



**Diseño metodológico de la detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de pacientes con infarto agudo de miocardio.**

**Deseño metodolóxico da detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de doentes con infarto agudo de miocardio.**

**Methodological design for detection of bacterial DNA from thrombi from patients with acute myocardial infarction**

**Bibiana Recalde Vázquez**

**(Julio del 2015)**

**Máster en Biotecnología Avanzada**

**Universidad de A Coruña**

# Facultad de Ciencias

*Grupo de Investigación en Cardiología del Instituto de Investigación  
Biomédica de A Coruña (INIBIC)*

**Diseño metodológico de la detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de pacientes con infarto agudo de miocardio.**

**Deseño metodolóxico da detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de doentes con infarto agudo de miocardio.**

**Methodological design for detection of bacterial DNA from thrombi from patients with acute myocardial infarction.**

**Bibiana Recalde Vázquez**

Las Dra. Lucía Núñez Fernández y Dra. Natalia Suárez Fuentetaja en calidad de tutoras de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador. Y para que conste firman este documento.

Dra. Lucía Núñez Fernández



Dra. Natalia Suárez Fuentetaja



A Coruña, Julio de 2015

# ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN .....	4
2.1. Definición de Infarto Agudo de Miocardio (IAM) .....	4
2.1.1. Trombo Intracoronario .....	5
2.1.2. Tratamiento .....	7
2.2. Papel de la infección en el IAM .....	8
2.2.1. Infección y aterosclerosis .....	8
2.2.2. Papel de la infección en el trombo .....	10
3. OBJETIVOS .....	11
4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	11
4.1. Muestras .....	11
4.2. Extracción ADN de trombos .....	13
4.2. Extracción ADN de sangre.....	14
4.3. Cuantificación del ADN.....	15
4.4. PCR en tiempo real (q-PCR).....	15
5. RESULTADOS .....	17
5.1. Extracción ADN de trombos .....	17
5.1.1. Kit de <i>NucleoSpin® BloodQuickPure</i> .....	17
5.1.2. Kit de <i>illustra™ DNA Extraction kit BACC3</i> . .....	18
5.2. Extracción ADN de sangre.....	22
5.3. Resultado q-PCR .....	23
6. DISCUSIÓN .....	23
7. CONCLUSIONES .....	26
8. BIBLIOGRAFÍA.....	27

## 1. RESUMEN

**Introducción:** El accidente de la placa aterosclerótica, consistente en la ruptura, erosión o disección que resulta en la formación de un trombo intraluminal en una o más arterias coronarias que dando lugar al Infarto Agudo de Miocardio (IAM). El tratamiento indicado en este contexto es la reperfusión urgente, fundamentalmente la de tipo mecánica como la angioplastia primaria. Se han identificado múltiples factores posibles predictores de los diferentes síndromes coronarios agudos pero los mecanismos moleculares y celulares implicados en la oclusión trombótica en el IAM no son totalmente conocidos. Por este motivo en los últimos años se ha planteado la hipótesis de que la infección crónica puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que se han hallado diversos microorganismos presentes en los trombos de pacientes con IAM.

**Objetivos:** Diseñar el método para la detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de pacientes con IAM.

**Métodos:** Los métodos incluyeron la utilización de dos kits de extracción de ADN para trombos el *NucleoSpin® Blood* y el *QuickPure illustra™ DNA Extraction kit BACC3* y de un tercer kit para la extracción de ADN de las muestras de sangre, el *kitGentra® Puregene®*.

**Resultados:** Con el kit *NucleoSpin® Blood* las concentraciones eran altas pero ninguna de buena calidad. Con el kit *QuickPure illustra™ DNA Extraction kit BACC3* se analizaron dos muestras siguiendo el protocolo específico para tejidos, ambas muestras daban concentraciones de ADN bajas y con una calidad pobre. Con el protocolo específico para sangre y cultivos celulares de este mismo kit se analizaron 124muestras.

**Conclusiones:** El mejor kit para la extracción de ADN procedente de trombos de pacientes con IAM es el Kit de *illustra™ DNA Extraction kit BACC3*. El protocolo con mejores resultados es el protocolo para BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50µL-1mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares. Realizar una optimización de los protocolos, en este caso de extracción de ADN es fundamental para llevar a cabo un proyecto de investigación. Es importante realizar un estudio para confirmar la presencia de microorganismos en el trombo coronario ya que de demostrarse esta teoría se podría mejorar la terapéutica del IAM.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Definición de Infarto Agudo de Miocardio (IAM)

La enfermedad coronaria es la causa más frecuente de muerte en todos los países del mundo. Más de 7 millones de personas mueren cada año como consecuencia de la cardiopatía isquémica, lo que corresponde a un 12,8% del total de mortalidad (Steg *et al* 2013).

La cardiopatía isquémica es un síndrome en el que se produce un desequilibrio entre la oferta y la demanda de sangre, debido a la arterosclerosis derivada de la oclusión, completa o parcial, de una arteria coronaria que prolongada en el tiempo, provoca la falta de oxigenación del miocardio dando lugar al conocido síndrome coronario agudo, como puede ser una angina inestable o el IAM (Anversa *et al* 1995).

La definición de consenso internacional actual especifica que el término " infarto agudo de miocardio" debe usarse cuando haya evidencia de necrosis miocárdica en un contexto clínico consistente con isquemia miocárdica (Thygesen *et al* 2007).

Atendiendo a esta definición cualquiera de los siguientes criterios cumplen el diagnóstico de IAM (Steg *et al* 2013):

- Detección de un aumento o descenso de los valores de biomarcadores cardíacos, con al menos uno de los valores por encima del percentil 99 del límite de referencia superior y al menos uno de los siguientes parámetros:

- Síntomas de isquemia.
- Cambios significativos en el segmento ST del electrocardiograma (ECG) nuevos o presumiblemente nuevos, o bloqueo de rama izquierda nuevo.
- Desarrollo de ondas Q patológicas en el ECG.
- Evidencia por imagen de pérdida de miocardio viable de nueva aparición o anomalías regionales en la motilidad de la pared de nueva aparición.
- Identificación de un trombo intracoronario mediante angiografía o autopsia.

- Muerte cardíaca con síntomas sugestivos de isquemia miocárdica y cambios del ECG presumiblemente nuevos, o bloqueo de rama izquierda nuevo, dicha muerte tiene lugar

antes de que se produzca liberación de los biomarcadores cardíacos sanguíneos o antes de que estos valores hayan aumentado.

- Trombosis intra-stent cuando se detecta por angiografía coronaria o autopsia en el contexto de una isquemia miocárdica y con aumento o descenso de los valores de biomarcadores cardíacos, con al menos unos de los valores por encima del percentil 99 del límite de referencia superior.

Dentro del IAM diferenciamos dos tipos: i) el IAM con elevación del segmento ST (IAMCEST) que se define como una persistencia de dolor torácico en reposo con una nueva o presuntamente nueva elevación del segmento ST, y ii) el IAM sin elevación del segmento ST definido como el dolor torácico prolongado con cambios del segmento ST dinámicos y un nivel de troponina T por encima del límite superior (0,1 mg / L) (Maier *et al* 2004). El IAM sin elevación del segmento en los últimos años ha ido en aumento mientras que la incidencia de IAMCEST parece ir declinando (Roger *et al* 2012). Esta disminución de la incidencia se debe principalmente a factores como el aumento de la terapia de resperfusión, intervención coronaria percutánea primaria, tratamiento antitrombótico moderno y tratamiento de prevención secundaria.

### **2.1.1. Trombo Intracoronario**

El IAMCEST generalmente causado por la oclusión trombótica de una arteria coronaria debido a la erosión o ruptura de una placa aterosclerótica, es la principal causa de muerte en el mundo occidental (Silvain *et al* 2011).

A lo largo de los últimos años se han llevado a cabo múltiples estudios que analizan la composición de los trombos procedentes de pacientes con IAMCEST, tanto desde un punto de vista histológico como su caracterización proteómica. Los estudios que analizan su composición histológica, concluyen que el trombo intracoronario se compone principalmente de plaquetas y fibrina además de los restos de la placa aterosclerótica (Barba *et al* 2011). Las fibras de fibrina son el principal componente de los trombos, lo que representa más de un 60% de su composición. Las plaquetas, eritrocitos, cristales de colesterol y leucocitos representan el 40% restante (Figura 1). Los trombos más frescos están formados principalmente por plaquetas mientras que la proporción de fibras de fibrina aumenta con el paso del tiempo, dando lugar a trombos más ricos en fibrina y disminuye la proporción de plaquetas. Además se ha demostrado que la composición de los

trombos en sí parece ser un marcador pronóstico y está vinculado a la mortalidad tanto a corto como a largo plazo en el IAMEST (Silvain *et al* 2011).

Un estudio más reciente, ha resaltado la importancia biológica que implica la caracterización proteómica del trombo, ya que puede contribuir a una mejor comprensión de los mecanismos implicados en el síndrome coronario agudo, y así facilitar la identificación de nuevas dianas terapéuticas que pueden ayudar a hacer frente a esta y otras enfermedades trombóticas. En este estudio mediante la combinación de espectrometría de masas junto con técnicas de cromatografía, han identificado unas 708 proteínas en el trombo. Se ha descrito un subgrupo de proteínas implicadas directamente en la expresión del trombo, entre las que cabe destacar la fermitina-3 (FERM3), la miosina-9 (MYH9), la trombospondina 1 (TSP1), la beta-parvina (PARVB) y la Rap1b. Además se ha establecido una correlación directa entre estas cinco proteínas con CD41 señalando la activación potencial de una vía de adhesión focal dentro de las plaquetas del trombo durante la formación del mismo. Por otro lado se ha visto que los niveles de la proteína DDO1, aumentaban en el plasma de pacientes con IAMCEST, constituyendo así un importante punto de partida para profundizar en el análisis de la búsqueda de biomarcadores de trombosis (Alonso-Organiz *et al* 2014).

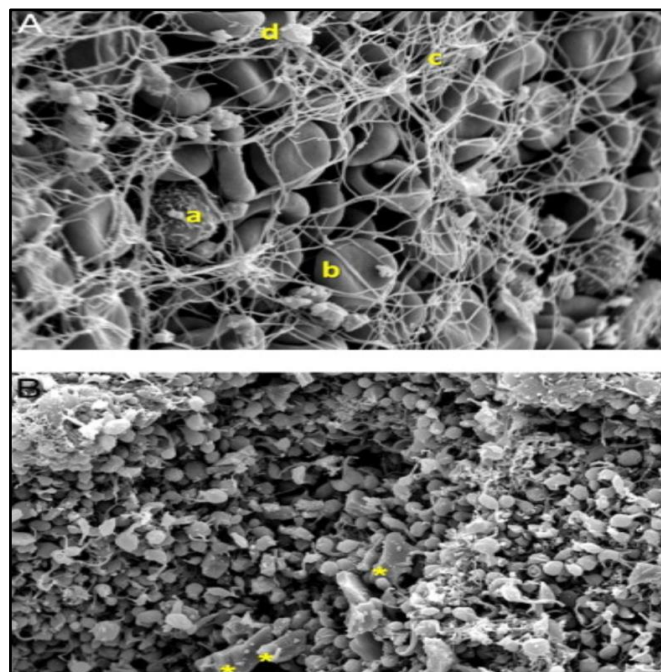


Figura 1. Imagen de microscopía electrónica de barrido de un trombo. (A) Esta porción compuesta principalmente de a) glóbulos blancos b) eritrocitos c) malla de fibrina d) agregados de plaquetas. (B) Agregados de plaquetas con cristales de colesterol (asteriscos amarillos). Adaptada de Silvain *et al* 2011.



### 2.1.2. Tratamiento

Una vez que el diagnóstico se confirme a partir de la historia clínica y el ECG se procede a la fase de tratamiento.

El tratamiento por excelencia en el IAMCEST es la reperusión del tejido miocárdico. Existen dos tipos de reperusión, la reperusión mecánica mediante angioplastia coronaria primaria y la farmacológica, mediante terapia fibrinolítica (Baz *et al* 2010). La angioplastia primaria, definida como una intervención coronaria percutánea (ICP) urgente en el contexto de IAMCEST, sin tratamiento farmacológico previo, es la estrategia de reperusión preferida en pacientes con IAMCEST, siempre que se pueda realizar de forma rápida. Esta técnica es efectiva para asegurar y mantener la permeabilidad coronaria.

Los pacientes que se someten a una angioplastia primaria deben recibir una combinación de doble antiagregación plaquetaria con aspirina, preferiblemente por vía oral, y un antagonista del receptor de adenosina difosfato (ADP) y un anticoagulante parental. Los antagonistas del receptor de ADP preferidos son el prasugrel o el ticagrelor. Ninguno de estos fármacos puede usarse en pacientes con accidente cerebrovascular hemorrágico previo o en pacientes con enfermedad hepática y todos los antagonistas del receptor de ADP deben usarse con precaución en pacientes con alto riesgo hemorrágico o con anemia significativa. Las opciones farmacológicas para la anticoagulación incluyen enoxaparina, bivalirudina y heparina no fraccionada.

En aquellos pacientes con IAMCEST a los que no se les pueda someter a una angioplastia primaria dentro de los plazos de tiempo recomendados se les aplica un tratamiento de fibrinólisis, consiste en otro tipo de terapia de reperusión basada en el suministro de fármacos para facilitar la disgregación del trombo. La desventaja es que está asociado a un aumento pequeño, pero significativo, de accidentes cerebrovasculares, y su utilización es poco frecuente (Steg *et al* 2013).

Tanto las guías europeas como norteamericanas, recomiendan la reperusión mecánica como primera opción de tratamiento en el IAMCEST, pero mantienen la indicación de la fibrinólisis en un medio extrahospitalario cuando no sea posible la aplicación de la primera (Baz *et al* 2010).



Para el tratamiento a largo plazo además de los cambios en los hábitos de vida (ejercicio, alimentación, tabaquismo,...) es importante continuar con una buena terapia farmacológica que incluye (Steg *et al* 2013):

- Fármacos antitrombóticos, como la aspirina que se debe usar de forma indefinida en todos los pacientes con IAMCEST.
- Doble antiagregación plaquetaria de 9-12 meses.
- Beta bloqueantes por vía oral.
- Tratamiento hipolipemiente mediante el suministro de estatinas.

## **2.2. Papel de la infección en el IAM**

El papel de la infección crónica en la formación de la placa de ateroma y el desarrollo de la aterosclerosis se ha visto respaldado por múltiples estudios y en la última década se ha vinculado la infección con el IAM.

### **2.2.1. Infección y aterosclerosis**

Diferentes estudios han confirmado el papel del proceso inflamatorio dentro de la placa aterosclerótica. Una vez que se activa la respuesta inflamatoria, comienza una compleja interacción entre las células, el endotelio y las moléculas de adhesión, donde los factores de crecimiento junto con las citoquinas son liberados. Este mecanismo persiste por la acción de los macrófagos que activan los monocitos y las células T, facilitando la migración de las células inflamatorias. Estos hallazgos sugieren que, aunque la inflamación parece jugar un papel importante en la transición de la aterosclerosis, es poco probable que sea la única causa (Gurfinkel 2000).

En los últimos años se ha producido un aumento en el interés por la posibilidad de que los procesos infecciosos crónicos puedan contribuir a la progresión inicial de la aterosclerosis, ya que los mecanismos moleculares y celulares implicados no están totalmente claros.

Durante la década de los 70 se publicaron los primeros estudios que apoyan la posible implicación del papel de la infección en la aterosclerosis, donde los investigadores Minick y Fabricant con sus trabajos, demostraron que un herpes virus de tipo aviar, causaba múltiples lesiones en las arterias de pollos y que la infección *in vitro* de células de músculo liso con el mismo virus, aumentaba la acumulación de colesterol (Minick *et al* 1979,

Fabricant *et al* 1983). A partir de esta teoría se extendió el paradigma de la infección/aterosclerosis a los seres humanos.

Ya, en años posteriores, durante la década de los 90, múltiples estudios en humanos, fueron llevados a cabo mostrando la existencia de patógenos en las lesiones ateroscleróticas y la presencia de anticuerpos frente a estos patógenos. Pero a pesar de ello, todas las demostraciones se consideraron puramente observacionales sin llegar a demostrar su papel causal en la infección de la aterosclerosis. No fue hasta finales de esta década cuando en un estudio con ratas infectadas con *Citomegalovirus*, se observaron lesiones en las células endoteliales de la aorta (Epstein *et al* 2009).

A día de hoy, los principales microorganismos que se han asociado con el desarrollo de la aterosclerosis han sido *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Citomegalovirus* y varias especies del género *Streptococcus* (Libby *et al* 1997, Pessy *et al* 2013)

La infección crónica por *C. pneumoniae* y su papel en la aterosclerosis ha sido respaldada por múltiples publicaciones (Saikku 2000, Ieven *et al* 2005). Uno de los primeros estudios se publicó en el año 2000 y en él se sugiere una relación entre el alto nivel de Inmonoglobulina A (IgA) frente a la *C. pneumoniae* y pacientes con accidentes cerebrovasculares. Esto les lleva a deducir que la infección crónica o aguda en cualquier parte del cuerpo podría desempeñar un papel en la activación de la placa aterosclerótica y ser utilizado como un marcador para las poblaciones afectadas en los futuros ensayos de prevención del accidente cerebrovascular. Dicha hipótesis se ha visto reforzada con publicaciones posteriores en las que se ha establecido una posible relación directa entre el aumento de los niveles de proteína C-reactiva y la infección por este patógeno en las placas ateroscleróticas. Dicha proteína es un predictor independiente de accidente cerebrovascular y enfermedad coronaria arterial (Claiborne *et al* 2001) e incluso se sugiere que la infección de *C. pneumoniae* contribuye a eventos cerebrovasculares en pacientes con enfermedad de la arteria carótida por la formación de trombos (Vainas *et al* 2002).

Al igual que ocurre con la *C. pneumoniae*, es frecuente la presencia de *H. pylori* en las placas ateroscleróticas. Diversos estudios han establecido la posible relación entre la infección por este patógeno y el desarrollo de la placa aterosclerótica (Ameriso *et al* 2001, Francesshi *et al* 2002) (Figura 2) y un estudio más reciente ha demostrado que aquellos pacientes con seropositividad para IgA frente a *H. pylori* son más propensos a tener niveles

de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL) más altos que aquellos pacientes que han dado negativo para dicha inmunoglobulina (Izadi *et al* 2011).

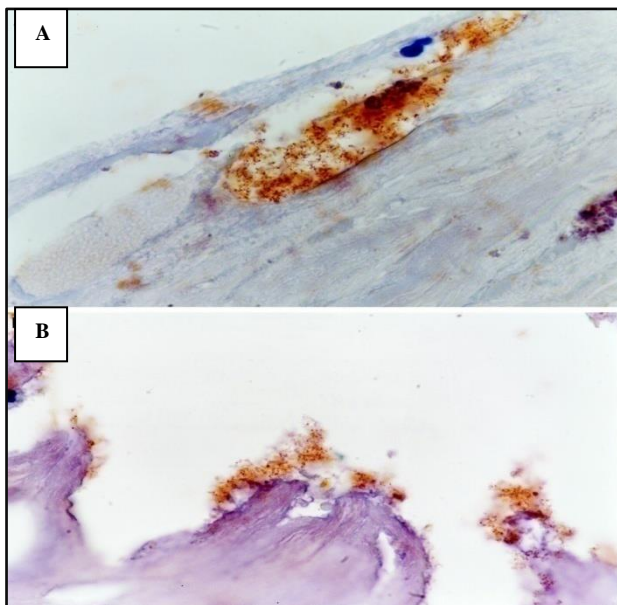


Figura 2. Inmunohistoquímica para *H. pylori*. (A) Inmunohistoquímica del patógeno en las endiduras subendoteliales. (B) Inmunodetección en la lúmina endotelial Adaptada de Ameriso *et al* 2000.

### 2.2.2. Papel de la infección en el trombo

En los últimos años se han publicado tres de los estudios que más influencia han tenido a la hora de establecer una relación entre la infección crónica y su papel en las enfermedades coronarias. Holmlund y colaboradores sugirieron que los pacientes con IAM tenían peor salud oral en comparación con los controles. Estos autores demostraron que la presencia de IgG frente a *Porphyromonas gingivalis*, un patógenos presente en infecciones bucodentales, en pacientes con IAM, estableciendo así un posible vínculo entre la salud oral y las enfermedades cardiovasculares (Holmlund *et al* 2009).

En un estudio posterior se detectaron tres especies de bacterias periodontales (*Actinobacillus* *Aggregatibacter*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*) en trombos de pacientes con IAM (Ohki *et al* 2012).

Un último estudio, detectó la presencia del patógeno *Streptococcus*, principalmente de la especie *Streptococcus viridans*, en pacientes con IAMCEST. En este estudio se analizaron muestras de sangre y de trombo, comprobando una mayor presencia del patógeno en las muestras de trombo. Además detectaron marcadores de reconocimiento de bacterias de monocitos (CD14) y macrófagos (CD68) (Pessi *et al* 2013).

Todos estos estudios apoyan la idea de un posible papel que puede desempeñar la infección bacterias con el desarrollo de la trombosis coronaria aguda.

Atendiendo a todo lo anterior, en el grupo de investigación en cardiología del INIBIC se plantea la hipótesis de que puede existir una relación entre la infección crónica por algún microorganismo y el IAM. Para poder confirmar esta hipótesis el primer paso que se debe hacer es diseñar un método que permite la detección de ADN bacteriano de trombos procedentes de pacientes con IAM.

### 3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este proyecto es diseñar el método para la detección de ADN bacteriano a partir de trombos procedentes de pacientes con IAM.

### 4. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 4.1. Muestras

Las muestras necesarias para la realización de este trabajo son muestras de sangre periférica y trombos (Figura 3) procedentes de pacientes con IAM. Las muestras utilizadas en este proyecto proceden de pacientes con IAMCEST de la unidad de hemodinámica del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC).

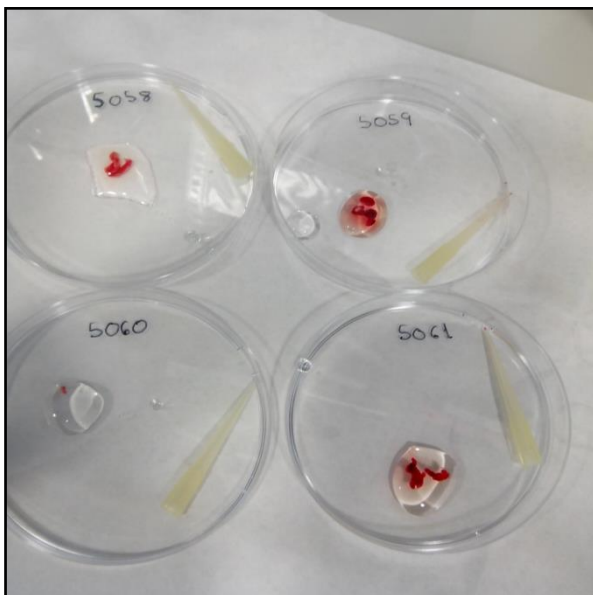


Figura 3. Trombos procedentes de pacientes con IAM del área de la unidad de hemodinámica del CHUAC.

Los trombos se han obtenido por aspiración manual. Para ello, los cardiólogos hemodinamistas utilizan los catéteres de trombectomía Export (Medtronic©) en 6 F y 7F (Figura 4), este último de mayor calibre y por tanto mayor capacidad de aspiración. El procedimiento consiste en avanzar una guía intracoronaria de 0,014" a través de la lesión trombótica y a continuación avanzar el catéter de trombectomía a través de un catéter guía y por la coronaria hasta situarlo proximal a la lesión. Una vez en esta posición se inicia aspiración manual creando vacío con una jeringa acoplada al extremo proximal del catéter y se avanza suavemente el catéter distalmente a la lesión, en el momento en el que deja de obtenerse material en la jeringa se retira el catéter de trombectomía del catéter guía y, fuera del paciente, se filtra el contenido de la jeringa y se lava el catéter a través de una pequeña cazoleta con filtro poroso y se recoge material trombótico procedente de la lesión. El procedimiento puede repetirse varias veces a criterio del operador hasta que se da por finalizado el procedimiento o, más frecuentemente, se implanta un stent coronario en la zona de la lesión. Se ha elegido esta técnica ya que diversos estudios demuestran que la aspiración manual mejora los parámetros de perfusión miocárdica, la resolución del segmento ST y el "blush" miocárdico en comparación a otros dispositivos como puede ser la angioplastia con balón o la aspiración mecánica. (Silva-Orrego *et al* 2006, Svilaas *et al* 2008). Simultáneamente, se extraen 4 mL de sangre por cada paciente, quedando recogida en tubos con el anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

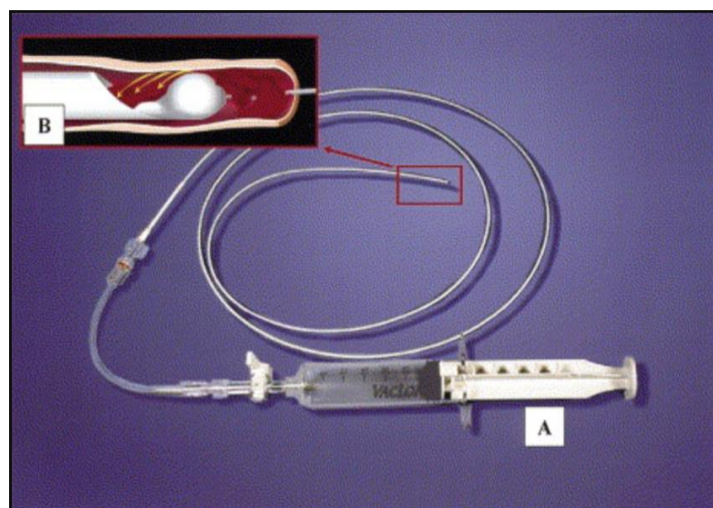


Figura 4. Catéter de trombectomía con jeringa de vacío de bloqueo proximal (A) extremo del dispositivo (B). Adaptada de Silva-Orrego *et al.* 2006.

## 4.2. Extracción ADN de trombos

Para conseguir el principal objetivo de este proyecto, diseñar un método para la detección de ADN bacteriano a partir de trombos intracoronarios, ha sido necesario optimizar la extracción de ADN a partir del trombo intracoronario y para ello se utilizaron diversos kits comerciales de extracción debido a que no existe un kit específico para la extracción de ADN de trombos.

Los Kits utilizados fueron:

a.) Kit de *NucleoSpin® BloodQuickPure*

b.) Kit de *illustra™ DNA Extraction kit BACC3*

Debido a que este trabajo se basa en el desarrollo metodológico para la detección de microorganismos en los trombos, los protocolos y las modificaciones de los mismos se detallan en el apartado de resultados.

Para este estudio cabe destacar que los trombos de los que se parte para la extracción de ADN, son de diverso tamaño que puede ir desde 0,5 micras a incluso 1 cm (Figura 5), por lo tanto esto puede influir en cada uno de los resultados.

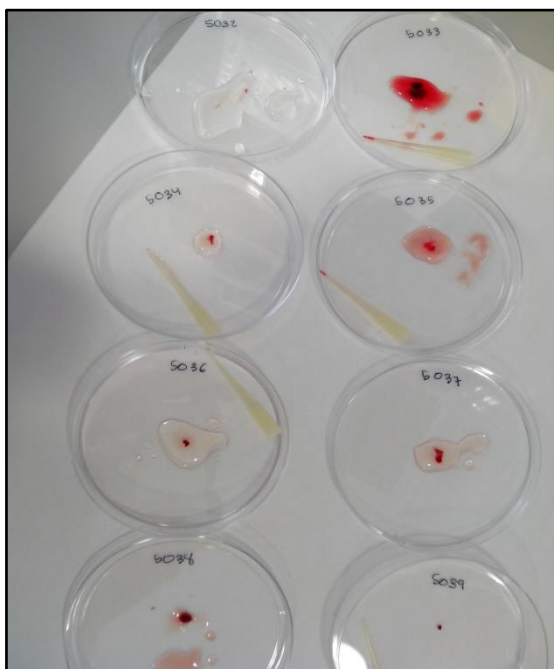


Figura 5. Trombos procedentes de pacientes con IAM del área de la unidad de hemodinámica del CHUAC.

## 4.2. Extracción ADN de sangre

La extracción del ADN a partir de sangre procedente de los pacientes con IAM y material trombótico recuperado, se lleva a cabo para comprobar que si se detecta ADN en el trombo no sea debido a una infección generalizada. Por lo tanto se analizará de manera pareada, sangre y trombo del paciente, la presencia de ADN de los microorganismos en estudio

El kit que se ha usado para la extracción de sangres ha sido *Gentra Puregene Blood Kit* (Figura 5), utilizado previamente en el laboratorio. Para ello se parte de un volumen de 3 mL de sangre y se pasan a un falcon de 15 mL, a continuación se añaden 9 mL del reactivo *RBC Lysis Solution* y se mezcla por inversión al menos diez veces. Se incuba a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se centrifuga a 2.000g durante 2 minutos. Posteriormente, se descarta el sobrenadante dejando unos 200 µL residuales con el pellet, se agita con la ayuda del "vortex" para resuspender el pellet y se añaden 3 mL del reactivo *Cell Lysis Solution* y 1 mL del reactivo *Protein Precipitation Solution*, de nuevo se agita y se centrifuga a 2.000g durante 5 minutos. En un tubo falcon nuevo de 15 mL se agregan 3 mL de isopropanol, sobre el cual se incorpora con la ayuda de una pipeta el sobrenadante obtenido en la centrifugación anterior. Se mezcla por inversión al menos 50 veces hasta que se visualice la nube de ADN. Una vez obtenida la nube, se centrifuga a 2.000g durante 3 minutos. Se descarta el sobrenadante y se añade 3 mL de etanol al 70%. Se centrifuga 1 minuto a 2.000g, se descarta el sobrenadante, se deja secar el pellet y finalmente se resuspende en 250 µL de agua-Dietilpirocarbonato (DEPC) y se deja en agitación al menos durante 3 horas antes de medir.

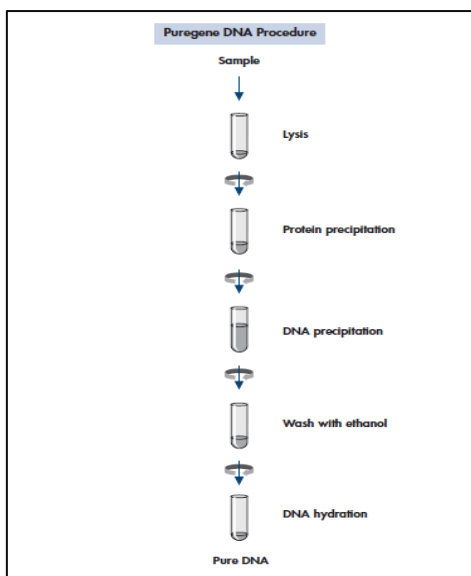


Figura 6. Pasos del protocolo de extracción de ADN genómico empleando el *kitGentra® Puregene®*.



### 4.3. Cuantificación del ADN

Una vez realizada la extracción de ADN se procede a cuantificar y a comprobar la pureza del mismo. Se lleva a cabo mediante el uso del NanoDrop, que es un espectrofotómetro de espectro total (220-750nm). La medida de la concentración es de forma directa sin necesidad de cubetas de medida. Mide la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y a 280 nm ( $A_{280}$ ). Los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm y las proteínas a 280nm (Figura 6). La relación entre ambas absorbancias ( $A_{260/280}$ ) determina la pureza del ADN a través la cual viene dada por los valores del ratio. Este último valor debe estar comprendido entre 1,8 y 2,0, un ratio mayor indica posible contaminación, generalmente por proteínas.

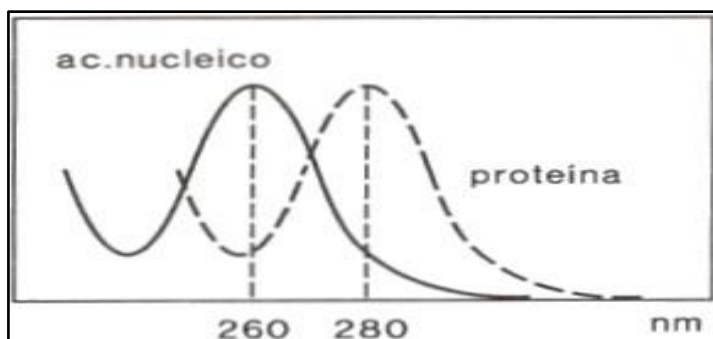


Figura 7. Absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ) que es donde los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción y a 280 nm ( $A_{280}$ ) que es el máximo de absorción de las proteínas. La relación entre ambas nos dará el grado de pureza de nuestro ADN. Adaptada de Cultek 2006.

Una vez medida la concentración de ADN se seleccionan las muestras con valores de  $>20\text{ng}/\mu\text{L}$  y un ratio  $>1,5$ . Dichas muestras se envían al departamento de microbiología del CHUAC, que mediante la técnica de PCR en tiempo real determinan la presencia o ausencia de microorganismos.

### 4.4. PCR en tiempo real (q-PCR)

El protocolo de la PCR en tiempo real que se ha aplicado es un método patentado por el grupo de Microbiología del CHUAC. El objetivo de este tipo de PCR es determinar la presencia o ausencia de uno de los microorganismos en estudio (Tabla 1) a partir de los productos obtenidos por PCR.

**Tabla 1. Microorganismos en estudio.**

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Tannerella forsythia</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Treponema denticola</i>

Como controles positivos se utilizan un Gen  $\beta$ -globina como control interno de amplificación y el producto amplificado de cada gen de estudio como control positivo de la mezcla.

En la PCR a tiempo real se utiliza el Kit *LightCycler480 Master Probes* de Roche. Los pasos a seguir se exponen a continuación:

- Se prepara una mezcla de reacción que permite determinar la presencia o ausencia del microorganismo en la muestra biológica a través de la PCR en tiempo real (q-PCR). La mezcla consta de los siguientes pasos:
  - a) Preparar stock de cebadores a 20  $\mu$ M.
  - b) Hacer la mezcla de la reacción (cantidad suficiente para un volumen final de 20  $\mu$ L por tubo):
    - ADN
    - Cebador directo (*Primer Forward*)
    - Cebador reverso (*Primer Reverse*)
    - Sonda Universal ProbeLibrary (UPL)
    - Uracil-ADN-Glicosilasa (enzima procedente de Bacalao del Atlántico (*Gadus morhua*))
    - Master Probe
    - Agua estéril
- Se establecen las características de programación siguiendo instrucciones del fabricante y modificando el número de ciclos (40) del programa de amplificación.

En determinados casos, patógenos donde se sospecha bajo inóculo en las muestras clínicas puede utilizarse 45 ciclos.

- Se analizan los Cp (*Crossing points*), con un eficacia de amplificación de 2, y se considera:
  - POSITIVO: Amplificación presentando un Cp inferior al ciclo 35.
  - INCIERTO: Amplificación presentando un Cp entre el ciclo 35 y 40. Confirmación mediante secuenciación.
  - NEGATIVO: Amplificación presentando un ciclo superior al ciclo 40 o ausencia de amplificación.

Todas las sondas y cebadores presentaron una sensibilidad y especificidad (>90%) para la identificación de patógenos en diferentes muestras clínicas.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Extracción ADN de trombos**

#### **5.1.1. Kit de NucleoSpin® BloodQuickPure**

Este kit comercial es específico para la extracción de ADN en muestras de sangre.

##### ***5.1.1.1. Protocolo optimizado para la extracción de ADN del trombo***

El primer paso a llevar a cabo es la disgregación del trombo, para ello, en tubos eppendorf de 1,5 mL y con unos 200 µL de agua-DEPC se tritura la muestra (siempre en hielo) ayudándonos de un émbolo. Una vez triturada se transfiere la suspensión obtenida a un tubo falcon de 15 mL y se añade agua-DEPC enrasando a 1 mL. Es importante que el tubo sea tan grande para facilitar la rotura celular y evitar que se produzcan agregados. Posteriormente se deja en hielo durante 2 h.

Una vez disgregado el trombo se procede con la extracción de ADN. En un tubo de 1,5 mL se añaden unos 200 µL de muestra con 25 µL de proteinasa K. A continuación se añade unos 200 µL de Buffer B3, se agita con la ayuda de un "vortex" y se incuba en termobloque a 70°C durante 15 minutos. Simultáneamente se incuba a la misma temperatura unos 130 µL de Buffer BE por cada muestra. Al tubo con la muestra se le

añade 210  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% y se agita nuevamente. En una de las columnas del nucleospin se vacía el contenido de la muestra con la ayuda de una pipeta y se centrifuga durante 1 minuto a 11.000g, se descarta el tubo y se toma uno nuevo. Se agregan 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer BW* y se centrifuga de nuevo. En otro tubo nuevo se pasa la columna, se añaden 600  $\mu\text{L}$  de *Buffer B5* y se vuelve a centrifugar 1 minuto a 11.000g. El precipitado se descarta y se centrifuga en las mismas condiciones. A continuación se pasa la columna a un eppendorf de 1,5 mL, se añaden 100  $\mu\text{L}$  de *Buffer BE*, incubado previamente a 70°C y se incuba durante 1 minuto a temperatura ambiente. De nuevo se centrifuga durante 1 minuto a 11.000g, posteriormente se descarta la columna quedándose con el precipitado. Se deja agitando unos 30 minutos para finalmente proceder con la cuantificación del ADN.

#### ***5.1.1.2. Resultados obtenidos con el kit NucleoSpin® BloodQuickPure de ADN de los trombos.***

Se analizaron dos muestras siguiendo dicho protocolo y los resultados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Concentración y ratio muestras de ADN del kit de *NucleoSpin*.**

<b>Código laboratorio</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Ratio</b>
<b>5003</b>	33,3	0,15
	30,6	0,13
<b>5020</b>	41,2	0,16
	40,8	0,14

Como se puede observar, las concentraciones de ADN obtenidas son relativamente buenas teniendo en cuenta la cantidad de muestra de la que se parte. En cambio el ratio nos indica que la calidad de la extracción ha sido pobre, sin llegar a alcanzar en ninguno de los casos un valor dentro de los parámetros adecuados (1,8-2,0).

#### ***5.1.2. Kit de *illustra™ DNA Extraction kit BACC3*.***

Este kit está indicado para la extracción de ADN a partir de tejido, muestras de sangre y cultivos celulares.

#### 5.1.2.1. Protocolo optimizado para la extracción de ADN del trombo

Se han seguido dos protocolos distintos:

- El primer protocolo a seguir es el *Nucleon HT* para la extracción de ADN de tejido.

En este caso el primer paso es la preparación de la muestra y la lisis celular. A diferencia del anterior, el disgregado del trombo se lleva a cabo de la siguiente manera. Se tritura la muestra en hielo seco en un tubo de 1,5 mL, se le añaden 350 µL de Reactivo B y se lleva a un termobloque (50°C) donde se le añaden unos 18 µL de proteinasa k y se deja incubando toda la noche. Se centrifuga durante 5 minutos a 2.000 g, se retira el sobrenadante y se transfiere a un tubo nuevo. El siguiente paso es la desproteinización para la cual se añaden 100 µL de perclorato sódico mezclando por inversión. Se extrae el ADN añadiendo 600 µL de cloroformo, se mezcla bien las fases y se le agrega 150 µL de *Nucleon resin*, se lleva a centrifugar 1 minuto a 350 g. Para la precipitación del ADN se transfiere la fase superior, sin tocar las fases restantes, a un tubo nuevo y se añaden dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcla por inversión hasta que aparezca el precipitado. Para terminar, se centrifuga 5 minutos a 14.000 g y se descarta el sobrenadante, se le añade 1 mL de etanol al 70% frío, se mezcla por inversión y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Se retira el sobrenadante, se deja secar el pellet durante 10 minutos, se resuspende en 50 µL de agua-DEPC y se lleva al agitador noria durante al menos 3 h para finalmente realizar la cuantificación del ADN.

- El segundo protocolo a seguir con este kit es el BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50 µL-1 mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares:

El primer paso a llevar a cabo es la disgregación del trombo cuyo proceso es similar al llevado a cabo con el protocolo de *NucleoSpin*. En tubos eppendorf de 1,5 mL y con unos 200 µL de agua-DEPC se tritura la muestra (siempre en hielo) ayudándonos de un émbolo. Una vez triturada se transfiere la suspensión obtenida a un tubo falcon de 15 mL y se añade agua-DEPC enrasando a 1 mL. Es importante que el tubo sea tan grande para facilitar la rotura celular y evitar que se produzcan agregados. Posteriormente se deja en hielo durante 2 h.

Una vez disgregado el trombo, se inicia el protocolo de extracción. El primer paso es el del lisado celular, para ello se le añade unos 4 mL de reactivo A al tubo falcon de 15 mL con

nuestra muestra, se lleva a un agitador noria durante 4 minutos, posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 1.300 g y se retira el sobrenadante. Se le añaden unos 350 µL del Reactivo B y se agita con la ayuda de un "vortex". A continuación se transfiere la suspensión a un tubo eppendorf de 1,5 mL. El siguiente paso es la desproteínización, para ello se añaden 100 µL de perclorato sódico y se mezcla repetidas veces por inversión. A continuación se procede con la extracción del ADN. En este paso se añaden 600 µL de cloroformo y se mezclan bien las fases para posteriormente incorporar 150 µL de Nucleon resin, se centrifuga 1 minutos a 350 g obteniéndose tres fases claramente visibles. Para continuar se sigue con la precipitación del ADN, se transfiere la fase superior, sin tocar las fases restantes, a un tubo nuevo, se añaden dos volúmenes de etanol absoluto frío y se mezcla por inversión hasta que aparezca el precipitado. Para terminar se lava el ADN, para ello se centrifuga 5 minutos a 14.000 g y se descarta el sobrenadante, se le añade 1mL de etanol al 70% frío, se mezcla por inversión y se centrifuga de nuevo en las mismas condiciones. Se retira el sobrenadante, se deja secar el pellet durante 10 minutos, se resuspende en 50 µL de agua-DEPC y se lleva al agitador noria durante al menos 3 h para finalmente realizar la cuantificación del ADN.

Las principales diferencias entre los dos protocolos del kit de *illustra* se encuentran en el paso de la preparación de la muestra y la lisis celular. En el caso del protocolo específico para tejidos la preparación de la muestra y la lisis celular se realiza en un mismo paso. En el caso del protocolo específico para sangre y cultivos celulares, el preparado de la muestra es el primer paso a realizar y posteriormente pasadas 2 horas de incubación en hielo, se procede con la lisis celular.

#### 5.1.2.2. Resultados obtenidos con el kit *illustra*<sup>TM</sup> DNA Extraction kit BACC3 de ADN de los trombos.

- Protocolo Nucleon HT para la extracción de ADN de tejido

Se analizaron dos muestras siguiendo este protocolo, los resultados se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Concentración y ratio muestras de ADN del kit de *illustra* y el protocolo Nucleon.**

<b>Código laboratorio</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Ratio</b>
<b>5007</b>	2	1,04
	2	1,03
<b>5020</b>	10,5	1,57
	10,7	1,47

En la tabla superior se muestran los resultados que se obtuvieron en la extracción de ADN con el segundo kit y el protocolo de extracción específico para tejidos. Las concentraciones de ADN que se obtienen son muy bajas al igual que ocurre con la calidad del mismo sin alcanzar los valores adecuados (1,8-2,0)

- Protocolo para BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50μL-1mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares:

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos al seguir este último protocolo.

Como se puede comprobar en la tabla, las concentraciones obtenidas varían en función de la muestra. Pero a diferencia de los dos protocolos anteriores, el ratio obtenido es mucho mayor, deduciendo así que su calidad es mejor.

**Tabla 4. Concentración y ratio muestras de ADN del kit de *illustra* y el protocolo BACC1.**

<b>Código laboratorio</b>	<b>Concentración (ng/μL)</b>	<b>Ratio</b>
<b>5001</b>	7,5	1,86
	7,3	1,45
<b>5002</b>	7,23	1,65
	7,2	1,56



<b>5004</b>	33,1	1,69
	29,9	1,64
<b>5005</b>	7,3	1,85
	7,7	1,54
<b>5006</b>	15,7	1,5
	12,5	1,57

Atendiendo a los resultados obtenidos se ha optado por emplear el kit de *illustra<sup>TM</sup> DNA Extraction kit BACC3* y seguir el protocolo para BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50µL-1mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares para la extracción de ADN de las muestras restantes. Se analizaron un total de 122 muestras y los resultados se muestran en el ANEXO I.

## 5.2. Extracción ADN de sangre

Una vez realizada la extracción de ADN de los trombos, hemos procedido a la extracción del ADN de las sangres. Se han procesado un total de 74 muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5 y las muestras restantes se han adjuntado en el ANEXO II.

**Tabla 5. Concentración de ADN y ratio de las muestras de sangre.**

<b>Código laboratorio</b>	<b>Concentración (ng/µL)</b>	<b>Ratio</b>
<b>5001</b>	664,7	1,54
<b>5002</b>	194,9	1,83
<b>5003</b>	216,5	1,73
<b>5004</b>	757,8	1,82
<b>5005</b>	185,3	1,79
<b>5006</b>	324,1	1,89

### 5.3. Resultado q-PCR

Hasta la fecha se ha comenzado con el análisis de 4 muestras en las que se ha realizado las diferentes PCR para detectar los 10 microorganismos en estudio. Los controles positivos para cada una de ellas han funcionado correctamente pero actualmente no se ha detectado ningún microorganismo en las 4 muestras de trombo analizadas.

## 6. DISCUSIÓN

En este estudio se ha optimizado el proceso de extracción de ADN procedente de trombos y posteriormente se ha llevado a cabo la extracción de ADN de las muestras de sangre correspondientes. Para la extracción del ADN de los trombos se han utilizado dos kits diferentes y se han seguido tres protocolos con el fin de conseguir una extracción lo más óptima posible. El primer Kit que se ha utilizado ha sido el *NucleoSpin® Blood QuickPure*. Este es específico para la extracción de ADN procedente de muestras de sangre, así que en un primer momento consideramos que podría ser una buena opción. Como podemos observar en la Tabla 2, los resultados no fueron los esperados. Las concentraciones que se han obtenido son altas, en cambio el ratio nos indica que la calidad de la extracción no es buena. Por este motivo se ha descartado esta posibilidad.

El siguiente kit al que se recurre es el *illustra™ DNA Extraction kit BACC3*. Este, a diferencia del anterior, permite la extracción de ADN de muestras de sangre y de ADN procedentes de tejidos. Por lo tanto hemos seguido los dos protocolos de extracción y así ver con cuál obteníamos los mejores resultados. El primer protocolo a seguir ha sido el Nucleon HT para la extracción de ADN de tejido. A la vista de los resultados del kit de *NucleoSpin*, consideramos que teniendo en cuenta la composición de los trombos, este protocolo podría ser una mejor opción. Atendiendo a los resultados de la Tabla 3, se puede ver que el ratio nos indica que la calidad de la extracción sí ha mejorado pero no es lo suficientemente buena como para continuar con el estudio, además las concentraciones obtenidas son demasiado bajas lo que impediría su posterior amplificación por q-PCR.

Los resultados obtenidos con el tercer protocolo, para BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50µL-1mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares, se exponen en la Tabla 4. El ratio nos indica que la pureza de la extracción es alta, por lo tanto la calidad es buena. En cuanto a las concentraciones existen resultados diferentes en función de la muestra. Esto se

debe al tamaño del trombo del que partimos y a la composición del mismo. Una vez visto los resultados que se han obtenido con ambos kits se ha decidido realizar las extracciones de ADN procedente de los trombos restantes con el kit *illustra<sup>TM</sup> DNA Extraction kit BACC3* y siguiendo el protocolo específico para sangres y cultivos celulares.

Actualmente solo existen dos proyectos previos que lleven a cabo la extracción de ADN de trombos procedente de pacientes con IAM (Ohki *et al* 2012, Pessi *et al* 2013), en ambos casos el kit de extracción de ADN que han utilizado ha sido el *Gentra Puregene Blood Kit*, los resultados han sido positivos, por lo que sería una buena alternativa a los kits empleados en nuestro proyecto. Sin embargo, en estos artículos no se hace referencia ni a la cantidad de ADN extraído ni a la calidad del mismo. Por lo tanto, no podemos comparar nuestros datos con los de estos estudios.

En este proyecto consideramos que es esencial una puesta a punto del protocolo de extracción para poder identificar microorganismos presentes en el trombo coronario. Hasta el momento no existe un procedimiento común y sencillo para la extracción de ADN que se pueda utilizar a gran escala para diferentes tipos de organismos. Por lo general, diferentes tipos de muestras requieren diferentes protocolos y diferentes formas de preparación (Alijanabi *et al* 1997). La comparativa entre diversos sistemas de extracción de ADN y la optimización de los mismos, se ha realizado en múltiples estudios. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Yang y su equipo, donde comparó la extracción de seis sistemas automatizados y un kit comercial para la extracción de ácidos nucleicos procedentes de patógenos respiratorios. Pudo observar, que la calidad y la cantidad obtenida era diferente con cada uno de los sistemas, concluyendo que estos diferían en la recuperación de los ácidos nucleicos, la reproducibilidad y la linealidad de una manera específica del patógeno (Yang *et al* 2011).

Por lo tanto en este TFM se ha conseguido optimizar un protocolo eficaz para la extracción de ADN de trombos intracoronarios. Es fundamental a la hora de comenzar un nuevo proyecto de investigación que los protocolos estén optimizados y normalizados para un buen desarrollo del mismo. La calidad de un proyecto de investigación depende de qué tan bien se haya logrado tanto el diseño como la ejecución de las distintas fases del proyecto. El protocolo previo al estudio que se quiere llevar a cabo, tiene que servir como un puente de unión entre todas las partes del estudio garantizando así el éxito de este. El protocolo

del estudio puede contribuir a la mejora de la investigación observacional en cuatro áreas clave, como son la integridad científica de los estudios observacionales, proporcionar una mejor documentación de estudio y unas comunicaciones más rigurosas y mayor eficiencia a lo largo de la planificación del pre-estudio (Ott 1991).

Además, se ha demostrado no solo la importancia de un buen protocolo de extracción, sino también de un protocolo de procesado de las diferentes muestras. En un laboratorio de investigación biomédica, como es nuestro caso, la sangre total ofrece una de las fuentes más comunes tanto de alta calidad como de gran cantidad de ADN para estudios de biología molecular. Se sabe que el almacenamiento de la misma a largo plazo a temperaturas por encima de los 4°C, afecta a la calidad del ADN (Richardson *et al* 2006). Lo mismo ocurre con la saliva, que es una fuente potencial para estudios genéticos y la calidad de la extracción del ADN influye directamente sobre los productos obtenidos durante la amplificación por PCR (Daniel *et al* 2004). Todos estos datos nos sugieren la importancia de partir de una buena calidad de ADN.

Una vez optimizada la extracción de ADN, un segundo paso en el proyecto será demostrar la presencia de microorganismos en el trombo y su implicación directa con el IAM. Es importante señalar que en este TFM, no solo se realizaron las extracciones de ADN de los trombos coronarios, sino que también se hizo la extracción de ADN de la sangre total de estos pacientes. Abriendo así la posibilidad de análisis de presencia de microorganismos no solo en los trombos sino en la sangre, y de este modo se podrá comprobar si la presencia/ausencia del microorganismo es única en el trombo o es debido a una infección generalizada. Si se llega a demostrar el papel de la infección crónica en el IAM, daría lugar a encontrar nuevas dianas terapéuticas, desarrollando así tratamientos más individualizados y prevenir ciertos tipos de cardiopatías. Un ejemplo que podemos extrapolar es el papel del microorganismo *H. pylori*, que es un microorganismo que está presente comúnmente en el estómago humano, en el desarrollo de úlceras peptídicas. Este descubrimiento revolucionó el tratamiento de las úlceras peptídicas y dio herramientas útiles a los clínicos para tratar a estos pacientes con antimicrobianos reduciendo así el riesgo de recurrencia de la úlcera peptídica (Nomura *et al* 2002).

En las primeras cuatro muestras analizadas no se ha detectado ninguno de los 10 microorganismos estudiados. Si se confirma, aumentando la *n* de la cohorte de pacientes, el

resultado negativo, también puede ser importante ya que apuntaría a que la infección solo tiene lugar en un subgrupo de pacientes, como en pacientes con problemas odontológicos (Ohki *et al* 2012) y por lo tanto debería centrarse la terapia antibacteriana en esos pacientes. Además se necesitarían nuevos estudios con una estrategia dirigida a ese grupo de pacientes para confirmar esta hipótesis.

## 7. CONCLUSIONES

Tras el análisis de los resultados obtenidos con dicho proyecto, podemos concluir que:

1. El mejor kit para la extracción de ADN procedente de trombos de pacientes con infarto agudo de miocardio es el Kit de *illustra<sup>TM</sup> DNA Extraction kit BACC*.
2. Dentro de este kit, el protocolo con mejores resultados es el protocolo para BACC1 para volúmenes pequeños de sangre (50µL-1mL) y  $1 \times 10^6$  a  $3 \times 10^6$  de cultivos celulares.
3. Realizar una optimización de los protocolos, en este caso de extracción de ADN es fundamental para llevar a cabo un proyecto de investigación.
4. Es importante realizar un estudio para confirmar la presencia de microorganismos en el trombo coronario ya que de demostrarse esta teoría se podría mejorar la terapéutica del IAM.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, SM., Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Alonso-Organ, S., Moreno-Luna, R., López, JA. *et al* (2014) Proteomic characterization of human coronary thrombus in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. *J Proteomics.* 109:368-381
- Ameriso, SF., Fridman, EA., Leiguarda, RC., Sevelev, GE. (2001) Detection of *Helicobacter pylori* in human carotid atherosclerotic plaques. *Stroke.* 32:385-391.
- Barba, I., Garcia del Blanco, B., Abdul-Jawad, O. *et al* (2011) MRI Discriminates Thrombus Composition and ST Resolution after Percutaneous Coronary Intervention in Patients with ST-Elevation Myocardial Infarction. *PLoS One.* 6: e18459.
- Baz, JA., Romo, AI., Fernández, EG., Peñaranda, AS., Macaya Miguel, C. (2010) Tratamiento de reperfusión en el infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST *Rev Esp Cardiol.* 10(C):12-20.
- Epstein, SE., Zhu, J., Najafi, AH., Burnett, MS. (2009) Insights into the role of infection in atherogenesis and in plaque rupture. *Circulation.* 119:3133-3141.
- Fabricant, CG., Hajjar, DP., Minick, CR., Fabricant, J. (1981) Herpesvirus infection enhances cholesterol and cholesteryl ester accumulation in cultured arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 105:176-184.
- Franceschi, F., Sepulveda, AR., Gasbarrini, A. *et al* (2002) Cross-reactivity of anti-CagA antibodies with vascular wall antigens: possible pathogenic link between *Helicobacter pylori* infection and atherosclerosis. *Circulation.* 106:430-434.
- Gurfinkel, E. (2000) Inflammation, infection, or both in atherosclerosis: the ROXIS trial in perspective. *J Infect Dis.* 181:S566-568.
- Holmlund, A., Hedin, M., Pussinen, PJ., Lerner, UH., Lind, L. (2009) *Porphyromonas gingivalis* (Pg) a possible link between impaired oral health and acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 148:148-153.
- Ieven, MM., Vicky YH. (2005) Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in Atherosclerosis: More Evidence for Lack of Evidence. *J Clin Microbiol.* 1:19-24.
- Izadi, M., Fazel, M., Sharubandi, SH. *et al* (2011) *Helicobacter* species in the atherosclerotic plaques of patients with coronary artery disease. *Cardiovasc Pathol.* 21:307-311.
- Johnston, SC., Messina, LM., Browner, WS., Lawton, MT., Morris, C., Dean, D. (2001) C-reactive protein levels and viable *Chlamydia pneumoniae* in carotid artery atherosclerosis *Stroke.* 32:2748-2752.
- LaBiche, R., Koziol, D., Quinn, TC. *et al* (2001) Presence of *Chlamydia pneumoniae* in human symptomatic and asymptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke.* 32:855-860.
- Libby, P., Egan, D., Skarlatos, S. (1997) Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. *Circulation.* 96:4095-103.
- Maier, W., Altwegg, LA., Corti, R. *et al* (2005) Inflammatory markers at the site of ruptured plaque in acute myocardial infarction: locally increased interleukin-6 and serum amyloid A but decreased C-reactive protein. *Circulation.* 111:1355-1361.
- Minick, CR., Fabricant, CG., Fabricant, J., Litrenta, MM. (1979) Atheroarteriosclerosis induced by infection with a herpesvirus. *Am J Pathol.* 96:673-706.
- Ng, DP., Koh, D., Choo, SG., Ng, V., Fu, Q. (2004) Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality genomic DNA from saliva. *Clin Chim Acta.* 343:191-194.

- Nomura, AM., Pérez-Pérez, GI., Lee, J., Stemmermann, G., Blaser, MJ. (2002) Relation between *Helicobacter pylori* cagA status and risk of peptic ulcer disease. *Am J Epidemiol.* 155:1054-1059.
- Ohki, T., Itabashi, Y., Kohno, T. *et al* (2012) Detection of periodontal bacteria in thrombi of patients with acute myocardial infarction by polymerase chain reaction. *Am Heart J.* 163:164-167.
- Ott MG. (1991) Importance of the study protocol in epidemiologic research. *J Occup Med.* 33:1236-1239.
- Pessi, T., Karhunen, V., Karjalainen, PP. *et al* (2013) Bacterial signatures in thrombus aspirates of patients with myocardial infarction. *Circulation.* 127:1219-1228.
- Richardson, AJ., Narendran, N., Guymer, RH., Vu, H., Baird, PN. (2006) Blood storage at 4 degrees C--factors involved in DNA yield and quality. *J Lab Clin Med.* 147:290-294.
- Roger, VL., Go, AS., Lloyd-Jones, DM. *et al* (2012) Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 125:188–197.
- Saikku, P. (2000) Epidemiologic association of *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: the initial serologic observation and more. *J Infect Dis.* 181:S411-3.
- Silva-Orrego, P., Colombo, P., Bigi, R. *et el* (2006) Thrombus Aspiration Before Primary Angioplasty Improves Myocardial Reperfusion in Acute Myocardial Infarction . *J. Am. Coll Cardiol.* 48:1552-1559.
- Silvain, J., Collet, JP., Nagaswami C. *et al* (2011) Composition of Coronary Thrombus in Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 57:1359-1367.
- Steg, G., James, S K., Atar, D. *et al* (2013) Guia de practica clinica de la ESC para el manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevacion del segmento ST. *Rev Esp Cardiol.* 66:53.e1-e46.
- Svilaas, T., Vlaar, PJ., Van der Horst, IC. *et al* (2008) Thrombus Aspiration during Primary Percutaneous Coronary Intervention. *N Engl J Med.* 358:557-567.
- Thygesen, K., Alpert, JS., White, HD. (2007) Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 50:2173-2195.
- Vainas, T., Kurvers, HAJM., Mess, WH. *et al* (2002) *Chlamydia pneumoniae* Serology Is Associated With Thrombosis-Related but Not With Plaque-Related Microembolization During Carotid Endarterectomy. *Stroke.* 33:1249-1254.
- Yang, G., Erdman, DE., Kodani, M., Kools, J., Bowen, MD., Fields, BS. (2011) Comparison of commercial systems for extraction of nucleic acids from DNA/RNA respiratory pathogens. *J Virol Methods.* 171:195-199.



## ANEXO I

### Concentración y ratio de las muestras de ADN procedente de los trombos

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5002	7,23	1,65	5021	11,6	1,53
	7,2	1,56		10,7	1,61
5004	33,1	1,69	5022	7,8	1,75
	29,9	1,64		7,4	1,73
5005	7,3	1,85	5023	117,9	1,7
	7,7	1,54		110,4	1,79
5006	15,7	1,5	5024	30	1,6
	12,5	1,57		30,1	1,65
5008	14,6	1,6	5025	33,6	1,73
	14,5	1,56		34,4	1,72
5009	7	1,54	5026	64,8	1,63
	7,3	1,34		65,4	1,7
5011	36,1	1,66	5027	4,1	1,07
	27	1,74		3,5	1,2
5012	13,6	1,69	5028	20,3	1,68
	9,4	1,86		18,8	1,91
5014	3,3	2,31	5029	2,5	1,37
	2,9	1,14		3,1	1,49
5015	6,2	1,66	5030	9,4	1,68
	5,8	1,54		9,1	1,68
5016	6,6	2,22	5031	80,7	1,11
	6,6	2,05		67,8	1,15
5017	186,9	1,8	5032	4,4	1,68
	182,9	1,81		2,4	1,66
5018	2,8	1,58	5033	400,9	1,71
	5,2	1,16		370,9	1,78
5019	24,8	1,66	5034	9,8	1,66
	25,5	1,53		9,6	1,24

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5035	14,1	1,52	5050	8,1	1,73
	15,1	1,66		7,6	2,1
5036	27,1	1,33	5051	38,4	1,82
	28,2	1,32		30,3	1,78
5037	35,2	1,45	5052	4,4	1,58
	26,9	1,56		3,5	1,34
5038	43,7	1,79	5053	2,5	2,77
	44,8	1,79		2,2	2,36
5039	3,5	1,19	5054	148	1,83
	3,5	1,2		146,6	1,83
5040	3,1	1,49	5055	23,3	1,97
	2,5	1,03		23,3	1,87
5041	7,4	1,37	5056	29,3	1,84
	7,5	1,25		27,7	2,1
5042	29	1,71	5058	33,4	1,72
	25,4	1,8		38,8	1,61
5043	190,6	1,82	5059	395,5	1,77
	178,6	1,82		308,3	1,83
5044	4,8	2,56	5061	392,3	1,8
	5	1,49		395,1	1,8
5045	1443,9	1,83	5062	7	1,52
	1349,6	1,8		6,7	1,69
5046	330,4	1,79	5063	4,7	1,6
	386,8	1,73		5,3	1,62
5047	77	1,74	5064	26,3	1,74
	76,4	1,75		25,8	1,75
5048	320,9	1,79	5065	6,2	1,78
	268,2	1,84		6,2	1,71
5049	33,8	1,79	5066	14,6	1,62
	33,4	1,88		13,7	1,88

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5068	14,9	1,47	5094	36,4	1,79
	14,4	1,56		36,2	1,88
5069	50,1	1,77	5095	27	1,83
	50,4	1,77		24,4	1,81
5070	21,6	1,92	5096	177,1	1,82
	22,4	1,84		130,6	1,86
5071	4,6	1,93	5097	83,9	1,78
	4,2	2,31		86,9	1,79
5072	56,6	1,85	5098	32,8	1,75
	67,7	1,74		38,5	1,64
5073	4,4	1,24	5099	11	2,11
	4,6	1,96		10,9	1,95
5074	13,3	2,51	5100	6,5	1,2
	11,8	2,5		7,2	1,16
5077	9,7	1,7	5102	489,4	1,77
5079	7,4	1,85		481,7	1,77
5080	5	1,67	5103	9,1	1,51
5081	37,3	1,88		7,5	1,33
5082	13,9	2,07	5104	3,1	1,44
5084	4,9	2,04		2,9	1,39
5086	14,5	1,55	5105	9,6	1,01
	15,1	1,6		6,8	1,14
5087	8,5	1,93	5106	9,9	1,24
	7,2	1,86		8,5	1,45
5090	35	1,73	5107	11,4	1,6
	32,9	1,74		7	2
5091	13,6	1,51	5108	10,7	3,02
	10,9	1,5		11	2,79
5092	149,9	1,8	5109	15,8	2,22
	145,7	1,8		14,7	2,21
5093	12,1	1,68	5111	27,5	1,96
	11,2	1,85		28,1	2

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5112	3,9	5,6	5134	45,5	1,78
	3,2	-7,2		68,8	1,7
5113	47,6	1,97	5135	248,2	1,79
	47,8	1,92		236,4	1,79
5116	41,5	1,75	5136	7,5	1,89
	41,8	1,85		9,3	2
5117	8,4	1,57	5137	6,7	3,22
	7,7	1,42		10,3	3,06
5118	11	1,8	5138	35,9	1,92
	11	1,75		38,9	1,75
5119	75,9	1,77	5139	3,5	2,8
	75	1,75		3,3	1,94
5120	602,8	1,75	5140	31,1	1,72
	463,8	1,78		29,6	1,72
5121	740,2	1,83	5141	98,4	1,88
	1083,3	1,83		108	1,82
5123	51,7	1,87	5142	10,8	1,79
	56	1,72		11,1	1,98
5124	38,2	1,74	5143	3,9	2,01
	35,2	1,86		3,7	2,04
5125	5,1	1,47	5144	5,3	2,71
	4,7	1,67		5,2	1,63
5126	10,5	1,77	5146	21,5	1,34
	8,1	1,99		23	123
5127	5,7	1,6	5147	5,8	1,44
	8,1	1,67		5,5	1,46
5128	160,4	1,84			
	158,6	1,83			
5132	49,9	1,77			
	50,9	1,86			
5133	138,4	1,75			
	125,4	1,82			

## ANEXO II

### Concentración y ratio de ADN procedente de las muestras de sangre

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5001	664,7	1,54	5030	96,9	1,79
5002	194,9	1,83		81,5	1,77
5003	216,5	1,73	5031	125,3	1,82
5004	757,8	1,82	5033	1009,4	1,67
5005	185,3	1,79	5035	293,6	1,8
5006	324,1	1,89		306,9	1,81
5007	122,6	1,75	5036	534	1,62
5008	234,4	1,81	5037	29,2	1,96
	251,7	1,79	5038	1872	1,64
5010	806,8	1,75	5042	1370,2	1,57
5011	361,5	1,81	5043	384,6	1,5
5012	182,5	1,8	5045	627,2	1,54
	199,8	1,79	5046	254,3	1,56
5017	46,4	1,95	5047	217,4	1,62
5019	695,8	1,78	5048	613,3	1,57
	680	1,82	5049	101,8	1,74
5020	555,4	1,79	5051	615,6	1,57
	542,3	1,78	5054	335,6	1,73
5021	184,5	1,8	5055	262,9	1,91
	199	1,79	5059	163,5	1,76
5023	448,8	1,7		157,8	1,81
	450	1,72			
5024	87,2	1,79	5061	303	1,78
	91,1	1,78		261,5	1,79
5025	69,1	1,62	5064	8,3	1,09
	78,5	1,58		9	1,2
5026	203,8	1,81	5066	355,5	1,8
	110,9	1,8		350,1	1,79
5028	179,5	1,93	5068	210	1,59

Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio	Código laboratorio	Concentración (ng/μL)	Ratio
5069	124,9	1,6	5102	204,7	1,85
	327,3	1,61		261,8	1,8
5070	519,7	1,77	5111	414,9	1,79
	633,9	1,84		417,9	1,78
5072	206,1	1,79	5116	118,7	1,77
	102,7	1,81		175,4	1,61
5074	86,6	1,83	5118	4,2	2,23
5086	119,8	1,83		4	2
	139,7	1,83	5119	309,8	1,82
5087	97,6	1,83		313,6	1,82
	99,5	1,8	5120	366,8	1,85
5090	106,7	1,83		365,3	1,83
	108,1	1,82	5121	15,8	1,95
5091	99,1	1,88		15,2	2
	101,2	1,85	5123	4,5	1,72
5092	196,9	1,82		3,7	1,8
	181,9	1,84	5124	46,3	1,84
5093	157,7	1,79		44,9	1,87
	143,9	1,78	5128	16,2	1,95
5094	108,2	1,84		16,6	1,89
	115,2	1,79	5132	442,3	1,8
5095	262,8	1,8		477	1,77
	362,4	1,8	5133	566,7	1,76
5096	276,8	1,81		653,7	1,8
	281,6	1,82	5134	236,1	1,79
5097	264	1,8		256	1,79
	273,1	1,79	5135	402,7	1,81
5098	359,3	1,8		390	1,8
	399,4	1,79	5138	273,5	1,84
5099	334,5	1,76		370,1	1,8
	342,4	1,76	5140	223,9	1,83

A mis tutoras la Dra. Lucía Núñez y la Dra. Natalia Suárez, por sus conocimientos y apoyo todos estos meses.

A mis padres, que aunque suene a cliché, todo lo que he conseguido y soy se lo debo a ellos y volvería a escogerlos una y mil vidas más.

No puedo olvidarme de una de las personas más importantes en mi vida, Javi por creer en mí todo este tiempo, sin él nada sería lo mismo.

Como última mención a mis amigos, Grecia, por ser una compañera incondicional durante todo el camino. A los mejores compañeros de máster que se pueden tener, nadie mejor que ellos entienden este logro y a mis geniales amigas y compañeras de piso, que han hecho de estos dos años recuerdos imborrables.

A todos vosotros por siempre estar ahí, GRACIAS.