



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Dpto. de Biotecnología

ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DEL DNA ASOCIADA A
LA VULNERABILIDAD DE LA PLACA DE ATEROMA EN
PACIENTES CON ESTENOSIS DE CARÓTIDA.

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Biotecnología Biomédica

AUTOR/A: Rojas Diago, Marcos

Tutor/a: Sirera Pérez, Rafael

Cotutor/a externo: Plana Andani, Emma

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA



Máster Universitario en
Biotecnología
Biomédica



Instituto de Investigación
Sanitaria La Fe



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**ESTUDIO DE LA INTEGRIDAD DEL DNA ASOCIADA A LA VULNERABILIDAD DE LA
PLACA DE ATEROMA EN PACIENTES CON ESTENOSIS DE CARÓTIDA.**

**ESTUDI DE LA INTEGRITAT DE L'DNA ASSOCIADA A LA VULNERABILITAT DE LA PLACA
D'ATEROMA EN PACIENTS AMB ESTENOSIS DE CARÒTIDE.**

**STUDY OF DNA INTEGRITY ASSOCIATED WITH ATHEROMA PLAQUE VULNERABILITY
IN PATIENTS WITH CAROTID STENOSIS.**

TRABAJO FIN DE MÁSTER EN BIOTECNOLOGÍA BIOMÉDICA

ALUMNO/A: Marcos Rojas Diago

TUTOR/A: Rafael Sirera Pérez

COTUTOR/A: Emma Plana Andaní

**Curso académico 2023-2024
Valencia, 05 de Septiembre de 2024**

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Introducción	5
Estenosis de carótida: Causas y factores de riesgo	5
Mecanismos moleculares de vulnerabilidad de la placa de ateroma	6
Implicaciones clínicas y socioeconómicas de la inestabilidad de la placa de ateroma carotídeo	8
Métodos diagnósticos	9
Nuevos marcadores de inestabilidad de placa de ateroma	9
El cfDNA como biomarcador	10
El cfDNA en el ictus isquémico	11
Integridad del cfDNA	13
Objetivos	14
Materiales y Métodos	15
Reclutamiento de pacientes y procesamiento de muestras	15
Obtención de cfDNA a partir de plasma: Selección y optimización de Kit de extracción	15
Obtención del DNA genómico	17
Cuantificación del DNA	18
Selección de los fragmentos de estudio	18
Optimización de condiciones de PCR convencional	18
Optimización de condiciones de qPCR	21
Cuantificación de la concentración de los distintos fragmentos de cfDNA	22
Análisis estadístico	22
Resultados	22
Selección y optimización del kit de extracción	22
Optimización de condiciones PCR	25
<i>HTRA1, HDAC9 y NOTCH3</i>	25
<i>Optimización de condiciones para ALU y LINE</i>	26
Extracción y análisis de las muestras	27
CfDNA y su integridad en pacientes con estenosis carotídea	27
Discusión	37
Conclusiones	40
Bibliografía	41
Agradecimientos	45

RESUMEN:

Estudios previos a demostrado que la integridad del DNA libre circulante (cfDNA) puede tener valor diagnóstico en diferentes patologías. Recientemente, la integridad del cfDNA (cfDI) en el plasma se ha postulado como un indicador de la arteriosclerosis, sin embargo, su aplicación en el contexto concreto de la estenosis de carótida asociada a sintomatología neurológica ha sido escasamente explorado hasta la fecha.

Nuestro estudio se enfocó en evaluar el potencial diagnóstico de la cfDI en la estenosis de carótida sintomática, siendo la obtención de plasma un método rápido, fácil y mínimamente invasivo.

Una de las limitaciones iniciales del estudio era la poca cantidad de plasma disponible para análisis, por lo que la primera etapa consistió en evaluar el rendimiento y optimizar diferentes kits de extracción disponibles en el mercado, adaptados a la obtención de cfDNA a partir de pequeños volúmenes de plasma. Una vez identificado el método más efectivo, procedimos a aislar el cfDNA de muestras de plasma de pacientes con estenosis de carótida sintomática (casos) y asintomática (controles) obtenidas durante la cirugía de endarterectomía carotídea.

Para evaluar la cfDI, realizamos una amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real de fragmentos de genes de diferentes tamaños, fragmentos cortos (52 y 115 pares de bases) y fragmentos largos (entre 211 y 339 pares de bases), y calculamos la concentración de cada fragmento mediante la interpolación en una curva estándar preparada con DNA extraído de sangre total. La cfDI se estimó como el ratio entre los fragmentos largos y cortos de cada gen. Finalmente, comparamos las concentraciones de los diferentes fragmentos, así como la cfDI de los distintos genes, entre los grupos clínicos analizados.

ABSTRACT:

Previous studies have shown that the integrity of circulating free DNA (cfDNA) can have diagnostic value in different pathologies. Recently, cfDNA integrity (cfDI) in plasma has been postulated as an indicator of atherosclerosis, however, its application in the specific context of carotid stenosis associated with neurological symptomatology has been scarcely explored to date.

Our study focused on evaluating the diagnostic potential of cfDI in symptomatic carotid stenosis, with plasma collection being a quick, easy and minimally invasive method.

One of the initial limitations of the study was the small amount of plasma available for analysis, so the first stage was to evaluate the performance and optimise different commercially available extraction kits adapted to obtain cfDNA from small volumes of plasma. Once the most effective method was identified, we proceeded to isolate cfDNA from plasma samples from patients with symptomatic (cases) and asymptomatic (controls) carotid stenosis obtained during carotid endarterectomy surgery.

To assess cfDI, we performed real-time quantitative PCR amplification of gene fragments of different sizes, short fragments (52 and 115 base pairs) and long fragments (between 211 and 339 base pairs), and calculated the concentration of each fragment by interpolating on a standard curve prepared with DNA extracted from whole blood. The cfDI was estimated as the ratio between the long and short fragments of each gene. Finally, we compared the concentrations of the different fragments, as well as the cfDI of the different genes, between the clinical groups analysed.

Palabras Clave: Estenosis de carótida, ictus isquémico, DNA libre circulante (cfDNA), PCR cuantitativa (qPCR), integridad del cfDNA (cfDI)

Key Words: Carotid stenosis, ischemic stroke, Cell-free DNA (cfDNA), quantitative PCR (qPCR), cfDNA integrity (cfDI).

Introducción:

Estenosis de carótida: Causas y factores de riesgo

La estenosis carotídea es un trastorno médico caracterizado por el estrechamiento de las arterias carótidas, los principales vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro, el cuello y la cara.¹

La estenosis carotídea comienza con el daño de las capas internas de las arterias carótidas, causado por factores, como la edad, el sexo y los factores genéticos. El riesgo es mayor en los hombres que en las mujeres y aumenta con la edad. La hipertensión y la hiperlipidemia contribuyen a la formación de placa.¹ El tabaquismo, la diabetes, la obesidad y un estilo de vida sedentario son factores de riesgo importantes, ya que dañan los vasos sanguíneos y favorecen las condiciones para que se produzca la estenosis de carótida.¹ Este daño conduce a la acumulación de colesterol, lípidos y otros productos de desecho celular, lo que da lugar a la formación de placa. A medida que la placa se acumula, se endurece y estrecha las arterias en un proceso conocido como aterosclerosis (Fig. 1). Con el tiempo, la aterosclerosis va reduciendo o bloqueando el flujo sanguíneo, lo que puede provocar graves problemas de salud, como los ictus.¹

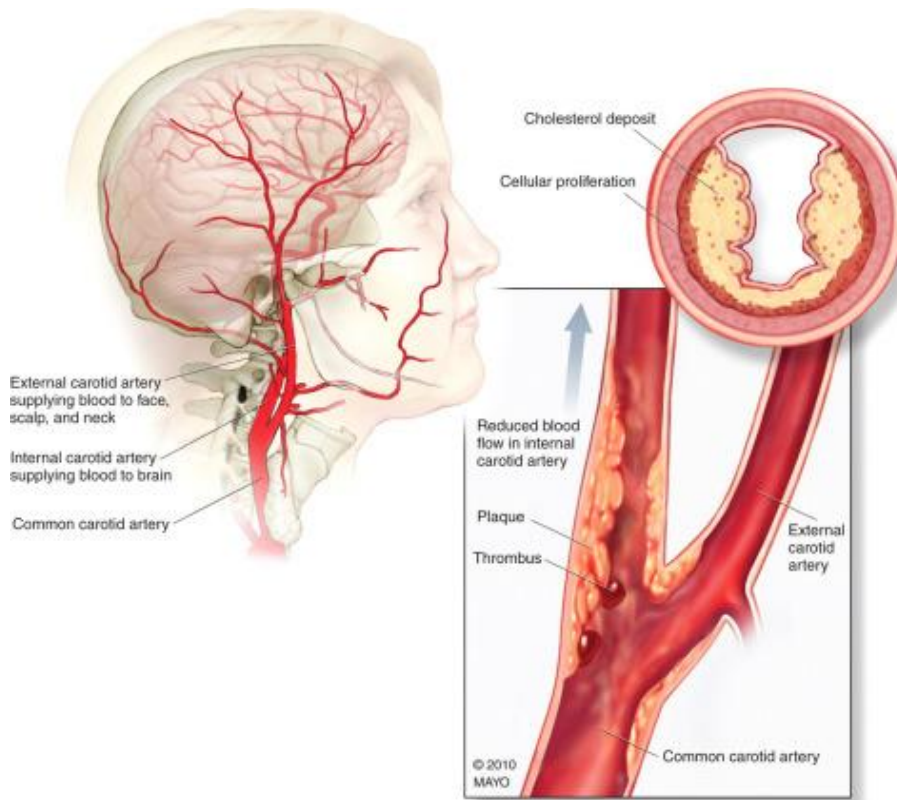


Fig 1: Estenosis de la arteria carótida: La placa ateromatosa en la bifurcación de la arteria carótida. La placa, resultado del depósito de colesterol y de la proliferación celular, altera el flujo sanguíneo y favorece la formación de trombos y émbolos.²

Mecanismos moleculares de vulnerabilidad de la placa de ateroma

La estenosis carotídea puede ser asintomática cuando las placas son estables, o, por el contrario, si las placas son vulnerables o inestables, pueden romperse, desprendiendo fragmentos al torrente sanguíneo, produciendo sintomatología neurológica.³

Las placas estables tienen una capa gruesa fibrosa, un núcleo lipídico más pequeño y menos células inflamatorias. La capa fibrosa de las placas estables es abundante en colágeno y células musculares lisas (CML), que proporcionan integridad estructural y resistencia a la rotura. El contenido reducido de células inflamatorias y los niveles más bajos de enzimas proteolíticas en las placas estables ayudan a mantener la matriz extracelular, reduciendo el riesgo de rotura.

En cambio, las placas vulnerables se caracterizan por tener una capa fina fibrosa, un gran núcleo necrótico rico en lípidos y abundante de células inflamatorias, sobre todo macrófagos. Estos macrófagos producen enzimas proteolíticas, que degradan los componentes de la matriz extracelular y debilitan la cubierta fibrosa, haciéndola propensa a la rotura.⁴ Además, estas placas suelen presentar una mayor neovascularización y hemorragia intraplaca, lo que contribuye a su inestabilidad.⁴ A nivel molecular, las placas vulnerables muestran una elevada expresión de citocinas proinflamatorias como la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF), que promueven aún más la inflamación y la degradación de la matriz.⁴

Los mecanismos celulares que subyacen a la vulnerabilidad de la placa implican una interacción dinámica entre varios tipos celulares, como las células endoteliales, las CML, los macrófagos y los linfocitos T. Las células endoteliales, cuando se activan por factores de riesgo como la hiperlipidemia y la hipertensión, expresan moléculas de adhesión que facilitan el reclutamiento de monocitos del torrente sanguíneo. Estos monocitos se diferencian en macrófagos dentro de la íntima y engullen partículas modificadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL), convirtiéndose en células espumosas. Estas células espumosas segregan citocinas y quimiocinas inflamatorias, repitiendo un ciclo de inflamación y reclutamiento adicional de células inmunitarias.⁵

Los macrófagos de las placas vulnerables también sufren apoptosis, lo que provoca la liberación de restos celulares y la acumulación de lípidos extracelulares, que forman el núcleo necrótico. La eliminación ineficaz de las células apoptóticas propicia la formación del núcleo necrótico y la inestabilidad de la placa. Los mediadores inflamatorios producidos por los macrófagos, como la IL-1 β y el TNF, activan las CML y las células endoteliales, promoviendo una mayor inflamación y degradación de la matriz.

Los linfocitos T, en particular las células T helper 1 (Th1), contribuyen a la vulnerabilidad de las placas al producir interferón gamma (IFN- γ), que activa los macrófagos y las CML, potenciando la respuesta inflamatoria (Fig. 2). Las células T reguladoras (Treg), que producen citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), son menos abundantes en las placas vulnerables, por lo que tiende hacia un estado proinflamatorio.⁶

Las CML desempeñan un papel doble en la aterosclerosis. En las placas estables, las CML sintetizan componentes de la matriz extracelular, como el colágeno, contribuyendo a la formación de una capa gruesa fibrosa. Sin embargo, en las placas vulnerables, las CML pueden pasar de un fenotipo contráctil a un fenotipo sintético, caracterizado por una mayor proliferación y producción de enzimas que degradan la matriz, lo que contribuye al adelgazamiento de la capa fibrosa y a la inestabilidad de la placa.⁶

A nivel molecular, varias vías de señalización están implicadas en la estabilidad y vulnerabilidad de la placa. La vía del factor nuclear kappa B (NF- κ B) es un regulador clave de la inflamación, y su activación en macrófagos y células endoteliales conduce a la transcripción de citocinas proinflamatorias, quimiocinas y moléculas de adhesión. La vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) también desempeña un papel crucial en las respuestas inflamatorias y la proliferación de las CML.⁷

El metabolismo de las lipoproteínas es otro factor crítico en la aterosclerosis. Los niveles elevados de colesterol LDL favorecen su retención y modificación dentro de la pared arterial, desencadenando una respuesta inflamatoria. En cambio, el colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) facilita el transporte inverso del colesterol y tiene propiedades antiinflamatorias, contribuyendo a la estabilidad de la placa.⁷

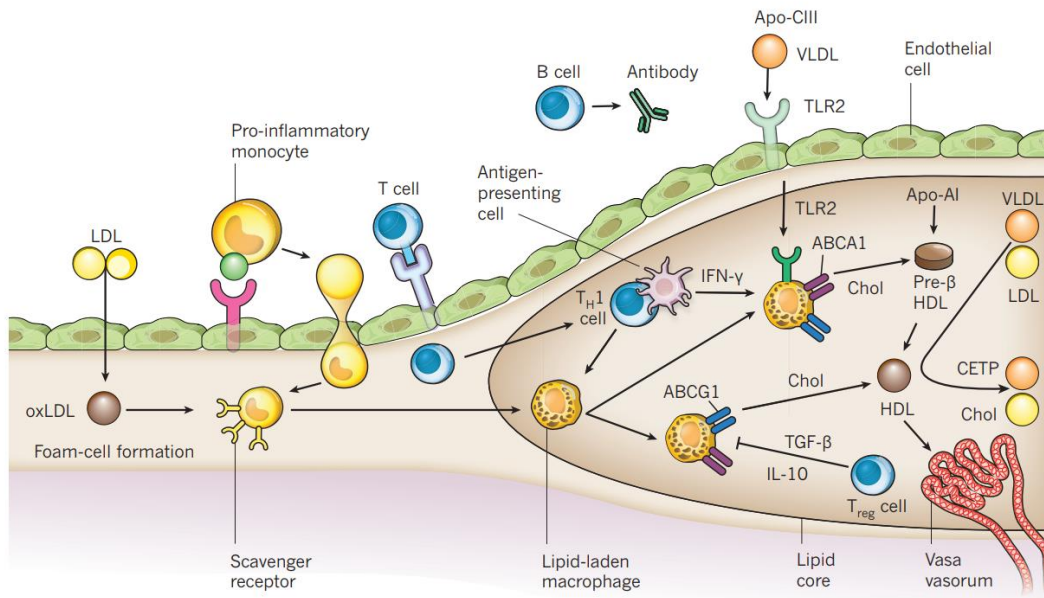


Fig 2: Representación gráfica de la interacción entre el metabolismo lipídico y la inflamación en la aterosclerosis: La aterogénesis comienza con el reclutamiento de células inflamatorias en la íntima, donde las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión leucocitaria para captar monocitos sanguíneos. Estos monocitos se convierten en células espumosas tras captar LDL modificadas, lo que conduce a la formación de macrófagos cargados de lípidos que favorecen la inflamación y la trombosis. Las células T, las células B y varias lipoproteínas también contribuyen al proceso a través de complejas interacciones y vías de señalización, afectando en última instancia al transporte y la eliminación del colesterol.⁸

La angiogénesis dentro de la placa, impulsada por factores como el factor de crecimiento endotelial vascular, puede conducir a la formación de nuevos vasos frágiles propensos a la rotura y la hemorragia, lo que contribuye a la vulnerabilidad de la placa. La interacción entre estos mecanismos celulares y moleculares determina en última instancia el equilibrio entre la estabilidad y la vulnerabilidad de la placa, lo que influye en el riesgo de episodios cardiovasculares agudos como el infarto de miocardio y el ictus.⁹

Implicaciones clínicas y socioeconómicas de la inestabilidad de la placa de ateroma carotídeo

La complicación neurológica más grave de la rotura de la placa de ateroma carotídea es el ictus, que puede tener efectos devastadores, como parálisis, pérdida del habla, trastornos cognitivos e incluso la muerte. Existen otras manifestaciones de sintomatología neurológica como son el accidente isquémico transitorio (AIT), que provoca, síntomas similares a los del ictus, pero no causan daños permanentes como la *amaurosis fugax*, siendo esta una pérdida temporal de la visión en cualquiera de los dos ojos.

El ictus es la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres en España y la primera causa de discapacidad adquirida en adulto. Aproximadamente 1,1 millones de europeos sufren un ictus cada año; el 80% de los casos corresponden a ictus isquémico. La estenosis u oclusión carotídea aterosclerótica causa en España alrededor del 30% de las isquemias cerebrovasculares. Entre un 20 y un 35% de los pacientes con ictus fallecen durante el primer mes, y aproximadamente un tercio de los sobrevivientes pierde su autonomía. El coste anual de los nuevos casos de ictus en España se estima en 1.989 millones de euros. Aunque en

los últimos 20 años, la mortalidad y discapacidad por ictus ha disminuido, en los próximos 25 años su incidencia se incrementará un 27%. Las previsiones actuales señalan que la incidencia del ictus continuará aumentando debido, entre otras causas, al envejecimiento de la población. De esta forma, se estima que entre los años 2015 a 2035 el número de personas que sufrirán un ictus superarán los cuatro millones y medio en la Unión Europea.¹⁰

Así pues, es una patología que afecta a un sector vulnerable de la población ya que se asocia al envejecimiento y, además de manera más acentuada en mujeres, considerándose la menopausia un factor de riesgo añadido.

Métodos diagnósticos

El diagnóstico de la estenosis carotídea implica exploraciones físicas y diversas pruebas de imagen, cada una con ventajas e inconvenientes. Inicialmente, los médicos pueden utilizar la auscultación para detectar hematomas, lo que puede sugerir un estrechamiento, pero no es sensible ni específico. La ecografía carotídea, una herramienta no invasiva y ampliamente disponible, utiliza ondas sonoras para crear imágenes de las arterias y medir el flujo sanguíneo, aunque su precisión puede depender del operador.¹¹ La angiografía por tomografía computarizada (ATC) ofrece imágenes detalladas mediante rayos X y un medio de contraste, pero implica radiación y riesgos potenciales para determinados pacientes.¹² La angiografía por resonancia magnética (ARM) evita la radiación mediante resonancia magnética y es adecuada para pacientes que no pueden someterse a una ATC, pero es más costosa y está menos disponible.¹³ La angiografía cerebral, o angiografía por sustracción digital (ASD), es la prueba de referencia por su gran precisión e imágenes detalladas, pero es invasiva, con mayores riesgos y exposición a la radiación.⁽¹⁴⁻¹⁵⁾

Nuevos marcadores de inestabilidad de placa de ateroma

Como consecuencia de las limitaciones de las técnicas de imagen actuales, la identificación de marcadores moleculares, rápidos, no invasivos y de fácil determinación, que indiquen la inestabilidad de la placa, es crucial para intervenir a tiempo y prevenir accidentes cardiovasculares severos.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas que degradan los componentes de la matriz extracelular, cruciales para la integridad estructural de las placas de ateroma. Los niveles elevados de MMP-3, MMP-7 y MMP-9 se han relacionado con la inestabilidad de la placa. Diversos estudios han demostrado que las concentraciones elevadas de estas MMP, en particular de la MMP-9, se asocian a la degradación de las proteínas extracelulares estabilizadoras y de los tapones fibrosos, lo que puede provocar la rotura de la placa y accidentes cardiovasculares posteriores.⁽¹⁶⁻¹⁷⁾ El aumento de la actividad de las MMP en las placas de ateroma reduce su estabilidad, haciéndolas más susceptibles a la rotura y provocando resultados cardiovasculares adversos.

El inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP-1) es el inhibidor natural de las MMP y desempeña un papel protector en el mantenimiento de la estabilidad de la placa. Se han observado niveles más bajos de TIMP-1 en pacientes con placas vulnerables, lo que contribuye a un desequilibrio entre las MMP y sus inhibidores.¹⁸

Estos son solo unos ejemplos de la amplia variedad de marcadores moleculares que se están investigando en la actualidad, lo que subraya la importancia de estos marcadores para evaluar el riesgo de inestabilidad de la placa de ateroma.

La identificación y comprensión de estos marcadores moleculares no solo permiten una mejor evaluación del riesgo cardiovascular, sino que también abren la puerta a métodos de detección más personalizados. Sin embargo, además de las proteínas y enzimas implicadas en la estabilidad de la placa, otros métodos innovadores están emergiendo para mejorar la detección y evaluación del riesgo cardiovascular, destacando especialmente aquellos que se centran en la genética y la biología molecular.

El cfDNA como biomarcador

El DNA libre circulante (cfADN) se refiere a fragmentos de DNA que circulan libremente por el torrente sanguíneo, fuera de las células. Estos fragmentos proceden de la descomposición de células en todo el organismo, tanto de procesos normales como de condiciones patológicas como el cáncer, la infección o la inflamación.

La detección de diferencias en el cfDNA se ha revelado como una técnica prometedora diagnóstica no invasiva. En los últimos años se han desarrollado diversas tecnologías para utilizar el cfDNA en aplicaciones como las pruebas prenatales no invasivas, el seguimiento de los trasplantes de órganos, el diagnóstico de enfermedades inmunitarias como el lupus eritematoso sistémico, la evaluación de lesiones tisulares como los accidentes cerebrovasculares y la detección del cáncer.¹⁹

Varios estudios indican que el cfDNA en individuos sanos procede principalmente del sistema hematopoyético, incluidos eritrocitos, granulocitos, monocitos y linfocitos.⁽²⁰⁻²²⁾ En condiciones patológicas, sin embargo, el cfDNA puede proceder de los tejidos afectados.²³

Independientemente de su origen, todos los cfDNA comparten propiedades comunes que influyen en su función y potencial diagnóstico. El cfDNA no está encapsulado, se encuentra en los fluidos corporales y está muy fragmentado, ya que comprende tanto DNA monocatenario como bicatenario y consiste en una mezcla de fragmentos de DNA de diversos tamaños.²³

La concentración de cfDNA en sangre está regulada principalmente por su cinética de degradación, que puede variar significativamente en diferentes condiciones fisiológicas. El cfDNA se degrada rápidamente en los fluidos corporales, pero su periodo de vida media se ha detectado que varía mucho según los diferentes contextos.²⁴

El conocimiento de la dinámica del cfDNA tanto en estados sanos como patológicos sienta las bases para su aplicación en diagnósticos no invasivos, y las investigaciones en curso siguen perfeccionando y ampliando sus posibles usos. Este enfoque innovador se está ampliando para incluir aplicaciones en una variedad de condiciones médicas, como los ictus isquémicos.

El cfDNA en el ictus isquémico

El ictus isquémico es una lesión tisular estéril resultante de la oclusión de una arteria que suministra sangre al cerebro. Esta obstrucción priva al tejido cerebral de oxígeno y glucosa, lo que provoca la muerte necrótica de las células y compromete la integridad del tejido. La inflamación desempeña un papel crucial en la patobiología del ictus, ya que el sistema inmunitario contribuye activamente al daño tisular iniciado por el episodio isquémico. El ictus no sólo induce una respuesta inflamatoria grave dentro del propio cerebro, sino que también desencadena una reacción inflamatoria sistémica inmediatamente después de la lesión isquémica.

Durante eventos patológicos como el ictus isquémico, el cfDNA liberado de las células dañadas o necróticas circula en el torrente sanguíneo y puede ser reconocido por el sistema inmunitario innato. Este cfDNA, al ser identificado como un patrón molecular asociado al daño (DAMP), contribuye a la activación de las respuestas inflamatorias sistémicas. Al igual que otros DAMP, el cfDNA puede interactuar con receptores de reconocimiento de patrones, promoviendo la activación de células inmunitarias y la liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que exacerba la respuesta inflamatoria asociada al daño tisular isquémico.²⁵

Los DAMP son un grupo diverso de moléculas inmunogénicas, ciertas proteínas, ATP, DNA y ARN, que generalmente son secretadas por células estresadas, dañadas o moribundas.²⁶ En el contexto del ictus, los DAMP se liberan principalmente del tejido cerebral necrótico y apoptótico post-isquémico.²⁷ La liberación inicial de DAMP activa el endotelio cerebral, lo que conduce al reclutamiento de células inmunitarias locales y circulantes, que a su vez amplifican la respuesta inmunitaria local.²⁸

Dada la amplia gama de moléculas DAMP que se liberan en la circulación tras un ictus, existe un gran interés en aprovechar estas moléculas como biomarcadores no invasivos para diagnosticar el ictus y predecir sus resultados. El objetivo de las investigaciones en curso sobre biomarcadores de ictus es identificar biomarcadores sanguíneos que no sólo puedan distinguir entre ictus y síntomas similares al ictus, sino también entre diversos subtipos de ictus, lo que en última instancia facilitaría intervenciones clínicas rápidas.⁽²⁹⁻³⁰⁾ A pesar de las numerosas investigaciones realizadas, ninguno de los biomarcadores identificados ha cumplido aún estos criterios lo suficiente como para ser adoptado en la práctica clínica.³¹

En el caso concreto del cfDNA aplicado a la detección del ictus, se han publicado ensayos observacionales que relacionan las concentraciones de cfDNA en sangre en pacientes con ictus, correlacionando estos niveles con otros biomarcadores sanguíneos y parámetros de resultados clínicos.⁽³²⁻³⁶⁾ En la mayoría de estos estudios clínicos, el cfDNA se ha considerado un posible marcador predictivo de los resultados crónicos tras un ictus. En 2003, Rainer *et al.* fueron los primeros en utilizar la PCR cuantitativa en tiempo real para el gen de la β -globina para demostrar que la concentración de cfDNA en sangre aumenta en las 3 horas siguientes al ictus.³² Este análisis cuantitativo fue suficiente para la clasificación temprana del riesgo y para predecir la discapacidad y la mortalidad a los 6 meses del ictus.³²

En muchos de los estudios clínicos ⁽³²⁻³⁶⁾, la cuantificación del cfDNA se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real o métodos fluorométricos/espectrométricos. La mayoría de esos estudios identificaron un aumento general de la concentración sanguínea de cfDNA poco después del inicio del ictus. Sin embargo, los tiempos de muestreo variaron ampliamente entre los estudios y a menudo no se describieron lo suficiente. Como resultado, las concentraciones de cfDNA reportadas variaban mucho entre los estudios, ya sea por diferencias en los tiempos de toma de muestras o por otras variaciones técnicas no especificadas.

*Geiger et al.*³³ cuantificaron el cfDNA nucleosómico sanguíneo. En el tercer día tras un caso de apoplejía, descubrieron que las concentraciones de cfDNA nucleosómico en sangre se correlacionaban bien con los resultados funcionales, medidos por el índice de Barthel (≥ 50 : 523 UA frente a < 50 : 869 UA).³³ En otro estudio desarrollado por *Vasilyeva et al.*²⁹ realizaron mediciones repetitivas a lo largo de las primeras 72 horas posteriores al ictus y observaron la concentración más alta de cfDNA en sangre a las 48 horas del inicio de los síntomas.

En conjunto, estos estudios subrayan el potencial del cfDNA como un valioso biomarcador en el diagnóstico y pronóstico del ictus. Sin embargo, también indican la necesidad de seguir investigando para estandarizar los protocolos de medición del cfDNA y comprender las implicaciones de los niveles de cfDNA en diversos contextos clínicos.

Muchos estudios han intentado relacionar los niveles de cfDNA en sangre con otros biomarcadores sanguíneos en pacientes con ictus. Un estudio del 2006 de Geiger et al comparó los niveles de cfDNA nucleosómico en sangre con otros posibles biomarcadores de ictus, como la enolasa neuronal específica (NSE), la proteína S100 y la PCR, en pacientes que sufrían un ictus isquémico.³⁷ Descubrieron que la gravedad del ictus en el momento del ingreso hospitalario se correlacionaba con los niveles sanguíneos de cfDNA, NSE y S100 a los 3 y 6 días del ictus.³⁷ A pesar de que las muestras de sangre se tomaron una sola vez en el momento del ingreso, la concentración de cfDNA demostró ser un predictor fiable de los resultados del ictus. Estos biomarcadores también estaban relacionados con el tamaño del infarto y el índice de recuperación a los 12 meses.³⁷

Estos resultados subrayan el potencial del cfDNA como marcador pronóstico en el ictus, superando a biomarcadores tradicionales como la PCR y la proteína S100 en la predicción de resultados a largo plazo.

A pesar de los prometedores resultados relativos a la utilidad clínica del cfDNA como biomarcador, es necesario seguir investigando para abordar varias cuestiones clave y retos técnicos y comprender plenamente su utilidad clínica en el tratamiento del ictus. Los ensayos futuros deberán centrarse en el desarrollo de métodos más sensibles y estandarizados para el análisis del cfDNA, la evaluación de su aplicabilidad tanto en muestras de plasma como de suero y el estudio detallado de la cinética de las concentraciones sanguíneas de cfDNA en pacientes con ictus. Estos avances mejorarán nuestra comprensión de la dinámica del cfDNA y consolidarán su papel en la práctica clínica, lo que podría mejorar la evolución de los pacientes gracias a diagnósticos más precisos y oportunos.

Integridad del cfDNA

Como se ha comentado, el cfDNA consiste en DNA fragmentado que circula por el torrente sanguíneo, liberado de células que sufren apoptosis o necrosis.²³ La longitud y la cantidad de estos fragmentos de DNA pueden variar en función de la fuente del cfDNA.³⁸ La integridad del cfDNA (cfDI), se ha estudiado más ampliamente en el contexto del cáncer, ya que las células cancerosas suelen liberar fragmentos más largos que los fragmentos más cortos y uniformes de las células apoptóticas no enfermas.³⁹⁻⁴¹ Esta diferencia en la longitud de los fragmentos constituye la base para medir la cfDI, calculada como la relación entre los fragmentos de DNA más largos y los más cortos.

Gran parte de los estudios en los que se usa la detección de cfDNA son aplicados, principalmente, en investigar la detección temprana de cáncer o su progresión.

En varios de estudios sobre el cáncer⁽³⁹⁻⁴¹⁾, se observaron niveles más elevados de los fragmentos de DNA más largos y los más cortos, (generalmente usados los fragmentos del gen ALU) y cfDI en las pacientes en comparación con los controles sanos, con una correlación significativa con el estadio del tumor. Esto sugiere que los marcadores de cfDNA reflejan la carga y la progresión de la enfermedad. Además, estos estudios proporcionan una base para comprender su posible utilidad en otras enfermedades, incluida la aterosclerosis.

La aterosclerosis se caracteriza por la inflamación crónica y el recambio celular dentro de las placas arteriales. Las células de estas placas, incluidas las células musculares lisas, las células endoteliales y los macrófagos, sufren apoptosis y necrosis, liberando cfDNA al torrente sanguíneo.⁴² La medición de los niveles de los fragmentos de DNA más largos y los más cortos, junto con el cálculo del cfDI, puede proporcionar información valiosa sobre el alcance del recambio celular y la inflamación asociada a las placas ateroscleróticas que podría indicar inestabilidad de la placa o una mayor carga de la enfermedad, lo que ayudaría al diagnóstico y seguimiento de la aterosclerosis.⁴³

En un estudio previo publicado por Qian et al. analizaron el cfDNA y la cfDI, en base a los fragmentos de distintos tamaños (115 y 247 pares de bases) las secuencias repetitivas ALU y observaron que los pacientes con aterosclerosis presentaban mayores niveles del cfDNA y menores ratios de cfDI que los controles sanos reclutados.⁴³ Este estudio sugiere la posible utilidad del cfDNA y la cfDI como marcadores de aterosclerosis, sin embargo, no ahonda en su relación con la vulnerabilidad de la placa y su relación con la sintmatología neurológica.

La capacidad de utilizar marcadores como el cfDNA y el cfDI para diagnósticos no invasivos es especialmente valiosa en el caso de la aterosclerosis, donde los métodos de diagnóstico tradicionales, como la angiografía o las técnicas de imagen, pueden ser invasivos, costosos y no siempre disponibles para el cribado rutinario. Mediante el uso de muestras de sangre para medir los marcadores de cfDNA, los médicos podrían detectar antes la aterosclerosis y controlar más eficazmente la progresión de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. Por ejemplo, unos niveles más elevados de cfDNA o una cfDI alterada podrían predecir acontecimientos cardiovasculares adversos, como infarto de miocardio o ictus, ayudando así a estratificar a los pacientes en función de su riesgo y orientando enfoques terapéuticos más personalizados.

La integración de marcadores de cfDNA como el ALU-247, el ALU-115 y la integridad del cfDNA en la práctica clínica de la aterosclerosis requeriría su validación mediante amplios estudios clínicos. Estos estudios tendrían que confirmar la sensibilidad y especificidad de estos marcadores para detectar la aterosclerosis y predecir los resultados en comparación con los biomarcadores y métodos de diagnóstico establecidos.⁴³

El uso de cfDNA como biomarcador para el diagnóstico y pronóstico presenta varias limitaciones importantes a pesar de su potencial. Uno de los principales retos es la concentración intrínsecamente baja de cfDNA en el plasma sanguíneo, lo que dificulta su detección y análisis precisos.⁴⁴

Así pues, por todo lo mencionado anteriormente, es importante disponer de marcadores no invasivos de inestabilidad de placa de ateroma. Además, se ha sugerido que tanto el cfDNA como su integridad (cfDI) podrían ser buenos marcadores de aterosclerosis. En base a eso, la hipótesis de este estudio supone que los pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática presentarán diferentes niveles de cfDNA en su torrente sanguíneo. Esta hipótesis se basa en el entendimiento de que la estenosis carotídea sintomática, caracterizada por manifestaciones clínicas como ataques isquémicos transitorios o accidentes cerebrovasculares, puede implicar un daño endotelial y procesos inflamatorios más extensos en comparación con la estenosis carotídea asintomática. Es probable que estos cambios patológicos liberen mayores cantidades de cfDNA en el torrente sanguíneo. Por el contrario, la estenosis carotídea asintomática, en la que el estrechamiento de la arteria carótida aún no produce síntomas perceptibles, puede presentar niveles más bajos de alteración endotelial e inflamación, lo que se traduce en niveles más bajos de cfDNA. Así pues, es interesante medir la utilidad como biomarcadores del cfDNA y la cfDI para estratificar riesgo de accidente cerebrovascular en pacientes con estenosis de carótida. Esto permitiría comprender mejor los mecanismos fisiopatológicos subyacentes y podría ayudar en la toma de decisiones clínicas adecuadas.

Objetivos:

El objetivo principal de este estudio es evaluar el cfDNA y su cfDI como marcadores no invasivos del riesgo de accidente cerebrovascular en pacientes con estenosis carotídea. Para su consecución se desarrollarán los siguientes objetivos específicos:

En primer lugar, se analizará la idoneidad de varios kits de extracción de cfDNA, optimizando las condiciones de extracción de cfDNA a partir de volúmenes pequeños de plasma. Esto incluye la evaluación de diferentes kits en función del rendimiento, la pureza y la eficacia general para determinar el mejor método de extracción de cfDNA a partir de muestras de pacientes.

En segundo lugar, se cuantificarán fragmentos de cfDNA de distintos tamaños mediante PCR cuantitativa (qPCR). Concretamente, se medirá la concentración de fragmentos de cfDNA pequeños (52-115 pb) y grandes (211-339 pb) y se calculará el ratio entre los fragmentos grandes/pequeños como medida de integridad del cfDNA.

Por último, se compararán los valores de integridad del cfDNA de pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática y se evaluará su capacidad diagnóstica.

Materiales y Métodos:

Reclutamiento de pacientes y procesamiento de muestras:

Se trata de un estudio caso-control realizado con la participación de pacientes reclutados consecutivamente por el servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario y Politécnico La Fe.

Se consideraron pacientes sintomáticos (casos) aquellos sujetos que presentaron AIT, *amaurosis fugax* o ictus, asociado a estenosis de la arteria carótida, con menos de 21 días de evolución desde su diagnóstico hasta la programación de la cirugía.

Se consideraron pacientes asintomáticos (controles) aquellos sujetos con estenosis severa de la arteria carótida (>70%) sin sintomatología neurológica intervenidos de estenosis carotídea según las indicaciones de las guías internacionales.

El estudio se llevó a cabo según la declaración de Helsinki con aprobación de sendos comités (ético y científico) del Hospital Universitario y Politécnico La Fe. Las muestras y los datos de los participantes se gestionaron a través del Biobanco del Hospital La Fe (PT17/0015/0043) según procedimientos normalizados, previa firma del correspondiente consentimiento informado por parte de los participantes.

De cada participante, se extrajo sangre venosa en tubo con K2EDTA durante la intervención quirúrgica que se procesó durante las 3 primeras horas tras la extracción. La sangre se centrifugó a 1800G durante 30 min a 4°C. El plasma se distribuyó en alícuotas de 250µL que se almacenaron a -80°C hasta su uso. Para la realización de este estudio, se dispuso de una de las alícuotas de 250µL.

Obtención de cfDNA a partir de plasma: Selección y optimización de Kit de extracción:

El pequeño volumen de plasma disponible para la realización del estudio (250µL) suponía una limitación para la obtención del cfDNA, ya que muchos de los kits disponibles en el mercado están diseñados para partir de una cantidad mayor de fluido.

Con el fin de determinar cuál proporcionaba una mayor cantidad y calidad de cfDNA, se compararon 3 kits de extracción, usando plasma de un sujeto sano, siguiendo la misma metodología de extracción usada en los pacientes. Los kits evaluados fueron los siguientes: *QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)*, *Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek Corp)* y *NucleoSpin cfDNA XS (Macherey-Nagel)*, siguiendo las indicaciones del fabricante con ligeras modificaciones.

Las alícuotas de 250µL de plasma se descongelaron introduciendo las muestras en hielo y se centrifugaron a 3000G a una temperatura de 4°C durante 5 min para precipitar posibles restos celulares. Se recuperaron 240µL de plasma que se utilizaron con cada kit. Los 3 kits se basan en un sistema de columnas. A continuación, se describe brevemente el protocolo de cada kit, se ha mantenido los nombres comerciales de los tampones incluidos en cada kit:

1. *QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)*

Este kit requiere la adición de un RNA carrier, preparado a 1µg/µL en tampón AVE® proporcionado en el kit, que ayuda a la recuperación del cfDNA en fluidos.

Previo al protocolo, se prepara la mezcla de tampón AVL + RNA-AVE (así descritos por la casa comercial) a proporción 100:1.

Se añaden 240 µL de plasma/suero a 960 µL de tampón AVL+RNA-AVE en un tubo de 1,5 mL de microcentrífuga. Se homogeniza por vórtex durante 15 s el tubo de microcentrífuga. Se deja incubar durante 10 min a temperatura ambiente (TA) y se realiza un spin al tubo para quitar las gotas del interior de la tapa. La muestra se divide en partes iguales en dos tubos de microcentrífuga y se añaden 480 µL de etanol (96-100%) a cada tubo. Se mezclan con vórtex durante 15 s seguido de un spin. Con cuidado, se aplican 540 µL de la solución a la mini columna QIAamp (en un tubo de recolección de 2mL) y se centrifuga a 6000 x g durante 1 min. Se coloca la mini columna QIAamp en un tubo de recolección limpio y se repite el proceso hasta que todo el volumen se haya cargado. Se realiza un lavado con 500 µL de tampón AW1 y se centrifuga a 6000 x g durante 1 min, seguido de un lavado con 500 µL de tampón AW2 centrifugándolo a 20000 x g durante 3 min. Tras una centrifugación adicional a 20000 x g durante 1 min para eliminar los restos de etanol de los lavados, el DNA se eluye con tampón AVE, se deja incubar durante 1 min a TA y se centrifuga a 6000 x g durante 1 min.

Este protocolo se llevó a cabo con 40 µL, 60 µL y 80 µL de tampón de elución AVE, así como con una doble elución de 40 µL para tratar de optimizar la recuperación del DNA.

2. *Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek Corp)*

Se añaden 260 µL de PBS 1X a los 240 µL de plasma en un tubo de 2 mL y se añaden 30 µL de Proteínasa K, mezclándolo bien con vórtex durante 10 s. Después, se incuba durante 10 min a TA invirtiendo la alícuota en un agitador orbital durante esos 10 min. Se añade 1 mL de tampón de fijación B y se mezcla bien usando vórtex durante 10 s. Se transfieren 750 µL de la mezcla a la mini columna de centrifugado ensamblada con uno de los tubos de recolección y se centrifuga durante 2 min a 3800 x g. Se descarta el sobrenadante y se repite hasta pasar el total de la muestra. Se aplican 500 µL de solución WN a la columna y se centrifuga 1 min a 3800 x g. Se descarta el sobrenadante y se repite este proceso usando solución de lavado A. Se centrifuga la columna vacía durante 3 min a 20800 x g y se descarta el tubo de recolección. Se transfiere la columna de centrifugado a un nuevo tubo de elución y se añaden 100 µL de tampón de elución B a la columna, dejándola durante 2 min a TA. Se centrifuga 1 min a 420 x g, seguido de 2 min a 6800 x g. A los 100 µL de DNA diluido, se añaden 300 µL de tampón de fijación B y se mezclan

en vórtex durante 10 s. Se transfiere la mezcla entera a la microcolumna de centrifugado ensamblada con un tubo de recolección y se centrifuga 1 min a 3800 x g, seguido de un lavado con 500 µL de solución de lavado A centrifugando 1 min a 3800 x g y se repite este proceso dos veces. Se centrifuga la columna vacía durante 3 min a 20800 x g y se descarta el tubo de recolección. Se transfiere la columna de centrifugado a un tubo de elución y se eluye con 25 µL de tampón de elución B a la columna, dejándola durante 2 min a TA. Se centrifuga 1 min a 420 x g, seguido de 2 min a 6800 x g y se recupera la fracción eluída.

3. NucleoSpin cfDNA XS (Macherey-Nagel)

Se introducen 240 µL de plasma a un tubo de microcentrífuga y se añaden 360 µL de tampón de fijación (BB). Se invierte el tubo 3 veces y se pasa por vórtex durante 3 s. Se cargan 600 µL de mezcla total a la columna NucleoSpin cfDNA XS, colocada en un tubo de recolección de 2 mL. Se centrifuga a 2000 x g durante 30 segundos, seguido de 11000 x g durante 5 s. Se lava la columna con 500 µL de tampón de lavado (WB) y se centrifuga durante 30 s a 11000 x g. Se repite el lavado con 250 µL de tampón WB y se centrifuga durante 3 min a 11000 x g. Se eluye el DNA con 20 µL de tampón de elución y se centrifuga durante 30 s a 11000 x g. Se incuba la fracción eluida con la tapa abierta durante 8 min a 90°C. Tras esta etapa de evaporación, el volumen final resultante es de 8-10 µL.

Obtención del DNA genómico

Dado que la concentración esperada del cfDNA en plasma es baja. Utilizaremos DNA genómico para ensayar y optimizar las condiciones de PCR convencional y qPCR, así como para utilizarlo como recta patrón en la cuantificación del cfDNA por qPCR.

Para la obtención de éste, se usará el kit de *Wizard Genomics DNA Purification Kit (Promega, Innogenetics)*. Este kit se utiliza para la extracción de DNA a partir de sangre total. El proceso seguido es el que indica el fabricante:

Se homogeneizan los tubos de sangre total anticoagulada con EDTA agitándolos cuidadosamente mediante inversión. Se separan en eppendorfs estériles de 1,5 mL con alícuotas de 300 µL de la muestra de sangre total. A cada alícuota se le añaden 900 µL de Cell Lysis Solution, se incuban y homogeneizan durante 10 min en un agitador orbital a baja velocidad. Se centrifugan 20 s a 16000 x g a TA, eliminando el sobrenadante y dejando el pellet. Los leucocitos se resuspenden agitando en vórtex durante 10-15 s y añadiendo 400 µL de Cell Lysis Solution a cada alícuota, incubando y homogeneizando 10 min más a baja velocidad. Se centrifugan nuevamente durante 20 s a 16000 x g, eliminando el sobrenadante. Para disgregar los leucocitos, se añaden 300 µL de Nuclei Lysis Solution a cada alícuota, homogeneizando con la pipeta. Se incuban 1 hora a 37°C en el termobloque, añadiendo 1,5µL de RNAasa, invirtiendo 25 veces e incubando 15 min más a 37°C en el termobloque. Tras atemperar 5 min a TA, se añaden 100 µL de Protein Precipitation Solution, se agita 20 s en vórtex y se centrifuga 3 min a 16000G. Se transfiere el sobrenadante a nuevos tubos estériles de 1,5mL, añadiendo 300 µL de isopropanol al 99% para precipitar el DNA, colocándolo en el agitador orbital 30 min. Se centrifugan las alícuotas 1 min a 16000 x g, eliminando el sobrenadante, y se añaden 300 µL de etanol 70%, centrifugando otro minuto a 16000 x g y eliminando el sobrenadante, de nuevo. Los tubos se colocan abiertos en el termobloque a 37°C por 15 min para evaporar el etanol restante,

añadiendo luego 100 µL de DNA Rehydration Solution. Finalmente, se colocan en un agitador 2 días para resuspender el DNA totalmente.

Cuantificación del DNA:

Se llevó a cabo una evaluación preliminar del DNA total utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000. La cantidad se calculó utilizando la medida de absorbancia a 260 nm. Se consideraron las relaciones entre las absorbancias a 260/280 y 260/230 para evaluar la pureza del DNA y detectar la posible presencia de contaminantes como proteínas, carbohidratos y fenoles.

Selección de los fragmentos de estudio:

Bajo la hipótesis de que la concentración de cfDNA y el cfDI son marcadores asociados a la estenosis de carótida y su evolución, se cuantificaron una serie de fragmentos relacionados con la enfermedad: 4 fragmentos del gen HTRA1 (locus 10q26.13): HTRA1_90 (producto de amplificación 90 pb), HTRA1_250 (producto de amplificación 250 pb), HTRA1_52 (producto de amplificación 52 pb), HTRA1_256 (producto de amplificación 256 pb); Cuatro fragmentos del gen HDAC9 (locus 7p21.1): HDAC9_87 (producto de amplificación 87 pb), HDAC9_211 (producto de amplificación 211 pb), HDAC9_129 (producto de amplificación 129 pb), HDAC9_339 (producto de amplificación 339 pb) y dos fragmentos del gen NOTCH3 (locus 19p13.12): NOTCH3_93 (producto de amplificación 93 pb), NOTCH3_263 (producto de amplificación 263 pb). Se eligieron estos genes específicos, en lugar de secuencias aleatorias, por tratarse de genes relacionados con aterosclerosis o procesos vasculares.

Por otro lado, se seleccionaron también secuencias repetitivas en el genoma, ALU y LINE. ALU: ALU-115 (producto de amplificación 115 pb) y ALU-247 (producto de amplificación 247 pb); LINE1: LINE1_97 (producto de amplificación 97 pb) y LINE1_266 (producto de amplificación 266 pb). Estas secuencias se seleccionaron de publicaciones previas. ^(43,45-49)

Optimización de condiciones de PCR convencional:

Se llevaron a cabo diferentes PCR para detectar la presencia de los fragmentos, tanto en, las muestras de cfDNA extraídas mediante los diferentes kits de extracción analizados, como de muestras de DNA genómico a partir de sangre total, como control positivo.

El diseño de los primers de cada fragmento se realizó utilizando la herramienta <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. A partir de las secuencias de las secuencias de cada gen extraídas de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>. Excepto para el ALU y LINE, cuyas secuencias se extrajeron de publicaciones previas. ^(39,41,49)

- HTRA1
 - HTRA1_90
 - FW: 5'-CCCGAAGAAATTGACCCATA-3'
 - RV: 5'-CCAGAGTCCTCATCCGTCAT-3'
 - HTRA1_250
 - FW: 5'-CCGCAGGGGTAATGAAGATA-3'
 - RV: 5'-GCGGATCTGCAACATTACATT-3'

- HTRA1_52
 - FW: 5'-GGCTGGGCTCATACACATTT-3'
 - RV: 5'-CAGGCCTTAAGGGAGGATTC-3'
- HTRA1_256
 - FW: 5'-GGCTGGGCTCATACACATTT-3'
 - RV: 5'-CTGGGCCTTGCTAAAGACAG-3'
- HDAC9
 - HDAC9_87
 - FW: 5'-CAACAGCACTAGGAGCGACA-3'
 - RV: 5'-TCCACTGGTTCCTCCTTGAC-3'
 - HDAC9_211
 - FW: 5'-AACTGAAGCAACCAGGCAGT-3'
 - RV: 5'-TCCATTTCTGGATCTGAGC-3'
 - HDAC9_129
 - FW: 5'-GCGGTCCAGGTAAAAACAGA-3'
 - RV: 5'-CTGCCAGTCCTCAATTACC-3'
 - HDAC9_339
 - FW: 5'-GGACTGGGCAGACCTATGAA-3'
 - RV: 5'-CCTCCCTCTGCTCATTTCTG-3'
- NOTCH3
 - NOTCH3_93
 - FW: 5'-CACAGGGCCACTATGTGAGA-3'
 - RV: 5'-TAAGTGAGGTCGCCACTCTG-3'
 - NOTCH3_263
 - FW: 5'-ATGGACGCTTCCTCTGCTC-3'
 - RV: 5'-AGGAAGACAGGCACAGTCGTA-3'
- ALU
 - ALU-115
 - FW: 5'-CCTGAGGTCAGGAGTTCGAG-3'
 - RV: 5'-CCCGAGTAGCTGGGATTACA-3'
 - ALU-247
 - FW: 5'-GTGGCTCACGCCTGTAATC-3'
 - RV: 5'-CAGGCTGGAGTGCAGTGG-3'
- LINE1
 - LINE1-97
 - FW: 5'-TGGCACATATACACCATGGAA-3'
 - RV: 5'-TGAGAATGATGGTTTCCAATTC-3'
 - LINE1-266
 - FW: 5'-ACTTGAACCAACCCAAATG-3'
 - RV: 5'-CACCACAGTCCCCAGAGTG-3'

Para los fragmentos HTRA1_90, HTRA1_250, HTRA1_52, HTRA1_256, HDAC9_87, HDAC9_211, HDAC9_129, HDAC9_339, NOTCH3_93 y NOTCH3_263 se realizó inicialmente una PCR de gradiente térmico para elegir las temperaturas de *annealing* ideales, abarcando cubriendo un

rango de temperaturas entre 53-69°C y así seleccionar las mejores condiciones para amplificar cada uno de los siguientes fragmentos. En base a ésta se seleccionó la temperatura que generaba una banda más intensa, sin amplificaciones inespecíficas. Para los fragmentos ALU-115, ALU-247 las condiciones se extrajeron de un artículo publicado en la *British Journal of Cancer*.⁵⁰ Y para los fragmentos LINE1_97 y LINE1_266 se extrajeron de un artículo publicado en la *Journal of Clinical Laboratory Analysis*.⁴¹ Todas las PCR se llevaron a cabo en un termociclador *Professional Thermocycler (Biometra)*. Los componentes de la PCR se detallan en la Tabla 1.

	1X
DNA	3 µL
Tampón 5X Promega	5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µL
dNTPs (10 mM/cada uno)	0,55 µL
Primer 5' (100 µM, Sigma)	0,25 µL
Primer 3' (100 µM, Sigma)	0,25 µL
Go Taq (Promega)	0,125 µL
H ₂ O libre de RNasa	14,325 µL
Total	25 µL

Tabla 1: Los componentes de la PCR para todos los fragmentos de los genes HTRA1, HDAC9, NOTCH3, ALU y LINE1.

Para evaluar el rendimiento de cada PCR, los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%.

Las condiciones de PCR finales, seleccionadas para cada fragmento fueron:

- Programa 1 “Fragmentos cortos”: Aplicado para los fragmentos cortos (HTRA1_90, HDAC9_87, NOTCH3_93, HTRA1_52 y HDAC9_129).
 - Preincubación: 95°C durante 1 min y 30 s.
 - Amplificación: 41 ciclos de:
 - Desnaturalización: 94°C durante 40 s.
 - Alineamiento: 61°C durante 30 s, y, para los fragmentos HTRA1_52 y HDAC9_129 de 53°C durante 30 s.
 - Extensión del DNA: 72°C durante 30 s.

- Programa 2 “Fragmentos largos”: Aplicado para los fragmentos largos (HTRA1_250, HDAC9_long, NOTCH3_long, HTRA1_256 y HDAC9_339).
 - Preincubación: 95°C durante 3 min.
 - Amplificación: 41 ciclos de:
 - Desnaturalización: 94°C durante 40 s.
 - Alineamiento: 61°C durante 30 s y, para los fragmentos HTRA1_252 y HDAC9_339 de 53°C durante 30 s.
 - Extensión del DNA: 72°C durante 30 s.

- Programa 3 “ALU”: Aplicado para los fragmentos ALU-115 y ALU-247.
 - Preincubación: 95°C durante 10 min.
 - Amplificación: 35 ciclos de:
 - Desnaturalización: 95°C durante 15 s.
 - Alineamiento: 64°C durante 1 min.

- Programa 4 “LINE1_97”: Aplicado para el fragmento LINE_97.
 - Preincubación: 95°C durante 10 min.
 - Amplificación: 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 95°C durante 10 s.
 - Alineamiento: 53°C durante 30 s.

- Programa 5 “LINE1_266”: Aplicado para el fragmento LINE_266.
 - Preincubación: 95°C durante 10 min.
 - Amplificación: 40 ciclos de:
 - Desnaturalización: 95°C durante 10 s.
 - Alineamiento: 60°C durante 30 s.

Optimización de condiciones de qPCR

Las condiciones establecidas en la PCR convencional se aplicaron a la qPCR, incrementando a 45 ciclos la etapa de amplificación para los programas 1 y 2 “Fragmentos cortos” y “Fragmentos largos”. Para los demás programas se mantuvieron las mismas condiciones que en la PCR convencional.

Se evaluaron diferentes concentraciones de DNA para obtener el mejor rendimiento en la qPCR (1 µL, 2 µL, 3 µL, 4 µL o 5 µL de DNA), así como distintas concentraciones de primers. Las concentraciones de reactivos finales para cada fragmento se indican a continuación (Tabla 2).

	1 (1X)	2 (1X)	3 (1X)	4(1X)
<i>H₂O libre de RNasa</i>	3,8 µL	1,8 µL	0,8 µL	3 µL
<i>Primer 5' (Sigma)*</i>	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL	0,5 µL
<i>Primer 3' (Sigma)^a</i>	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL	0,5 µL
<i>Master Mix SYBR Green I 2X (Roche)</i>	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
<i>DNA^b</i>	1 µL	3 µL	4 µL	1 µL
<i>Total</i>	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Tabla 2: Condiciones finales de la qPCR para todos los fragmentos de los genes HTRA1, HDAC9, NOTCH3, ALU y LINE1. (1): Condiciones de los fragmentos ALU-115 y ALU-247. (2): Condiciones de los fragmentos HTRA1_52, HTRA1_129, HTRA1_256, HTRA1_339. (3): Condiciones de los fragmentos HTRA1_90, HTRA1_250, HDAC9_87, HDAC9_211, NOTCH3_93 y NOTCH3_263. (4): Condiciones de los fragmentos LINE1_97 y LINE1_266. ^a La concentración del stock de primers fue 100 µM para todos los casos, excepto para la amplificación de LINE1_97 y LINE1_266, (condición 4) para la que se empleó una dilución intermedia a 10 µM. ^b La cantidad de DNA molde se basa en volumen y no en la concentración medida por el Nanodrop, ya que algunos de los kits de extracción emplean DNA carrier en el proceso, que enmascaran el valor real de DNA recuperado.

Las qPCR se llevaron a cabo en un *LightCycler® 480 Instrument II (Roche)*.

Cuantificación de la concentración de los distintos fragmentos de cfDNA:

Para determinar la concentración de las muestras se creó una recta patrón estándar a partir del cfDNA extraído de la sangre total. Se generaron 10 puntos (312 pg/μL, 156 pg/μL, 78 pg/μL, 39 pg/μL, 19,5 pg/μL, 9,75 pg/μL, 4,875 pg/μL, 2,4375 pg/μL, 1,21875 pg/μL, 0 pg/μL). Además, durante las qPCR, se añadieron controles positivos de DNA y un control negativo o blanco (añadiendo agua en lugar de DNA). Los controles positivos consistieron en DNA genómico a concentraciones conocidas, así como cfDNA de origen plasmático obtenido de un voluntario sano, como control interplaca. Los puntos de la recta patrón, se ensayaron por triplicado, los controles, y las muestras, por duplicado.

Análisis estadístico:

Se realizó el análisis estadístico utilizando GraphPad Prism (versión v8.0.1). Se presentaron las variables continuas como valor medio y desviación estándar o mediana, rango intercuartílico, y las variables categóricas como recuento y porcentaje. Los valores de los fragmentos se cuantificaron mediante interpolación en la recta patrón de concentraciones conocidas. Estos valores se cuantificaban como Ct. El *cycle threshold*, (Ct) es el número de ciclos en una prueba qPCR en el que la señal fluorescente cruza un umbral predeterminado, indicando la presencia del material genético determinado en una muestra. Se aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilk a los resultados de concentración de cada fragmento y de cfDI. La cfDI se definió como el ratio entre el fragmento largo/fragmento corto de cada gen para cada individuo. Se analizó la asociación entre la concentración de los diferentes fragmentos génicos estudiados (ALU, LINE1 y HTRA1), así como el cociente entre fragmentos (cfDI), comparando sus niveles entre los diferentes grupos clínicos estudiados mediante el test de Mann-Whitney (es una prueba no paramétrica que compara las medianas de dos grupos independientes para determinar si existen diferencias significativas entre ellos. No asume normalidad en los datos). Se analizó la capacidad diagnóstica de los distintos fragmentos de los genes estudiados, así como la proporción de fragmentos grandes/pequeños, con curvas ROC mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC). Se estudiaron las correlaciones de los distintos fragmentos de genes y los cocientes de integridad mediante el test de Pearson se consideraron los resultados estadísticamente significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados:

Selección y optimización del kit de extracción:

Para determinar qué kit era el ideal para extraer el DNA de las muestras de plasma, se emplearon muestras de voluntarios sanos y muestras de pacientes descartadas para el estudio.

En el planteamiento inicial del estudio se pretendía cuantificar la integridad en base al ratio entre fragmentos cortos y largos de genes relacionados con la patología aterosclerótica (HTRA1, HDAC9 y NOTCH3). Por ello, la selección del kit de extracción y la optimización de sus condiciones se basaron en los niveles plasmáticos de fragmentos de esos genes en el cfDNA.

En primer lugar, se realizó un PCR convencional de dichos fragmentos, con las condiciones de temperatura previamente optimizadas mediante una PCR en gradiente en la que se estimó 61°C como la temperatura óptima de *annealing*.

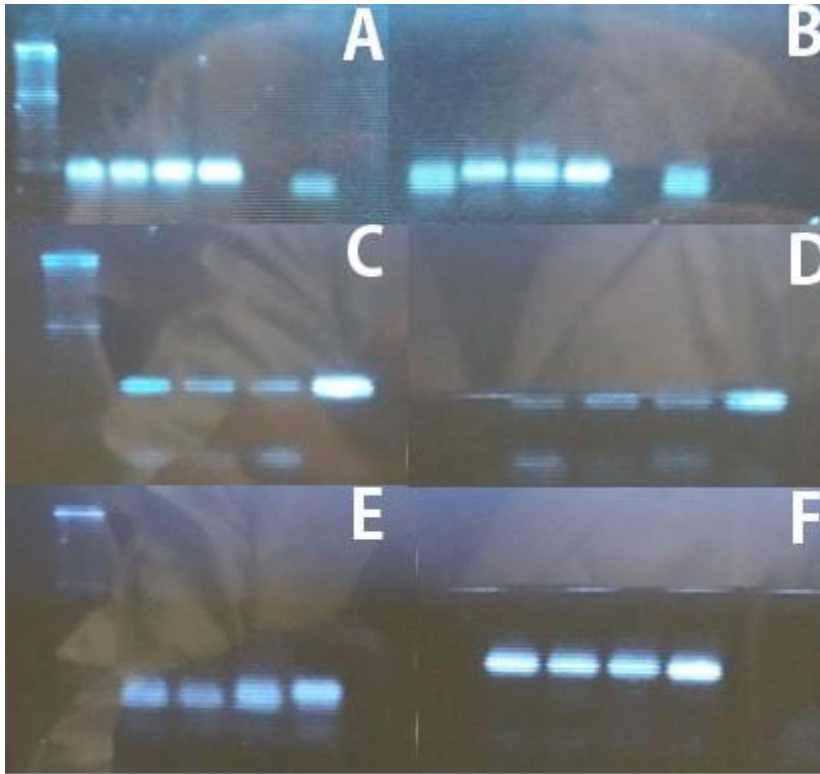


Fig 4. PCR convencional con temperatura de *annealing* de 61°C en gel de agarosa. Análisis de los kits de extracción empezando por la izquierda, las bandas corresponden a: 1: marcador de peso molecular; 2: Kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit, (Qiagen) 3: kit de extracción Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek Corp) 4: kit NucleoSpin cfDNA XS de la marca Macherey-Nagel (casa comercial); 5: DNA genómico. (A y C): Son las señales correspondientes a los fragmentos de HTRA1_90 y HTRA1_250. (B y D): Son las señales correspondientes a los fragmentos de HDAC9_87 y HDAC9_211. (E y F): Son las señales correspondientes a los fragmentos de NOTCH3_93 y NOTCH3_263.

La Figura 4 muestra amplificación de los fragmentos en el tamaño esperado para todos los kits de extracción ensayados. Subjetivamente, no se observan diferencias en la intensidad de la señal, por lo que se realizó una qPCR para poder cuantificar el cfDNA amplificado en cada una de las condiciones. Las PCRs convencionales se hicieron en parejas, por eso, las parejas A y B, C y D, E y F tienen solamente una señal correspondiente al marcador de peso molecular.

Se calcularon los valores de Cts de los fragmentos HTRA1_90, HDAC9_87 y NOTCH3_93, y, por otro lado, HTRA1_250, HDAC9_211 y NOTCH3_263 de las extracciones realizadas con los tres kits. Atendiendo a las Cts obtenidas en cada uno de los análisis, es decir, a partir del ciclo de qPCR en el que empezaba a haber producto de amplificación, se hizo una comparación entre todos los kits. Además, se ensayaron distintos volúmenes iniciales de cfDNA para la qPCR (5 µL y 3 µL) para cada muestra a analizar de cada kit y cada fragmento.

En la Tabla 3, se muestran las Cts de las muestras obtenidas con *QIAamp® Viral RNA Mini Kit*, *Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit* de la marca *Norgen Biotek Corp* y *NucleoSpin cfDNA XS* de la marca *Macherey-Nagel* en cada una de las qPCRs realizadas.

	QIAGEN		Norgen		Macherey-Nagel	
	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)
HTRA1_90	36,47	36,04	35,23	32,69	30,77	33
HTRA1_250	35,66	34,54	34,56	35,64	33,39	33,54
HDAC9_87	35,78	35,47	34,14	32,88	32,89	34,47
HDAC9_211	36,45	38,54	36,82	38,25	34,9	38
NOTCH3_93	37,4	39,64	34,89	35,11	36,32	36,43
NOTCH3_263	36,36	38,63	34,7	36,28	35,43	36,13

Tabla 3: Valores de Cts obtenidas mediante la qPCR de los fragmentos HTRA1_90, HDAC9_87, NOTCH3_93, HTRA1_250, HDAC9_211 y NOTCH3_263 de muestras de cfDNA extraídas a partir de los tres kits diferentes, ensayando distintos volúmenes de DNA (5µL y 3 µL).

La mayoría de los valores de Cts obtenidos se encuentran por encima de 35, indicando concentraciones muy bajas de DNA, por debajo del umbral de detección. Teniendo en cuenta únicamente los valores de Cts, el kit de mejor rendimiento sería NucleoSpin cfDNA XS (Macherey-Nagel); sin embargo, debido a las características del protocolo, el volumen de extracción final es muy bajo (8,5 µL tras la evaporación del eluyente), lo que no permitiría realizar el análisis de todos los fragmentos. Los otros dos kits ensayados presentan Cts equivalentes en la mayoría de los casos, siendo el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit con el que se obtiene mayor volumen de cfDNA (60 µL) y que ofrece margen de optimización.

Así pues, se seleccionó QIAamp® Viral RNA Mini Kit y se ensayaron distintos volúmenes de eluyente (40, 60, 80 µL y 2 eluciones consecutivas de 40 µL) (ver materiales y métodos). Los resultados de Cts para el fragmento HDAC9 se muestran en la Tabla 4.

	40µL		40µL X2		80µL		60µL	
	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)	Ct media (5µL)	Ct media (3µL)
HDAC9_87	32,60	33,00	33,95	34,70	34,00	35,58	34,75	34,14
HDAC9_211	35,84	35,95	36,86	38,06	36,23	36,80	36,71	37,38

Tabla 4: Valores de Cts obtenidas mediante la qPCR de los fragmentos HDAC9_87 y HDAC9_211 usando las muestras de cfDNA extraídas a partir del kit de QIAGEN®, ensayando distintos volúmenes de elución y distintos volúmenes de DNA (5µL y 3 µL).

A pesar de la optimización de condiciones, no se consiguieron obtener Cts por debajo de 35 (umbral de detección), particularmente para el caso de los fragmentos largos. Tomando como referencia los valores de Cts de los fragmentos cortos, se optó por 40 µL de eluyente como condición de extracción.

Optimización de condiciones PCR

HTRA1, HDAC9 y NOTCH3

A pesar de haberse intentado optimizar las condiciones de temperatura en la PCR convencional en gradiente, los valores de Cts obtenidos en la qPCR seguían sin ser adecuados para su cuantificación, por lo que se estudiaron nuevas condiciones de PCR con el fin de optimizar resultados. En primer lugar, se exploró otro rango de temperatura de *annealing* mediante PCRs convencionales con gradiente térmico, variando desde los 53°C hasta los 63°C la temperatura de *annealing*.

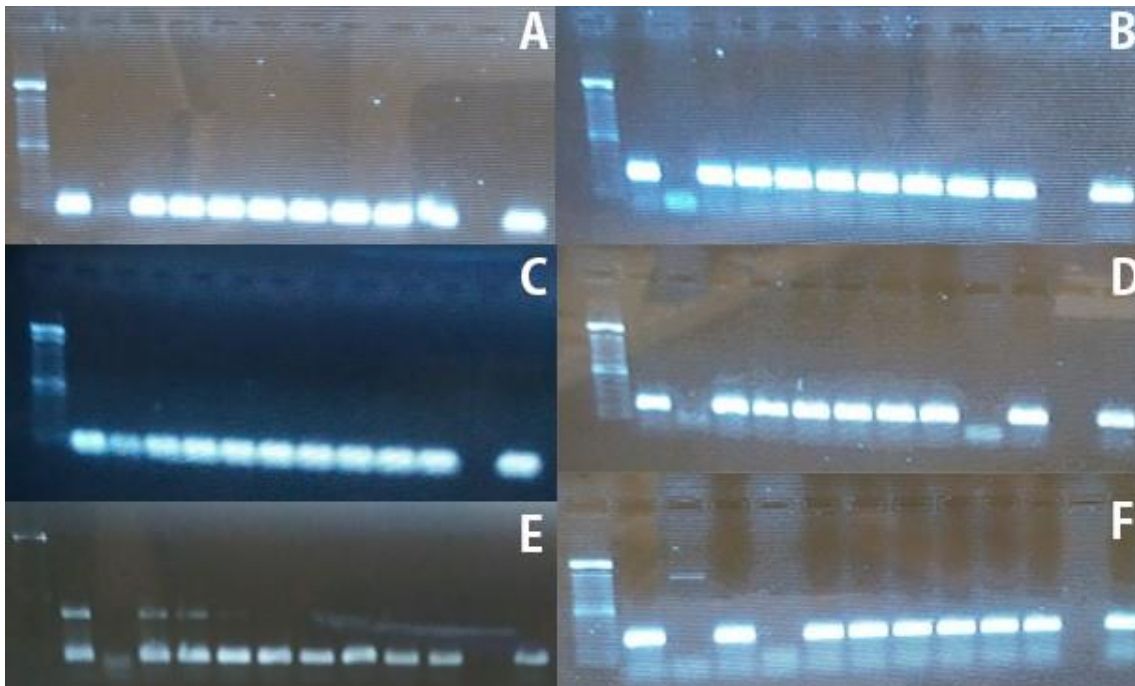


Fig 5. PCR convencional con gradiente de temperatura, de izquierda a derecha, 53°C hasta los 63°C, en gel de agarosa. Como muestra de DNA se ha usado la misma muestra de DNA genómico para todas las PCRs. (A y B): Son las señales correspondientes a los fragmentos de HTRA1_90 y HTRA1_250. (C y D): Son las señales correspondientes a los fragmentos de HDAC9_87 y HDAC9_211. (E y F): Son las señales correspondientes a los fragmentos de NOTCH3_93 y NOTCH3_263. Se han incluido controles negativos en posiciones aleatorias del gel (huecos en blanco)

Subjetivamente, no se observaron mejoras en el nuevo rango analizado, por lo que se decidió mantener como temperatura de *annealing* óptima 61°C.

Con respecto a las condiciones de qPCR, se analizaron diferentes volúmenes y concentraciones de reactivos. Para optimizar las condiciones y el rango de trabajo se realizó una un barrido de diferentes concentraciones de cfDNA que abarca de 312 pg/μL a 1,21875 pg/μL. Las condiciones ensayadas y los resultados del punto más concentrado de la (312 pg/μl) y el más diluido (1,21875 pg/μL) se muestran en la Tabla 4 y se han nombrado como CT min y CT máxima, respectivamente.

		<i>V(DNA)=5μL/20μL</i>		<i>V(DNA)=4μL/10μL</i>		<i>V(DNA)=3μL/10μL</i>	
		Ct min	Ct max	Ct min	Ct max	Ct min	Ct max
HTRA1	90	28,39	34,57	25,30	35,02	33,66	34,41
	250	25,36	34,56	23,23	34,86	28,75	32,94
HDAC9	87	30,34	34,35	24,12	34,73	24,42	34,82
	211	26,29	37,28	23,14	35,16	24,21	36,30
NOTCH3	93	37,12	40,00	32,56	38,12	35,57	40,00
	263	32,58	38,40	27,81	39,47	29,08	38,51

Tabla 5: Valores medios de Cts del punto más concentrado (Ct min) y más diluido (Ct max) de la recta patrón obtenidas mediante la qPCR de los fragmentos HTRA1_90, HTRA1_250, HDAC9_87, HDAC9_211, NOTCH3_93 y NOTCH3_263 usando las muestras de cfDNA extraídas a partir del kit de QIAamp®. Se prueban las distintas configuraciones de recta patrón para observar su rendimiento.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron 4 μL de DNA en un volumen final de reacción de 10 μL como la condición óptima. Además, el fragmento NOTCH3 presentó valores de Cts>35 en la mayoría de puntos de la recta lo que implica una amplificación inespecífica, por lo que descartamos la cuantificación de dichos fragmentos.

Con el fin de descartar que los bajos rendimientos de la PCR se debieran a un mal diseño de los primers, se diseñaron dos nuevas parejas de primers para los fragmentos HTRA1 y HDAC9 (HTRA1_52, HDAC9_129, HTRA1_256 y HDAC9_339) y se repitieron los experimentos de optimización (tanto las PCRs convencionales en gradiente como las qPCR), obteniendo resultados similares.

En vista de los resultados obtenidos, únicamente se seleccionaron los fragmentos HTRA1_90 y HTRA1_250 para su cuantificación en pacientes.

Optimización de condiciones para ALU y LINE

Ante las bajas concentraciones de cfDNA obtenidas para los fragmentos de los genes seleccionados y la perspectiva de no poder alcanzar los objetivos establecidos en el trabajo, se diseñó un plan de contingencia. Para ello, se optó por la cuantificación de secuencias repetitivas del genoma ALU y LINE. Tanto ALU como LINE son secuencias repetitivas del genoma que se han descrito en la literatura como marcadores robustos de integridad del cfDNA. Las condiciones de PCR de los fragmentos ALU (115 y 247) se obtuvieron a partir de las referencias bibliográficas.^{49,50} Se realizó una prueba de PCR convencional y qPCR junto con recta patrón para confirmar que las condiciones preestablecidas permitían la cuantificación de dichos fragmentos en nuestro tipo de muestras.

Del mismo modo, en el caso de los fragmentos LINE (97 y 266) las condiciones de PCR se establecieron según el artículo⁴¹, con ligeras modificaciones, estableciendo la temperatura de *annealing* en 53 y 60°C, respectivamente. Realizamos PCR convencional y qPCR en el cfDNA obtenido del plasma de 2 pacientes y comprobamos que era viable la cuantificación de ambos fragmentos. Tanto para los dos fragmentos de ALU como de LINE se ajustó el volumen de cfDNA a 1μL.

		Paciente 1 Ct media	Paciente 2 Ct media
ALU	115	19,94	18,00
	247	19,39	17,79
LINE1	97	21,53	19,60
	266	24,53	22,93

Tabla 6: Valores medios de Cts obtenidas mediante la qPCR de los fragmentos ALU_115, ALU_247, LINE1_97 y LINE1_266 usando las muestras de cfDNA de dos pacientes, extraídas a partir del kit de QIAamp®.

Teniendo en cuenta el volumen eluido con el kit de extracción seleccionado y los volúmenes de cfDNA necesario para cada reacción. Se seleccionaron los siguientes fragmentos para cuantificarlos en el total de las muestras de pacientes: ALU_115, ALU-247, LINE1_97, LINE1_266, HTRA1_90 y HTRA1_250.

Extracción y análisis de las muestras de estudio:

Se extrajo el cfDNA de 102 muestras de pacientes con estenosis de carótida, utilizando el kit QIAamp® Viral RNA Mini Kit con las condiciones optimizadas en apartados anteriores. El cfDNA extraído para cada muestra se cuantificó mediante un Nanodrop; la concentración media fue de 140,6 ng/μL para pacientes sintomáticos y 127,8 ng/μL para pacientes asintomáticos. Sin embargo, dado que el kit seleccionado incorpora la adición de un DNA carrier en la primera etapa, esta cuantificación no indica la concentración real presente en la muestra, aunque permite identificar extracciones fallidas.

Se cuantificaron los fragmentos ALU-115, ALU-247, LINE-97, LINE-266, HTRA1_90 y HTRA1_250 según las condiciones optimizadas descritas en Materiales y métodos (página 22-23).

Cada punto de la curva estándar, realizada con DNA genómico de concentraciones conocidas, se analizó por triplicado. Cada muestra de cfDNA de pacientes se analizó por duplicado. Se consideraron aceptables desviaciones estándar <0,5 para los valores medios de las Cts de cada muestra.

Los valores de Cts obtenidos para las muestras se interpolaron en la recta patrón, para obtener un valor de concentración de DNA.

Pare evitar sesgos, las muestras se cargaron de manera aleatoria y ciega, es decir, las características de los pacientes se revelaron tras el análisis. Además, todas las placas incluyeron un calibrador interplaca consistente en una muestra de un voluntario sano, que se analizó de igual manera que las muestras de interés y que sirvió para aplicar un factor corrector inter-placa. Todas las placas también incluyeron un blanco de PCR, siendo aceptable un valor del blanco de al menos 5 Cts por encima de la muestra de menor concentración.

CfDNA y su integridad en pacientes con estenosis carotídea

Para evaluar el papel diagnóstico del cfDNA en pacientes con estenosis de carótida, se evaluaron las concentraciones de cfDNA de fragmentos cortos (ALU 115, LINE1_97 y HTRA1_90) y largos (ALU 247, LINE1_266 y HTRA1_250), así como la integridad (CfDI) del mismo, en pacientes con sintomatología neurológica (ECS) y asintomáticos (ECA).

Las características de los pacientes incluidos en el estudio, edad, sexo y factores de riesgo cardiovascular (FRCV) clásicos como hipertensión (HTA) diabetes (DM), dislipemia (DL) y tabaquismo se muestran en la Tabla 6. Los dos grupos de estudio estaban equilibrados en cuanto a factores de riesgo analizados.

Variable	Control (ECA) 66	Casos (ECS) 36
Edad (Mediana [IQR])	69,45 [65,00- 74,00]	70,97 [44,00- 78,00]
Sexo Hombre (%)	83,33%	88,89%
HTA (%)	81,82%	77,78%
DM (%)	39,39%	50,00%
DL (%)	69,70%	66,67%
Tabaquismo (%)	77,27%	83,33%

Tabla 7: Características clínicas de los pacientes. HTA: hipertensión; DM: diabetes, DL: dislipemia y tabaquismo. Para el tabaquismo consideramos a los fumadores activos y a los exfumadores. IQR: rango intercuartílico

La concentración de los distintos fragmentos (cortos y largos) del cfDNA así como la cfDI de cada uno de los genes analizados (ALU, LINE1 y HTRA1) se resume en la Tabla 8.

Grupo	ALU			LINE1			HTRA1		
Mediana	115	247	cfDI	97	266	cfDI	90	250	cfDI
a									
ECA	51,69	14,32	0,32	65,78	8,15	0,12	75,37	14,36	0,19
Mediana	[23,31-	[7,60-	[0,14-	[18,79-	[3,15-	[0,08-	[24,60-	[6,58-	[0,14-
a ([IQ])	133,00]	23,64]	0,55]	154,00]	15,26]	0,18]	162,20]	27,22]	0,33]
ECS	120,6	19,50	0,229	124,70	9,57	0,08	132,10	14,53	0,16
Mediana	[46,12-	[12,92-	[0,08-	[46,75-	[4,97-	[0,04-	[57,38-	[8,60-	[0,09-
a ([IQ])	296,9]	30,84]	0,37]	288,30]	17,35]	0,11]	308,50]	43,01]	0,25]
p	0,0003	0,0421	0,006	0,0109	0,4127	0,0016	0,0053	0,2451	0,0798

Tabla 8: Valores desde las concentraciones de cfDNA (ALU_115, ALU_247, LINE1_97, LINE1_266, HTRA1_90 y HTRA1_250) y con los cfDI de cada gen expresados como mediana y rango intercuartil. ECA: estenosis de carótida asintomática (controles). ECS: estenosis de carótida sintomática (casos)

Las diferencias entre grupos para de cada fragmento de ALU, así como para la cfDI se muestran en la Figura 6.

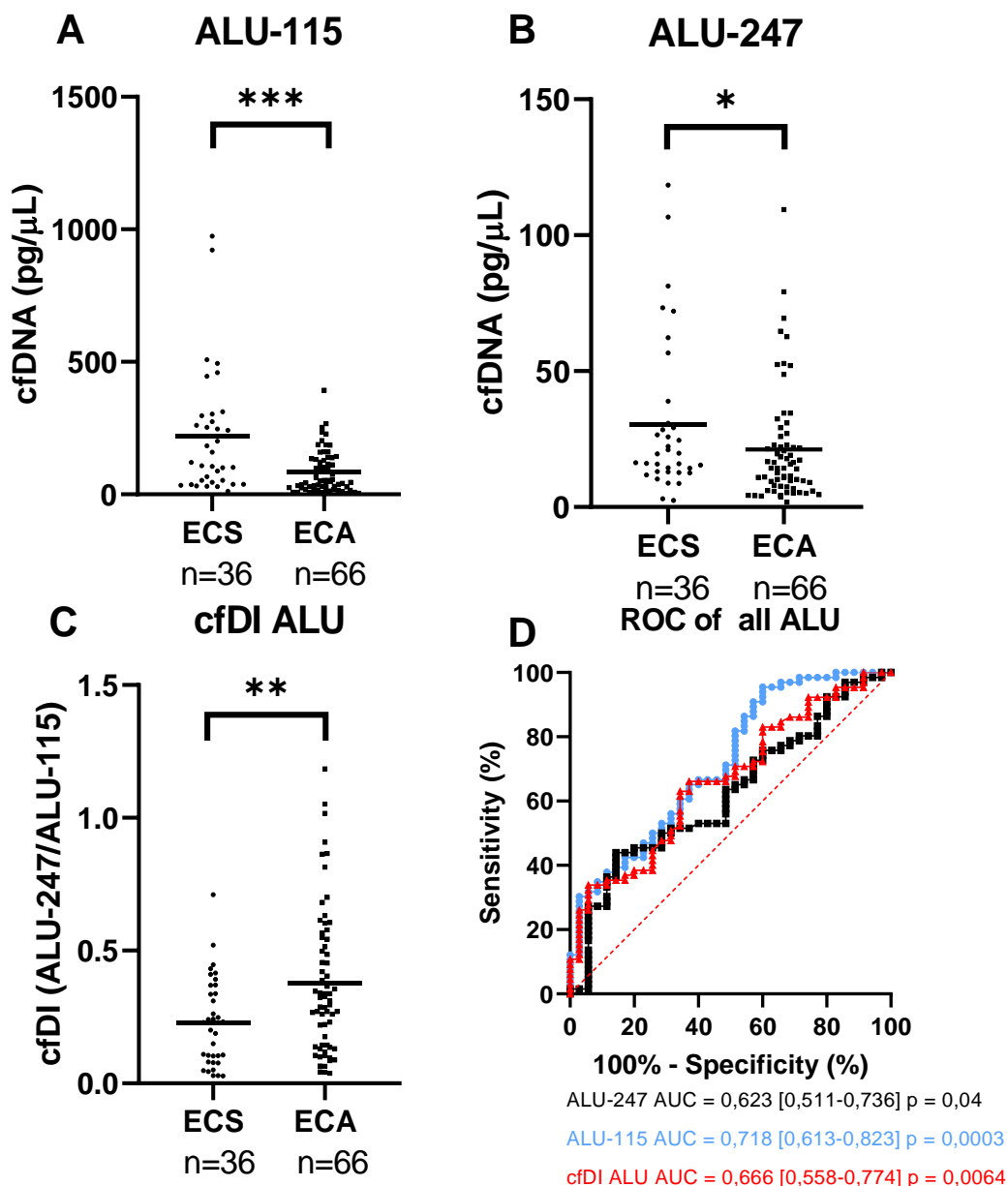


Fig 6: Concentración de cfDNA del fragmento corto (ALU_115) (A) y fragmento largo (ALU_247) (B) y de cfDI (integridad del cfDNA) para fragmentos ALU, calculada como el ratio ALU_247/ ALU_115) (C). (D) Curvas ROC de ALU_115, ALU_247y cfDI. ECS: Estenosis de carótida sintomática. ECA: estenosis de carótida asintomática. * P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

Como se puede observar, las mayores diferencias se observaron para el fragmento corto de ALU (ALU-115) indicando que los pacientes sintomáticos presentaron más concentración de cfDNA con una concentración de 120.6 pg/ μ L (IQC de 46,12 pg/ μ L – 296,9 pg/ μ L) respecto a los pacientes asintomáticos que presentan una concentración de cfDNA de 51,69 pg/ μ L (IQC de 23,31 pg/ μ L – 133,00pg/ μ L), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0,0003).

Por otro lado, observamos que la cfDI ALU es menor en ECA con un valor de 0,32 (IQC de 0,14 – 0,55) respecto al valor de 0.23 (IQC de 0,08 – 0,37) en ECS, siendo esta diferencia

estadísticamente significativa ($p=0.006$). Estos valores indican una mayor degradación del cfDNA en pacientes sintomáticos.

El análisis de la curva ROC nos indica que la mayor capacidad predictiva corresponde a los fragmentos cortos (ALU-115) con un AUC de 0,718 frente a 0,623 y 0,666 del fragmento largo (ALU-247) y de cfDI ALU, respectivamente.

Por tanto, la medida de los fragmentos ALU y en particular del fragmento ALU-115, seguida por la cfDI, podría tener potencial como biomarcador para diferenciar entre pacientes con estenosis de carótida estable y vulnerable.

La figura 7 muestra los resultados obtenidos para las secuencias LINE1 y su integridad.

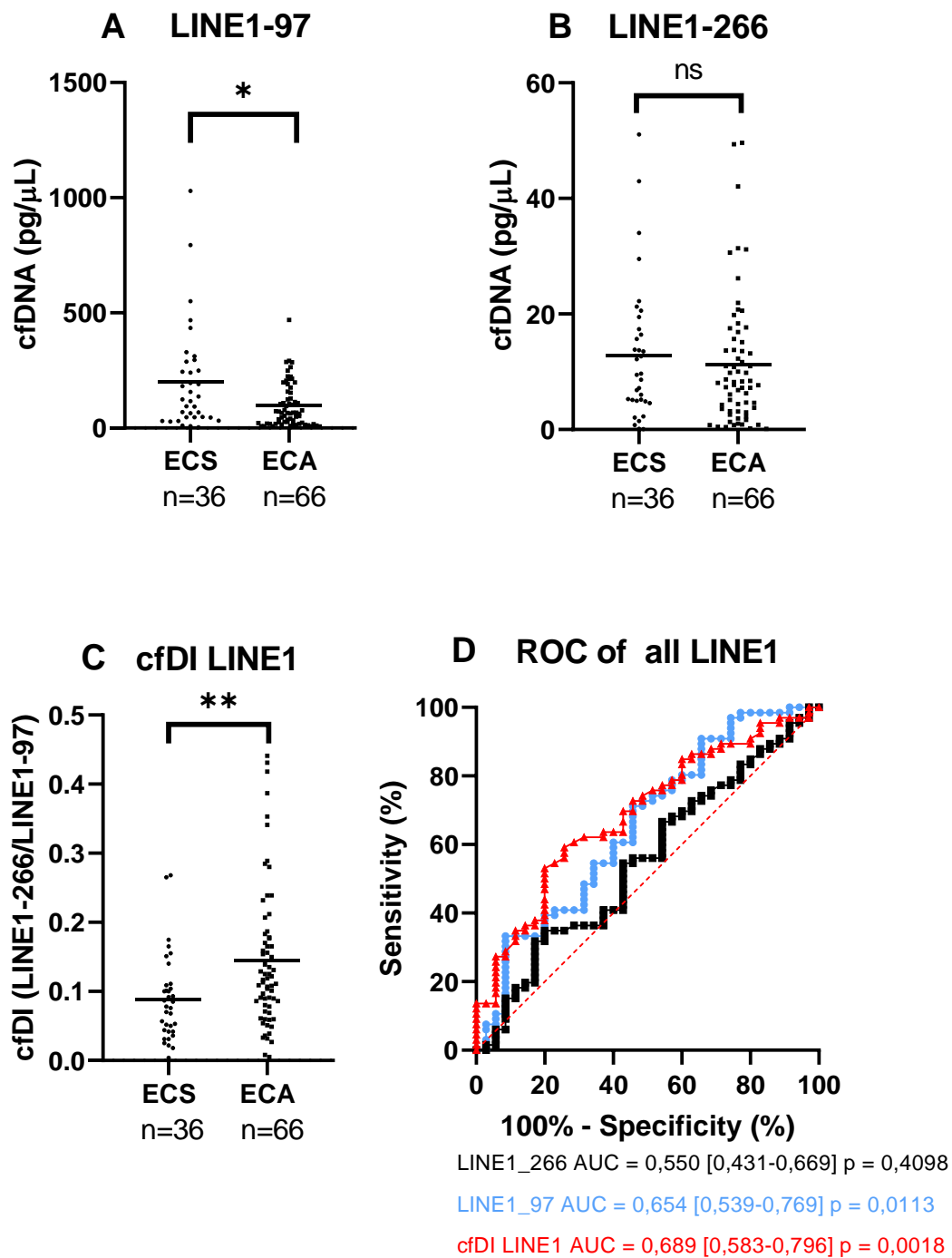


Fig 7: Concentración de cfDNA del fragmento corto (LINE1_97) (A) y fragmento largo (LINE1_266) (B) en pacientes con ECS y ECA. (C) cfDI (integridad del cfDNA) para fragmentos LINE, calculada como el ratio LINE1_266/LINE1_97). (D) Curvas ROC de LINE1_97, LINE1_266 y cfDI. ECS: Estenosis de carótida sintomática. ECA: estenosis de carótida asintomática. * P<0,05, **P<0,01.

Como se puede observar, existen diferencias significativas en la concentración del fragmento corto de LINE1 (LINE1-97) aunque menores que para el caso de ALU-115. Los pacientes sintomáticos presentaron más concentración de cfDNA de 124,70 pg/μL (IQC de 46,75 pg/μL –

288,30 pg/ μ L) respecto a los pacientes asintomáticos que presentan una concentración de cfDNA de 65,78 pg/ μ L (IQC de 18,79 pg/ μ L – 154,00pg/ μ L), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,01$). Sin embargo, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,41$) entre los fragmentos largos. No obstante, al realizar el ratio entre fragmentos, observamos diferencias significativas ($p=0,02$) en la cfDI al comparar pacientes sintomáticos y asintomáticos. Observamos que la cfDI LINE1 es menor en ECS con un valor de 0.08 (IQC de 0.04 – 0.11) respecto al valor de 0.12 (IQC de 0.08 – 0.18) en ECA, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0.002$). Estos valores indican una mayor degradación del cfDNA en pacientes sintomáticos.

A diferencia del fragmento ALU, en el caso de LINE 1, el mayor poder predictivo reside en la cfDI con una AUC de 0,689 frente a 0,654 del fragmento corto (LINE1-97). Es interesante destacar que, mientras que los fragmentos cortos y los fragmentos largos de ALU y LINE1 han mostrado resultados diferentes a la hora de diferenciar los dos grupos clínicos, la cfDI es equivalente, con una significación estadística similar y con un AUC parecida, indicando que, aunque menos potente, la cuantificación de cfDI podría ser más robusta, siendo reproducible incluso para fragmentos diferentes analizados.

Los resultados obtenidos para los fragmentos del gen HTRA 1 se muestran en la figura 8.

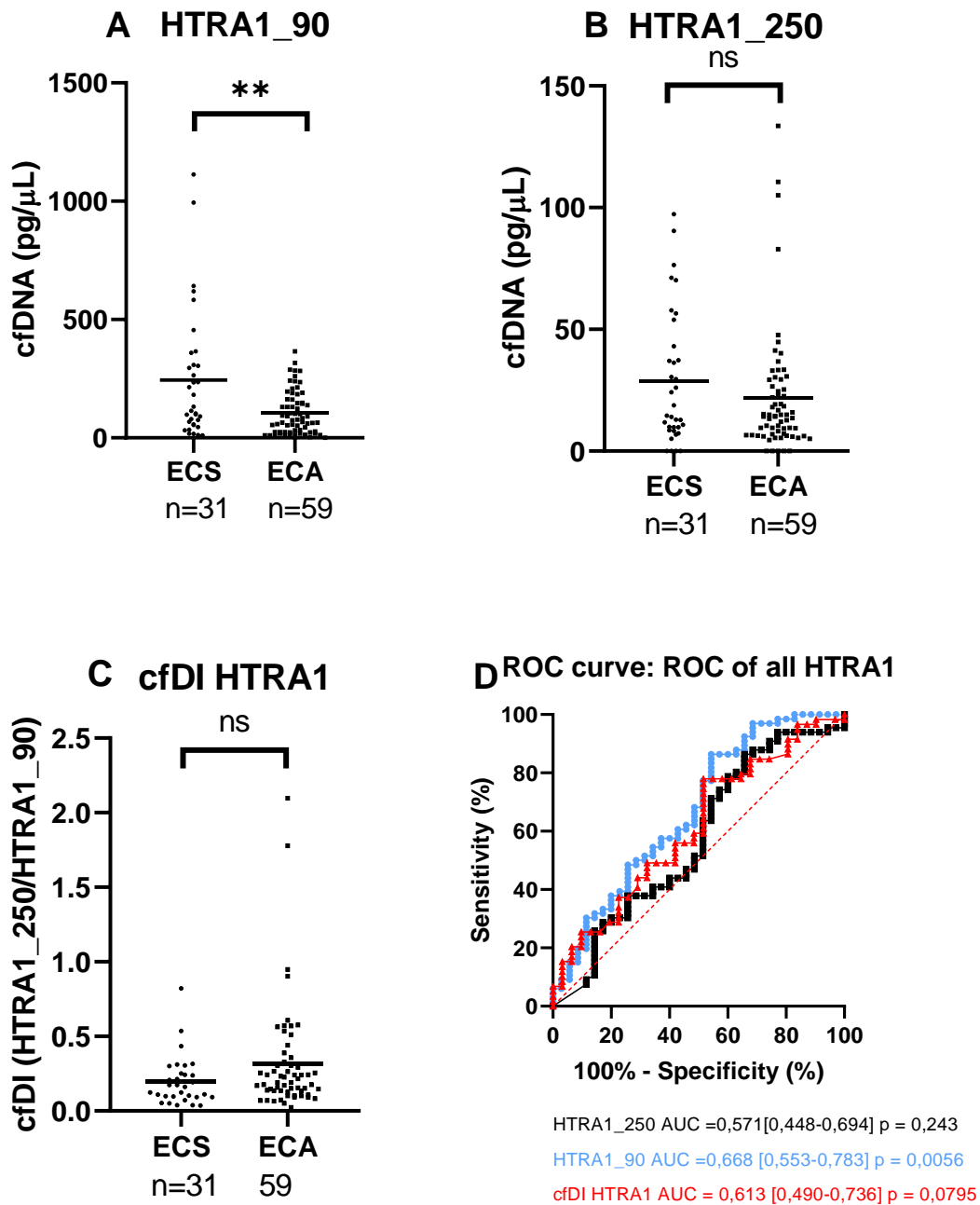


Fig 8: Concentración de cfDNA del fragmento corto (HTRA1_90) (A) y fragmento largo (HTRA1_250) (B) en pacientes con ECS y ECA. (C) cfDI (integridad del cfDNA) para fragmentos ALU, calculada como el ratio HTRA1_250/HTRA1_90. (D) Curvas ROC de HTRA1_90, HTRA1_250 y cfDI. ECS: Estenosis de carótida sintomática. ECA: estenosis de carótida asintomática. **P<0,01.

Como se puede observar, en este caso solo se detectaron diferencias significativas en los fragmentos cortos de HTRA1 (HTRA1_90) indicando que los pacientes sintomáticos presentaron más concentración de cfDNA con una concentración de 132,10 pg/μL (IQC de 57,38 pg/μL – 308,50 pg/μL) respecto a los pacientes asintomáticos que presentan una concentración de cfDNA de 75,37 pg/μL (IQC de 24,60 pg/μL – 162,20 pg/μL), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p=0,005). Por el contrario, tanto los fragmentos largos como la cfDI fueron similares entre grupos (p=0,25 y p=0,08, respectivamente).

Consecuentemente, en el análisis del AUC de la curva ROC únicamente los fragmentos cortos presentaron significación estadística (0,668, $p=0,006$). Como se ha comentado a lo largo de la memoria, el análisis de fragmentos genómicos no repetitivos, como en el caso del gen HTRA1 ha resultado complicado y muchas de las Cts de las muestras se encontraban próximas o fuera del umbral de detección. Esto ha implicado el descarte de algunas muestras y el número de pacientes analizados por grupo se ha reducido. En consecuencia, la potencia estadística y la robustez de los análisis son menores para este fragmento. Así pues, en las condiciones de estudio establecidas, es decir, con un volumen de muestra de partida limitado, el análisis de fragmentos genómicos no repetitivos no parece ser apropiado para su uso como biomarcadores de estabilidad de placa de ateroma.

Finalmente, como hemos observado un comportamiento similar entre los fragmentos de ALU y LINE en cuanto a su poder predictivo, quisimos comprobar el grado de correlación entre todos los marcadores analizados. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

<i>Grupo</i>	<i>ALU-115</i>	<i>ALU-247</i>	<i>ALU-cfDI</i>	<i>LINE1-97</i>	<i>LINE1-266</i>	<i>LINE-cfDI</i>	<i>HTRA1-90</i>	<i>HTRA1-250</i>	<i>HTRA1-cfDI</i>
<i>Correlación valor R/ Correlación valor P</i>									
<i>ALU_115</i>	1/0,00	0,50/8,65e-8	-0,40/3,36e-5	0,81/0,00	0,47/5,73e-7	-0,37/1,20e-4	0,74/0,00	0,45/1,76e-6	-0,19/0,07
<i>ALU_247</i>		1/0,00	-0,03/0,80	0,58/2,21e-10	0,58/1,95e-10	-0,21/0,03	0,53/8,89e-9	0,68/8,66e-15	-0,14/0,18
<i>ALU-cfDI</i>			1/0,00	-0,30/0,00	-0,16/0,12	0,30/0,2e-2	-0,31/0,00	-0,07/0,47	0,19/0,08
<i>LINE1_97</i>				1/0,00	0,63/1,54e-12	-0,33/0,00	0,93/0,00	0,51/7,11e-8	-0,22/0,03
<i>LINE1_266</i>					1/0,00	0,09/0,37	0,55/2,32e-9	0,79/0,00	-0,16/0,12
<i>LINE1-cfDI</i>							-0,31/0,00	0,03/0,78	0,18/0,09
<i>HTRA1_90</i>							1/0,00	0,50/1,02e-7	-0,23/0,03
<i>HTRA1_250</i>								1/0,00	0,01/0,93
<i>HTRA1-cfDI</i>									1/0,00

Tabla 9: Correlación entre los fragmentos ALU, LINE1 y HTRA1 expresados en el valor de la R de Pearson y en los valores P. Los valores que son estadísticamente diferentes y que el valor de R indique la existencia de una correlación aparecen marcados en negrita.

Evidentemente, los valores de cada cfDI correlacionan con los fragmentos cortos y largos de un mismo gen. Además, observamos una fuerte correlación entre, los valores de cfDI de ALU y de LINE. (P=0,002). Esto nos indica que la integridad de ambos fragmentos está relacionada entre sí, sugiriendo que la degradación es similar para ambos fragmentos y reforzando la solidez de la medida de la cfDI como biomarcador de vulnerabilidad de placa de ateroma. Sin embargo, no se ha observado correlación con la cfDI del gen HTRA1 ni para ALU ni para LINE1. Esto podría deberse al problema ya mencionado en la cuantificación de los fragmentos largos de este gen. No obstante, se observa una fuerte correlación entre los fragmentos cortos de los 3 genes (ALU-115, vs LINE 1-97, R=0,81 P=0,00; ALU-115 vs HTRA1-90 (R=0,74, P=0,00; LINE1 vs HTRA1-90; R=0,93, P=0,00).

En general, estos resultados sugieren que ciertas mediciones de fragmentos de cfDNA, en particular los fragmentos más cortos y algunos ratios cfDI, pueden tener potencial como biomarcadores para distinguir entre los grupos de pacientes y controles. El patrón consistente en diferentes regiones de DNA (ALU, LINE1, HTRA1) refuerza la fiabilidad de estos hallazgos. Estos datos proporcionan información valiosa sobre posibles diferencias en la fragmentación o circulación del DNA entre los dos grupos clínicos analizados, que podrían estar relacionadas con procesos o afecciones patológicas subyacentes.

Discusión:

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de buscar biomarcadores para la detección temprana de la estenosis de carótida con fines diagnósticos o pronósticos. Se han establecido algunos marcadores procedentes del torrente sanguíneo con fines diagnósticos, pero apenas se ha investigado el papel potencial del cfDNA y de la cfDI en el análisis de la estabilidad de la placa del ateroma. La presencia de cfDNA y la cfDI, podría detectarse fácilmente en pequeños volúmenes de sangre.

Este estudio se centró en la cuantificación la concentración y en la medida de la integridad del cfDNA en pacientes con ECS en comparación con ECA para evaluar su utilidad como biomarcadores circulantes no invasivos. Estudios previos han demostrado la utilidad del cfDNA y la cfDI como marcadores de otras patologías como el cáncer⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Además, un estudio reciente ha sugerido su posible aplicación en el diagnóstico de la aterosclerosis⁴³. Por ello, en el presente trabajo nos hemos planteado si, además de ser un marcador de aterosclerosis, podría ser un marcador de inestabilidad de la placa de ateroma asociada a la sintomatología neurológica.
(40,42,48,49)

La hipótesis de este estudio sostenía que los pacientes con estenosis carotídea sintomática y asintomática presentarían diferentes niveles de cfDNA en su torrente sanguíneo. Esto se debe a que la estenosis carotídea sintomática, que presenta síntomas de daño endotelial y procesos inflamatorios más extensos, probablemente libere mayores cantidades de cfDNA. En contraste, la estenosis carotídea asintomática, en la que el estrechamiento de la arteria carótida aún no produce síntomas perceptibles, puede presentar niveles más bajos de alteración endotelial e

inflamación, resultando en niveles menores de cfDNA. Estos niveles de cfDNA pueden estar influenciados por los procesos celulares subyacentes: la apoptosis y la necrosis. Durante la apoptosis, los componentes celulares se desensamblan y el DNA nuclear se degrada en pequeños fragmentos, mientras que la necrosis, al ser una muerte celular prematura no programada, produce fragmentos más grandes de DNA nuclear.²² Por lo tanto, es razonable estudiar la relación entre fragmentos grandes y pequeños de DNA en diferentes genes, buscando diferencias significativas entre individuos con ECS y ECA, ya que la variabilidad en estos procesos podría reflejarse en los patrones de cfDNA observados en el torrente sanguíneo.

Para ello, se seleccionaron los genes HTRA1, HDAC9 y NOTCH3 por su relevancia bibliográfica o por relación con accidentes cerebrovasculares.^{42,45-48} y los fragmentos ALU y LINE1 por su extensa aplicación en la cuantificación del cfDNA y cfDI en distintas patologías (referencias). HDAC9 y NOTCH3 fueron descartados en las etapas de optimización debido a su bajo rendimiento. Se aisló el cfDNA de 102 muestras de pacientes con ECS y ECA. Tras optimizar los programas de qPCR para cada fragmento de interés, se cuantificaron dos fragmentos por qPCR dos fragmentos de cada gen, uno más largo y otro más corto estando el corto contenido dentro del grande. Posteriormente, se analizaron las posibles diferencias entre grupos clínicos en la concentración de cada fragmento, también la relación fragmentos largos/cortos (cfDI) y la correlación entre los fragmentos.

Los resultados de este estudio mostraron que los fragmentos de cfDNA cortos y largos, concretamente ALU_115, ALU_247, LINE1_97, LINE1_266, HTRA1_90 y HTRA1_250, estaban elevados en pacientes con ECS. Además, los índices de integridad para ALU y LINE1 fueron inferiores en los pacientes con ECS en comparación con los controles, lo que indica una mayor degradación del cfDNA en los pacientes con ECS.

El análisis de la curva ROC demostró que el fragmento de cfDNA ALU_115 tenía el valor predictivo más alto para el ECS (AUC = 0,718), seguido del índice de integridad de ALU (cfDI ALU; AUC = 0,666). Sin embargo, los valores predictivos globales de los fragmentos y sus índices de integridad fueron relativamente bajos, lo que sugiere que estas mediciones por sí solas pueden no ser suficientes para un diagnóstico definitivo. Los valores moderados de AUC sugieren que las medidas de cfDNA y cfDI podrían ser más valiosas como parte de un panel más amplio de herramientas de diagnóstico y complementar a otros biomarcadores emergentes y técnicas avanzadas de imagen. La combinación de cfDNA con marcadores inflamatorios, lípidos plasmáticos, MMPs o TIMP-1 podría mejorar la precisión diagnóstica y proporcionar una evaluación más completa del estado de la enfermedad. (15-17)

Por otro lado, el análisis de correlación mediante la R de Pearson reveló asociaciones significativas entre fragmentos cortos de cfDNA, observándose las correlaciones más fuertes entre ALU_115 y LINE1_97 (R = 0,81), ALU_115 y HTRA1_90 (R = 0,74), y LINE1_97 y HTRA1_90 (R = 0,93). Se observó también correlación entre, los valores de cfDI de ALU y de LINE. Esto indica que la integridad de ambos fragmentos está relacionada entre sí, sugiriendo que la degradación es similar para ambos fragmentos y reforzando el valor de la medida de la cfDI como biomarcador de vulnerabilidad de placa de ateroma.

Los elevados niveles de fragmentos de cfDNA en los pacientes con ECS podrían atribuirse al aumento del recambio celular y la apoptosis en el endotelio vascular debido a los procesos patológicos de aterosclerosis e inflamación. Los menores índices de integridad en los pacientes con ECS indican un mayor grado de fragmentación del cfDNA, lo que concuerda con la hipótesis de que el aumento del daño celular y la apoptosis contribuyen a la liberación de cfDNA altamente fragmentado en la circulación. En el estudio de *Qian B. et al.* se destaca la importancia de la concentración del cfDNA y cfDI en la discriminación entre pacientes con aterosclerosis y controles, al igual que en nuestro estudio, subrayando la capacidad de estos parámetros para diferenciar entre grupos clínicos.

Sin embargo, existen diferencias entre ambos estudios. El estudio de *Qian B. et al.* además de identificar los pacientes de aterosclerosis de los controles sanos, remarca su potencial del cfDNA y la cfDI para monitorear la progresión de la placa, sin embargo, no hacen distinción entre la sintomatología de los pacientes. En este sentido nuestro estudio aporta novedad y complementa el estudio de *Qian B.*, ya que parece que el cfDNA y la cfDI no indican únicamente progresión de placa, sino también podrían estar asociados con la composición y vulnerabilidad de la misma y con la aparición de sintomatología neurológica.

En nuestro estudio hemos empleado una cohorte bien caracterizada con criterios diagnósticos claros para el ECS y la ECA, y únicamente se han incluido pacientes con sintomatología reciente, lo que aumenta la fiabilidad de los hallazgos. además, se analizaron varios fragmentos de cfDNA, lo que proporcionó una visión completa de la dinámica del cfDNA en la estenosis carotídea y refuerza su uso como marcadores ya que tanto la cfDI calculada para ALU como para LINE1 presentaron resultados similares. Sin embargo, el estudio presenta ciertas limitaciones. Por un lado, se trata de un diseño transversal que dificulta determinar si los cambios en los niveles de cfDNA causan la progresión de la estenosis carotídea. Además, las muestras se obtuvieron una vez presentada la sintomatología, por lo que el carácter predictivo del cfDNA y la cfDI es limitado. Estudios longitudinales en pacientes en seguimiento son necesarios para confirmar el potencial diagnóstico y pronóstico de estos marcadores. Por otro lado, el tamaño muestras es relativamente pequeño de la muestra puede haber limitado la potencia estadística para detectar diferencias y correlaciones significativas, especialmente en el caso del HTRA1, donde se han descartado muestras En el estudio de *Qian B. et al.* la cohorte mayor a la nuestra lo que le proporciona valores predictivos AUC son algo superiores a los de este estudio. Además, ellos emplean voluntarios sanos (sin patología aterosclerótica) como grupo control, y es de esperar que las diferencias entre pacientes y controles sanos sean mayores que entre dos grupos de pacientes con estenosis severa (sintomáticos y asintomáticos) como en nuestro análisis. Una limitación importante que tienen estos estudios es la dependencia de los fragmentos ALU-115 y ALU-247 para evaluar la integridad del cfDNA. ^(39,43) Aunque estos marcadores se utilizan ampliamente, es posible que no reflejen toda la complejidad de los patrones de fragmentación del cfDNA. Además, el estudio de *Qian B.* se centra principalmente en la correlación entre la cfDI y las características de la placa, como el tamaño y el grosor, pero tienen en cuenta otros factores de riesgo que podrían actuar como factores de confusión influyendo en los niveles de cfDNA. En este sentido, hay que aclarar que, en nuestro estudio, el grupo limitante fue el de los pacientes sintomáticos mientras que pacientes asintomáticos se escogieron entre una colección mayor de manera que estuvieran pareados por edad y sexo con el grupo de estudio. Además, comparamos los principales factores de riesgo vascular y comprobamos que su distribución era equivalente

entre grupos, por lo que no los tuvimos en cuenta como factores de confusión en nuestro análisis.

En investigaciones futuras se tendrían que realizar estudios longitudinales con una cohorte mucho mayor de pacientes con ECS y ECA para evaluar los cambios en los niveles de cfDNA y los índices de integridad a lo largo del tiempo en relación con la progresión de la estenosis carotídea. De esta forma se reforzaría estadísticamente los resultados obtenidos haciéndolos mucho más sólidos. Además, la integración del análisis de cfDNA con otros biomarcadores y técnicas de imagen puede mejorar las capacidades diagnósticas y pronósticas de la estenosis carotídea y las afecciones cardiovasculares relacionadas. Nuestros hallazgos podrían ayudar a desarrollar en un futuro nuevas herramientas para diagnosticar de forma temprana y con certeza la ECS y ECA en pacientes sin necesidad de realizar técnicas invasivas, mejorando el confort del paciente y previniendo accidentes cerebrovasculares.

Conclusiones:

Entre todos los kits de extracción de cfDNA evaluados, QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) es el más apropiado para llevar a cabo las extracciones de cfDNA en pequeños volúmenes de plasma por presentar un mayor rendimiento y versatilidad de protocolo que ha permitido optimizar las condiciones para la obtención cfDNA y posterior cuantificación por PCR de los distintos fragmentos.

Los fragmentos de las secuencias repetitivas ALU y LINE1, así como los fragmentos cortos del gen HTRA1, y la cfDI de ALU y LINE1, estimada como el ratio de los fragmentos largos/cortos, podrían tener utilidad como nuevos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico de la estenosis de carótida sintomática. Este tipo de marcadores podrían complementar en un futuro a las técnicas de imagen actual, ayudando a la estratificación de los pacientes para favorecer una medicina personalizada.

Aunque los resultados son prometedores, las mediciones basadas en cfDNA no son suficientemente robustas como para ser utilizadas como pruebas diagnósticas independientes. Estos biomarcadores podrían ser más valiosos como parte de un panel diagnóstico más amplio que incluya otras técnicas y biomarcadores. Es necesario realizar estudios longitudinales para evaluar los cambios en los niveles de cfDNA y los índices de integridad a lo largo del tiempo y su relación con la progresión de la estenosis carotídea. Además, la integración del análisis de cfDNA con otras técnicas diagnósticas y de imagen podría mejorar las capacidades diagnósticas y pronósticas para esta condición.

Bibliografía:

1. ¿Qué es la aterosclerosis? [Internet]. NHLBI, NIH. [consultado 13 de Julio de 2024]. Disponible en: <https://www.nhlbi.nih.gov/es/salud/aterosclerosis>
2. Erickson KM, Cole DJ. Carotid artery disease: stenting vs endarterectomy. *Br J Anaesth*. 2010 Dec;105 Suppl 1:i34-49. doi: 10.1093/bja/aeq319. PMID: 21148654.
3. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011 May 19;473(7347):317-25. doi: 10.1038/nature10146. PMID: 21593864.
4. Bouhlel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007 Aug;6(2):137-43. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.010. PMID: 17681149.
5. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):508-19. doi: 10.1038/nri1882. Epub 2006 Jun 16. PMID: 16778830.
6. van Es T, van Puijvelde GH, Ramos OH, Segers FM, Joosten LA, van den Berg WB, Michon IM, de Vos P, van Berkel TJ, Kuiper J. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 16;388(2):261-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.152. Epub 2009 Aug 4. PMID: 19660432.
7. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*. 2001 Feb 23;104(4):503-16. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00238-0. PMID: 11239408.
8. Tall AR, Yvan-Charvet L, Terasaka N, Pagler T, Wang N. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):365-75. doi: 10.1016/j.cmet.2008.03.001. PMID: 18460328.
9. LeFevre ML; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for asymptomatic carotid artery stenosis: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*. 2014 Sep 2;161(5):356-62. doi: 10.7326/M14-1333. Erratum in: *Ann Intern Med*. 2015 Feb 17;162(4):323. PMID: 25003392.
10. Rev. Esp. Salud Publica vol.95, 2021; Atlas de ictus en España 2019. https://www.sen.es/images/2020/atlas/Atlas_del_Ictus_de_Espana_version_web.pdf; Anales Sis San Navarra vol.45 (1) 2022
11. Murray CSG, Nahar T, Kalashyan H, Becher H, Nanda NC. Ultrasound assessment of carotid arteries: Current concepts, methodologies, diagnostic criteria, and technological advancements. *Echocardiography*. 2018 Dec;35(12):2079-2091. doi: 10.1111/echo.14197. PMID: 30506607.
12. Ferrero A, Takahashi N, Vrtiska TJ, Krambeck AE, Lieske JC, McCollough CH. Understanding, justifying, and optimizing radiation exposure for CT imaging in nephrourology. *Nat Rev Urol*. 2019 Apr;16(4):231-244. doi: 10.1038/s41585-019-0148-8. PMID: 30728476; PMCID: PMC6447446.
13. Hartung MP, Grist TM, François CJ. Magnetic resonance angiography: current status and future directions. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2011 Mar 9;13(1):19. doi: 10.1186/1532-429X-13-19. PMID: 21388544; PMCID: PMC3060856.
14. U.S. Preventive Services Task Force. Screening for carotid artery stenosis: recommendation statement. *Am Fam Physician*. 2008 Apr 1;77(7):1006-10. PMID: 18441867.
15. Alborelli I, Generali D, Jermann P, Cappelletti MR, Ferrero G, Scaggiante B, Bortul M, Zanconati F, Nicolet S, Haegeler J, Bubendorf L, Aceto N, Scaltriti M, Mucci G, Quagliata L, Novelli G. Cell-free DNA analysis in healthy individuals by next-generation sequencing: a proof of concept and technical validation study. *Cell Death Dis*. 2019 Jul 11;10(7):534. doi: 10.1038/s41419-019-1770-3. PMID: 31296838; PMCID: PMC6624284.

16. Giagtzidis I, Karkos C, Kadoglou NPE, Spathis A, Papazoglou K. Serum Levels of Matrix Metalloproteinases in Patients Undergoing Endovascular Intervention for Peripheral Arterial Disease. *Ann Vasc Surg.* 2023 Aug;94:154-164. doi: 10.1016/j.avsg.2023.04.029. Epub 2023 May 9. PMID: 37169253.
17. Gaubatz JW, Ballantyne CM, Wasserman BA, He M, Chambless LE, Boerwinkle E, Hoogeveen RC. Association of circulating matrix metalloproteinases with carotid artery characteristics: the Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 May;30(5):1034-42. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.195370. Epub 2010 Feb 18. PMID: 20167662; PMCID: PMC2860383.
18. Kadoglou NP, Gerasimidis T, Moumtzouoglou A, Kapelouzou A, Sailer N, Fotiadis G, Vitta I, Katinios A, Kougiass P, Bandios S, Voliotis K, Karayannacos PE, Liapis CD. Intensive lipid-lowering therapy ameliorates novel calcification markers and GSM score in patients with carotid stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2008 Jun;35(6):661-8. doi: 10.1016/j.ejvs.2007.12.011. Epub 2008 Apr 18. PMID: 18395477.
19. Moss J, Magenheim J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, Samet Y, Maoz M, Druid H, Arner P, Fu KY, Kiss E, Spalding KL, Landesberg G, Zick A, Grinshpun A, Shapiro AMJ, Grompe M, Wittenberg AD, Glaser B, Shemer R, Kaplan T, Dor Y. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nat Commun.* 2018 Nov 29;9(1):5068. doi: 10.1038/s41467-018-07466-6. PMID: 30498206; PMCID: PMC6265251.
20. Steinman CR. Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest.* 1975 Aug;56(2):512-5. doi: 10.1172/JCI108118. PMID: 1150882; PMCID: PMC436612.
21. Pös O, Biró O, Szemes T, Nagy B. Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur J Hum Genet.* 2018 Jul;26(7):937-945. doi: 10.1038/s41431-018-0132-4. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29681621; PMCID: PMC6018748.
22. Nagy B. Cell-Free Nucleic Acids. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 12;20(22):5645. doi: 10.3390/ijms20225645. PMID: 31718077; PMCID: PMC6888694.
23. Szilágyi M, Pös O, Márton É, Buglyó G, Soltész B, Keserű J, Penyige A, Szemes T, Nagy B. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2020 Sep 17;21(18):6827. doi: 10.3390/ijms21186827. PMID: 32957662; PMCID: PMC7555669.
24. Neher MD, Keene CN, Rich MC, Moore HB, Stahel PF. Serum biomarkers for traumatic brain injury. *South Med J.* 2014 Apr;107(4):248-55. doi: 10.1097/SMJ.0000000000000086. PMID: 24937520.
25. Stanzione R, Forte M, Cotugno M, Bianchi F, Marchitti S, Rubattu S. Role of DAMPs and of Leukocytes Infiltration in Ischemic Stroke: Insights from Animal Models and Translation to the Human Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2022 Apr;42(3):545-556. doi: 10.1007/s10571-020-00966-4. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32996044.
26. Simats A, Liesz A. Systemic inflammation after stroke: implications for post-stroke comorbidities. *EMBO Mol Med.* 2022 Sep 7;14(9):e16269. doi: 10.15252/emmm.202216269. Epub 2022 Aug 15. PMID: 35971650; PMCID: PMC9449596.
27. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018 Aug 13;18(4):e27. doi: 10.4110/in.2018.18.e27. PMID: 30181915; PMCID: PMC6117512.
28. Iadecola C, Buckwalter MS, Anrather J. Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J Clin Invest.* 2020 Jun 1;130(6):2777-2788. doi: 10.1172/JCI135530. PMID: 32391806; PMCID: PMC7260029.
29. Vasilyeva I, Bepalov V, Baranova A, Voznyuk I, Baranenko D. Differential Dynamics of the Levels of Low Molecular Weight DNA Fragments in the Plasma of Patients With Ischemic and Hemorrhagic Strokes. *Basic Clin Neurosci.* 2020 Nov-Dec;11(6):805-810. doi: 10.32598/bcn.11.6.1639.1. Epub 2020 Nov 1. PMID: 33850617; PMCID: PMC8019841.

30. Roth S, Wernsdorf SR, Liesz A. The role of circulating cell-free DNA as an inflammatory mediator after stroke. *Semin Immunopathol.* 2023 May;45(3):411-425. doi: 10.1007/s00281-023-00993-5. Epub 2023 May 22. PMID: 37212886; PMCID: PMC10279574.
31. Hasan N, McColgan P, Bentley P, Edwards RJ, Sharma P. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *Br J Clin Pharmacol.* 2012 Aug;74(2):230-40. doi: 10.1111/j.1365-2125.2012.04212.x. PMID: 22320313; PMCID: PMC3630743.
32. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, Lo YM. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem.* 2003 Apr;49(4):562-9. doi: 10.1373/49.4.562. PMID: 12651807.
33. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Nagel D, Seidel D. Nucleosomes as a new prognostic marker in early cerebral stroke. *J Neurol.* 2007 May;254(5):617-23. doi: 10.1007/s00415-006-0407-5. Epub 2007 Apr 6. PMID: 17410327.
34. Tsai NW, Lin TK, Chen SD, Chang WN, Wang HC, Yang TM, Lin YJ, Jan CR, Huang CR, Liou CW, Lu CH. The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta.* 2011 Feb 20;412(5-6):476-9. doi: 10.1016/j.cca.2010.11.036. Epub 2010 Dec 3. PMID: 21130757.
35. Bustamante A, Mancha F, Macher HC, García-Berrocso T, Giralt D, Ribó M, Guerrero JM, Montaner J. Circulating cell-free DNA is a predictor of short-term neurological outcome in stroke patients treated with intravenous thrombolysis. *J Circ Biomark.* 2016 Sep 26;5:1849454416668791. doi: 10.1177/1849454416668791. PMID: 28936264; PMCID: PMC5548318.
36. Grosse GM, Blume N, Abu-Fares O, Götz F, Ernst J, Leotesco A, Gabriel MM, van Gemmeren T, Worthmann H, Lichtinghagen R, Imker R, Falk CS, Weissenborn K, Schuppner R, de Buhr N. Endogenous Deoxyribonuclease Activity and Cell-Free Deoxyribonucleic Acid in Acute Ischemic Stroke: A Cohort Study. *Stroke.* 2022 Apr;53(4):1235-1244. doi: 10.1161/STROKEAHA.121.036299. Epub 2022 Jan 7. PMID: 34991335.
37. Geiger S, Holdenrieder S, Stieber P, Hamann GF, Bruening R, Ma J, Nagel D, Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2006;21(1-2):32-7. doi: 10.1159/000089591. Epub 2005 Nov 8. PMID: 16282687.
38. Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2015 Oct 9;17(1):136. doi: 10.1186/s13058-015-0645-5. PMID: 26453190; PMCID: PMC4599311.
39. Hussein NA, Mohamed SN, Ahmed MA. Plasma ALU-247, ALU-115, and cfDNA Integrity as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Breast Cancer. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019 Mar;187(3):1028-1045. doi: 10.1007/s12010-018-2858-4. Epub 2018 Aug 28. PMID: 30151636.
40. Casadio V, Calistri D, Salvi S, Gunelli R, Carretta E, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W. Urine cell-free DNA integrity as a marker for early prostate cancer diagnosis: a pilot study. *Biomed Res Int.* 2013;2013:270457. doi: 10.1155/2013/270457. Epub 2013 Feb 13. PMID: 23509700; PMCID: PMC3586456.
41. Ren S, Ren XD, Guo LF, Qu XM, Shang MY, Dai XT, Huang Q. Urine cell-free DNA as a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer. *J Clin Lab Anal.* 2020 Aug;34(8):e23321. doi: 10.1002/jcla.23321. Epub 2020 Apr 13. PMID: 32281142; PMCID: PMC7439414.
42. Fan J, Watanabe T. Atherosclerosis: Known and unknown. *Pathol Int.* 2022 Mar;72(3):151-160. doi: 10.1111/pin.13202. Epub 2022 Jan 25. PMID: 35076127.
43. Qian B, Li K, Lou X, Guo Y, Wang Y, Wu L, Zhang D. Plasma Cell-Free DNA as a Novel Biomarker for the Diagnosis and Monitoring of Atherosclerosis. *Cells.* 2022 Oct 16;11(20):3248. doi: 10.3390/cells11203248. PMID: 36291116; PMCID: PMC9600586.
44. Song P, Wu LR, Yan YH, Zhang JX, Chu T, Kwong LN, Patel AA, Zhang DY. Limitations and opportunities of technologies for the analysis of cell-free DNA in cancer diagnostics. *Nat Biomed*

- Eng. 2022 Mar;6(3):232-245. doi: 10.1038/s41551-021-00837-3. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35102279; PMCID: PMC9336539.
45. Kuroki R, Murata Y, Fuke S, Nakachi Y, Nakashima J, Kujoth GC, Prolla TA, Bundo M, Kato T, Iwamoto K. Establishment of Quantitative PCR Assays for Active Long Interspersed Nuclear Element-1 Subfamilies in Mice and Applications to the Analysis of Aging-Associated Retrotransposition. *Front Genet.* 2020 Sep 16;11:519206. doi: 10.3389/fgene.2020.519206. PMID: 33193604; PMCID: PMC7525186.
 46. Onodera O, Nozaki H, Fukutake T. HTRA1 Disorder. 2010 Apr 27 [Updated 2019 Nov 7]. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK32533/>
 47. Malhotra R, Mauer AC, Lino Cardenas CL, Guo X, Yao J, Zhang X, Wunderer F, Smith AV, Wong Q, Pechlivanis S, Hwang SJ, Wang J, Lu L, Nicholson CJ, Shelton G, Buswell MD, Barnes HJ, Sigurslid HH, Slocum C, Rourke CO, Rhee DK, Bagchi A, Nigwekar SU, Buys ES, Campbell CY, Harris T, Budoff M, Criqui MH, Rotter JI, Johnson AD, Song C, Franceschini N, Debette S, Hoffmann U, Kälsch H, Nöthen MM, Sigurdsson S, Freedman BI, Bowden DW, Jöckel KH, Moebus S, Erbel R, Feitosa MF, Gudnason V, Thanassoulis G, Zapol WM, Lindsay ME, Bloch DB, Post WS, O'Donnell CJ. HDAC9 is implicated in atherosclerotic aortic calcification and affects vascular smooth muscle cell phenotype. *Nat Genet.* 2019 Nov;51(11):1580-1587. doi: 10.1038/s41588-019-0514-8. Epub 2019 Oct 28. PMID: 31659325; PMCID: PMC6858575.
 48. Wang MM. CADASIL. *Handb Clin Neurol.* 2018;148:733-743. doi: 10.1016/B978-0-444-64076-5.00047-8. PMID: 29478611.
 49. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S, Cuk K, Riethdorf S, Trumpp A, Pantel K, Sohn C, Schneeweiss A, Surowy H, Burwinkel B. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014 Jul;146(1):163-74. doi: 10.1007/s10549-014-2946-2. Epub 2014 May 17. PMID: 24838941.
 50. Hao TB, Shi W, Shen XJ, Qi J, Wu XH, Wu Y, Tang YY, Ju SQ. Circulating cell-free DNA in serum as a biomarker for diagnosis and prognostic prediction of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014 Oct 14;111(8):1482-9. doi: 10.1038/bjc.2014.470. Epub 2014 Aug 26. PMID: 25157833; PMCID: PMC4200099.

Agradecimientos:

Quiero dar las gracias a, Emma Plana por darme la posibilidad de formar parte del Grupo de Investigación en Hemostasia, Trombosis, Arteriosclerosis y Biología Vascular. Adquirí mucha experiencia de trabajo y aprendí a resolver los problemas que iban surgiendo a lo largo del experimento. Además, aprecio mucho la ayuda prestada por los miembros del grupo: Pilar Medina, Julia Oto y Patricia Verger. Todas ellas me ayudaron mucho no sólo enseñándome todo lo que necesitaba, sino también proporcionándome un buen ambiente de trabajo que me ayudó a sentirme cómodo y a trabajar de forma más eficiente. La realización de este proyecto no habría sido posible sin toda su ayuda. Quisiera sobre todo exaltar la paciencia y el respeto que ha mostrado tener mi tutora conmigo pues, durante los meses de junio y julio, sufrí un acontecimiento personal bastante desagradable que ha repercutido mucho en mi rendimiento académico. De corazón que agradezco el trato conmigo este verano. Y para cuando termine la realización de este Trabajo de Fin de Master, le deseo la mejor de las suertes durante el resto de su actividad profesional.