



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

BIOQUÍMICA CLÍNICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE RNAm DE GENES
RELACIONADOS CON LA CALCIFICACIÓN E INFLAMACIÓN EN
TEJIDO ADIPOSEO EPICÁRDICO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

MARÍA DE JESÚS LUNA LUNA

TUTOR: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formar parte de su gran familia.

Al Posgrado en Ciencias médicas, odontológicas y de la salud por darme la oportunidad de continuar mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 341023 otorgada durante mis estudios de maestría

Al jurado asignado, por sus observaciones al presente trabajo y su contribución en el enriquecimiento de éste.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que me ha regalado el don de la vida, por estar conmigo en mis momentos de dolor y de alegría...

Nada te turbe, nada te espante;
todo se pasa, Dios no se muda;
la paciencia todo lo alcanza.

Quien a Dios tiene, nada le falta:
sólo Dios basta.

Eleva el pensamiento, al cielo sube,
por nada te acongojes.

Nada te turbe, a Jesucristo sigue
con pecho grande,
y venga lo que venga, nada te espante.

¿Ves la gloria del mundo?
es gloria vana, nada tiene de estable,
todo se pasa.

Aspira a lo celeste que siempre dura;
fiel y rico en promesas, Dios no se muda.

Confianza y fe viva mantenga mi alma,
que quien cree y espera, todo lo alcanza.

Del infierno acosado aunque se viere,
burlará sus furios quien a Dios tiene.

Vengan desamparos, cruces, desgracias,
siendo Dios tu tesoro, nada te falta.

Id, pues, bienes del mundo,
id, dichas vanas,
aunque todo lo pierda,

¡sólo Dios basta!

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por luchar cada día por mí, por su amor incansable y su valor incomparable!!!.

A mi padre por el apoyo brindado.

A mi hermana, Mayra, por ser mi heroína, mi amiga, mi ejemplo. Gracias May porque sin tu apoyo esto no sería posible.

A mi hermano, por recordarme que en medio de la tempestad se puede seguir soñando y ser feliz.

A mi comadre y amiga Eli, por el conocimiento, las experiencias, los abrazos y el cariño compartido, por el gran regalo que es Valentina. ¡Te quiero güera!

Mi querido doctor Óscar, jamás estará de más decirte que te quiero, que eres una bendición en mi vida y que agradezco cada día que nuestros caminos se hayan cruzado. Gracias por compartir tu conocimiento y experiencia, por creer en mí e impulsarme a ser más de lo que yo misma creo que puedo ser. Gracias por escucharme, por brindarme un abrazo en mis momentos de alegría, de dolor, de incertidumbre. Las palabras no me alcanzarían para agradecerte todo lo que has hecho por mí, así que sólo diré: ¡Te Quiero!

A mis amigos de laboratorio:

Vicky, por brindarme tu cariño, porque en medio de las diferencias, el amor siempre está. Cristóbal (el señor doctor profesor Jr), por la asesoría estadística, por escucharme, por los consejos dados y las alegrías compartidas.

Miriam, por compartir conmigo la presencia de un Dios poderoso, por los ánimos, la escucha y los consejos brindados.

A mis súper amigas Coral y Sara, porque sin ustedes mi vida estaría incompleta, gracias por estar en el momento que más las he necesitado, gracias por cada abrazo, por cada lágrima que sus manos secaron, por las carcajadas que nos dejaron sin aliento, gracias.

A mis mejores amigas Rosita y Lupita por preocuparse por mí, por cuidarme y apoyarme, porque son el regalo más grande que Dios me ha dado en la iglesia. Porque "juntas en oración, nuestro corazón se hace uno con Dios".

AGRADECIMIENTOS

Porque las verdaderas amistades se construyen día a día y no importa el tiempo y la distancia, gracias mi muy amada amiga y confidente Areli, siempre has estado presente y me alegra sentirte muy cerca de mí.

A mis amigos y compañeros de la Maestría: mi súper amiga Paty, Filio, Edgar, Sandra y Yanelli.

A todas las personas que han estado presentes durante la elaboración de este proyecto: Juan (mi "individuo"), Mario, Ezequiel (el "vaquero marlboro"), Selene, señor Juan, Jorge, Karla, Iván, América y Claudia, gracias por su presencia.

A tí, porque sin pensar lo que sucedería has estado presente, gracias por los abrazos dados y las experiencias compartidas. En la lejanía o cercanía te recuerdo con mucho cariño.
¡Te quiero!

“Cuando quieres algo, todo el Universo conspira para que realices tu sueño”

ÍNDICE

Tema	Página
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC)	3
Calcificación de la placa aterosclerosa	5
Osteopontina (OPN)	6
Osteonectina (ON)	9
Osteoprotegerina (OPG)	11
Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	13
Tejido adiposo epicárdico (TAE)	14
Características generales	14
TAE y aterosclerosis	15
TAE y calcificación de la placa aterosclerosa	19
Lipoproteínas de alta densidad (HDL)	19
Justificación	23
Hipótesis	24
Objetivos	25
Objetivo general	25
Objetivos particulares	25
Métodos	26
Pacientes	26
Obtención de muestras sanguíneas	26
Análisis de laboratorio	26
Caracterización de las HDL	27
Aislamiento y análisis de los lípidos de HDL	27
Tinción enzimática de colesterol total de las subpoblaciones de HDL	27
Tinción enzimática de colesterol libre de las subpoblaciones de HDL	29

Tinción enzimática de fosfatidilcolina de las subpoblaciones de HDL	29
Tinción enzimática de triacilgliceroles de las subpoblaciones de HDL	30
Determinación de la concentración plasmática de los lípidos de las subpoblaciones de HDL	31
Determinación de la presencia de aterosclerosis	32
Muestras de tejido adiposo epicárdico	33
Extracción de RNA total	33
Retrotranscripción	34
Ensayos de expresión	34
Cuantificación relativa por curva estándar	34
Análisis estadístico	34
Resultados	36
Discusión	43
Conclusión	49
Perspectivas	49
Apéndices	50
Determinación de CT, TG y G por métodos enzimáticos colorimétricos en plasma	50
Determinación de la concentración de CT, TG, PH, y CL de HDL	51
Retrotranscripción	53
Cuantificación relativa por curva estándar	54
Bibliografía	55

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1.- Formación de la placa aterosclerosa	4
Figura 2.- Estructura proteínica de OPN	7
Figura 3.- Estructura proteínica de ON	10
Figura 4.- Papel patofisiológico del TAE en el desarrollo de la placa aterosclerosa	17
Figura 5.- Estructura de las HDL	21
Figura 6.- Reacción enzimática para la determinación de colesterol total	28
Figura 7.- Separación y análisis de las HDL en gel de poliacrilamida	29
Figura 8.- Reacción enzimática para la determinación de fosfatidilcolina	30
Figura 9.- Reacción enzimática para la determinación de triacilgliceroles	31
Figura 9.- Distribución relativa determinada por la fracción proteínica de las HDL	39
Figura 10.- Cuantificación relativa con curva estándar	40
Figura 11.- Diagrama esquemático de la función de las proteínas codificadas por los genes analizados en el TAE	48
	Página
Índice de tablas	
Cuadro 1.- Datos antropométricos y parámetros bioquímicos evaluados en plasma	36
Cuadro 2.- Concentración de las diferentes especies de lípidos asociados a las HDL	37
Cuadro 3.- Cocientes colesterol/fosfatidilcolina y triacilgliceroles/fosfatidilcolina de las subpoblaciones de HDL en controles y pacientes con EAC	38
Cuadro 4.- Análisis de correlación simple de Spearman de la expresión génica y la proporción relativa y concentración de lípidos de las subpoblaciones de HDL	41
Cuadro 6.- Resumen de la Regresión lineal por pasos sucesivos	20
Cuadro 7.- Relación de la presencia de ateroma, con la expresión de los genes	42

ABREVIATURAS

ALP	Fosfatasa Alcalina
Apo	Apolipoproteína
BMP	Proteína morfogenética ósea
C-HDL	Colesterol de HDL
C-LDL	Colesterol de LDL
CE	Colesterol esterificado
CL	Colesterol libre
CT	Colesterol total
EAC	Enfermedad aterosclerosa coronaria
EGF	Factor de crecimiento endotelial
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
G	Glucosa
GAPDH	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
IDL	Lipoproteínas de densidad intermedia
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MGP	Proteína de matriz Gla
MMP	Metaloproteínasa

NF- κ B	Factor nuclear κ B
OPN	Osteopontina
ON	Osteonectina
OPG	Osteoprotegerina
PAI	Inhibidor del activador de plasminógeno
PBS SSI	Buffer de fosfatos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PH	Fosfatidilcolina
RANK	Receptor activador del NF- κ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
Ser	Serina
sPLA2-IIA	Fosfolipasa A2 secretada tipo IIA
SSI	Solución salina isotónica
TAE	Tejido adiposo epicárdico
TAS	Tensión arterial sistólica
TG	Triacilgliceroles
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Thr	Treonina
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor del TNF
TRAIL	Ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF

TRC	Transporte reverso del colesterol
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad

RESUMEN

El tejido adiposo epicárdico (TAE) podría actuar como tejido paracrino expresando genes que codifican proteínas que participan en el desarrollo y calcificación de las placas aterosclerosas. Proteínas pro-calcificantes como osteopontina (OPN) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), y anti-calcificantes como osteonectina (ON) y osteoprotegerina (OPG) podrían estar asociados en este proceso. Por otra parte, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) podrían retardar la calcificación arterial promoviendo la expresión de OPG y ON.

En este estudio postulamos que el TAE tiene una mayor expresión de RNAm de genes pro-calcificantes en pacientes con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC), y que dicha expresión está relacionada con las subpoblaciones de HDL.

Determinamos la expresión del RNAm de los genes que codifican para *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* en TAE de pacientes con EAC cuyas lesiones fueron determinadas por coronariografía, y pacientes estenosis valvular aórtica (controles) sin lesiones aterosclerosas. Determinamos además la distribución relativa y composición lipídica de las subclases de HDL.

El TAE de los pacientes con EAC expresó dos veces más *OPN* y *OPG* y 33% menos del *TNF- α* comparado con los controles. La distribución de las subpoblaciones de HDL presentó un desplazamiento hacia partículas grandes tipo HDL2b. La proporción relativa de las HDL3b fue el mejor predictor independiente de la expresión de *ON* ($\beta=0.493$, $P=0.011$) mientras que para el *TNF- α* fue el colesterol esterificado de las HDL3a ($\beta=0.398$, $P=0.044$). Finalmente, niveles de expresión de RNAm de *OPN* > 1.21, correlacionaron con la presencia de aterosclerosis (Exp (B)= 12.782, IC=1.178-138.644, $P= 0.036$).

El TAE es una fuente de expresión de RNAm *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* , sólo la *OPN* presentó una relación positiva con la presencia de aterosclerosis. La correlación entre la expresión de los genes y las HDL sugiere que estas partículas también podrían mediar el proceso de calcificación.

ABSTRACT

Epicardial adipose tissue (EAT) could function as a paracrine tissue expressing genes that encodes proteins related with the pathogenesis and calcification of atherosclerotic plaques. Genes of pro-calcifying proteins such as osteopontin (OPN) and the tumoral necrosis factor α (TNF- α); and anti-calcifying genes such as osteonectin (ON) and osteoprotegerin (OPG) may be associated with this process. Moreover, high density lipoprotein (HDL) could retard the arterial calcification promoting the expression of OPG and ON.

We postulated that EAT over expresses mRNA of pro-calcifying genes in patients with coronary atherosclerotic disease (CAD) and the expression of these genes is related with the composition and distribution of subclasses HDL.

The expression of mRNA *OPN*, *ON*, *OPG* and *TNF- α* was determined in EAT of patients with CAD whose atherosclerotic lesions were determined by coronary angiography and patients with aortic valve stenosis (controls) without atherosclerotic lesion. The HDL were characterized by sequential ultracentrifugation and polyacrylamide gels under non-denaturing conditions.

EAT obtained from CAD patients expressed twice mRNA of *OPN* and *OPG* and 33% less of *TNF- α* compared with controls. The distribution of HDL subpopulations showed a shift towards larger particles in patients as compared to controls. The relative proportion of HDL3b was the best independent predictor for expression of *ON* (β = 0.493, P = 0.011) while for *TNF- α* the best predictor was the esterified cholesterol of the HDL3a (β = 0.398, P= 0.044). Finally, the *OPN* expression levels above 1.21 was positively associated with the presence of atherosclerosis (Exp (B) = 12,782, CI = 1.178-138.644, p = 0.036).

EAT expresses the mRNA of *OPN*, *ON*, *OPG* and *TNF- α* , only *OPN* was statistically associated with the presence of atherosclerosis. The correlation between the expression of these genes and HDL suggest that these lipoproteins also participate in the regulation of the calcification process.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad Aterosclerosa Coronaria (EAC)

Las enfermedades cardiovasculares son las principales causas de muerte en México ^{1,2} y sus incidencias son cada vez mayor en adultos jóvenes. Dentro de este tipo de enfermedades se encuentra la EAC, la cual involucra una serie de eventos celulares que culminan con el desarrollo de fibrosis y calcificación, con la consecuente reducción de la luz del vaso sanguíneo que da lugar a los síntomas clínicos.

La EAC comienza con la disfunción del endotelio vascular producida como respuesta a una agresión, provocando una infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) al espacio subendotelial (1). El estrés oxidativo local (2) provoca la peroxidación de sus lípidos (3) que actúan como factores quimiotácticos (4) para monocitos circulantes³, los cuales atraviesan el endotelio vascular y se transforman en macrófagos (5) capaces de fagocitar a las LDL (6). La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y peróxidos, tienen como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa (7)⁴. Antes de morir, las células espumosas liberan una gran cantidad de citocinas (8) que estimulan al endotelio vascular para que sintetice más adhesinas (9), exacerbando así el proceso inflamatorio (10)^{5,6,7}. Las células espumosas constituyen la etapa temprana de la formación del ateroma (Figura 1).

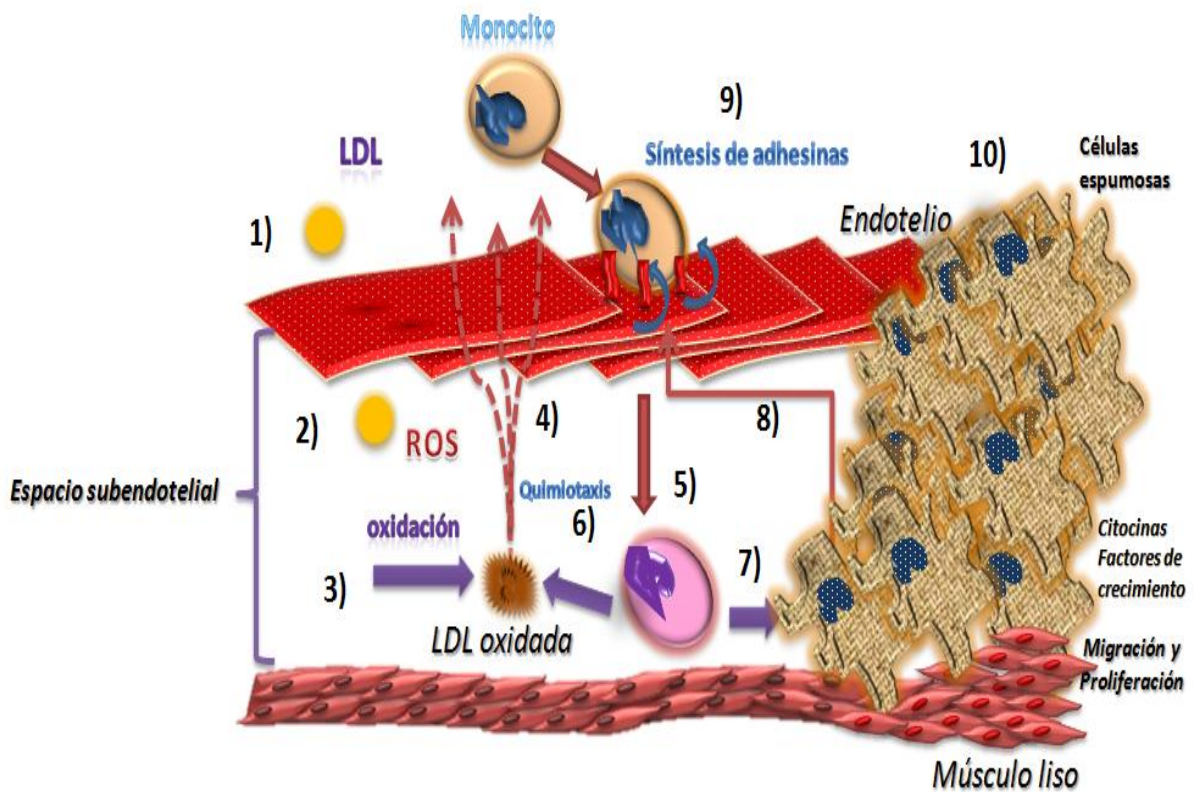


Figura 1.- Formación de la placa aterosclerosa. Los lípidos oxidados de las LDL en el espacio subendotelial son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, los cuales, atraviesan el endotelio vascular, se diferencian en macrófagos y fagocitan a las LDL oxidadas. La falta de maquinaria enzimática para degradar a estos lípidos oxidados ocasiona su acumulación en el macrófago, dando lugar, a la célula espumosa. Este proceso continua formando la estría grasa y posteriormente el ateroma.

La etapa temprana del ateroma es la formación de la estría grasa (Figura 1), una vez que ésta se forma continúa su crecimiento paulatino hasta llegar a obliterar el lumen del vaso, reduciendo el aporte sanguíneo a órganos como el corazón o el cerebro. Las placas aterosclerosas tienden a calcificarse, y conforme avanza la edad y progresa la aterosclerosis, los depósitos de calcio también se incrementan⁸. La importancia de la formación de la placa, además de reducir la lumen del vaso sanguíneo, es que puede presentar una rotura y causar un coágulo sanguíneo que ocluye la circulación y provocar un episodio vascular isquémico agudo, es decir, infarto o evento vascular cerebral.

Calcificación de la placa aterosclerosa

El calcio juega un papel clave en un amplio rango de funciones biológicas, ya sea en su forma libre o formando complejos. Una de las funciones más importantes es en la mineralización esquelética. La mayoría del calcio total del cuerpo está en el hueso (>99%) como complejos de fosfato cálcico, principalmente hidroxapatita⁹.

El calcio que no está en hueso representa <1% del calcio total; sin embargo, es responsable de una amplia variedad de funciones esenciales, incluyendo señalización extra- e intracelular, la transmisión de impulsos nerviosos y la contracción muscular^{10,11}. El intervalo de calcio sérico va de 8.8 - 10.4 mg/dL en sujetos sanos, en donde aproximadamente el 51% corresponde a calcio iónico, el 40% está unido a proteínas y el 9% forma complejos iónicos. Este calcio está unido a una amplia variedad de proteínas y aniones. Las principales proteínas de unión a calcio son la albúmina y la globulina en suero y la calmodulina y otras proteínas de unión en la célula. Los principales complejos séricos son el fosfato de calcio, el carbonato de calcio y el oxalato de calcio.

El calcio y el fosfato (fósforo inorgánico) interactúan en varios procesos fundamentales. En el esqueleto, el metabolismo del calcio y el fosfato trabajan en conjunto con osteoblastos, osteocitos y proteínas del matriz extracelular para mineralizar al osteoide. Por otro lado, hay un menor entendimiento del sistema regulador que previene el depósito perjudicial de complejos de fosfato y calcio en tejidos blandos, como en la enfermedad renal crónica en donde la calcificación de tejidos blandos es común o bien, la calcificación de los vasos sanguíneos.

En este contexto, la calcificación de la placa suele comenzar tan temprano como en la segunda década de la vida, justo después de la formación de la estría grasa¹² ocupando hasta un 20% del volumen del ateroma¹³. Los depósitos de calcio se encuentran con más frecuencia en individuos mayores y en lesiones aterosclerosas más avanzadas¹⁴.

El calcio arterial coronario es ampliamente aceptado como sinónimo de aterosclerosis; sin embargo, el mecanismo básico que inicia el proceso de calcificación es desconocido, pero parece que requiere de la apoptosis de las células presentes en la lesión, probablemente las células de músculo liso para generar cuerpos apoptóticos que actúen como sitios de

nucleación para la calcificación, inflamación, acumulación de fosfolípidos y lipoproteínas, y finalmente el depósito de hidroxiapatita⁸.

Diversos autores han propuesto que la calcificación del ateroma es un proceso activo que se asemeja a la formación de hueso, ya que se ha demostrado que la pared arterial tiene varias proteínas relacionadas con éste, incluyendo osteopontina, osteonectina y osteoprotegerina, entre otras¹⁵⁻¹⁸, y aunque las células endoteliales, células de músculo liso, macrófagos, plaquetas y linfocitos están involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis, los tipos celulares responsables de la calcificación no han sido aún dilucidados.

Osteopontina (OPN)

El gen que codifica la OPN se denomina en humanos *SPP1* (Secreted Phosphoprotein 1) y se encuentra localizado en el brazo largo región 22.1 del cromosoma 4. Su longitud es de 7762 pares de bases y cuenta con 8 exones. El gen de la *OPN* presenta “splicing alternativo” generando tres isoformas, la isoforma “a” que es la forma más larga y contiene a los 8 exones, la isoforma “b” que carece del exón 5 y la isoforma “c” que carece del exón 4. Por otro lado, la OPN sufre modificaciones postraduccionales tales como fosforilaciones y escisiones enzimáticas¹⁹ (Figura 2).

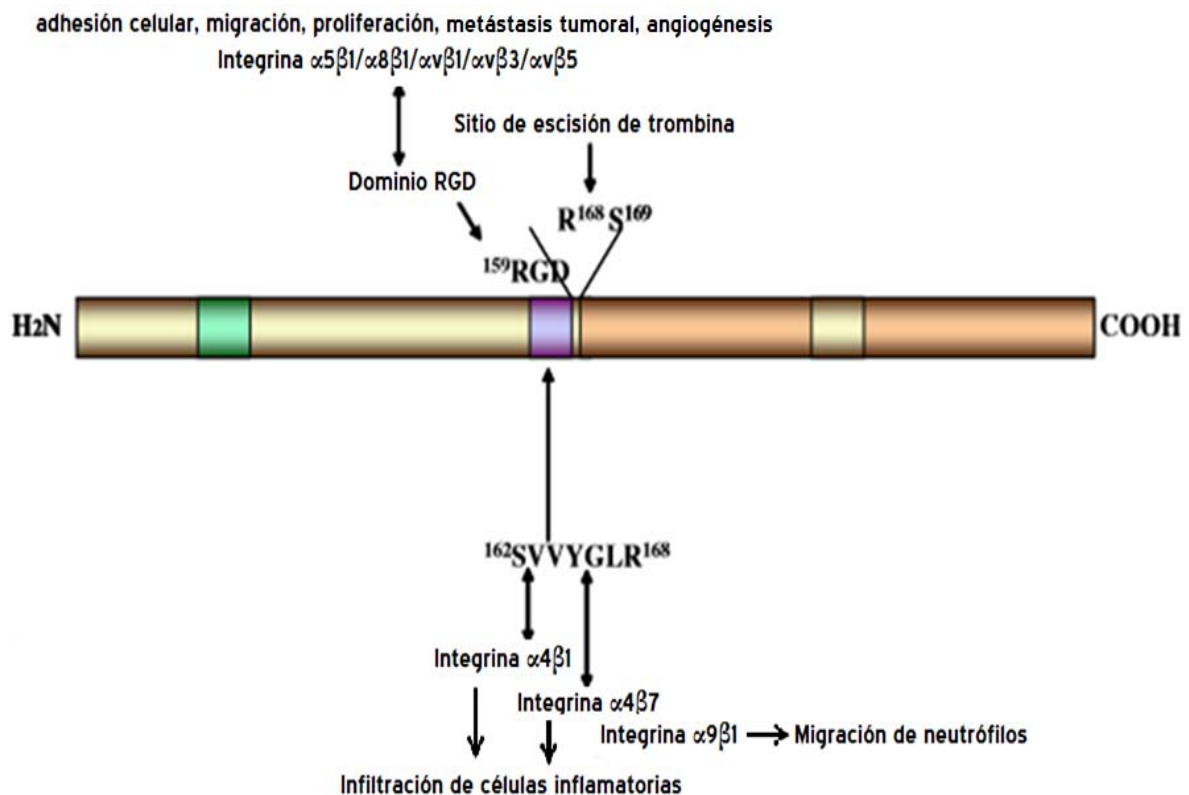


Figura 2.- Estructura proteínica de OPN²⁰. La OPN tiene un dominio RGD que media la unión con integrinas y un sitio de escisión de trombina. Una vez escindida, otro sitio de unión a integrinas es expuesto, el dominio SVVYGLR; generando dos fragmentos: a) el fragmento pro-inflamatorio N-terminal, que incluye dos sitios de unión a integrinas, el RGD y el SVVYGLR, y b) el fragmento C-terminal, el cual es carente de sitios de unión a integrinas. RGD: arginina- glicina- ácido aspártico; SVVYGLR: serina-valina-valina-tirosina-glicina-leucina-arginina.

La OPN cuenta con un dominio RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) que se combina con múltiples receptores de superficie celular, incluyendo varias integrinas ($\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, and $\alpha v\beta 5$) y CD44²¹.

La OPN es escindida por trombina en dos péptidos aproximadamente del mismo tamaño; la mayoría de dominios funcionales están localizados en el extremo N- terminal, una vez escindida se expone la secuencia SVVYGLR (serina-valina-valina-tirosina-glicina-leucina-arginina) que es reconocida por las integrinas $\alpha 4\beta 1/\alpha 9\beta 1$, involucradas en inflamación y adhesión celular²². Finalmente, la OPN tiene sitios de fosforilación Ser/Thr, glucosilación y sulfatación de tirosinas, resultando en una proteína de peso molecular en un intervalo de 41-75 kDa²³. Enfatizando la importancia funcional de esas fosforilaciones, la OPN recombinante no fosforilada incrementa la mineralización de las células de músculo liso,

mientras que la OPN fosforilada enzimáticamente, es un potente inhibidor de la calcificación vascular²⁴.

OPN es una proteína que tiene una elevada actividad pro-inflamatoria, y cuando es escindida se potencian aún más sus acciones. Se ha demostrado que la OPN y el fragmento N-terminal escindido por trombina, promueven la inflamación, y ésta puede ser atenuada por el fragmento C-terminal fosforilado, a través de la inhibición de la adhesión celular vía integrina $\alpha V\beta 3$ ¹⁹.

Debido al splicing alternativo y a las modificaciones pos-traduccionales, esta proteína tiene una gran diversidad funcional. OPN ha sido identificada como un biomarcador para varios tipos de cánceres y enfermedades inflamatorias^{22,23,25,26}. La expresión desregulada o excesiva de OPN ha sido asociada a la patogénesis de desórdenes autoinmunes como esclerosis múltiple²⁷, lupus eritematoso sistémico²⁸, artritis reumatoide²⁹ y otras enfermedades inflamatorias incluyendo, enfermedades cardiovasculares³⁰, aterosclerosis³¹, enfermedad pulmonar obstructiva crónica³², enfermedades hepáticas³³, asma³⁴.

La OPN originalmente fue encontrada en hueso (osteoblastos y osteoclastos), sin embargo, es producida por otros tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células NK, linfocitos T y B, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos y adipocitos. La transcripción de este gen es potenciada por factores de crecimiento³⁵ como TGF β (factor de crecimiento transformante β), EGF (factor de crecimiento endotelial), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), FGF2 (factor de crecimiento de fibroblastos 2); citocinas pro-inflamatorias (IL-1a e IL-2, TNF- α) y endotelina¹⁹ y su sobre-expresión inhibe la producción de IL-10 y de otras citocinas antiinflamatorias producidas por macrófagos³⁶

La evidencia muestra que las LDL oxidadas son capaces de inducir la expresión de *OPN* en células endoteliales y en células de músculo liso, y a través de su unión con integrinas activar al NF- κ B e inducir la expresión de genes pro-inflamatorios favoreciendo el proceso inflamatorio de la aterosclerosis.

La OPN no se encuentra en arterias normales, sin embargo, en sitios de lesiones aterosclerosas está asociada con macrófagos y células espumosas, es abundante en placas

que presentan calcificación, sugiriendo que esta proteína podría tener un papel pro-calcificante.³⁷

Matsui *et al.*, observaron que la deficiencia de OPN reduce significativamente el tamaño de la lesión aterosclerosa en ratones hiperlipidémicos *apo E* *-/-OPN**-/-* comparado con ratones *apo E**-/-OPN**+/+* lo que apoya el papel de la OPN en la aterosclerosis³⁸. Estudios en ratones knock out *apo E* / *receptor LDL* / *OPN* mostraron que la deficiencia de OPN resultó en una disminución del tamaño de la lesión aterosclerosa³⁹. Los estudios sugieren que la OPN promueve la acumulación de macrófagos y su retención en las lesiones aterosclerosas, contribuyendo a la cronicidad de la enfermedad^{39,40}.

En este mismo contexto, diversos autores han encontrado asociación de la *OPN* con la aterosclerosis y la calcificación arterial⁴¹⁻⁴⁵. En macrófagos de placas aterosclerosas y válvulas aórticas calcificadas, la *OPN* está sobre-expresada en la superficie de los depósitos calcificados, sugiriendo que los macrófagos pueden ser la fuente primaria de OPN en el tejido valvular en condiciones patológicas⁴⁶. Estos datos sugieren que la OPN podría ser un importante regulador pro-calcificante de la placa.

Osteonectina (ON)

La ON en humanos es codificada por el gen *SPARC* (Secreted protein, acidic, cysteine-rich), ubicado en el brazo largo del cromosoma 5 en la banda 31.3, está formado por 10 exones y su longitud es de 25959 pares de bases.

El gen *SPARC* codifica para una proteína de 298-304 aminoácidos (aa), posee un péptido señal de 17 aminoácidos y el péptido maduro consiste de tres dominios estructurales (Figura 3).

El dominio I (aa 3-51) tiene una región de unión a hidroxipatita. El extremo N-terminal es una región rica en asparagina y glutamato en donde pueden unirse de 5-8 Ca²⁺ (con baja afinidad). El dominio II (aa 52-132) es rico en cisteínas, es un dominio tipo Folistatina. Este dominio contiene péptidos bioactivos que ejercen diferentes efectos sobre las células endoteliales. El péptido 2.1 inhibe la proliferación de las células endoteliales. El péptido FS-E inhibe potencialmente la migración de las células endoteliales *in vitro* y la angiogénesis *in vivo*⁴⁷. El péptido FS-K tiene un efecto inhibitorio en la proliferación

endotelial. Por el contrario, el péptido 2.3 tiene un efecto estimulante sobre la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis⁴⁸.

El dominio III (aa 133-285, exones 7-9) se une a Ca^{2+} extracelular. Este dominio contiene el péptido 4.2 que estimula la migración de células endoteliales pero inhibe su proliferación⁴⁹.

La escisión de ON por metaloproteinasas de la matriz (MMP-3) produce tres péptidos, un péptido Z-1 que contiene una secuencia de unión a Cu^{2+} , el cual, estimula el crecimiento vascular. En contraste, los péptidos Z-2 y Z-3 inhiben la proliferación celular de células endoteliales pero estimulan su migración^{50,51}.

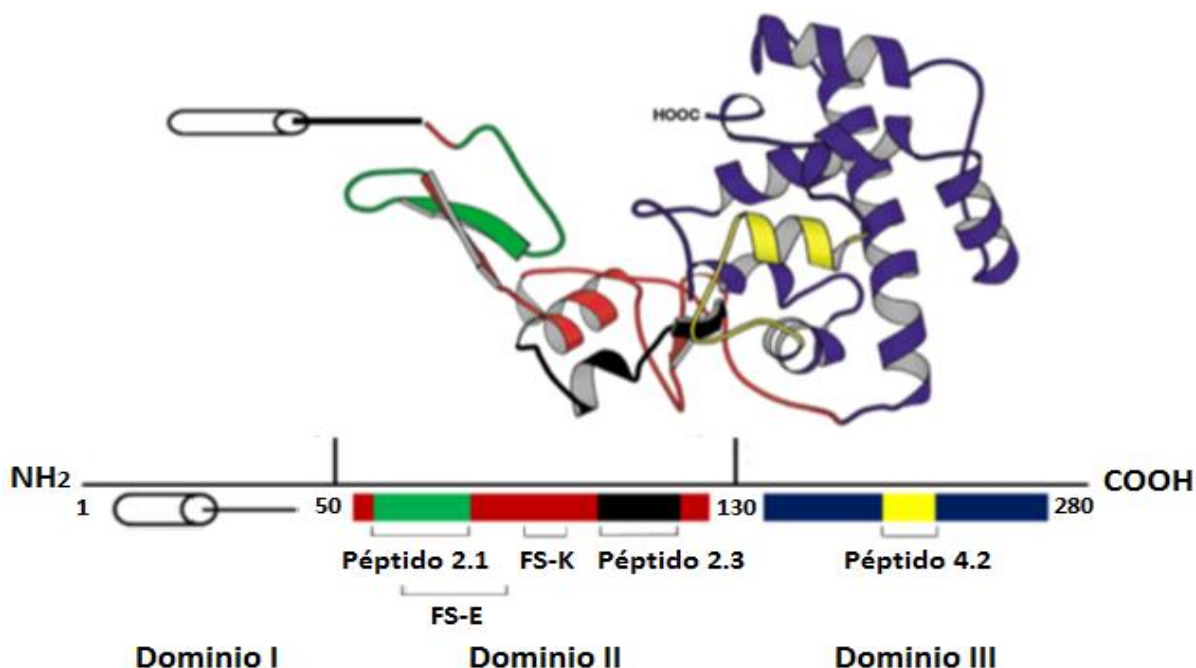


Figura 3.- Estructura proteínica de osteonectina⁵², La ON presenta tres dominios: el dominio I rico en asparagina y glutamato, el dominio II que contiene a los péptidos 2.1,2.3, FS-E y FS-K y el dominio III es un sitio de unión a Ca^{2+} extracelular.

Los estudios *in vitro* han mostrado evidencia de que ON promueve cambios en la morfología y la diferenciación celular⁵³, inhibe la progresión del ciclo celular⁵⁴, regula la actividad de factores de crecimiento como PDGF, FGF o VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) e inhibe la adipogénesis^{49,55}.

ON es expresada por osteoblastos, células endoteliales, células de músculo liso y adipocitos⁵⁶. Alteraciones en sus niveles o actividad se han asociado con varias

enfermedades humanas comunes como osteoporosis⁵⁷, artritis^{58,59}, cáncer⁶⁰, enfermedad cardíaca^{61,62}, obesidad^{62,63} y diabetes mellitus tipo 2^{64,65}.

En contraste con la *OPN*, la expresión de *ON* correlacionó negativamente con la aterosclerosis y la calcificación en tejido ateroscleroso humano en un estudio llevado a cabo por Hirota *et al.*; dicho estudio mostró que la expresión del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) de *ON* disminuyó con el desarrollo de la aterosclerosis y el RNAm de *OPN* incrementó con la severidad de ésta y su calcificación⁴¹, sugiriendo que *ON* podría tener una función anti-calcificante⁶⁶.

Por lo anterior, una mayor expresión de *OPN* con respecto a *ON* podría ser clave en la calcificación de las placas aterosclerosas, pero esta posibilidad no ha sido explorada hasta el momento.

Osteoprotegerina (OPG)

La OPG es codificada en humanos por el gen *TNFRSF11B* (tumoral necrosis factor receptor superfamily, member 11B), localizado en el brazo largo del cromosoma 8, región 24, está formado por 28588 pares de bases y presenta 5 exones. Esta proteína es un miembro de la superfamilia del receptor del TNF y es expresada por osteoblastos, células endoteliales y células de músculo liso⁶⁷⁻⁶⁹.

Bucay *et al.*, estudiaron el papel fisiológico de OPG en ratones knock out y observaron una calcificación media de la aorta y de las arterias renales, concluyendo que la OPG podría actuar como un inhibidor de la calcificación⁷⁰. En el mismo sentido, Bennet *et al.*, generaron ratones *OPG*^{-/-} *Apo E*^{-/-}, en los cuales la inactivación de *OPG* resultó en un incremento del tamaño de la lesión aterosclerosa y del área de calcificación comparado con ratones *OPG*^{+/+} *Apo E*^{-/-}, sugiriendo que la OPG protege contra la progresión de la lesión aterosclerótica y su calcificación⁷¹.

El mecanismo propuesto por el cual OPG podría inhibir la calcificación es a través de la unión con RANKL (Receptor activator NF-κB ligand). La OPG es un factor soluble, es decir, no está anclado a la membrana sino que actúa en el medio intercelular. La OPG a este nivel actúa como un receptor señuelo, uniéndose a RANKL neutralizándolo, impidiendo así su fijación a RANK (Receptor activator NF-κB)^{72,73}.

La expresión de *OPG* y *RANKL* ha sido observada en lesiones aterosclerosas de ratones y humanos, sin embargo, su papel en la enfermedad vascular aún no es bien entendida^{74,76}. *RANKL* y *RANK* son frecuentemente indetectables en vasos normales y en arterias o válvulas no calcificadas^{69,72, 77-79}. Una serie de estudios recientes sugieren que *RANKL* es sobre-expresada en lesiones aterosclerosas humanas y de ratones^{78,79}. *RANKL* es un miembro de la superfamilia del TNF, el cual, en unión con su receptor *RANK*, estimula la liberación de quimiocinas, la migración monocito/macrófago y la actividad de las metaloproteinasas^{68,80-83}. Por otro lado, se ha demostrado que *RANKL* es capaz de estimular la actividad de la fosfatasa alcalina (*ALP*), una proteína que favorece la calcificación. Además, la unión de *RANKL* con *RANK* inicia una cascada de señalización intracelular para la translocación del *NF-κB* del citosol al núcleo modulando la expresión de diferentes genes, tal como el de la Proteína morfogenética ósea 2 y 4 (*BMP2*, *BMP4*)⁷⁴, cuyos productos proteicos están implicadas en la mineralización vascular. Las *BMP* se expresan en células endoteliales y células de músculo liso^{75,76}, son un potente inductor de la diferenciación celular osteoblástica, a través de la expresión de factores de transcripción críticos para la mineralización como *Runx2*^{77,78}. Además, la inflamación juega un papel importante en el desarrollo de la calcificación vascular a través del aumento de la expresión en los vasos de *BMP2* y 4. Bajo el efecto de citocinas pro-inflamatorias, las células endoteliales producirán *BMP 2* y 4, las cuales actuarán sobre las células de músculo liso adyacentes induciendo su diferenciación osteogénica y con ello, la calcificación vascular⁷⁹. De esta manera, la unión de *OPG* con *RANKL* inhibe las cascadas de señalización que llevan a la diferenciación osteogénica de tipo osteoblástico y con ello, a una atenuación de la calcificación.

Por otro lado, *OPG* también se une a otro ligando conocido como *TRAIL* (TNFR apoptosis inductor ligand), el cual es un factor pro-apoptótico. Al unirse *OPG* con *TRAIL* se inhibe la formación de cuerpos apoptóticos y con ello, existen menos sitios de nucleación para la mineralización^{80,81}. Se ha demostrado que al inhibir la apoptosis de células de músculo liso también se inhibe su calcificación, ya que sus cuerpos apoptóticos pueden contener y cristalizar calcio⁸¹. Por lo cual, la unión de *OPG* con *TRAIL* favorece la atenuación de la calcificación de la placa.

Con la evidencia existente, se puede postular que la OPG es un inhibidor crucial de la calcificación de la placa aterosclerosa.

Factor de Necrosis Tumoral α (TNF- α)

El gen en humanos del *TNF- α* está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6, en la región 21.3, su longitud es de 2770 pares de bases y tiene 4 exones. La proteína está involucrada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos incluyendo proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo de lípidos y coagulación^{82,83}. Esta citocina ha sido implicada también en una gran variedad de enfermedades, incluyendo enfermedades autoinmunes, resistencia a la insulina y cáncer⁸³.

En 2003, Kaden *et al.*, mostraron evidencia de que la calcificación de la válvula aórtica puede ser regulada por un proceso inflamatorio mediado por TNF- α ; este grupo realizó cultivos de miofibroblastos de la válvula aórtica y los estimularon con TNF- α bajo condiciones mineralizantes, obteniendo un incremento en la formación de nódulos calcificados, concluyendo que el TNF- α podría ser un mediador importante en la calcificación del ateroma⁸⁴ además de su papel como citocina pro-inflamatoria.

Una vez que el TNF- α se une a su receptor TNFR1, se desencadena una cascada de señalización que lleva a la fosforilación de los inhibidores del NF- κ B (factor nuclear κ B), evento que lleva a la liberación y translocación del NF- κ B desde el citoplasma al núcleo en donde funciona como factor de transcripción, expresando genes involucrados en la síntesis de proteínas relacionadas con la inflamación. En las células endoteliales, el TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión⁸⁵, la diferenciación de macrófagos⁸⁶ y promueve la formación de células espumosas⁸⁷, contribuyendo de esta manera, con la exacerbación del proceso ateroscleroso.

Por otro lado, el TNF- α induce la expresión y actividad de la ALP en células vasculares incrementando la mineralización⁸⁸. También el TNF- α es capaz de incrementar la expresión de la *BMP-2* en células endoteliales, que actuaría sobre las células de músculo liso adyacentes induciendo su diferenciación osteoblástica⁸⁸.

La evidencia muestra que el TNF- α es suficiente para inducir la mineralización de células de músculo liso⁸⁹, debido a que induce la expresión de factores de transcripción de

diferenciación osteoblástica como *Runx2*⁷⁸ y genes pro-calcificantes como el de la *ALP* e inhibe el gen anti-calcificante de la *MGP* (proteína de matriz Gla). La proteína que codifica este último gen es capaz de inhibir la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales mediante el secuestro de la BMP-2, con el cual MGP forma un complejo previniendo la interacción de BMP-2 con sus receptores⁹⁰.

Finalmente, el TNF- α y los polipéptidos que pertenecen a la familia de esta citocina señalan la muerte celular programada a través de la activación de sus receptores. La unión de esos ligandos a su receptor genera la señal de apoptosis activando directamente a las caspasas, de esta manera, puede inducir la apoptosis de las células endoteliales⁹¹.

A través de los mecanismos anteriormente descritos (inflamación, activación de genes pro-calcificantes y apoptosis) el TNF- α puede estar favoreciendo la calcificación de la placa.

Si bien el TNF- α es secretado principalmente por células del sistema inmune, los adipocitos también son capaces de secretarlo. En este contexto, la relación entre el tejido adiposo visceral abdominal y el riesgo cardiovascular ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, existen sitios de tejido adiposo ectópicos que podrían contribuir con el desarrollo de la aterosclerosis y la calcificación de la placa por su cercanía con las arterias coronarias, tal como el tejido adiposo epicárdico.

Tejido adiposo epicárdico (TAE)

Características generales

El TAE es la auténtica grasa visceral del corazón, se ubica entre el miocardio y el pericardio visceral. Se origina del mesoderma esplacnopleural y es vascularizado por las ramas de las arterias coronarias. Se encuentra prominentemente en los surcos atrioventricular e interventricular y una pequeña cantidad se extiende desde la superficie epicárdica hacia el miocardio, rodeando la adventicia de las arterias coronarias⁹². Bajo condiciones fisiológicas, representa aproximadamente el 20% de la masa del corazón y cubre el 80% de la superficie de éste⁹³.

El TAE está compuesto predominantemente por adipocitos, pero también contiene nervios interconectados, células inflamatorias, inmunes y estroma⁹⁴. Sus adipocitos son

generalmente más pequeños que los del tejido subcutáneo u otros depósitos de grasa visceral^{95,96}.

La principal diferencia entre el TAE y otros depósitos de grasa visceral, es su elevada tasa de captación y liberación de ácidos grasos libres, lo cual resulta de particular importancia, ya que el miocardio usa y metaboliza ácidos grasos mediante el proceso de β - oxidación, siendo éste el responsable del 50 al 70% de la energía del músculo cardíaco.

En condiciones fisiológicas, el TAE actúa como un amortiguador que protege al corazón contra la lipotoxicidad⁹⁷ y además provee al miocardio de los lípidos necesarios para la obtención de energía mediante la β - oxidación de los ácidos grasos.

El TAE es rico en ácidos grasos saturados incluyendo, el ácido mirístico (14:0), ácido palmítico (16:0) y el ácido esteárico (18:0), mientras que ácidos grasos insaturados como el ácido palmitoleico (16:1n-7), ácido oleico (18: 1n-9), ácido linoleico (18:2n-6) y el ácido linolénico (18:3n-3) son menos abundantes⁹⁸.

Recientemente, la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1), un marcador de tejido adiposo pardo, ha sido reportado en TAE, esto sugiere, que puede actuar de manera similar que el tejido adiposo café⁹⁹, defendiendo al miocardio y a las arterias coronarias contra la hipotermia.

TAE y aterosclerosis

Diversos estudios muestran que existe una fuerte correlación entre el volumen del TAE y la presencia de oclusiones arteriales coronarias¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. Iwasaki *et al.*, propusieron que el volumen del TAE incrementa abruptamente en pacientes con estenosis arterial coronaria y en aquellos con una calcificación arterial coronaria severa. Para explorar esta propuesta, cuantificaron el volumen del TAE a través de tomografía computarizada multidetector y el análisis de sus resultados mostró que el volumen del TAE se asocia con la aterosclerosis coronaria¹⁰¹.

La presencia y severidad de la enfermedad arterial coronaria y la calcificación coronaria indican estados de aterosclerosis muy avanzados, los cuales han sido asociados con el TAE¹⁰²⁻¹⁰⁵. Dicha asociación ha sido reforzada por un meta-análisis reciente en donde se demostró que el volumen del TAE de pacientes con enfermedad arterial coronaria es

significativamente mayor que el de sujetos sin dicha enfermedad¹⁰⁶. En este contexto, hay segmentos de las arterias coronarias que son libres de aterosclerosis y esto ha sido atribuido a la carencia de tejido adiposo en esta zona y por lo tanto, no hay producción de estímulos pro-inflamatorios. Estudios de tomografía computarizada han demostrado la presencia de aterosclerosis en segmentos de las arterias coronarias que se encuentran cercanas a puentes miocárdicos, en donde hay presencia de este tejido, mientras que segmentos que están sobre el puente miocárdico, están libres de aterosclerosis¹⁰⁷⁻¹¹¹. Este hallazgo y la experiencia de los cirujanos del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", quienes han observado que las lesiones aterosclerosas se ubican siempre en regiones donde la coronaria es adyacente al TAE, mientras que nunca se ubican en las regiones en donde la arteria incursiona en el músculo cardiaco, abre camino a la posibilidad de que el TAE, efectivamente ejerce un papel importante en la formación y desarrollo de la aterosclerosis. La expresión y secreción del TNF- α , MCP-1 (proteína quimiotáctica de monocitos), IL-6, IL-1 β , PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno) y resistina en el TAE de pacientes con enfermedad arterial coronaria está incrementada¹¹²⁻¹¹⁷, por lo cual, estas proteínas podrían inducir la formación de la placa aterosclerosa a través de la exacerbación de la respuesta inmune (Figura 4).

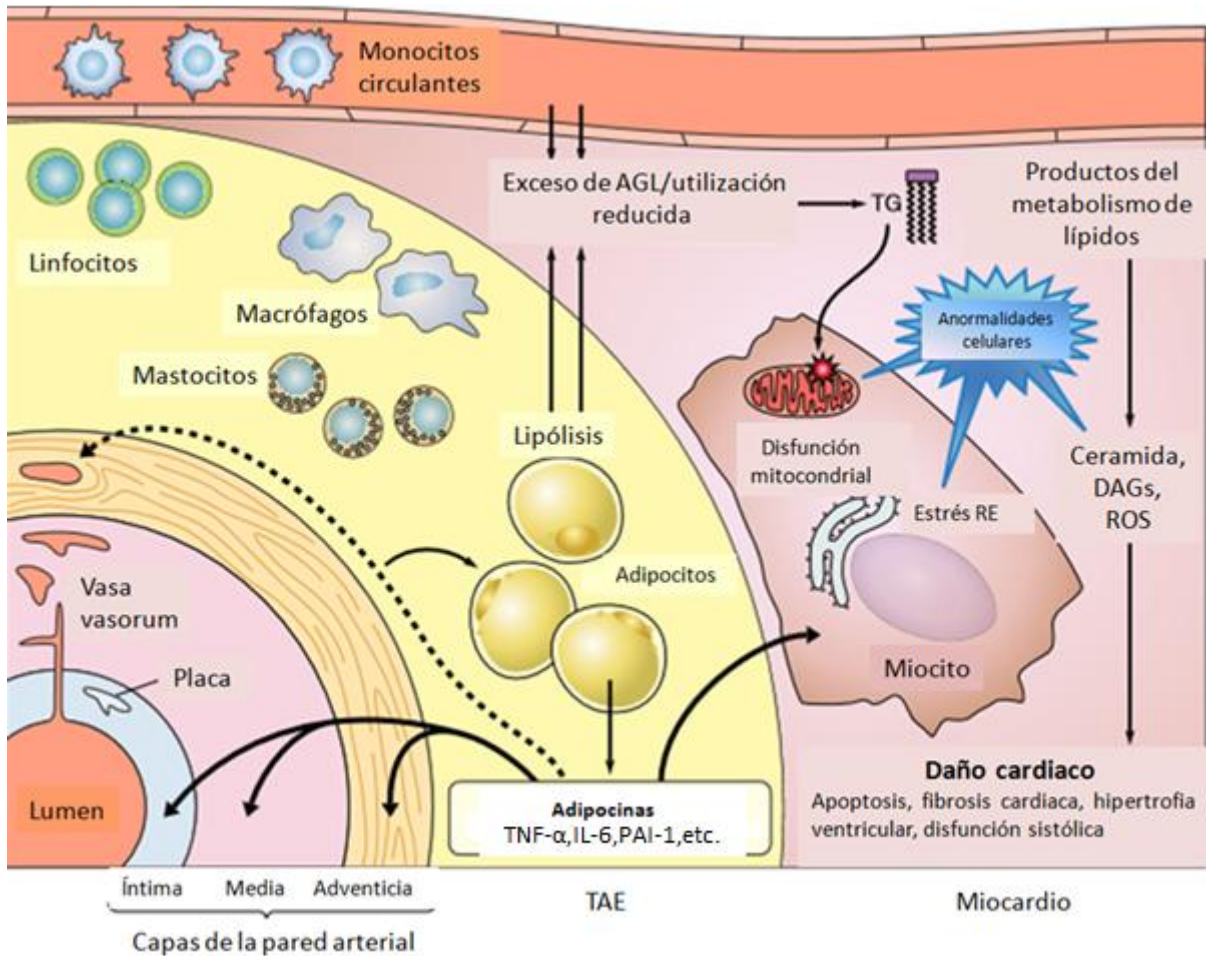


Figura 4.- Papel patofisiológico del TAE en el desarrollo de la placa aterosclerosa. Las adipocinas pro-inflamatorias secretadas por el TAE podrían actuar de manera parácrina (línea negras) sobre las arterias coronarias, contribuyendo con el desarrollo y progresión de la placa aterosclerosa, a través de la promoción y exacerbación del proceso inflamatorio. Modificado de Am J Physiol Endocrinol Metab 2012; 303: E937- E949.

La respuesta inmune innata representa una de las vías que pudieran explicar la liberación de citocinas pro-inflamatorias por parte del TAE y el subsecuente aumento del riesgo cardiovascular. La inmunidad innata puede ser activada a través de los TLRs (Toll like receptors), que pueden activar la transcripción de mediadores inflamatorios. La activación de los TLRs provoca la translocación del NF- κ B hacia el núcleo, con la posterior transcripción de IL-6, IL-1, TNF- α ¹¹⁸⁻¹²⁰ y seguida por la liberación de IL-6, TNF- α y resistina¹²¹. Recientemente Baker *et al.*, demostraron que el TAE de pacientes con enfermedad arterial coronaria exhibe mayor actividad de NF- κ B y c-Jun N-terminal cinasa (JNK)¹²¹, favoreciendo un estado pro-inflamatorio que puede promover el desarrollo y progresión de la placa. La mayor expresión del TLR-2 y TLR-4 en este grupo de pacientes,

permite sugerir que los macrófagos juegan un papel preponderante en la respuesta inflamatoria del TAE. En este estudio, los pacientes con enfermedad arterial coronaria presentaron niveles elevados de lipopolisacáridos, los cuales activan a los TLRs y en consecuencia dan lugar a un proceso inflamatorio. Estos hallazgos sugieren que los macrófagos y las vías del NF- κ B y JNK juegan un papel importante en el perfil inflamatorio y aterogénico del TAE.

El TAE anormal puede afectar al endotelio a través de la secreción de sPLA2-IIA¹²² (secretory type II phospholipase A2), una enzima involucrada en la retención de las LDLs en el espacio subendotelial. Esta enzima ha sido encontrada en lesiones aterosclerosas y la sobre-expresión del gen *sPLA2-IIA* humano incrementa la susceptibilidad a aterosclerosis¹²³⁻¹²⁵.

El TAE induce la expresión de moléculas de adhesión e incrementa la adhesión de monocitos a las células endoteliales¹²⁶. Además de MCP-1, ICAM (molécula de adhesión intercelular) se ha detectado en este tejido¹²⁶. Dicha molécula participa en varias etapas del proceso ateroscleroso incluyendo quimiotaxis, formación de células espumosas, proliferación y migración de células de músculo liso.

Otro factor que contribuye con el desarrollo y progresión de aterosclerosis es un metabolismo anormal de glucosa. En el TAE de pacientes con enfermedad arterial coronaria la expresión del RNAm de *GLUT 4* (Glucose transporter 4) es menor y sus adipocitos epicárdicos cultivados liberaron niveles más elevados de RBP4 (retinol-binding protein 4) que el tejido adiposo subcutáneo, de esos mismos sujetos¹¹³. Por lo tanto, el TAE puede contribuir con la resistencia a la insulina y con un perfil de glucosa y lípidos desfavorable.

Los mecanismos que regulan el equilibrio entre los efectos protectores y perjudiciales del TAE aún se desconocen. El TAE puede tener propiedades cardio-protectoras a través de la secreción de adipocinas anti-inflamatorias y anti-aterogénicas como adiponectina y adrenomedulina^{93,127}. En pacientes con enfermedad arterial coronaria la expresión de ambas en el TAE se encuentra significativamente reducida^{128,129}. Aunque el TAE ha sido reportado como una fuente de adipocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, la evidencia sugiere que la secreción local de adipocinas pro-inflamatorias es más

predominante y puede regular a la baja a las adipocinas anti-inflamatorias como adiponectina y adrenomedulina en enfermedad arterial coronaria severa.

TAE y la calcificación de la placa aterosclerosa

Por su contigüidad anatómica es posible que el TAE interactúe localmente con las arterias coronarias a través de una vía paracrina, siendo una fuente de genes pro-calcificantes (*OPN* y *TNF- α*) y anti-calcificantes (*ON* y *OPG*). Las proteínas codificadas por estos genes podrían difundir en el fluido intersticial, atravesar la adventicia, media e íntima y luego interactuar con el vasa vasorum, así como con células endoteliales y células de músculo liso, mediando el desarrollo (*OPN* y *TNF- α*) o atenuación (*ON* y *OPG*) de la calcificación del ateroma, dependiendo del grado en el que son expresados y traducidos. De esta manera, a pesar de que el volumen del TAE es muy pequeño con respecto al tejido adiposo visceral abdominal que secreta adipocinas a la circulación sanguínea, las proteínas de secreción producidas por el TAE podrían actuar localmente como factores aterogénicos paracrinos más que como factores circulantes. Sin embargo, se ha descrito muy poco acerca de esta función del TAE.

Si bien hemos propuesto al tejido adiposo epicárdico como fuente de genes pro- (*OPN* y *TNF- α*) y anti-calcificantes (*ON* y *OPG*), la expresión exacerbada de *OPN* y *TNF- α* favorecerá el desarrollo y la calcificación de placas aterosclerosas. Por otro lado, las lipoproteínas de alta densidad (HDL) también podrían tener un papel indirecto en la atenuación de este proceso, ya que en estudios *in vitro* con miofibroblastos de la válvula aórtica, las HDL fueron capaces de inducir la secreción de *OPG* e inhibir la expresión del RNAm del *TNF- α* ¹³⁰, principalmente las HDL de tipo 3, actuando como lipoproteínas con un papel anti-calcificante

Lipoproteínas de alta densidad (HDL)

Existe una fuerte correlación negativa entre la concentración de colesterol-HDL (C-HDL) en plasma y el riesgo de desarrollar EAC observada en los estudios epidemiológicos, que afirma la asociación de estos dos parámetros^{131,132}.

Se ha postulado que las HDL tienen una función protectora en el desarrollo de la EAC, evitando la formación del ateroma por el papel que desempeñan en el transporte reverso de colesterol (TRC). Además, en los últimos años se han descrito otros mecanismos

potencialmente anti-aterosclerosos para las HDL, como su capacidad antioxidante^{133,134}, el mejoramiento de la función endotelial¹³⁵ y la regulación de la respuesta inflamatoria^{136,137}.

Las lipoproteínas son complejos macromoleculares pseudomicelares, constituidos en la superficie por fosfolípidos y colesterol libre (lípidos anfipáticos), y por colesterol esterificado y triacilglicerolos (lípidos hidrófobos) en su núcleo. Este complejo lipídico es estabilizado por la presencia de proteínas conocidas como apolipoproteínas, que se unen por interacciones hidrofóbicas a los lípidos, debido a que las proteínas poseen dominios de diferentes polaridades, pueden interactuar selectivamente con los lípidos que conforman las lipoproteínas, favoreciendo la estabilidad fisicoquímica de la partícula¹³⁸⁻¹³⁹.

Las HDL son las lipoproteínas más pequeñas; su diámetro varía entre 5 y 12 nm y son las lipoproteínas más densas. Estas lipoproteínas tienen un contenido proteínico que va del 45-55% de su masa seca, siendo las lipoproteínas con mayor proporción proteínica. La apo AI es característica de las HDL y representa hasta un 70% del total de su proteína constitutiva^{140,141} (Figura 5). Los grupos ionizables de los aminoácidos presentes en estas apolipoproteínas aportan a las lipoproteínas plasmáticas una carga generalmente negativa a pH fisiológico, lo que les permite interactuar con las regiones ionizables de los fosfolípidos hacia la interface lípido-agua estabilizando la partícula¹⁴². El valor de carga de superficie no es estático, pues la proporción de las apolipoproteínas presentes en las HDL es variable y dependerá de la cantidad y naturaleza de los fosfolípidos¹⁴³.

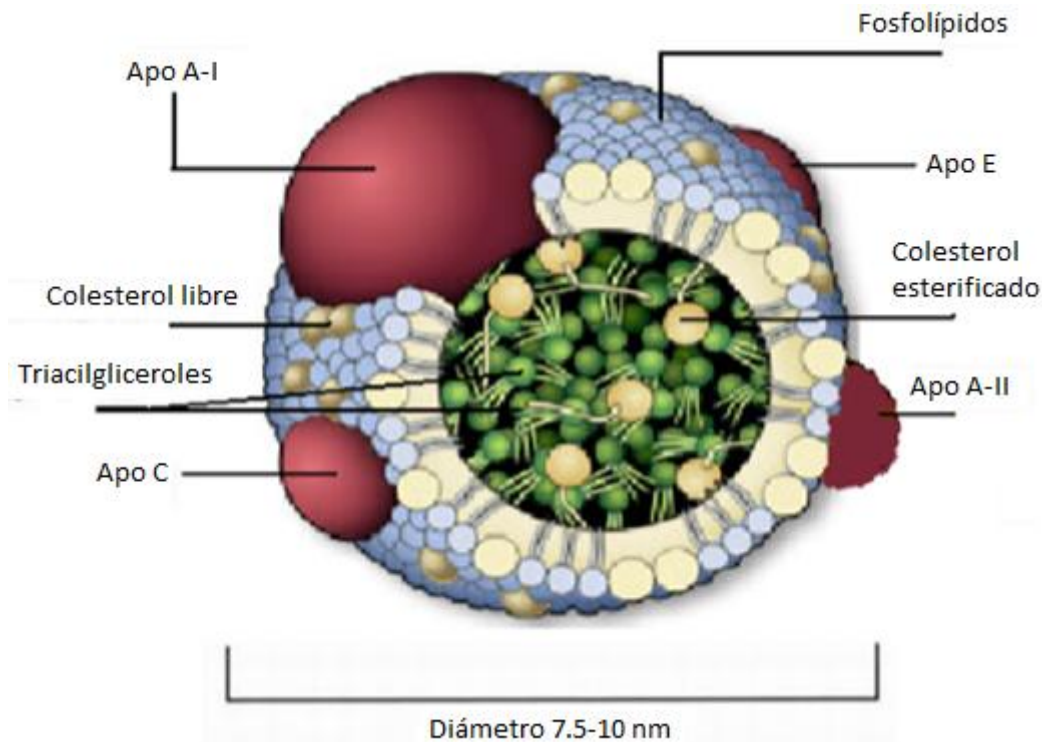


Figura 5.- Estructura de las HDL. Las HDL están formadas por lípidos hidrofóbicos en el núcleo (colesterol esterificado y triacilgliceroles) y anfipáticos en la superficie (colesterol total y libre). Estas lipoproteínas son estabilizadas por proteínas, la más abundante es la Apo A1.

Las partículas de HDL pueden subclasificarse con base en su densidad de flotación y en su diámetro hidrodinámico. Esta diferenciación está basada en el aislamiento de las HDL del plasma o suero por ultracentrifugación secuencial y separándolas posteriormente por PAGE (polyacrylamide gradient gel electrophoresis) en condiciones nativas. Mediante este procedimiento se pueden reconocer 5 subpoblaciones de HDL en humanos, las HDL2b con diámetro de 10.58-12.36 nm, HDL2a de 9.94-10.58 nm, HDL3a de 8.98-9.94, HDL3b de 8.45-8.98 nm y las HDL3c de 7.90-8.45 nm.

Las HDL2 son ricas en lípidos hidrofóbicos mientras que las HDL3 están formadas por fosfolípidos y proteínas principalmente. En este sentido, se ha sugerido que la actividad biológica de estas lipoproteínas es dependiente de su tamaño y características fisicoquímicas^{144,145}.

En un modelo de conejos hipercolesterolémicos a los que se les infundió apo A1, principal apolipoproteína de las HDL se observó una atenuación de la calcificación valvular^{146,147}.

Además la Apo AI moviliza rápidamente el colesterol y por tanto, reduce la carga de la placa aterosclerosa.

El mecanismo anti-calcificante de las HDL no se conoce con precisión pero es posible que sea través de su relación con OPG y el TNF- α . Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que también puedan tener alguna relación con OPN y ON.

En resumen, el TAE puede suplir de energía y calor al miocardio, pero en condiciones patológicas puede ser un tejido pro-inflamatorio y lipotóxico. Bajo estas condiciones, el TAE no sólo puede favorecer el desarrollo de aterosclerosis sino también la calcificación de la placa a través de la expresión exacerbada de proteínas de secreción tales como OPN y TNF- α en comparación con ON y OPG. A nuestro conocimiento, con excepción del TNF- α , no existe algún estudio en el que se haya realizado su determinación en este tejido así como su relación con las subpoblaciones de HDL y el volumen del ateroma.

JUSTIFICACIÓN

La EAC tiene sus inicios desde la infancia y entre los factores de riesgo asociados con esta enfermedad se encuentran la edad, sexo, factores genéticos, hipertensión, resistencia a la insulina, diabetes, dislipidemias y la obesidad.

En este contexto, el papel del tejido adiposo visceral abdominal ha sido ampliamente estudiado en relación al riesgo cardiovascular, sin embargo, existen sitios de tejido adiposo ectópicos que pueden contribuir con el desarrollo de la placa aterosclerosa y su calcificación. Tal es el caso del TAE, cuyo volumen correlaciona con la severidad de la enfermedad arterial coronaria y se incrementa abruptamente en pacientes con calcio arterial coronario. De esta manera, dada su contigüidad anatómica, el TAE podría actuar como órgano paracrino y pro-inflamatorio local que favorece la calcificación de la placa aterosclerosa a través de la expresión incrementada de genes pro-calcificantes como *OPN* y *TNF- α* en comparación con genes anti-calcificantes tales como *ON* y *OPG*.

La relación inversa entre el riesgo de desarrollar EAC y la concentración de colesterol-HDL es bien conocida. El carácter atero-protector atribuido a las HDL involucra su participación en el transporte reverso del colesterol, su capacidad antioxidante, el mejoramiento de la función endotelial y la regulación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, se ha demostrado recientemente que estas lipoproteínas son capaces de inducir la secreción de proteínas anti-calcificantes (*OPG*) y atenuar la expresión de genes pro-calcificantes (*TNF- α*).

A la fecha no existen estudios que hayan determinado la expresión de estos genes en TAE ni correlacionado su expresión con la distribución y composición de las HDL. Asimismo, no se ha relacionado la presencia de ateromas con los niveles de expresión de estos genes. Por lo tanto, estos conceptos plantean una nueva forma de abordar el desarrollo de la EAC que de confirmarse, contribuirán a plantear nuevas estrategias para la prevención y el tratamiento de la EAC que es la principal causa de muerte en población adulta en el mundo.

HIPÓTESIS

Los pacientes con EAC tendrán una expresión exacerbada de *OPN* y *TNF- α* , así como una expresión disminuida de *ON* y *OPG* en su TAE, y una mayor proporción de HDL pequeñas con respecto a los sujetos control.

OBJETIVO

Determinar si el nivel de expresión de RNA mensajero de *OPN*, *TNF- α* , *ON* y *OPG* en tejido adiposo epicárdico así como la composición y distribución de las lipoproteínas de alta densidad se asocian con la presencia de placas aterosclerosas en las arterias coronarias

Objetivo particular

- Cuantificar la expresión de RNA mensajero de *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* en el tejido adiposo epicárdico de pacientes con estenosis valvular aórtica (grupo control) y enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC)
- Determinar la presencia de placas aterosclerosas mediante coronariografía y el puntaje SYNTAX
- Caracterizar a las HDL plasmáticas de pacientes con estenosis valvular aórtica (grupo control) y enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC)
- Establecer si existe una relación entre el tamaño y composición de las HDL con la expresión de *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* , así como con la presencia de placas aterosclerosas

MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron 13 muestras de TAE de pacientes con enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) y 14 con estenosis valvular aórtica (grupo control) sometidos a cirugía de revascularización y recambio valvular, valorados clínicamente con estudios de laboratorio, procedentes del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

Criterios de inclusión.- Sujetos que presenten estenosis valvular aórtica sin presencia de placa aterosclerosa y pacientes con enfermedad aterosclerosa coronaria, sometidos a cirugía de recambio valvular y revascularización respectivamente, determinada por coronariografía y cuya edad se encuentre en un intervalo de 30- 70 años.

Criterios de exclusión.- Sujetos que presenten enfermedad hepática, renal, tiroidea, alcoholismo y obesidad y/o que no firmen el consentimiento informado.

Obtención de muestras sanguíneas

Después de un ayuno de 12 horas, se obtuvieron muestras de sangre venosa que fueron colectadas en tubos que contenían EDTA (1.8 mg/mL). Las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C y el plasma fue separado y almacenado en alícuotas a -70°C hasta el momento de su uso.

Análisis de laboratorio

Las determinaciones bioquímicas (Colesterol total, triacilglicérols y glucosa) se realizaron a través de métodos enzimáticos colorimétricos (Randox, UK) (Apéndice 1). El colesterol LDL (C-LDL) se determinó mediante la fórmula de Friedewald:

$$\text{C-LDL} = \text{CT} - [\text{C-HDL} + (\text{TG}/5)]$$

Caracterización de las HDL

Aislamiento y análisis de los lípidos de las HDL

Las muestras de HDL se obtuvieron por ultracentrifugación secuencial a partir de plasma, ajustando la densidad del mismo a 1.063 g/mL con KBr sólido y ultracentrifugando por 2 horas y media a 435 680 g con la finalidad de separar a las lipoproteínas que contienen apoB. Posteriormente se ajustó nuevamente la densidad a 1.21 g/mL con KBr sólido y se centrifugó por 3 horas a 435 680 g para aislar a las HDL y dializarlas contra un amortiguador de 0.09 M Tris/ 0.08 M ácido bórico/ 3 mM EDTA (TBE) con pH 8.4.

Las subpoblaciones de HDL fueron separadas por su tamaño a través de su corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida gradiente 3-30% en condiciones nativas. Las HDL separadas en el gel, se analizaron por su radio hidrodinámico (HDL_{2b} 10.58-12.36 nm, HDL_{2a} 9.94-10.58 nm, HDL_{3a} 8.98-9.94, HDL_{3b} 8.45-8.98 nm, HDL_{3c} 7.90-8.45 nm), utilizando como referencia marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina 17 nm, ferritina 12.2 nm, catalasa 10.4 nm, lactato deshidrogenasa 8.2 nm y albúmina 7.1 nm, kit Pharmacia, UK). Posteriormente se obtuvo el densitograma (Molecular Analyst Software Versión 1.1, 1994 Bio-Rad) de las bandas correspondientes a cada lípido que conforma a la partícula de HDL y proteína para su análisis. Los geles se tiñeron inicialmente con el reactivo revelador de cada uno de los lípidos según se detalla más adelante para cada uno de ellos. Tras la decoloración de la tinción de lípidos con una mezcla de ácido acético/metanol/ agua, los geles fueron teñidos para proteína con una solución de colorante azul de Coomassie R250 0.1% en metanol 25%, ácido acético 10% y agua.

Tinción enzimática de colesterol total de las subpoblaciones de HDL

Para realizar la detección selectiva de colesterol total (colesterol libre + colesterol esterificado) sobre el gel de poliacrilamida se empleó el método recientemente descrito por nuestro grupo¹⁴⁸. Brevemente, se utilizó una mezcla enzimática compuesta de colesterol esterasa (0.075 µU/mL), colesterol oxidasa (0.05 µU/mL) y peroxidasa (0.25 µU/mL) en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4. Además, se añadió colato de sodio (3mM) y Tritón 100X (0.1%) para exponer al colesterol embebido en la estructura de las lipoproteínas. Se utilizó carboximetilcelulosa como agente viscosante para evitar la difusión de los reactivos y productos de reacción, así como para garantizar un contacto homogéneo del reactivo con la superficie del gel de poliacrilamida. El H₂O₂, producto final

de la secuencia de reacciones enzimáticas, es estequiométricamente proporcional al colesterol total en la muestra y se puso en evidencia con la peroxidasa, el azul de tetrazolium (MTT, 0.04 mM) y el fenazinmetasulfato (FMS, 0.04mM) como aceptores de electrones¹⁴⁹ (Figura 6). El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica; el área bajo la curva del densitograma representará al 100% del colesterol de la muestra y el porcentaje de la integración parcial en los intervalos de tamaño correspondientes a cada subpoblación de HDL representó la proporción relativa de cada una de ellas (Figura 7).

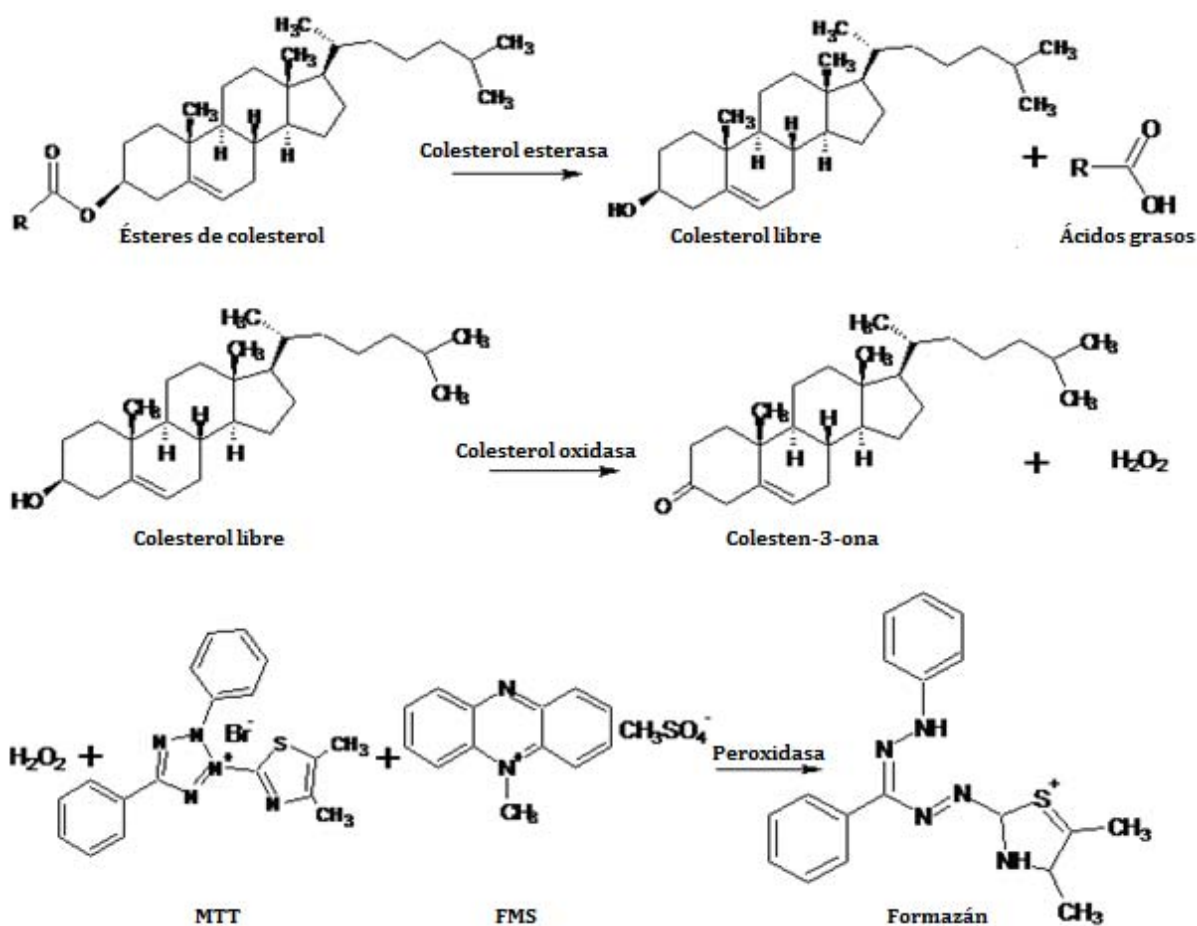


Figura 6. Reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol. El formazán fue analizado por densitometría óptica.

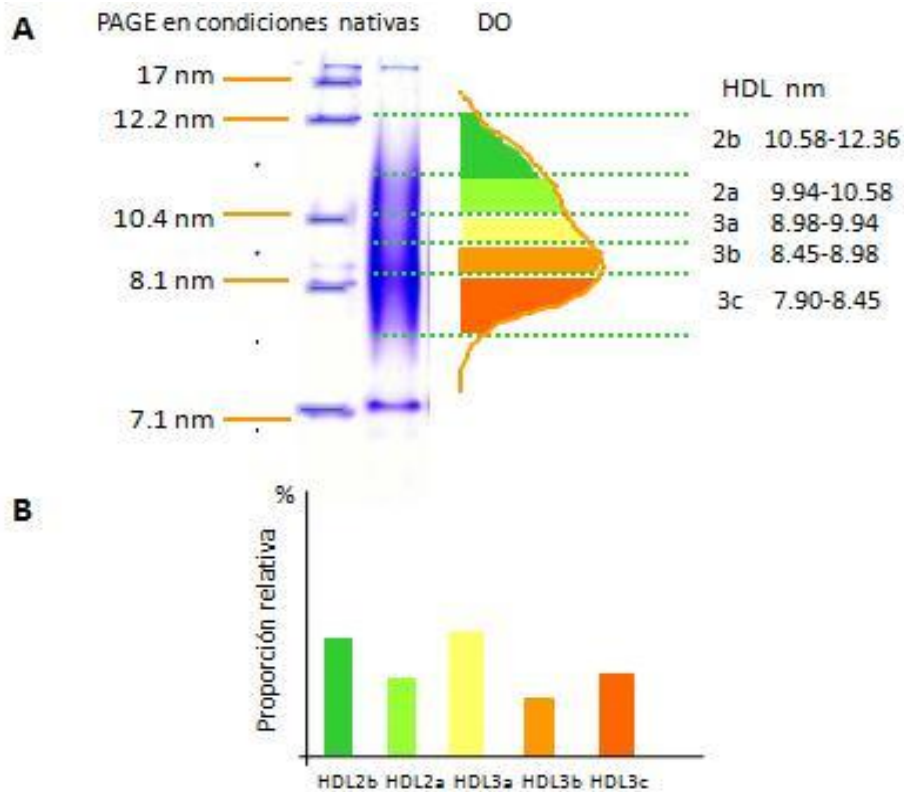


Figura 7. Separación y análisis de las subpoblaciones de HDL por electroforesis en gradiente de poliacrilamida (PAGE) en condiciones nativas. Las HDL se separan por PAGE y los barridos se revelan con azul de Coomassie (Panel A). Se construyen intervalos de tamaño correspondientes a las 5 subclases de HDL con base en marcadores de diámetro conocido. El análisis densitométrico e integración parcial en cada uno de los intervalos permite la estimación de la proporción relativa de cada una de las subpoblaciones de HDL expresadas como % de la proteína HDL total (Panel B).

Tinción enzimática de colesterol libre de las subpoblaciones de HDL

Se utilizó el mismo procedimiento que para el colesterol total pero omitiendo la enzima colesterol esterasa. Esto garantizará la cuantificación específica del colesterol libre.

Tinción enzimática de fosfatidilcolina de las subpoblaciones de HDL

Para realizar la detección selectiva de fosfatidilcolina sobre el gel de poliacrilamida se empleó una mezcla enzimática compuesta de fosfolipasa D (0.12 μ U/mL) y colina oxidasa (62 μ U/mL) en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4, colato de sodio (3 mM) y Tritón® 100X (0.1%). Se agregó además el agente viscosante (Figura 8). El H₂O₂, producto final de la secuencia de reacciones enzimáticas se puso en evidencia con

peroxidasa (1.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$), MTT (0.04 mM) y FMS (0.04mM)¹⁴⁹. El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica.

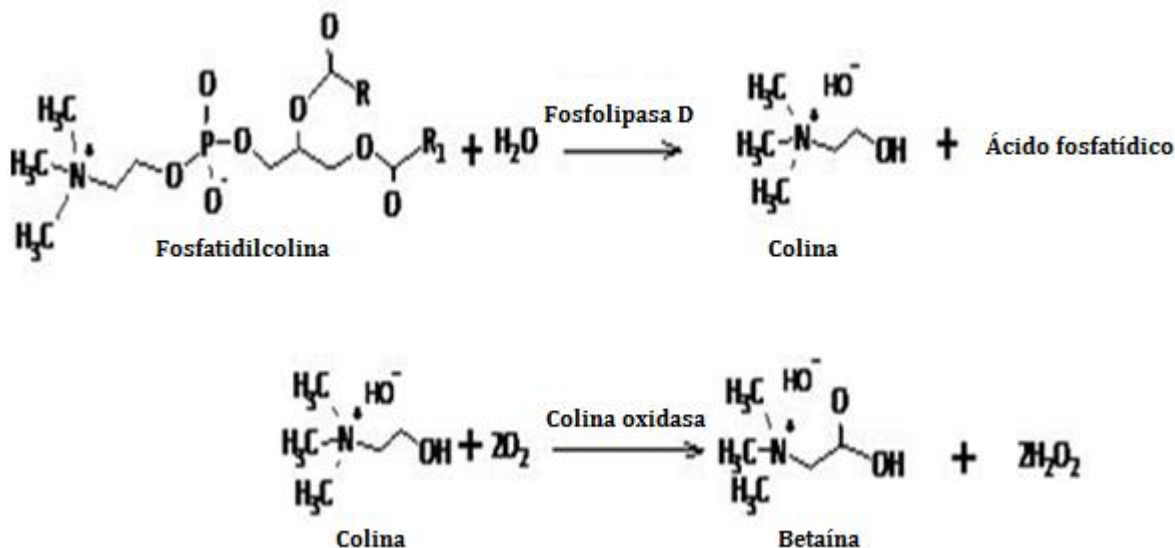


Figura 8. Reacciones enzimáticas para la determinación de fosfatidilcolina

Tinción enzimática de los triacilglicérols de las subpoblaciones de HDL

La mezcla enzimática está compuesta de lipasa (37.5 $\mu\text{U}/\text{mL}$), glicerol cinasa (0.1 $\mu\text{U}/\text{mL}$), glicerol-3-fosfato oxidasa (0.4 $\mu\text{U}/\text{mL}$) y peroxidasa (0.13 $\mu\text{U}/\text{mL}$) en solución amortiguadora de fosfatos 10mM, pH 7.4, colato de sodio (3 mM) y Tritón® 100X (0.1%). Se agregó el agente viscosante (figura 9). El H_2O_2 se puso en evidencia con MTT (0.04 mM) y FMS (0.04 mM)¹⁴⁹. El producto de reacción precipitó en el gel y se analizó por densitometría óptica.

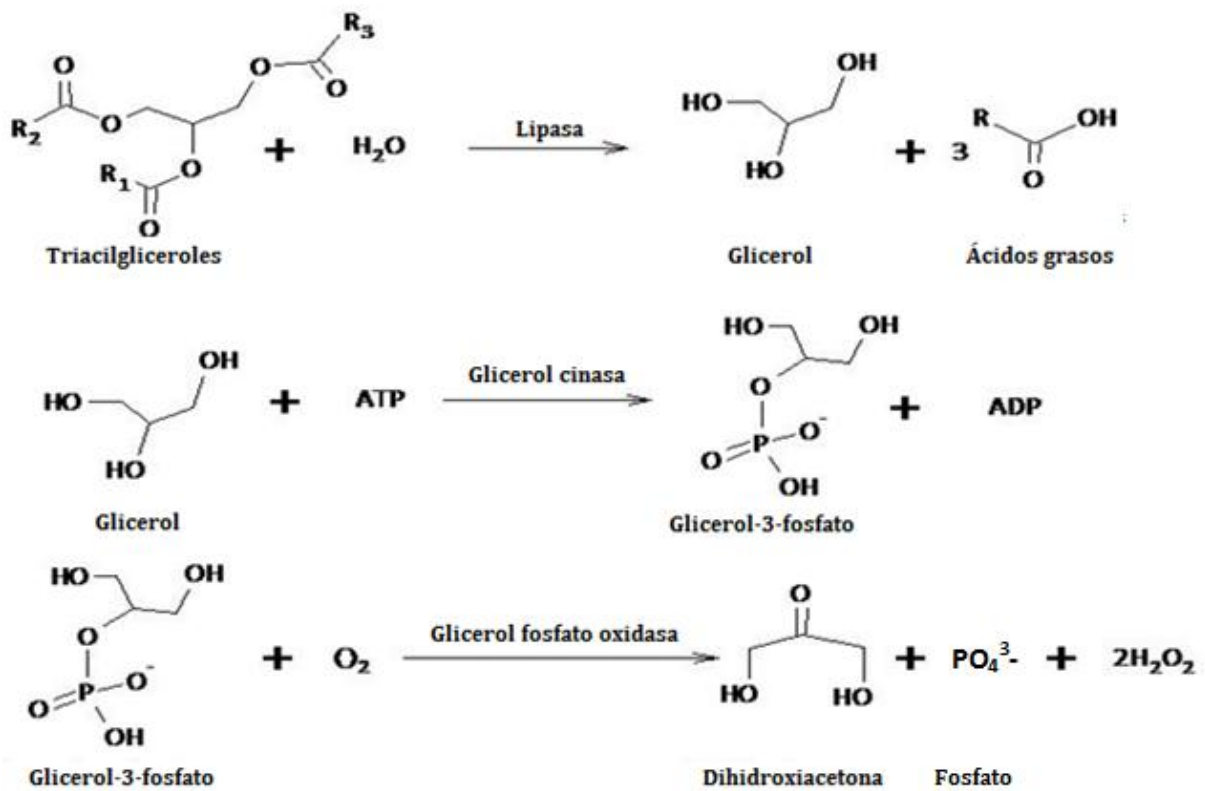


Figura9. Reacciones enzimáticas para la determinación de triacilgliceroles

Determinación de la concentración plasmática de los lípidos de las subpoblaciones de HDL

La concentración plasmática de cada uno de los lípidos (triacilgliceroles, fosfatidilcolina, colesterol total, libre y esterificado) de las HDL totales sirvió de referencia para calcular la concentración plasmática de cada subpoblación de HDL.

Para realizar esta determinación, las lipoproteínas que contienen apo B (VLDL, IDL, LDL) fueron precipitadas selectivamente con un reactivo comercial que contiene ácido fosfotúngstico/ cloruro de magnesio (Randox, UK) (Apéndice 2). El sobrenadante que resulta después de separar el precipitado, contiene a las HDL totales y en él se determinó la concentración de triacilgliceroles, fosfatidilcolina y colesterol total mediante métodos enzimáticos colorimétricos (Randox, UK) mientras que para desarrollar el color en la determinación de colesterol libre en fase acuosa por acción de la peroxidasa, se utilizó 4-aminoantipirina y 4-clorofenol (Apéndice 2).

La cuantificación se realizó espectrofotométricamente. La concentración del colesterol esterificado se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Colesterol esterificado} = (\text{Colesterol total} - \text{Colesterol Libre}) * 1.68$$

donde 1.68 corresponde al factor de conversión entre el peso molecular del colesterol y el colesterol esterificado.

La concentración plasmática obtenida para triacilglicerolos, fosfatidilcolina, colesterol total y libre es equivalente al 100% del área bajo la curva; de esta manera cada uno de los porcentajes relativos de las subclases de HDL obtenidos por integración parcial fueron expresados como valores absolutos de concentración plasmática¹⁴⁸, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{HDLn-L} = (\% \text{HDLn} \times \text{HDL-L}) / 100$$

donde n representa la subpoblación de HDL, %HDLn es el porcentaje relativo de cada subpoblación determinado por densitometría óptica y HDL-L es la concentración de cada lípido de HDL (colesterol total y libre, triacilglicerolos o fosfatidilcolina) determinada como se mencionó anteriormente en este apartado. La concentración de colesterol esterificado de cada subpoblación de HDL, se calculó con la misma fórmula descrita anteriormente para este lípido en las HDL totales, pero ahora utilizando la concentración obtenida del colesterol total y libre de cada subpoblación.

Determinación de la presencia de aterosclerosis

La presencia de placas aterosclerosas fue establecida mediante coronariografía y a través del puntaje SYNTAX. Este puntaje se emplea para evaluar no sólo la severidad y la extensión de las lesiones coronarias sino también la complejidad de éstas, en los sujetos con enfermedad trivascular, puntajes SYNTAX elevados (>33) son indicativos de una enfermedad más compleja y representan un gran reto terapéutico.

El puntaje SYNTAX se calculó con un programa computacional que consiste de doce preguntas secuenciales. Las cuales pueden dividirse en dos grupos. Las primeras tres determinan la dominancia, el número total de lesiones y los segmentos de los vasos involucrados por lesión. El máximo número de lesiones sumadas es doce y cada lesión puede involucrar uno o más segmentos. En este caso cada segmento del vaso involucrado

contribuye con el puntaje y no hay límite en el número de segmentos involucrados por lesión. Las nueve preguntas restantes se refieren a las características de las lesiones, tal como la presencia de oclusión total, el número de segmentos que se encuentran involucrados en la oclusión, la presencia de trifurcaciones o bifurcaciones, presencia de lesiones aorto-ostiales, la tortuosidad severa, longitud de lesión mayor a 20 mm, calcificación severa, presencia de trombos y una enfermedad difusa.

Un puntaje SINTAX ≥ 1 fue considerado para clasificar a los pacientes dentro del grupo de pacientes con EAC.

Muestras de tejido adiposo epicárdico

Las muestras de tejido adiposo epicárdico fueron almacenadas en Allprotect Tissue Reagent (Qiagen) y congeladas a -20°C hasta el momento de su extracción.

Extracción de RNA total

El RNA total fue extraído con el kit comercial RiboPure™ RNA Purification Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, el tejido adiposo epicárdico fue homogeneizado en trizol (por cada 100 mg de tejido se adicionaron 1000 μL de Trizol) con ayuda de un polytron. Las muestras fueron incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida fueron centrifugadas a 12 000 g durante 10 minutos a 4°C para eliminar la capa de lípidos formada en la superficie.

Se transfirió 1 mL del homogenizado a un tubo nuevo y se le adicionaron 200 μL de cloroformo, después de mezclar en vórtex, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 g, 10 minutos a 4°C , para separar la mezcla en fase orgánica, interfase y fase acuosa. Se transfirieron 400 μL de la fase acuosa a un tubo nuevo y se le adicionaron 200 μL de etanol. Se mezcló en vórtex y todo el contenido fue transferido a un filtro de fibra de vidrio incorporado a un tubo colector. Se centrifugó a 12 000 g, 30 s a temperatura ambiente, el infranadante fue desechado y se centrifugó una segunda vez para eliminar el exceso de etanol.

Se adicionaron 500 μL de solución de lavado, se centrifugó a 12 000 g, 30 s a temperatura ambiente y el infranadante fue desechado, este paso fue repetido una segunda vez. Se realizó una tercera centrifugación durante 30 segundos a temperatura ambiente para

eliminar los restos de solución de lavado. La membrana fue transferida a un tubo colector nuevo, se le adicionaron 100 μ L de buffer de elución, incubamos 2 minutos y centrifugamos a 12 000 g, 30 s. Finalmente, el RNA fue cuantificado espectrofotométricamente en el eluido a 260/280 nm.

Retrotranscripción

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 0.5 μ g de RNA utilizando el kit comercial SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Apéndice 3) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Ensayos de expresión

Cuantificación relativa con curva estándar

La expresión de los genes se realizó a través de PCR en tiempo real utilizando Taqman® Gene Expression Assay y el ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se construyó una curva estándar a partir de un pool de cDNA utilizando diluciones seriales 1:4, para cada gen blanco y el gen endógeno, en reacciones dúplex.

Los primers utilizados fueron SPP1, SPARC, TNFRSF11B, TNF (correspondientes al gen de *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* respectivamente) y como gen endógeno *GAPDH* (Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, CA) (Apéndice 4).

Las condiciones de amplificación fueron, incubación por 2 min a 50°C, la activación de la polimerasa 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de una desnaturalización por 15 segundos a 95°C y la alineación y extensión un minuto a 60°C.

El valor de Ct obtenido de cada muestra fue extrapolado en la curva estándar tanto para el gen blanco como para el gen endógeno, al sacar el antilogaritmo, el producto del cociente de la concentración del gen blanco entre el gen endógeno, corresponde al nivel de expresión de cada gen en cada muestra con respecto al gen endógeno.

Análisis estadístico

Los datos distribuidos normalmente, determinado con la prueba Kolmogorov-Smirnov, fueron expresados como la media \pm EE, mientras que las variables que no presentaron una distribución normal fueron reportadas como la mediana y el rango intercuartílico. Un

modelo lineal general multivariante fue utilizado para determinar el efecto del consumo de fármacos antilipídicos (estatinas) y la presencia de diabetes mellitus tipo 2. Los coeficientes de correlación entre la expresión de los genes estudiados y la composición y tamaño de las subpoblaciones de HDL así como el colesterol total, triacilglicéridos, glucosa, IMC y edad fueron determinados a través de la correlación de Spearman, ya que algunas de las variables evaluadas no siguen una distribución normal. Un modelo de regresión lineal múltiple por pasos sucesivos fue utilizado para examinar el impacto de las variables sobre la expresión de los genes. Las variables seleccionadas para el análisis de regresión fueron aquellas que correlacionaron significativamente con la expresión de los genes. Un análisis de regresión logística binaria fue realizado para la variable dependiente dicotómica presencia de placa aterosclerosa y como variable independiente la expresión de cada gen tomando como base la media de expresión agrupándolos en aquellos que están por arriba de la media y aquellos por debajo de ésta. La comparación entre grupos se realizó a través de una prueba t Student para muestras independientes (para datos cuya distribución fue normal) o U-Mann Whitney (para datos que no presentaron distribución normal) con una $P < 0.05$. Los análisis fueron realizados con SPSS (Inc, Chicago, IL, USA) versión 21.0.

RESULTADOS

La media de edad de los pacientes con estenosis valvular aórtica (controles) y enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) fue de 59.64 ± 2.22 y 63.10 ± 2.40 años respectivamente, la diferencia no fue estadísticamente significativa. El cuadro 1 muestra que los pacientes con EAC presentaron niveles menores, estadísticamente significativos de CT (22%), CT-HDL (18%), CE-HDL (37%) y C-LDL (26%) comparado con los controles.

Cuadro 1.- Datos antropométricos y parámetros bioquímicos evaluados en plasma

Parámetro	Control (n=14)	EAC (n=13)
IMC (Kg/m ²)	27.09 ± 1.07	27.76 ± 1.37
Estatina (sujetos)	7	11
DM2 (sujetos)	5	8
TAS (mmHg)	113.92 ± 4.84	$144.08 \pm 6.64^*$
Puntaje SYNTAX	0	10 (4.50-36.00)
Placa aterosclerosa	No	Si
CT (mg/dL)	141.20 ± 2.06	$109.99 \pm 2.46^\dagger$
TG (mg/dL)	96.74 ± 2.34	90.73 ± 5.04
G (mg/dL)	92.84 ± 1.70	$114.52 \pm 4.60^\dagger$
CT-HDL (mg/dL)	32.62 (28.77- 48.69)	26.60 (26.60 - 30.76)*
TG-HDL (mg/dL)	31.62 (24.48 - 32.26)	24.55 (24.55 - 25.24)
PH-HDL (mg/dL)	70.31 ± 2.76	66.89 ± 1.68
CL-HDL (mg/dL)	10.36 ± 0.97	11.77 ± 0.69
CE-HDL (mg/dL)	42.92 ± 3.59	$27.24 \pm 2.20^*$
C-LDL (mg/dL)	85.94 ± 4.13	$63.85 \pm 2.21^\dagger$

Los resultados son mostrados como la media \pm EE o mediana (Rango intercuartilico), las frecuencias son expresadas como N (%), las comparaciones fueron realizadas con una prueba t Student o una prueba U-Mann Whitney según el caso $^\dagger p < 0.001$ * $p < 0.05$

La concentración de CT, TG, PH, CL y CE de las HDL totales aisladas con el reactivo comercial que contiene ácido fosfotúngstico/ cloruro de magnesio (Randox, UK) no es suficiente para establecer posibles alteraciones a nivel de las diferentes subpoblaciones de HDL. Por tal motivo, es necesario determinar la concentración de los lípidos que conforman a las HDL por cada subpoblación. En este sentido, a pesar de que en las concentraciones plasmáticas de TG- y PH-HDL no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (Cuadro 1), a nivel de las subpoblaciones se presentó una mayor concentración de ambos lípidos en la subpoblación HDL2b y una concentración menor en las HDL3c en los EAC (Cuadro 2).

El cambio en las concentraciones plasmáticas del CT-HDL (Cuadro 1) indicaba posibles cambios a nivel de las subpoblaciones, y efectivamente, las HDL pequeñas (HDL3a, 3b y 3c) en los pacientes con EAC presentaron una concentración menor de este lípido con respecto a los controles; el CE es la especie responsable de dicha concentración (Cuadro 2).

Cuadro 2.- Concentración de las diferentes especies de lípidos asociados a las HDL

Parámetro (mg/dL)	Grupo	Subpoblación				
		HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
CT	Control	9.90 (8.52-13.88)	4.36 (3.89-6.53)	8.53 (7.56-13.13)†	5.05 (4.29-7.53)†	5.83 ± 0.44†
	EAC	9.50 (9.50-12.55)	4.07 (4.07-4.49)	6.72 (6.41-6.72)	3.71 (3.54-3.71)	3.45 ± 0.11
CL	Control	3.53 ± 0.35	1.46 ± 0.13	2.64 ± 0.23	1.40 ± 0.13	1.33 ± 0.14
	EAC	4.40 ± 0.31	1.77 ± 0.11	3.03 ± 0.19	1.41 ± 0.09	1.17 ± 0.08
CE	Control	10.86 ± 1.54	5.47 ± 0.69	11.15 ± 1.00†	6.62 ± 0.75*	7.28 ± 0.86*
	EAC	9.79 ± 2.68	3.95 ± 0.62	5.91 ± 0.20	3.67 ± 0.58	3.69 ± 0.73
TG	Control	8.30 (7.53-9.46)†	4.52 ± 0.54	8.04 ± 0.86	4.13 ± 0.46	4.37 ± 0.21*
	EAC	10.00 (9.97-10.00)	4.13 ± 0.55	7.04 ± 0.88	3.45 ± 0.57	2.98 ± 1.07
PH	Control	20.11 ± 0.90†	9.40 (7.48-10.62)	17.21 ± 0.75	11.23 ± 0.53†	12.75 ± 1.20†
	EAC	26.80 ± 1.16	10.15 (10.07-10.15)	16.19 ± 0.48	7.78 ± 0.11	6.35 ± 0.41

Los resultados son mostrados como la media ± EE o mediana (Rango intercuartílico), las comparaciones fueron realizadas con una prueba t Student o U- Mann Whitney †p<0.001 *p<0.05

Las diferencias en las concentraciones plasmáticas de los lípidos de las subpoblaciones de HDL sugiere una alteración en su estructura. Para abordar esta posibilidad determinamos el cociente C/PH y TG/PH de cada subpoblación; los fosfolípidos de las subclases de HDL son una estimación del número de partículas¹⁵⁰, por lo tanto, los cocientes son una aproximación del contenido de lípido por partícula. En el cuadro 3 se muestra la normalización del contenido de lípido por número de partícula, las HDL2b, 2a y 3a de los pacientes con EAC presentaron un empobrecimiento de colesterol total mientras que las HDL3c presentaron un enriquecimiento en este lípido. En contraste, no se observaron diferencias significativas en los cocientes TG/PH de las subpoblaciones entre los grupos de estudio (Cuadro 3).

Cuadro 3.- Cocientes colesterol/fosfatidilcolina y triacilglicerol/fosfatidilcolina de las subpoblaciones de HDL en controles y pacientes con EAC

Cociente	Grupo	Subpoblación				
		HDL 2b	HDL 2a	HDL 3a	HDL 3b	HDL 3c
CT/PH	Control	0.51 ± 0.02*	0.53 ± 0.02*	0.55 ± 0.01†	0.50 ± 0.04	0.48 ± 0.03*
	EAC	0.40 ± 0.03	0.44 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.47 ± 0.01	0.55 ± 0.01
TG/PH	Control	0.37 (0.36-0.56)	0.50 (0.39-0.61)	0.44 (0.40-0.56)	0.37 (0.35-0.38)	0.40 ± 0.05
	EAC	0.35 (0.35-0.37)	0.36 (0.36-0.37)	0.37 (0.37-0.39)	0.36 (0.36-0.41)	0.41 ± 0.09

Los resultados son mostrados como la media ± EE, prueba t Student y como la mediana (Rango intercuartilico), prueba U- Mann Whitney †p<0.001 *p<0.05

En la figura 10 se presenta La distribución relativa de las HDL determinada por su contenido de proteína según se describe en la sección de métodos. Los pacientes con EAC tienen una mayor y menor proporción de las HDL2b y 3c respectivamente.

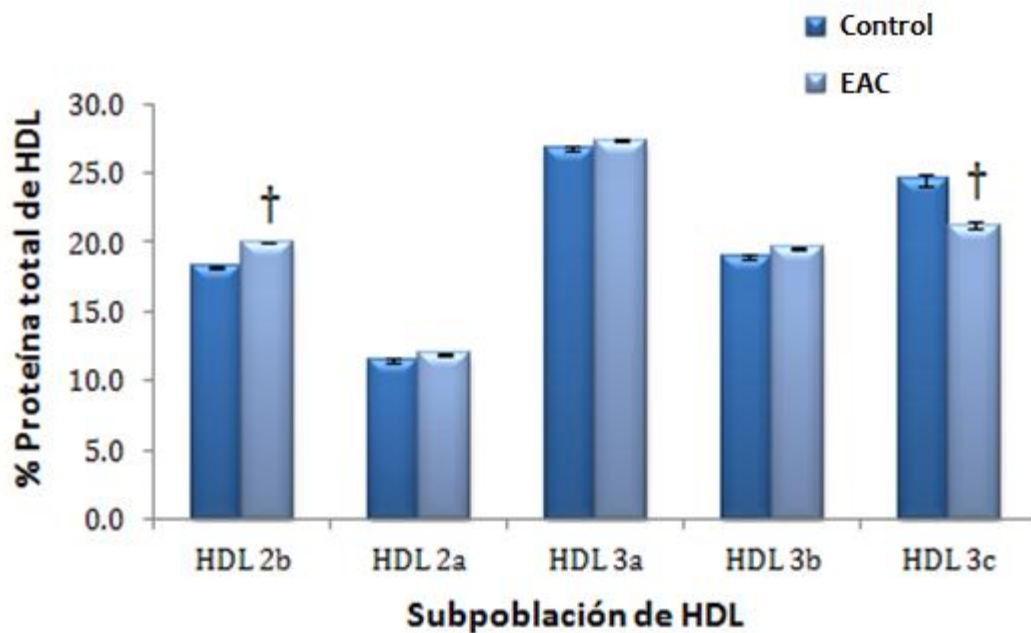


Figura 10.- Distribución relativa determinada por la fracción proteínica de las HDL. Los pacientes con EAC presentaron una distribución relativa de las subpoblaciones de HDL desplazada hacia partículas de mayor tamaño, de tipo 2b.

Media \pm EE t Student †p<0.01

La cuantificación relativa de los genes propuestos fue obtenida mediante el método de curva estándar utilizando como gen endógeno *GAPDH*. La *OPN* y *OPG* presentaron una expresión aproximadamente dos veces mayor en el TAE de los pacientes con EAC. Este mismo grupo presentó una menor expresión (33%) de *TNF- α* comparado con los controles (Figura 11).

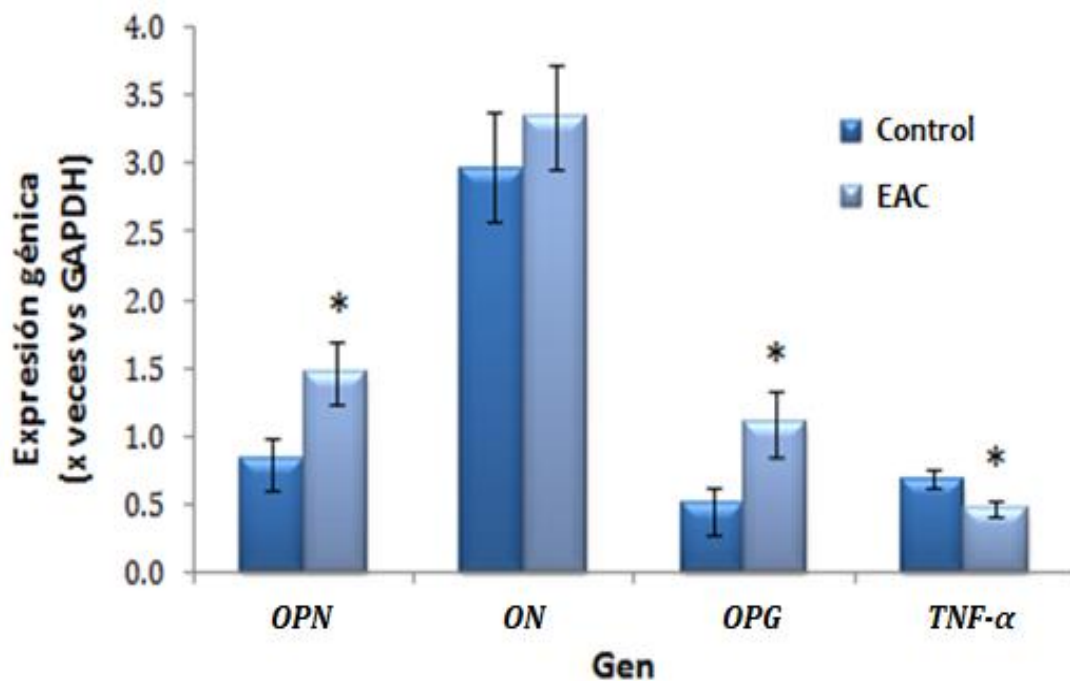


Figura 11.- Expresión de cada gen estudiado mediante la cuantificación relativa con curva estándar. Los genes que más se expresaron en el TAE de pacientes con EAC fueron OPN (procalcificante) y OPG (anti-calcificante).
Media \pm EE t Student *p<0.05

La evidencia ha demostrado en estudios in vitro, que las HDL son capaces de inducir la secreción de OPG así como la atenuación de la expresión de *TNF- α* en miofibroblastos de la válvula aórtica³⁷, por tal motivo, realizamos la correlación de la expresión génica de los genes estudiados con el tamaño y la composición de cada subpoblación de HDL para establecer si existe alguna asociación entre ellas (Cuadro 4).

La expresión del RNAm de *OPN* correlacionó positivamente con *OPG*, y ésta última correlacionó negativamente con el *TNF- α* . Esta correlación no sólo se observó con la proporción relativa de las subpoblaciones de HDL sino también con la concentración plasmática de algunos de sus lípidos (Cuadro 4).

Cuadro 4.- Análisis de correlación simple de Spearman de la expresión génica y la proporción relativa y concentración de lípidos de las subpoblaciones de HDL*

	<i>OPN</i>	<i>ON</i>	<i>OPG</i>	<i>TNF-α</i>
<i>OPN</i>			r = 0.458 p = 0.016	
<i>OPG</i>	r = 0.458 p = 0.016			r = -0.451 p = 0.018
CT				r = 0.398 p = 0.044
CL HDL			r = 0.409 p = 0.038	
Proteína 3a		r = 0.436 p = 0.026		
Proteína 3b		r = 0.393 p = 0.047		
Proteína 3c				r = 0.404 p = 0.041
CL HDL 2b		r = 0.400 p = 0.043	r = 0.447 p = 0.022	
CL HDL 2a		r = 0.400 p = 0.043	r = 0.447 p = 0.022	
CL HDL 3a		r = 0.409 p = 0.038	r = 0.394 p = 0.046	
CL HDL 3b		r = 0.409 p = 0.038	r = 0.394 p = 0.046	
CL HDL 3c		r = 0.451 p = 0.021		
TG HDL 2b	r = 0.436 p = 0.026			r = -0.393 p = 0.047
TG HDL 3c				r = 0.426 p = 0.030
CE HDL 3a				r = 0.484 p = 0.012

* Sólo se muestran las correlaciones estadísticamente significativas

Para identificar las variables independientes relacionadas con la expresión de los genes estudiados, realizamos un modelo de regresión lineal utilizando como variable dependiente el nivel de expresión del RNAm de los genes y como variables independientes aquellas que presentaron una correlación estadísticamente significativa (Cuadro 4).

El cuadro 5 muestra las variables independientes que fueron significativamente asociadas con la expresión de cada gen.

Cuadro 5.- Resumen de la Regresión lineal por pasos sucesivos

Gen		B	β	r^2	F	Significancia
<i>OPN</i>	Constante	0.802				
	<i>OPG</i>	0.504	0.429	0.184	5.419	0.018
<i>ON</i>	Constante	-18.023				
	Prot HDL 3b	1.099	0.493	0.243	7.690	0.011
<i>OPG</i>	Constante	0.330				
	<i>OPN</i>	0.365	0.429	0.184	5.419	0.029
<i>TNF - α</i>	Constante	0.035				
	CE HDL 3a	0.614	0.398	0.158	4.518	0.044

El análisis de regresión logística binaria fue realizado a partir de la presencia de ateroma como variable dependiente dicotómica, y como variables independientes dicotómicas los niveles de expresión de cada gen dividiéndolos en dos grupos, por abajo o arriba de su media. Los resultados obtenidos muestran que niveles de expresión de *OPN* mayores a 1.21 (media de expresión de esta gen) están asociados con la presencia de placas aterosclerosas (Cuadro 6).

Cuadro 6.- Relación de la presencia de ateroma, con la expresión de los genes

	Exp (B)	IC 95%	P
<i>OPN</i>	12.782	1.178-138.644	0.036

DISCUSIÓN

En este trabajo postulamos que el TAE puede ser una fuente de proteínas de secreción pro- y anti-calcificantes, las cuales pueden actuar a nivel paracrino sobre las arterias coronarias influyendo así en la calcificación del ateroma. En este contexto, demostramos que el TAE expresa RNAm de *OPN* y *TNF- α* (genes pro-calcificantes) así como de *ON* y *OPG* (genes anti-calcificantes). Además, los niveles de expresión se asociaron con la composición de las subpoblaciones de HDL sugiriendo que estas lipoproteínas participan en la regulación de la calcificación del ateroma.

Estudios previos han demostrado que la *OPN* tiene una elevada actividad pro-inflamatoria¹²⁹ y por tal razón esta proteína favorece el desarrollo de la placa aterosclerosa. La *OPN* se expresa abundantemente en lesiones aterosclerosas con y sin presencia de calcio pero no se ha demostrado su presencia en arterias normales²⁷. En este contexto, los elevados niveles de expresión de *OPN* en el TAE de los pacientes con EAC comparados con los del grupo control son consistentes con la presencia de las placas aterosclerosas.

Por otra parte, se ha demostrado que el *TNF- α* contribuye con la progresión del ateroma⁸⁵⁻⁸⁷. Paradójicamente, el nivel de expresión del *TNF- α* fue menor en el TAE de los pacientes con EAC en comparación con el de los controles. Esta aparente paradoja sugiere la necesidad de determinar los tipos celulares que están presentes en el TAE, principalmente los adipocitos y los macrófagos, ya que en condiciones patológicas, la celularidad se modifica y con ello, la expresión de diferentes genes. Además, dado que el RNAm no se traduce en su totalidad, la determinación de las proteínas también se hace necesaria. Previamente mencionamos que *OPN* sufre corte y empalme y modificaciones post-traduccionales¹²⁹, motivo por el cual, la determinación proteica es relevante. A nuestro conocimiento no existen estudios en donde se hayan determinado las diferentes isoformas de *OPN* así como los fragmentos generados a través de escisiones enzimáticas y la fosforilación de éstos. De esta manera, la cuantificación del RNAm es un eslabón importante para dilucidar el papel de las diferentes proteínas de secreción propuestas en este estudio; sin embargo, la demostración de la expresión proteínica, incluyendo isoformas, debe ser analizada en estudios futuros.

En cuanto a la expresión de *ON*, ésta no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio. No obstante, el gen de la *ON* fue el que más se expresó con respecto a los otros tres. Hirota *et al.*, encontraron una relación inversa de la expresión del RNAm de *ON* con la severidad de la aterosclerosis y la calcificación de la placa³⁷, sugiriendo que la proteína podría actuar como un inhibidor de la calcificación. Sin embargo, aún no se conoce el papel de *ON* en esta patología. En consecuencia, la determinación del RNAm y la cuantificación de la proteína podría ayudar a establecer su relación con la lesión aterosclerosa.

El papel anticalcificante de *OPG* ha sido propuesto ampliamente y se ha demostrado que su presencia disminuye en placas aterosclerosas calcificadas^{69,72,77-79}. En contraste con estas observaciones, la expresión de *OPG* en el TAE de los pacientes con EAC fue alrededor de dos veces mayor que en los controles. La expresión de *OPG* es inducida por *OPN* y el TNF- α ⁶⁸; de acuerdo con esta evidencia, el análisis de regresión lineal mostró que la *OPN* es el principal factor independiente asociado con la expresión de *OPG*, sugiriendo que la expresión elevada de *OPG* en los sujetos con EAC puede ser el producto de la expresión elevada de *OPN*. Sin embargo, hacen falta estudios específicamente diseñados para demostrar esta posible asociación.

Recientemente, se ha propuesto la participación de las HDL en la atenuación de la calcificación a través de la inhibición de la expresión del TNF- α e inducir la secreción de *OPG* por parte de las HDL3 principalmente⁷⁷. En este contexto, nuestros resultados muestran que la distribución relativa de tamaños (determinada por proteína) de las subpoblaciones se desplazó hacia partículas HDL2b mientras que la distribución de las HDL3c fue menor en los pacientes con EAC. Esta alteración en la distribución de tamaños sugiere una alteración en su metabolismo y por ende, en su composición química.

La relevancia clínica de los niveles circulantes de las subpoblaciones de HDL en la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular aún no es clara. Algunos autores como Lamarche¹⁵¹ y Salonen¹⁵² proponen que el efecto cardioprotector de los niveles elevados de HDL son atribuidos a la subpoblación HDL2, inversamente, Stampfer¹⁵³ y Sweetnam¹⁵⁴ encontraron a las HDL3 como el predictor más fuerte de enfermedad isquémica. La discrepancia en el rol jugado por las subpoblaciones de HDL obliga a estudiar no sólo la distribución de las subpoblaciones sino también su composición ya que alteraciones en

ambos han sido asociadas con enfermedades tales como resistencia a la insulina o síndrome metabólico^{155,156}. Por tal motivo, la composición lipídica de las HDL también fue determinada.

Los sujetos con EAC presentaron concentraciones de CT-HDL menores con respecto a los controles, siendo el CE la especie responsable de las alteraciones observadas en la concentración del CT-HDL. Dado que el colesterol contenido en las HDL se puede alterar con la presencia de ciertas patologías así como con tratamientos farmacológicos (inhibidores de CETP, fibratos, tiazolidindionas), la sola determinación del CT-HDL no es suficiente para considerarlo un buen marcador de riesgo de la EAC, es por ello, que hay una creciente necesidad de identificar otras características de las HDL que denoten mejor la cantidad y función de estas lipoproteínas.

Por tal motivo, determinamos cada uno de los lípidos que conforman a estas partículas en las diferentes subpoblaciones. De estos lípidos, la fosfatidilcolina es esencial para mantener la estructura de las lipoproteínas y los tamaños de éstas están directamente relacionados con el número de moléculas constitutivas de fosfolípidos¹⁵⁰. Por lo tanto, el incremento en las concentraciones plasmáticas de la fosfatidilcolina de las HDL2b en los sujetos con EAC puede ser interpretado como un mayor número de partículas HDL2b por volumen de plasma comparado con los controles.

La relación TG/PH y CT/PH refleja la composición de las HDL, de esta manera, nuestros resultados muestran que no hay alteración en la relación TG/PH en los pacientes con EAC y parecerían inconsistentes con las concentraciones elevadas y bajas de TG de las HDL2b y 3c respectivamente, en comparación con los controles. Sin embargo, debemos tomar en cuenta que las concentraciones plasmáticas de TG y PH para las HDL2b y 3c fueron mayores o menores respectivamente, en proporción similar, y como consecuencia no se observa un cambio en su relación. Por otro lado, la concentración de CT plasmático de las HDL3a, 3b y 3c fue menor en los pacientes con EAC y como consecuencia la relación CT/PH siguió la misma tendencia, particularmente para las HDL2b, 2a y 3a. Por lo cual, sólo hay un empobrecimiento de colesterol en las HDL2b, 2a y 3a así como un enriquecimiento de este lípido en las HDL3c sin cambios en la proporción de TG.

Dada la controversia existente del potencial anti-aterogénico de las HDL la correlación de la expresión del RNAm de *OPN*, *TNF- α* (genes pro-calcificantes) y *ON*, *OPG* (genes anti-calcificantes) con el tamaño y composición de estas partículas, mostró estadísticamente que el tamaño de las HDL3a y 3b así como el CL de todas las subpoblaciones tienen una relación positiva con la expresión de *ON*, mientras que sólo el CL de las cinco subpoblaciones presentó una asociación positiva con *OPG*. Por otro lado, los TG de las 2b correlacionaron negativamente con la expresión del *TNF- α* a diferencia de los TG de las 3c y el CE de las 3a cuya correlación fue positiva. En cuanto a la expresión de *OPN*, ésta presentó una correlación positiva con los TG de las HDL2b. En conjunto, nuestros resultados indican que no sólo el tamaño determinado por proteína sino también la composición lipídica de las HDL están relacionados estadísticamente con la expresión de *OPN*, *TNF- α* , *ON* y *OPG*, apoyando la necesidad de determinar ambos parámetros de estas partículas.

Después de tomar en consideración las variables que pudieran estar relacionadas con la expresión de los diferentes genes, tales como género, edad, perfil de lípidos, tamaño y composición de las subpoblaciones de HDL entre otros, el valor de beta en el análisis del modelo de regresión lineal indicó que por cada unidad que cambien el % de HDL3b y la concentración de CE-HDL3a se espera un incremento medio de 0.493 y 0.398 veces en la expresión de *ON* y *TNF- α* , respectivamente. Asimismo, *OPN* es la variable que mejor explicó la expresión de *OPG* y viceversa, sugiriendo una estrecha relación entre ellas.

Finalmente, debido a que no existen estudios previos que relacionen la expresión de *OPN* en el TAE con la presencia del ateroma, no hay un valor determinado que sirva como base para establecer un punto de comparación entre niveles elevados o bajos de expresión. Por tal motivo, la media de expresión de cada gen fue tomada como punto base para dividir a los pacientes en dos grupos, aquellos que tuvieran niveles de expresión inferiores a la media y pacientes cuya expresión fuera mayor a ésta. De esta manera, determinamos si existía una relación con la presencia o ausencia de aterosclerosis y los niveles de expresión de cada gen. El análisis de regresión logística mostró que los pacientes que tienen una expresión de *OPN* mayor a 1.21 tienen una asociación positiva con la presencia de aterosclerosis sugiriendo la contribución de este gen en el desarrollo de aterosclerosis, sin embargo, es necesario aumentar el número de sujetos en ambos grupos de estudio.

En la figura 11 se resumen las acciones de las proteínas que codifican los genes estudiados y cuya expresión fue estadísticamente significativa. Brevemente, OPN, OPG y TNF- α originadas en el TAE difunden hacia el espacio subendotelial de las arterias coronarias en donde llevan a cabo sus funciones. OPN se une a los macrófagos infiltrados en la placa vía integrinas ($\alpha 4\beta 1$) y actúa como un potente quimioatrayente de monocitos y células T hacia la lesión. Por otro lado, el TNF- α induce la expresión de moléculas de adhesión (VCAM, ICAM-1, MCP, entre otras) en las células endoteliales, favoreciendo la infiltración de monocitos circulantes, lo que promueve y exagera el proceso inflamatorio y desarrollo del ateroma. Otra de las acciones del TNF- α es su capacidad para estimular la secreción de BMP-2 en las células endoteliales; esta proteína actúa en las células de músculo liso adyacentes ocasionando su diferenciación osteogénica y con ello, la calcificación de la placa. La interacción de RANKL con RANK también induce la secreción de BMP-2 favoreciendo aún más la diferenciación de las células de músculo liso. La producción de BMP-2 puede ser inhibida a través de la unión RANKL- OPG. OPG al unirse con TRAIL evita la formación de cuerpos apoptóticos que son sitios de nucleación para la mineralización, la unión de OPG con RANKL y TRAIL favorece la atenuación de la calcificación del ateroma.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, los niveles de expresión elevados de *OPN* en el TAE de los pacientes con EAC son consistentes con la presencia de placa aterosclerosa. El TAE de estos pacientes es fuente de *OPG*, cuya proteína puede proteger de la calcificación, la relación entre la expresión y secreción de OPG en el TAE y la presencia de calcio arterial coronario será evaluada en estudios posteriores. Por último, a diferencia de lo que esperábamos, la expresión del *TNF- α* fue menor con respecto a los controles; sin embargo, en vista de que no todo el RNAm se traduce, es posible que a pesar de una expresión mayor de RNAm de *TNF- α* en los sujetos control, la expresión de la proteína no sea mayor, por lo cual, es necesaria la determinación de las proteínas que codifican estos genes de manera local.

La relación de las HDL 3b y 3a con la expresión de *ON* y el *TNF- α* respectivamente, sugiere que las HDL pueden regular la expresión de genes en el TAE. Estudios posteriores con adipocitos en cultivo deberán establecer si la relación observada en este trabajo entre las subpoblaciones de HDL y la expresión y secreción de las proteínas involucradas en la calcificación del ateroma es casual o causal.

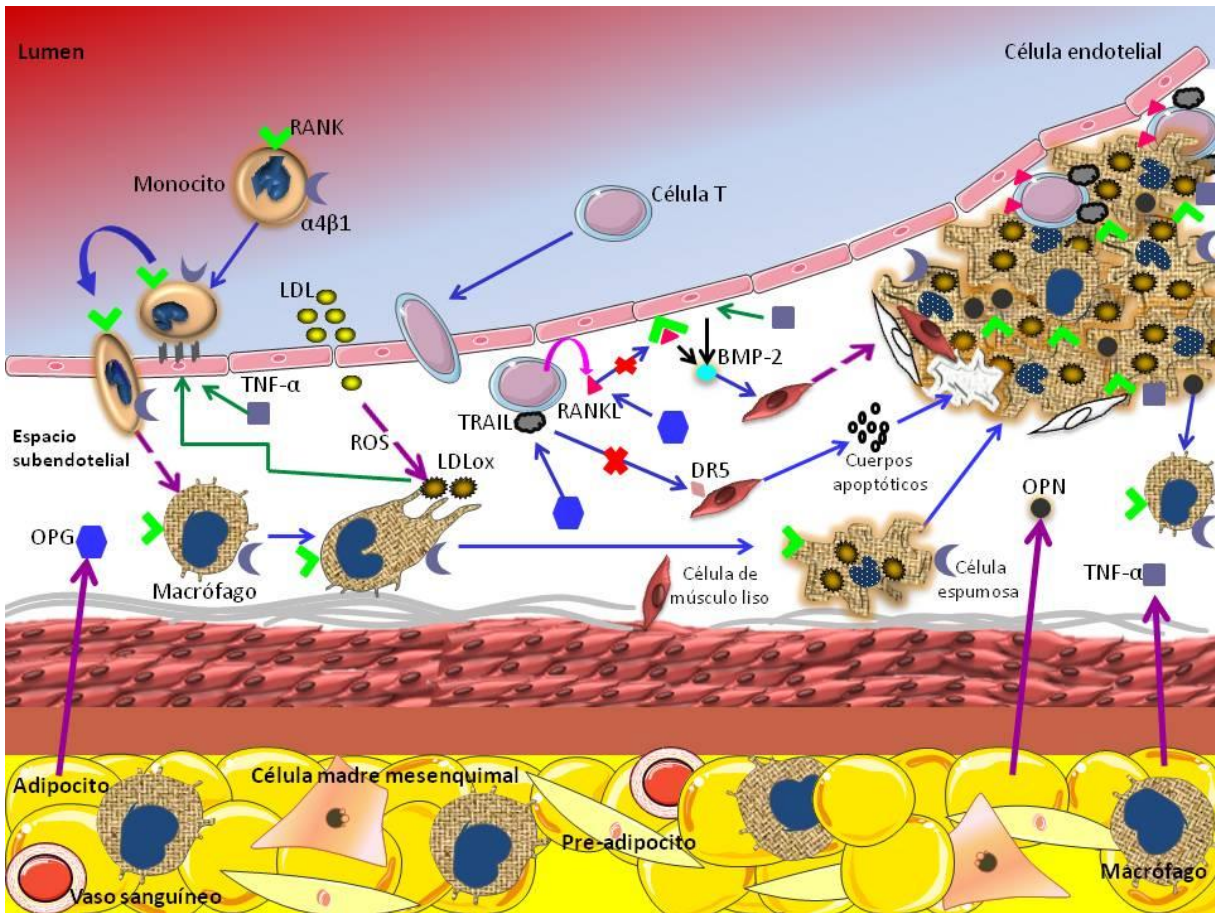


Figura 11.- Diagrama esquemático de la función de las proteínas codificadas por los genes analizados en el TAE. OPN promueve el desarrollo del ateroma a través de su acción quimioatrayente de monocitos y células T circulantes; el TNF- α contribuye con la progresión del ateroma, a través de inducir la producción de moléculas de adhesión así como de proteínas que favorecen la diferenciación osteogénica de las células de músculo liso; OPG atenúa la progresión del ateroma, al unirse a RANKL y TRAIL, evitando la formación de sitios de nucleación para la mineralización.

Las líneas continuas moradas indican la secreción de las proteínas codificadas por los genes analizados en el TAE; las líneas punteadas corresponden a la diferenciación que sufren los monocitos y las células de músculo liso; las líneas azules indican la dirección de los eventos una vez que los ligandos se unen a sus receptores; las líneas verdes representan el estímulo de TNF- α y LDL oxidadas sobre las células endoteliales; las líneas negras corresponden al producto de la estimulación o de la unión ligando-receptor.

OPN: osteopontina; OPG: osteoprotegerina; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF; RANKL: ligando del receptor activador del factor nuclear kappa B; RANK: receptor activador del factor nuclear kappa B; BMP-2: proteína morfogenética ósea 2; DR5: receptor de muerte 5.

CONCLUSIÓN

En este estudio demostramos que el TAE expresa RNAm de *OPN* y *TNF- α* (genes pro-calcificantes) así como de *ON* y *OPG* (genes anti-calcificantes), de los cuales, el RNAm de *OPN* se asoció con la presencia de placa aterosclerosa determinada a través del puntaje SYNTAX. Asimismo, demostramos que la distribución y composición de las subpoblaciones de HDL tienen una correlación estadística con la expresión de *OPN*, *TNF- α* , *ON* y *OPG*. Estos resultados sugieren una participación activa del TAE en el desarrollo del ateroma y justifica la determinación del volumen del TAE en la evaluación del riesgo cardiovascular.

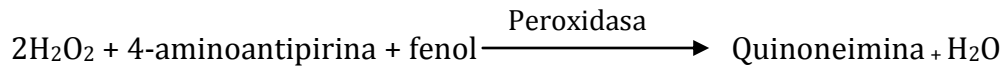
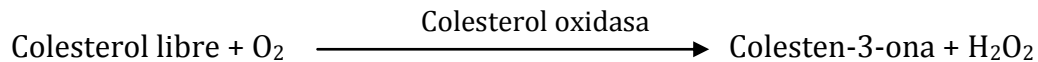
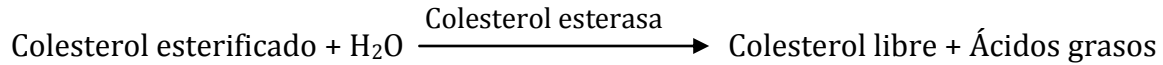
PERSPECTIVAS

- Ampliar el número de muestras de TAE de ambos grupos de estudio
- Incluir sujetos con calcio arterial coronario determinado mediante tomografía computarizada
- Determinar el volumen del TAE mediante ecocardiografía
- Realizar cultivo primario de adipocitos del TAE de los pacientes con estenosis valvular aórtica, con EAC y con calcio arterial coronario e incubarlo con HDL aisladas de diferentes orígenes (HDL de los mismos pacientes y HDL de sujetos sanos) y determinar la expresión de *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* a través de RT-PCR
- Realizar cultivo primario de adipocitos del TAE de los pacientes con estenosis valvular aórtica, con EAC y con calcio arterial coronario e incubarlo con HDL de diferentes orígenes (HDL de los mismos pacientes y HDL de sujetos sanos) y determinar la secreción de *OPN*, *ON*, *OPG* y *TNF- α* en el medio de cultivo mediante ELISA o Western blot.

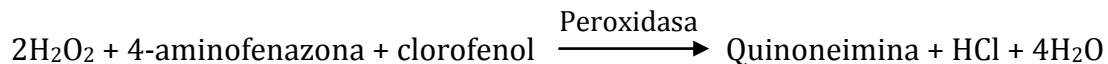
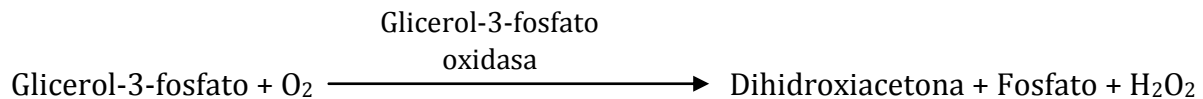
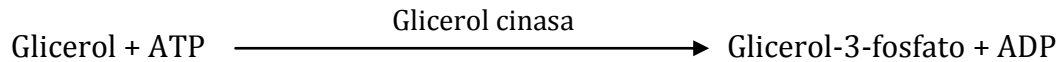
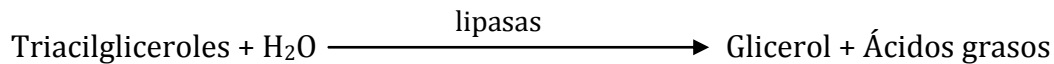
APÉNDICE

I.- Determinación de la concentración de colesterol total, triacilgliceroles y glucosa por métodos enzimáticos colorimétricos en plasma

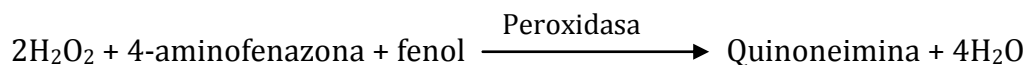
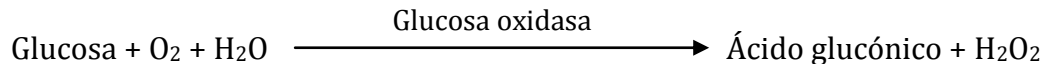
- **Reacciones enzimáticas para la determinación de colesterol total**



- **Reacciones enzimáticas para la determinación de triacilgliceroles**



- **Reacciones enzimáticas para la determinación de glucosa**



1.- Adicionar en cada celda lo correspondiente a la siguiente tabla

Celda	Agua	Estándar	Muestra†
Blanco	10 µL		
Estándar*		10 µL	
Muestra			10 µL

*Dependiendo de la determinación usar colesterol total, triacilgliceroles o glucosa.

† Plasma

2.- Adicionar en cada celda 1 mL del reactivo comercial, el cual contiene las enzimas necesarias para cada determinación (colesterol total, triacilgliceroles y glucosa)

3.- Mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente

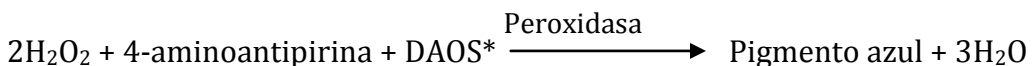
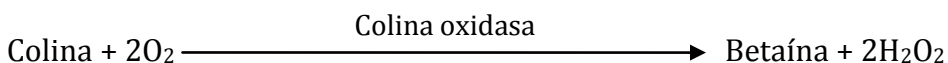
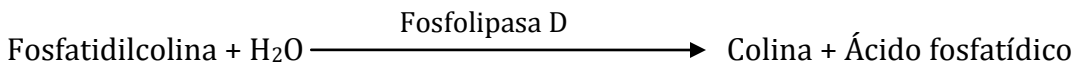
4.- Leer la absorbancia a 500 nm

5.- Determinar la concentración de cada analito

$$\text{Concentración del analito } \left(\frac{mg}{dL}\right) = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Absorbancia del estándar}} \times \text{Concentración del estándar } \left(\frac{mg}{dL}\right)$$

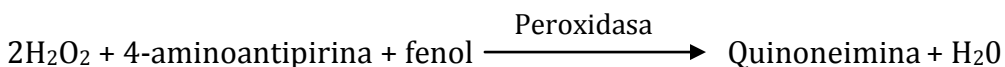
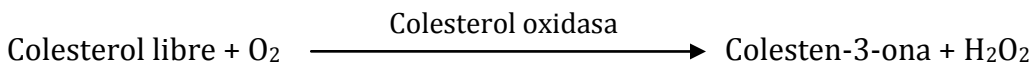
II.- Determinación de la concentración de colesterol total, triacilgliceroles, fosfatidilcolina y colesterol libre de HDL

- **Reacciones enzimáticas de la determinación de fosfatidilcolina**



* N-etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoxianilina sódica

- **Reacciones enzimáticas para colesterol libre**



- 1.- Por cada 100 μL de plasma adicionar 250 μL del reactivo precipitante de HDL
- 2.- Mezclar e incubar por 10 min a temperatura ambiente
- 3.- Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 min
- 4.- Separar el sobrenadante (en el sobrenadante se encuentran las HDL)
- 5.- Adicionar en cada celda lo correspondiente a la siguiente tabla

5.1- Determinación de la concentración de colesterol total y fosfatidilcolina

Celda	Agua	Estándar	Muestra†
Blanco	50 μL		
Estándar*		50 μL	
Muestra			50 μL

* Dependiendo de la determinación usar colesterol total o fosfolípidos

† Sobrenadante

5.2- Determinación de la concentración de triacilgliceroles

Celda	Agua	Estándar	Muestra†
Blanco	100 μL		
Estándar		100 μL	
Muestra			100 μL

† Sobrenadante

- 6.- Adicionar 1 mL del reactivo comercial (en donde se encuentran las enzimas) correspondiente al lípido a cuantificar
- 7.- Mezclar e incubar 30 min a temperatura ambiente
- 8.- Leer la absorbancia a 500 nm para colesterol total y triacilgliceroles, para fosfatidilcolina leer a 600 nm

5.3.- Determinación de la concentración de colesterol libre HDL

- 1.- Adicionar por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos lo correspondiente a la siguiente tabla

	Blanco	10 mg/dL	12.5 mg/dL	15 mg/dL	17.5 mg/dL	20 mg/dL	Muestra†
H2O (μL)	50	45	43.75	42.5	41.25	40	-
Estándar (μL)	-	5	6.25	7.5	8.75	10	-
Muestra (μL)	-	-	-	-	-	-	50 μL

† Sobrenadante

1.1.- Preparación de la solución A para la cuantificación de colesterol libre de HDL

Reactivo	Cantidad 10X
4-Aminoantipirina	0.0088 g
Ácido cólico	0.0421 g
Fenol	0.1273 g
Triton	100 µL
PBS-SSI 10X	cbp 10 mL

1.2.- Tomar un mililitro de la solución A, y adicionar 10 mL de SSI

1.3.- Adicionar 50 µL de colesterol oxidasa (0.05 µU/mL) y 15 µL de peroxidasa (0.25 µU/mL)

1.4.- Mezclar suavemente el reactivo (Solución B)

2.-Adicionar 200 µL de la solución B

3.- Mezclar e incubar 30 min a temperatura ambiente

4.- Leer la absorbancia a 500 nm

5.- Determinar la concentración de los analitos analizados con ayuda de la curva patrón

$$\text{Concentración } \left(\frac{mg}{dL} \right) = \frac{y - b}{m} \times 3.5$$

3.- Retrotranscripción

1.- Para cada reacción, se combinan los siguientes componentes en un tubo en hielo

5X VILO Reaction Mix	4 µL
10X SuperScript Enzyme Mix	2 µL
RNA (hasta 2.5 µg)	x µL
Agua libre de nucleasas cbp	20 µL

2.- Mezclar el contenido suavemente

3.- Incubar a 25°C por 10 minutos

4.- Incubar a 42°C por 60 minutos

5.- Terminar la reacción a 85°C por 5 minutos

6.- Cuantificar el RNA obtenido espectrofotométricamente a 260/280

7.- Almacenar a -20°C hasta su uso

4.- Cuantificación relativa por curva estándar

1.- Realizar diluciones seriales de un pool de cDNA, al menos cinco puntos.

2.- Colocar 4 µL de cada dilución por triplicado en la placa de PCR

3.- Diluir las muestras de cDNA a una concentración tal que se encuentre dentro de la curva de calibración

4.- Colocar 4µL de cada muestra por triplicado en la placa

5.- Preparar la siguiente mezcla de reacción: (Preparar siempre para una reacción extra)

	Para una reacción (16 µL)
TaqMan Gene Expression Assay (20X VIC)	1 µL
TaqMan Gene Expression Assay (20X FAM)	1 µL
TaqMan Gene Expression Master Mix (2X)	10 µL
Agua libre de nucleasas cbp	4 µL

5.- Mezclar suavemente, cuidando de no formar burbujas

6.- Añadir 16 µL de la mezcla de reacción a cada pozo y mezclar suavemente para no formar burbujas

7.- Asegurarse de sellar completamente la placa

8.- Programar el termociclador con las siguientes condiciones: incubación por 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y un minuto a 60°C.

BIBLIOGRAFÍA

1. www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/infoepid/publicaciones2011.html. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2010.
- 2.- Secretaría de Salud Norma Oficial Mexicana NOM-037-SSA2-2012. Para la prevención, tratamiento y control de las dislipidemias.
- 3.- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 5134-5138.
- 4.- Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-261.
- 5.- Seifert PS, Kazatchine MD: Generation of complement anaphylatoxins and C5b-9 by crystalline cholesterol oxidation derivatives depends on hydroxyl group number and position. *Mol Immunol* 1987; 24: 1303-1308.
- 6.- Torzewiski J, Oldroyd R, Lachman P, Fitzimmons C, Proufoot D, Bowyer D: Complement-induced release of monocyte chemotactic protein-1 from human smooth muscle cells. A possible initiating event in atherosclerotic lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16: 673-677.
- 7.- Gadner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and woman. *J Am Med Assoc* 1996; 276: 875-881.
- 8.- Alexopoulos N, Raggi Paolo. Calcification in atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 681-688.
- 9.- Wang L, Nancollas GH, Henneman ZJ. Nanosized particles in bone and dissolution insensitivity of bone mineral. *Biointerphases* 2006; 1: 106-111.
- 10.- Campbell AK. Calcium as an intracellular regulator. *Proc Nutr Soc* 1990; 49: 51-56.

- 11.- Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, de Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P. Calcium signalling- An overview. *Semin Cell Dev Biol* 2001; 12: 3-10.
- 12.- Davies M. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996; 94: 2013-2020.
- 13.- Rumberger JA, Simons DB, Fitzpatrick LA, Sheedy PF, Schwartz RS. Coronary artery calcium area by electron-beam computed tomography and coronary atherosclerotic plaque area. A histopathologic correlative study. *Circulation* 1995; 92 (8): 2157-2162.
- 14.- Doherty TM, Detrano RC. Coronary arterial calcification as an active process: a new perspective on an old problem. *Calcif Tissue Int* 1994; 54: 224-230.
- 15.- Demer LL, Watson KE, Boström K. Mechanism of calcification in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 1994; 4 (1): 45-49.
- 16.- Trion A, van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J* 2004; 147 (5): 808-814.
- 17.- Wallin R, Wajih N, Greenwood GT, Sane DC. Arterial calcification: a review of mechanisms, animal models, and the prospects for therapy. *Med Res Rev* 2001; 21 (4): 274-301.
- 18.- Tousoulis D, Siasos G, Maniatis K, Oikonomou E, Vlasis K, Papavassiliou A.G., Stefanadis C. Novel biomarkers assessing the calcium deposition in coronary artery disease. *Curr Med Chem* 2012; 19 (6): 901-920.
- 19.- Wolak T. Osteopontin-A multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 2014; 236: 327-337.
- 20.- Okamoto H. Osteopontin and cardiovascular system. *Mol Cell Biochem* 2007; 300: 1-7.
- 21.- Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107 (9): 1055-1061.

- 22.- Katagiri YU, Sleeman J, Fujii H, Herrlich P, Hotta H, Tanaka K, Chikuma S, Yagita H, Okumura K, Murakami M, Saiki I, Chambers AF, Uede T. CD44 variants but not CD44s cooperate with β 1-containing integrins to permit cells to bind to osteopontin independently of arginine-glycine-aspartic acid, thereby stimulating cell motility and chemotaxis. *Cancer Res* 1999; 59 (1): 219–226.
- 23.- Christensen B, Petersen TE, Sorensen ES. Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J*. 2008; 411 (1): 53-61.
- 24.- Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000; 275 (26): 20197-20203.
- 25.- Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol* 2006; 16 (2): 79-87
- 26.- Ramaiah SK, Rittling S. Pathophysiological role of osteopontin in hepatic inflammation, toxicity, and cancer. *Toxicol Sci* 2008; 103 (1): 4-13.
- 27.- Steinman L, Martin R, Bernard C, Conlon P, Oksenberg JR. Multiple sclerosis: deeper understanding of its pathogenesis reveals new targets for therapy. *Annu Rev Neurosci* 2002; 25: 491-505.
- 28.- Zandman- Goddard G, Shoenfeld Y. SLE and infections. *Clin Rev Allergy Immunol* 2003; 25 (1): 29-40.
- 29.- Xu G, Nie H, Li N, Zheng W, Zhang D, Feng G, Ni L, Xu R, Hong J, Zhang JZ. Role of osteopontin in amplification and perpetuation of rheumatoid synovitis. *J Clin Invest* 2005; 115 (4): 1060-1070.
- 30.- Zhao X, Johnson JN, Singh K, Singh M. Impairment of myocardial angiogenic response in the absence of osteopontin. *Microcirculation* 2007; 14 (3): 233-240.
- 31.- Ohsuzu F. The roles of cytokines, inflammation and immunity in vascular diseases. *J Atheroscler Thromb* 2004; 11 (6): 313-321

- 32.- Woodruff PG, Koth LL, Yang YH, Rodríguez MW, Favoreto S, Dolganov GM, Paquet AC, Erle DJ. A distinctive alveolar macrophage activation state induced by cigarette smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172 (11): 1383-1392.
- 33.- Banerjee A, Apte UM, Smith R, Ramaiah SK. Higher neutrophil infiltration mediated by osteopontin is a likely contributing factor to the increased susceptibility of females to alcoholic liver disease. *J Pathol* 2006; 208 (4): 473-485.
- 34.- Xanthou G, Alissafi T, Semitekolou M, Simoes DC, Economidou E, Gaga M, Lambrecht BN, Lloyd CM, Panoutsakopoulou V. Osteopontin has a crucial role in allergic airway disease through regulation of dendritic cell subsets. *Nat Med* 2007; 13 (5): 570-580.
- 35.- Kubota T, Zhang Q, Wrana JL, Ber R, Aubin JE, Butler WT, Sodek J. Multiple forms of SPP1 (secreted phosphoprotein, osteopontin) synthesized by normal and transformed rat bone cell populations: regulation by TGF-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162(3):1453-1459
- 36.- Isoda K, Kamezawa Y, Ayaori M, Kusuhara M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin transgenic mice fed a high-cholesterol diet develop early fatty-streak lesions. *Circulation* 2003, 107 (5): 679-681.
- 37.- Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002; 91 (1): 77-82.
- 38.- Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akinon M, Sugawara T, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Denhardt D, Kitabatake A, Uede T. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (6): 1029-1034.
- 39.- Ström A, Franzén A, Wängnerud C, Knutsson AK, Heinegard D, Hultgardh-Nilsson A. Altered vascular remodeling in osteopontin-deficient atherosclerotic mice. *J Vasc Res* 2004; 41 (4): 314-322.
- 40.- Bruemmer D, Collins AR, Noh G, Wang W, Territo M, Arias-Magallona S, Fishbein MC, Blaschke F, Kintscher U, Graf K, Law RE, Hsueh WA. Angiotensin II-accelerated

atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 112 (9): 1318-1331.

41.- Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim H-M, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol* 1993; 143 (4): 1003-1008.

42.- Giachelli CM, Bae N, Almeida M, Denhardt DT, Alpers CE, Schwartz SM. Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1993; 92 (4): 1686-1696.

43.- Ikeda T, Shirasawa T, Esaki Y, Yoshiki S, Hirokawa K. Osteopontin mRNA is expressed by smooth muscle derived foam cells in human atherosclerotic lesions of the aorta. *J Clin Invest* 1993; 92 (6): 2814-2820.

44.- Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 93 (6): 2393-2402.

45.- Fitzpatrick LA, Severson A, Edwards WD, Ingram RT. Diffuse calcification in human coronary arteries. Association of osteopontin with atherosclerosis. *J Clin Invest* 1994; 94 (4): 1597-1604.

46.- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, Otto CM. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation*. 1995; 92(8):2163-2168.

47.- Chlenski A, Liu S, Baker LJ, Yang Q, Tian Y, Salwen HR, Cohn SL. Neuroblastoma angiogenesis is inhibited with a folded synthetic molecule corresponding to the epidermal growth factor-like module of the follistatin domain of SPARC. *Cancer Res* 2004; 64 (20): 7420-7425.

48.- Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J* 1994; 8 (2): 163-173.

- 49.- Kupprion C, Motamed K, Sage EH. SPARC (BM-40,osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273 (45): 29635–29640.
- 50.- Bradshaw AD, Sage EH. SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *J Clin Invest* 2001; 107 (9): 1049-1054.
- 51.- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 1999; 47 (12): 1495-1506.
- 52.- Ribeiro N, Sousa SR, Brekken RA, Monteiro FJ. Role of SPARC in bone remodeling and cancer-related bone metastasis. *J Cell Biochem* 2014; 115 (1): 17-26.
- 53.- Yan Q, Sage EH. SPARC, a matricellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochemical Cytochem* 1999; 47 (12): 1495-1505.
- 54.- Funk SE, Sage EH. The Ca²⁺(+)- binding glycoprotein SPARC modulates cell cycle progression in bovine endothelial cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 (7): 2648-2652.
- 55.- Yang E, Kang HJ, Koh KH, Rhee H, Kim NK, Kim H. Frequent inactivation of SPARC by promoter hypermethylation in colon cancers. *Int J Cancer* 2007; 121 (3): 567-575.
- 56.- Harries LW, McCulloch LJ, Holley JE, Rawling TJ, Welters HJ, Kos K. A role for SPARC in the moderation of human insulin secretion. *PLoS One* 2013; 8 (6): e68253.
- 57.- Delany AM, McMahon DJ, Powell JS, Greenberg DA, Kurland ES. Osteonectin/SPARC polymorphisms in Caucasian men with idiopathic osteoporosis. *Osteopor Int* 2008; 19 (7): 969–978
- 58.- Nakamura S, Kamihagi K, Satakeda H, Katayama M, Pan H, Okamoto H, Noshiro M, Takahashi K, Yoshihara Y, Shimmei M, Okada Y, Kato Y. Enhancement of SPARC (osteonectin) synthesis in arthritic cartilage. Increased levels in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and regulation by growth factors and cytokines in chondrocyte cultures. *Arthritis Rheum* 1996; 39 (4): 539–551

- 59.- Nanba Y, Nishida K, Yoshikawa T, Sato T, Inoue H, Kuboki Y. Expression of osteonectin in articular cartilage of osteoarthritic knees. *Acta Med Okayama* 1997; 51 (5): 239–243.
- 60.- Llera AS, Girotti MR, Benedetti LG, Podhajcer OL. Matricellular proteins and inflammatory cells: a task force to promote or defeat cancer?. *Cytokine Growth Factor Rev* 21 (1): 67–76.
- 61.- Frangogiannis NG. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol Rev* 2012; 92 (2): 635–688.
- 62.- Takahashi M, Nagaretani H, Funahashi T, Nishizawa H, Maeda N, Hotta K, Ouchi N, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y. The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res* 2001; 9 (7): 388–393.
- 63.- Kos K, Wong S, Tan B, Gummesson A, Jernas M, Franck N, Kerrigan D, Nystrom FH, Carlsson LM, Randeve HS, Pinkney JH, Wilding JP. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes* 2009; 58 (8): 1780–1788.
- 64.- Kos K, Wilding JP. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6 (4): 225–235.
- 65.- Wu D, Li L, Yang M, Liu H, Yang GY. Elevated plasma levels of SPARC in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol* 2011; 165 (4): 597–601.
- 66.- Worcester EM, Blumenthal SS, Beshensky AM, Lewand DL. The calcium oxalate crystal growth inhibitor protein produced by mouse kidney cortical cells in culture is osteopontin. *J Bone Miner Res* 1992; 7 (9): 1029-1036.
- 67.- Sattler AM, Schoppet M, Schaefer JR, Hofbauer LC. Novel aspects on RANK ligand and osteoprotegerin in osteoporosis and vascular disease. *Calcif Tissue Int* 2004; 74 (1): 103–106.
- 68.- Collin-Osdoby P. Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circ Res* 2004; 95 (11): 1046–1057.

- 69.- Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22 (4): 549–553.
- 70.- Bucay N, Sarosi I, Dunstan C, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes and Dev* 1998; 12 (9): 1260-1268.
- 71.- Bennett B, Scatena M, Kirk EA, Rattazzi M, Varon RM, Averill M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older Apo E^{-/-} mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (9): 2117-2124.
- 72.- Kaden JJ, Bickelhaupt S, Grobholz R, Haase KK, Sarikoc A, Kilic R, Brueckmann M, Lang S, Zahn I, Vahl C, Hagl S, Dempfle CE, Borggrefe M. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36 (1): 57-66.
- 73.- Joao M, Aparicio L, Aparicio N. Calcificaciones arteriales y osteoporosis... ¿Mecanismos y posibilidades terapéuticas comunes?. *Revista de endocrinología Ginecológica y reproductiva*. 2005.
- 74.- Rattazzi M, Bennett BJ, Bea F, Kirk EA, Ricks JL, Speer M, Schwartz SM, Giachelli CM, Rosenfeld ME. Calcification of advanced atherosclerotic lesions in the innominate arteries of ApoE-deficient mice: potential role of chondrocyte-like cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25 (7): 1420–1425.
- 75.- Dhore CR, Cleutjens JP, Lutgens E, Cleutjens KB, Geusens PP, Kitslaar PJ, Tordoir JH, Spronk HM, Vermeer C, Daemen MJ. Differential expression of bone matrix regulatory proteins in human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21 (2): 1998–2003.
- 76.- Sandberg WJ, Yndestad A, Øie E, Smith C, Ueland T, Ovchinnikova O, Robertson AK, Müller F, Semb AG, Scholz H, Andreassen AK, Gullestad L, Damås JK, Frøland SS, Hansson GK, Halvorsen B, Aukrust P. Enhanced T-cell expression of RANK ligand in acute

coronary syndrome: possible role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26 (4): 857–863.

77.- Min H, Morony S, Sarosi I, Dunstan C, Capparelli C, Scully S, Van G, Kaufman S, Kostenuik PJ, Lacey DL, Boyle WS, Simonet W. Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J Exp Med* 2000; 192 (4): 463–474.

78.- Schoppet M, Al-Fakhri N, Franke FE, Katz N, Barth PJ, Maisch B, Preissner KT, Hofbauer LC. Localization of osteoprotegerin, tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand in Mönckeberg's sclerosis and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89 (8): 4104–4112.

79.- Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B ligand and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2001; 276 (23): 20659–20672.

80.- Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4 (6): 801–811.

81.- Hofbauer L, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/ RANKL/ RANK system for bone and vascular disease. *JAMA.* 2004; 292 (4): 490–495.

82.- Fragoso JM, Vargas Alarcón G, Jiménez Morales S, Reyes Hernández OD, Ramírez Bello J. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune diseases (AIDs): molecular biology and genetics. *Gac Med Mex* 2014; 150 (4): 334-344.

83.- Min JK, Kim YM, Kim SW, Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, Won MH, Rho J, Kwon YG. TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE) enhances leukocyte adhesiveness: induction of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF receptor- associated factor and protein kinase C-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. *J Immunol* 2005; 175 (1): 531–540.

84.- Kaden JJ, Kiliç R, Sarikoç A, Hagl S, Lang S, Hoffmann U, Brueckmann M, Borggrefe M. Tumor necrosis factor alpha promotes an osteoblast-like phenotype in human aortic

valve miofibroblasts: a potential regulatory mechanism of valvular calcification. *Int J Mol Med* 2005; 16 (5): 869 - 872.

85.- Thorne SA, Abbot SE, Stevens CR, Winyard PG, Mills PG, Blake DR.. Modified low density lipoprotein and cytokines mediate monocyte adhesion to smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1996; 127 (2): 167–176.

86.- Riches DW, Chan ED, Winston BW. TNF-alpha-induced regulation and signalling in macrophages. *Immunobiology* 1996; 195: 477–490.

87.- Li H, Freeman MW, Libby P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* 1995; 95 (1): 122–133.

88.- Tintut Y, Patel J, Parhami F, Demer LL. Tumor necrosis factor-alpha promotes in vitro calcification of vascular cells via the cAMP pathway. *Circulation* 2000; 102 (21): 2636-42.

89.- Deuell KA, Callegari A, Giachelli CM, Rosenfeld ME, Scatena M. RANKL enhances macrophage paracrine pro-calcific activity in high phosphate-treated smooth muscle cells: dependence on IL-6 and TNF- α . *J Vasc Res* 2012; 49 (6): 510-21.

90.- Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003; 1 (1): 178-185.

91.- McKellar GE, McCarey DW, Sattar N, McInnes IB. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6 (6): 410-417.

92.- Iacobellis G, Corradi D, Sharma AM. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2 (10): 536–543.

93.- Iacobellis G, Pistilli D, Gucciardo M, Leonetti F, Miraldi F, Brancaccio G, Gallo P, di Gioia CR. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2005; 29 (6): 251– 255.

- 94.- Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion JD, Diehl JT, Arafat H, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper EA, Johnson AG, Martin J, Goldstein BJ, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003; 108 (20): 2460–2466.
- 95.- Bambace C, Telesca M, Zoico E, Sepe A, Oliosio D, Rossi A, Corzato F, Di Francesco V, Mazzucco A, Santini F, Zamboni M. Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men. *Cardiovasc Pathol* 2011; 20 (5): e153-e160.
- 96.- Eiras S, Teijeira-Fernández E, Salgado-Somoza A, Couso E, García-Caballero T, Sierra J, Juanatey JR. Relationship between epicardial adipose tissue adipocyte size and MCP-1 expression. *Cytokine* 2010; 51 (2): 207–212.
- 97.- Marchington JM, Mattacks CA, Pond CM. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium; structure, foetal development and biochemical properties. *Comp Biochem Physiol* 1989; 94 (21): 225-232.
- 98.- Pezeshkian M, Noori M, Najjarpour-Jabbari H, Abolfathi A, Darabi M, Darabi M, Shaaker M, Shahmohammadi G. Fatty acid composition of epicardial and subcutaneous human adipose tissue. *Metab Syndr Relat Disord* 2009; 7 (2): 125–131.
- 99.- Sacks HS, Fain JN, Holman B, Cheema P, Chary A, Parks F, Karas J, Optican R, Bahouth SW, Garrett E, Wolf RY, Carter RA, Robbins T, Wolford D, Samaha J. Uncoupling protein-1 and related messenger ribonucleic acidsRNAs in human epicardial and other adipose tissues: epicardial fat functioning as brown fat. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94 (9): 3611-3615.
- 100.- Iacobellis G, Lonn E, Lamy A, Singh N, Sharma AM. Epicardial fat thickness and coronary artery disease correlate independently of obesity. *Int J Cardiol* 2011; 146 (3): 452-454.
- 101.- Iwasaki K, Matsumoto T, Aono H, Furukawa H, Samukawa M. Relationship between epicardial fat measured by 64-multidetector computed tomography and coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2011; 34 (3): 166-171.

- 102.- Aydin H, Toprak A, Deyneli O, Yazici D, Tarcin O, Sancak S, Yavuz D, Akalin S. Epicardial fat tissue thickness correlates with endothelial dysfunction and other cardiovascular risk factors in patients with metabolic syndrome. *Metab Syndr Relat Disord* 2010; 8 (3): 229-234.
- 103.- Djaberi R, Schuijf JD, van Werkhoven JM, Nucifora G, Jukema JW, Bax JJ. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2008; 102 (12): 1602-1607.
- 104.- Rosito GA, Massaro JM, Hoffmann U, Ruberg FL, Mahabadi AA, Vasani RS, O'Donnell CJ, Fox CS. Pericardial fat, visceral abdominal fat, cardiovascular disease risk factors, and vascular calcification in a community-based sample: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2008; 117 (5): 605-613.
- 105.- Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WL, Ding J, Carr JJ, Taylor HA. Pericardial fat and echocardiographic measures of cardiac abnormalities: the Jackson Heart study. *Diabetes Care* 2011; 34 (2): 341-346.
- 106.- Xu Y, Cheng X, Hong K, Huang C, Wan L. How to interpret epicardial adipose tissue as a cause of coronary artery disease: a meta-analysis. *Coron Artery Dis* 2012; 23 (4): 227-233
- 107.- Ishikawa Y, Akasaka Y, Ito K, Akishima Y, Kimura M, Kiguchi H, Fujimoto A, Ishii T. Significance of anatomical properties of myocardial bridge on atherosclerosis evolution in the left anterior descending coronary artery. *Atherosclerosis* 2006; 186 (2): 380-389.
- 108.- Ishikawa Y, Akasaka Y, Suzuki K, Fujiwara M, Ogawa T, Yamazaki K, Niino H, Tanaka M, Ogata K, Morinaga S, Ebihara Y, Kawahara Y, Sugiura H, Takimoto T, Komatsu A, Shinagawa T, Taki K, Satoh H, Yamada K, Yanagida-Iida M, Shimokawa R, Shimada K, Nishimura C, Ito K, Ishii T. Anatomic properties of myocardial bridge predisposing to myocardial infarction. *Circulation* 2009; 120 (5): 376-383.
- 109.- Ishii T, Asuwa N, Masuda Y, Ishikawa S. The effects of a myocardial bridge on coronary atherosclerosis and ischaemia. *J Pathol* 1998; 185 (1): 4-9.

- 110.- Kawawa Y, Ishikawa Y, Gomi T, Nagamoto M, Terada H, Ishii T, Kohda E. Detection of myocardial bridge and evaluation of its anatomical properties by coronary multislice spiral computed tomography. *Eur J Radiol* 2007; 61 (1): 130–138.
- 111.- Zeina AR, Odeh M, Blinder J, Rosenschein U, Barmeir E. Myocardial bridge: evaluation on MDCT. *AJR Am J Roentgenol* 2007; 188 (4): 1069– 1073.
- 112.- Iacobellis G, Barbaro G. The double role of epicardial adipose tissue as pro- and anti-inflammatory organ. *Horm Metab Res* 2008; 40 (7): 442–445.
- 113.- Salgado-Somoza A, Teijeira-Fernández E, Rubio J, Couso E, González-Juanatey JR, Eiras S. Coronary artery disease is associated with higher epicardial retinol-binding protein 4 (RBP4) and lower glucose transporter (GLUT) 4 levels in epicardial and subcutaneous adipose tissue. *Clin Endocrinol* 2012; 76 (1): 51–58.
114. Teijeira- Fernández E, Eiras S, Shamagian LG, Somoza AS, Delgado C, Gonzalez-Juanatey JR. Lower epicardial adipose tissue adiponectin in patients with metabolic syndrome. *Cytokine* 2011; 54 (2): 185–190.
- 115.- Cheng KH, Chu CS, Lee KT, Lin TH, Hsieh CC, Chiu CC, Voon WC, Sheu SH, Lai WT. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *Int J Obes* 2008; 32 (2): 268–274.
116. Fain JN, Sacks HS, Bahouth SW, Tichansky DS, Madan AK, Cheema PS. Human epicardial adipokine messenger RNAs: comparisons of their expression in substernal, subcutaneous, and omental fat. *Metabolism* 2010; 59 (9): 1379–1386.
117. Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, Chikugo F, Hori T, Bando Y, Nishio C, Higashida M, Nakaya Y, Kitagawa T, Sata M. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int Heart J* 2011; 52 (3): 139–142.
- 118.- Kaisho T, Akira S. Toll like receptors as adjuvant receptors. *Biochimic Biophys Acta* 2002; 1589 (1): 1-13.
- 119.- Muzio M, Polentarrutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A. Toll like receptor family and signalling pathway. *Biochem Soc Trans* 2000; 28 (5): 563-566.

- 120.- Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher M, Da Silva NF, Khanolkar M. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292 (3): E740-E747.
- 121.- Baker AR, Harte AL, Howell N, Pritlove DC, Ranasinghe AM, da Silva NF, Youssef EM, Khunti K, Davies MJ, Bonser RS, Kumar S, Pagano D, McTernan PG. Epicardial adipose tissue as a source of nuclear factor-kappaB and c-Jun N-terminal kinase mediated inflammation in patients with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metabol* 2009; 94 (1): 261-267.
- 122.- Dutour A, Achard V, Sell H, Naour N, Collart F, Gaborit B, Silaghi A, Eckel J, Alessi MC, Henegar C, Clément K. Secretory type II phospholipase A2 is produced and secreted by epicardial adipose tissue and overexpressed in patients with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95 (2): 963-967.
- 123.- Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, Fogelman AM, Grass DS, Swanson ME, de Beer MC, de Beer F, Lusis AJ. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19 (5): 1284-1290.
- 124.- Menschikowski M, Rosner-Schiering A, Eckey R, Mueller E, Koch R, Jaross W. Expression of secretory group IIA phospholipase A(2) in relation to the presence of microbial agents, macrophage infiltrates, and transcripts of proinflammatory cytokines in human aortic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20 (3): 751-762.
- 125.- Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H. Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 100 (12): 1280-1284.
- 126.- Karastergiou K, Evans I, Ogston N, Miheisi N, Nair D, Kaski JC, Jahangiri M, Mohamed-Ali V. Epicardial adipokines in obesity and coronary artery disease induce

atherogenic changes in monocytes and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30 (7): 1340–1346.

127.- Silaghi A, Achard V, Paulmyer-Lacroix O, Scridon T, Tassistro V, Duncea I, Clément K, Dutour A, Grino M. Expression of adrenomedullin in human epicardial adipose tissue: role of coronary status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293 (5): E1443–E1450.

128.- Iacobellis G, di Gioia CR, Cotesta D, Petramala L, Travaglini C, De Santis V, Vitale D, Tritapepe L, Letizia C. Epicardial adipose tissue adiponectin expression is related to intracoronary adiponectin levels. *Horm Metab Res* 2009; 41 (3): 227–231.

129.- Iacobellis G, di Gioia CR, Di Vito M, Petramala L, Cotesta D, De Santis V, Vitale D, Tritapepe L, Letizia C. Epicardial adipose tissue and intracoronary adrenomedullin levels in coronary artery disease. *Horm Metab Res* 2009; 41 (12): 855–860.

130.- Lommi J, Kovanen P, Jauhiainen M, Lee-Rueckert M, Kupari M, Helske S. High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis* 2011; 219 (2): 538–544.

131.- Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, Huang Y. High-density lipoprotein cholesterol as a predictor of coronary heart disease risk: the PROCAM experience and pathophysiological implications for reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis* 1996; 124: S11-S20.

132.- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B. Exploiting the vascular protective effects of high density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, parte I. *Circulation* 2001; 104 (19): 2376-2386.

133.- Deakin S, Leviev I, Gomaschi M, Calabresi L, Franceschini G, James RW. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J Biol Chem* 2002; 277 (6): 4301-4308.

134.- Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23 (10): 1881-1888.

- 135.- Li XP, Zhao SP, Zhang XY, Liu L, Gao M, Zhou QC. Protective effect of high density lipoprotein on endothelium-dependent vasodilatation. *Int J Cardiol* 2000; 73 (3): 231-236.
- 136.- Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15 (11): 1987-1994.
- 137.- Calabresi L, Franceschini G, Sirtori CR, De Palma A, Saresella M, Ferrante P, Taramelli D. Inhibition of VCAM-1 expression in endothelial cells by reconstituted high density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 238 (1): 61-65.
- 138.- Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 4ta edición USA 2004. 820-827.
- 139.- Voet D, Voet J. *Biochemistry* 2da edición USA 1995. 690-704.
- 140.- Pérez Méndez O. Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la atherosclerosis? *Arch Cardiol Mex* 2004; 74 (1): 53-67.
- 141.- Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res* 2005; 96 (12): 1221-1232.
- 142.- Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Brouillette CG, Venkatachalapathi YV, Anantharamaiah GM. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. *J Lipid Res* 1992; 33 (2): 141-166.
- 143.- Pérez Méndez O, Álvarez Salcedo P, Carreón Torres E, Luc G, Arce Fonseca M, de la Peña A, Cruz Robles D, García JJ, Vargas Alarcón G. Palmitic acid in HDL is associated to low apo AI fractional catabolic rates in vivo. *Clin Chim Acta* 2007; 378: 53-58.
- 144.- von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol* 1994; 5 (6): 404-416.
- 145.- Castro GR, Fielding CJ: Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein. *Biochemistry* 1988; 27 (1): 25-29.

- 146.- Busseuil D, Shi Y, Mecteau M, Brand G, Kernaleguen AE, Thorin E, Latour JG, Rhéaume E, Tardif JC. Regression of aortic valve stenosis by ApoA-I mimetic peptide infusions in rabbits. *Br J Pharmacol* 2008; 154 (4): 765–73.
- 147.- Speidl WS, Cimmino G, Ibanez B, , Elmariah S, Hutter R, Garcia MJ, Fuster V, Goldman ME, Badimon JJ. Recombinant apolipoprotein A-I Milano rapidly reverses aortic valve stenosis and decreases leaflet inflammation in an experimental rabbit model. *Eur Heart J* 2010; 31 (16): 2049–57.
- 148.- Toledo-Ibelles P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreón-Torres E, Posadas-Romero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 2010; 51 (6): 1610-1617.
- 149.- Franco M, Bautista R, Pérez-Méndez O, González L, Pacheco U, Sánchez-Lozada LG, Santamaría J, Tapia E, Monreal R, Martínez F. Renal interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294 (1): F84-F92.
- 150.- Pérez Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure?. *Clin Chim Acta* 2014; 429: 111-122.
- 151.- Lamarche Benoit, Moorjani Sital, Cantin Bernard, Dagenais Gilles R., Lupien Paul, Després Jeane-Pierre. Associations of HDL 2 and HDL3 subfractions with ischemic heart disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(6):1098-105.
- 152.- Salonen JT, Salonen R, Seppänen K, Rauramaa R, Tuomilehto J. HDL, HDL2, and HDL3 subfractions, and the risk of acute myocardial infarction: a prospective study in eastern Finnish men. *Circulation* 1991; 84 (1): 129-139.
- 153.- Stampfer MJ, Sacks FM, Salvini S, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 1991; 325 (6): 373-381.
- 154.- Sweetnam PM, Bolton CH, Yarnell JWG, Bainton D, Baker IA, Elwood PC, Miller NE. Associations of the HDL2 and HDL3 cholesterol subfractions with the development of

ischemic heart disease in British men: the Caerphilly and Speedwell Collaborative Heart Disease studies. *Circulation* 1994; 90 (2): 769-774.

155.- Pérez Ó, Torres M, Posadas C, Vidaure Garcés V, Carreón-Torres E, Mendoza-Pérez E, Medina Urrutia A, Huesca-Gómez C, Zamora-González J, Aguilar-Herrera B. Abnormal HDL subclasses distribution in overweight children with insulin resistance or type 2 diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 2007; 376: 17-22.

156.- García C, Torres M, Juárez M, López C, Toledo P, Monter M, Cruz D, Carreón E, Vargas G, Pérez Ó . Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determine by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 201; 412: 292-298.

157.- Rangel CM, Grinberg M, Maranhão RC, Ventura LI. Aortic stenosis and coronary disease. Analysis of risk factors. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87 (2): 115-120.

158.- Ashvin RK, Ramdas GP. Risk factors for progression of calcific aortic stenosis and potential therapeutic targets. *Int J Angiol* 2008; 17 (2): 63-70.

159.- Novaro GM, Griffin BP. Calcific aortic stenosis: another face of atherosclerosis?. *Cleve Clin J Med* 2003; 70 (5): 471-477.