effects of PPARalpha agonist on myocardial damage in obese diabetic mice with heart failure. *Int Heart Journal*. 2010;51:3:199-206
35. Honda T et al. Pioglitazone, a peroxisome proliferators-activated receptor-gamma agonist, attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in mice with metabolic disorders. *J Mol Cell Cardiol*. 2008. 44(5):915-26
36. Shiomi T, Tsutsui H, Hayashidani S, Suematsu N, Ikeuchi M et al. Pioglitazone, a PPAR gamma agonist, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*. 2002;106:3126-32
37. Tian-Li Yue et al. In vivo Myocardial Protection From Ischemia-Reperfusion Injury by the Peroxisome Proliferator-Activator receptor-gamma agonist Rosiglitazone. *Circulation*. 2001. 104:2588-2594

38. Wayman N, Hattori Y, McDonald M, Mota-Filipe H, Cuzzocrea S et al. Ligands of the PPAR gamma and alpha reduce myocardial infarct size. *The FASEB Journal*. 2002; 16:1027-40
39. Sun CK, Chang LT, Sheu JJ, Wang CY, Youssef AA, Wu CJ et al. Losartan preserves integrity of cardiac gap junctions and PGC-1 α gene expression and prevents cellular apoptosis in remote area of left ventricular myocardium following acute myocardial infarction. *Int Heart J*. 2007;48:533-542
40. Ruiz-Meana M, García-Dorado D. Fisiopatología del daño por isquemia-reperfusión: nuevas oportunidades terapéuticas en el infarto agudo de miocardio. Medicina cardiovascular traslacional (II). *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(2):199-209
41. García-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 1992;85:1160-74
42. Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe calcium overload. *Am J Physiol*. 1992;263:H1262-9
43. Inserte J, García-Dorado D, Hernando V, Soler-Soler J. Calpain-mediated impairment of Na/K/ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res*. 2005;97:465-73
44. García-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation*. 1997;96:3579-86
45. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Nature*. 2005;434:658-62
46. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia-reperfusion injury. *Ann NY Acad Sci*. 2005;1047:248-58
47. West MB, Rokosh G, Obal D, Velayutham M, Yu-Ting X, Hill B, Keith R et al. Cardiac myocyte-specific expression of inducible nitric oxide synthase protects against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2008; 44:1970-78
48. Dirksen MT, Laarman GJ, Simoons ML, Duncker DJ. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovascular Res*. 2007;74:343-55
49. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. *Circulation*. 2000;102:3032-8
50. Zeymer U, Suryapranata H, Monassier JP, Opolski G, Davies J, Rasmanis G et al. The sodium/hydrogen exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1644-5
51. The EXPEDITION study investigators. Effects of sodium/hydrogen exchange inhibition by cariporide on death and nonfatal myocardial infarction in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery. *Circulation*. 2003;108:3M
52. Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR et al. Recombinant human superoxide dismutase fails to improve recovery of

- ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 1994;89:1982-91
53. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473-81
54. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112:2143-8
55. Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2005;65:361-7
56. Ma X, Zhang X, Li C, Luo M. Effect of postconditioning on coronary blood flow velocity and endothelial function and LV recovery after myocardial infarction. *J Interv Cardiol*. 2006;19:367-75
57. Prasad A, Stone GW, Colmes D, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction and cardioprotection: the “dark side” or reperfusion. *Circulation*. 2009;120:2105-12
58. Gibbons RJ, Christian TF, Hopfenspirger M, Hodge DO, Bailey KR. Myocardium at risk and infarct size after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: implications for the design of randomized trials of acute intervention. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:616-24
59. Zadelaar S, Kleemann L, Verschuren J, de Vries WdW, van der Hoorn H, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1706-24
60. Plump A. S., Smith J. D., Hayek T., Aalto-Setala K., Walsh A., Verstuyft J. G., Rubin E. M., Breslow J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992; 71; 343—353
61. Dong F, Li Q, Sreejayan N, Nunn JM, Ren J. Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. *Diabetes*. 2007. 56;9:2201-12
62. Duncan JG, Fong JL, Medeiros DM, Finck BN, Nelly DP. Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway. *Circulation*. 2007. 115;7:909-17
63. Shan K, Constantine G, Sivananthan M, Flamm S. Role of cardiac magnetic resonance imaging in the assessment of myocardial viability. *Circulation*. 2004;109:1328-34
64. Klocke FJ. Cardiac resonance measurements of area at risk and infarct size in ischemic syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:2489-90
65. Marholdt H, Wagner A, Holly TA, et al. Reproducibility of chronic infarct size measurement by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation*. 2002;106:2322-27
66. Al Saadi N, Nagel E, Gross M, et al. Noninvasive detection of myocardial ischemia from perfusion reserve based on cardiovascular magnetic resonance. *Circulation*. 2000;101:1379-83
67. Baer FM, Theissen P, Schneider CA, et al. Dobutamine magnetic resonance imaging predicts contractile recovery of chronically dysfunctional myocardium after successful revascularization. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31:1040-48

68. Raman SV, Simonetti OP, Winner M, Dickerson J, Mazzaferri E, Ambrosio G. Cardiac magnetic resonance with edema imaging identifies myocardium at risk and predicts worse outcome in patients with non ST-segment elevation acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2480-88
69. Monmeneu JV, Bodí V, Sanchis J, López-Lereu M, Mainar L, Nuñez J et al. Valoración del edema tras un infarto agudo de miocardio con elevación del ST mediante resonancia magnética cardiaca. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(8):858-66
70. García-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Pérez-Villa F, Barrabés J, et al. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonance imaging early after coronary artery occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1993;27:1462-9
71. Friedrich MG, Abdel-Aty H, Taylor A, Schulz-Menger J, Messroghli D, Dietz R. The salvaged area at risk in reperfused acute myocardial infarction as visualized by cardiovascular magnetic resonance. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1581-7
72. Eitel I, Desch S, Fuernau G, Hildebrand L, Gutberlet M, Schuler G, Thiele H. Prognostic significance and determinants of myocardial salvage assessed by cardiovascular magnetic resonance in acute reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2470-9
73. Van der Werf (coordinador) et al. Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología (ESC). Manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación persistente del segmento ST. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62(3):e1-e47
74. Arós F, Alegria E, Boraita A. Pruebas de esfuerzo en cardiología. Sección de Cardiopatía Isquémica y Unidades Coronarias y Grupo de Trabajo de Cardiología del Deporte de la SEC. 1º ed. Barcelona: Sanofi-Synthélabo, SA;2000. p. 1-17
75. Rijneke RD, Ascoop CA, Talmon JL. Clinical significance of upsloping ST segments in exercise electrocardiography. *Circulation.* 1980;61:671-8
76. Ortolani P, Marzocchi A, Marrozzini C, Palmerini T, Sala F, Taglieri N et al. Predictive value of high sensitivity C-reactive protein in patients with ST elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2008;29:1241-9
77. Soyal S, Krempler F, Oberkofler H, Patsch W. PGC1alpha: a potent transcriptional cofactor involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2006;49:1477-88
78. Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J et al. PGC1alpha responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet.* 2003;34:267-73
79. Garcia C, Feve B, Ferre P, Halimi S, Baizri H, Bordier L et al. Diabetes and inflammation: fundamental aspects and clinical implications. *Diabetes Metab.* 2007;36:327-338