

# Linfocitos T y monocitos activados en la reestenosis coronaria. ¿Reflejan la persistencia de un mecanismo inflamatorio?

Francisco Navarro-López<sup>a</sup>, Antonio Francino<sup>a</sup>, Antonio Serra<sup>a</sup>, Montserrat Enjuto<sup>a</sup>, Juan Carlos Reverter<sup>b</sup>, Teresa Jimenez de Anta<sup>c</sup> y Amadeo Betriu<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Cardiología Molecular. Departamento de Cardiología (ICMCV). Hospital Clínic (IDIBAPS). Universidad de Barcelona. Barcelona. <sup>b</sup>Laboratorio de Cardiología Molecular. Departamento de Hemoterapia y Hemostasia. Hospital Clínic (IDIBAPS). Universidad de Barcelona. Barcelona. <sup>c</sup>Laboratorio de Cardiología Molecular. Departamento de Microbiología. Hospital Clínic (IDIBAPS). Universidad de Barcelona. Barcelona. España.

**Objetivos.** El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la relación de la reestenosis coronaria postangioplastia con la actividad inflamatoria e inmunitaria en la sangre periférica, y explorar su posible asociación con infecciones latentes.

**Pacientes y método.** Se estudiaron 46 pacientes consecutivos con angina a los que se practicó una angioplastia coronaria percutánea y un control angiográfico a los 6 meses. Se tomaron muestras de sangre venosa antes de la intervención, 24-48 h después y a los 6 meses. Se determinó la expresión de las moléculas de adhesión en los leucocitos mediante la técnica de la citometría de flujo. Se cuantificaron las concentraciones de las citocinas proinflamatorias interleucina (IL) 6 y factor de necrosis tumoral (TNF) alfa, así como los receptores solubles de la IL-2 en el plasma, y se utilizaron las reacciones antigénicas para detectar la infección por *Chlamydia pneumoniae* y *Cytomegalovirus*.

**Resultados.** Los pacientes con reestenosis coronaria angiográfica (27 de 46) presentaron un aumento significativo de los linfocitos T citotóxicos CD3+/CD56+ ( $18,8 \pm 7,1$  frente a  $6,12 \pm 2,7\%$ ;  $p = 0,005$ ) y de monocitos activados (CD11b:  $1.383 \pm 624$  frente a  $990 \pm 484$  MFI;  $p = 0,025$ ; CD64:  $76,0 \pm 28,7$  frente a  $56,7 \pm 21,8$  MFI;  $p = 0,014$ ) a los 6 meses, sin relación aparente con el aumento de las citocinas o la positividad de las reacciones antigénicas infecciosas.

**Conclusiones.** La reestenosis coronaria se asocia a una reacción inflamatoria/inmunitaria persistente, que no parece estar relacionada con las infecciones latentes estudiadas. La persistencia de actividad inflamatoria a los 4-6 meses sugiere que las intervenciones destinadas a prevenir la reestenosis deberían mantenerse durante meses.

**Palabras clave:** Reestenosis. Angioplastia coronaria. Linfocitos. Leucocitos. Interleucina. Infección.

## Late T-Lymphocyte and Monocyte Activation in Coronary Restenosis. Evidence for a Persistent Inflammatory/Immune Mechanism?

**Aims.** This study was made to determine if restenosis after percutaneous coronary angioplasty is associated with acute or chronic inflammatory/immunologic activity, and explored possible relationships with latent infection.

**Patients and method.** Forty-six consecutive patients underwent elective PTCA and 6 months of angiographic follow-up. Peripheral venous blood samples were obtained at baseline, 24-48 h, and 4-6 months post-intervention. Flow-cytometric methods were used to measure early and late circulating leukocyte activation status. IL-6 and TNF-alpha cytokines, and IL-2 soluble receptor concentrations were determined in all plasma samples. *Chlamydia pneumoniae* and *Cytomegalovirus* antibody assays were performed to detect infectious disease.

**Results.** Angiographic coronary stenosis developed in 27 out of 46 patients. At 6 months of follow-up, these patients showed a significant increase in circulating cytotoxic T-lymphocytes CD3+/CD56+ ( $18.8 \pm 7.1$  vs  $6.12 \pm 2.7\%$ ;  $p = 0.005$ ) and activated monocytes (CD11b:  $1,383 \pm 624$  vs  $990 \pm 484$  MFI,  $p = 0.025$ ; CD64:  $76.0 \pm 28.7$  vs  $56.7 \pm 21.8$  MFI;  $p = 0.014$ ), with no apparent relation to increased cytokines or latent infectious disease.

**Conclusions.** Restenosis appears to be associated to inflammatory and immunological activity that persists 6 months after coronary intervention. No relationship was found with the infections studied. The presence of inflammatory activity 4-6 months after PTCA suggest that pharmacological therapeutic interventions to prevent restenosis should be maintained for months.

**Key words:** Restenosis. Coronary angioplasty. Lymphocytes. Leukocytes. Interleukins. Infection.

Full English text available at: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

Financiado por una beca del Ministerio de Educación (SAF97-0124)

Correspondencia: Dr. F. Navarro-López.  
Servicio de Cardiología. Hospital Clínic. Universidad de Barcelona.  
Villarroel, 170. 08036 Barcelona. España.  
Correo electrónico: [navarro@medicina.ub.es](mailto:navarro@medicina.ub.es)

Recibido el 29 de julio de 2002.

Aceptado para su publicación el 17 de enero de 2003.

## INTRODUCCIÓN

La índole inflamatoria de las placas de ateroma está hoy fuera de toda duda<sup>1</sup>, y cabe pensar que la inflamación también desempeña un papel relevante en la génesis de la reestenosis coronaria postangioplastia

**ABREVIATURAS**

ACTP: angioplastia coronaria transluminal percutánea.

IL-6: interleucina 6.

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa.

IL-2 RS: receptor soluble de la interleucina 2.

CMV: Citomegalovirus.

(ACTP). Los patólogos han descrito, en efecto, la presencia de infiltrados de células inflamatorias (monocitos/macrófagos) e inmunocitos (linfocitos T) en el tejido reestenoso<sup>2-4</sup>, y los estudios de seguimiento angiográfico han asociado la aparición de la reestenosis con la actividad inflamatoria previa o inducida por la ACTP. Esta actividad inflamatoria se ha detectado clínicamente por la activación de los leucocitos circulantes (monocitos y polimorfoelulares), que expresan moléculas de adhesión en la superficie celular<sup>5,6</sup>, el aumento de las citocinas proinflamatorias, y en particular la interleucina (IL) 6 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), producido por los monocitos activados<sup>7,8</sup>, y por el incremento de las proteínas reactivantes de la fase aguda, como la proteína C reactiva sintetizada en el hígado por efecto de la IL-6<sup>9,10</sup>. Se desconoce, sin embargo, el origen y la naturaleza de esta inflamación, así como su comportamiento a largo plazo<sup>11</sup>, aunque se ha suscitado recientemente la posibilidad de que la actividad inflamatoria/inmunitaria pudiera estar relacionada con una infección local o sistémica<sup>12-14</sup>, un fenómeno trombótico<sup>15</sup> o un proceso inmunológico específico sobreañadido<sup>16</sup>.

El objetivo de este trabajo fue analizar, de manera prospectiva, la relación de la reestenosis coronaria con la respuesta inflamatoria/inmunitaria aguda y crónica post-ACTP, a juzgar por: *a*) la activación de los leucocitos en la sangre venosa periférica (linfocitos, monocitos y neutrófilos), y *b*) la producción de citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) e inmunitarias (IL-2 RS). Como objetivo secundario se estudió su posible asociación con infecciones latentes.

**PACIENTES Y MÉTODO**

Se estudiaron prospectivamente 46 pacientes coronarios consecutivos con angina de pecho, de edades comprendidas entre los 38 y 76 años, a los que se practicó con éxito una intervención coronaria transluminal percutánea electiva (año 1988), incluyendo 23 casos de aterectomía. En la tabla 1 se describen las características de la población estudiada. Se excluyeron los pacientes que habían tenido angina la última semana, con el fin de minimizar los posibles efectos de la fase aguda de la angina inestable sobre la activación

leucocitaria, los infartos de miocardio de menos de 15 días de evolución, y los pacientes con enfermedad vascular periférica. Se practicó coronariografía de control a los 6 meses. El estudio fue aprobado por el comité ético del hospital y se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes.

**Angiografía coronaria y ACTP**

La coronariografía se practicó mediante la técnica estándar de Judkins, utilizando un introductor femoral del 6 Fr que se sustituía por uno de 8 Fr para practicar la ACTP, con o sin implantación de un *stent* de Palmar-Schatz, o la práctica de una aterectomía direccional según la técnica habitual. Se consideró que la intervención coronaria había tenido éxito si la estenosis angiográfica residual era < 50%, en ausencia de complicaciones. Se retiraba el introductor a las 4 h del procedimiento o más tarde, el mismo día, si el tiempo de coagulación activada era inferior a los 170 s. Se administraron 10.000 U de heparina intravenosa antes del procedimiento, y todos los pacientes recibieron idéntico tratamiento durante el período postintervención (ticlopidina y aspirina).

El análisis cuantitativo de la coronariografía inicial y del seguimiento a los 6 meses fue realizado por dos observadores independientes, que utilizaron un sistema computarizado (ImageComm Systems, EE.UU.). El diámetro luminal mínimo, el diámetro de referencia interpolado y la estenosis porcentual se determinaron en telediástole, utilizando la misma proyección en la coronariografía previa, después de la intervención y a

**TABLA 1. Datos demográficos y clínicos**

|                                   | Pacientes<br>sin reestenosis<br>(n = 19) | Pacientes<br>con reestenosis<br>(n = 27) | p     |
|-----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------|
| Edad (años)                       | 59 $\pm$ 13                              | 57 $\pm$ 10                              | 0,500 |
| Sexo: varones (%)                 | 16 (84,2%)                               | 21 (77,8%)                               | 0,716 |
| Angina inestable                  | 6 (31,6%)                                | 12 (44,4%)                               | 0,566 |
| Tiempo de la última angina (días) | 20 (15-37)                               | 27 (12-78)                               | 0,867 |
| Factores de riesgo                |                                          |                                          |       |
| Diabetes                          | 6 (31,6%)                                | 5 (18,5%)                                | 0,484 |
| Tabaquismo                        | 6 (31,6%)                                | 12 (44,4%)                               | 0,465 |
| Hipertensión                      | 5 (27,8%)                                | 14 (56%)                                 | 0,119 |
| Colesterol total (mg/dl)          | 217 $\pm$ 37                             | 203 $\pm$ 49                             | 0,310 |
| cHDL (mg/dl)                      | 34,8 $\pm$ 11                            | 39,3 $\pm$ 11                            | 0,200 |
| Medicación                        |                                          |                                          |       |
| ASA                               | 17 (89,5)                                | 25 (92,6%)                               | 1,000 |
| Nitratos                          | 3 (15,8%)                                | 10 (38,5%)                               | 0,182 |
| Estatinas                         | 13 (68,4%)                               | 15 (61,5%)                               | 0,483 |
| Antagonistas del calcio           | 8 (42,1%)                                | 12 (44,4%)                               | 1,000 |
| Bloqueadores beta                 | 13 (68,4%)                               | 16 (61,5%)                               | 0,523 |

Los datos se expresan como media  $\pm$  DE, el número y porcentaje (%) de pacientes o la mediana y el rango intercuartil. CHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

los 6 meses. Se utilizó el catéter-guía como referencia para la calibración. La pérdida tardía durante el período de seguimiento se definió como la diferencia entre el diámetro luminal mínimo en la coronariografía post-ACTP y la de los 6 meses, y el índice de pérdida. Se calificó como reestenosis a la presencia de una estenosis de  $\geq 50\%$  de reducción de la luz en el segmento tratado a los 6 meses, si después de la intervención era  $< 50\%$ .

### Activación de los leucocitos. Citometría de flujo y moléculas de adhesión

La activación de los linfocitos, monocitos y neutrófilos se analizó mediante la técnica de la citometría de flujo, que permite cuantificar la expresión de las moléculas de adhesión en la membrana celular (los marcadores de superficie).

Se analizaron en cada enfermo 3 muestras de sangre venosa periférica extraídas antes de la angioplastia, tras 24-48 h y 6 meses después. La punción se practicó sin torniquete y la sangre se coleccionó en un tubo con EDTA, introducido inmediatamente en hielo sin fijar, y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se analizaron por duplicado.

Para medir la expresión de los receptores se utilizó el método de inmunofluorescencia directa. Se analizaron las muestras con los siguientes anticuerpos: CD11a, CD11b, CD11c (Dako, Barcelona, España); CD3, CD16, CD33 and CD56 (Becton y Dickinson, CA, EE.UU.); CD66a y CD66b (CLB, Amsterdam); CD64 (Serotec). Se utilizaron como controles marcados los anticuerpos monoclonales antirratón (Isotype matched) FITC or PE-conjugated (IgG1 FITC Immunotech and IgG2 PE Caltag). Se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de sangre total con concentraciones saturadas de anticuerpos monoclonales antihumanos conjugados con FITC o PE (ficoeritrina). Después de incubarlos durante 20 min en la oscuridad y a temperatura ambiente, se lisaron los hematíes y se fijaron los leucocitos utilizando una solución comercial (FACS Lysing Solution, Becton and Dickinson). A continuación se lavaron las células dos veces con PBS y se almacenaron en la oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Inmediatamente después de la tinción, se midió la fluorescencia de  $2 \times 10^6$  células con un citómetro de flujo FACSscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, EE.UU.) utilizando el programa Lysis II. Se identificaron los neutrófilos, monocitos y linfocitos gracias a sus propiedades de dispersión. Las muestras se leyeron en escala logarítmica con FL1 (fluoresceína, con fluorescencia a 530 nm) o FL2 (phycoerythrin, fluorescencia a 585 nm). Se registró el canal medio de intensidad de la fluorescencia (MFI) en unidades arbitrarias. Se determinó el porcentaje de linfocitos T citotóxicos y NK (*natural killer cells*) según la positividad para el CD3 y el CD56.

### Citocinas

Se recogieron las muestras de sangre en tubos Vacutainer y, después de la coagulación, se separaron mediante centrifugación y se guardaron en tubos de ensayo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se determinaron las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-2 SR (el receptor soluble de la IL-2) utilizando un inmunoanálisis en fase sólida de alta sensibilidad (IL-6 y TNF- $\alpha$ : EASIA, Medgenix Diagnostics; IL-2 RS, Immunotech). Las determinaciones se hicieron por duplicado y se obtuvo la media.

### Anticuerpos para *Chlamydia pneumoniae* y *Cytomegalovirus* (CMV)

Las determinaciones de los anticuerpos anti-CMV IgG se realizaron mediante un equipo de ensayo ELISA (Cytomegelisa II) y las de anticuerpos anti-*Chlamydia pneumoniae* IgG mediante inmunofluorescencia indirecta. Se consideraron negativos los títulos de anticuerpos inferiores a 1/64. Las pruebas se realizaron sin conocer los datos angiográficos.

### Análisis estadístico

Los datos se expresan como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media). Las diferencias entre los dos grupos de pacientes con y sin reestenosis se analizaron mediante la prueba de la t de Student o el test de la  $\chi^2$ . Los cambios intragrupo en los 3 estadios pre y post-ACTP agudo y crónico se analizaron mediante el análisis de la varianza para muestras repetidas. Se analizaron las correlaciones entre los datos de los marcadores inflamatorios mediante la prueba no paramétrica rho de Spearman. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizó con un programa SPSS, versión 9.

## RESULTADOS

### Características demográficas, clínicas y angiográficas

Se confirmó la aparición de una reestenosis angiográfica a los 6 meses en 27 de los 46 pacientes consecutivos (59%; IC del 95%, 44,5-73%). En las tablas 1 y 2 se exponen los datos demográficos, clínicos y angiográficos basales en los pacientes con y sin reestenosis. No se encontraron diferencias significativas. En 4 pacientes, la coronariografía de seguimiento se adelantó a los 4-5 meses debido a que presentaron angina de esfuerzo.

### Linfocitos T

Los pacientes que desarrollaron una reestenosis coronaria presentaron a los 6 meses un aumento signifi-

TABLA 2. Datos angiográficos

|                                | Pacientes<br>sin reestenosis<br>(n = 19) | Pacientes<br>con reestenosis<br>(n = 27) | p     |
|--------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------|
| Stents implantados             | 9 (47,4%)                                | 10 (37,0%)                               | 0,552 |
| Aterectomía                    | 7 (36,8%)                                | 10 (37,0%)                               | 0,989 |
| N.º de lesiones                |                                          |                                          | 0,599 |
| Arteria descendente anterior   | 9                                        | 14                                       |       |
| Arteria circunfleja izquierda  | 5                                        | 6                                        |       |
| Arteria coronaria derecha      | 5                                        | 6                                        |       |
| N.º de vasos (1 vaso/> 1 vaso) | 8/13                                     | 11/14                                    | 0,625 |
| Diámetro de referencia (mm)    | 3,17 ± 0,53                              | 3,09 ± 0,62                              | 0,659 |
| Longitud de la lesión          | 8,18 ± 2,8                               | 11,5 ± 7,6                               | 0,077 |
| Diámetro de la estenosis (%)   |                                          |                                          |       |
| Antes                          | 80,3 ± 8,7                               | 78,7 ± 14,4                              | 0,678 |
| Después                        | 20,2 ± 11,6                              | 23,9 ± 12,7                              | 0,324 |
| Seguimiento                    | 31,0 ± 12,6                              | 77,6 ± 15,2                              | 0,000 |
| Ganancia (mm)                  | 1,89 ± 0,59                              | 1,70 ± 0,71                              | 0,329 |
| Pérdida (mm)                   | 0,34 ± 0,47                              | 1,6 ± 0,47                               | 0,000 |

Los datos se expresan como media ± DE o el número y porcentaje (%) de pacientes.

cativo del porcentaje de linfocitos T citotóxicos (CD3+, CD56+), en relación con las cifras basales (análisis de la varianza para muestras repetidas,  $p < 0,011$ , y para muestras apareadas,  $p = 0,007$ ), alcanzando cifras superiores a las de los pacientes sin reestenosis ( $10,8 \pm 7,0$  frente a  $6,1 \pm 2,8\%$ ;  $p = 0,005$ ) (fig. 1). Las cifras de linfocitos T citotóxicos en la fase tardía tuvieron una buena correlación con las cifras basales ( $r = 0,490$ ;  $p = 0,001$ ) (fig. 2A). No se detectó ninguna relación de las cifras de linfocitos basales o a los 6 meses con la presencia de angina durante el último mes, antecedentes de angina inestable, la colocación de un *stent* o la práctica de aterectomía.

Los linfocitos CD3/CD56– o los linfocitos NK CD3/CD56– no presentaron diferencias significativas.

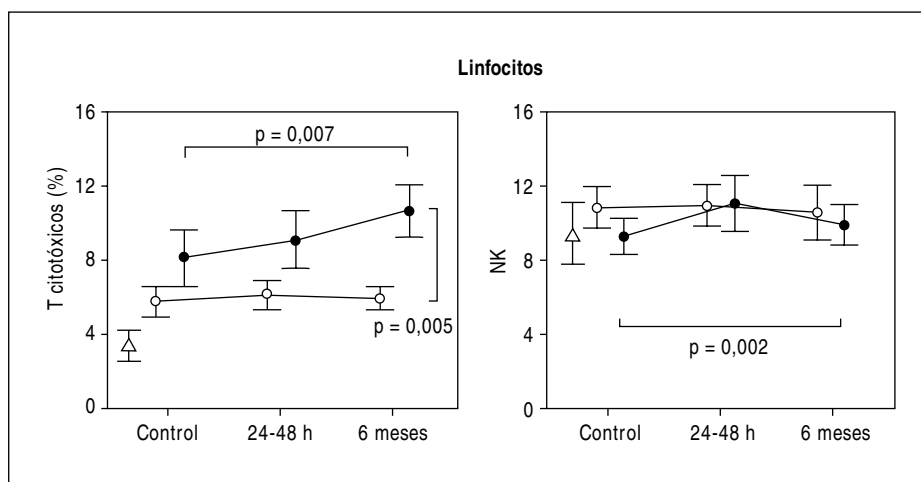
## Activación de monocitos y polimorfonucleares

También se comprobó un aumento significativo de la expresión de las moléculas de adhesión Mac-1/CD-11b a los 6 meses ( $1.383 \pm 625$  frente a  $990 \pm 484$  MFI;  $p = 0,025$ ), CD64/FcγRI ( $76 \pm 29$  frente a  $57 \pm 22$  MFI;  $p = 0,014$ ) en los monocitos de los pacientes con reestenosis en comparación con aquellos sin reestenosis (fig. 3). En cambio, no se detectó ninguna diferencia en los marcadores de los neutrófilos: Mac-1 (CD-11b) y CD66b (BGP-1) (fig. 4).

La expresión de los marcadores de monocitos CD11b ( $r = 0,646$ ;  $p < 0,0001$ ) y CD64 ( $r = 0,563$ ;  $p < 0,0001$ ) demostró una excelente correlación con el porcentaje de linfocitos T citotóxicos a los 6 meses (fig. 2B). La estenosis se desarrolló en todos los pacientes que tenían  $> 10\%$  de linfocitos T citotóxicos y  $> 1.000$  unidades MFI en los monocitos CD11b (22%) (fig. 2B). No se comprobó ninguna relación con los marcadores de los neutrófilos.

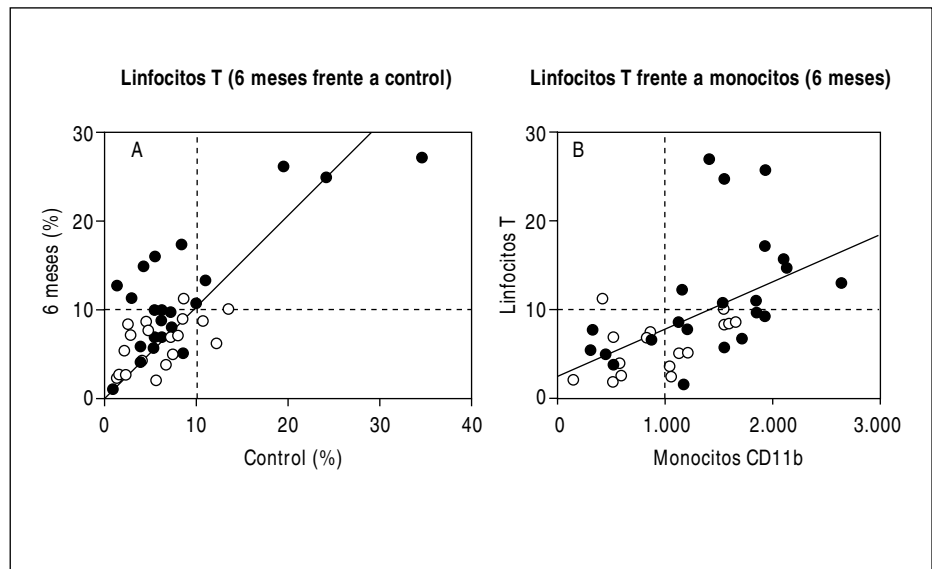
## Citocinas IL-6, TNF-α e IL-2-RS

Las concentraciones plasmáticas de IL-6 y TNF-α aumentaron de manera significativa tras la intervención, pero sólo las del TNF-α se mantuvieron elevadas a los 6 meses (análisis de la varianza para muestras repetidas,  $p < 0,004$ ), sin que los cambios fueran distintos en los pacientes con y sin reestenosis. La citocina IL-2-RS presentó un ligero aumento a los 6 meses en los pacientes con estenosis, que no alcanzó la significación estadística ( $66 \pm 5,5$  frente a  $69 \pm 8,5$  ng/ml;  $p = 0,87$ ). Se observaron cifras elevadas ( $> 80$  ng/ml) en 3 pacientes sin estenosis y en ocho con estenosis ( $p = 0,234$ ) (fig. 5). La proporción era similar a la observada en el control pre-ACTP. No se detectó ninguna correlación clara entre las citocinas y la activación de los leucocitos.

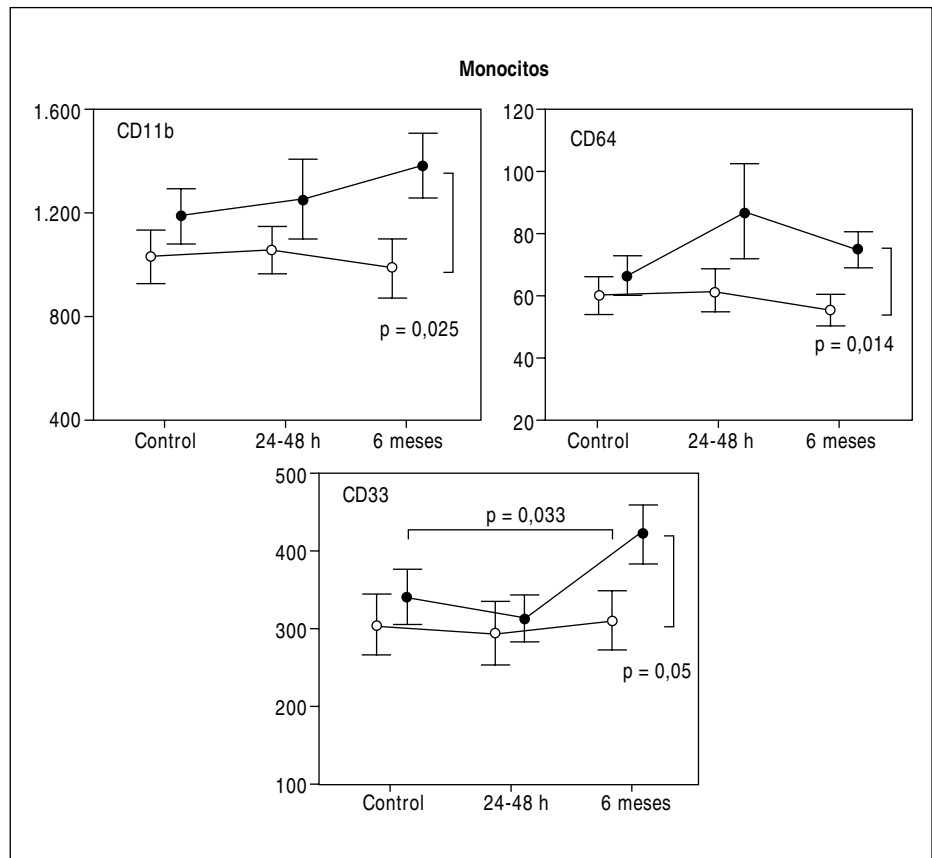


**Fig. 1.** Proporción de linfocitos T citotóxicos y *natural killer* (NK), antes de la angioplastia (control), a las 24-48 h y a los 6 meses de la intervención. Círculos negros: pacientes que desarrollan reestenosis. Círculos blancos: sin reestenosis. Triángulos: valores normales. Porcentaje ± DE de la media. Se aprecia un aumento significativo del porcentaje de linfocitos citotóxicos a los 6 meses en pacientes que desarrollan reestenosis en relación con las cifras basales ( $p = 0,007$ ) y en relación con los pacientes que no desarrollan reestenosis ( $p = 0,005$ ). También es significativo el aumento de los linfocitos NK en pacientes con reestenosis en relación con las cifras basales.

**Fig. 2.** A: Muestra la correlación a los 6 meses de la cifra de linfocitos T citotóxicos (CD3+/CD56+) con las cifras previas a la intervención ( $r = 0,490$ ;  $p = 0,001$ ). Círculos negros: pacientes con reestenosis. Círculos blancos: sin reestenosis. Trazos horizontal y vertical interrumpidos: valor máximo normal de la cifra de linfocitos (10%). B: Muestra la correlación de la actividad inflamatoria/inmunitaria tardía representada por los linfocitos T (CD3+/CD56+) y los monocitos CD11b (intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias MFI) ( $r = 0,563$ ;  $p < 0,0001$ ). Todos los pacientes (22% de los casos) con cifras elevadas de linfocitos T por encima del 10% (trazo horizontal interrumpido) y monocitos CD11b con  $> 1.000$  unidades MFI (trazo vertical), desarrollaron estenosis.



**Fig. 3.** Activación monocitaria puesta de manifiesto por la expresión de CD11b, CD64 y CD33, antes, a las 24-48 h y a los 6 meses de la intervención. Círculos negros: pacientes que desarrollan reestenosis. Círculos blancos: sin reestenosis. Abcisas: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias MFI  $\pm$  DE de la media. Se aprecia un aumento significativo de la expresión de CD11b ( $p = 0,033$ ) y CD64 ( $p = 0,014$ ) a los 6 meses en pacientes que desarrollan reestenosis en relación con los pacientes sin reestenosis. La expresión de CD33 está aumentada a los 6 meses en relación con los controles en los pacientes con reestenosis ( $p = 0,033$ ).

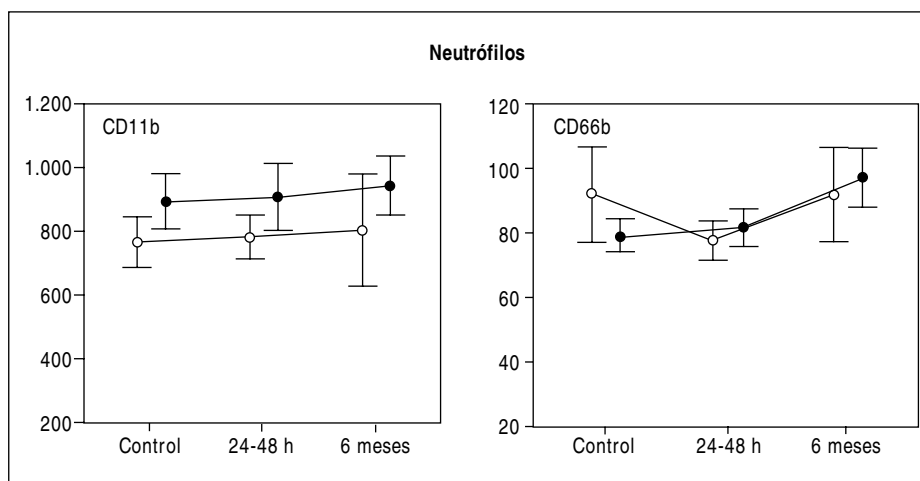


### *Chlamydia pneumoniae* y CMV

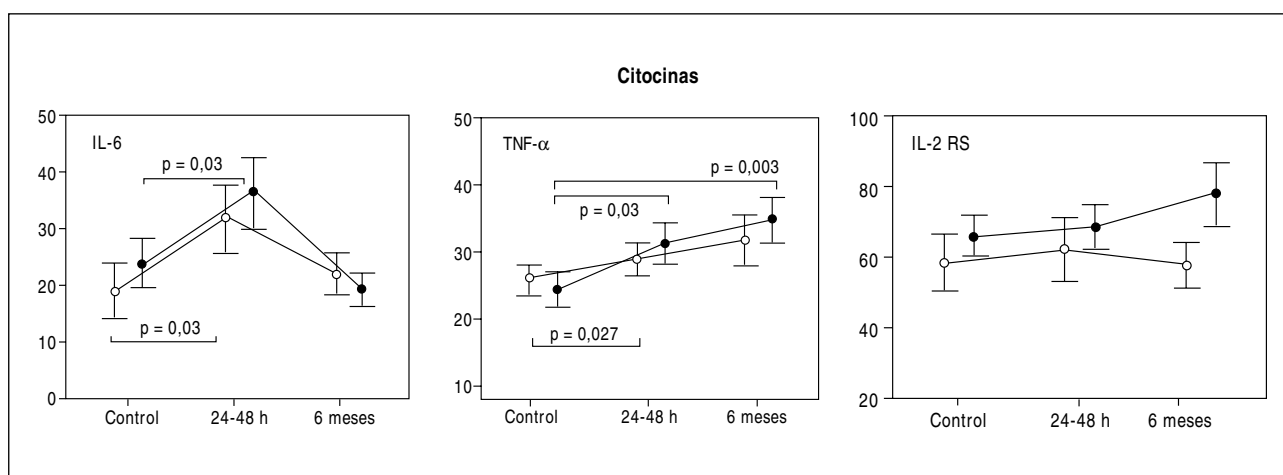
No se observaron diferencias significativas entre los pacientes con y sin reestenosis. Un total de 9 (55,5%) pacientes con reestenosis y 15 (47,4%) sin estenosis fueron seropositivos a los anticuerpos IgG para *C.*

*pneumoniae*. La proporción de seropositivos para el CMV con y sin reestenosis fue del 68,4 y del 74,1%, respectivamente ( $p = 0,093$ ).

Los valores de seropositividad no se modificaron sensiblemente en los 6 meses del estudio. Sólo un paciente sin exposición previa se positivizó a los 6 meses.



**Fig. 4.** Activación de leucocitos polimorfonucleares en la sangre venosa, a juzgar por la expresión de CD11b, CD66b, antes, a las 24-48 h y a los 6 meses de la intervención. Circulos negros: pacientes que desarrollan reestenosis. Circulos blancos: sin reestenosis. Abcisas: intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias MFI  $\pm$  DE de la media.



**Fig. 5.** Concentración plasmática de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-2 RS antes (control), a las 24-48 h y a los 6 meses de la intervención. Circulos negros: pacientes que desarrollan reestenosis. Circulos blancos: sin reestenosis. Abcisas: ng/ml  $\pm$  DE de la media. Para la explicación, véase el texto.

## DISCUSIÓN

### Reacción inflamatoria aguda

Aunque la activación de los leucocitos en respuesta a la ACTP no alcanzó la significación estadística, el aumento de la concentración de IL-6 y TNF- $\alpha$  a las 24-48 h revela la aparición de la conocida reacción inflamatoria aguda inducida por el traumatismo vascular, en la que están implicados una serie de fenómenos en cadena: a) la activación de los leucocitos a su paso por la circulación coronaria, caracterizada por la expresión de moléculas de adhesión, como la CD11b/CD18 (Mac-1), el ligando de la ICAM-1, en la membrana celular<sup>16-20</sup>; b) el aumento de la producción de IL-6, por parte de los monocitos activados, que estimula la expresión de moléculas de adhesión en el tejido lesionado, facilitando así la infiltración celular y el proceso reparativo de la lesión<sup>7,8</sup>, y c) el aumento de

síntesis hepática de la proteína C reactiva por efecto de la IL-6<sup>9,10</sup>. Esta reacción de fase aguda es similar a la descrita en pacientes con angina inestable<sup>21</sup>. En nuestro estudio, la activación de los monocitos y neutrófilos demostró una excelente correlación con el aumento de las IL-6, lo que sugiere que son marcadores menos sensibles de la inflamación inducida por la ACTP o que no coinciden los picos de actividad.

Aunque es posible que la respuesta aguda esté relacionada con la importancia del traumatismo vascular, lo cierto es que el aumento de IL-6 y TNF- $\alpha$  post-ACTP presenta una excelente correlación con los valores basales previos a la intervención, independientemente de que se implante un *stent* o se practique arteriectomía. Esto sugiere que la intensidad de la respuesta aguda podría ser considerada un fiel reflejo de la sensibilidad del sistema inflamatorio/inmunitario a los estímulos responsables de la inflamación<sup>7</sup>. La actividad leucocitaria basal estaba aumentada en algunos casos, lo que podría

corresponder a la presencia de un proceso inflamatorio crónico de fondo, de baja intensidad, que se ha sospechado que desempeña un papel etiológico en la cardiopatía isquémica<sup>22</sup>. No pudimos comprobar, sin embargo, ninguna relación de la actividad inflamatoria con la inestabilidad de la placa, como se ha descrito previamente, pues no existía ninguna asociación con los antecedentes de angina estable o inestable, o con el tiempo transcurrido desde el último episodio de angina.

Se ha especulado sobre la posibilidad de que esta respuesta aguda fuera determinante de la magnitud del proceso cicatrizal de la lesión que, de ser excesivo, conduciría a la hipertrofia obstructiva de la íntima<sup>5,6</sup>. Pero tampoco pudo detectarse ninguna relación de la reestenosis con la magnitud de la respuesta inflamatoria aguda ni con la actividad leucocitaria o inflamatoria basal.

### Actividad inflamatoria tardía: linfocitos T y respuesta inflamatoria

El hallazgo más relevante ha sido la comprobación, hasta ahora inédita, de que los pacientes que desarrollan reestenosis presentan un aumento de la actividad inflamatoria que persiste a los 4-6 meses de la intervención, a juzgar por el incremento de monocitos activados (células inflamatorias) y linfocitos T citotóxicos circulantes (células inmunitarias). Los linfocitos T se han descrito también en la fase aguda de la ACTP<sup>16</sup> y en pacientes con angina inestable<sup>23</sup>. La persistencia de este estado inflamatorio crónico podría ser la causa de la progresión de la reestenosis, como ha sugerido la frecuente observación de monocitos/macrófagos y de linfocitos T, la mayoría de tipo citotóxico/supresor, en el tejido de la reestenosis, similar a la descrita en todo tipo de lesiones de atheroma<sup>24,25</sup>.

La magnitud de este aumento tardío también parece estar relacionada con la actividad leucocitaria de fondo, previa a la ACTP. Esta hipersensibilidad persistente sería superponible a la descrita en los monocitos a los 6 meses del episodio agudo de angina inestable<sup>26</sup>. Sin embargo, no existe ningún dato que permita explicar la persistencia de la actividad inflamatoria.

Recientemente ha despertado gran interés la posibilidad de que los linfocitos T pudieran formar parte de una respuesta específica autoinmune, que potenciaría la inflamación<sup>27-31</sup>, lo cual establecería cierto parentesco de la enfermedad coronaria con otras enfermedades autoinmunes dependientes de los linfocitos T, como la artritis reumatoide<sup>32</sup>. En apoyo de esta hipótesis se ha comprobado que los linfocitos T en la placa de atheroma expresan citocina IL-2 RS, lo que se considera un signo fehaciente de que estas células están activadas por antígenos específicos de la placa, y existe, por tanto, una respuesta inmunitaria local<sup>8</sup>. El aumento de los valores plasmáticos de IL-2 RS se ha descrito en la angina estable o inestable, y se ha sugerido que esta elevación podría servir como marcador de reestenosis<sup>16</sup>.

En nuestro caso, sin embargo, no se comprobó ninguna relación de las IL-2 RS con la reestenosis, por lo que el aumento observado en el porcentaje de linfocitos T CD3/CD56 no implica necesariamente que exista una respuesta inmunitaria específica.

### Actividad inflamatoria e infecciones lentas

La respuesta inflamatoria post-ACTP podría relacionarse con la infección por CMV u otras infecciones latentes, que se han detectado con una frecuencia elevada en los especímenes de aterectomía<sup>13</sup>. Se ha descrito, en efecto, que la incidencia de reestenosis postaterectomía es sensiblemente superior en pacientes seropositivos para el CMV (43%) que en los seronegativos (8%). En nuestro caso, no hemos podido confirmar ninguna asociación de la reestenosis o los marcadores de la inflamación estudiados con la infección aguda o crónica por *C. pneumoniae* o CMV, aunque el reducido tamaño de la muestra podría explicar la negatividad de los resultados.

### Limitaciones del estudio. ¿La actividad inflamatoria podría ser consecuencia de la reestenosis?

En rigor, los datos del estudio no permiten excluir la posibilidad de que la actividad inflamatoria fuera la consecuencia, no la causa, de la reestenosis. Se ha sugerido que la activación leucocitaria aguda podría tener lugar en la microcirculación a causa de episodios de isquemia-reperfusión, o de la aparición de necrosis, o cabría invocar la persistencia de una superficie cruenta o inflamada en la coronaria intervenida o en otras placas, ya que, al parecer, la activación leucocitaria no se produce durante el paso a través de una estenosis intacta<sup>19</sup>. Sin embargo, la ausencia en nuestros casos de episodios clínicos agudos en el seguimiento de la ACTP hacen poco probable que la activación leucocitaria tardía pudiera tener un mecanismo similar.

Por otra parte, el número de pacientes y la heterogeneidad de la población estudiada (inclusión de pacientes con angina estable e inestable de más de una semana de duración) no permiten dilucidar si existían diferencias en la actividad inflamatoria basal atribuibles a episodios coronarios recientes o a la actividad crónica de fondo, o si la actividad tardía era más pronunciada en los *stents* o las arteriectomías, aunque el análisis estadístico fue negativo.

### CONCLUSIONES

El aumento de la actividad inflamatoria linfomonocitaria tardía refuerza la participación de un proceso inflamatorio en la patogenia de la reestenosis. La intensidad de esta respuesta está relacionada con el estado inflamatorio basal que, al parecer, no depende de la

existencia de infecciones lentas, como la infección por *C. pneumoniae*, y sugiere, en cambio, la posibilidad de un origen autoinmune. La persistencia de esta actividad inflamatoria podría tener implicaciones clínicas, ya que sugiere la necesidad de que las medidas orientadas a la prevención de la estenosis no se limiten a la fase aguda, sino que deben prolongarse durante meses después de la ACTP.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en parte con la ayuda de una beca del Ministerio de Educación (CICYT, SAF97-0124).

## BIBLIOGRAFÍA

- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;40:115-26.
- Moreno PR, Bernardi VH, López-Cuellar J, Newell J, McMellon C, Gold HK, et al. Macrophage infiltration predicts reestenosis after coronary interventions in patients with unstable angina. *Circulation* 1996;94:3098-102.
- Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-Stent reestenosis: contribution of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:224-30.
- Piek JJ, Van der Wal AC, Meuwissen M, Koch KT, Chamuleau SAJ, Teeleing P, et al. Plaque inflammation in restenotic coronary lesions of patients with stable and unstable angina. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:963-7.
- Pietersma A, Kofflard M, De Wit EA, Stijnen T, Koster JF, Serruys PW, et al. Late lumen loss after coronary angioplasty is associated with the activation status of circulating phagocytes before treatment. *Circulation* 1995;91:1320-5.
- Inoue T, Sakai Y, Morooka S, Hayashi T, Takayanagi K, Takabatake Y. Expression of polymorphonuclear leukocyte adhesion molecules and its clinical significance in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;28:1127-33.
- Liuzzo G, Buffon A, Biasucci LM, Caligiuri G, Vitelli A, Altamura S, et al. Enhanced inflammatory response to coronary angioplasty in patients with severe unstable angina. *Circulation* 1998;98:2370-6.
- Linkoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, Deckelbaum LI, Barnathan ES, Patel KK, et al. Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 2001;104:163-7.
- Buffon A, Liuzzo G, Biasucci I. Preprocedural serum levels of C-reactive protein predict early complications and late reestenosis after coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1512-21.
- Gottsauer-Wolf M, Zasmata G, Hornykewycz M. Plasma levels of C-reactive protein after coronary stent implantation. *Eur Heart J* 2000;21:1152-8.
- Libby P, Schwartz D, Brogi E, Taanaka H, Clinton SK. A cascade model for reestenosis: a special case for atherosclerosis progression. *Circulation* 1992;86(Suppl III):47-52.
- Ramires JAF, Higuchi ML. Micoplasma pneumoniae y Chlamidia pneumoniae se asocian con la inflamación y la rotura de las placas coronarias ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2002;55(Supl 1):2-9.
- Zhou YF, Leon MB, Waclawiw MA, Popma JJ, Yu ZX, Finkel T, et al. Association between prior cytomegalovirus infection and the risk of reestenosis after coronary atherectomy. *N Engl J Med* 1996;335:624-30.
- Bermejo García J, Martínez P, Martín Rodríguez JF, de la Torre Carpena M, Bustamante Bustamante R, Guerrero Peral AB, et al. Inflamación e infección en la enfermedad coronaria estable y en el síndrome coronario agudo. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:453-9.
- Merino Otermin A, Artaiz Urdaci M, Bregada García J, Riera Sagrera M, Vidal Salvá B, Rodríguez Fernández A. El eptifibatide reduce los valores de proteína C reactiva tras angioplastia coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:186-9.
- Blum A, Sclarovsky S, Shohat B. T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1995;91:20-2.
- De Servi S, Mazzone A, Ricevuti G, Fioravanti A, Bramucci E, Angoli L, et al. Granulocyte activation after coronary angioplasty in humans. *Circulation* 1990;82:140-6.
- Ikeda H, Nakayama H, Oda T, Kuwano K, Yamaga A, Ueno T, et al. Neutrophil activation after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J* 1994;128:1091-8.
- Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:819-24.
- Serrano C, Ramires JAF, Venturini M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, et al. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecules expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:1276-83.
- Mazzone A, De Servi S, Ricevuti G. Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease. *Circulation* 1993;88:358-63.
- Haught WH, Mansour M, Rothlein R, Kishimoto TK, Mainolfi EA, Hendricks JB, et al. Alterations in circulating intercellular adhesion molecule-1 and L-selectin: further evidence for chronic inflammation in ischemic heart disease. *Am Heart J* 1996;132:1-8.
- Neri Serneri GG, Prisco D, Maretini F, Gori AM, Brunelli C, Poggessi L, et al. Acute T-cell activation is detectable in unstable angina. *Circulation* 1997;95:1806-12.
- Van der Waal AC, Piek JJ, de Boer OJ, Koch KT, Teeling P, van der Loos CM, et al. Recent activation of the plaque immune response in coronary lesions underlying acute coronary syndromes. *Heart* 1998;80:14-8.
- Van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1988;61:166-70.
- Emeson EE, Robertson AL Jr. T lymphocytes in aortic and coronary intimas. Their potential role in atherogenesis. *Am J Pathol* 1988;130:369-76.
- Liuzzo G, Angiolillo DJ, Buffon A, Rizzello V, Colizzi C, Ginnetti F, et al. Enhanced response of blood monocytes to in vitro lipopolysaccharide-challenge in patients with recurrent unstable angina. *Circulation* 2001;103:2236-43.
- Blum A, Vardinon N, Kaplan G, Laniado S, Yust I, Burk M, et al. Autoimmune and inflammatory responses may have an additive effect in postpercutaneous transluminal coronary angioplasty reestenosis. *Am J Cardiol* 1998;81:339-41.
- Caligiuri G, Liuzzo G, Biasucci LM, Maseri A. Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenic implications. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1295-304.
- Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon M, Maseri A, Goronzy JJ, et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation* 1999;100:2135-9.
- Caligiuri G, Paulsson G, Nicoletti A, Maseri A, Hansson GK. Evidence for antigen-driven T-cell response in unstable angina. *Circulation* 2000;103:1114-9.
- Pascari V, Yeh ETH. A tale of two diseases. Atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Circulation* 1999;100:2124-6.