

Artículo original

# El polimorfismo de un solo nucleótido *PLAU* P141L se asocia con el grado de circulación colateral en pacientes con enfermedad arterial coronaria



Joan Duran<sup>a</sup>, Pilar Sánchez-Olavarría<sup>a,b</sup>, Marina Mola<sup>a,c</sup>, Víctor Götzens<sup>a</sup>, Julio Carballo<sup>d</sup>, Eva Martín-Pelegri<sup>d</sup>, Màrius Petit<sup>d</sup>, Bruno García del Blanco<sup>e</sup>, David García-Dorado<sup>e</sup> y Josep M. de Anta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Anatomía y Embriología Humanas, Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Facultad de Medicina, Campus de Ciencias de la Salud de Bellvitge, Universitat de Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España

<sup>b</sup> Departamento de Estadística, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

<sup>c</sup> Grupo de Investigación Neurovascular (NEUVAS), IMIM-Hospital del Mar, PRBB-Parque de Investigación Biomédica de Barcelona, Barcelona, España

<sup>d</sup> Departamento de Cardiología y Hemodinamia, Centro Cardiovascular Sant Jordi, Barcelona, España

<sup>e</sup> Departamento de Cardiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España

## Historia del artículo:

Recibido el 6 de septiembre de 2013

Aceptado el 13 de noviembre de 2013

On-line el 3 de abril de 2014

## Palabras clave:

Activador del plasminógeno

Polimorfismo rs2227564

Circulación colateral

Estudio de asociación

## RESUMEN

**Introducción y objetivos:** El gen *PLAU*, que codifica para el activador del plasminógeno tipo urocinasa, desempeña un papel destacado en el crecimiento colateral. Se ha investigado si el polimorfismo *PLAU* P141L (C > T), que causa una mutación en el dominio *kringle* de la proteína, se asocia con la circulación colateral coronaria en una cohorte de 676 pacientes con enfermedad arterial coronaria.

**Métodos:** Se genotipificó el polimorfismo de muestras de sangre mediante prueba basada en TaqMan, y la circulación colateral se evaluó por el método Rentrop. Las asociaciones de las variantes alélicas y los genotipos con la circulación colateral se examinaron mediante modelos de regresión logística multivariable ajustados por las variables clínicamente relevantes.

**Resultados:** Los pacientes con circulación colateral deficiente (Rentrop 0-1; n = 547) presentaron mayor frecuencia del genotipo TT que aquellos con buena circulación colateral (Rentrop 2-3; n = 129; p = 0,020). Por otra parte, el alelo T fue más frecuente en los paciente con circulación deficiente (p = 0,006). La *odds ratio* de los portadores del alelo T de presentar una circulación colateral deficiente (ajustada por variables clínicamente relevantes) fue estadísticamente significativa en el modelo dominante (*odds ratio* = 1,83 [intervalo de confianza del 95%, 1,16-2,90]; p = 0,010) o el aditivo (*odds ratio* = 1,73 [intervalo de confianza del 95%, 1,14-2,62]; p = 0,009).

**Conclusiones:** Se demuestra una asociación entre la circulación colateral coronaria y el polimorfismo *PLAU* P141L. Los pacientes con la variante 141L tienen mayor riesgo de tener una circulación colateral deficiente.

© 2013 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## The *PLAU* P141L Single Nucleotide Polymorphism Is Associated With Collateral Circulation in Patients With Coronary Artery Disease

## ABSTRACT

**Introduction and objectives:** Urokinase-type plasminogen activator, which is encoded by the *PLAU* gene, plays a prominent role during collateral arterial growth. We investigated whether the *PLAU* P141L (C > T) polymorphism, which causes a mutation in the kringle domain of the protein, is associated with coronary collateral circulation in a cohort of 676 patients with coronary artery disease.

**Methods:** The polymorphism was genotyped in blood samples using a TaqMan-based genotyping assay, and collateral circulation was assessed by the Rentrop method. Multivariate logistic regression models adjusted by clinically relevant variables to estimate odds ratios were used to examine associations of *PLAU* P141L allelic variants and genotypes with collateral circulation.

**Results:** Patients with poor collateral circulation (Rentrop 0-1; n = 547) showed a higher frequency of the TT genotype than those with good collateral circulation (Rentrop 2-3; n = 129; P = .020). The T allele variant was also more common in patients with poor collateral circulation (P = .006). The odds ratio of having poorly developed collaterals in patients bearing the T allele (adjusted for clinically relevant variables) was statistically significant under the dominant model (*odds ratio* =1.83 [95% confidence interval, 1.16-2.90]; P = .010) and the additive model (*odds ratio* =1.73 [95% confidence interval, 1.14-2.62]; P = .009).

## Keywords:

Plasminogen activator

rs2227564 polymorphism

Collateral circulation

Association study

\* Autor para correspondencia: Unidad de Anatomía y Embriología Humanas, Departamento de Patología y Terapéutica Experimental, Facultad de Medicina, Campus de Ciencias de la Salud de Bellvitge, Universitat de Barcelona, Feixa Llarga s/n, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, España.

Correo electrónico: [janta@ub.edu](mailto:janta@ub.edu) (J.M. de Anta).

**Conclusions:** An association was found between coronary collateral circulation and the *PLAU* P141L polymorphism. Patients with the 141L variant are at greater risk of developing poor coronary collateral circulation.

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

© 2013 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Abreviaturas

CCC: circulación colateral coronaria  
 DM: diabetes mellitus  
 EAC: enfermedad arterial coronaria  
 SNP: polimorfismo de un solo nucleótido  
 uPA: activador del plasminógeno tipo urocinasa (*urokinase-type plasminogen activator*)

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es la principal causa de muerte en los países industrializados<sup>1-4</sup>. En la EAC, el crecimiento de las arterias colaterales coronarias (arteriogénesis coronaria) se ha reconocido como una fuente alternativa de aporte sanguíneo a un área miocárdica afectada por la isquemia<sup>1,3</sup>. Los pacientes con niveles elevados de colateralización tienen un 36% menos riesgo de mortalidad que los pacientes con bajos niveles de colateralización<sup>5</sup>. Un desencadenante importante en la etiología de la formación de arterias colaterales son la isquemia crónica y la extensión de la carga aterosclerótica. Aun así, la capacidad de los pacientes con EAC para inducir el crecimiento colateral es muy heterogéneo, incluso en aquellos con arterias totalmente ocluidas<sup>6</sup>, y probablemente se trata de un proceso determinado genéticamente<sup>7,8</sup>.

Fulton<sup>9</sup> demostró que el corazón humano contiene una gran red colateral preexistente incluso antes de la aparición de la enfermedad aterosclerótica obstructiva (revisado por Van Royen et al<sup>10</sup>). La arteriogénesis se basa en la presencia de estas arteriolas colaterales que interconectan ramas laterales proximal y distalmente a la arteria ocluida (anastomosis)<sup>10,11</sup>. Tras la oclusión de una arteria, la redirección del flujo sanguíneo a través de conexiones arteriolas preexistentes desencadena, en primera instancia, el aumento de fuerzas mecánicas tales como la tensión de cizallamiento y la tensión circunferencial de la pared, a través del gradiente de presión formado entre la región de alta presión, proximal a la oclusión, y la región de baja presión, distal<sup>11-13</sup>. Estas fuerzas inducen el crecimiento colateral coronario. Este proceso supone la remodelación estructural completa de la pared arterial, que a su vez comprende la proliferación de las células endoteliales y de las células de la musculatura lisa y, finalmente, la reorganización del componente extracelular y de la lámina elástica interna. Juntos, estos procesos conducen a una reducción en la tensión de cizallamiento de la pared arterial hasta valores basales fisiológicos<sup>14</sup>.

Las células endoteliales perciben la tensión de cizallamiento y transforman esta señal en cambios en la expresión génica<sup>11-15</sup>. De este modo, el endotelio se activa, y se promueve la atracción y la adhesión de los monocitos que secretarán factores de crecimiento y citocinas a las arterias en crecimiento<sup>11</sup>. En su fase temprana, el crecimiento arterial colateral se asocia con un aumento de la expresión del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-1 en el sitio del vaso donde tiene lugar la remodelación, mientras que los monocitos suministran por vía paracrina los ligandos (factores de crecimiento de fibroblastos) que promueven el crecimiento<sup>15</sup>. La activación del receptor del factor de crecimiento de fibroblastos-1 por factores de crecimiento de fibroblastos por

factores de crecimiento de fibroblastos origina la activación de la vía de Ras/Raf, MEK1/2, ERK1/2 y, finalmente, el aumento de la expresión del factor de respuesta de crecimiento temprano-1, implicado en la iniciación de un fenotipo migratorio e invasivo en las células endoteliales y en las del músculo liso. El factor de respuesta de crecimiento temprano-1 induce la expresión del activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA)<sup>14</sup>.

El uPA es fundamental en la regulación de la adhesión celular, la migración y la proliferación<sup>16</sup> y la remodelación de la pared arterial debida a lesiones mecánicas y durante la arteriogénesis<sup>16-19</sup>. El uPA convierte el plasminógeno en plasmína, que a su vez activa factores de crecimiento, formas latentes de citocinas y metaloproteinasas de matriz 2 y 9, que participan en la degradación, estrictamente localizada, de la matriz extracelular, crucial para permitir la migración de células musculares lisas y la formación de la neointima<sup>16,17</sup> durante el crecimiento colateral.

*PLAU*, el gen que codifica para uPA, se localiza en el cromosoma 10q22.2 entre dos regiones que muestran vinculación con la enfermedad de Alzheimer<sup>20</sup>. El polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs2227564 (un polimorfismo C/T de la segunda base del codón 141 del gen *PLAU*) causa una mutación de cambio de sentido (de prolina a leucina) en el dominio *kringle* de uPA, que tiene un efecto funcional en la unión del cimógeno de la fibrina a uPA<sup>21</sup>. Aunque este SNP se ha asociado con varias enfermedades<sup>22-29</sup>, su asociación con la arteriogénesis coronaria no se ha estudiado hasta la fecha. El objetivo de nuestro estudio es evaluar la asociación del polimorfismo *PLAU* P141L con el crecimiento arterial colateral coronario, planteando la hipótesis que la variante *PLAU* L141 se asocia con una respuesta arteriogénica reducida en los pacientes con EAC.

## MÉTODOS

### Estudio y selección de los pacientes

El estudio se realizó de conformidad con la Declaración de Helsinki y el protocolo aprobado por el Comité de Bioética del *Centre Cardiovascular Sant Jordi* y el *Hospital Universitari de la Vall d'Hebron* para el periodo comprendido entre 2008 y 2012. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado y se obtuvo su autorización por escrito.

Se seleccionó a los participantes en el estudio consecutivamente de entre los pacientes sometidos a cateterización diagnóstica de las arterias coronarias. Se incluyó una cohorte de 677 pacientes con EAC y estenosis grave ( $\geq 70\%$ ). Se excluyó a los pacientes con infarto agudo de miocardio reciente ( $< 1$  mes), anemia, angioplastia reciente, revascularización previa por intervención coronaria percutánea, cirugía de *bypass* de la arteria coronaria, infección o inflamación o insuficiencia renal crónica. Se estudió con detalle la historia clínica de cada paciente y se registraron las características demográficas, clínicas y de laboratorio de cada uno. Hipertensión, diabetes mellitus (DM), tipo de DM, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, antecedentes de tabaquismo, antecedentes familiares de cardiopatías, antecedentes de angina de pecho y tipo de angina e infarto agudo de miocardio se registraron como variables categóricas (presencia o ausencia).

## Angiografía coronaria y evaluación de la circulación colateral coronaria

La angiografía coronaria se realizó en múltiples proyecciones ortogonales utilizando la técnica de Judkins. La circulación colateral coronaria (CCC) se evaluó angiográficamente utilizando el método de Rentrop et al<sup>30</sup>. Para evaluar el llenado de las colaterales, se utilizó la siguiente escala: 0, sin llenado visible de colaterales; 1, llenado colateral de ramas del vaso que se ha de dilatar sin que el contraste alcance el segmento epicárdico de este vaso; 2, llenado parcial colateral del segmento epicárdico del vaso que se está dilatando, y 3, llenado completo del segmento epicárdico del vaso que se está dilatando.

Se clasificó a los pacientes con EAC según el grado de CCC: deficiente (Rentrop 0-1; n = 546) y bien desarrollada (Rentrop 2-3; n = 131). La CCC fue evaluada por tres cardiólogos hemodinamistas experimentados que no recibieron información previa sobre los pacientes. El grado de concordancia en la evaluación diagnóstica de la CCC entre los tres evaluadores fue alto y se determinó a través del estadístico kappa ( $\kappa = 0,987$ ; intervalo de confianza del 95% [IC95%], 0,953-1,000;  $p < 0,001$ ). Este test estadístico se determinó con las primeras 100 angiografías revisadas.

### Análisis genotípico

Se extrajo sangre a los pacientes en el momento de la coronariografía. El ADN genómico se aisló utilizando la estación de trabajo automatizada Chemagen (Baesweiler, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Para determinar el genotipo del polimorfismo rs2227564 en las muestras de sangre, se realizó un análisis TaqMan de genotipificación de SNP (Applied Biosystems; Foster City, California, Estados Unidos) utilizando el sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real Fast 7900HT (Applied Biosystems). Las determinaciones de los genotipos de cada paciente se reprodujeron en tres pruebas independientes.

### Análisis estadístico

Los datos continuos de distribución no normal se analizaron mediante la prueba de la U de Mann-Whitney. En este estudio, la edad no mostró una distribución normal (Shapiro-Wilk,  $p < 0,001$ ). Las asociaciones entre datos categóricos se evaluaron utilizando la prueba exacta de Fisher o la de la  $\chi^2$ , y el equilibrio de Hardy-Weinberg se evaluó mediante la prueba de la  $\chi^2$ . Para estimar las *odds ratio* (OR) y sus IC95% entre los genotipos y el riesgo de una CCC reducida, se ajustaron modelos de regresión logística multivariable utilizando las variables clínicamente relevantes. Con el modelo de regresión multivariable, también se analizaron los términos de interacción entre el SNP y las covariables significativas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* STATA 11.2. Se estimó la potencia para detectar una asociación genética utilizando el mismo paquete estadístico.

## RESULTADOS

El análisis estadístico mostró que no hay diferencias de distribución estadísticamente significativas entre los grupos con CCC deficiente y CCC bien desarrollada en cuanto a edad, sexo, hipertensión o antecedentes de hiperlipemia, tabaquismo, angina o infarto de miocardio previo. La prevalencia de DM (35,88%) y el porcentaje de pacientes con prescripción con estatinas (44,27%) fueron significativamente mayores en el grupo de CCC reducida (tabla 1). En nuestra población, 462 pacientes (68,24%)

**Tabla 1**

Características clínicas de los pacientes con enfermedad arterial coronaria en función de la circulación colateral coronaria

Características	CCC deficiente	CCC bien desarrollada	p
Pacientes, n	546	131	
Edad (años)	65,26 ± 10,88 57 [65-74]	66,76 ± 10,06 61 [66-74]	0,187
Sexo (varones)	460 (84,25)	110 (83,97)	0,937
Hipertensión	372 (68,13)	97 (74,05)	0,188
Diabetes mellitus	146 (26,74)	47 (35,88)	0,037*
Hiperlipemia	381 (69,78)	96 (73,28)	0,43
Tabaquismo	126 (23,08)	33 (25,19)	0,608
Historia de angina	383 (70,15)	93 (70,99)	0,849
Infarto de miocardio previo	196 (35,90)	43 (32,82)	0,509
Medicación con estatinas	188 (34,43)	58 (44,27)	0,035*

CCC: circulación colateral coronaria.

Los datos se expresan como n (%), media ± desviación estándar o mediana [intervalo intercuartílico].

\*Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

presentaban el genotipo CC, 194 (28,66%) eran heterocigotos (CT) y 21 (3,01%) tenían el genotipo TT. Las frecuencias de los alelos C y T en el total de la muestra fueron del 82,57 y el 17,43% respectivamente (tabla 2). Estas frecuencias son compatibles con el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $\chi^2 = 0,059$ ;  $p = 0,8077$ ).

El análisis del polimorfismo *PLAU* P141L (C > T) mostró asociación entre la distribución del genotipo y el grado de CCC (prueba exacta de Fisher,  $p = 0,0160$ ). La frecuencia del genotipo TT entre los pacientes con EAC y CCC deficiente fue mayor que entre los que mostraron una CCC bien desarrollada. Por otra parte, la variante alélica T también fue más frecuente en pacientes con CCC deficiente ( $\chi^2 = 8,0706$ ;  $p = 0,004$ ) (tabla 2). Esta asociación se mantuvo también en el subgrupo de pacientes con estenosis de alto grado ( $\geq 95\%$ ) ( $p = 0,016$ ).

Las OR de tener CCC deficiente para los pacientes portadores del alelo T que codifica para la forma L141 en el modelo dominante (CT + TT frente a CC) (OR = 1,92; IC95%, 1,22-3,02;  $p = 0,005$ ) y en el modelo aditivo (OR = 1,79; IC95%, 1,19-2,72;  $p = 0,005$ ) mostraron significación estadística (tabla 3). Cuando se ajustó por posibles variables de confusión como la DM y la medicación con estatinas (tabla 1), las OR de tener CCC deficiente para los pacientes portadores del alelo T en el modelo dominante (CT + TT frente a CC) (OR = 1,93; IC95%, 1,22-3,05;  $p = 0,008$ ) y el modelo aditivo (OR = 1,81; IC95%, 1,19-2,74;  $p = 0,008$ ) también fueron estadísticamente significativas (tabla 3). Cuando los datos se ajustaron por separado por DM o por medicación con estatinas, se obtuvieron

**Tabla 2**

Asociación de las distribuciones genotípicas y alélicas del polimorfismo *PLAU* P141L (rs2227564) en pacientes con enfermedad arterial coronaria en función de la circulación colateral coronaria

	CCC deficiente (n = 546)	CCC bien desarrollada (n = 131)	p
Genotipo CC	359	103	0,0160 <sup>a</sup>
Genotipo CT	168	26	
Genotipo TT	19	2	
Alelo C	886	232	$\chi^2 = 8,0706$ ; $p = 0,004^b$
Alelo T	206	30	

CCC: circulación colateral coronaria.

Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

<sup>a</sup> Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar las diferencias entre grupos de genotipos.

<sup>b</sup> Se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  de Pearson para evaluar la distribución alélica.

**Tabla 3**

Odds ratio del polimorfismo de un solo nucleótido *PLAU* P141L (rs2227564) en pacientes con enfermedad arterial coronaria con respecto a la circulación colateral coronaria según diferentes modelos de herencia

Modelo	OR (IC95%)	p	DM+ME, ORa (IC95%)	p	DM, ORa (IC95%)	p	ME, ORa (IC95%)	p
Dominante	1,92 (1,22-3,02)	0,005	1,93 (1,22-3,05)	0,008	1,88 (1,19-2,97)	0,006	1,96 (1,24-3,09)	0,004
Aditivo	1,79 (1,19-2,72)	0,005	1,81 (1,19-2,74)	0,008	1,78 (1,18-2,68)	0,006	1,83 (1,21-2,78)	0,004
Recesivo	2,35 (0,54-10,11)	0,260	2,42 (0,55-10,61)	0,277	2,44 (0,56-10,67)	0,234	2,35 (0,54-10,26)	0,255
Codominante	1,79 (1,13-2,86)	0,014	1,79 (1,12-2,88)	0,020	1,75 (1,10-2,79)	0,019	1,83 (1,15-2,93)	0,011

DM: diabetes mellitus; IC95%: intervalo de confianza del 95%; ME: medicación con estatinas; OR: odds ratio; ORa: odds ratio ajustada. Un valor  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

resultados similares (tabla 3). Considerando que la diferencia del porcentaje de desviación entre la OR bruta y la OR ajustada por DM y/o medicación con estatinas estaba por debajo de 10%, se concluye que estas variables no son factores de confusión.

El análisis de la interacción entre el SNP y covariables significativas no reveló asociación alguna. Asumiendo las tasas del 18,86 y el 11,45% de presencia del alelo T en pacientes con CCC deficiente y bien desarrollada respectivamente, la potencia estadística para detectar diferencias genéticas fue del 81,6%.

## DISCUSIÓN

La comprensión del programa genético que conduce al desarrollo de las arterias colaterales es de una gran importancia para mejorar el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la EAC<sup>7,8</sup>. Las colaterales coronarias pueden ser un marcador pronóstico útil: los pacientes con escasa colateralización tienen mayor riesgo de muerte y se debe seguirlos de cerca. Recientemente, un metanálisis de 12 estudios y 6.529 pacientes mostró que la CCC se asocia con una sustancial mejora de la supervivencia<sup>5</sup>. Este estudio demostró que los pacientes con alto grado de colateralización muestran una reducción significativa del riesgo de muerte en comparación con los pacientes con baja colateralización (riesgo relativo = 0,64; IC95%, 0,45-0,91;  $p = 0,012$ ).

La urocinasa, que induce una cascada proteolítica local de gran importancia tanto en la remodelación vascular como en la angiogénesis, es uno de los participantes clave en el mecanismo de respuesta a la lesión cardiovascular y el crecimiento colateral, lo que la convierte en una interesante y prometedora diana terapéutica en las enfermedades vasculares<sup>16,18,31</sup>. En modelos de remodelación vascular inducidos por flujo, el contenido de uPA se correlacionó con el nuevo crecimiento de la íntima<sup>32</sup> y los estudios en tejido arterial de ratones transgénicos<sup>17</sup> y de primates<sup>33</sup> van en el mismo sentido. En un modelo murino de isquemia del miembro posterior, se ha comprobado que los ratones deficientes en uPA muestran menos capacidad endógena para restaurar el flujo sanguíneo que los ratones control<sup>19</sup>. Por otro lado, Traktuev et al<sup>34</sup> demostraron que la sobreexpresión de uPA estimula el crecimiento de los vasos y la perfusión de los tejidos, lo que limita el daño miocárdico y ayuda a la posterior remodelación tras el infarto.

En la superficie celular, uPA, que es una proteína multifuncional multidominio, se une al receptor de alta afinidad de la urocinasa (uPAR)<sup>35</sup>, que se localiza en el borde de ataque de la célula migratoria, lo que permite la proteólisis regulada de proteínas de la matriz extracelular en la dirección de movimiento de la célula. Por otro lado, el complejo uPA-uPAR también regula la remodelación vascular por vías independientes de la proteólisis y la generación de plasmina: interacciona, entre otros, con proteínas de matriz, integrinas y receptores de endocitosis, y activa la señalización intracelular y la expresión génica, con lo que regula la adhesión celular, la migración, la diferenciación y la proliferación<sup>16</sup>. Por otra

parte, la arteriogénesis también se promueve por la infiltración de leucocitos mediada por uPA que no depende de uPAR<sup>19</sup>.

Respecto al SNP *PLAU* P141L, se ha demostrado que la sustitución de prolina por leucina en la posición del aminoácido 121 aumenta la hidrofugacidad de la región<sup>21</sup>. Esta sustitución puede afectar también a la estructura terciaria de la molécula, ya que la P121 es un componente de una de las tres estructuras de hoja beta antiparalelas en el dominio *kringle* de uPA<sup>21</sup>. Este cambio puede ser causa directa o indirecta de que disminuya la afinidad aparente por los coágulos de fibrina.

La capacidad de uPA para inducir quimiotaxis en las células musculares lisas se ha atribuido a la unión del dominio *kringle* de uPA a la superficie de las células y la asociación de uPA con uPAR<sup>36</sup>. El uPA puede unirse simultáneamente a dos receptores en la superficie celular: a uPAR a través del dominio semejante al factor de crecimiento y a la integrina Mac-1 a través de los dominios *kringle* y proteolítico<sup>37</sup>. Este complejo trimolecular multicontacto puede desempeñar un papel importante en el control de la migración de células inflamatorias y en la homeostasis vascular<sup>37</sup>. Por otra parte, el dominio *kringle* de uPA se une en la superficie celular a un receptor específico que es distinto de uPAR<sup>36</sup> y contiene una secuencia que interactúa con el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1<sup>38</sup>. El dominio *kringle* está implicado en la señalización intracelular y en la inducción de la migración y la adhesión celulares<sup>39</sup>.

Además de la asociación de la variante T de uPA con una reducción de la CCC presentada en este trabajo, distintos estudios demuestran que el SNP *PLAU* P141L está involucrado en otros estados patológicos, como los trastornos neurológicos y el cáncer. De particular interés es el papel de uPA en la enfermedad de Alzheimer<sup>20,23,25,26,40,41</sup>. Este es atribuible a su implicación funcional en la generación de plasmina, proteasa capaz de degradar las proteínas betaamiloides. Cabe destacar que Riemenschneider et al<sup>23</sup> encontraron mayores recuentos de placas en las cortezas temporales de los pacientes portadores del alelo T de *PLAU* P141L en comparación con los pacientes sin este alelo, y que un reciente metanálisis ha confirmado que el alelo T incrementa el riesgo de tener esta enfermedad<sup>26</sup>. En otras enfermedades como el cáncer, se ha podido observar una asociación entre el genotipo CC de este polimorfismo y la invasión y metástasis del cáncer colorrectal<sup>22</sup> o la relación del SNP con la susceptibilidad al carcinoma escamoso de lengua<sup>27</sup>. Además, Begin et al<sup>24</sup> observaron una correlación de este SNP con la función de uPA a través de la matriz extracelular en la patología del asma. Muy recientemente, se ha publicado una asociación del SNP P141L con las concentraciones de lípidos en suero<sup>28</sup> y, finalmente, con la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>29</sup>.

Estas observaciones ponen de relieve la importancia biológica de este SNP funcional de uPA, que afecta a la estructura *kringle* de la proteína, y son coherentes con la asociación entre el alelo T en pacientes con EAC y la CCC reducida detectada en esta subpoblación.

Estas observaciones confirman la implicación del SNP *PLAU* P141L en el proceso arteriogénico de crecimiento de las arteriolas



coronarias colaterales. Es posible que la variante L141, que se ha demostrado que afecta a la estructura del dominio *kringle* de la proteína y la posterior reducción de su afinidad por la fibrina, pueda afectar a la eficiencia de la remodelación de la matriz extracelular y la capacidad de migración de las células musculares lisas, con lo que disminuye la respuesta arteriogénica de los pacientes con EAC portadores de la variante alélica T.

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados muestran, por primera vez, una fuerte asociación entre el SNP *PLAU* P141L y la CCC. Los pacientes con EAC con la variante funcional L141 muestran mayor probabilidad de tener una CCC deficiente. Aunque los resultados presentados en este documento deben replicarse en cohortes adicionales, el polimorfismo *PLAU* P141L podría ser una herramienta genética predictora de la respuesta arteriogénica en los pacientes con EAC. Estudios basados en el análisis genético de grandes muestras de casos y controles mediante genotipificación de miles de SNP distribuidos por todo el genoma (estudios de asociación de genoma completo) permitirán descubrir otros *loci* asociados con el desarrollo de CCC, como recientemente se ha demostrado para la enfermedad coronaria y el infarto de miocardio (revisado por Companioni et al<sup>42</sup>. en 2011). Además, dado el papel central de uPA en la formación de la neointima durante la remodelación arterial, se requieren ensayos de migración *in vitro* utilizando células musculares lisas de los pacientes que poseen el alelo T para comprobar la relevancia funcional de este polimorfismo. Por otra parte, y como defienden distintos autores<sup>16</sup>, estos resultados respaldan la idea de que la terapia génica de uPA o la mejora de la producción local de uPA podrían ser herramientas prometedoras para la estimulación local del crecimiento arterial colateral y el tratamiento del miocardio isquémico.

## AGRADECIMIENTOS

Damos las gracias a Àlex Cordero, Montse Cairó, Eva Sánchez, Dolors Colell, Teresa Torrent, María José Fernández de Muniain y Miquel Rugat por su colaboración y asistencia técnica.

## FINANCIACIÓN

Este trabajo recibió el apoyo de la Universitat de Barcelona (proyecto ACESBELL 08) y la Fundació La Marató de TV3 07 (proyecto 080810).

## CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

## BIBLIOGRAFÍA

- Seiler C. The human coronary collateral circulation. *Heart*. 2003;89:1352-7.
- Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJ. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367:1747-57.
- Seiler C. The human coronary collateral circulation. *Eur J Clin Invest*. 2010;40:465-76.
- Traupe T, Gloekler S, De Marchi SF, Werner GS, Seiler C. Assessment of the human coronary collateral circulation. *Circulation*. 2010;122:1210-20.
- Meier P, Hemingway H, Lansky AJ, Knapp G, Pitt B, Seiler C. The impact of the coronary collateral circulation on mortality: a meta-analysis. *Eur Heart J*. 2012;33:614-21.
- Pohl T, Seiler C, Billinger M, Herren E, Wustmann K, Mehta H, et al. Frequency distribution of collateral flow and factors influencing collateral channel development. Functional collateral channel measurement in 450 patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1872-8.
- Teunissen PF, Horrevoets AJ, Van Royen N. The coronary collateral circulation: genetic and environmental determinants in experimental models and humans. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;52:897-904.
- Zhang J, Regieli JJ, Schipper M, Entius MM, Liang F, Koerselman J, et al. Inflammatory gene haplotype-interaction networks involved in coronary collateral formation. *Hum Hered*. 2008;66:252-64.
- Fulton WF. Chronic generalized myocardial ischaemia with advanced coronary artery disease. *Br Heart J*. 1956;18:341-54.
- Van Royen N, Piek JJ, Schaper W, Fulton WF. A critical review of clinical arteriogenesis research. *J Am Coll Cardiol*. 2009;55:17-25.
- Deindl E, Schaper W. The art of arteriogenesis. *Cell Biochem Biophys*. 2005;43:1-15.
- Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449-58.
- Cai W, Schaper W. Mechanisms of arteriogenesis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40:681-92.
- Sho E, Sho M, Singh TM, Nanjo H, Komatsu M, Xu C, et al. Arterial enlargement in response to high flow requires early expression of matrix metalloproteinases to degrade extracellular matrix. *Exp Mol Pathol*. 2002;73:142-53.
- Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Strniskova M, et al. Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*. 2003;92:561-8.
- Tkachuk VA, Plekhanova OS, Parfyonova YV. Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87:231-51.
- Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D, et al. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. *Circulation*. 1997;96:3180-91.
- Parfenova EV, Plekhanova OS, Men'shikov MI, Stepanova VV, Tkachuk VA. Regulation of growth and remodeling of blood vessels: the unique role of urokinase. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 2009;95:442-64.
- Deindl E, Ziegelhoffer T, Kanse SM, Fernandez B, Neubauer E, Carmeliet P, et al. Receptor-independent role of the urokinase-type plasminogen activator during arteriogenesis. *FASEB J*. 2003;17:1174-6.
- Finckh U, Van Hadeln K, Muller-Thomsen T, Alberici A, Binetti G, Hock C, et al. Association of late-onset Alzheimer disease with a genotype of *PLAU*, the gene encoding urokinase-type plasminogen activator on chromosome 10q22.2. *Neurogenetics*. 2003;4:213-7.
- Yoshimoto M, Ushiyama Y, Sakai M, Tamaki S, Hara H, Takahashi K, et al. Characterization of single chain urokinase-type plasminogen activator with a novel amino-acid substitution in the ringle structure. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1293:83-9.
- Przybylowska K, Smolarczyk K, Kulig A, Romanowicz-Makowska H, Dziki A, Ulanska J, et al. Antigen levels of the urokinase-type plasminogen activator and its gene polymorphisms in colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2002;181:23-30.
- Riemenschneider M, Konta L, Friedrich P, Schwarz S, Taddei K, Neff F, et al. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 2006;15:2446-56.
- Begin P, Tremblay K, Daley D, Lemire M, Claveau S, Salesse C, et al. Association of urokinase-type plasminogen activator with asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175:1109-16.
- Liu X, Yue C, Xu Z, Shu H, Pu M, Yu H, et al. Association study of candidate gene polymorphisms with amnesic mild cognitive impairment in a Chinese population. *PLoS One*. 2012;7:e41198.
- Wu W, Jiang H, Wang M, Zhang D. Meta-analysis of the association between urokinase-plasminogen activator gene rs2227564 polymorphism and Alzheimer's disease. *Am J Alzheimer's Dis Other Dement*. 2013;28:517-23.
- Zhong F, Yang XC, Bu LX, Li NY, Chen WT. Single nucleotide polymorphisms in the u-PA gene are related to susceptibility to oral tongue squamous cell carcinoma in the northern Chinese Han population. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14:781-4.
- Tamura T, Morita E, Kawai S, Okada R, Naito M, Wakai K, et al. Significant association of urokinase plasminogen activator Pro141Leu with serum lipid profiles in a Japanese population. *Gene*. 2013;524:363-7.
- Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012;491:119-24.
- Rentrop KP, Cohen M, Blanke H, Phillips RA. Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol*. 1985;5:587-92.
- Krasnikova TL, Parfyonova Y, Alekseeva IA, Arefieva TI, Mukhina SA, Dobrovolsky AB, et al. Urokinase plasminogen activator system in humans with stable coronary artery disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26:354-7.
- Korshunov VA, Solomatina MA, Plekhanova OS, Parfeonova YV, Tkachuk VA, Berk BC. Plasminogen activator expression correlates with genetic differences in vascular remodeling. *J Vasc Res*. 2004;41:481-90.
- Kenagy RD, Vergel S, Mattsson E, Bendeck M, Reidy MA, Clowes AW. The role of plasminogen, plasminogen activators, and matrix metalloproteinases in primate arterial smooth muscle cell migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16:1373-82.
- Traktuev DO, Tsokolaeva ZI, Shevelev AA, Talitskiy KA, Stepanova VV, Johnstone BH, et al. Urokinase gene transfer augments angiogenesis in ischemic skeletal and myocardial muscle. *Mol Ther*. 2007;15:1939-46.

35. Blasi F. The urokinase receptor. A cell surface, regulated chemokine. *APMIS*. 1999;107:96–101.
36. Mukhina S, Stepanova V, Traktouev D, Poliakov A, Beabealashvilly R, Gursky Y, et al. The chemotactic action of urokinase on smooth muscle cells is dependent on its kringle domain. Characterization of interactions and contribution to chemotaxis. *J Biol Chem*. 2000;275:16450–8.
37. Pluskota E, Soloviev DA, Plow EF. Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration. *Blood*. 2003;101:1582–90.
38. Mimuro J, Kaneko M, Murakami T, Matsuda M, Sakata Y. Reversible interactions between plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1160:325–34.
39. Stepanova VV, Beloglazova IB, Gursky YG, Bibilashvily RS, Parfyonova YV, Tkachuk VA. Interaction between kringle and growth-factor-like domains in the urokinase molecule: possible role in stimulation of chemotaxis. *Biochemistry (Mosc)*. 2008;73:252–60.
40. Liu RM, Van Groen T, Katre A, Cao D, Kadisha I, Ballinger C, et al. Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011;32:1079–89.
41. Barker R, Kehoe PG, Love S. Activators and inhibitors of the plasminogen system in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*. 2012;16:865–76.
42. Companioni O, Rodríguez Esparragón F, Fernández-Aceituno AM, Rodríguez Pérez JC. Variantes genéticas, riesgo cardiovascular y estudios de asociación de genoma completo. *Rev Esp Cardiol*. 2011;64:509–14.