Asociación de polimorfismos del gen factor de necrosis tumoral (TNF) con el desarrollo de reestenosis de stent post angioplastia coronaria

Braulio Bobadilla¹, Jenny Ruedlinger², Nicolás Saavedra², Marcelo Potthoff¹, Fernando Lanás¹, Luis Salazar², Luis Pérez³.

1. Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera.

2. Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de la Frontera.

3. Facultad de Medicina, Universidad de Concepción.

Proyecto FONDECYT: N° 1141292

Recibido 19 de Abril 2016 / Aceptado 27 de Julio 2016

Rev Chil Cardiol 2016; 35: 91-98

Introducción: La intervención coronaria percutánea (PCI en inglés) con implante de stent coronario es uno de los procedimientos más utilizados para la revascularización miocárdica en condiciones agudas o crónicas. Múltiples factores se han relacionado con la restenosis de stent, incluyendo aspectos clínicos, angiográficos, genéticos y epigenéticos. La respuesta inflamatoria en gran parte está determinada genéticamente y probablemente sea el rol más importante en la restenosis. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) es un mediador clave en la respuesta inflamatoria actuando en sitios de injuria tisular inducida por el daño de las paredes del vaso.

Objetivo: Determinar la asociación entre polimorfismos genéticos del TNF y restenosis en pacientes coronarios sometidos a angioplastia.

Métodos: Se diseñó un estudio de casos y controles incidentes no pareados, aprobado por el comité de ética institucional. Se incluyeron pacientes con cardiopatía coronaria sometidos a PCI con implante de stent BMS o DES, con un tiempo de control angiográfico mayor de 6 meses. Los casos fueron definidos como aquellos pacientes con estenosis de stent $>50\%$ y como controles aquellos con estenosis $<50\%$, con respecto del lumen del vaso de referencia. Se efectuó la genotipificación de los polimorfismos rs361525 (-238G/A) y rs1799964 (-1031 T/C) del gen TNF mediante PCR en tiempo real mediante sondas alelo- específicas. Ade-

más, se registraron variables clínicas y demográficas.

Resultados: Se incluyó en este estudio de análisis de genotipificación del polimorfismo del gen TNF 82 pacientes como casos, y 102 controles. No hubo diferencias significativas en las siguientes variables clínicas y demográficas: edad (63.7 ± 10.5 vs. 65.4 ± 9.6 años; $p=0.24$), género masculino (75 vs. 69%, $p=0.5$), IMC (28.5 ± 3.6 vs. 28 ± 3.8 Kg/m²; $p=0.78$) y tabaquismo (79 vs. 77%; $p=0.7$). En contraste, se observó una diferencia significativa en la frecuencia de DM-2 casos y controles (43.2 vs. 26.5%; $p=0.03$) y %HbA1c entre ambos grupos (6.78 ± 1.5 vs. $6.1 \pm 0.8\%$; $p=0.01$). Respecto a las variantes genéticas estudiadas, no hubo diferencias significativas en la frecuencia relativa del alelo mutado tanto para el polimorfismo rs361525 (Alelo A, casos: 0.06 vs. controles: 0.08; $p=0.37$), como para la variante rs1799964 (Alelo C, casos: 0.2 vs. controles: 0.2; $p=0.96$). Las OR asociadas a dichos alelos fueron 0.68 (I.C. 95% = 0.29 – 1.59) y 0.99 (I.C. 95% = 0.58 – 1.67), respectivamente; confirmando la ausencia de asociación.

Conclusión: Nuestros datos sugieren que las variantes genéticas estudiadas no están relacionadas al desarrollo de restenosis en los sujetos estudiados, y probablemente en nuestra población los factores clínicos sean más determinantes para el desarrollo de restenosis coronaria post angioplastia que los factores genéticos.

Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor gen: are they associated to Stent Restenosis after Coronary Angioplasty?

Multiple factors have been associated to the development of stent restenosis after coronary angioplasty (PCA). including clinical, angiographic, genetic and epigenetic factors. The inflammatory response is genetically determined and it may be the most important factor. Tumor necrosis factor α (TNF α) is a potent mediator of this response at the endothelial wall.

Aim: To determine the association between TNF α genetic polymorphisms and stent restenosis.

Methods: A case-control study was performed in patients submitted to PTCA with stent implantation(-bare metal or drug eluting stent) at least 6 months prior to the study. Cases were defined by the presence of $\geq 50\%$ intra stent stenosis. PCR was used for type classification of polymorphisms rs361525 (-238G/A) y rs1799964 (-1031 T/C) of the TNF α gene.

Results: 82 cases and 102 controls were included. No differences were observed in clinical and demogra-

phic variables: age (63.7 ± 10.5 vs. 65.4 ± 9.6 years, $p=0.24$, for cases and controls, respectively), male gender (75 vs. 69%, $p=0.5$), BMI (28.5 ± 3.6 vs. 28 ± 3.8 Kg/m², $p=0.78$) and active smoking (79 vs. 77%, $p=0.7$). In contrast, Diabetes was more frequent in cases than in controls (43.2 vs. 26.5%, $p=0.03$). There was no difference in the relative frequency of mutations of the rs361525 polymorphism (Allele A, 0.06 vs 0.08, $p=0.37$ for cases and controls, respectively) nor for variant rs1799964 (0.2 in both cases and controls). Non significant associations were confirmed by Odd ratios with 0 included in the 95% confidence interval.

Conclusion: No association of genetic polymorphisms of TNF α and stent restenosis was found, which suggests that clinical factors may be more important for the development of post PTCA stent restenosis.

Keywords: Restenosis, Angioplasty, coronary; genetic polymorphisms, tumor necrosis factor α .

Introducción: La cardiopatía coronaria es una de las principales causas de morbilidad a nivel mundial; y la intervención coronaria percutánea (PCI en inglés) con el implante de stent coronario es uno de los procedimientos más utilizados para la revascularización miocárdica en condiciones agudas o crónicas. Desde su introducción ha sido ampliamente aceptada para el tratamiento de la lesión coronaria tanto por su efectividad como por su seguridad. Sin embargo, uno de sus principales inconvenientes es la reestenosis del vaso tratado, con la reaparición de síntomas y necesidad de nuevos procedimientos, terminando muchos de los casos en la cirugía de revascularización miocárdica. Con ello aumentan significativamente los costos financieros para el sistema de salud.

La reestenosis fue un problema común en la era en que se practicaba sólo angioplastia con balón y ocurría en hasta un 50% de los pacientes tratados¹. Con la introducción de los stents BMS (bare metal stent) la incidencia bajó a un 20-30%² y a 5-10% con stents DES³ (drug eluting stent); sin embargo, sigue siendo un problema que no está resuelto.

La fisiopatología de la reestenosis no está plenamente comprendida, y hay ciertos pacientes que tienden a tener mayor riesgo para dicha complicación⁴. Parece ser que el estímulo gatillante de la reestenosis es la cascada de eventos que se suceden con la dilatación por balón (barotrauma) y colocación de stent en la PCI, que provocan una denudación endotelial y hemorragia subintimal⁴⁻⁵. Esto resulta en varios procesos que incluyen proliferación y migración de células de la musculatura lisa vascular, formación de matriz extracelular, e hiperplasia neointimal⁴⁻⁶; además, se pone en marcha una cascada de eventos que se caracterizan por una respuesta inflamatoria que involucra activación de plaquetas, leucocitos, sistema de coagulación-fibrinólisis, factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias⁶⁻⁷. Se ha determinado la participación de diversos factores relacionados con reestenosis, tales como factores clínicos (diabetes mellitus⁸, hipertensión⁹⁻¹¹, historia de reestenosis¹²), y factores angiográficos (diámetro del vaso, longitud de la obstrucción, tipo de stent, fractura de stent).

Existe mucha evidencia para apoyar el papel de los factores genéticos en el riesgo de reestenosis, independiente de las variables clínicas convencionales y muchos estudios se han centrado en la identificación de polimorfismos genéticos asociados a este proceso¹³. La identificación de dichos marcadores, entre los cuales destacan los polimorfismos genéticos relacionados con inflamación, remodelado y función vascular e hiperplasia neointimal, podría ser útil en la estratificación de riesgo de acuerdo a la composición

genética del paciente. Por otro lado, la identificación de polimorfismos genéticos permitiría ayudar a la comprensión de los mecanismos implicados en la reestenosis, y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Otros factores que han sido invocados recientemente en la reestenosis de stent son los mecanismos epigenéticos. Estos modulan la expresión génica sin modificar la secuencia del ADN (a través de acetilación de histonas y metilación de ADN)⁵⁻¹⁴. Sin embargo, la contribución de estos factores al desarrollo de reestenosis no está completamente clara.

La respuesta inflamatoria juega un rol fundamental en la reestenosis y las diferencias en la composición genética entre individuos podrían explicar en parte el riesgo de la reestenosis. Una de las principales citocinas que tiene un papel mediador determinante en el inicio, progresión y riesgo asociado a las enfermedades cardiovasculares es el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)¹⁵⁻¹⁶. Ha sido documentado el rol de TNF- α en el desarrollo de reestenosis¹⁷, así como también que el gen TNF, que codifica para la citocina pro-inflamatoria, contiene diversos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) distribuidos a través de su estructura.

El objetivo del presente estudio es identificar si existe relación entre el polimorfismo genético del gen TNF con la presencia de reestenosis coronaria post angioplastia en pacientes chilenos con enfermedad arterial coronaria sometidos a PCI exitosa.

Métodos

Se diseñó un estudio de casos incidentes y controles no pareados. Participaron pacientes con una historia de angioplastia coronaria efectuada al menos seis meses antes, que por razones clínicas fueron referidos para angiografía coronaria.

Se consideran casos pacientes del Hospital Dr. Hernán Henríquez Aravena, de Temuco, y del Hospital Guillermo Grant Benavente, de Concepción, sometidos previamente a una angioplastia arterial coronaria exitosa al menos 6 meses antes con > 50% de obstrucción en el sitio de la angioplastia. Como controles se incluyeron pacientes sometidos previamente a una angioplastia arterial coronaria exitosa al menos 6 meses antes que tuvieron < 50% de obstrucción en el sitio de la angioplastia. El porcentaje de obstrucción coronaria se realizó por medio de estimación visual o calculado por el computador del angiógrafo.

Se efectuó la genotipificación del polimorfismo rs361525 (-238 G/A) y rs1799964 (-1031 T/C) del gen TNF, mediante PCR en tiempo real usando sondas alelo-específicas (TaqMan® SNP Genotyping Assay, Life Technologies,

EE.UU.) en un sistema StepOne™ Real-Time (Life technologies).

Análisis estadístico.

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación estándar (SD). Para el cálculo de las diferencias entre la media de dos variables continuas se utilizó el test t Student para muestras no pareadas o el test no paramétrico de Mann-Whitney en caso de no seguir una distribución normal (evaluado por el Test de D'Agostino). Las diferencias entre variables no continuas, distribución genotípica, frecuencia alélica y equilibrio de Hardy-Weinberg, se analizaron mediante el método de Chi cuadrado (χ^2). Se evaluó asociación entre reestenosis y polimorfismos con "Odds ratio". Adicionalmente, se realizó análisis estratificado de Mantel-Haenszel para variables potencialmente confusoras. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Se incluyó un total de 184 pacientes, 82 como casos y 102 como controles.

En la Tabla N° 1 se resumen los resultados de los parámetros clínicos, historia médica familiar, perfil lipídico y medicación. Sólo el porcentaje de casos con Diabetes Mellitus y el nivel de Hb A1c fueron significativamente mayores en los casos que en los controles. El resto de los parámetros clínicos y bioquímicos fueron comparables entre casos y controles.

En cambio, al comparar entre ambos grupos, se observaron diferencias significativas en relación al tipo de stent utilizado, stent BMS 48,4% reestenosis y para stent DES 20% (OR 3.756, IC 95% 1.34 - 10.50, $p = 0.008$).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los casos y controles respecto a las variantes genéticas estudiadas, tanto para el polimorfismo rs361525 (Alelo A, casos: 0.06 vs. controles: 0.08; $p = 0.37$), como para la variante rs1799964 (Alelo C, casos: 0.2 vs. controles: 0.2; $p = 0.96$). Todas las frecuencias genotípicas fueron consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg en casos y controles. Las OR asociadas a dichos alelos fueron 0.68 (I.C. 95% = 0.29 - 1.59) y 0.99 (I.C. 95% = 0.58 - 1.67), respectivamente, confirmando la ausencia de asociación (Tabla 2). Se descartó el tipo de stent como una variable de confusión en este estudio mediante un análisis estratificado de Mantel-Haenszel ajustado. Para el Alelo A stent BMS OR: 0.67 (I.C. 95% = 0.25 - 1.25) y DES OR 0.89 (I.C. 95% = 0.09 - 8.98). Para el Alelo C stent

Tabla 1. Características clínicas y demográficas de casos (reestenosis) y controles (sin reestenosis)

Parámetro	Casos (n = 82)	Controles (n = 102)	Valor P
Edad (años)	63.7 $\pm$ 10.5	65.4 $\pm$ 9.6	0.24
% Sexo masculino	75	69	0.5
P/A (mmHg)	133.8 $\pm$ 21.5	138.3 $\pm$ 25	0.2
Glicemia (mg/dL)	131.11 $\pm$ 64.5	112.3 $\pm$ 31	0.5
HbA1c (%)	6.78 $\pm$ 1.5	6.1 $\pm$ 0.8	0.01
% Dislipidemia	75.6	79	0.59
% Diabetes Mellitus	43.2	26.5	0.03
% Hipertensión	87	90	0.5
IMC (kg/m ²)	28.5 $\pm$ 3.6	28 $\pm$ 3.8	0.78
% Tabaquismo	79	77	0.7
Historia Familiar %			
Diabetes	46	34	0.1
IAM	8	8	0.46
Hipertensión	58.5	53	0.44
Perfil lipídico			
Colesterol total (mg/dL)	170.5 $\pm$ 42.5	172.2 $\pm$ 47.3	0.88
Triglicéridos (mg/dL)	152.2 $\pm$ 124	170.4 $\pm$ 86.2	0.3
HDL (mg/dL)	39.7 $\pm$ 10.7	37.6 $\pm$ 11	0.09
LDL (mg/dL)	103.9 $\pm$ 47.2	104.2 $\pm$ 40	0.64
Medicación %			
Estatinas	86.6	88	0.9
IECA	53.6	51	0.83
Beta bloqueadores	67	71	0.7
ARA II	19.5	29.5	0.33
Diuréticos	19.5	15.7	0.5
Clopidogrel	57	55	0.8
Aspirina	93	95	0.7

BMS OR: 0.68 (I.C. 95% = 0.38 - 1.24) y DES OR 4.71 (I.C. 95% = 0.78 - 28.41).

Discusión

En este trabajo estudiamos la posible asociación entre los polimorfismos del gen TNF -238 G>A y -1031 T>C y el desarrollo de reestenosis coronaria post-angioplastia, confirmada por angiografía en pacientes chilenos con enfermedad coronaria, describiendo además características clínicas y de laboratorio de los respectivos grupos de estudio. En relación a los hallazgos clínicos y de laboratorio, observamos una diferencia significativa en el número de individuos con diabetes en casos respecto de los controles presentando adicionalmente niveles más altos de HbA1c. La diabetes es un importante factor de riesgo de reestenosis⁵⁻⁸. La hipótesis más aceptada de este fenómeno es que la hiperglicemia induce disfunción endotelial y un estado pro-inflamatorio con incremento de la liberación de citoquinas y factores de crecimiento⁵⁻⁷⁻¹⁸⁻¹⁹; y la insulina está involucrada en la proliferación y migración de células de músculo liso (CML), lo que en conjunto resulta en una extensa formación de neointima y un incremento de

Tabla 2. Distribución genotípica, frecuencias alélicas relativas y Odds ratio (OR) de los SNPs de TNF estudiados en pacientes chilenos con Enfermedad coronaria que presentan (casos) y no presentan (controles) reestenosis.

SNP		Genotipos		Frecuencias Alélicas	
rs361525(−238 G>A)	GG	GA	AA	G	A
Casos (n= 82)	89%	11%	0	0.94	0.06
Controles (n= 102)	84%	16%	0	0.92	0.08
Valor p	0.65		0.37		
OR (IC)	0.68, IC: 0.29 a 1.59				
rs1799964(−1031 T>C)	TT	TC	CC	T	C
Casos (n= 82)	64.2%	33.3%	2.5%	0.8	0.2
Controles (n= 102)	63%	35%	2%	0.8	0.2
Valor p	0.96		0.96		
OR (IC)	0.99, IC: 0.58 a 1.67				

la susceptibilidad al desarrollo de reestenosis²⁰⁻²²⁻²³. Por otra parte, los niveles HbA1c constituyen un parámetro que permite evaluar el control glicémico y que a pobres niveles de control se relaciona con una mayor tasa de intervenciones del vaso tratado previamente (TVR)²⁴.

Así también, el proceso inflamatorio que ocurre como respuesta a la lesión vascular durante la angioplastia constituye uno de los factores más importantes en el desarrollo de reestenosis intra-stent²⁵⁻²⁶⁻⁵, considerada una reacción inflamatoria local²⁷. Adicionalmente, ha sido ampliamente descrito que factores genéticos influyen sobre la intensidad de la reacción y el resultado clínico y angiográfico que se presenta posterior a la implantación del stent⁴⁻²⁸⁻²⁷⁻²⁹⁻⁵. Monraats et al.,¹⁷ llevaron a cabo una investigación exhaustiva respecto a factores inflamatorios genéticos asociados a reestenosis en la población del estudio Determinantes Genéticos de Reestenosis (GENetic DEterminants of Reestenosis, GENDER), consistente en 3,104 pacientes tratados mediante PCI, reportando que variantes de cuatro genes se asociaron con un incremento (receptor $\beta 2$ - adrenérgico) o disminución (CD14, Factor estimulante de colonias 2 y eotaxina) en el riesgo de TVR. Adicionalmente, entre los hallazgos se describió que tres genotipos diferentes de la citoquina inmunosupresora IL-10 podrían considerarse como marcadores de riesgo en el desarrollo de reestenosis³⁰. Un mediador inflamatorio importante que se ha encontrado elevado tras la lesión vascular es TNF- α , fenómeno que ya ha sido demostrado en modelos animales de denudación por balón de la arteria carótida, reportándose entre los efectos un incremento de cuatro veces su expresión génica al compararse arterias le-

sionadas con aquellas sin lesión.³¹ También se ha observado que una disminución en la expresión de TNF- α , ya sea localmente como visto en cultivo de CML, resulta en una inhibición significativa del proceso reestenótico³². Tomando en cuenta el importante rol de la inflamación, y con el objeto de evaluar la posible relación de los SNPs de TNF -863C/A y -308G/A con reestenosis, Koch et al.,²³ realizaron la genotipificación de 1.850 pacientes sometidos a implantación de stent coronario, concluyendo que dichas variantes no estaban asociadas con la condición ni con resultados clínicos adversos posterior a la implantación de stent. Luego, Monraats et al.,¹⁷ en el estudio con pacientes del Proyecto GENDER mostraron que individuos con el genotipo - 238A/A (R.R. = 0.59, 95% IC: 0.37 – 0.94) y con el genotipo -1031C/C (R.R. = 0.77, 95% IC: 0.59 – 1.00) requerían frecuentemente menos TVR. Esto último podría deberse a un rol protector de estos SNPs, ya que se ha propuesto que los genotipos TC y CC de rs1799964 se asocian con una disminución de los niveles séricos de TNF- α (P <0.01 y P <0.05, respectivamente)³³. Adicionalmente, Monraats et al.,¹⁷ sugieren en su trabajo que la asociación de ambas variantes con una disminución del riesgo de reestenosis se debería aparentemente a una represión transcripcional, siendo esto apoyado por su estudio paralelo en ratones TNF-knockout. Por otro lado, ellos evaluaron el haplotipo -238G-1031T del gen TNF, encontrando una relación entre este y un aumento del riesgo clínico y angiográfico de reestenosis intra stent (ISR) (RR: 1.33, 95% CI: 1.05–1.69, P=0.02). Esto no estaría en concordancia con nuestros resultados, ya que no evidenciamos asociación entre los dos polimorfismos estudiados y el riesgo

Tabla 3. Distribución de frecuencias entre casos y controles según stent utilizado.

	Total	Restenosis
Stent BMS	159	77
Stent DES	25	5
OR 3.756 (IC 95% 1.34 - 10.50), p= 0.008		

de desarrollo de reestenosis, aun cuando debe notarse que el tamaño de muestra utilizado en nuestro caso es considerablemente menor. Además, la etnicidad es otro factor relevante a considerar ya que las poblaciones de ambos estudios son distintas (Caucásicos vs población chilena), aunque las frecuencias alélicas reportadas en ambos estudios muestran una clara similitud. En esta misma línea, como podía esperarse, las frecuencias genotípicas del SNP rs361525 reportadas aquí son similares a lo descrito por Santos et al.³⁴ en un estudio en mujeres chilenas. Por otro lado, nuestros resultados son comparables con los obtenidos en un trabajo llevado a cabo en población Mexicana³⁵, en que se demostró que la distribución de la variante rs361525 era similar en pacientes con y sin reestenosis, no encontrándose asociación. Otros dos estudios evaluaron la posible relación entre el SNP rs1799964 y enfermedad arterial coronaria (EAC) en población tunecina³⁶ y pakistaní,³⁷ respectivamente, describiendo frecuencias genotípicas similares a lo reportado en este trabajo, concluyendo ambos estudios que la variante no jugaría un rol importante en la patogénesis de la enfermedad. Por otro lado, se evidenció la existencia de una pequeña variación en las frecuencias genotípicas descritas en población chilena en este trabajo para los SNPs rs361525 y rs1799964 y

aquellas presentadas en un estudio en población china que buscaba evaluar la participación de TNF- α en la patogenia del accidente cerebrovascular³³.

Con el advenimiento de los stent medicados (DES), la incidencia de reestenosis disminuyó considerablemente de un 20-30% con BMS a un 5-10% con DES³. La tecnología de los DES permite liberar agentes antiinflamatorios, inmunomoduladores, y/o agentes anti-proliferativos en cantidades adecuadas y distribuidas en el sitio de lesión arterial durante el período inicial de curación de 30 días. Los mecanismos fisiopatológicos invocados en la reestenosis de los DES son factores biológicos (resistencia a la droga, reacciones de hipersensibilidad), factores mecánicos (sub-expansión del stent, distribución no uniforme de los strut del stent, fractura del stent, liberación no uniforme de la droga/depósito, descamación del polímero) y, factores técnicos (barotrauma fuera del segmento con stent, brecha stent, placas ateroscleróticas descubiertas residuales)²¹. En nuestro estudio un pequeño porcentaje de pacientes con stent medicados fueron incluidos en el reclutamiento, los que, al ser comparados con los pacientes tratados con BMS presentaron una menor frecuencia de reestenosis.

En nuestro estudio no se ha encontrado asociación entre la reestenosis de stent coronario y los polimorfismos del gen TNF [rs361525 (-238 G/A) y rs1799964 (-1031 T/C)] estudiados, resultados que no variaron al realizar un análisis estratificado por tipo de stent. De acuerdo a los resultados observados, es probable que en nuestra población estudiada los factores clínicos sean más determinantes para el desarrollo de reestenosis coronaria post angioplastia que los factores genéticos.

Referencias

1. FISCHMAN D. L. et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Reestenosis Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331: 496–501.
2. FATTORI R, PIVAT. Drug-eluting stents in vascular intervention. *Lancet* 2003; 361: 247–249.
3. ROIRON C, SANCHEZ P, BOUZAMONDO A, LECHAT P, MONTALESCOT G. Drug-eluting stents: an updated meta-analysis of randomised controlled trials. *Heart* 2006; 92: 641–649.
4. MONRAATS PS, AGEMA RP, JUKEMA JW. Genetic predictive factors in reestenosis. *Pathol. Biol.* 2004; 52: 186–195.
5. JUKEMA JW, VERSCHUREN JJ, AHMED TA, QUAX PH. Reestenosis after PCI. Part 1: pathophysiology and risk factors. *Nat. Rev. Cardiol.* 2012; 9: 53–62.
6. AGEMA WR, JUKEMA JW, PIMSTONE SN, KASTELEIN JJ. Genetic aspects of reestenosis after percutaneous coronary interventions: towards more tailored therapy. *Eur. Heart J.* 2001; 22: 2058–2074.
7. LEE MS, DAVID EM, MAKKAR RR, WILENTZ JR. Molecular and cellular basis of reestenosis after percutaneous coronary intervention: the intertwining roles of platelets, leukocytes, and the coagulation-fibrinolysis system. *J. Pathol.* 2004; 203: 861–870.
8. Gilbert, J., Raboud, J. & Zinman, B. Meta-analysis of the effect of diabetes on reestenosis rates among patients receiving coronary angioplasty stenting. *Diabetes Care* 2004; 27: 990–994.
9. SINGH M, GERSH BJ, MCCLELLAND RL, HO KK, WILKERSON JT, PENNY WF, et al. Clinical and angiographic predictors of reestenosis after percutaneous coronary intervention: insights from the Prevention of Reestenosis With Transilast and Its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation* 2004; 109: 2727–2731.
10. AGEMA WR, MONRAATS PS, ZWINDERMAN AH, DE WINTER RJ, TIO RA, DOEVEDANS PA, et al. Current PTCA practice and clinical outcomes in The Netherlands: the real world in the pre-drug-eluting stent era. *Eur. Heart J.* 2004; 25: 1163–1170.
11. CUTLIP DE, CHAUHAN MS, BAIM DS, HO KK, POPMA JJ, CARROZZA JP, et al. Clinical reestenosis after coronary stenting: perspectives from multicenter clinical trials. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40: 2082–2089.
12. KASTRATI A, SCHÖMIG A, ELEZI S, SCHÜHLEN H, WILHELM M, DIRSCHINGER J. Interlesion dependence of the risk for reestenosis in patients with coronary stent placement in multiple lesions. *Circulation* 1998; 97: 2396–2401.
13. VERSCHUREN JJW, TROMPET S, POSTMUS I, SAMPIETRO ML, HEIJMANS BT, et al. Systematic Testing of Literature Reported Genetic Variation Associated with Coronary Reestenosis: Results of the GENDER Study. *PLoS ONE.* 2012; 7: e42401.
14. PONS D, TROMPET S, DE CRAEN AJ, THIJSEN PE, QUAX PH, DE VRIES M, et al. Genetic variation in PCAF, a key mediator in epigenetics, is associated with reduced vascular morbidity and mortality: evidence for a new concept from three independent prospective studies. *Heart* 2011; 97: 143–150.
15. MCKELLAR GE, MCCAREY DW, SATTAR N, MCINNES IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol.* 2009; 6: 410–7.
16. FRAGOSO JM. et al. El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades cardiovasculares: biología molecular y genética. *Gaceta Médica de México.* 2013; 149: 521–530.
17. MONRAATS PS, PIRES NM, SCHEPERS A, AGEMA WR, BOESTEN LS, DE VRIES MR, et al. Tumor necrosis factor- α plays an important role in reestenosis development. *FASEB J.* 2005; 19: 1998–2004.
18. ARONSON D, EDELMAN ER. Revascularization for coronary artery disease in diabetes mellitus: angioplasty, stents and coronary artery bypass grafting. *Rev. Endocr. Metab Disord.* 11, 75–86 (2010).
19. ARONSON D, BLOOMGARDEN Z, RAYFIELD EJ. Potential mechanisms promoting reestenosis in diabetic patients. *J Am Coll Cardiol.* 1996; 27: 528–35.
20. BAYES-GENIS A, CONOVER CA, SCHWARTZ RS. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and reestenosis. *Circ Res.* 2000; 86: 125–30.
21. DANGAS GD, CLAESSEN BE, CAIXETA A, SANIDAS EA, MINTZ GS, MEHRAN R. In-Stent Reestenosis in the Drug-Eluting Stent Era. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56: 1897–907.
22. GOMMA AH, ELRAYESS MA, KNIGHT CJ, HAWES E, FOX KM, HUMPHRIES SE. Fox and S. Humphries (2002). The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and-786T> C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent reestenosis. *European heart journal.* 2002; 23: 1955–1962.

23. KOCH W, TIROCH K, VON BECKERATH N, SCHÖMIG A, KASTRATI A. Tumor necrosis factor- α , lymphotoxin- α , and interleukin-10 gene polymorphisms and reestenosis after coronary artery stenting. *Cytokine* 2003; 24: 161-171.
24. REIMERS B, MOUSSA I, AKIYAMA T, TUCCI G, FERRARO M, MARTINI G, et al. Long-term clinical follow up after succesful repeat percutaneous interventions for stent reestenosis. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 186-192.
25. KOZINSKI M, KRZEWINA-KOWALSKA A, KUBICA J, ZBIKOWSKA-GOTZ M, DYMEK G, PIASECKI R, et al. Percutaneous coronary intervention triggers a systemic inflammatory response in patients treated for in-stent reestenosis-comparison with stable and unstable angina. *Inflammation Research* 2005; 54: 187-193.
26. OZER N, TANGUREK B, FIRAT F, OZER S, TARTAN Z, OZTURK R, et al. Effects of drug-eluting stents on systemic inflammatory response in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Heart and vessels*, 2008; 23: 75-82.
27. JOVILIANO EE, PICCINATO CE, DELLALIBERA-JOVILIANO R, MORIYA T, ÉVORA PR. Inflammatory markers and reestenosis in peripheral percutaneous angioplasty with intravascular stenting: current concepts. *Annals of vascular surgery* 2011; 25: 846-855.
28. YAMADA Y. Identification of genetic factors and development of genetic risk diagnosis systems for cardiovascular diseases and stroke. *Circulation Journal* 2006; 70: 1240-1248.
29. SAMPIETRO ML, TROMPET S, VERSCHUREN JJ, TALENS RP, DEELEN J, HEIJMANS BT, et al. A genome-wide association study identifies a region at chromosome 12 as a potential susceptibility locus for reestenosis after percutaneous coronary intervention. *Human molecular genetics* 2011; 20: 4748-4757.
30. MONRAATS PS, KURREEMAN FA, PONS D, SEWGOBIND VD, DE VRIES FR, ZWINDERMAN AH, ET AL. Interleukin 10: a new risk marker for the development of reestenosis after percutaneous coronary intervention. *Genes Immun* 2007; 8: 44-50.
31. CHIENG-YANE P, BOCQUET A, LÉTIENNE R, BOURBON T, SABLAYROLLES S, PEREZ M, HATEM SN. Protease-activated receptor-1 antagonist F 16618 reduces arterial reestenosis by down-regulation of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase 7 expression, migration, and proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2011; 336: 643-651.
32. LONG G, G WANG L, YB LIN, D WEI, L LIU, L YANG. Important Role of TNF- α in Inhibitory Effects of Radix Sophorae Flavescentis Extract on Vascular Reestenosis in a Rat Carotid Model of Balloon Dilatation Injury. *Planta Med* 2009; 75: 1-7.
33. CUI G, WANG H, LI R, ZHANG L, LI Z, WANG Y, et al. Polymorphism of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) gene promoter, circulating TNF-alpha level, and cardiovascular risk factor for ischemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 235.
34. SANTOS JL, PATIÑO GA, ANGEL BB, MARTÍNEZ JA, PÉREZ F, VILLARROEL AC, et al. Asociación entre polimorfismos de la región promotora del gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- alfa) con obesidad y diabetes en mujeres chilenas. *Revista médica de Chile* 2006; 134: 1099-1106.
35. MARTÍNEZ-RÍOS MA, PEÑA-DUQUE MA, FRAGOSO JM, DELGADILLO-RODRÍGUEZ H, RODRÍGUEZ-PÉREZ JM. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 10 promoter polymorphisms in Mexican patients with reestenosis after coronary stenting. *Biochemical genetics* 2009; 47: 707-716.
36. GHAZOUANI L, KHALIFA SB, ABBOUD N, ADDAD F, KHALFALLAH AB, BRAHIM N, et al. -308G>A and -1031T>C tumor necrosis factor gene polymorphisms in Tunisian patients with coronary artery disease. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 1247-1251.
37. ASIFA GZ, LIAQUAT A, MURTAZA I, KAZMI SA, JAVED Q. Tumor necrosis factor-alpha gene promoter region polymorphism and the risk of coronary heart disease. *The Scientific World Journal* 2013.