



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

“Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en tejido adiposo epicárdico de pacientes con aterosclerosis coronaria y estenosis aórtica y su relación con el score de calcio coronario y el volumen de tejido adiposo epicárdico”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
CARDIOLOGÍA

PRESENTA
Dra. Adriana Flores Zapata

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Oscar A. Pérez Méndez.

ASESORA DE METODOLOGÍA EN BIOLOGÍA MOLECULAR
M. en C. María de Jesús Luna Luna

Ciudad Universitaria, Cd. México, julio 2017



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 mi familia y prometido por hacer la diferencia en mi vida y en esta profesión. Gracias por todo el amor, la espera y los días que estuvimos lejos por ir en busca de nuestros sueños. A mis profesores por su guía y paciencia

Dr. Oscar A. Pérez Méndez

Dra. Mariana Díaz Díaz

M. en C. María de Jesús Luna Luna

Dr. Fernando Guadalajara Boo

Dr. Sergio Criales Vera

A todos los médicos que siguen y seguiremos siendo residentes...Me he dado cuenta que nosotros no comemos, no dormimos, no lloramos, no gritamos, no nos sentamos, no discutimos, no tenemos familia menos amigos, no necesitamos bañarnos ni tenemos miedo, ni rencor ni cansancio, ni fastidio, ni hastío, ni soledad, que siempre tenemos ganas de escuchar, de oler, de aconsejar, de saber, de estudiar, de orientar, de servir, de insistir, de entender, de decidir, de esperar, de elegir, de predecir, de sugerir, de cuestionar, de empezar, de acabar, de adivinar y de levantarse en especial cuando todo el mundo está dormido, a nosotros no se nos muere nuestra abuelita, nuestro papa no se enferma, nuestra mama no se preocupa por nosotros, nuestros hermanos no nos extrañan, nuestro amigos no nos olvidan, a nosotros no se lleva el coche la grúa....y a nosotros no se nos rompen los zapatos. Nosotros entendemos el corazón y a veces porque simplemente, llega el día que en el que dice hoy no, a veces quitamos el dolor, damos esperanza, vida, calma y placer....cuando la ausencia del dolor es el verdadero placer para alguien, administramos sustancias que cualquier suicida desearía tener en sus manos, portamos en el cuello la serpiente de la verdad y la ignorancia un instrumento por el cual igual nos habla el corazón como nos canta también, conocemos las arterias y le tomamos instantáneas al corazón, cambiamos la anatomía del cuerpo, si, eso que Dios hizo un día nosotros le decimos no, y todo por una pasión que llevamos dentro, por tu aliento y por una bomba que llamamos corazón que sin el tú no vivirías y yo no me daría cuenta que estoy vivo.

ABREVIATURAS

BMP2 – Proteína Morfogenética de hueso tipo 2

BMP4 – Proteína Morfogenética de hueso tipo 4

CML - Células de músculo liso.

EAC - Enfermedad aterosclerosa coronaria.

EAO - Estenosis aórtica

EAT Epicardial Adipose Tissue

IL-6 Interleucina 6

OPN – Osteopontina

OPG - Osteoprotegerina

ON- Osteonectina

PAI-1 Activador del inhibidor del plasminógeno 1.

PAT – Tejido adiposo paracardiaco

RNAm – Ácido Ribonucleico mensajero

TAM – Tejido adiposo marrón

TAB - Tejido adiposo blanco

TAE - Tejido adiposo epicárdico

TAV – Tejido adiposo visceral

TC – Tomografía computada.

TRAIL – Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF α

TNF α – Factor de necrosis tumoral alfa

VTAE - Volumen de tejido adiposo epicárdico

RANK - Ligando del receptor activado del factor nuclear Kb

GAPDH – Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa

WAT – White adipose tissue

SCC - Score de Calcio coronario

INDICE

I.	PORTADA.....	1
II.	AGRADECIMIENTOS.....	2
III.	ABREVIATURAS	3-4
IV.	ÍNDICE	5
V.	INTRODUCCIÓN	6
VI.	MARCO TEÓRICO	7-18
VII.	JUSTIFICACIÓN.....	19-20
VIII.	PROPUESTA TEÓRICA	21
IX.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
X.	HIPÓTESIS	21
XI.	OBJETIVO	21
XII.	MATERIAL Y MÉTODOS	22-25
XIII.	ASPECTOS ÉTICOS	25
XIV.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
XV.	RESULTADOS	26-31
XVI.	DISCUSIÓN	32-34
XVII.	CONCLUSIONES	35
XVIII.	BIBLIOGRAFÍA	36-40
XIX.	ANEXOS	41-55

INTRODUCCIÓN

La correlación que existe entre el tejido adiposo epicárdico (TAE) y enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) sugiere una relación causal entre ambos. Estudios anatómicos han demostrado que el TAE invade la adventicia e incluso la media de las coronarias en ciertas secciones y está por lo tanto en contacto directo con la media del vaso. La experiencia del departamento de cirugía del INC revela que las lesiones aterosclerosas se ubican siempre donde hay tejido adiposo adyacente a la arteria y nunca donde la arteria incursiona en el miocardio. La aterosclerosis es un proceso inflamatorio en sus etapas tempranas. Sin embargo, no siempre es válido presuponer que la inflamación sistémica produce lesiones aterosclerosas.

De tal manera que la inflamación en la aterosclerosis debe ser de tipo local y por lo tanto está promovida por los tejidos adyacentes al sitio de la lesión. La mayoría de las lesiones aterosclerosas calcifican y el grado de calcificación determinado por tomografía computada (TC) correlaciona con la incidencia de eventos coronarios. Sin embargo, la contribución del TAE en el desarrollo de lesiones aterosclerosas y su calcificación no está bien definida. La calcificación de la placa aterosclerótica guarda estrecha relación con sustancias calcificantes, anticalcificantes y relacionadas con la inflamación, por lo tanto se busca establecer si las células del tejido adiposo epicardio producen estas moléculas y si su patrón secretor guarda alguna relación en pacientes con EAC conocida. En conclusión la propuesta teórica radica en si el TAE actúa como un órgano parácrino que favorece el proceso inflamatorio local y secreta proteínas que favorecen el depósito de calcio en las coronarias.

MARCO TEÓRICO

La correlación que existe entre el tejido adiposo epicárdico (TAE) y enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) sugiere una relación causal entre ambos. Estudios anatómicos han demostrado que el TAE invade la adventicia e incluso la media de las coronarias en ciertas secciones y está por lo tanto en contacto directo con la media del vaso. La experiencia del departamento de cirugía del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez revela que las lesiones aterosclerosas se ubican siempre donde hay tejido adiposo adyacente a la arteria y nunca donde la arteria incursiona en el miocardio.

Aterosclerosis

La enfermedad arterial coronaria es una de las más causas más importantes de muerte a nivel mundial y la calcificación coronaria es uno de los mejores indicadores de esta enfermedad. Los depósitos de calcio en la vasculatura están mediados por complejos mecanismos que producen calcificaciones en la íntima y en la media de las arterias. [1-2].

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio en sus etapas tempranas. En el proceso de aterosclerosis, factores inflamatorios inducen diferenciación osteogénica en la íntima del vaso, sin embargo, no siempre es válido presuponer que la inflamación sistémica produce lesiones aterosclerosas. De tal manera que la inflamación en la aterosclerosis debe ser de tipo local y por lo tanto está promovida por los tejidos adyacentes al sitio de la lesión. [3-8]

La mayoría de las lesiones aterosclerosas calcifican, y el grado de calcificación determinado por tomografía computada (TC) correlaciona con la incidencia de eventos coronarios. [9]

La enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC) involucra una serie de eventos celulares que culminan con el desarrollo de fibrosis y calcificación, y la consecuente reducción de la luz del vaso sanguíneo que da lugar a los síntomas clínicos. [1,8,9]

Biomoléculas implicadas en la calcificación de la placa aterosclerótica.

La calcificación de la placa aterosclerótica guarda una estrecha relación con la osteopontina (OPN) y esta proteína está relacionada con la gravedad de las lesiones, la principal fuente de ella son los macrófagos infiltrados pero no la única. La OPN es otra proteína que puede tener una contribución en el proceso de calcificación [10-12]. Fue identificada por primera vez en hueso y hallada después en diversos tejidos, entre ellos los vasos sanguíneos.

Se trata de una glicoproteína de 44 kD que tiene una alta afinidad por la hidroxiapatita y parece jugar un papel importante en la modulación de los tejidos calcificados [13]. Diversos estudios han demostrado una asociación entre la OPN y la calcificación de la placa aterosclerótica, y se ha postulado que la principal fuente de OPN son los macrófagos infiltrados, aunque las células endoteliales y del músculo liso [11] también participan en la síntesis de OPN en el ateroma.

No obstante, se desconoce si otros tipos celulares como los adipocitos epicárdicos contribuyen a la calcificación de la placa por medio de la síntesis de OPN; la relación del VTAE y el SCC determinada mencionada previamente [15-18] sugiere que el TAE puede en efecto tener una contribución parácrina importante en la calcificación de las arterias coronarias.

La OPN participa también en la inducción de señales inflamatorias en adipocitos humanos interfiriendo con su función. La principal función del tejido adiposo es el almacenamiento de energía, principalmente en forma de grasa, de cuya cantidad depende la sensibilidad de los adipocitos a la insulina; la OPN es un factor que puede contribuir a la resistencia a la insulina en pacientes que presentan obesidad por acción directa en los adipocitos [19], aumentando así el riesgo de la enfermedad aterosclerosa coronaria y posiblemente la calcificación.

Por otro lado, OPN tiene actividad inflamatoria *per se*, ya que estimula la actividad del TNF α que a su vez induce la expresión de genes pro-calcificantes como BMP2 la cual induce la diferenciación osteogénica de las CML e inhibe la secreción de proteínas de matriz anticalcificantes, razón por la cual la OPN interviene también en enfermedades inflamatorias, enfermedades con fondo autoinmune y cáncer. [11] (Figura 1)

La osteonectina (ON) es otra de las proteínas implicadas; esta sustancia tiene acción anticalcificante y la relación que se ha visto entre el volumen del TAE y el SCC presupone que el TAE puede estar expresando estas proteínas. Además, es posible que el TAE también produzca biomoléculas que participan en la inflamación como IL6, IL1 β y TNF α lo que culmina con la calcificación de la lesión. La ON como proteína involucrada en la modulación de la calcificación es una glicoproteína de 38 kD que tiene una gran afinidad por el calcio, por la hidroxiapatita y por el colágeno tipo I. (Figura 1) En contraste con la OPN, la expresión de ON tiende a disminuir en las placas ateromatosas calcificadas, sugiriendo que esta proteína tiene una función anti-calcificante [15,19]. Algunos estudios han demostrado una correlación inversa entre de la expresión de ON y la incidencia de aterosclerosis [20]. De esta manera, más allá de una sobre- o sub-expresión de estas proteínas, es posible que la calcificación sea consecuencia de un desbalance en la relación osteopontina-osteonectina; sin embargo esta posibilidad no ha sido explorada.

El TAE contribuiría a la calcificación de la placa por medio de la síntesis de OPN, ya que la relación que se ha visto entre el volumen del TAE y el score de calcio coronario en otros estudios hace pensar que así es. Además, la OPN estimula por si sola al TNF α perpetuando la inflamación.

Asimismo, el TAE puede expresar osteoprotegerina (OPG) que es una importante proteína protectora mediada por HDL. La OPG bloquea la función de ligandos como RANKL (Ligando del receptor activado del factor nuclear $\kappa\beta$) y TRAIL (Ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF α), receptores que al activarse inducen la expresión de BMP4 y así estimula la calcificación de CML mediante diferenciación osteogénica. [11]

La etiología de la calcificación del ateroma no está bien definida, pero se ha demostrado que los niveles séricos bajos de C-HDL se asocian con la rápida progresión del proceso [21]. No obstante, la función de las HDL en la calcificación del ateroma no ha sido propiamente estudiada; sin embargo, se tienen algunos indicios de un papel protector de las HDL contra la calcificación extra-ósea a partir de observaciones realizadas en calcificación valvular. En analogía con la EAC, estudios previos han demostrado la presencia de VLDL, LDL, apo B100, apo E y LDL oxidadas en válvulas aórticas estenóticas calcificadas [22-24]. Asimismo, conejos hipercolesterolémicos a los que se les infundió apo AI, principal apolipoproteína de las HDL, se benefician de una atenuación de la calcificación valvular [25].

El mecanismo anticalcificante de las HDL se ha sugerido que está relacionado con el hecho de que las HDL incrementan la secreción de OPG, una proteína antagonista de RANKL, a la cual se le atribuye participación en la calcificación [26].

Por otro lado, también observaron que las HDL son capaces de reducir la expresión de RNAm de TNF α por las células vasculares. El TNF α tiene acciones pro-inflamatorias y pro-fibrótica y es capaz de inducir la formación de nódulos calcificados en miofibroblastos valvulares en aorta [26]. Por lo anterior, es factible suponer que la atenuación de la expresión de TNF α por las HDL puede proteger a las arterias coronarias contra la calcificación. (Figura 1)

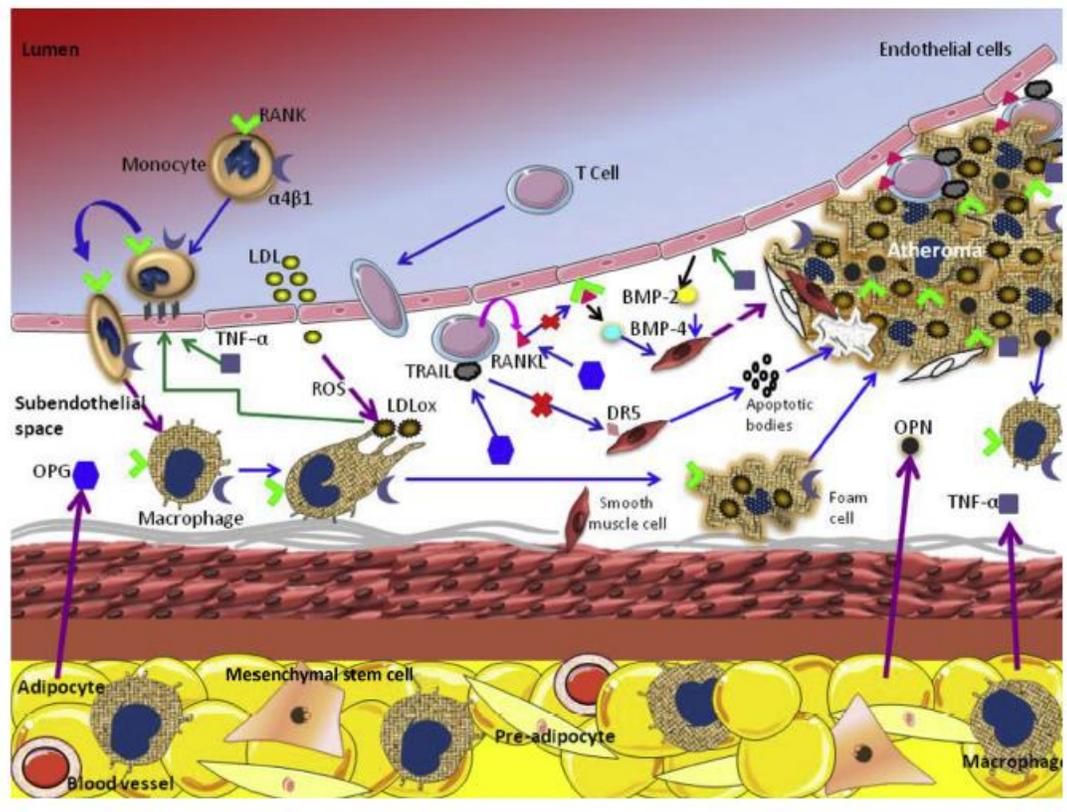
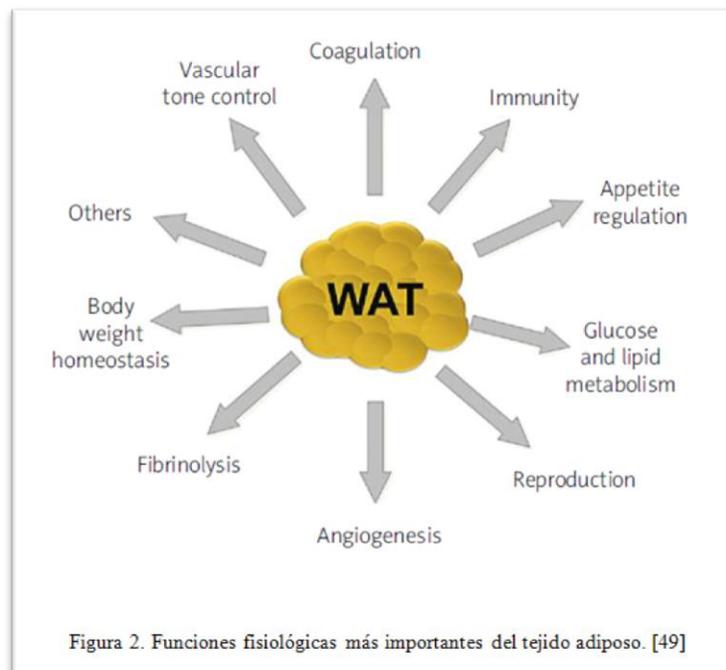


Figura 1. Diagrama esquemático del papel de OPN, OPG y TNF α proteínas secretadas por el TAE. La OPN promueve el desarrollo de la placa aterosclerótica a través de la acción quimiotáctica en los monocitos/macrófagos y células T. El TNF α induce la producción de moléculas de adhesión y proteínas que estimulan la diferenciación osteogénica de las CML: OPG atenúa la progresión del ateroma al interactuar con RANKL y TRAIL, inhibiendo la formación de sitios de nucleación. Las líneas moradas indican la secreción de OPN, OPG y TNF α por el TAE. La línea punteada corresponde a la diferenciación que sufre el monocito y las CML; las líneas azules muestran la dirección del evento siguiente al interactuar con su ligando; las líneas verdes representan la estimulación del TNF α y la oxidación del LDL en las células endoteliales; las líneas negras muestran el producto de la estimulación o la unión de la interacción ligando-receptor. OPN osteopontina, OPG osteoprotegerina, TAE tejido adiposo epicárdico, TNF α Factor de necrosis tumoral alfa, TRAIL Ligando del inductor de apoptosis relacionado a TNF α , RANKL Ligando del receptor activado del factor nuclear $\kappa\beta$, BMP2 Proteína morfogenética del hueso tipo 2, BMP4 proteína morfogenética de hueso tipo 4, DR5 Receptor de muerte tipo 5, ROS Especies reactivas de oxígeno, LDLox Lipoproteínas de baja densidad oxidadas. [47]

Tejido adiposo como órgano endócrino

Originalmente se consideraba solo un órgano de depósito de triglicéridos, sin embargo, en la últimas décadas dejó de considerarse como un órgano inerte y es desde 1994 con el descubrimiento de la leptina, un pequeño péptido proinflamatorio del cual su principal productor es el tejido adiposo subcutáneo; que se postuló la actividad endocrina de este tejido. El tejido adiposo es un órgano metabólicamente dinámico capaz de sintetizar diversos componentes biológicos que regulan la homeostasis metabólica, las funciones fisiológicas más significativas del tejido adiposo blanco (WAT White adipose tissue) son regulación del apetito, coagulación, capacidad inmunológica, regulación del metabolismo de la glucosa, reproducción, angiogénesis, fibrinólisis, homeostasis del peso corporal y control del tono vascular. (Figura 2). [49]



El tejido adiposo está compuesto no solo de adipocitos sino de células que componen el estroma vascular entre estos: eritrocitos, células endoteliales, pericitos y células

precursoras de adipocitos. Además, el tejido adiposo no es uniforme en su composición, ya que depende de la localización en el cuerpo su capacidad de secretar adipocitocinas. [49]

El tejido adiposo se divide en 2 grandes categorías que difieren en su actividad fisiológica, tejido adiposo blanco (TAB) y tejido adiposo marrón (TAM). El TAM es un tejido de distribución dispersa en el organismo y su papel en los mamíferos es de termogénesis, particularmente importante en los neonatos [9]. Por otra parte, el tejido adiposo subcutáneo y visceral son dos tipos de TAB; el primero, a pesar de ser metabólicamente menos activo que el segundo, se considera un órgano de almacenamiento de triglicéridos que provee de ácidos grasos libres durante los periodos de ayuno prolongado, inanición, o durante el ejercicio. El tejido adiposo visceral (TAV) es más activo metabólicamente y en su actividad endócrina que el anterior [27], el TAV secreta altas concentraciones de IL-6 y PAI-1 activador del inhibidor del plasminógeno 1, en cambio el tejido adiposo subcutáneo otro tipo de TAB secreta altas concentraciones de leptina y adiponectina.

La habilidad del tejido adiposo de secretar hormonas lo coloca como el tejido endócrino más grande del ser humano, y su naturaleza pleiotrópica se basa en la capacidad de los adipocitos de secretar hormonas, factores de crecimiento, enzimas, citosinas, factores del complemento y proteínas de matriz celular.

El tejido adiposo se encuentra inmerso en complejas vías de señalización endocrina (señales que viajan a través del sistema circulatoria a todo el cuerpo) parácrina (señales que viajan entre células vecinas y cercanas) y autócrina (señales que solo afectan a células del mismo tipo). [49,50]

Además de leptina, el tejido adiposo secreta otras hormonas; algunas de manera exclusiva como la adiponectina la cual presenta una fuerte correlacion negativa entre los niveles plasmáticos y la cantidad de grasa en el ser humano. La adiponectina mejora la sensibilidad a la insulina, estimula la oxidación de ácidos grasos y la captura de glucosa en el musculo esquelético y el mismo tejido adiposo. [49]

El incremento de los niveles de TNF α en la obesidad puede ser debido a la infiltración del tejido adiposo por macrófagos ya que estos se encuentran en altas concentraciones en el TAV, el TNF α se encuentra implicado en la patogénesis de la resistencia a la insulina ya que altera las vías de señalización en el hepatocito y en el tejido adiposo [49]. Otra molécula producida en el tejido adiposo es la IL-6 de la cual el 30% de la molécula circulante se origina del tejido adiposo, los niveles elevados se asocian a enfermedad coronaria, aterosclerosis y angina inestable. Por otro lado, importantes factores involucrados en los eventos microvasculares como el PAI-1 incrementa proporcionalmente al TAV y altera la capacidad del sistema fibrinolítico natural lo que incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares. [49]

Tejido adiposo epicárdico y aterosclerosis

A pesar de que no hay una definición universalmente aceptada, el tejido adiposo epicárdico (TAE) puede ser considerado un tercer tipo de TAB [27]. La terminología que se ha utilizado para designar a los depósitos de grasa alrededor del corazón es diversa y con frecuencia produce confusión. En términos generales, el tejido adiposo pericárdico está constituido por los depósitos de tejido adiposo ubicados por fuera del pericardio visceral, es decir el tejido adiposo epicárdico TAE y en la superficie del pericardio parietal, es decir el tejido adiposo paracardíaco en consecuencia el TAE es una fracción del tejido adiposo pericárdico. [29] (Figura 3)

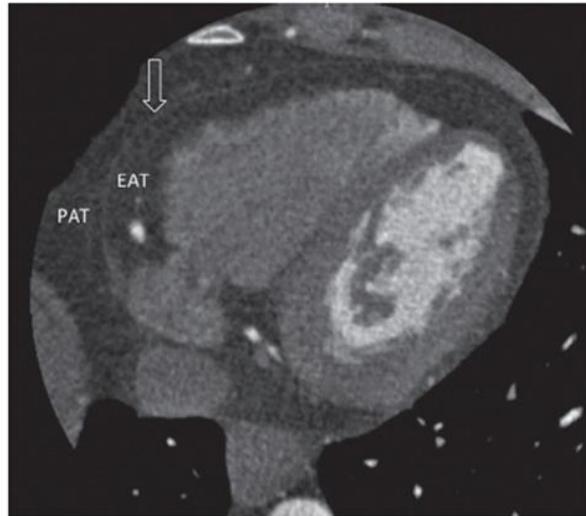


Figura 3. Tejido adiposo epicárdico (EAT Epicardial adipose tissue) Y tejido adiposo paracardiaco (PAT paracardial adipose tissue) separados por el pericardio parietal (flecha) en una TC de corazón. [29]

El TAE para los fines del presente protocolo de investigación, se define como el depósito de grasa intrapericárdica que se localiza entre el miocardio y el pericardio visceral alrededor de los lechos coronarios [28,29]

La relación del tejido adiposo abdominal y el riesgo cardiometabólico ha sido extensivamente analizado [28] y debido a que la obesidad se relaciona fuertemente con enfermedades cardiovasculares, los pacientes obesos con frecuencia requieren cirugía cardiaca. La obesidad definida como IMC >30 esta relacionada a mayor comorbilidad relacionada a DM2 e HAS en comparación con pacientes con peso normal, así mismo con mayor frecuencia presentan neumonía, ventilación mecánica prolongada, mediastinitis y lesión renal, por lo que los pacientes con IMC >30 tiene 1.57 veces mayor mortalidad que los pacientes con IMC normal además el costo de hospitalización es 17.5% mayor en estos pacientes [48]. De esta manera la cantidad de tejido adiposo en el paciente con enfermedades cardiovasculares impacta en diversas esferas.

Sin embargo, también la acumulación de grasa en otros tejidos tiene implicaciones importantes sobre el riesgo de aterosclerosis. Varios estudios han investigado el impacto de la acumulación de grasa en sitios ectópicos incluyendo al TAE [28,29].

El TAE puede representar hasta el 20% de peso ventricular en el corazón humano [30] y su función es actuar como un amortiguador de ácidos grasos libres en sangre, almacenándolos o liberándolos hacia el miocardio cuando los requerimientos del tejido aumentan.

El TAE puede generar diversas biomoléculas que participan en la inflamación como IL-6, IL-1 β , TNF α y adipocinas como adiponectina y leptina como ya se mencionó previamente. [31-33]

Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre el TAE y los niveles plasmáticos de las citocinas que produce [33,34] sugiriendo que la acción de éstas ocurre a nivel local y no sistémico. De esta manera, es posible que el TAE tenga función de órgano parácrino. A medida que el volumen de la grasa epicárdica aumenta, las coronarias se recubren o yacen entre el TAE y el miocardio. El tejido adiposo puede incluso penetrar en el tejido conectivo de las fibras musculares cardíacas e invadir la adventicia de las coronarias, quedando yuxtapuesto al músculo liso arterial [7].

La experiencia de los cirujanos cardiovasculares del INC indica que hay segmentos de la coronaria que están libres de aterosclerosis y este hecho se asocia con la ausencia de tejido adiposo en dichos segmentos.

En este sentido, se ha demostrado por tomografía computarizada que existe aterosclerosis exacerbada en los segmentos de las coronarias donde el tejido adiposo es abundante; en contraste, en los segmentos de las coronarias que incursionan en el miocardio, donde no se encuentran adyacentes al tejido adiposo, están libres de aterosclerosis [35]. El TAE se encuentra incrementado en pacientes con enfermedad arterial coronaria, y está asociada con la severidad de la enfermedad y con la calcificación coronaria [15]. Las adipocinas y citosinas sintetizadas por el TAE pueden actuar localmente en la vasculatura coronaria adyacente, agravando la inflamación de la pared del vaso y estimulando la progresión de la aterosclerosis que culmina en la calcificación de la lesión. [36].

Diversos estudios han puesto de manifiesto una relación estadística entre el volumen de la grasa epicárdica y la presencia de aterosclerosis coronaria, dando soporte a esta hipótesis [16,29].

Todas estas observaciones en su conjunto sugieren un papel activo del TAE en el desarrollo del ateroma. Por otra parte, estudios recientes demostraron que el volumen del TAE correlaciona con el grado de calcificación coronaria determinados ambos por tomografía computarizada [17,18] y con la severidad de la enfermedad coronaria incluso después de ajustar por calcio coronario [37]. Sin embargo, en otros estudios esta relación no se ha confirmado [38]. Por lo tanto, la relación entre el TAE y la aterosclerosis coronaria sigue siendo controversial. En consecuencia, es fundamental explorar los mecanismos que podrían relacionar al TAE con el desarrollo del ateroma, así como los factores que regulan la comunicación cruzada entre los tejidos implicados.

En conjunto con toda la evidencia presentada es posible que el tejido epicárdico se encuentre involucrado en el proceso ateroscleroso y probablemente tenga un efecto más importante que el tejido adiposo visceral por su cercanía a los vasos afectados. De esta manera, surge la necesidad de caracterizar al tejido adiposo epicárdico en cuanto a la expresión de genes involucrados en la calcificación tales como la osteopontina y osteonectina, osteoprotegerina así como la expresión de citocinas relacionadas con la inflamación que puedan exacerbar el proceso aterosclerótico.

Para los fines de esta tesis, se decidió conformar el grupo control con pacientes con estenosis aórtica sin lesiones coronarias significativas. La razón de incluir a este tipo de pacientes fue la posibilidad de obtener la muestra correspondiente de TAE ya que serían intervenidos quirúrgicamente debido a su patología de base. Por otra parte estudios histopatológicos han demostrado que la enfermedad aortica valvular comparte diversos factores de riesgo clínico y hallazgos con la aterosclerosis como la infiltración lipídica y la activación de vías inflamatorias. [39,40]. Sin embargo el órgano blanco de la lesión es diferente, en los pacientes aórticos las lesiones calcificadas se encuentran distantes al TAE. Estas características hacen a los pacientes con estenosis aortica un grupo adecuado de comparación con pacientes con EAC conocida para el propósito de esta tesis.

Inflamación y calcificación en el proceso ateroscleroso

La aterosclerosis comienza con daño endotelial que aumenta su permeabilidad, lo que facilita la penetración de lipoproteínas de baja densidad (LDL).

Las LDL atrapadas en el espacio subendotelial, se oxidan dando lugar a lipoperóxidos que a su vez actúan como factores quimiotácticos para monocitos. De esta manera se desencadena el proceso inflamatorio mediado por macrófagos, que se perpetúa ante la incapacidad de estas células para degradar el colesterol de las LDL. El tejido adiposo es conocido por producir y secretar una variedad de adipocinas pro-inflamatorias y pro-aterogénicas que actúan a nivel local y sistémico, como se mencionó previamente [41]. Además, las citocinas que produce el TAE desencadenan un proceso inflamatorio en la pared arterial in vitro y ex vivo que culminan con la calcificación de la lesión [42]. De esta manera, la inflamación se resuelve con la remodelación del vaso que implica el depósito de tejido fibroso y de calcio en la lesión [43]; sin embargo, las moléculas implicadas en estos procesos no se conocen con precisión. La mayor parte de los ateromas contienen calcio, el cual representa hasta un 20% del volumen de la lesión. Así, se ha observado que los pacientes con un incremento en la carga de calcio de la placa tienen aproximadamente 10 veces más probabilidades de sufrir eventos cardíacos en los siguientes 5 años. La calcificación de la placa aterosclerosa es de inicio temprano, alrededor de la segunda década de la vida, justo después de la estría grasa. Por esta razón la aterosclerosis subclínica puede ser detectada por imagen basada en tomografía computada (CT) de la calcificación coronaria (CAC) utilizando el puntaje de Agatston; se ha sugerido que este procedimiento mejora la evaluación temprana del riesgo coronario [44-46].

JUSTIFICACIÓN

La caracterización del tejido adiposo epicárdico a nivel de la expresión de las proteínas involucradas en la calcificación ha sido poco estudiada, a pesar de que esta caracterización permitiría la participación de este tejido en el desarrollo de la enfermedad aterosclerosa coronaria y posiblemente establecer nuevos marcadores de riesgo de EAC. La etiología de la calcificación en la enfermedad aterosclerosa es aún poco conocida; varios estudios han puesto de manifiesto una relación estadística entre el volumen de la grasa epicárdica y la presencia de aterosclerosis coronaria, dando soporte a esta hipótesis [22-26]. Todas estas observaciones en su conjunto sugieren un papel activo del TAE en el desarrollo del ateroma y es importante investigar el impacto de esta acumulación de grasa ectópica: así, proponemos al tejido adiposo como un órgano parácrino. Debido a que se desconoce si la información que arrojan las herramientas actuales para la cuantificación de TAE, como la TC permite evaluar el potencial pro-calcificante de este tejido, el RNAm es un mejor indicador del nivel de expresión ya que se mantiene en las células como un marcador de activación genética, ya que cabe destacar que la OPN, OPG, ON, TNF α , son proteínas de secreción y por lo tanto no es válido cuantificar la proteína en el tejido aislado. Por lo tanto, la cuantificación plasmática de estas proteínas puede producir confusión ya que varios tejidos las producen. En este caso, el RNAm es un mejor indicador del nivel de expresión ya que no necesariamente existe una relación entre la concentración plasmática de las proteínas (si es detectable) con la producción local en el TAE. La evaluación del riesgo cardiovascular se podría mejorar sustancialmente por lo que es fundamental explorar los mecanismos que podrían relacionar al TAE con el desarrollo del ateroma, así como los factores que regulan la comunicación cruzada entre los tejidos implicados. De esta manera, surge la necesidad de caracterizar al tejido adiposo epicárdico en cuanto a la expresión de genes involucrados en la calcificación tales como la OPN, ON y OPG, así como la expresión de citocinas relacionadas con la inflamación que puedan exacerbar el proceso aterosclerótico. Se ha sugerido que el proceso de calcificación depende en gran medida de la expresión de OPN, mientras que puede ser atenuado por la ON, OPG, y las HDL. La etiología de la calcificación en la enfermedad aterosclerosa es aún poco conocida, y se han asociado alteraciones de ciertas

proteínas relacionadas con el depósito de calcio y la aterosclerosis y la caracterización del TAE a nivel de la expresión de las proteínas involucradas en la calcificación permitirá posiblemente establecer nuevos marcadores de riesgo de EAC. De tal manera, un desbalance entre los factores pro- y anti-calcificantes provenientes del TAE favorecerían el proceso, pero no existe suficiente evidencia experimental en esta área del conocimiento. La evaluación del riesgo cardiovascular se podría mejorar sustancialmente.

PROPUESTA TEÓRICA

El tejido adiposo epicárdico actúa como un órgano parácrino que favorece el proceso inflamatorio local y secreta proteínas que favorecen el depósito de calcio en las coronarias. Ambos procesos redundarían en un proceso ateromatoso exacerbado.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Esta incrementada la expresión local del RNAm de genes relacionados con la expresión de moléculas de calcificación e inflamación en el TAE en los sujetos con lesiones aterosclerosas y esto correlaciona con el score de calcio coronario y con el volumen de tejido adiposo epicárdico en comparación con los pacientes con estenosis aortica como grupo control?

HIPÓTESIS

Existe un desbalance en la relación OPN-ON-OPG asociado a la expresión exacerbada de citocinas pro-inflamatorias en el tejido adiposo epicárdico lo que determina el grado de calcificación del ateroma coronario y la gravedad de la enfermedad coronaria.

OBJETIVO

Determinar los niveles de expresión del RNAm de OPN, ON, OPG, TNF α , BM2 y BMP4 en el TAE, y establecer si se asocian con el score de calcio coronario y el volumen del tejido adiposos epicárdico estimado por tomografía computarizada en ambos grupos.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó un estudio de investigación básico-clínica, con un diseño transversal, prolectivo, comparativo de casos y controles. El grupo de casos se conformó con pacientes que ingresaron al servicio de hospitalización, con indicación quirúrgica de revascularización coronaria y con estudio de angiografía previa a la cirugía, el grupo control se conformó por pacientes que ingresaron al servicio de hospitalización, con diagnóstico de EAo con indicación de cambio valvular y sin coronariopatía asociada.

La muestra de TAE de 1 cm^3 se obtuvo durante la cirugía previa autorización y carta de consentimiento informado. Se realizó TC de tórax simple previo a la cirugía y carta de consentimiento informado previo reclutamiento.

Criterios de inclusión

El grupo de sujetos de estudio se integró por 10 pacientes de sexo masculino que ingresaron al servicio de hospitalización, con indicación quirúrgica de revascularización coronaria y con estudio de angiografía previa a la cirugía.

El grupo control se integró por 10 pacientes que ingresaron al servicio de hospitalización, con diagnóstico de estenosis aortica importante sin coronariopatía asociada, e indicación quirúrgica para cambio valvular (con área valvular aórtica menor o igual a 1 cm^2 , con velocidad a través de la válvula medido por ecocardiografía mayor a 4 m/s, y gradiente medio entre 40 y 50 mmHg, o bien gradiente pico-pico mayor o igual a 50 mmHg por cateterismo). El tamaño muestra es por conveniencia debido a que no existen antecedentes suficientes al respecto para un cálculo estadístico de la n.

Los pacientes fueron informados y aquellos que estuvieron de acuerdo en participar, firmaron la carta de consentimiento correspondiente (Anexo).

Criterios de exclusión

Diabetes mellitus

Insuficiencia renal (creatinina $> 1.5 \text{ mg/dL}$)

Hiperparatiroidismo o alteraciones conocidas del metabolismo de calcio

Distiroidismo

Pacientes con stents o cirugías cardíacas previas.

Pacientes con descompensación de su cardiopatía.

Tomografía computada

Previo a la cirugía, se tomó una TAC multicorte de coronarias, en donde se evaluó el score de calcio de las coronarias [36] así como de la válvula aortica, también se estimó el espesor de la grasa epicárdica. Las imágenes de las arterias coronarias fueron adquiridas en un equipo de tomografía computada de doble fuente de 128 cortes (Somatom Definition Flash128x2, Siemens, Forchheim, Alemania) siguiendo los parámetros de adquisición de exploración recomendadas. La mejor fase cardíaca diastólica fue seleccionada para la reconstrucción de la imágenes, que fueron analizadas en una estación de trabajo dedicada utilizando el software del score de calcio (Calcium Scoring, Siemens, Alemania). El software emplea un umbral de atenuación de 130 unidades Hounsfield y un mínimo de 3 de pixeles contiguos para la identificación de una lesión calcificada. Imagen sugestiva de calcio se calificó con el algoritmo desarrollado originalmente por Agatston et al. [36]. El total score de calcio se determinó sumando las puntuaciones individuales de la lesión de cada una de la arterias principales (tronco izquierdo, descendente anterior, circunfleja izquierda y coronaria derecha).

Obtención y manejo de las muestras

Durante el procedimiento quirúrgico al que fueron sometidos los pacientes, se obtuvo una muestra de tejido adiposo epicárdico de 1 cm³ aproximadamente del surco aurículo-ventricular derecho, entre 3 y 4 cm del nacimiento de la arteria coronaria. Las muestras se colocaron inmediatamente después de su obtención en solución *RNAlater*TM y transportadas dentro de las dos horas siguientes al departamento de Biología Molecular en donde se procesaron.

Medidas antropométricas y parámetros bioquímicos

Las medidas antropométricas fueron tomadas durante el ingreso previo a la cirugía y estas incluyeron: peso corporal, estatura, circunferencia de cintura, medida a nivel del ombligo, presión sanguínea, frecuencia cardiaca. Los parámetros bioquímicos que se analizaron fueron: colesterol total, triglicéridos, colesterol de HDL, glucosa plasmática calcio, fosfato y magnesio, perfil tiroideo y hepático por métodos colorimétricos comerciales y se llevaron a cabo en el laboratorio central del INC. Se cuantificaron además por métodos inmunoenzimáticos comerciales el TNF α .

PCR en tiempo real

El RNA total fue extraído con el kit comercial RiboPure™ RNA Purification Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El tejido adiposo epicárdico fue homogeneizado en trizol (100 mg de tejido por 1 mL de Trizol) y posteriormente centrifugado para eliminar la capa de lípidos que se forme en la superficie. El homogenizado fue separado y mezclado con cloroformo para extraer la fase acuosa, ésta se mezcló posteriormente con etanol y se transfirió inmediatamente a un tubo colector con filtro. El etanol fue desechado al centrifugar el tubo colector y mediante la adición posterior de la solución de lavado. RNA total presente en el filtro fue eluido con agua libre de nucleasas. El RNA obtenido fue cuantificado espectrofotométricamente a 260/280nm y la calidad de éste se evaluó a través de geles de agarosa al 1%. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 1 μ g de RNA total utilizando el kit comercial SuperScript® VILO™ cDNA synthesis (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

La expresión de los genes se realizó a través de PCR en tiempo real utilizando TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y el ABI 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), bajo condiciones de amplificación

estándar. Estudios piloto de nuestro laboratorio en muestras de tejido adiposo validaron como método de cuantificación relativa el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando como gen endógeno GAPDH. La expresión de los genes propuestos en este protocolo, OPN, ON, OPG, TNF- α y el gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (SPP1, SPARC, TNFRSF11B, TNF y GAPDH respectivamente, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) fue evaluada a través de este método, verificando se cumplan los requisitos de validación para este método comparativo.

ASPECTOS ÉTICOS

Se siguieron las leyes y normas tanto nacionales como internacionales para investigación clínica y aplicada en humanos: Ley de General de Salud, artículos 20, 100, 103 y pertinentes. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, declaración de Helsinki revisada y Código de Nürember. Se solicitó consentimiento informado para toma de biopsia de tejido adiposo epicárdico y tomografía cardíaca.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la descripción de las características generales de nuestra población se realizó prueba de normalidad Shapiro Wilk para ambos grupos (n=10), y posteriormente se analizó según lo expresado (U de Mann Whitney para distribución no normal y t de Student para distribución normal). Para variables categóricas se utilizó prueba de Chi-cuadrado. Se utilizó 95% de confianza con una p estadísticamente significativa al ser < 0.05 . Para el análisis de correlaciones entre ambos grupos se utilizó Coeficiente de correlación de Spearman y se empleó un análisis de regresión lineal mediante Coeficiente de determinación R cuadrada para determinar la contribución de la expresión de los genes analizados y el volumen del TAE y el SCC. Las variables independientes fueron: OPN, ON, OPG, TNF α , BMP2 Y BMP4 (eje y) y las variables dependientes fueron: VTAE y SCC (eje x). Todos los análisis se hicieron al 95% de confianza con una p estadísticamente significativa al ser < 0.05 .

RESULTADOS

En este estudio de investigación básico-clínica transversal, comparativo de casos y controles, se incluyeron 20 pacientes masculinos, 10 pacientes en el grupo control y 10 pacientes como casos, la media de edad de los casos fue significativamente mayor en comparación con el grupo control. De las variables que también presentaron diferencias significativas fueron las siguientes. El ácido úrico, colesterol sérico y colesterol-LDL fueron mayores en el grupo Control lo que puede reflejar la presencia de tratamiento intensivo hipolipemiante en los casos al ser pacientes con aterosclerosis coronaria (Tabla 1).

El nivel de expresión de RNAm de los genes analizados de OPN, ON, OPG, BMP2, BMP4 y TNF α no presentó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. De estas proteínas, la OPN, ON y OPG presentaron una distribución normal y el TNF α , BMP2 y BMP4 presentaron una distribución no normal.

El volumen de TAE en cm³ no presentó diferencia estadísticamente significativa. A diferencia de lo observado en el análisis del SCC en los casos donde fue significativamente mayor. (Tabla 1). Por otro lado los casos tenían tratamiento con ASA con mayor frecuencia que los controles.

Tabla 1. Características basales de la población

<i>Características</i>	<i>Grupo control</i> (n=10)	<i>Grupo casos</i> (n=10)	
	X±DS	X±DS	p
EDAD - años	55.8±11	67.2±5.7	0.01
IMC - kg/m ²	26.4±3.2	24.89±2.4	0.20
TAS - mm Hg.	120.5±14.8	130.5±17.8	0.10
TAD - mm Hg	72.7±12	77.3±11.65	0.39
Acido úrico - mg/dl	7.6±1.0	6.2±1.7	0.04
Creatinina - mg/dl	0.9±0.19	1.0±0.15	0.22
Magnesio - mg/dl	2.05±0.21	2.0±0.11	0.66
Calcio – mmolL	9.2±0.51	9.2±0.5	1.00
T3 – mg/dl	1.0±0.25	1.0±0.18	0.89
Colesterol - mg/dl	137±23.9	106±20	<0.01
Triglicéridos - mg/dl	110±35	117±47.5	0.70
HDL - mg/dl	30.6±6.9	32.17±7.5	0.65
LDL - mg/dl	84.8±19.9	51.0±16.38	<0.01
OPN Veces vs GAPDH	0.68±0.57	0.63±0.31	0.81
ON Veces vs GAPDH	0.8±0.42	1.07±0.35	0.14
OPG Veces vs GAPDH	0.71±0.41	0.74±0.46	0.86
	Mediana Rangos intercuartiles *		p
Volumen de TAE –cm ³ *	140(94.2-228.7)	136(94.7-148.75)	0.49
Fósforo - mg/dl*	3.4(3.2-4.2)	3.4(3.2-4.2)	0.59
Fosfatasa alcalina - mg/dl*	79.4(59.9-96.8)	92.8(74.3-124)	0.22
T4 - mg/dl	7.4±1.2	8.5±1.6	0.17
SCC Unidades Agatston*	0.0(0.0-6.2)	761(242-1825)	.002

TNF α - Veces vs GAPDH*	0.37(0.32-0.62)	0.80(0.50-1.44)	0.17
BMP2- Veces vs GAPDH*	0.67(0.25-1.05)	0.63(0.48-1.92)	0.75
BMP4- Veces vs GAPDH*	0.70(0.46-0.88)	0.72(0.50-1.0)	1.00
	n(%)	n(%)	
Estatina ~	4(40)	8(80)	0.68
Fibratos ~	2(20)	4(40)	0.32
Enalapril ~	5(50)	7(70)	0.36
Furosemida ~	1(10)	3(30)	0.26
ASA ~	2(20)	9(90)	<0.01
HAS ~	6(60)	6(60)	1.00
Dislipidemia ~	3(30)	6(60)	0.17

***Variables con distribución no normal (Prueba de U de Mann Whitney)**

~Variables categóricas (Prueba de Chi Cuadrada)

Análisis de correlación

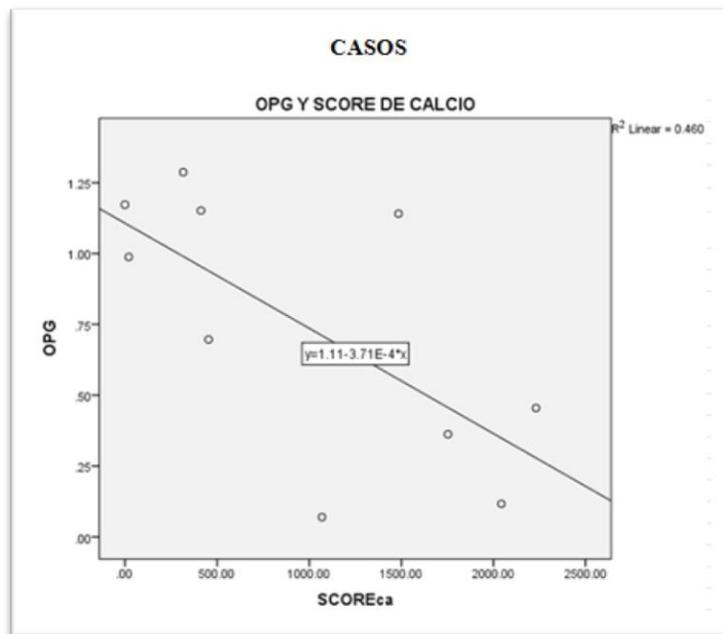
En el análisis de correlación entre la expresión del RNAm de los genes relacionados a calcificación e inflamación y VTAE y SCC en el grupo control se encontró una relación inversa, fuerte y significativa en el nivel de expresión de ON en el TAE en correlación con el VTAE.

Así mismo en el análisis de correlación de la expresión de RNAm de los genes relacionados a OPG y SCC se demostró este mismo patrón de expresión, por lo tanto en los pacientes con aterosclerosis coronaria existe una relación inversa, fuerte y estadísticamente significativa entre los niveles de expresión de RNAm de OPG y SCC. (Tabla 2)

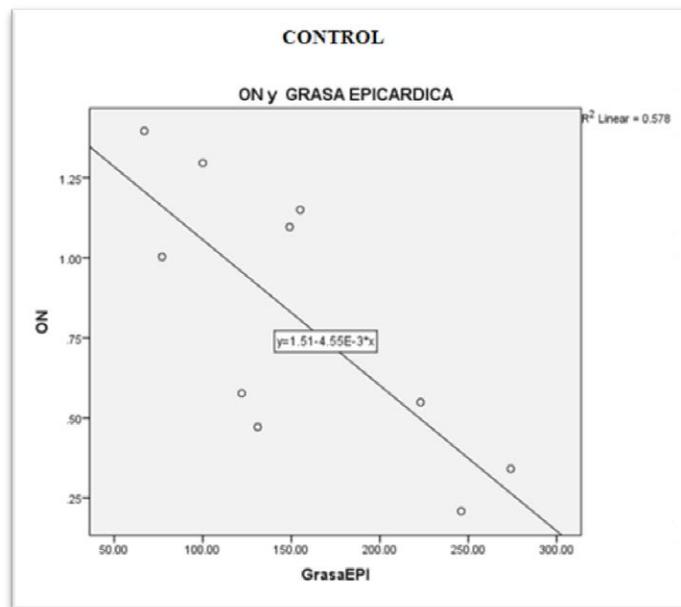
Tabla 2. Análisis de Correlación de Spearman

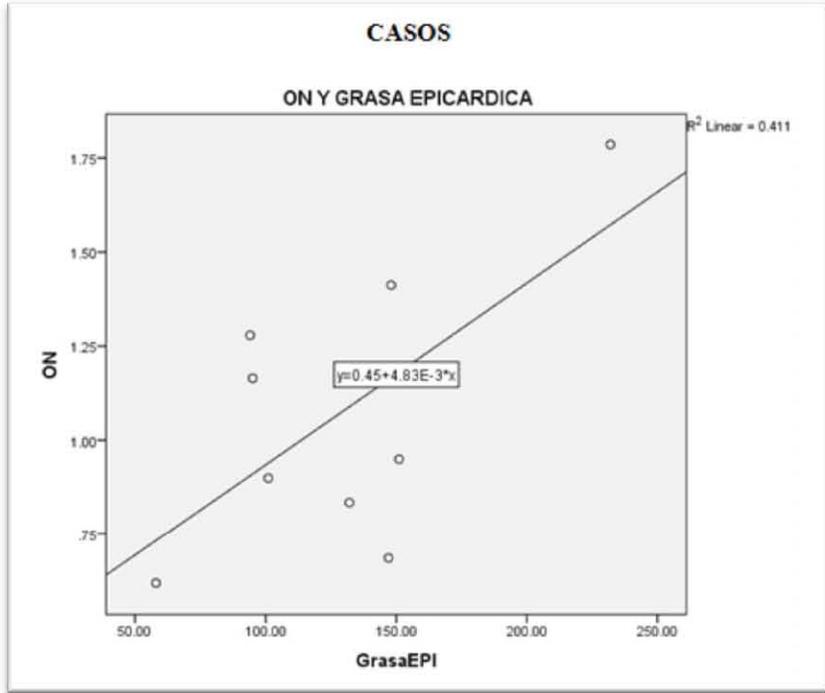
<i>RNAm – Controles</i>	<i>Coefficiente de correlación de Spearman</i>	<i>R cuadrada</i>	<i>p</i>
OPN – VTAE	-0.110	0.029	0.75
ON – VTAE	-0.720	0.578	0.019
OPG – VTAE	0.115	0.029	0.75
TNF α – VTAE	-0.321	0.076	0.36
BMP2 – VTAE	0.212	0.004	0.55
BMP4 – VTAE	-0.491	0.252	0.15
OPN – SCC	0.102	0.099	0.77
ON – SCC	-0.341	0.281	0.33
OPG – SCC	0.212	0.011	0.55
TNF α – SCC	-0.034	0.079	0.92
BMP2 – SCC	0.205	0.005	0.57
BMP4 – SCC	-0.355	0.180	0.31
<i>RNAm – Casos</i>	<i>Coefficiente de correlación de Spearman</i>	<i>R cuadrada</i>	<i>P</i>
OPN – VTAE	-0.091	0.002	0.80
ON – VTAE	0.406	0.411	0.24
OPG – VTAE	0.224	0.092	0.53
TNF α – VTAE	-0.176	0.005	0.62
BMP2 – VTAE	0.248	0.059	0.48
BMP4 – VTAE	0.042	0.103	0.90
OPN – SCC	-0.34	0.170	0.32
ON – SCC	-0.27	0.016	0.44
OPG – SCC	-0.69	0.460	0.025
TNF α – SCC	-0.03	0.004	0.93
BMP2 – SCC	0.11	0.013	0.75
BMP4 – SCC	-0.03	0.005	0.93

Correlación de la expresión de RNAm de genes de OPG y SCC en ambos grupos



Correlación de la expresión de genes de ON y VTAE en ambos casos.





DISCUSIÓN

En este estudio demostramos que el tejido adiposo epicárdico expresa el RNAm de la OPN, OPG, ON, BMP2, BMP4 y TNF α , sugiriendo la participación de este tejido en el proceso de calcificación de la placa ateromatosa actuando como un órgano parácrino.

En respuesta a la pregunta de investigación planteada inicialmente y sabiendo que la OPN se relaciona con la gravedad de las lesiones [10,19], se podría haber esperado que el nivel de expresión del RNAm fuera mayor en los pacientes con aterosclerosis coronaria ya que el TAE puede contribuir a la calcificación de la placa por medio de la síntesis de OPN y además esta molécula estimula por si sola al TNF α perpetuando la inflamación [19,47]. Sin embargo en esta tesis el nivel de expresión de OPN no alcanzó significancia estadística.

Es posible que en el grupo de pacientes con enfermedad aterosclerosa coronaria la expresión de OPN ya se haya estabilizado al existir calcificación local avanzada y significativa. Además, la OPN es una proteína de secreción y en este sentido es importante remarcar el concepto de que encontrar la expresión de RNAm es un indicador del nivel de expresión que se mantiene en las células como un marcador de activación genética y no siempre correlaciona con la cantidad de proteína secretada. Por otra parte, la fuente principal de esta proteína son los macrófagos infiltrados en el TAE [11]; en pacientes ya con aterosclerosis avanzada la placa aterosclerótica puede ya no estar conformada en su mayor parte por macrófagos infiltrados sino que han pasado por un proceso de formación de placa fibrosa con migración y proliferación de CML y su acumulación en la íntima [2]. En esta circunstancia, la secreción de proteínas de matriz extracelular da soporte a la capa fibrosa y los macrófagos presentes en esta etapa comienzan a expresar citocinas proinflamatorias, de manera que no es raro encontrar trayectos vasculares que ya hayan sufrido trombosis arterial con formación de trombo blanco y remodelado vascular. [2]

Por otro lado, la ON es una proteína anticalcificante [47] que en contraste con la OPN tiende a disminuir en las placas ateromatosas [15,19] y de hecho algunos estudios han demostrado una correlación inversa entre la expresión de ON y la incidencia de aterosclerosis [20], en este estudio en los pacientes sin aterosclerosis coronaria

significativa la ON se expresó de forma inversa a mayor VTAE. En los casos el grado de expresión de ON no presentó significancia estadística; sólo parece ser que el coeficiente de correlación de Spearman siguen una tendencia a presentar una relación inversa con el SCC; en analogía a la OPG, probablemente, la ON sigue un patrón de secreción inversa, es decir que tiende a disminuir en las placas ateromatosas calcificadas.

Asimismo, otras sustancias cuantificadas como BMP2 y BMP4 no presentaron diferencia estadística quizás por encontrarse río abajo en la cadena de estimulación del proceso de aterosclerosis. [47,11]

La siguiente cuestión importante planteada en nuestra tesis fue la de si existía alguna correlación de la expresión de RNAm de los genes mencionados con el SCC y/o el VTAE, es decir si existe una asociación estadística. En este sentido, observamos que en el TAE de pacientes con aterosclerosis coronaria el nivel de expresión de RNAm de OPG es inverso, es decir, a menor expresión de OPG mayor calcificación definida por SCC. Este resultado sigue la lógica de la biología descrita para esta molécula ya que bloquea la función de ligandos como RANKL y TRAIL que al activarse inducen la expresión de BMP4 y así estimula la calcificación de CML mediante diferenciación osteogénica, proceso que en los pacientes con EAC podría encontrarse sobreexpresado [47]. En este sentido, existe una relación entre el volumen de TAE medido por TAC y la expresión de genes relacionados a la calcificación, pero en todo caso es inversa en relación con el SCC.

Por otro lado se ha observado que el TAE se encuentra incrementado en pacientes con enfermedad arterial coronaria [15,16,17] y está asociada con la severidad de la enfermedad y con la calcificación coronaria. En nuestro estudio, el VTAE no presentó diferencia significativa en comparación con el grupo control; vale la pena destacar que el VTAE en ambos grupos es mayor al encontrado en otros estudios donde la mediana de volumen de TAE era de 126 cm³. [16, 29, 37].

Los resultados de esta tesis pueden soportar en cierta medida la hipótesis de que existe un desbalance en la relación OPN-ON-OPG asociado a la expresión exacerbada de citocinas pro-inflamatorias en el TAE lo que puede determinar el grado de calcificación del

ateroma coronario, observamos que el TAE expresa RNAm de genes implicados en la calcificación e inflamación y que en los pacientes con aterosclerosis coronaria avanzada predomina la expresión disminuida de OPG en el TAE.

El valor científico de esta tesis radica en el esfuerzo de correlacionar patrones de expresión de genes implicados en el proceso de aterosclerosis con aquella observación clínica de que las lesiones aterosclerosas se ubican siempre donde hay tejido adiposo adyacente a la arteria y nunca donde la arteria incursiona en el miocardio. De esta manera, se refuerza el concepto de que el TAE puede ser, además de un órgano parácrino, un marcador del grado de calcificación. Si bien la contribución del TAE en el desarrollo de lesiones aterosclerosas y su calcificación no está bien definida aun, en conjunto, las observaciones demostradas en esta tesis apoyan la premisa de que mas allá de una sobre o sub-expresión de estas proteínas, es posible que la calcificación sea consecuencia de un desbalance en la relación de sustancias pro y anticalcificantes. Cabe mencionar que este estudio se realizó en una población altamente seleccionada con tratamiento que modifica la historia natural de la enfermedad de manera importante es decir eran pacientes que tenían tratamiento anti isquémico óptimo e hipolipemiente intensivo lo que se reflejó en las características de la población en donde paradójicamente los pacientes con aterosclerosis coronaria tenían menores niveles de colesterol total, LDL y ácido úrico, por otro lado eran pacientes que se encontraban en su peso ideal con IMC alrededor de 25 ya que este es uno de los objetivos pre quirúrgicos que se requieren para que un paciente pueda ser candidato a cirugía de revascularización coronaria en el INC, ya que el IMC alto está asociado a incremento en la mortalidad, mayor morbilidad y costos de hospitalización. [48]

Reconocemos que la principal limitación del estudio es el tamaño de la muestra; en este sentido, los resultados de esta tesis constituyen un estudio piloto que justifica continuar reclutando pacientes para poder alcanzar datos significativos y así esclarecer el enlace biológico-clínico del proceso biológico implicado en la enfermedad con mayor mortalidad en el mundo que debe ser una prioridad en el estudio de la cardiología.

CONCLUSIONES

- Existe expresión local de RNAm de genes relacionados con la expresión de moléculas de calcificación e inflamación en el TAE en pacientes con aterosclerosis coronaria avanzada sin embargo no se demostró una expresión incrementada en este estudio, lo que puede estar influenciado por múltiples factores como la evolución en el tiempo del proceso de aterosclerosis.
- Existe una relación inversa significativa de la expresión de RNAm de ON en el TAE en relación con VTAE en los pacientes con EAo sin enfermedad coronaria significativa.
- Sustancias procalcificantes como BMP2 y BMP4 e inflamatorias como TNF α no presentaron diferencia estadística. Lo que de manera interesante demostró esta tesis aun con el limitado tamaño de la muestra fue que en el TAE de pacientes con aterosclerosis coronaria el nivel de expresión de RNAm de OPG el patrón de secreción es inverso fuerte y significativo, es decir mientras menor expresión de OPG se demostraba mayor SCC.
- El VTAE no presentó diferencia estadísticamente significativa en los grupos, sin embargo, el volumen encontrado en nuestra población es mayor al descrito en otros estudios. Existe un desbalance en la relación OPN-ON-OPG asociado a la expresión exacerbada de citocinas pro-inflamatorias en el TAE lo que puede determinar en el tiempo puede la expresión o no de calcificación, sin embargo en pacientes con aterosclerosis avanzada y significativa es la regulación a la baja y la relación inversa, fuerte y significativa de la OPG lo que determina el patrón de expresión en los pacientes con aterosclerosis coronaria.
- Además de que el TAE puede tener función de órgano parácrino y reservorio de RNAm de los genes más importantes relacionados a calcificación como OPN, ON, OPG, TNF α , BMP2 y BMP4, puede también tener la capacidad de ser un marcador inverso del proceso de aterosclerosis coronaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nezarat N, Kim M, Budoff M. Role of Coronary Calcium for Stratification and Prognostication. *Curr Treat Options Cardio Med*; 2017; 19:8.
2. Aldons J. Lysis Atherosclerosis. *Nature*. Vol 407. 14 septiembre 2000.
3. 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: 4301-4308.
4. Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ. Small, dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:1881-1888.
5. Mineo C, Deguchi H, Griffin JH, Shaul PW. Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res* 2006; 9:1352-1364.
6. 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: 231-236.
7. Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003; 108: 2751-2756.
8. Suzuki M, Pritchard DK, Becker L, Hoofnagle AN, Tanimura N, Bammler TK, Beyer RP, Bumgarner R, Vaisar T, de Beer MC, de Beer FC, Miyake K, Oram JF, Heinecke JW. High-density lipoprotein suppresses the type I interferon response, a family of potent antiviral immunoregulators, in macrophages challenged with lipopolysaccharide. *Circulation* 2010; 122: 1919-1927.
9. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 911-919.
10. Yu PJ, Skolnick A, Ferrari G, Heretis K, Mignatti P, Pintucci G, Rosenzweig B, Díaz-Cartelle J, Kronzon I, Perk G, Pass HI, Galloway AC, Grossi EA, Grau JB. Correlation between plasma osteopontin levels and aortic valve calcification: potential insights into the pathogenesis of aortic valve calcification and stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009; 138: 196-199.
11. Wada T, McKee MD, Steitz S, Giachelli CM. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin. *Circ Res* 1999; 84: 166-178.
12. 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: 2163-2168.
13. Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim HM, 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: 1003-1008.
 14. Alexopoulos N, McLean DS, Janik M, Arepalli CD, Stillman AE, Raggi P. Epicardial adipose tissue and coronary artery plaque characteristics. *Atherosclerosis* 2010; 210: 150-154.
 15. Kim TH, Yu SH, Choi SH, Yoon JW, Kang SM, Chun EJ, Choi SI, Shin H, Lee HK, Park KS, Jang HC, Lim S. Pericardial fat amount is an independent risk factor of coronary artery stenosis assessed by multidetector-row computed tomography: the Korean Atherosclerosis Study 2. *Obesity* 2011; 19: 1028-1034.
 16. Yong HS, Kim EJ, Seo HS, Kang EY, Kim YK, Woo OH, Han H. Pericardial fat is more abundant in patients with coronary atherosclerosis and even in the non-obese patients: evaluation with cardiac CT angiography. *Int J Cardiovasc Imaging* 2010; 26 (Suppl 1): 53–62.
 17. 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: 166– 171.
 18. Kim SH, Chung JH, Kwon BJ, Song SW, Choi WS. The associations of epicardial adipose tissue with coronary artery disease and coronary atherosclerosis. *Int Heart J.* 2014; 55:197-203.
 19. Zeyda M, Gollinger K, Todoric J, Kiefer FW, Keck M, Aszmann O, Prager G, Zlabinger GJ, Petzelbauer P, Stulnig TM. Osteopontin is an activator of human adipose tissue macrophages and directly affects adipocyte function. *Endocrinology* 2011; 152: 2219-2227.
 20. Gadeau AP, Chaulet H, Daret D, Kockx M, Daniel-Lamazière JM, Desgranges C. Time course of osteopontin, osteocalcin, and osteonectin accumulation and calcification after acute vessel wall injury. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 79-86.
 21. Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A, and 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.
 22. Yilmaz MB. Statins and aortic stenosis in the context of ratio of low- to high-density lipoprotein cholesterol. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 289-290.
 23. O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otto CM. Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:523–

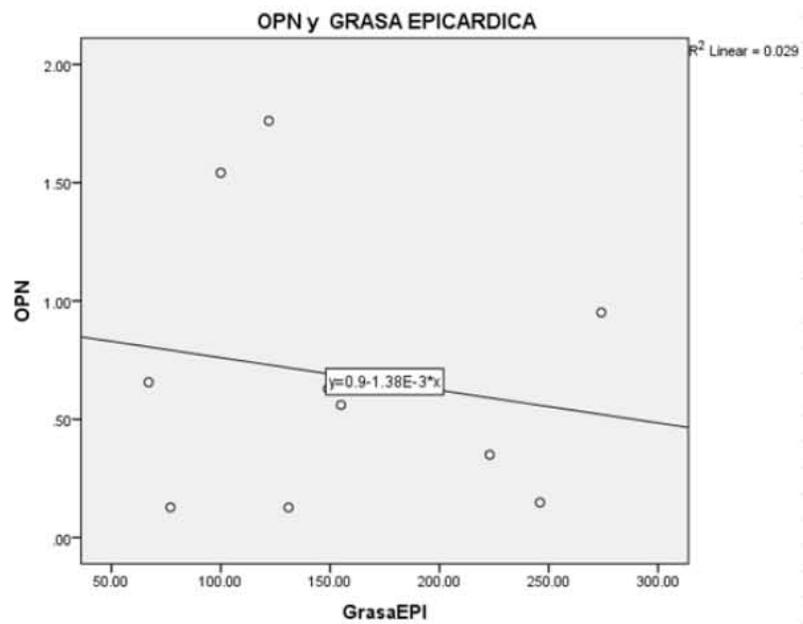
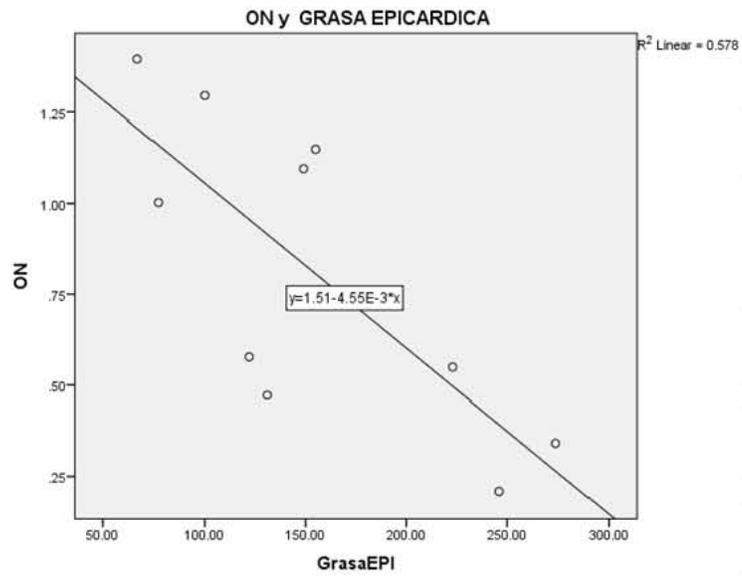
- 32.
24. Rajamannan NM, Subramaniam M, Stock SR, Stone NJ, Springett M, Ignatiev KI, McConnell JP, Singh RJ, Bonow RO, Spelsberg TC. Atorvastatin inhibits calcification and enhances nitric oxide synthase production in the hypercholesterolaemic aortic valve. *Heart* 2005; 91: 806–810.
 25. Busseuil D, 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: 765–773.
 26. Lommi, Petri T. Kovanen, Matti Jauhiainen, Miriam Lee-Rueckert, Markku Kupari, Satu Helske. High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification. *Atherosclerosis* 2011; 219: 538–544.
 27. Cherian S, Lopaschuk GD, Carvalho E. Cellular cross-talk between epicardial adipose tissue and myocardium in relation to the pathogenesis of cardiovascular disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 303:E937-E949.
 28. Iozzo P. Myocardial, perivascular, and epicardial fat. *Diabetes Care* 2011; 34 (Suppl 2): S371–S379.
 29. Andrew H. Talman¹, Peter J. Psaltis^{1,2}, James D. Cameron¹, Ian T. Meredith¹, Sujith K. Seneviratne¹, Dennis T. L. Wong. Epicardial adipose tissue: far more than a fat depot *Cardiovasc Diagn Ther* 2014;4(6):416-429.
 30. Corradi D, Maestri R, Callegari S, Pastori P, Goldoni M, Luong TV, Bordi C. The ventricular epicardial fat is related to the myocardial mass in normal, ischemic and hypertrophic hearts. *Cardiovasc Pathol* 13: 313–316, 2004.
 31. 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: 2460–2466.
 32. Baker AR, da Silva NF, Quinn DW, Harte AL, Pagano D, Bonser RS, Kumar S, McTernan PG. Human epicardial adipose tissue expresses a pathogenic profile of adipocytokines in patients with cardiovascular disease. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 1–7.
 33. Shibasaki I, Nishikimi T, Mochizuki Y, Yamada Y, Yoshitatsu M, Inoue Y, Kuwata T, Ogawa H, Tsuchiya G, Ishimitsu T, Fukuda H. Greater expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *Regul Pept* 2010; 165: 210–217.
 34. Sacks HS, Fain JN, Cheema P, Bahouth SW, Garrett E, Wolf RY, Wolford D, Samaha J. Inflammatory genes in epicardial fat contiguous with coronary atherosclerosis in the metabolic syndrome and Type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; 34: 730–733.

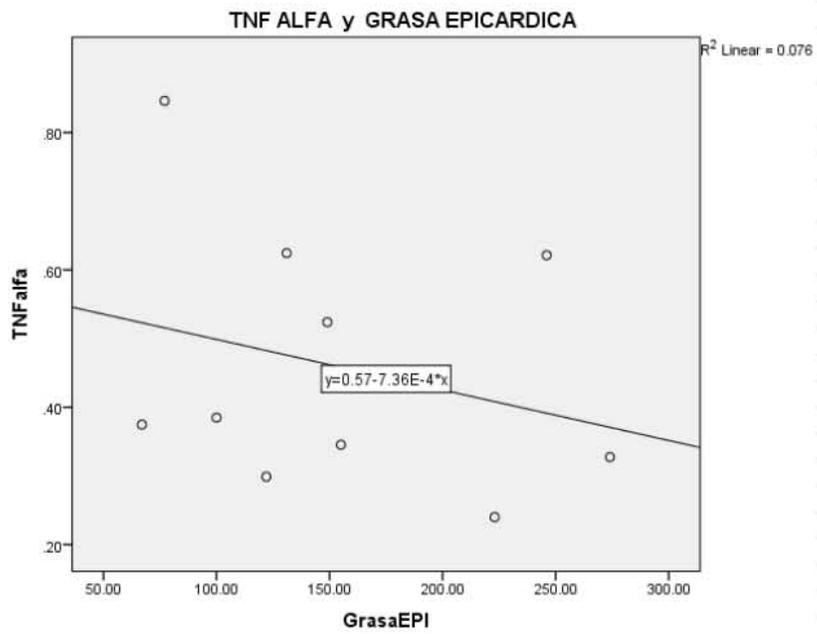
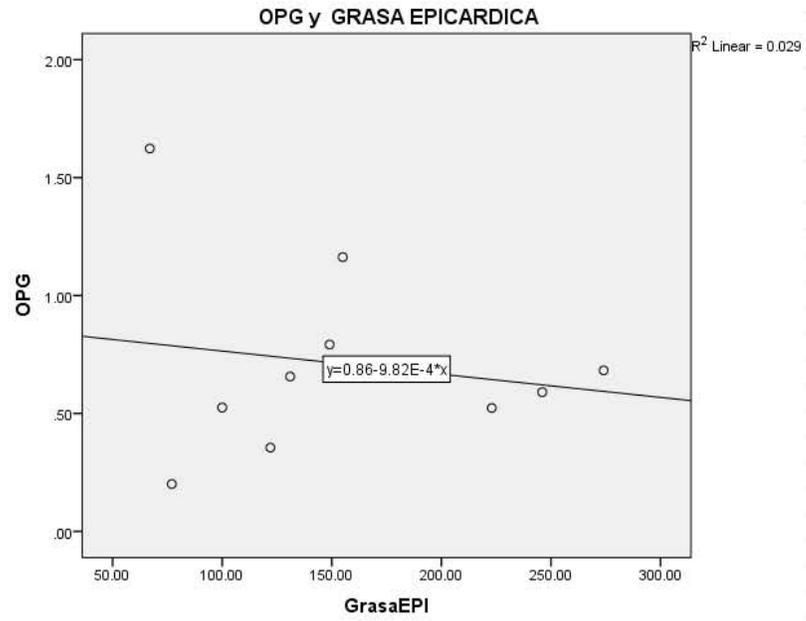
35. Ishikawa Y, Akasaka Y, Suzuki K, Fujiwara M, Ogawa T, Yamazaki K, Niino H, Tanaka M, Ogata K, Morinaga S, Ebihara Y, Kawahara Y, Sugiura H, Takimoto T, Komatsu A, Shinagawa T, Taki K, Satoh H, Yamada K, Yanagida-Iida M, Shimokawa R, Shimada K, Nishimura C, Ito K, Ishii T. Anatomic properties of myocardial bridge predisposing to myocardial infarction. *Circulation* 2009; 120: 376–383.
36. Mahabadi AA, Reinsch N, Lehmann N, Altenbernd J, Kälsch H, Seibel RM, Erbel R, Möhlenkamp S. Association of pericoronary fat volume with atherosclerotic plaque burden in the underlying coronary artery: a segment analysis. *Atherosclerosis* 2010; 211:195-199.
37. Groves EM, Erande AS, Le C, Salcedo J, Hoang KC, Kumar S, Mohar DS, Saremi F, Im J, Agrawal Y, Nadeswaran P, Naderi N, Malik S. Comparison of Epicardial Adipose Tissue Volume and Coronary Artery Disease Severity in Asymptomatic Adults With Versus Without Diabetes Mellitus. *Am J Cardiol* 2014; doi: 10.1016/j.amjcard.2014.05.057.
38. Yüce G, Türkvatan A, Yener O. Can aortic atherosclerosis or epicardial adipose tissue volume be used as a marker for predicting coronary artery disease? *J Cardiol* 2014; doi: 10.1016/j.jjcc.2014.03.017.
39. Toro, R., A. Mangas, and F. Gómez. 2011. Calcified aortic valve disease: association with atherosclerosis. *Med Clin (Barc)*. 136: 588-593.
40. Otto, C.M., J. Kuusisto, D.D. Reichenbach, A.M. Gown, and K.D. O'Brien. 1994. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation*. 90: 844-853.
41. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2548–2556.
42. Amir A. Mahabadi, Joseph M. Massaro, Guido A. Rosito, Daniel Levy, Joanne M. Murabito, Philip A. Wolf, Christopher J. O'Donnell, Caroline S. Fox, Udo Hoffmann. Association of pericardial fat, intrathoracic fat, and visceral abdominal fat with cardiovascular disease burden: the Framingham heart study. *European Heart Journal* 2009; 30:850-856.
43. Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1854-1863.
44. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte Jr M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 827-832.
45. Detrano R, Guerci AD, Carr JJ, Bild DE, Burke G, Folsom AR, et al. Coronary calcium as a predictor of coronary events in four racial or ethnic groups. *N Engl J Med* 2008; 358: 1336-1345.

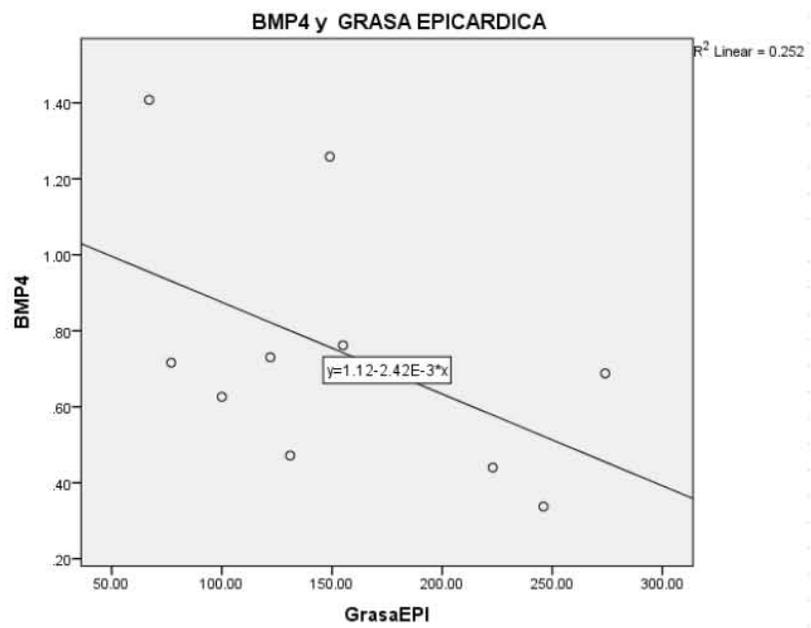
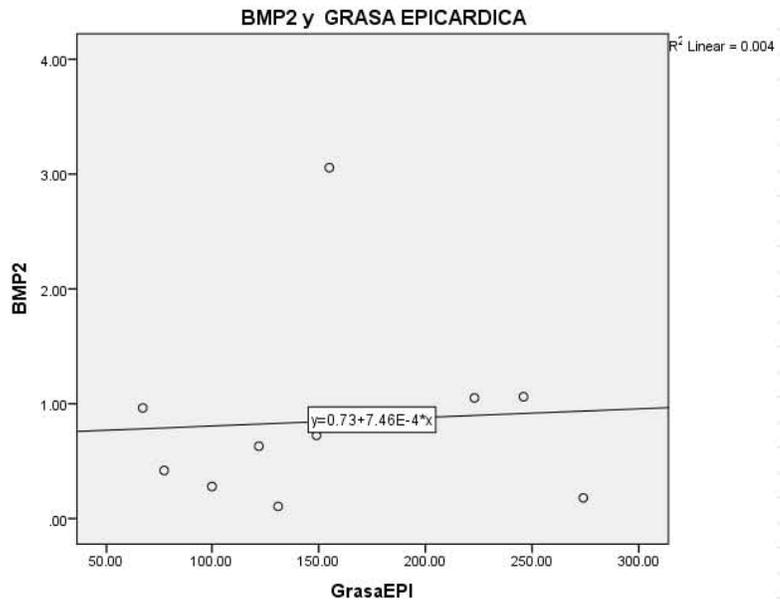
46. Vliedenthart R, Oudkerk M, Hofman A, Oei HH, van Dijck W, van Rooij FJ, et al. Coronary calcification improves cardiovascular risk prediction in the elderly. *Circulation* 2005; 112: 572-577.
47. Luna-Luna M, Medina-Urrutia A, Vargas Alarcon G, Coss-Roviroso F, Vargas-Barrón J, Pérez-Mendez OJ. Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. *Archives of Medical Research* 46 (2015) 392e407.
48. Ghanta R, LaPar D, Zhang Q, Devarkonda S. Obesity Increases Risk-Adjusted Morbidity, Mortality, and Cost Following Cardiac Surgery, *J Am Heart Assoc.* 2017;6:e003831.
49. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 2013; 9, 2: 191-200.
1. Chistiakov D, Grechko A, Myasoedova A, Melnichenko A, Orekhov A. Impact of the cardiovascular system-associated adipose tissue on atherosclerotic pathology. *Journal American of Atherosclerosis*.2017.06.017

ANEXOS

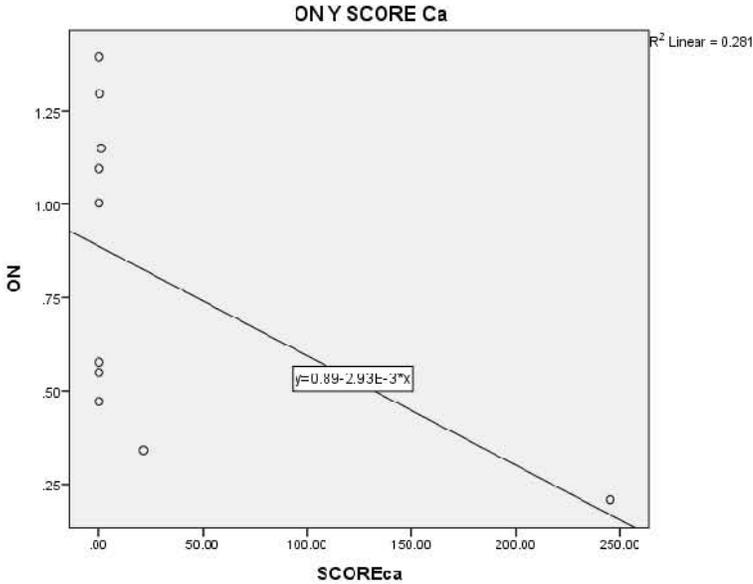
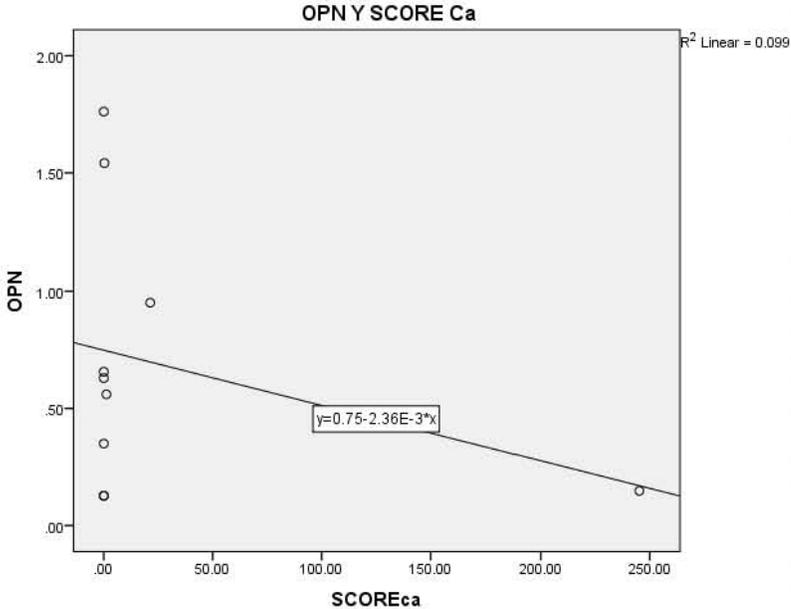
Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en TAE y VTAE en el grupo control.

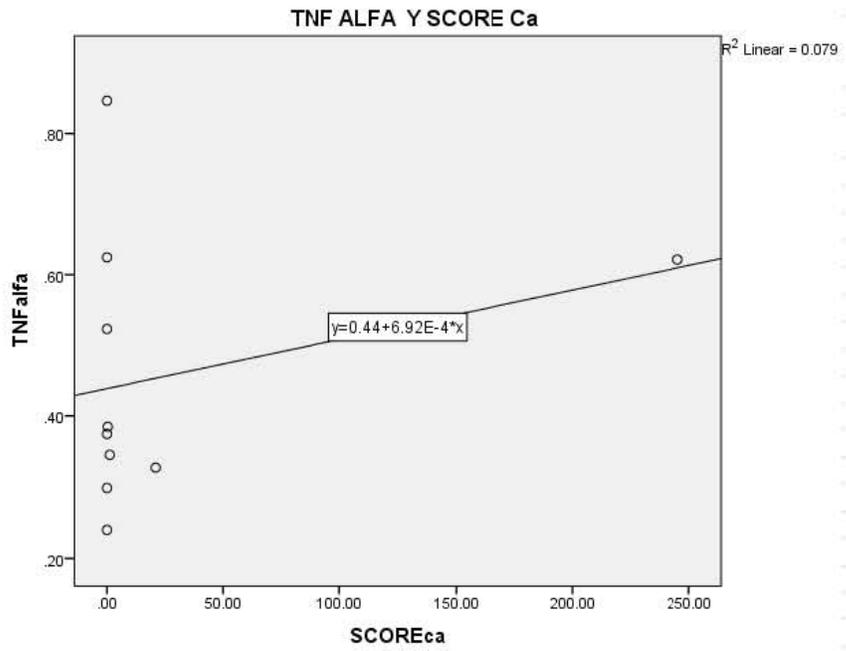
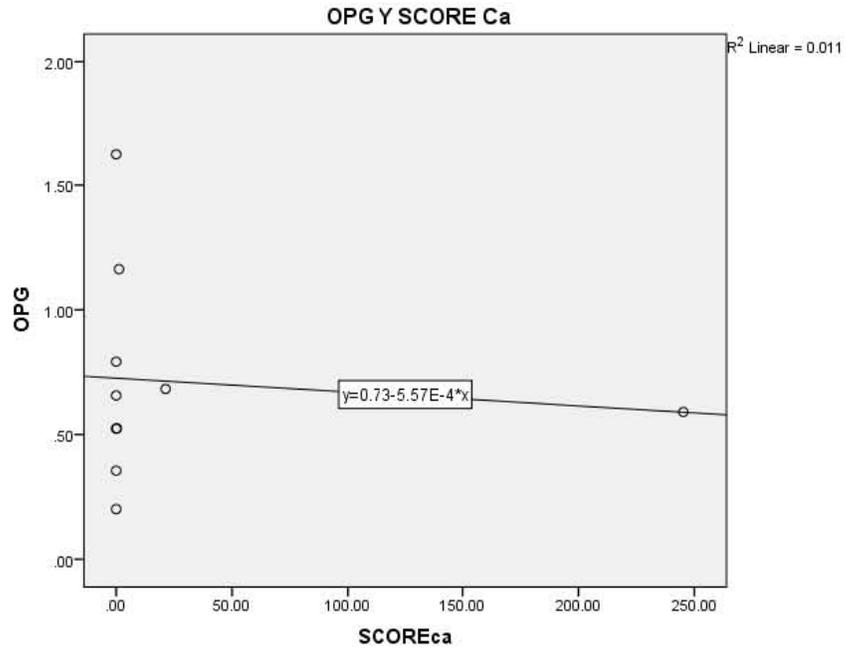


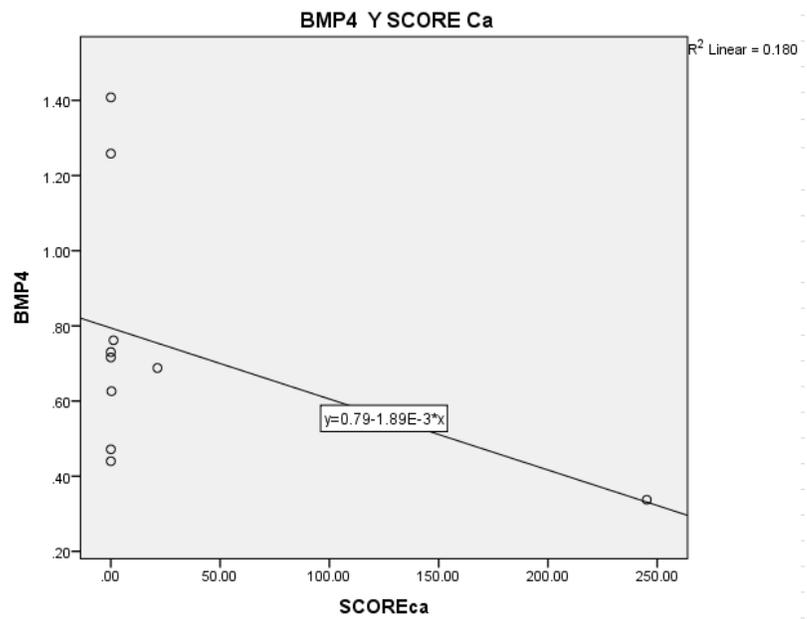
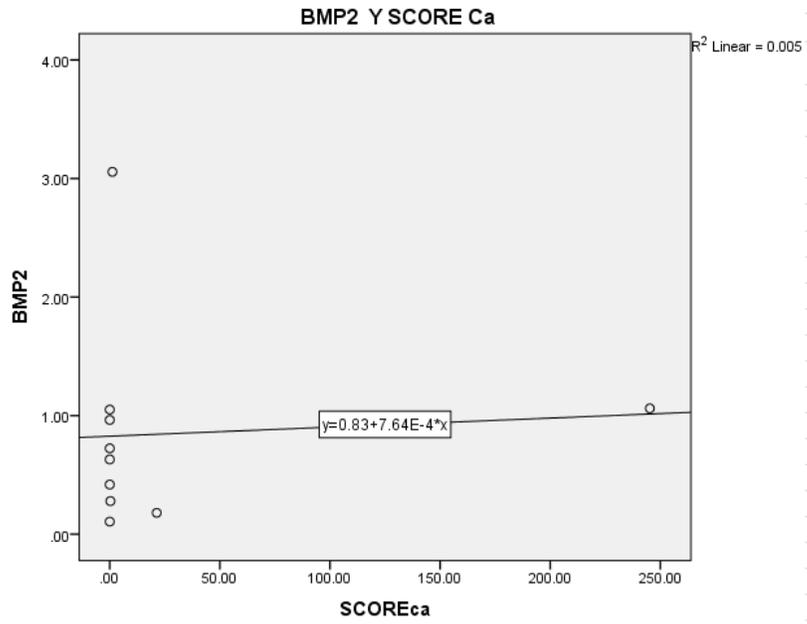




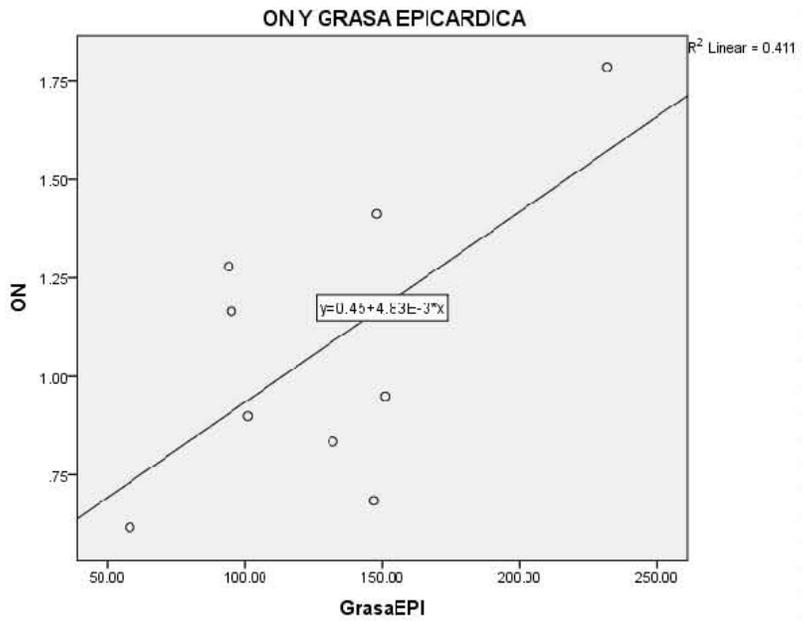
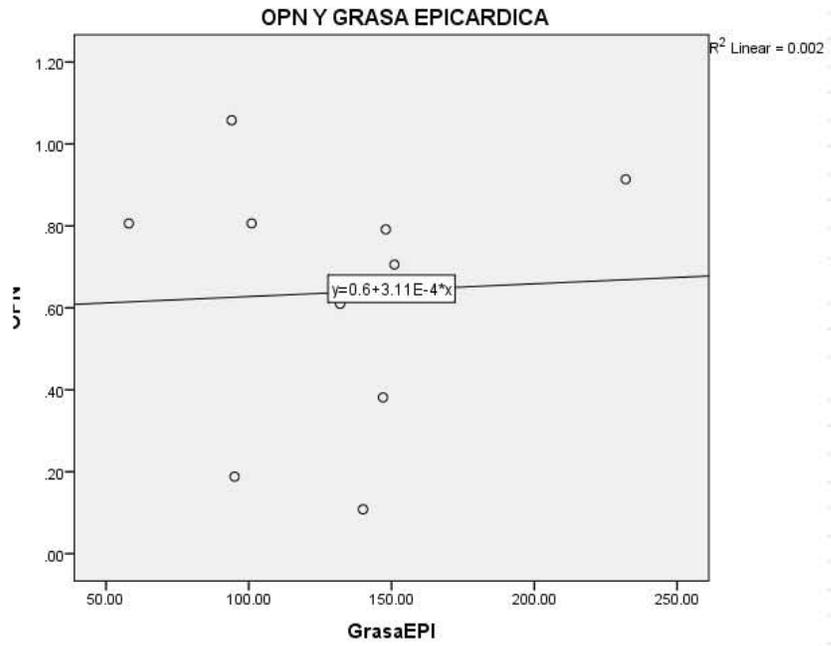
Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en TAE y el SCC en el grupo control.

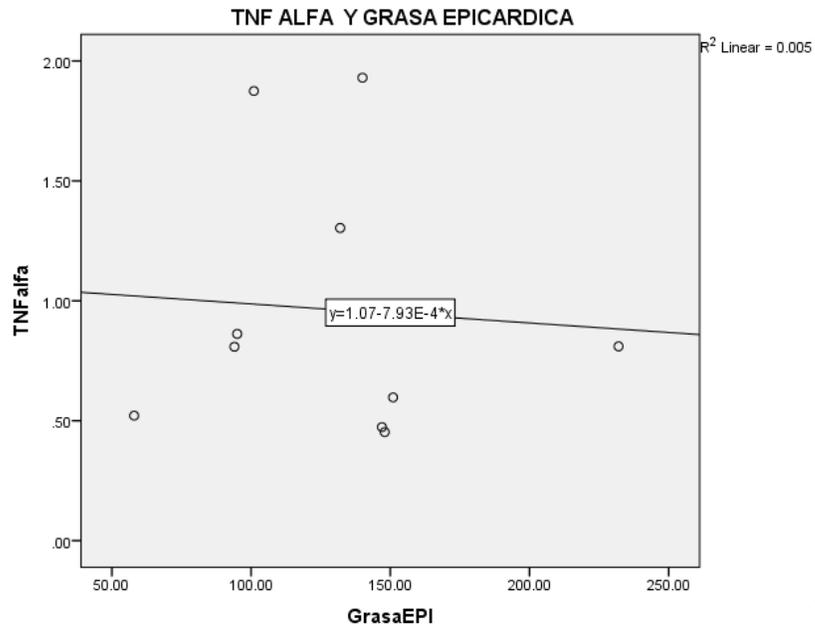
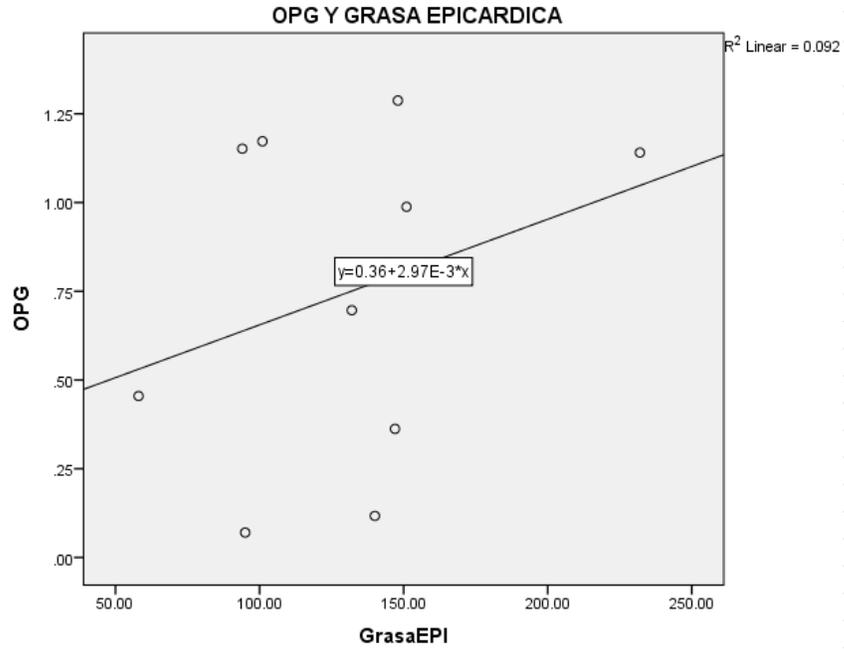


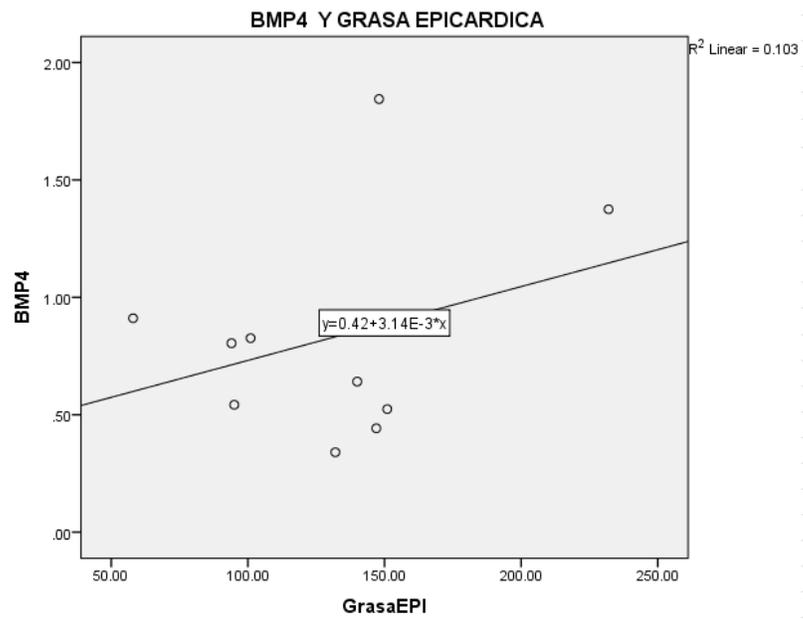
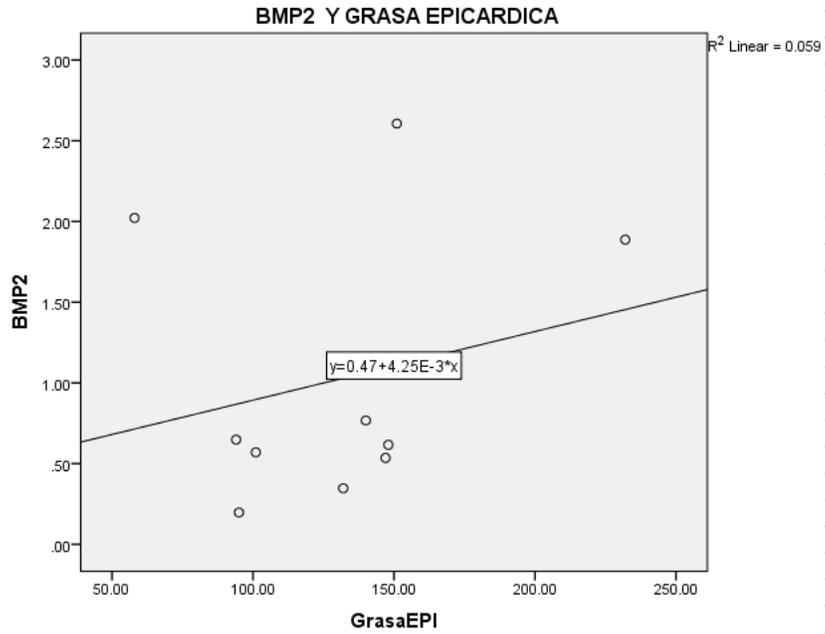




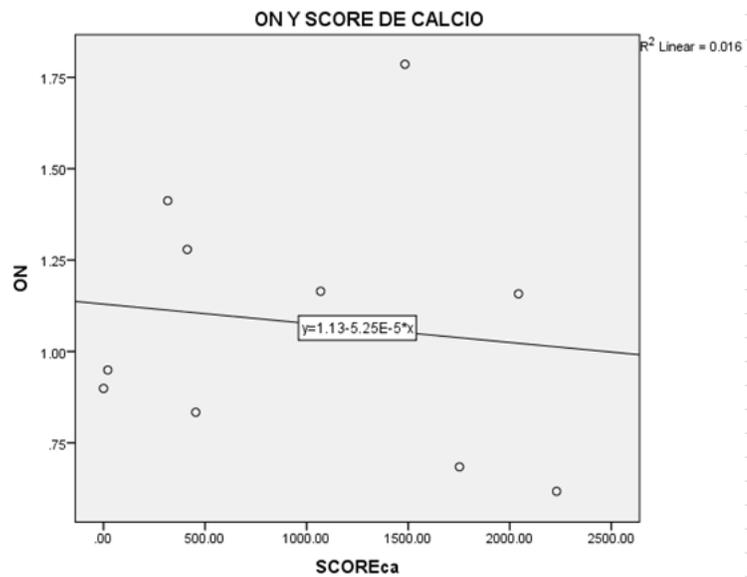
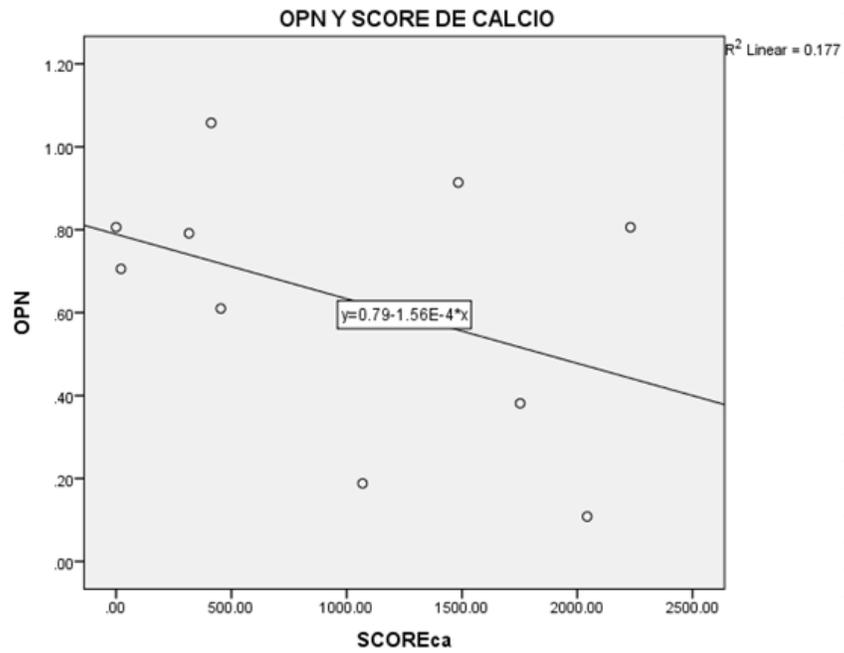
Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en TAE y VTAE en los casos.

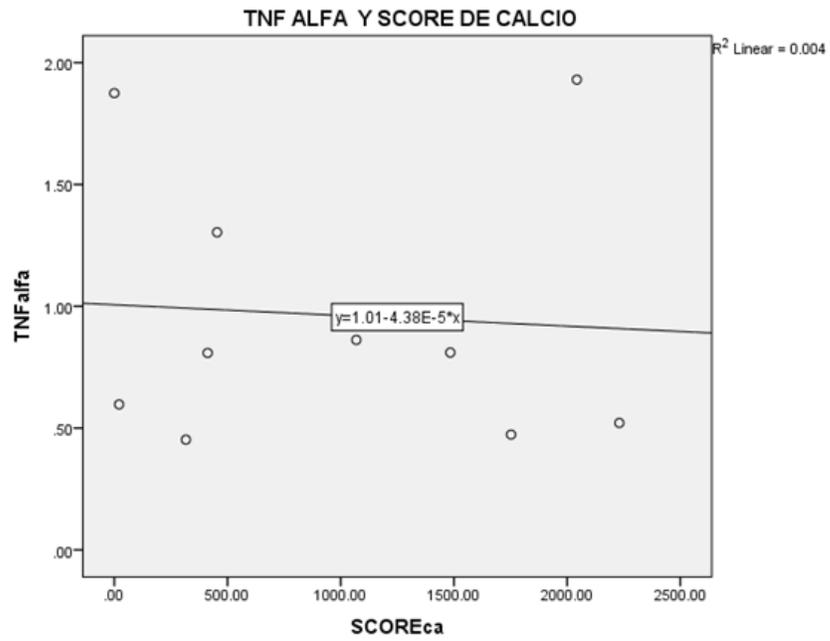
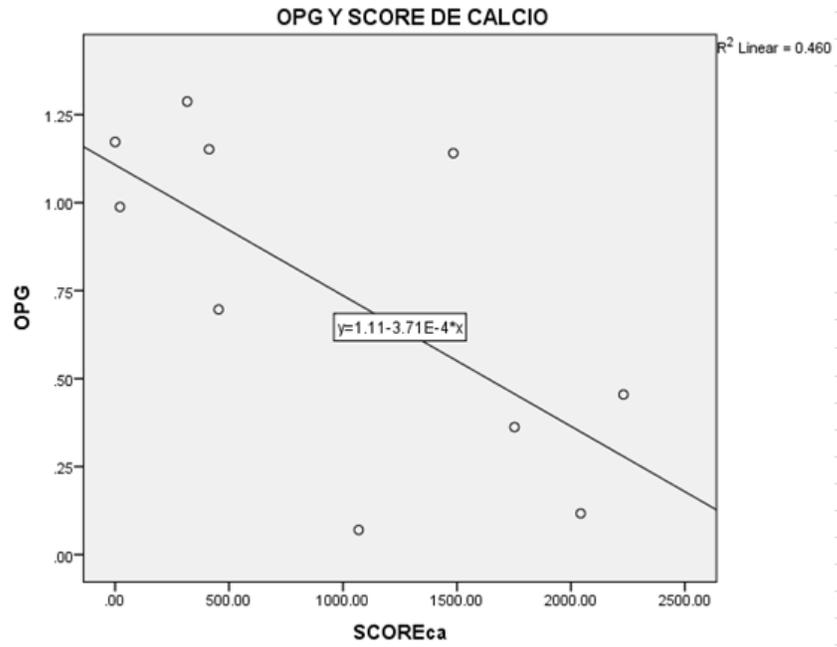


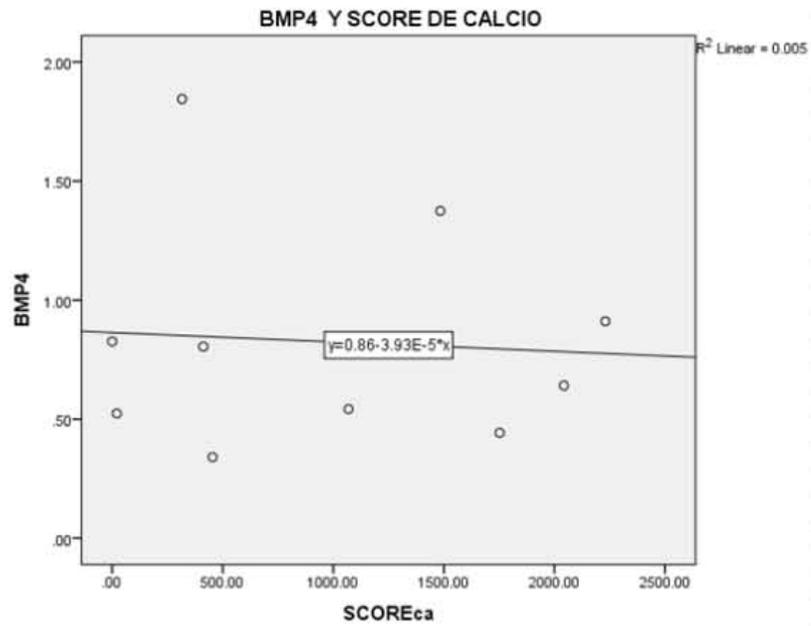
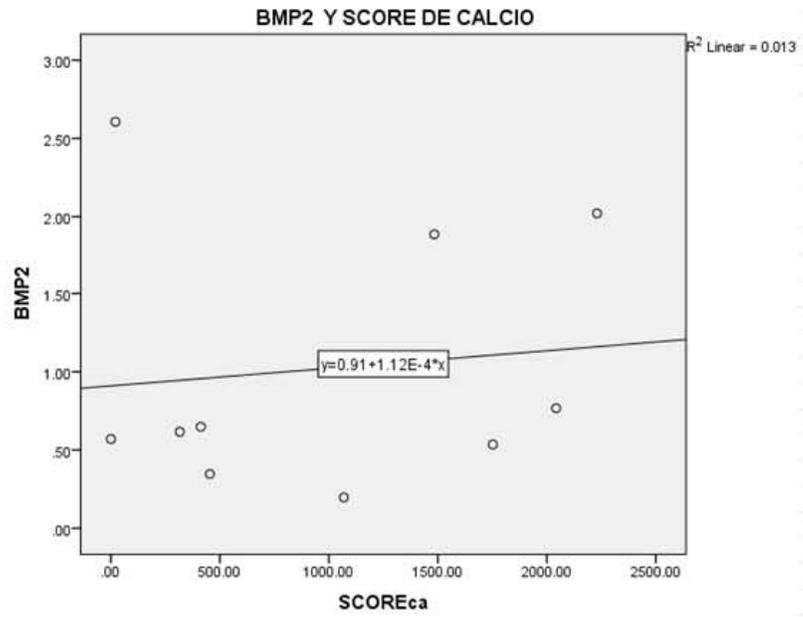




Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en TAE y SCC en los casos.









CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE BIOPSIA

Fecha _____, en: _____ Registro: _____

Paciente: _____

Yo (paciente) autorizo al cirujano cardiotorácico Dr. _____ la toma de biopsia de grasa epicárdica a nivel del septum interventricular (2mm^3) con fines de análisis que servirán para llevar a cabo el protocolo de investigación que lleva por título “**Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en tejido adiposo epicárdico de pacientes con aterosclerosis coronaria**” del cual es responsable el Dr. Óscar Pérez Méndez (Jefe del departamento de Biología Molecular) y el Dr. Valentín Herrera Alarcón (Jefe del departamento de Cirugía). Bajo este entendimiento, el médico arriba citado me ha explicado la información que contiene, entre otros aspectos, la naturaleza del plan y los riesgos inherentes que en este procedimiento en particular son: BAJOS, información que he comprendido y acepto en plena conciencia. Declaro que este documento representa lo que el médico me ha explicado con respecto al procedimiento, he podido plantear mis dudas las que han sido contestadas satisfactoriamente por éste. Lo anterior bajo lo dispuesto en el artículo 80 del reglamento de la ley general de salud en materia de prestación de servicios de atención médica: **Artículo 80:** En todo hospital y siempre que el estado del paciente lo permita, deberá recabarse a su ingreso la autorización escrita y firmada para practicarle, con fines diagnósticos o terapéuticos los procedimientos médico-quirúrgicos necesarios de acuerdo al padecimiento de quien se trate, debiendo informarle claramente el tipo de documento que esta presenta para su firma. Esta autorización inicial no excluye la necesidad de recabar después la correspondiente a cada procedimiento que atañe un riesgo para el paciente.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma cirujano cardiotorácico

Dr. Óscar Pérez Méndez // Dr. Valentín Herrera Alarcón

Testigos sin relación con el paciente ni el investigador

Testigo 1. Nombre, firma y dirección

Testigo 2. Nombre, firma y dirección



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMOGRAFÍA CARDIACA

Fecha _____, en: _____ Registro: _____

Paciente: _____

Yo (paciente) autorizo al cirujano cardiorácico Dr. _____ la la realización de una tomografía cárdica para cuantificar el puntaje de calcio coronario que servirá para llevar a cabo el protocolo de investigación que lleva por título **“Análisis de la expresión de RNAm de genes relacionados con la calcificación e inflamación en tejido adiposo pericárdico de pacientes con estenosis aórtica”** del cual es responsable el Dr. Óscar Pérez Méndez (Jefe del departamento de Biología Molecular) y el Dr. Sergio Criales (Jefe del departamento de Tomografía).

Bajo este entendimiento, el médico arriba citado me ha explicado la información que contiene, entre otros aspectos, la naturaleza del plan y los riesgos inherentes que en este procedimiento en particular son: BAJOS, información que he comprendido y acepto en plena conciencia. Declaro que este documento representa lo que el médico me ha explicado con respecto al procedimiento, he podido plantear mis dudas las que han sido contestadas satisfactoriamente por éste. Lo anterior bajo lo dispuesto en el artículo 80 del reglamento de la ley general de salud en materia de prestación de servicios de atención médica: **Artículo 80:** En todo hospital y siempre que el estado del paciente lo permita, deberá recabarse a su ingreso la autorización escrita y firmada para practicarle, con fines diagnósticos o terapéuticos los procedimientos médico-quirúrgicos necesarios de acuerdo al padecimiento de quien se trate, debiendo informarle claramente el tipo de documento que esta presenta para su firma. Esta autorización inicial no excluye la necesidad de recabar después la correspondiente a cada procedimiento que atañe un riesgo para el paciente.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma cirujano cardiorácico

Dr. Óscar Pérez Méndez // Dr. Sergio Criales

Testigos sin relación con el paciente ni el investigador

Testigo 1. Nombre, firma y dirección

Testigo 2. Nombre, firma y dirección

