



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PLASMÁTICAS DE INDIVIDUOS
CON ATROSKLEROSIS CORONARIA SUBCLÍNICA Y DE CONTROLES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. C. ZEPEDA GARCÍA OSCAR

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PLASMÁTICAS DE INDIVIDUOS
CON ATEROSCLEROSIS CORONARIA SUBCLÍNICA Y DE CONTROLES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

M. C. ZEPEDA GARCÍA OSCAR

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EDUARDO MARTÍNEZ MARTÍNEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. JUAN MIRANDA RÍOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2022

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/821/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **20 de junio de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** del estudiante **ZEPEDA GARCÍA OSCAR** con número de cuenta **304299225** con la tesis titulada **“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS VESÍCULAS EXTRACELULARES PLASMÁTICAS DE INDIVIDUOS CON ATROSCLEROSIS CORONARIA SUBCLÍNICA Y DE CONTROLES”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Vocal: DR. ÓSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ
Vocal: DR. JUAN GABRIEL JUÁREZ ROJAS
Vocal: DRA. MARTHA EUGENIA RUÍZ TACHIQÚIN
Secretario: DR. JUAN MIRANDA RÍOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 09 de septiembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales.

Expreso mi agradecimiento total al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme otorgado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y por las facilidades académicas y administrativas necesarias para cumplir con el programa de estudios, pero sobre todo por brindarme la oportunidad de realizar uno de los viajes más sorprendentes y apasionantes a través del conocimiento.

También y no menos importante agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la Beca Nacional de Posgrado, sin la cual nada de esto hubiese sido posible.

De igual forma agradezco a mi tutora principal, la Dra. Leonor Jacobo Albavera por apoyarme en este proceso a pesar de todas las vicisitudes, y a los integrantes de mi Comité Tutoral, al Dr. Juan Miranda Ríos y al Dr. Eduardo Martínez Martínez, por compartirme sus conocimientos y su pasión por lo que realizan y ser un ejemplo a seguir. Gracias por su guía, por sus consejos y por su aliento, en los momentos más álgidos de este proceso.

Agradecimientos personales.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo brindado durante cada parte de mi formación. Agradezco a mi hermana Alicia a su esposo José Luis, a mis sobrinos Luis y Aura por ser un motor en mi vida y una fuente inagotable de perseverancia y resiliencia. Agradezco a mi hermano Efrén, por todas las enseñanzas compartidas en mi vida. Agradezco a José Cruz y su esposa Vicki, por ser una luz en mi sendero. Gracias por tanto amor, cariño y apoyo incondicional, sin ustedes nada de esto sería posible.

También quiero agradecer a mis hermanos de espíritu, mis amigos y mis guías: Jesús Banda, Manuel Avantes, Carlos López, Naum Velázquez, Iván Gallegos, Lupin, Berenice Otero, Miguel Telona, Alejandro Candia, Eduardo Guerrero, Diego Silva, Anael Cortés, Diego López Mena y a Beli, quienes son un importante bastión en mi vida, y quienes me han apoyado en los momentos más complejos.

Así mismo, expreso un profundo y especial agradecimiento a cada uno de mis hermanos de Logia, quienes han sido un eje rector en mi vida desde hace más de 10 años, ¡gracias Libertad y Justicia 85!

Agradezco a las personas que integran el equipo de trabajo del laboratorio de enfermedades cardiovasculares del INMEGEN, a la Dra. María Teresa Villarreal Molina por recibirme en su laboratorio, a la Dra. Antonia González, por su camaradería, por sus consejos, por compartir desde algo de comer hasta su gran conocimiento, a la Dra. Mayra Domínguez por sus enseñanzas y camaradería. De la misma manera, agradezco a mi amigo, compañero y ciertamente maestro, Juan Alfonso Martínez Greene, por ser una guía muy importante y un apoyo increíble en este proyecto; desde luego, agradezco a Fernando Ulises Jiménez, por sus invaluable aportaciones al proyecto, pero sobre todo por su amistad.

Por otra parte, quiero agradecer a la Dra. Rosalinda Posadas y a la Dra. Fabiola López Bautista del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, por su invaluable y titánica labor en cuanto a la captación y obtención de muestras de los participantes voluntarios que hicieron posible esta investigación. Un especial agradecimiento al Dr. Fausto Sánchez Muñoz y al Dr. Adrián Hernández Díaz Couder, por ser una guía invaluable desde mi formación en el servicio social y por siempre compartirme sus luces y conocimientos.

Extiendo mi más profundo agradecimiento a los miembros de mi jurado: Dra. Rebeca López Marure, Dra. Martha Eugenia Ruíz Tachiquín, Dr. Juan Gabriel Juárez Rojas, Dr. Óscar Armando Pérez Méndez y al Dr. Juan Miranda Ríos, por revisar, guiar y sobre todo por enriquecer este trabajo, ya que me ayudaron a tener otra perspectiva de éste.

Desde luego, agradezco a cada uno de mis maestros del posgrado que tuve el gusto de conocer y aprender de ellos, gracias por proveer las herramientas necesarias para la adquisición de nuevos conocimientos y templanza, gracias por sus enseñanzas.

¡Gracias infinitas a todos!

Dedicatoria

A mi mamá.

A mi gran familia y a mis amigos.

A mis compañeros, hombres y mujeres médicos, científicos, enfermeros, químicos, camilleros, afanadores, con quien tuve la oportunidad de servir durante la emergencia sanitaria causada por la COVID-19. A la memoria de mis compañeros de profesión que perecieron durante la atención médica de pacientes COVID.

A aquellos que ya no están, pero que dejaron una enseñanza profunda en mi vida.

Ubi dubium ibi libertas

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción.....	3
1. Enfermedad arterial coronaria.....	3
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Fisiopatología	4
1.2.1 Definición de la aterosclerosis	4
1.2.2 Historia natural de la enfermedad.....	4
1.3 Factores de riesgo.....	8
2. Las vesículas extracelulares.....	9
2.1 Clasificación de las EVs.....	9
2.2 Biogénesis de las EVs	10
2.2.1 Exosomas	10
2.2.2 Microvesículas.....	11
2.2.3 Cuerpos apoptóticos.....	12
2.3 Contenido molecular de las EVs.....	13
2.4 Función e interacción de las EVs con células receptoras.....	14
2.5 Las EVs en el contexto de la aterosclerosis y la enfermedad arterial coronaria.....	15
3. Los microRNAs	17
3.1 Síntesis y maduración de los microRNAs	17
3.2 Funciones.....	18
3.3 Los microRNAs contenidos en las EVs y su papel en la aterosclerosis.....	19
4. Planteamiento del problema.....	20
5. Hipótesis.....	20
6. Objetivos	20
6.1 General.....	20
6.2 Específicos	20
7. Metodología	21
7.1 Población de estudio.....	21
7.2 Obtención del plasma sanguíneo.....	22
7.3 Aislamiento de las EVs plasmáticas para los ensayos de TEM y Western Blot.....	22
7.4 Caracterización de las EVs por TEM.....	22
7.5 Inmunodetección por ensayo Western Blot.....	23

7.6 Estandarización para la obtención de las EVs y RNA total a partir de plasma para los ensayos de expresión diferencial de los microRNAs	23
7.7 Aislamiento de EVs y purificación del RNA total a partir de plasma.....	25
7.8 Análisis de expresión diferencial de los microRNAs contenidos en la EVs mediante microarreglos.....	25
7.9 Análisis <i>in silico</i> de las posibles vías moleculares afectadas por los microRNAs con expresión diferencial	25
7.10. Análisis estadístico de las variables	25
8. Resultados obtenidos en la cohorte de descubrimiento	26
8.1 Cohorte de descubrimiento.....	26
8.2 Caracterización de la forma y tamaño de las EVs	27
8.3 Caracterización bioquímica de las EVs	27
8.4 Obtención de las EVs y RNA total a partir de plasma.....	29
8.5 Análisis de expresión de microRNAs mediante microarreglos	31
8.6 Análisis <i>in silico</i> de las posibles vías afectadas	33
9. Discusión.....	34
10. Conclusiones.....	38
11. Perspectivas.....	38
12. Referencias bibliográficas.....	39

Resumen

Introducción: La aterosclerosis es la lesión de la capa íntima de los vasos sanguíneos que culmina con la formación de la placa de ateroma. Las etapas más tempranas de esta lesión son asintomáticas y se denominan como aterosclerosis subclínica. El infarto de miocardio es una de las complicaciones de la aterosclerosis coronaria y la principal causa de muerte en México y el mundo. Las vesículas extracelulares (EVs, por sus siglas en inglés) son pequeñas estructuras esféricas carentes de organelos y delimitadas por una bicapa lipídica, desempeñan un papel importante en diversos procesos fisiológicos y patológicos del cuerpo humano, entre ellos, la aterosclerosis. Las EVs transportan microRNAs que contribuyen en la regulación y progresión de la aterosclerosis coronaria subclínica (ACS) y de la enfermedad arterial coronaria. Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos implicados en procesos celulares como proliferación, diferenciación, metabolismo, envejecimiento y apoptosis. Su potencial uso como biomarcadores es de gran interés ya que permitirían identificar a individuos con riesgo de padecer las severas complicaciones de la aterosclerosis en etapas más tempranas.

Objetivo: Caracterizar el tamaño, la forma y los marcadores proteicos de las EVs plasmáticas de individuos con ACS y de controles, así como el perfil de expresión de microRNAs contenidos en ellas.

Método: Se formaron dos cohortes: una de descubrimiento y otra de validación a partir de individuos mexicanos de sexo masculino pertenecientes al grupo control del proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), a quienes se les realizó una tomografía computarizada simple de las arterias coronarias. En cada una de las dos cohortes se crearon dos grupos utilizando el puntaje de calcio de las arterias coronarias (CACS, por sus siglas en inglés) como variable de contraste: individuos con evidencia de placa ateromatosa e individuos sin evidencia de placa, los cuales fueron pareados por edad y categoría de índice de masa corporal (IMC). Se obtuvieron muestras de plasma sanguíneo a partir del cual se aislaron las EVs. En la cohorte de descubrimiento se caracterizó el tamaño y la forma de las EVs por microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), y se identificaron marcadores proteicos mediante Western Blot. Se obtuvo el RNA total proveniente de estas EVs y se analizó la expresión diferencial de los microRNAs a través de un microarreglo GeneChip miRNA 4.0 de Affymetrix con 6599 sondas para microRNAs de humano. Los datos del microarreglo fueron analizados con el software Partek Genomic Suite v7.0©, estableciendo un valor de veces de cambio (Fold Change) de ± 2 y un valor de $P < 0.05$ como significativos.

Resultados: Se identificó la presencia de EVs en el plasma sanguíneo en ambos grupos en la cohorte de descubrimiento; la forma esférica y el tamaño observados en las laminillas corresponden a subpoblaciones de vesículas denominadas exosomas y microvesículas. Se confirmó la presencia de dos marcadores proteicos exosomales (CD9 y CD63). El análisis por microarreglo identificó 19 microRNAs contenidos en las EVs de ambos grupos con expresión diferencial: 11 microRNAs regulados a la baja y 8 microRNAs regulados a la alta con respecto al grupo control. El análisis *in silico* mostró que estos microRNAs regulan principalmente genes involucrados en procesos inflamatorios, de proliferación y supervivencia celular.

Conclusiones: Existe una expresión diferencial de los microRNAs transportados en las EVs entre los sujetos con ACS y los sujetos del grupo control, lo que sugiere la existencia de una firma molecular asociada al proceso de aterosclerosis; determinar dicha expresión diferencial podría ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar esta enfermedad y sus complicaciones.

Abstract

Introduction: Atherosclerosis is the lesion of the intimal layer of the blood vessels that culminates in the formation of the atherosclerotic plaque. The earliest stages of this lesion are asymptomatic and are referred as subclinical atherosclerosis. Myocardial infarction is one of the complications of coronary atherosclerosis and the main cause of death in Mexico and the world. The extracellular vesicles (EVs) are small spherical structures devoid of organelles and bounded by a lipid bilayer, they play an important role in various physiological and pathological processes in the human body, including atherosclerosis. EVs carry microRNAs that contribute to the regulation and progression of subclinical coronary atherosclerosis (SCA) and coronary artery disease. The microRNAs are small non-coding RNA molecules of approximately 21 to 23 nucleotides involved in cellular processes such as proliferation, differentiation, metabolism, aging, and apoptosis. Their potential use as biomarkers is of great interest since they would allow the identification of individuals at risk of suffering the severe complications of atherosclerosis in earlier stages.

Objective: To characterize the size, shape, and protein markers of plasma EVs from individuals with SCA and controls, as well as the expression profile of microRNAs contained in them.

Method: Two cohorts were created: the discovery cohort and the validation cohort, both from Mexican male individuals belonging to the control group of the Genetics of Atherosclerotic Disease (GEA) project, who underwent a simple computed tomography of the coronary arteries. In both cohorts, two groups were formed using the coronary artery calcium score (CACs) as a contrast variable: individuals with evidence of atheromatous plaque and individuals without evidence of plaque, who were matched for age and Body Mass Index (BMI) category. Blood plasma samples were obtained from which the EVs were isolated. In the discovery cohort, the size and shape of EVs were characterized by transmission electron microscopy (TEM), and protein markers were identified by Western Blot. Total RNA from these EVs was obtained, the differential expression of the microRNAs was analyzed through an Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 microarray with 6599 probes for human microRNAs. The microarray data were analyzed with the Partek Genomic Suite v7.0© software, establishing a Fold Change of ± 2 and a P value < 0.05 as significant.

Results: The presence of EVs in blood plasma in both groups of the discovery cohort was identified, the spherical shape and size observed in the lamellae correspond to subpopulations of vesicles called exosomes and microvesicles. In addition, the presence of two exosomal protein markers (CD9 and CD63) was confirmed. Microarray analysis identified 19 microRNAs contained in the EVs of both groups with differential expression: 11 downregulated microRNAs and 8 upregulated microRNAs concerning the control group. *In silico* analysis showed that these microRNAs mainly regulate genes involved in inflammatory processes, cell proliferation and survival.

Conclusions: There is a differential expression of the microRNAs transported in the EVs between the subjects with SCA and the subjects of the control group, which suggests the existence of a molecular signature associated with the atherosclerosis process; to determine this differential expression could help to identify individuals at risk of developing the disease and its complications.

Introducción

1. Enfermedad arterial coronaria

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es una condición patológica de las arterias que irrigan al corazón, y frecuentemente es resultado de un proceso denominado aterosclerosis, un proceso inflamatorio que afecta la función de las arterias al reducir su luz y con ello el flujo sanguíneo, dicha condición reduce el aporte de oxígeno al músculo cardíaco, lo que puede conducir a la muerte del tejido cardíaco y generar falla cardíaca o muerte (1).

1.1 Epidemiología

Las complicaciones de la EAC representan la primera causa de muerte en el mundo (2). En el año 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó un estimado de 17.9 millones de muertes a causa de las enfermedades cardiovasculares, lo que representó el 32% de las muertes globales. De estas muertes, el 85% fueron causadas por la EAC (3). La incidencia y mortalidad es mayor en hombres que en mujeres en edad premenopáusicas, 3 y 5 veces, respectivamente (4, 5).

En México, la prevalencia de la EAC ha incrementado desde la segunda mitad del siglo XX, hasta llegar a ser la primera causa de muerte en nuestra población. (6). De acuerdo con los datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) durante el año 2019, las enfermedades del corazón representaron la primera causa de mortalidad en nuestro país (7). En el periodo comprendido entre los meses de enero a junio del año 2021, la COVID-19 ocupó el primer lugar como causa de muerte y las enfermedades cardiovasculares el segundo. Para este periodo el INEGI reportó 579,596 defunciones, de las cuales 113,899 (19.65%) se debieron a enfermedades del corazón (8). (Figura 1). El riesgo de padecer EAC incrementa con la edad y con la presencia de comorbilidades como diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica y obesidad (6).

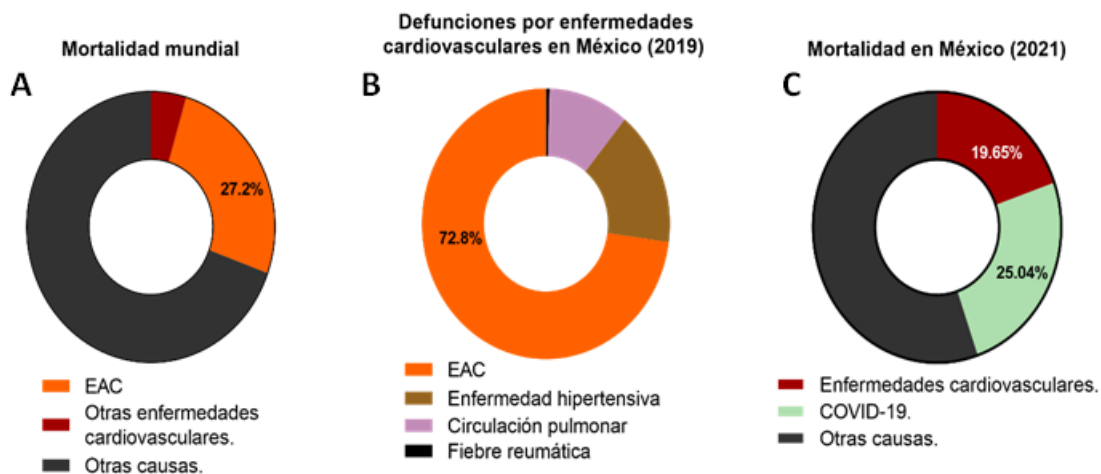


Figura 1. (A) Según la OMS, la EAC causó el 27.2% (15.21 millones) de muertes a nivel mundial y en conjunto con otras enfermedades cardiovasculares representaron el 32% (17.9 millones) de las muertes en el año 2019 (3). (B) En México en el año 2019 las enfermedades cardiovasculares fueron la primera causa de muerte, siendo la EAC la de mayor impacto en la mortalidad (7). (C) Para el año 2021, la COVID-19 ocupó la primera causa de muerte con el 25.04% (145,159 muertes), mientras que las enfermedades cardiovasculares representaron el 19.65% (113,899) de la mortalidad (8).

1.2 Fisiopatología

1.2.1 Definición de la aterosclerosis

La aterosclerosis es la acumulación de grasa y material fibroso en la capa más interna de la pared del vaso sanguíneo, llamada íntima (9). El término aterosclerosis, cuyas raíces griegas significan papilla y endurecimiento, se refiere a la apariencia del material lipídico hallado en el centro del ateroma, que es la lesión focal en forma de placa en la pared interna del vaso sanguíneo (10).

1.2.2 Historia natural de la enfermedad

La aterosclerosis comprende tres etapas: inicio, progresión y complicaciones (9). Las primeras dos se caracterizan por ser asintomáticas (aterosclerosis subclínica), mientras que la tercera etapa se caracteriza por la manifestación de los signos y síntomas propios de la EAC, la fase clínica de la enfermedad (10).

- Inicio

El endotelio es una monocapa de células planas que recubre el interior de las paredes de los vasos sanguíneos. Su lesión representa un hecho fundamental para el inicio de la aterosclerosis (9). Estas lesiones ocurren por lo general en regiones donde el flujo sanguíneo es turbulento (11), la turbulencia aunada a las altas concentraciones de una lipoproteína de baja densidad transportadora de colesterol, conocida como LDL, producen la permeabilidad de esta capa, así, estas lipoproteínas pueden ingresar al espacio subendotelial del vaso sanguíneo, donde interactúan con proteoglicanos, lo que favorece su retención. Posteriormente, las lipoproteínas son oxidadas por proteasas y lipasas como las mieloperoxidasas, lipoxigenasas y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), y son desencadenantes de otros procesos de oxidación e inflamación (10, 11).

Las lipoproteínas LDL oxidadas activan patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), lo que promueve que sean fagocitadas por los macrófagos residentes del espacio subendotelial (12, 13), y que las células endoteliales expresen moléculas de adhesión en sus membranas e inicie un proceso inflamatorio mediado por células de la respuesta inmune (9, 12, 14). Durante el proceso inflamatorio los monocitos presentes en sangre se adhieren al endotelio y migran al espacio subendotelial donde se diferencian a macrófagos (15). La activación de macrófagos promueve la síntesis de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , por sus siglas en inglés) e incrementa la producción de ROS (9). Una vez que fagocitan cantidades elevadas de LDL, los macrófagos modifican su estructura y dan origen a las células espumosas, las cuales rodean el material graso en el espacio subendotelial y forman el ateroma (9, 16, 17). (Figura 2).

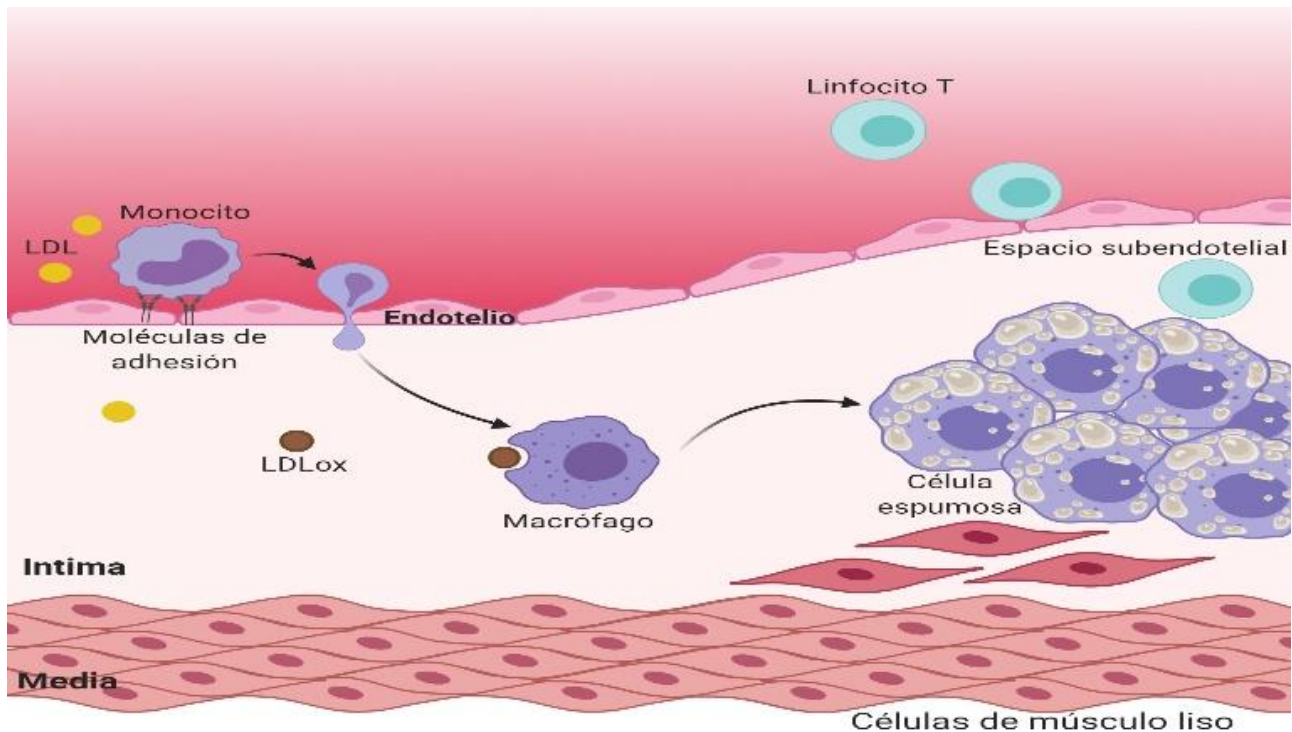


Figura 2. Inicio de la aterosclerosis. La lesión endotelial provoca que las LDL ingresen al espacio subendotelial donde se oxidan (9, 10). Esto induce la activación de los macrófagos residentes y del endotelio, lo que permite el reclutamiento de células del sistema inmune y el inicio del proceso inflamatorio (12, 13). Los monocitos ingresan al espacio subendotelial y se diferencian a macrófagos, los cuales fagocitan a las LDL y sintetizan citocinas proinflamatorias como el TNF- α . Los macrófagos modifican su estructura celular y encapsulan el contenido lipídico dando lugar a la formación de las células espumosas y la lesión aterosclerótica (9, 16, 17). **Imagen modificada de Libby et al. 2019 (9) y realizada con biorender.com**

- **Progresión**

Esta etapa se caracteriza por el crecimiento de la placa de ateroma, lo que induce que la pared del vaso sanguíneo se remodele. La participación de macrófagos, elementos de la matriz extracelular, células vasculares de músculo liso y linfocitos T son cruciales en la progresión de la aterosclerosis (9).

Diferentes subpoblaciones de linfocitos T son atraídas hacia el lugar de la lesión endotelial e ingresan al espacio subendotelial, donde interactúan con los macrófagos y producen distintas citocinas. Los linfocitos TH1 sintetizan interferón gama (IFN- γ , por sus siglas en inglés) y son capaces de estimular a macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas, lo cual da lugar a un proceso inflamatorio crónico (10). Los linfocitos TH2 y T reguladores (Treg) producen la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , por sus siglas en inglés) respectivamente, los cuales limitan el proceso inflamatorio y promueven la síntesis de elementos de la matriz extracelular como colágeno, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos (18). Además, la activación de las células musculares lisas promueve su migración desde la capa media del vaso hacia el espacio subendotelial, donde rodean la placa de ateroma y favorecen su crecimiento y cambios estructurales en el vaso sanguíneo (9, 19), (Figura 3).

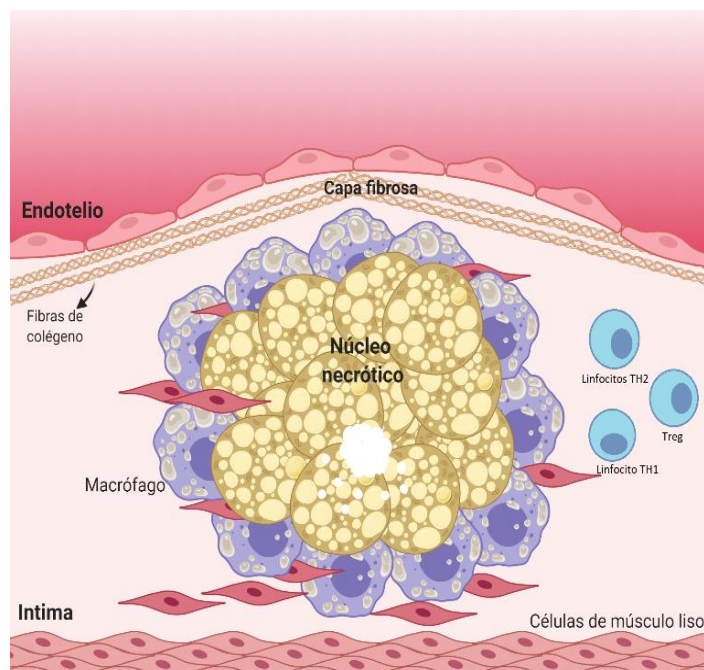


Figura 3. La progresión de la lesión aterosclerótica. El crecimiento de la placa de ateroma es el resultado de la interacción entre las células endoteliales, diversas subpoblaciones de linfocitos T, macrófagos y células musculares lisas. Los linfocitos T son atraídos al sitio de la lesión donde ingresan al espacio subendotelial (10). Los linfocitos T_{H1} producen $IFN-\gamma$, un intermediario que promueve la activación del endotelio, de los macrófagos y de las células musculares lisas. Las células de músculo liso migran hacia el espacio subendotelial donde proliferan y generan un microambiente inflamatorio debido a la producción de la IL-10 y otros factores quimiotácticos (11). Estas células, en conjunto con los linfocitos T_{H2} y T_{reg} promueven la síntesis de elementos de la matriz extracelular, lo que da como resultado el crecimiento de la placa de ateroma. Además, los macrófagos activados producen una gran cantidad de metaloproteasas, enzimas que degradan el colágeno, lo que resulta en cambios estructurales en la pared del vaso sanguíneo. A medida que avanza la lesión, las células musculares lisas y los macrófagos pueden sufrir muerte celular. Las células muertas se acumulan y forman un núcleo necrótico rico en lípidos, encapsulado por fibras de colágeno (9-18). **Imagen modificada de Libby et al. 2019 (9) y realizada con biorender.com**

La interacción entre los elementos de la matriz extracelular y las células de músculo liso favorece que las placas de ateroma desarrollen procesos de calcificación. Este proceso tiene una gran importancia, ya que permite la estabilidad de la placa y la identificación de la aterosclerosis en la práctica clínica mediante el uso de un estudio de imagen llamado tomografía computarizada (14, 20).

La detección de aterosclerosis mediante tomografía computarizada permite estratificar el riesgo de padecer la EAC y sus complicaciones (21, 22). Para ello se emplea una escala llamada puntaje de calcio de las arterias coronarias (CACs, por sus siglas en inglés) o de Agatston, en honor a su creador, Arthur Agatston (23, 24). Los estudios epidemiológicos establecen que, a mayor cantidad de calcio presente en las arterias coronarias, mayor es el riesgo de padecer EAC. Un puntaje igual o mayor a 100 unidades Agatston (UA), establece un incremento de riesgo considerable para la EAC (25-28).

La siguiente tabla muestra el grado de calcificación de las arterias coronarias y su implicación clínica.

Tabla 1. Grados de calcificación coronaria por puntaje de Agatston y sus interpretación clínica

Grado de calcificación de las arterias coronarias	Cuantificación absoluta por unidades Agatston (UA)	Interpretación clínica
Ausente	0	Muy bajo riesgo de eventos coronarios futuros.
Discreto	1-100	Bajo riesgo de eventos coronarios futuros; baja probabilidad de isquemia miocárdica.
Moderado	100-400	Alto riesgo de eventos coronarios futuros.
Severo	>400	Probabilidad incrementada de isquemia miocárdica.

Tabla adaptada de Neves, *et al.* 2017 (29).

La estratificación del riesgo mediante el puntaje de Agatston ha permitido identificar a pacientes en etapas asintomáticas; sin embargo, la presencia de calcio en las arterias coronarias indica un estadio avanzado de la aterosclerosis (25-27).

- **Complicaciones**

El crecimiento de la placa provoca una obstrucción parcial o total en la luz del vaso, lo que reduce el flujo sanguíneo y el aporte de nutrientes hacia el corazón; este proceso se llama cardiopatía isquémica y puede conducir al infarto de miocardio, un evento que provoca la manifestación de un conjunto de signos y síntomas como dolor torácico con irradiación hacia miembro torácico izquierdo, mandíbula, cuello y espalda, dolor en el epigastrio, dificultad para respirar, náuseas, mareo, vómito, cambios en el registro electrocardiográfico, denominados en conjunto como síndrome coronario agudo (9, 30, 31).

La ruptura de la placa de ateroma es el principal mecanismo que desencadena el infarto de miocardio, ya sea por obstrucción o porque expone material que induce la activación plaquetaria y la formación de trombos que ocluyen totalmente la luz de la arteria (30).

Por otra parte, la constante remodelación de la pared del vaso sanguíneo causa una lesión progresiva y la destrucción de las capas arteriales. Esto se debe a que las células musculares lisas sintetizan proteinasas que degradan los componentes de la matriz extracelular y causan deformación y pérdida de la elasticidad de las arterias, favoreciendo la formación de aneurismas, los cuales pueden sufrir ruptura y causar la muerte (9, 10).

1.3 Factores de riesgo

Los factores de riesgo que desencadenan el proceso de la aterosclerosis son diversos y sus complejas interacciones desempeñan un papel importante en la enfermedad (32, 33). Suelen clasificarse como genéticos y ambientales (10).

En el aspecto genético, uno de los primeros factores de riesgo identificados fue la hipercolesterolemia familiar, un rasgo hereditario caracterizado por el aumento del colesterol LDL en la sangre, lo que incrementa de 3 a 13 veces el riesgo de padecer la EAC en comparación con individuos sanos (34). Las investigaciones actuales se enfocan en encontrar genes candidatos implicados en las vías aterogénicas conocidas, como el metabolismo de lípidos e inflamación, y realizar estudios de asociación para evaluar su papel en el desarrollo de la patología (35). Desde 2007, los estudios de asociación de genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés), han identificado más de 50 *loci* asociados a riesgo de EAC (32). Sin embargo, este tipo de estudios no consideran el impacto de los factores ambientales y procesos moleculares dentro de un tejido en particular. Otro reto ha sido la dificultad para comparar los genes potencialmente relacionados con aterosclerosis entre modelos murinos y seres humanos (35-37).

Por otra parte, los cambios epigenéticos, influidos por estímulos ambientales, pueden modificar el fenotipo celular, la expresión genética y la regulación de factores de transcripción. Se ha observado hipermetilación del DNA en condiciones de aterosclerosis (38); además, los RNAs largos no codificantes (lncRNA, por sus siglas en inglés) desempeñan un papel importante en el proceso patológico. Por ejemplo, ANRIL es un lncRNA fuertemente asociado a la incidencia de la EAC, ya que promueve la proliferación de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos e induce la expresión de genes proinflamatorios y de las interleucinas IL-6 e IL-8 en las células endoteliales vasculares; ambos procesos son relevantes en el desarrollo de la aterosclerosis y de la EAC (39).

Los factores ambientales desempeñan un papel muy importante en la prevención y progreso de la EAC. Una alimentación saludable disminuye el riesgo de infarto de miocardio ya que mejora las condiciones cardiometabólicas; la actividad física disminuye en un 20% el riesgo de la enfermedad al mejorar la función endotelial y promover la angiogénesis (33, 40). En contraste, el consumo de tabaco representa uno de los mayores riesgos para desarrollar la EAC, ya que causa daño a las células endoteliales (41). Asimismo, el consumo excesivo de alcohol incrementa el riesgo (33). Las enfermedades como obesidad, diabetes, hipertensión, dislipidemias y procesos infecciosos recurrentes aumentan considerablemente el riesgo de desarrollar aterosclerosis (42-46).

Hoy en día, el abordaje de los factores de riesgo de manera integral sugiere que es poco probable que genes y ambiente actúen de manera separada. La secuenciación del RNA y las estrategias bioinformáticas actuales para el análisis de datos, han generado una nueva perspectiva al encontrar redes reguladoras de genes (GRN, por sus siglas en inglés), las cuales ayudan a caracterizar las interacciones moleculares en el interior y a través de los tejidos específicos relevantes en la EAC (47). Van der Harst, *et al.* realizaron en 2018 el último GWAS reportado para EAC; este estudio conjuntó datos de variantes genéticas y factores de riesgo ambientales en poblaciones europeas y encontró más de 160 *loci* asociados a la EAC con significancia estadística ($P < 5 \times 10^{-8}$), de los cuales 64 fueron novedosos (48). Por lo tanto, el abordaje de manera integral de los factores de riesgo de la EAC ha permitido acercarse al entendimiento de la enfermedad desde su compleja arquitectura genética hasta establecer estrategias de prevención, diagnóstico y tratamiento.

La aterosclerosis es un proceso multifactorial, paulatino y complejo, en el cual la comunicación entre las diversas células de los tejidos implicados juega un papel determinante para el desarrollo de la EAC. Este proceso puede estar regulado por vectores de comunicación molecular como las vesículas extracelulares, las cuales hacen posible la interacción entre las diversas células implicadas en las etapas y progreso de la aterosclerosis y la EAC, a través de mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos (49).

2. Las vesículas extracelulares

Las vesículas extracelulares (EVs, por sus siglas en inglés), son un grupo heterogéneo de pequeñas estructuras membranosas liberadas por las células hacia el espacio extracelular (50). Su membrana está compuesta de una bicapa lipídica y tienen un citosol carente de organelos (51).

Las EVs se encuentran en varios tejidos y en una gran variedad de fluidos biológicos tales como orina, saliva, leche materna, líquido amniótico, líquido cerebroespinal, bilis, semen, sangre, entre otros, lo que sugiere su participación en distintos procesos biológicos, tanto en condiciones normales como patológicas (52, 53).

2.1 Clasificación de las EVs

Las EVs se clasifican de acuerdo a su origen y tamaño en tres grandes grupos: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (54) (Figura 4). Los exosomas tienen un origen endosomal y su tamaño es de 40 a 100 nm. Las microvesículas se forman a partir de protrusiones de la membrana plasmática y tienen un tamaño de 100 a 1000 nm. Los cuerpos apoptóticos se originan y liberan en etapas tardías de la apoptosis, siendo las vesículas más grandes, con un tamaño mayor a 1000 nm (50, 55).

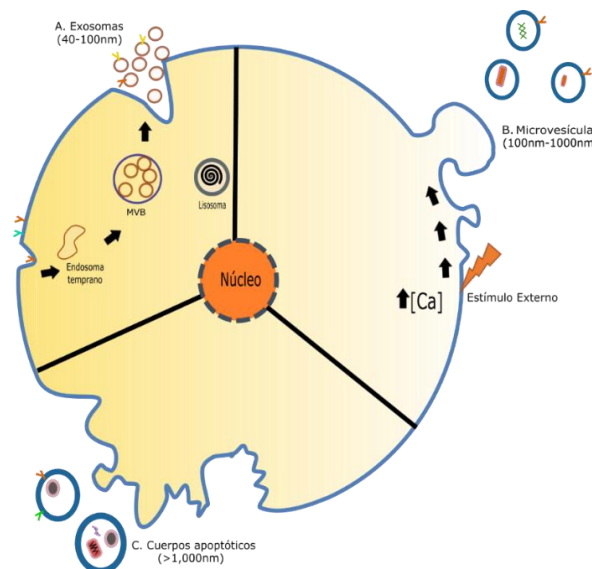


Figura 4. Clasificación de las EVs. (A) Los exosomas provienen de una doble invaginación de la membrana plasmática que genera cuerpos multivesiculares (MVBs, por sus siglas en inglés), los cuales, al fusionarse con la membrana plasmática celular, son liberados al espacio extracelular. (B) Las microvesículas se originan por diferentes estímulos de estrés como hipoxia y estrés oxidativo, que resultan en el incremento del calcio intracelular y el rearrreglo del citoesqueleto, lo que provoca una pérdida en la asimetría de la membrana y favorece la formación de protrusiones, las cuales son liberadas al espacio extracelular. (C) Los cuerpos apoptóticos se liberan en etapas tardías del proceso de muerte celular programada (apoptosis) en conjunto con quimiocinas y moléculas de adhesión que actúan como señales quimiotácticas para facilitar la fagocitosis (50, 54, 55). **Imagen modificada de Merchant, et al. 2017 (55) y realizada con InkScape**

2.2 Biogénesis de las EVs

La membrana plasmática celular es un elemento altamente dinámico que está en proceso constante de remodelación, fusión, gemación y escisión. Estos procesos son regulados principalmente por complejos de proteínas y lípidos que permiten la formación de vesículas como las EVs, así como su transporte y liberación al espacio extracelular. A pesar de ello, los mecanismos de biogénesis de las EVs aún están lejos de ser entendidos completamente (56). A continuación, se describen de manera breve los principales mecanismos implicados en este proceso.

2.2.1 Exosomas

Las células son capaces de introducir proteínas, lípidos, metabolitos, iones y otras moléculas presentes en el espacio extracelular por medio de invaginaciones de la membrana plasmática. El resultado es la formación de vesículas denominadas endosomas tempranos. Estas vesículas pueden fusionarse con otros organelos como el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi o bien, madurar a endosomas tardíos (57).

Estos endosomas tardíos forman cuerpos multivesiculares (MVBs, por sus siglas en inglés) mediante la invaginación de su membrana, lo que genera vesículas intraluminales (ILVs, por sus siglas en inglés). Los MVBs son transportados hacia la membrana plasmática donde se fusionan y liberan las ILVs (futuros exosomas) hacia el espacio extracelular (52). El proceso de formación carga y liberación de los exosomas es regulado por una maquinaria multiproteica denominada en conjunto como complejo de clasificación endosomal requerido para el transporte (ESCRT, por sus siglas en inglés) o de manera independiente por la participación de lípidos, proteínas Rab7, 11, 27 y 35, así como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (57-59). (Figura 5).

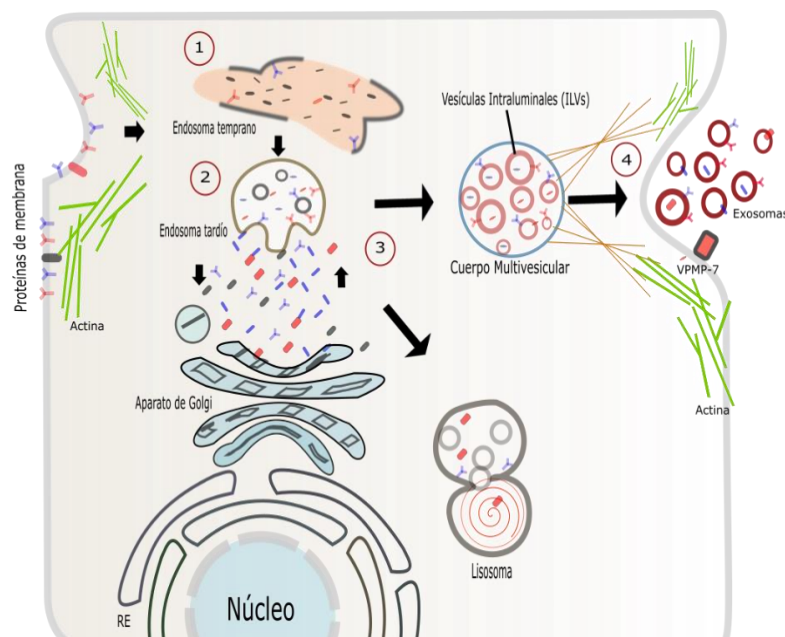


Figura 5. Biogénesis de los exosomas. (1) La invaginación de la membrana plasmática forma un endosoma temprano, el cual madura a un endosoma tardío. (2) El endosoma tardío interactúa con otros organelos membranosos como los lisosomas donde es degradado, o con el aparato de Golgi y el RE, que permiten el intercambio de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. (3) La membrana del endosoma tardío se invagina y forma MVBs que contienen a las ILVs (futuros exosomas). Durante este proceso, distintas proteínas citosólicas y transmembranales son incorporadas al interior de los MVBs. La formación de MVBs, carga, transporte y liberación de los exosomas pueden ser mediados por el complejo de proteínas ESCRT o por lípidos y otras proteínas como Rab7, 11, 27 y 35 y las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (59). (4) La familia de proteínas Rab son esenciales para los MVBs, ya que evitan su degradación y además permiten el rearrreglo del citoesqueleto para su transporte hacia la membrana plasmática. Las proteínas de membrana SNAP3 y VAMP7, en conjunto con la actina presente en el citosol, permiten la fusión de los MVBs y la liberación de los exosomas hacia el espacio extracelular (56-58). **Imagen modificada de Kalluri, et al. 2020 (57) y realizada con InkScape**

2.2.2 Microvesículas

En condiciones basales, la disposición de los lípidos de la membrana plasmática se debe a la distribución asimétrica de los fosfolípidos en la bicapa lipídica. La capa externa está enriquecida principalmente por fosfatidilcolina y esfingomiélna, mientras que la capa interna está formada por fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (60).

Distintos estímulos de estrés celular pueden incrementar la concentración de calcio (Ca^{2+}) en el citosol, lo que promueve la pérdida de la asimetría de la membrana. La concentración elevada de Ca^{2+} citosólico tiene varias implicaciones biológicas: activa a la proteína escramblasa, lo que da como resultado la redistribución de los fosfolípidos a través de la bicapa lipídica; además, activa el proceso de proteólisis que degrada el citoesqueleto cercano a la membrana plasmática, lo que favorece la formación de protrusiones en la membrana plasmática (61) (Figura 6).

La liberación de las protrusiones hacia el espacio extracelular es mediada por la participación de la proteína ARF6, la cual activa vías de señalización celular que remodelan las fibras de actina y permite la separación y liberación de la microvesícula (62).

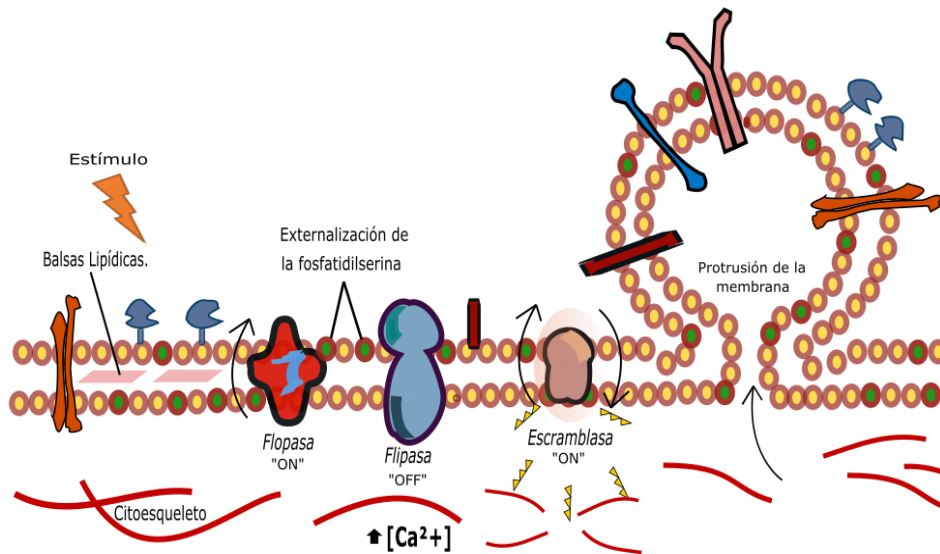


Figura 6. La formación de las microvesículas. La bicapa de la membrana plasmática tiene una distribución asimétrica. Esta distribución es regulada por tres grandes proteínas: una flipasa específica para fosfatidilserina y fosfatiletanolamina en la capa interna; una flopasa específica para fosfatidilcolina y esfingomiélna en la capa externa y una proteína escramblasa que permite la distribución bidireccional de los lípidos a través de la membrana. El incremento de calcio (Ca^{2+}) citosólico provoca la pérdida de la asimetría de la membrana y el reacomodo del citoesqueleto, lo que favorece la formación de protrusiones en la membrana plasmática y su posterior liberación hacia el espacio extracelular (59-61). **Imagen modificada de Hugel, et al. 2005 (61) y realizada con Inkscape**

2.2.3 Cuerpos apoptóticos

La apoptosis es el proceso de muerte celular programada, ocurre principalmente durante el desarrollo embrionario y el envejecimiento celular como un mecanismo de equilibrio dinámico para mantener las poblaciones celulares de los tejidos (63) (Figura 7).

Durante la apoptosis, los componentes nucleares y citoplasmáticos se fragmentan rápidamente en múltiples vesículas de diversos tamaños unidas a la membrana plasmática, las cuales son liberadas al espacio extracelular. Estas vesículas se denominan cuerpos apoptóticos (55). Un estudio reciente en linfocitos T describió un nuevo tipo de protuberancia de la membrana llamada apoptopodia, la cual es muy similar a una cuerda, y aparece después del inicio de la formación de burbujas en la membrana, lo que facilita la liberación de éstas y, por consiguiente, la generación de cuerpos apoptóticos individuales (64). Los cuerpos apoptóticos tienen una gran importancia durante la señalización celular, ya que en su membrana llevan moléculas DAMPs que emiten señales que atraen a los macrófagos al sitio de apoptosis donde fagocitan los residuos celulares y ayudan a mantener la homeostasis (65).

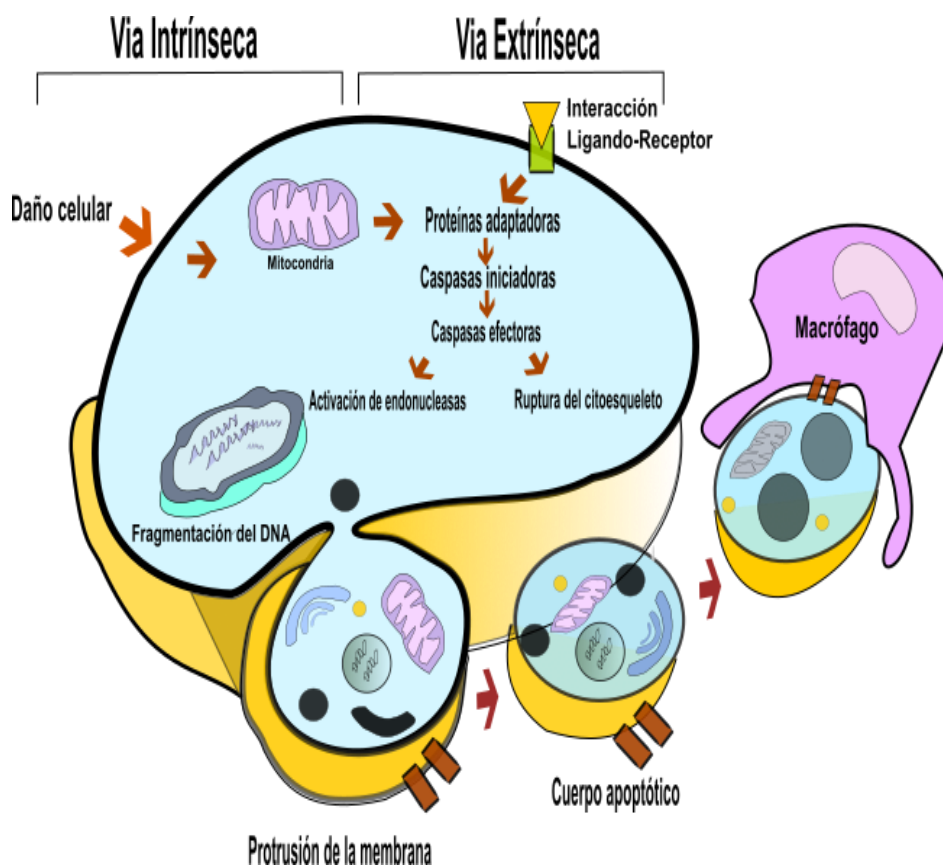


Figura 7. La formación de los cuerpos apoptóticos. Se han descrito dos vías de señalización para el proceso de apoptosis: la vía intrínseca o mitocondrial, desencadenada por daño celular que induce la liberación de proteínas mitocondriales con actividad proapoptótica; y la vía extrínseca, activada por la interacción de ligando-receptor como Fas y TNF- α . Ambas vías interactúan con proteínas adaptadoras y convergen en la activación de las proteínas caspasas, lo que da como resultado la fragmentación del DNA y el rearrreglo del citoesqueleto. El resultado es la formación de protrusiones en la membrana plasmática y la posterior liberación de los cuerpos apoptóticos hacia el espacio extracelular (63, 64, 65). Imagen modificada de Kumar, *et al.* 2015 (10) y realizada con InkScape

2.3 Contenido molecular de las EVs

Las EVs contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales varían según el origen de cada tipo vesicular (52).

Los exosomas contienen un grupo de proteínas endosomales específicas, lo que sugiere un mecanismo de selección y carga durante su formación. Este mecanismo puede ser dependiente o independiente del complejo ESCRT (57, 59). Colombo, *et al.* demostraron que la depleción de proteínas específicas del complejo ESCRT altera el perfil proteico de los exosomas (66). Las proteínas del complejo ESCRT, Alix y TSG-101, están enriquecidas en los exosomas y se consideran biomarcadores (67). Otras moléculas como las tetraspaninas CD9, CD63, CD81 y proteínas asociadas a balsas lipídicas como flotilina-1 y caveolina-1 están presentes en los exosomas. Estas proteínas están involucradas en los mecanismos de biogénesis, transporte y liberación exosomal independientes del complejo ESCRT (68). La composición de la membrana de las microvesículas guarda una estrecha relación con la membrana plasmática de la célula que les dio origen (52). Las microvesículas contienen proteínas como ARF6, integrinas, moléculas de adhesión, moléculas de inmunomodulación, glucoproteínas, metaloproteinasas, entre otras, además de algunos lípidos como fosfatidilserina y colesterol (50). (Figura 8).

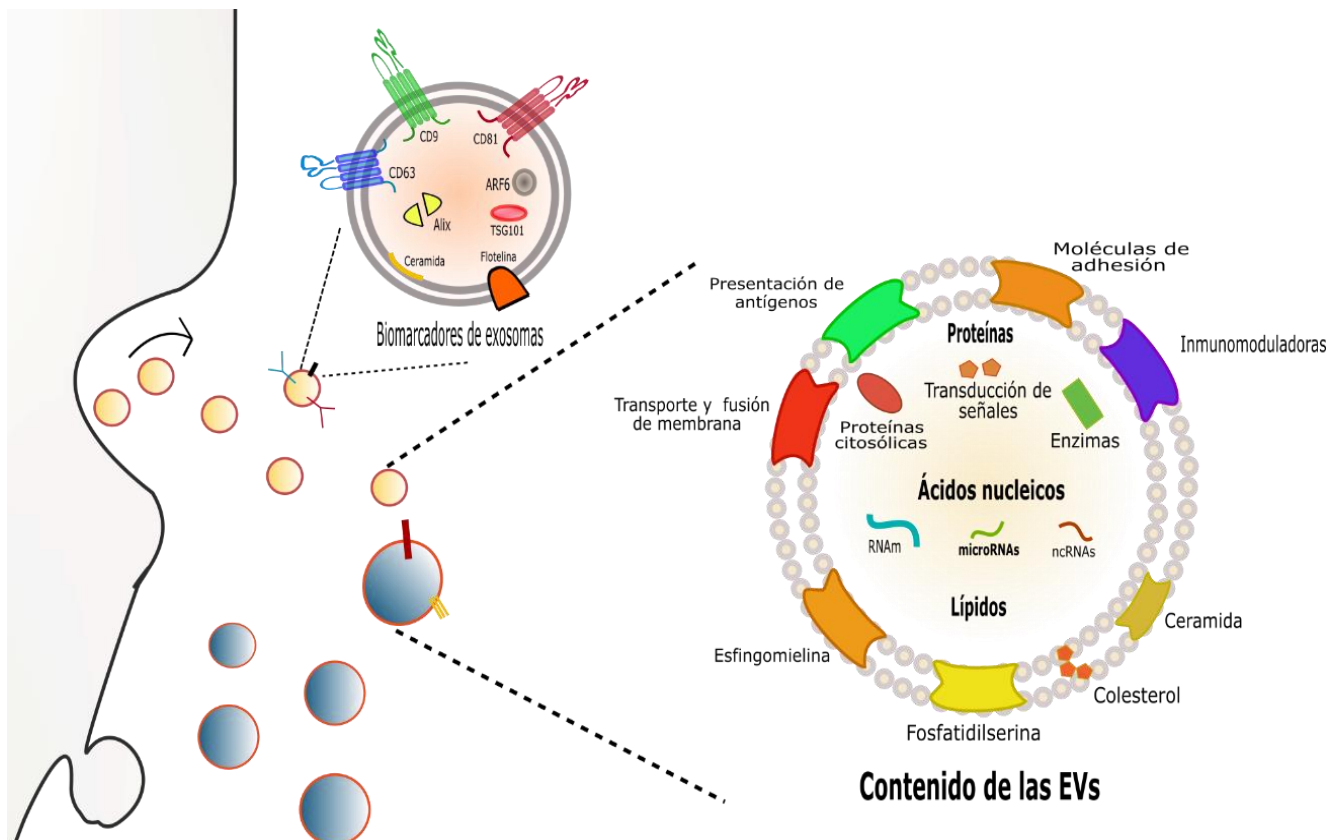


Figura 8. Contenido molecular de las EVs. Las EVs contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Su contenido puede variar acorde a su biogénesis (52). Los exosomas contienen un grupo de proteínas implicadas en su biogénesis, transporte y liberación, tales como Alix, TSG-101, flotilina y las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81 (65,66). Las membranas de las EVs tienen una gran diversidad de proteínas que regulan el transporte y la fusión de membrana, la presentación de antígenos, la inmunomodulación y la adhesión celular; además son ricas en lípidos como esfingomielinas, fosfatidilserinas, colesterol y ceramidas (57). En el citosol de las EVs se transportan enzimas y proteínas que participan en vías de transducción de señales. También contienen una gran variedad de ácidos nucleicos como DNAs, RNAs mensajeros (mRNA) y RNAs no codificantes (ncRNA) como los microRNAs, lncRNAs, snRNAs, snoRNAs, mtRNAs, tRNAs, entre otros (57,67,68). **Imagen modificada de Colombo, *et al.* 2014 (52) y realizada con InkScape**

Los exosomas y las microvesículas pueden transportar ácidos nucleicos como DNA, RNAs mensajeros (mRNA) y otros RNAs no codificantes como los microRNAs (57, 68, 69). La carga de los microRNAs en los exosomas y microvesículas es un proceso selectivo y regulado que depende de su interacción con proteínas (70). Estudios recientes sugieren que los microRNAs tienen secuencias que pueden ser reconocidas por regiones específicas de algunas proteínas como el dominio NURR de Syncrip, y motivos proteicos específicos de hnRNPA2B1, una ribonucleoproteína sumoilizada que permite reclutar a los microRNAs al interior de los exosomas (71, 72).

2.4 Función e interacción de las EVs con células receptoras

Luego del descubrimiento de las EVs se planteó que la función principal de estas vesículas era el transporte de desechos celulares hacia el exterior (50), sin embargo, esta percepción cambió sustancialmente con hallazgos que mostraron que las EVs participan de manera directa en la activación de los linfocitos B durante el proceso de presentación de antígenos (73).

En la actualidad, las EVs son consideradas como elementos fundamentales en las vías de comunicación y señalización celular, así como de suma importancia para mantener la homeostasis o mediar los procesos patológicos (50, 57, 70). Las EVs interactúan con las células de manera autocrina, paracrina y endocrina. La interacción entre las EVs y las células receptoras es regulada por varios mecanismos que permiten a la célula receptora reconocer a las vesículas (74). El resultado puede ser la fusión de las EVs con la membrana plasmática o la internalización al espacio intracelular donde liberan las moléculas contenidas y generan respuestas funcionales y cambios fenotípicos (57, 74) (Figura 9).

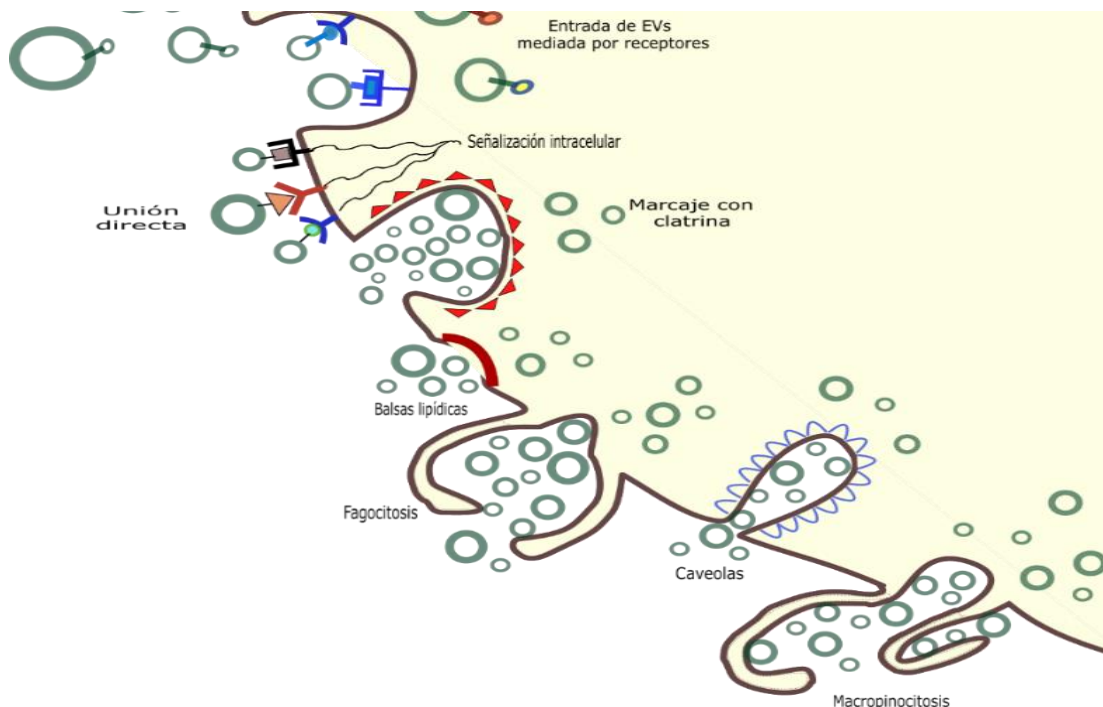


Figura 9. Interacción de las EVs con células receptoras. Una vez en el espacio extracelular, las EVs se dirigen a sus células receptoras, donde liberan su contenido, generan respuestas funcionales y promueven cambios fenotípicos (57). Algunos mecanismos descritos son: la unión directa entre EVs y la membrana plasmática, la activación de los receptores de superficie celular y la internalización por distintos mecanismos de endocitosis como los mediados por marcaje con clatrina, interacción con balsas lipídicas, fagocitosis, caveolas y macropinocitosis (73). La especificidad con las células receptoras probablemente es determinada por interacciones específicas entre las proteínas enriquecidas de las EVs y los receptores de la membrana plasmática (50). **Imagen modificada de Kallur, et al. 2020 (57) y realizada con InkScape**

Algunos ejemplos son los exosomas liberados por los linfocitos B y las células dendríticas, los cuales contienen antígenos que inducen una respuesta antígeno-específica mediada por los linfocitos T. Además, las EVs liberadas por células tumorales contienen fibronectina, la cual activa a los fibroblastos, lo que contribuye al crecimiento del tumor (75). Por otra parte, los microRNAs contenidos en las EVs pueden inducir el silenciamiento génico en las células receptoras (57).

Por todo esto, las EVs presentan un gran potencial como herramientas diagnósticas y terapéuticas en una gran variedad de enfermedades como las neurodegenerativas, oncológicas y, desde luego, las cardiovasculares, por lo que su estudio es de gran interés y relevancia (57).

2.5 Las EVs en el contexto de la aterosclerosis y la enfermedad arterial coronaria.

La comunicación intercelular es un mecanismo esencial en todas las etapas de la aterosclerosis (76), esta interacción puede ser regulada por las EVs, ya que favorecen el inicio y progresión o limitan la lesión aterosclerótica (77, 78) (Figura 10).

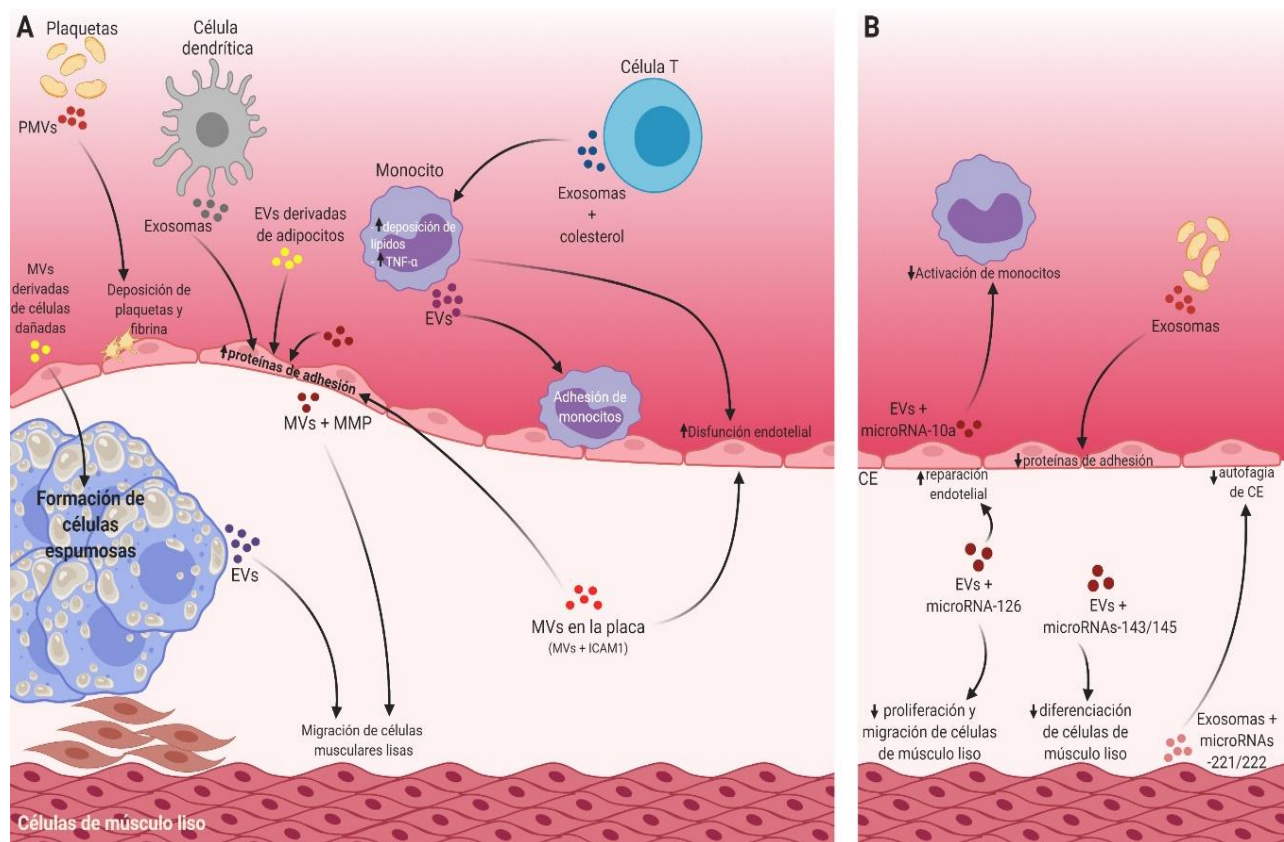


Figura 10. Las EVs en la aterosclerosis. La comunicación entre las células endoteliales (CE), células de músculo liso, macrófagos, plaquetas, monocitos y linfocitos es regulada por las EVs en el proceso de aterosclerosis (49,76,78). **(A) Aterogénesis.** Las EVs de distintas células participan en el proceso de disfunción endotelial al incrementar la expresión de moléculas de adhesión, promover la inflamación y la transferencia de lípidos, e incrementar la apoptosis celular, así como la formación de células espumosas (79-84). Las EVs liberadas por las células endoteliales y las células espumosas inducen la migración de las células musculares lisas hacia el espacio endotelial, lo que favorece el crecimiento de la placa y el proceso de calcificación (89-94). **(B) Limitación de la aterosclerosis.** Las EVs contienen microRNAs que limitan la aterosclerosis; las EVs liberadas por el endotelio transportan a los microRNAs 10a, 126 y 143/145. El primero disminuye la activación de los monocitos; el segundo reduce la proliferación y migración de las células de músculo liso hacia el espacio subendotelial y promueve la reparación de las células endoteliales; y los microRNAs-143/145 reducen la diferenciación de las células de músculo liso, y, por lo tanto, la mineralización. Los exosomas originados en las células de músculo liso contienen los microRNAs-221/222 que, al ser fagocitados por las células endoteliales, disminuyen la autofagia. Además, los exosomas derivados de plaquetas, disminuyen la expresión de moléculas de adhesión endotelial (49, 76). **Imagen modificada de Peng, et al. 2020 (77) y realizada con biorender.com**

La producción de las EVs incrementa en individuos con factores de riesgo cardiovasculares como diabetes, hipertensión, obesidad y tabaquismo, en comparación con individuos sanos (76, 79).

- Inicio de la lesión

La interacción de las EVs provenientes de diferentes tipos celulares como plaquetas, monocitos y leucocitos con las células endoteliales influye en el funcionamiento e integridad de los vasos sanguíneos (77). Estos efectos están determinados por el contenido, origen celular, microambiente y el estímulo que dio inicio al proceso de vesiculación (80).

La lesión de las células endoteliales es un elemento clave en el inicio de la aterosclerosis, ya que puede desencadenar la liberación de las EVs (81) y promover de manera autocrina el estrés oxidativo en estas células, al disminuir la producción de óxido nítrico (82). Por otra parte los exosomas originados en los linfocitos T transfieren colesterol a los monocitos, lo que resulta en la síntesis de TNF- α y favorece la inflamación (83). Además, algunos estudios sugieren que las microvesículas derivadas de plaquetas promueven la adhesión de los leucocitos al inducir un aumento en la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 (84) y del receptor para leucocitos CD11 en las células endoteliales (76). Otros estudios mostraron que las EVs derivadas de plaquetas incrementan la producción y liberación de la IL-6 y la IL-8 en las células endoteliales y leucocitos, lo que promueve la expresión de moléculas de adhesión endoteliales y favorece la migración de los monocitos hacia el espacio subendotelial (85) y la generación de una respuesta inflamatoria, así como la activación de células inflamatorias en circulación (86).

- Progresión de la lesión

Las EVs de varios orígenes celulares estimulan la formación de células espumosas al promover la apoptosis (87). La fagocitosis por parte de las células blanco de las microvesículas originadas en linfocitos T y monocitos genera un incremento en el contenido de los fosfolípidos de la membrana celular y en la cantidad de las ceramidas proapoptóticas (88). Por otra parte, la transferencia de enzimas proapoptóticas como las caspasas 1 y 3, a través de las microvesículas derivadas de las células endoteliales, eritrocitos, plaquetas, monocitos y células dendríticas hacia las células blanco, desencadena el proceso de muerte celular programada (89).

Las EVs secretadas por las células endoteliales y las células espumosas contienen metaloproteinasas e integrinas que degradan la matriz extracelular y promueven que las células musculares lisas migren hacia el espacio subendotelial, donde proliferan y permiten el crecimiento de la placa de ateroma (90, 91). En etapas tardías, las células musculares lisas disminuyen la expresión de proteínas contráctiles e incrementan la síntesis de matriz extracelular (76).

- Calcificación

La calcificación de la placa de ateroma ocurre en las etapas más avanzadas de la aterosclerosis. En los sitios de calcificación se ha observado la presencia de las EVs derivadas de células endoteliales, musculares y macrófagos (92). La constante apoptosis de los macrófagos presentes en las placas de ateroma libera a las EVs que están enriquecidas con factores calcificantes como anexinas 2, 5 y 6 y fosfatasa alcalina no dependiente de tejido (TNAP), lo que promueve la deposición de calcio en la placa (93).

Además, las células endoteliales incrementan la liberación de las EVs que contienen la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP-2), las cuales son fagocitadas por las células de músculo liso y promueven su calcificación (94). Otra vía es la descrita por Kapustin, *et al.*, quienes demostraron que la exposición de las células de músculo liso al TNF- α o al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), estimula la liberación de exosomas que secuestran fetuína-A, una proteína que inhibe la calcificación. Este mecanismo favorece la mineralización de las células del músculo liso (95).

El contenido de las EVs juega un papel determinante en las diversas etapas de la aterosclerosis y de la EAC. Los ácidos nucleicos como los lncRNA y los microRNAs contenidos en las EVs regulan la expresión génica en las diferentes etapas de la aterosclerosis y la EAC, por lo que su estudio ha generado un gran interés y expectativa para el abordaje diagnóstico y terapéutico de la enfermedad (77).

3. Los microRNAs

Los microRNAs son RNAs no codificantes con una longitud promedio, en sus formas maduras, de 22 nucleótidos. Su descubrimiento en el año 1993 revolucionó el campo de la biología molecular (96). Los microRNAs desempeñan un papel importante en procesos celulares de proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis; además, participan en la fisiopatología de un gran número de enfermedades, y su estudio es de gran interés en la investigación como potenciales biomarcadores diagnósticos y terapéuticos (97, 98).

3.1 Síntesis y maduración de los microRNAs

La biogénesis de los microRNAs se lleva a cabo en el núcleo celular por la acción de la RNA polimerasa II, la cual sintetiza microRNAs primarios (pri-microRNAs), a partir de una secuencia de DNA, con una estructura en tallo y horquilla, y una longitud mayor a 1000 nucleótidos. Posteriormente, estos transcritos son procesados por el complejo enzimático nuclear Drosha-DGCR8, lo que reduce su tamaño a \approx 65 nucleótidos denominado pre-microRNA (99). Los pre-microRNAs son transportados hacia el citoplasma por la acción de la proteína exportina-5 (Exp-5). Una vez en el citoplasma, la enzima Dicer escinde la horquilla de los pre-microRNAs, lo que genera dos hebras: una 5p y otra 3p, con una longitud de 20 a 25 nucleótidos. Finalmente, la proteína Argonauta (AGO) es cargada con una de las hebras del microRNA maduro, formando así el complejo de silenciamiento inducido por RNA, RISC (100) (Figura 11).

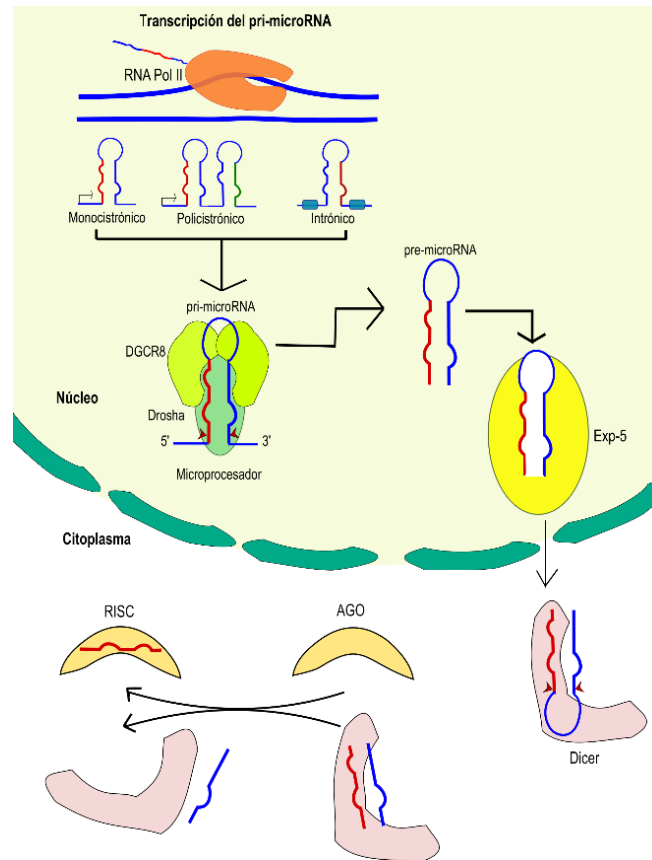


Figura 11. Biogénesis de los microRNAs. La RNA polimerasa II sintetiza a los microRNAs en el núcleo. Los microRNAs pueden ser codificados como un gen individual (monocistrónico) o como un grupo de genes (policistrónico). También los microRNAs son sintetizados a partir de las regiones intrónicas del DNA, mediante un proceso de corte y empalme (*splicing*). El transcrito primario (pri-microRNA) es procesado por el complejo enzimático Drosha-DGCR8, el cual escinde el transcrito en la base de su estructura, lo que reduce su tamaño y forma al pre-microRNA. Éste es exportado hacia el citoplasma por la Exp-5 a través de los poros nucleares. En el citoplasma, la enzima Dicer, corta la estructura de horquilla, lo que da lugar a la formación de dos hebras con una longitud promedio de 22 nucleótidos (microRNA maduro). Posteriormente una de las hebras del microRNA es cargada a la proteína argonauta (AGO), formando el complejo RISC, que transportará al microRNA y permitirá llevar a cabo su función como regulador de la expresión génica (99, 100). **Imagen modificada de Treiber, et al. 2019 (100) y realizada con InkScape**

3.2 Funciones

Los microRNAs participan en el silenciamiento génico. A nivel postranscripcional, los microRNAs inducen la degradación de su mRNA blanco o reprimen su traducción. El extremo 3'UTR del mRNA blanco tiene sitios de unión para microRNAs específicos que permiten la interacción con los nucleótidos de la región semilla (*seed*) de los microRNAs (101). Además, los microRNAs pueden reconocer sitios de unión en el extremo 5'UTR y en la región codificante del mRNA blanco (96).

Tres mecanismos permiten la degradación del mRNA blanco: la deadenilación, la decapitación y finalmente la degradación. La interacción entre el mRNA y el microRNA permite que la proteína AGO del RISC, exponga el sitio de unión para la proteína GW182, la cual recluta los complejos enzimáticos PAN1-PAN3 y CCR4-NOT, que degradan la cola de Poli-A del mRNA. Además, el RISC recluta al complejo enzimático de decapitación Dcp1 y Dcp2, los cuales remueven el extremo 5'Cap del mRNA. La exposición de los extremos 5' y 3' del mRNA, permite que la enzima exonucleasa XRN1 lo degrade (96, 101).

Los microRNAs también reprimen el proceso de traducción por varios mecanismos. El complejo RISC impide la unión de factores que promueven el inicio de la traducción, como eIF4A, e impide que las subunidades del ribosoma se acoplen. Por otra parte, recluta factores como las proteínas de la familia GW182, TNRC6A, TNRC6B y CCR4-NOT, las cuales inhiben el inicio de la traducción (96). Además, los microRNAs inducen que los ribosomas detengan prematuramente el proceso de elongación (102). Otro posible mecanismo es que el complejo RISC recluta proteasas que degradan el polipéptido recién sintetizado (103).

A nivel transcripcional, existe evidencia de que los microRNAs maduros son transportados hacia el núcleo celular en conjunto con AGO por la acción de la proteína importina-8 y que la proteína GW182 es importada por la proteína importina- α/β . Una vez en el núcleo, se han sugerido interacciones microRNA-mRNA y microRNA-DNA que regulan el proceso de transcripción (104).

Los microRNAs pueden ser liberados hacia fluidos extracelulares como plasma y suero, líquido cerebrospinal, saliva, leche materna, orina, lágrimas, entre otros. Los microRNAs pueden ser transportados en las EVs o asociados a proteínas, principalmente AGO-2. Estas interacciones confieren protección y estabilidad a los microRNAs y permiten que lleven a cabo sus funciones en células receptoras lejanas (96).

3.3 Los microRNAs contenidos en las EVs y su papel en la aterosclerosis

Diversos estudios han mostrado que los microRNAs contenidos en las EVs tienen un papel importante en la regulación de la aterosclerosis y de la EAC, ya que pueden promover su inicio y desarrollo o limitar el daño al participar en los procesos de inflamación, migración, diferenciación y calcificación celular (105).

La activación de las células endoteliales es de suma importancia para el desarrollo de la aterosclerosis. Un estudio *in vitro* mostró que el estímulo de las células endoteliales con lipoproteínas LDL oxidadas, incrementó la expresión del microRNA-155-5p, el cual es transportado mediante las EVs hacia los monocitos y promueve su diferenciación a macrófagos (106). Por otra parte, las células endoteliales liberan a las EVs enriquecidas con microRNA-10a-5p y microRNA-92a-3p, los cuales reducen la activación de los monocitos, la inflamación y el avance de la lesión (107, 108).

También se sabe que la exposición de los macrófagos a LDL oxidadas promueve la producción de exosomas enriquecidos con el microRNA-146a-3p, los cuales tienen como células blanco a otros macrófagos. Estudios *in vitro* y análisis bioinformáticos demostraron que el microRNA-146a-3p induce el silenciamiento de genes involucrados en el control de la migración transendotelial de los leucocitos, lo que provoca que los macrófagos queden atrapados en la pared del vaso sanguíneo y favorece la formación de células espumosas y, por lo tanto, la progresión de la aterosclerosis (109).

Adicionalmente, las células de músculo liso liberan exosomas cargados con los microRNAs 30-5p, 125b-3p, 143-5p, 145-5p y 155-3p hacia la matriz extracelular, los cuales promueven su calcificación al modificar las vías de señalización del calcio (110). Por otra parte, las células endoteliales liberan microvesículas que transportan el microRNA-126-3p, las cuales interactúan con las células del músculo liso e inducen la inhibición de su migración hacia el espacio subendotelial y su proliferación, limitando así el avance de la lesión (111).

Dado que aún estamos lejos de esclarecer en su totalidad el vasto papel de los microRNAs transportados en las EVs en el contexto de la aterosclerosis, este estudio contribuirá al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la aterosclerosis coronaria subclínica (ACS), al caracterizar las EVs de individuos con este padecimiento.

4. Planteamiento del problema

Las enfermedades cardiovasculares tienen un impacto primordial en la Salud Pública a nivel mundial. Las complicaciones de la aterosclerosis coronaria, en especial el infarto de miocardio, son la primera causa de muerte en México y en el mundo.

La disfunción endotelial, la inflamación, la calcificación vascular y los microRNAs transportados en las EVs contribuyen en la regulación y progresión de la aterosclerosis coronaria subclínica (ACS) y de la enfermedad arterial coronaria, por lo que su estudio es prioritario para entender sus mecanismos fisiopatológicos. Esto con la finalidad de poder identificar a individuos con riesgo de padecer las severas complicaciones de la aterosclerosis en etapas más tempranas y actuar a tiempo.

5. Hipótesis

Las vesículas extracelulares plasmáticas de individuos con ACS y de controles, contienen un perfil de microRNAs expresados diferencialmente, los cuales están implicados en vías biológicas importantes para el inicio y el desarrollo de la enfermedad.

6. Objetivos

6.1 General

Caracterizar las EVs de individuos con ACS y controles, y el perfil de expresión de microRNAs contenido en ellas.

6.2 Específicos

1. Analizar la forma, el tamaño y marcadores proteicos de las vesículas extracelulares plasmáticas de individuos con ACS y de controles
2. Estandarizar la obtención de las EVs provenientes del plasma y del RNA total contenido en las mismas, de individuos con ACS y controles.
3. Identificar los microRNAs diferencialmente expresados provenientes de las EVs de ambos grupos.
4. Determinar mediante herramientas bioinformáticas las posibles vías moleculares afectadas de los microRNAs con expresión diferencial.

7. Metodología

El presente estudio se realizó en el laboratorio de enfermedades cardiovasculares del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), en colaboración con el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH). El siguiente esquema muestra de manera general el diseño metodológico. (Figura 12).

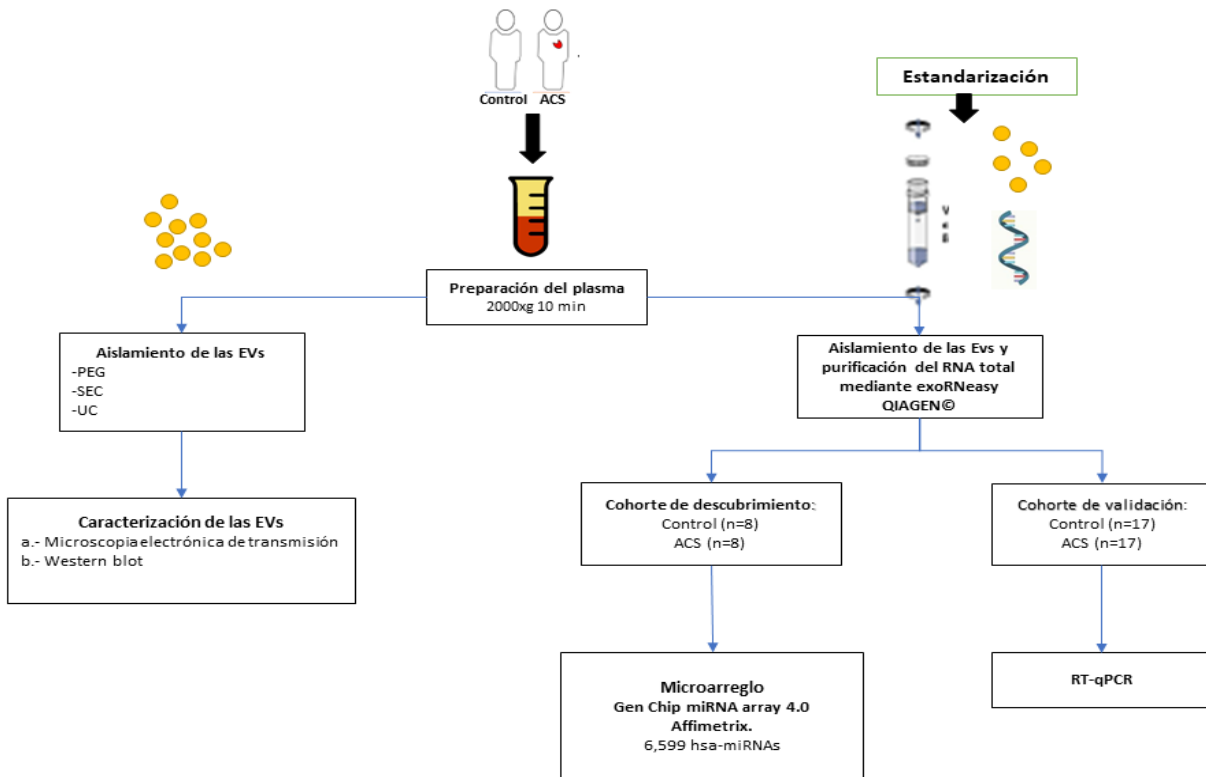


Figura 12. Diseño del estudio. Para este estudio se formaron dos cohortes: una de descubrimiento y una de validación. Se obtuvo el plasma de individuos con ACS y controles en ambas cohortes. Luego se aislaron las EVs del plasma mediante precipitación con polietilenglicol (PEG); cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y ultracentrifugación (UC) para ser caracterizadas mediante Western Blot (WB) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Además, se aislaron las EVs y se purificó el RNA total contenido en ellas, mediante el kit comercial exoRNeasy de QIAGEN para ser utilizado en un microarreglo en la cohorte de descubrimiento o en los ensayos de RT-qPCR en la cohorte de validación.

7.1 Población de estudio

- Cohorte de descubrimiento

Para esta cohorte se seleccionaron individuos del sexo masculino pertenecientes al grupo de controles del proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA) (112), quienes aceptaron participar de manera voluntaria y firmaron consentimiento informado. Se les realizó un estudio de imagen de las arterias coronarias por tomografía axial computarizada sin contraste, el cual permitió observar y cuantificar la presencia de calcio en las arterias coronarias y, por lo tanto, identificar a individuos con ACS y controles. Además, fueron valorados con estudios de laboratorio procedentes del INCICH.

Se crearon dos grupos: 8 individuos con $CACS \geq 400$ UA (ACS, con evidencia de placa aterosclerosa severa y extensa) y 8 individuos con $CACS = 0$ (controles, sin evidencia de aterosclerosis). Los individuos seleccionados se parearon por edad y categoría de índice de masa corporal (IMC) propuesta por la OMS: 18.5-24.9 (normopeso); ≥ 25 (sobrepeso) y ≥ 30 (obesidad). Para tener un mayor control se excluyeron del estudio aquellos individuos con diagnóstico establecido de otras enfermedades como diabetes mellitus, hipertensión arterial sistémica, insuficiencia renal o hepática, enfermedad tiroidea, infecciones agudas y con antecedentes heredofamiliares de enfermedades cardiovasculares o que hubieran presentado alguna manifestación clínica de la EAC.

- Cohorte de validación

Se seleccionaron individuos mexicanos del sexo masculino del grupo de controles del proyecto GEA: 17 individuos con $CACS \geq 100$ UA y 17 individuos con $CACS = 0$. Los individuos seleccionados también se parearon por edad y categoría de IMC. Los criterios de exclusión fueron los mismos que se establecieron para la cohorte de descubrimiento.

7.2 Obtención del plasma sanguíneo.

Se obtuvieron muestras de sangre por venopunción periférica en ambas cohortes. Para la venopunción y extracción de las muestras de sangre, se utilizó el kit comercial BD Vacutainer® y tubos BD Vacutainer con EDTA K_2 (13 x 100 mm, 6.0 mL) para la recolección de la sangre total. Posterior al llenado, los tubos se invirtieron 10 veces para mezclar y fueron colocados en hielo para ser transportados. Para separar el plasma sanguíneo, se centrifugaron los tubos a 2000xg por 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante (plasma) se recolectó y almacenó en tubos de 2 mL a una temperatura de -80°C hasta el momento de su uso.

7.3 Aislamiento de las EVs plasmáticas para los ensayos de TEM y Western Blot

Para el aislamiento de las EVs, se utilizaron 500 μ L de plasma, se adicionaron 4.5 mL de PBS y 2 mL de polietilenglicol 8000 (PEG 8000) al 50%. La mezcla se incubó durante 1 hora en hielo. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1500xg por 30 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de PBS/citrato 0.32%, pH 7.4. Una vez resuspendida la pastilla, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). Se colectaron 30 fracciones y se cuantificó la absorbancia a 280 nm. Con base en los datos de absorbancia, se seleccionaron las 8 fracciones donde se encontraban las vesículas y se concentraron mediante ultracentrifugación a 120,000xg por 30 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 60 μ L de buffer de RIPA con inhibidores de proteasas y EDTA o en PBS 1x, según el uso posterior.

7.4 Caracterización de las EVs por TEM

Posterior a la ultracentrifugación, las vesículas fueron resuspendidas en 200 μ L de PBS. Mediante tubos Amicon Ultra 3k se redujo el volumen de la muestra hasta 100 μ L. Se les agregó 400 μ L de la solución fijadora (paraformaldehído/glutaraldehído 2.5%, buffer cacodilato 0.1M, pH 7.4.) y se incubaron durante 45 minutos. Se redujo su volumen hasta alcanzar los 100 μ L. Una vez fijadas, se tomaron 7 μ L de muestra y se montaron en rejillas de cobre cubiertas con Formvar/Carbon. Se realizó una contratincción de las rejillas con acetato de uranilo alcohólico al 1% por 15 minutos. Finalmente, las rejillas se observaron al microscopio a un aumento de 60,000x, utilizando un microscopio electrónico

de transmisión JEOL JEM-1010 y el software AmtV542 Image Capture Engine para capturar las imágenes.

7.5 Inmunodetección por ensayo Western Blot

Las vesículas se aislaron siguiendo el protocolo descrito en la sección “Aislamiento de EVs a partir de plasma sanguíneo”, después fueron resuspendidas en buffer de RIPA con inhibidores de proteasas y EDTA. La proteína se cuantificó mediante el ensayo BCA. Se realizó una electroforesis de las muestras en geles de poliacrilamida al 10% con la tecnología Stain Free (Bio-Rad), en condiciones no reductoras y a proteína constante (8 µg por muestra). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubó con los anticuerpos CD9 (Ts9, Life Technologies) y CD63 (SC-5275, Santa Cruz Biotechnology). Se realizó una densitometría de las bandas detectadas, y se normalizó su señal por el contenido total de proteína en el carril.

7.6 Estandarización para la obtención de las EVs y RNA total a partir de plasma para los ensayos de expresión diferencial de los microRNAs

Para la estandarización, se obtuvo el plasma sanguíneo de individuos ajenos a la cohorte, quienes aceptaron participar de manera voluntaria. Se compararon los métodos de aislamiento de las EVs: ultracentrifugación, precipitación con polietilenglicol (PEG) y uso de un kit comercial; también se compararon distintos kits comerciales para la purificación de RNA total contenido en ellas. Se cuantificó la concentración del RNA total mediante espectrofotometría empleando una absorbancia de 260/280 nm, y mediante la técnica de PCR en tiempo real cuantitativo (RT-qPCR), determinando la expresión del cel-microRNA-39 como control exógeno y del hsa-microRNA-223-3p, el cual favorece el proceso de calcificación en la aterosclerosis (113). Por último, se compararon distintos volúmenes de plasma sanguíneo inicial: 1 mL, 2 mL, 4 mL y 6 mL con la finalidad de saber si había diferencias en el ensayo de expresión diferencial.

Se compararon 3 métodos para el aislamiento de las EVs plasmáticas:

1. Ultracentrifugación:

Una vez obtenido el plasma, se agregó el volumen necesario de PBS 1x para aforar a 3 mL en tubos de policarbonato. Posteriormente se centrifugaron a 120000xg por 90 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se conservó el botón formado en el fondo de cada tubo, se realizaron lavados con 2.5 mL de PBS 1x hasta resuspenderlo. Después se centrifugó a 120000xg por 35 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se conservaron los botones formados. Por último, se añadió PBS 1x para lavar y resuspender los botones. Se colocaron en hielo para su uso posterior.

2. Precipitación con PEG 8000:

Por cada 250 µL de plasma se agregaron 65 µL de PEG 8000. Se agitó hasta obtener una mezcla homogénea. Se incubó en hielo por 30 minutos. Después se centrifugó a 1500xg por 30 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 1500xg por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se conservó el botón. Por último, se agregó 300 µL de PBS para resuspender el botón. Se colocaron en hielo.

3. Kit exoRNeasy Serum/Plasma Maxi (QIAGEN®. Cat. No. / ID: 77164):

Se siguieron las instrucciones del fabricante.

- Purificación del RNA total contenido en las EVs:

El RNA se obtuvo siguiendo las instrucciones de cada fabricante de los siguientes métodos:

1. Separación de fases con TRIzol Reagent®.
2. Kit miRVana® Ambion, (Life technologies®. Cat. AM 1560).
3. Kit Direct-zol RNA miniprep (Zymo Research®. Cat. 2051).
4. Kit miReasy (exoRNeasy Serum/Plasma Maxi, QIAGEN®. Cat. No. / ID: 77164).

- Cuantificación de la expresión de los microRNAs contenidos en las EVs mediante RT-qPCR:

Para este ensayo se requirió el uso de kits para la síntesis de DNA complementario (cDNA) y para la PCR en tiempo real, los cuales utilizan oligonucleótidos y sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific®) específicos para el cel-microRNA-39 y el hsa-microRNA-223-3p, respectivamente.

1. Síntesis del cDNA:

- a) Mezcla de reacción: Para la mezcla de reacción se utilizaron los siguientes reactivos más 3 µL de RNA, para obtener un volumen de reacción de 10 µL:

cel-microRNA-39	1x
dNTPaix (100 mM)	0.1 µL
Enzima RT (50 u/µL)	0.66 µL
Buffer RT (10x)	1.0 µL
Inhibidor RNasa (10 u/µL)	0.12 µL
Agua libre de RNasas	4.62 µL
Primer cel-miR-39 [20x]	0.5 µL
Muestra de RNA total	3 µL

hsa-microRNA-223	1x
dNTPaix (100 mM)	0.1 µL
Enzima RT (50 u/µL)	0.66 µL
Buffer RT (10x)	1.0 µL
Inhibidor RNasa (10 u/µL)	0.12 µL
Agua libre de RNasas	4.62 µL
Primer hsa-miR-223 [20x]	0.5 µL
Muestra de RNA total	3 µL

- b) Una vez elaborada la mezcla de reacción, se colocó en una placa de 96 pozos, se selló perfectamente y se llevó al termociclador (GeneAmp PCR System 9700 ®) con los siguientes parámetros:
1. 16°C por 30 minutos.
 2. 42° por 30 minutos.
 3. 85°C por 5 minutos.
 4. 4°C por tiempo indefinido.
- c) Luego se centrifugó la placa a 3000 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente. Se continuó con la preparación de la placa para PCR en tiempo Real.

2. PCR en tiempo real:

Se preparó la mezcla de reacción con los siguientes reactivos:

- a) Dependiendo del número de muestras a realizar es la cantidad de mezcla de reacción que se prepara por cada microRNA:

	cel-microRNA-39	hsa-microRNA-223
	1x	1x
Enzima (Quantinova®)	5.0 µL	5.0 µL
Sonda microRNA (TM)	0.5 µL	0.5 µL
Agua libre de RNasa	2.5 µL	2.5 µL

- b) Preparación de la placa de 96 pozos: por cada muestra se agregaron 8 μ L de mezcla de reacción más 2 μ L del cDNA correspondiente. Además, se agregó un blanco (mezcla de reacción sin cDNA). Se selló perfectamente la placa y se centrifugó a 3000rpm por 2 minutos a temperatura ambiente.
- c) Se llevó la placa al termociclador marca ROCHE®. Se usó el software Light Cyclers 480 con los siguientes parámetros a 40 ciclos:
- Preamplificación: 95°
 - Amplificación:
 - i. 95°-10 segundos.
 - ii. 60°-40 segundos.
 - iii. 72°-5 segundos.
 - Enfriamiento:
 - i. 1 minuto

7.7 Aislamiento de EVs y purificación del RNA total a partir de plasma

Se utilizó el kit comercial exoRNeasy Serum/Plasma Maxi (QIAGEN®. Cat. No. / ID: 77164). Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones.

Brevemente, 6 mL de plasma se mezclaron con el buffer XBP 1x, la mezcla se colocó en la columna de afinidad (exo Easy Spin) para centrifugarse a 500xg por 1 minuto a temperatura ambiente; después a la columna se le agregaron 10 mL del buffer XWP y se centrifugó a 3200xg por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó la lisis de las EVs con el reactivo QIAzol (QIAGEN®) para separar el RNA. La fase acuosa se pasó nuevamente a través de una columna donde se llevaron a cabo lavados con buffers y centrifugaciones. Al final el RNA fue diluido en 14 μ L de agua libre de RNasas; se colocó en un tubo de plástico de 0.5 mL y se almacenó a -80°C hasta su uso posterior.

7.8 Análisis de expresión diferencial de los microRNAs contenidos en la EVs mediante microarreglos

Una vez extraído el RNA, se analizó su concentración y calidad mediante electroforesis capilar con un chip Small RNA (Agilent Technologies). Para el análisis de expresión se utilizaron microarreglos GeneChip miRNA 4.0 de Affymetrix, ya que contienen sondas para 6599 microRNAs de humano (2,578 maduros; 2,025 pre-microRNAs; 1,996 snoRNA). Esto se realizó en la Unidad de Microarreglos del INMEGEN. Los resultados obtenidos de los microarreglos se analizaron con el software Partek Genomics Suite v7.01.18.07.23, se normalizaron por cuantiles y se estableció un valor de veces de cambio (Fold Change) ± 2 y un valor de $P < 0.05$ como significativo.

7.9 Análisis *in silico* de las posibles vías moleculares afectadas por los microRNAs con expresión diferencial

Este análisis se llevó a cabo con el software libre FunRich v 3.1.3, cuya base de datos está alimentada con la plataforma vesiclepedia en: <http://microvesicles.org>, así como con la plataforma mirsystem de acceso libre: <http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/index.php>.

7.10. Análisis estadístico de las variables

Para el análisis de los datos obtenidos se contrastaron las medias de las variables con distribución normal mediante la prueba t de Student y U de Mann-Whitney para las variables sin distribución normal. Además, se utilizó ANOVA para la comparación entre 3 o más grupos. Se consideró un valor de $P < 0.05$ como significativo. Se utilizó el software IBM SPSS Statistics v22, así como el software Graph Pad Prisma v7.0 para la realización de los gráficos.

8. Resultados obtenidos en la cohorte de descubrimiento

8.1 Cohorte de descubrimiento

La siguiente tabla muestra un resumen de las distintas variables cuantitativas de los individuos con ACS y controles que participaron en este estudio. (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las variables obtenidas de los sujetos con ACS y controles

ID	Grupo	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (m)	IMC (kg/m ²)	Categoría de IMC	Glucosa (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	TG (mg/dL)	CACS (UA)
1A	ACS	71	78.60	1.64	29.22	Sobrepeso	94.60	173.50	27.30	117.90	188.10	432.10
1B	Control	59	72.00	1.65	26.44	Sobrepeso	91.40	152.90	30.70	104.90	108.40	0.00
2A	ACS	66	63.00	1.66	23.18	Normopeso	105.10	101.30	28.90	44.00	177.30	780.50
2B	Control	67	55.70	1.57	23.18	Normopeso	86.10	176.10	49.30	49.30	58.40	0.00
3A	ACS	66	62.90	1.69	22.02	Normopeso	86.70	108.40	42.10	49.10	107.40	739.20
3B	Control	66	67.00	1.66	24.13	Normopeso	93.80	171.60	40.70	107.40	146.80	0.00
4A	ACS	57	83.90	1.64	31.04	Obesidad	96.20	208.80	55.80	128.60	153.00	1030.60
4B	Control	63	87.60	1.70	30.24	Obesidad	120.30	146.10	36.50	74.30	220.40	0.00
6A	ACS	73	71.20	1.64	26.47	Sobrepeso	96.40	116.50	42.60	55.70	113.60	508.90
6B	Control	70	70.70	1.59	27.96	Sobrepeso	90.50	188.10	39.70	115.80	203.50	0.00
8A	ACS	71	99.90	1.80	30.83	Obesidad	90.00	157.90	36.10	132.80	361.80	451.50
8B	Control	68	83.00	1.72	28.50	Sobrepeso	109.80	176.50	26.20	110.80	246.80	0.00
9A	ACS	74	81.90	1.65	30.00	Obesidad	99.80	200.70	38.60	108.80	332.90	400.60
9B	Control	75	68.70	1.50	30.53	Obesidad	114.60	143.50	43.50	80.70	120.80	0.00
10A	ACS	66	98.90	1.80	30.52	Obesidad	104.20	188.00	46.00	120.10	136.90	457.90
10B	Control	66	96.30	1.76	31.08	Obesidad	110.90	123.30	45.60	68.10	60.10	0.00

CACS, Score de calcio de las arterias coronarias; IMC, índice de masa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad; TG, triglicéridos.

Se compararon las medias de las variables entre los grupos de ACS y controles, siendo el puntaje de calcio de las arterias coronarias (CACS) la única variable que mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El resto de las variables tuvieron un valor de $P > 0.05$ entre los grupos de este estudio. (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre los individuos con ACS y controles.

Característica	ACS (n=8)	Control (n=8)	P
Sexo masculino (n)	8	8	
Edad (Años)	68.00 ±5.50	66.75 ±4.71	0.633
Peso (kg)	80.15 ±14.15	75.12 ±12.98	0.472
Talla (m)	1.69 ±0.06	1.63 ±0.09	0.168
IMC (kg/m ²)	27.91 ±3.59	27.76 ±2.95	0.928
CACS (Unidades Agatston)	483.40 [432.10 - 739.20]	0	<0.000 [†]
Glucosa Sanguínea (mg/dL)	102.70 ±15.62	102.17 ±13.08	0.943
Colesterol Total (mg/dL)	156.88 ±42.98	159.76 ±21.77	0.868
HDL (mg/dL)	39.67 ±9.23	39.02 ±7.67	0.881
LDL (mg/dL)	86.01 ±35.95	97.31 ±19.72	0.449
Triglicéridos (mg/dL)	196.37 ±97.55	145.65 ±71.81	0.256

Los datos se expresan como media ± desviación estándar, y mediana [rango intercuartil]. CACS, puntaje de calcio de las arterias coronarias; IMC, índice de masa corporal; HDL, lipoproteína de alta densidad; LDL, lipoproteína de baja densidad.

† Determinada mediante la prueba U de Mann-Whitney; para el resto de las variables se utilizó la prueba t- Student.

8.2 Caracterización de la forma y tamaño de las EVs

Las imágenes obtenidas mediante TEM permitieron identificar las EVs plasmáticas de 2 individuos del grupo control (Figura 13 A1 y A2) y las EVs plasmáticas de 2 individuos con ACS (Figura 13 B1 y B2), cuya forma esférica y tamaño corresponde a muestras enriquecidas principalmente de exosomas y microvesículas. Se observaron similitudes en cuanto a tamaño y forma entre las EVs de los individuos pertenecientes al grupo control y de los individuos con ACS.

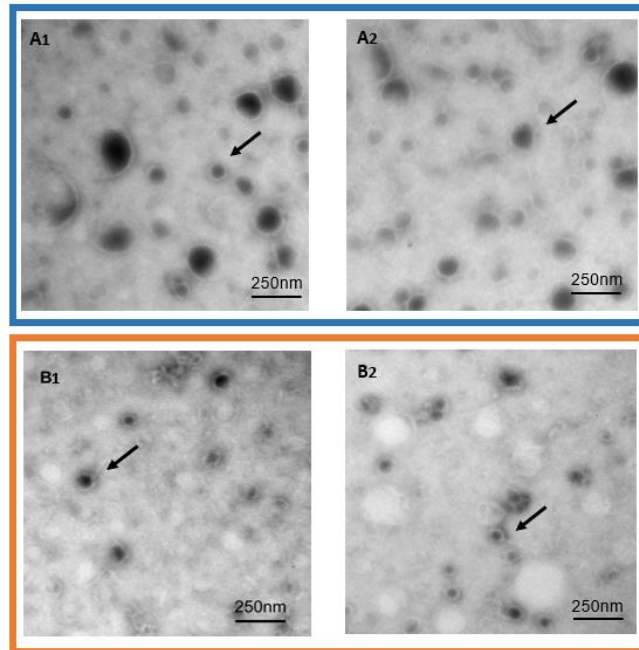


Figura 13. EVs plasmáticas. En esta fotomicrografía a una escala de 250 nm, las flechas señalan algunas de las EVs presentes en las muestras obtenidas de 2 individuos del grupo control (A1 y A2) y de 2 individuos con ACS (B1 y B2). Observamos una imagen electrodensa al centro con un contorno (bicapa lipídica) característico de las EVs.

8.3 Caracterización bioquímica de las EVs

Para la caracterización bioquímica, se determinó la concentración de proteína total contenida en las EVs de 6 individuos controles y 6 individuos con ACS de la cohorte de descubrimiento con la finalidad de realizar un ensayo Western Blot a proteína constante.

Aunque parece haber una mayor cantidad de proteínas en las EVs del grupo control con respecto al grupo de casos; el análisis estadístico reveló que esta diferencia no es estadísticamente significativa ($P=0.1392$). (Figura 14).

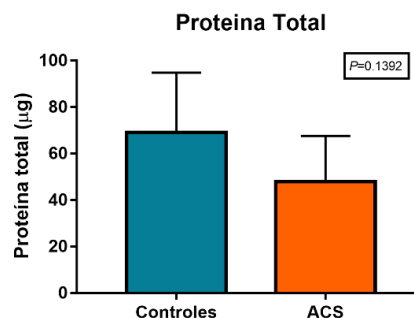


Figura 14. Proteína total contenida en las EVs plasmáticas de 6 individuos controles y 6 individuos con ACS. Se contrastaron las medias mediante la prueba t de Student.

Mediante la inmunodetección por Western Blot, se identificó la presencia de las tetraspaninas CD9 y CD63 en ambos grupos de la cohorte de descubrimiento (Figura 15 A). El análisis densitométrico no mostró diferencias significativas en la expresión de estas proteínas entre los grupos (Figuras 15 B y C).

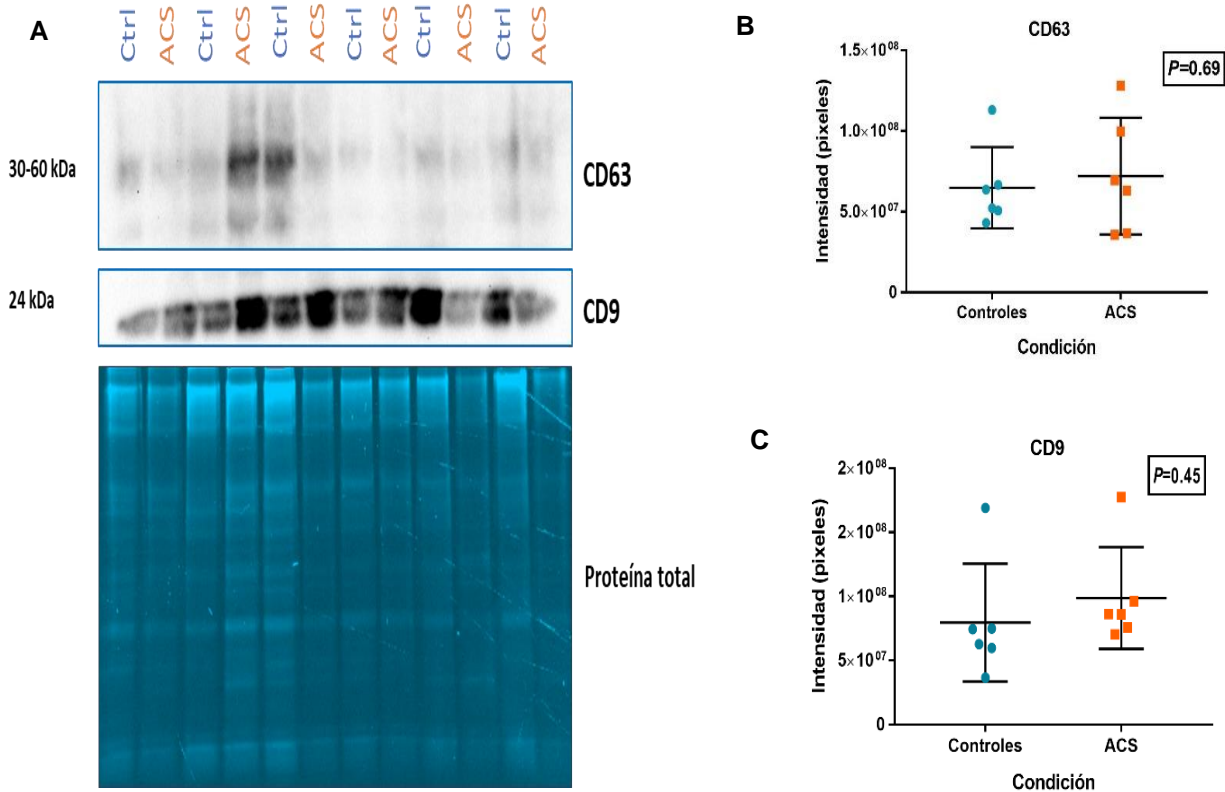


Figura 15. (A) Inmunodetección de las tetraspaninas CD9 y CD63 presentes en las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles (Ctrl). **(B)** Análisis densitométrico de CD63 en ambos grupos; **(C)** análisis densitométrico de CD9 en ambos grupos.

Una vez caracterizada e identificada la presencia de EVs en el plasma de individuos con ACS y controles, y habiendo observado que hay similitudes en cuanto al tamaño, la forma, y el contenido proteico, se realizó un ensayo mediante microarreglos para la determinación de la expresión de microRNAs contenidos en las EVs de ambos grupos.

Para ello, fue necesaria la estandarización para la obtención de las EVs plasmáticas y la purificación del RNA total contenido en ellas. A continuación, se describen los resultados.

8.4 Obtención de las EVs y RNA total a partir de plasma

Después de probar tres métodos de aislamiento de las EVs y 4 kits de purificación de RNA total, se encontró que el kit exoRNeasy de QIAGEN tuvo un mayor rendimiento del RNA contenido en las EVs para los ensayos posteriores de este estudio. Para ello, se realizó la determinación de la expresión del cel-microRNA-39 (como control exógeno) y del hsa-microRNA-223-3p, mediante un ensayo RT-qPCR, para lo cual se seleccionaron 13 muestras de individuos ajenos a la cohorte de acuerdo con la concentración de RNA, método de aislamiento de las EVs y método de purificación del RNA (Tabla 4).

Tabla 4. 13 muestras seleccionadas para el ensayo por RT-qPCR

Muestra	Obtención de las EVs	Purificación del RNA	Concentración del RNA
1	Ultracentrifugación	Zymo Direct-zol	5.7 ng/μL
2	Ultracentrifugación	miRNeasy	14.4 ng/μL
3	PEG	miRNeasy	13.6 ng/μL
4	Ultracentrifugación	miRNeasy	6.8 ng/μL
5	Ultracentrifugación	miRNeasy	11.2 ng/μL
6	ExoRNeasy	miRNeasy	15.2 ng/μL
7	ExoRNeasy	miRNeasy	14.8 ng/μL
8	ExoRNeasy	miRNeasy	16.6 ng/μL
9	ExoRNeasy	miRNeasy	13.8 ng/μL
10	ExoRNeasy	miRNeasy	12.7 ng/μL
11	ExoRNeasy	miRNeasy	11.2 ng/μL
12	ExoRNeasy	miRNeasy	10.9 ng/μL
13	ExoRNeasy	miRNeasy	20.4 ng/μL

Se obtuvieron los ciclos de expresión (Ct) promedio de cada muestra y por cada microRNA, como se muestra en la Figura 16; se aprecia de forma cualitativa que ambos microRNAs se expresan en ciclos más tempranos en las muestras 6 a 13, cuyas EVs fueron obtenidas mediante el kit exoRNeasy, con respecto a las muestras 1-5, que fueron aisladas por otros métodos.

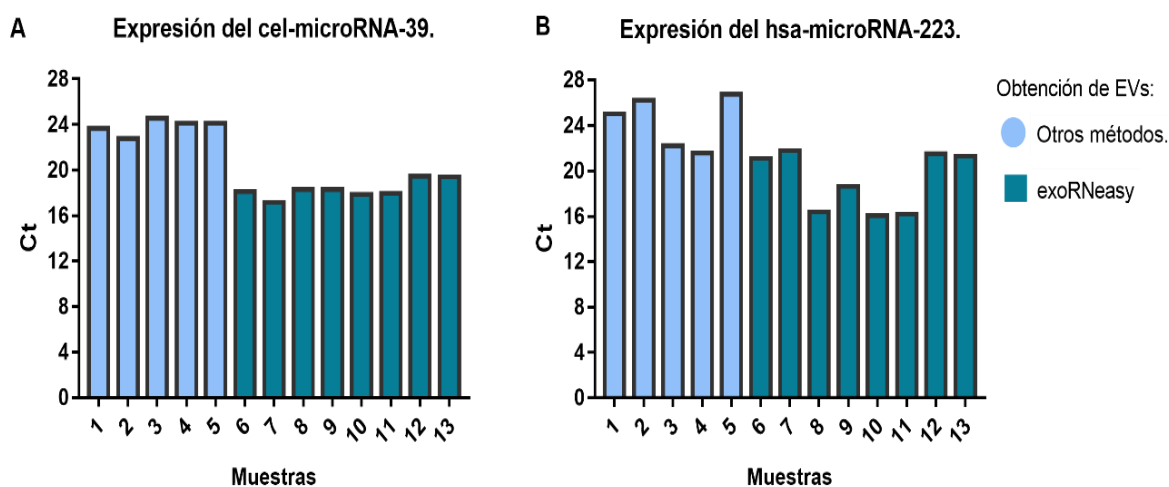


Figura 16. Expresión de los microRNAs. La gráfica A muestra los Ct de expresión del cel-microRNA-39 para las distintas muestras. La gráfica B muestra los Ct de expresión del hsa-microRNA-223.

Se compararon las medias de los ciclos de expresión de ambos microRNAs. Se agrupó por método de obtención de las vesículas: exoRNeasy y otros métodos. (Figura 17). Se observó que la expresión de los microRNA-39 y microRNA-223-3p, fue en ciclos más tempranos al utilizar el kit exoRNeasy, en comparación con los otros métodos de aislamiento (Figura 17A y 17B, respectivamente).

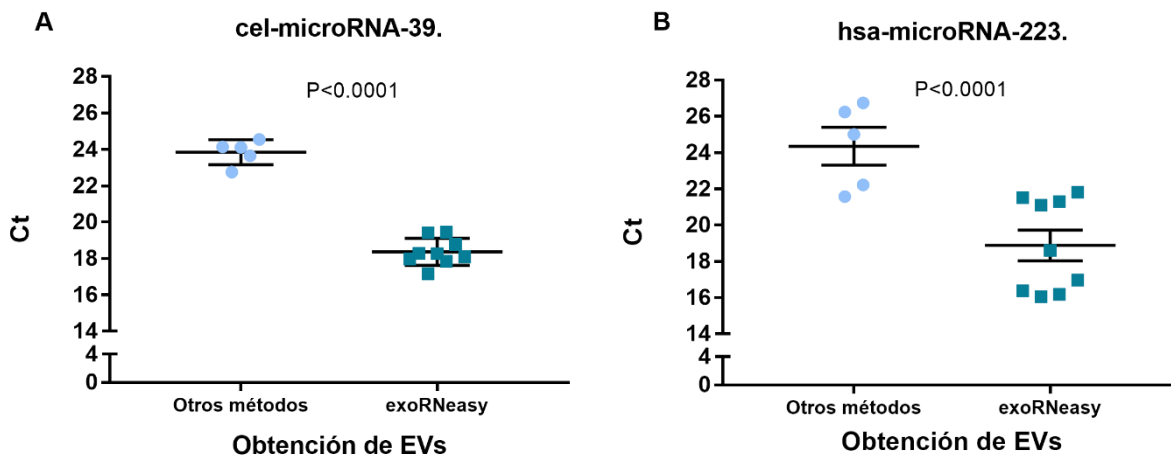


Figura 17. Comparación de los métodos de aislamiento de EVs y la expresión de los microRNAs. El panel A muestra el contraste de las medias de los Ct del microRNA-39 entre los métodos exoRNeasy y los otros métodos, con un valor de $P < 0.0001$. El panel B muestra la comparación de las medias del Ct del microRNA-223 entre ambos grupos, con un valor de $P < 0.0001$. Se analizó mediante la prueba t-Student.

Una vez que se determinó la metodología a emplear para la obtención de las EVs y la purificación del RNA, se evaluó el volumen óptimo de plasma inicial (Figura 18). El microRNA-39 mantuvo una expresión constante, independientemente del volumen de plasma inicial, lo cual es importante ya que se utilizó control exógeno (Figura 18A). Por otra parte, el microRNA-223-3p, tuvo ciclos de expresión más tempranos con volúmenes de plasma inicial de 4 y 6 mL (Figura 18B). Estos hallazgos fueron relevantes para establecer un volumen inicial de plasma de 6 mL, a partir del cual se aislaron las EVs y se obtuvo el RNA total de individuos con ACS y controles de este estudio.

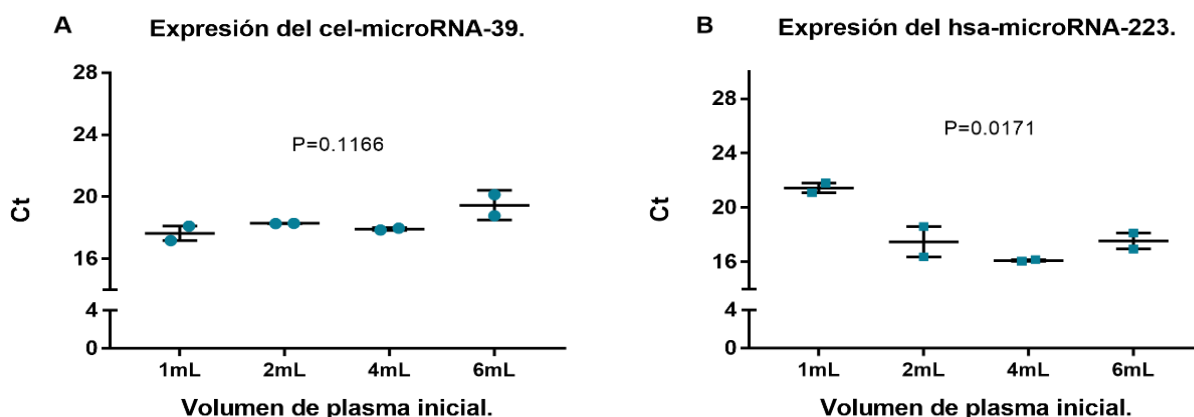


Figura 18. Determinación del volumen inicial de plasma. Las EVs y el RNA total se obtuvieron mediante el kit exoRNeasy. Se compararon diferentes volúmenes iniciales del plasma mediante RT-qPCR. En el panel A se observa que el microRNA-39 se expresó de manera constante sin importar el volumen inicial del plasma. El panel B, muestra que, a mayor volumen, los ciclos de expresión del microRNA-223-3p fueron más tempranos. Este análisis se determinó mediante una prueba ANOVA.

8.5 Análisis de expresión de microRNAs mediante microarreglos

Los microRNAs contenidos en las EVs desempeñan un papel importante en varias etapas de la aterosclerosis, por lo que se determinó el contenido de microRNAs transportados en las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles. Es importante mencionar que debido a que estos resultados son potencialmente patentables, la Oficina de Transferencia Tecnológica del INMEGEN sugirió el anonimato de dichos datos.

El análisis por microarreglos identificó los 19 microRNAs con expresión diferencial significativa entre ambos grupos. El gráfico de volcán (Figura 19) muestra los microRNAs que formaron parte del microarreglo, de los cuales, 8 están regulados a la alta y 11 regulados a la baja con respecto al grupo control.

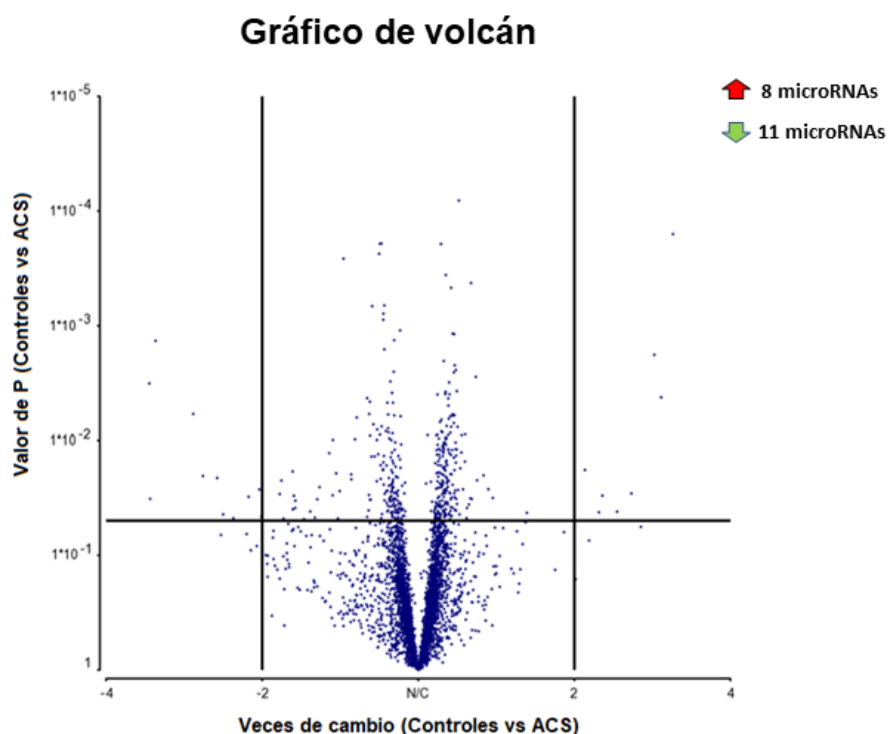


Figura 19. Análisis de expresión diferencial de los microRNAs contenidos en las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles. El gráfico de volcán muestra en el eje horizontal (eje X) los valores de veces de cambio, Fold Change y en el eje vertical (eje Y) muestra los valores expresados en $-\text{Log}_{10}$. Para este análisis se consideró un valor de veces de cambio de ± 2 y un valor de $P \leq 0.05$ como significativos, por lo que, 19 microRNAs muestran una expresión distinta entre ambos grupos de estudio, 8 de ellos regulados a la alta y 11 regulados a la baja con respecto al grupo control. Análisis y gráfico realizado con el **software Partek Genomic Suite V 7.01.18.07.23**

El dendograma del mapa de calor (Figura 20) muestra la tendencia a formar grupos de los individuos con ACS y controles. En la parte superior se muestra una barra: en color azul se representan a los sujetos control, mientras que los individuos con ACS están representados en color naranja. Se observa que dos individuos del grupo control (6B y 9B) se agrupan con los sujetos con ACS. Al costado izquierdo del mapa de calor se muestran los microRNAs agrupados de acuerdo a su expresión diferencial, 8 regulados a la alta y 11 regulados a la baja, con respecto al grupo control.

Dendograma y mapa de calor

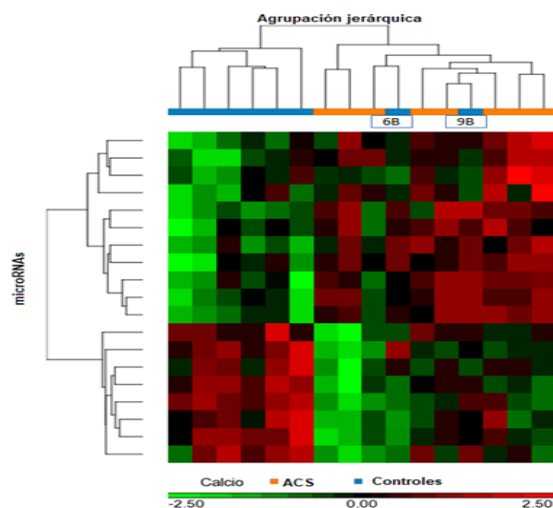


Figura 20. Dendograma y mapa de calor. En la barra superior se muestran en color azul a los individuos del grupo control y en color naranja a los individuos con ACS, se observa una tendencia a formar grupos de acuerdo con su condición, sin embargo, 2 sujetos del grupo control se agrupan con los individuos con ACS. Por otra parte, en el borde lateral se observa la agrupación de los microRNAs con expresión diferencial entre individuos con ACS y controles. La barra inferior muestra dos colores: rojo (expresión a la alta) y verde (expresión a la baja). Este gráfico nos permite observar que para el grupo control (azul) hay 11 microRNAs expresados a la baja (verde) y 8 microRNAs expresados a la alta (rojo). Análisis y gráfico realizado con el **software Partek Genomic Suite V 7.01.18.07.23**

El análisis de componentes principales (Figura 21), mostró en un modelo tridimensional, la variación de los individuos pertenecientes a los grupos ACS y controles. La variable de agrupación fue la presencia de calcio en las arterias coronarias en los individuos con ACS. Un 26.6% de la variación de los individuos de este estudio podría ser explicada por la condición de calcio en las arterias. Además, se observa que las muestras presentan una tendencia a agruparse según la condición de la presencia de calcio en las arterias coronarias. De manera interesante se apreció que dos individuos pertenecientes al grupo control (flechas negras), tienden a agruparse con los sujetos con ACS.

Análisis de componentes principales

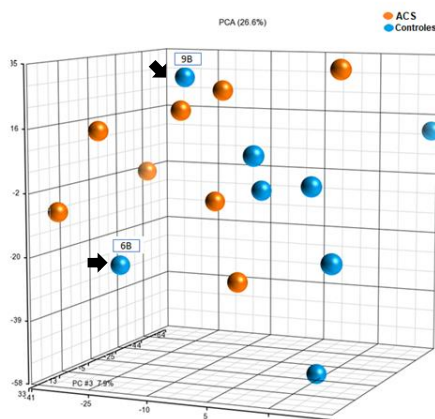


Figura 21. Análisis de componentes principales (PCA). El gráfico muestra la comparación entre los sujetos con ACS y controles. La variable de contraste que se empleó fue la presencia y puntaje de calcio de las arterias coronarias. Las esferas azules muestran a los 8 individuos del grupo control, mientras que las esferas naranjas muestran a los 8 individuos con ACS. Se observa cómo dos individuos pertenecientes al grupo control (6B y 9B) tienden a agruparse con los individuos con ACS. Análisis y gráfico realizado con el **software Partek Genomic Suite V 7.01.18.07.23**

8.6 Análisis *in silico* de las posibles vías afectadas

El análisis de las posibles vías biológicas afectadas por los microRNAs expresados diferencialmente, es de suma importancia para entender el papel de éstos en la aterosclerosis coronaria en su etapa subclínica (Figura 22). El análisis con el software FunRich permitió inferir la regulación de la expresión genética de diversas vías biológicas por parte de los microRNAs con expresión diferencial mediante la predicción de genes blanco. Los microRNAs regulados a la alta llevan a cabo el silenciamiento génico, mientras que los microRNAs regulados a la baja permiten la expresión de los genes en esta vías.

Para el conjunto de microRNAs regulados a la baja con respecto al grupo control (Figura 22A), algunas de las vías que resultaron de interés fueron las relacionadas con la proliferación y supervivencia celular como PI3K y mTOR, así como la relacionada con la angiogénesis, ya que estos microRNAs están implicados en la regulación de la expresión génica de los factores de crecimiento asociados a endotelio vascular (VEGF) y del receptor VEGFR de esta vía de señalización. Otra vía en la que participan estos microRNAs fue la del interferón gamma (IFN- γ), importante en la activación de las células del sistema inmune y la inflamación. Por otra parte, el conjunto de microRNAs regulados a la alta con respecto al grupo control (Figura 22B) mostraron implicación con genes que participan en vías de señalización celular involucradas en la proliferación celular, PI3K, el transporte transmembranal de moléculas pequeñas y la captación y transporte de hierro.

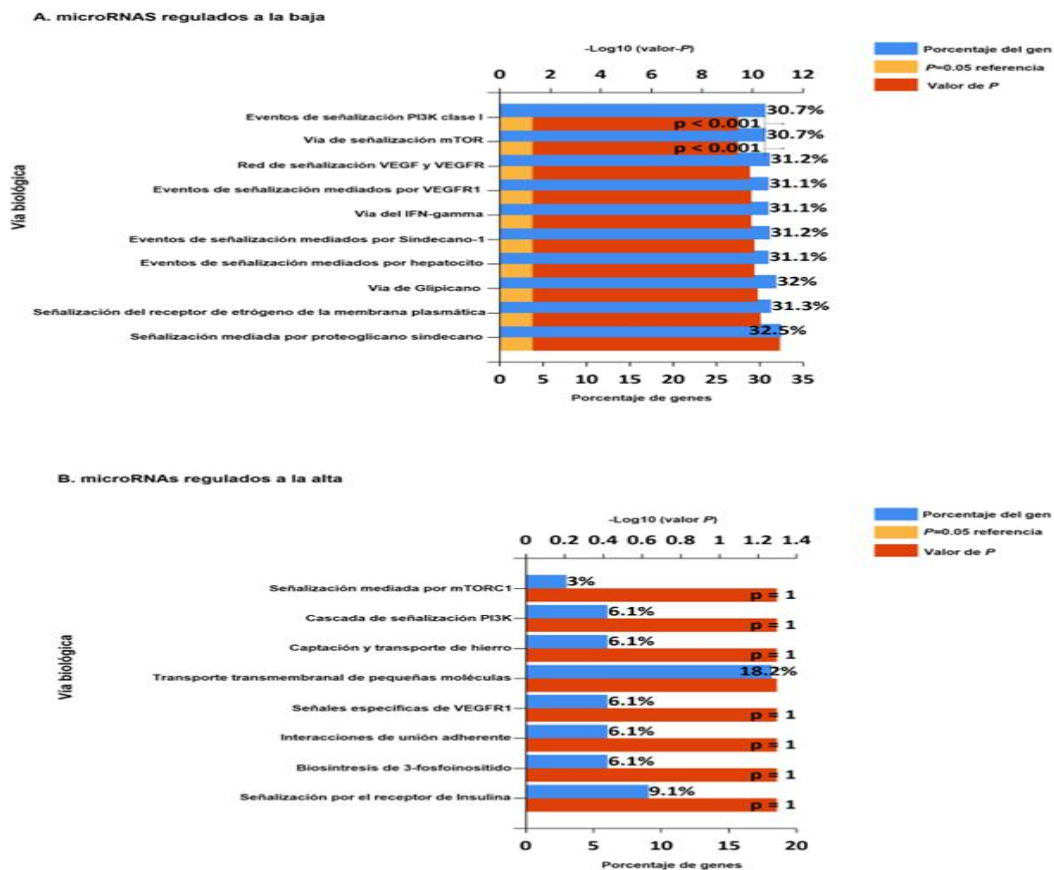


Figura 22. Vías biológicas afectadas por los microRNAs contenidos en las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles. Ensayo *in silico* con software FunRich v3.1.3. (A) microRNAs regulados a la baja con respecto al grupo control y algunas de las vías biológicas implicadas. (B) microRNAs regulados a la alta con respecto al grupo control y algunas vías afectadas.

9. Discusión

La aterosclerosis y sus complicaciones representan uno de los mayores problemas de salud pública en México y el mundo. Su estudio es de crucial importancia para entender los diversos mecanismos y procesos que están involucrados en la enfermedad. Lo novedoso de este estudio consistió en abordar la enfermedad en una de las etapas en las cuales no existen síntomas, llamada fase subclínica y explorar el posible papel de las vesículas extracelulares y su contenido en esta etapa. Este estudio tuvo como objetivo caracterizar las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles en cuanto a su forma, tamaño, así como identificar marcadores proteicos y los microRNAs contenidos en ellas, para que, en un futuro, se puedan establecer indicadores de diagnóstico oportuno.

Para lo anterior, se formó una cohorte de descubrimiento. En esta cohorte se cuantificaron variables antropométricas y bioquímicas. Al comparar estas variables entre los grupos, el puntaje de calcio de las arterias coronarias fue la única que presentó una diferencia estadística, con un valor de $P < 0.05$. Esto quiere decir que una diferencia cuantitativa entre los individuos con las estrategias y metodologías utilizadas en este estudio fue la presencia de calcio en las arterias coronarias de los individuos diagnosticados con ACS. Cabe mencionar que, aunque en el resto de las variables no identificamos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, una variable a destacar fue la categoría de IMC, ya que de los 16 individuos que participaron en este estudio, el 75% cursó con sobrepeso y obesidad. Estos resultados concuerdan con lo publicado en 2020 por Barquera, *et al.* (114) quienes reportaron que la prevalencia de sobrepeso y obesidad en adultos de nuestro país fue del 74.2%. Nuestras observaciones apoyan que el sobrepeso y obesidad sean considerados como factores de riesgo para el desarrollo de la aterosclerosis. Nuestro estudio contó con limitaciones, una de ellas fue el número reducido de individuos por cada grupo de estudio. Esto se debió a varios factores, entre ellos, a que los participantes no son formalmente pacientes del INCICH, ya que todos pertenecen al grupo control del estudio GEA, por lo que no cuentan con un seguimiento médico por parte del Instituto y, además, debido a que en su condición de aterosclerosis coronaria subclínica no hay manifestaciones clínicas, resultó difícil captar la atención de los participantes. Sin embargo, nuestro número de participantes es comparable al de otros estudios como el de Kolhe, *et al.* en 2017 (115), en donde se formó una cohorte para estudiar a las EVs y su contenido en la enfermedad de osteoporosis, en la que analizaron 6 controles y 8 casos, y se obtuvieron datos relevantes para esta condición. Otro estudio es el publicado en 2017 por García-Contreras, *et al.* (116), quienes trabajaron en la caracterización del contenido de las EVs en el contexto de la diabetes mellitus tipo 1 y formaron un grupo de estudio con 12 controles y 12 casos, y de igual forma obtuvieron resultados relevantes para esta enfermedad. Otra posible limitante fue el número reducido de variables bioquímicas cuantificadas en este estudio. A pesar de ello, es importante mencionar que esta cohorte nos permitió explorar las características de las EVs y su contenido en una condición poco estudiada como lo es la ACS.

En cuanto a la caracterización mediante TEM, nuestro objetivo fue identificar y observar el tamaño y la forma de las EVs plasmáticas de dos individuos con ACS y 2 controles. Se lograron identificar estructuras esféricas con un centro electrodensito y un contorno correspondiente a la bicapa lipídica, e imágenes con forma de copa correspondientes a las EVs. De acuerdo con la clasificación por tamaño, las imágenes que se obtuvieron estaban enriquecidas en exosomas y microvesículas principalmente (Figura 13). Con lo anterior, corroboramos la presencia de las EVs en el plasma sanguíneo de estos individuos. Estas características en cuanto a tamaño y forma de las EVs concuerdan con lo descrito por otros autores tanto en estudios de comparación de los métodos para caracterizarlas (117), así como en otros estudios donde evalúan su participación en distintas enfermedades: cardiovasculares

(118-120), nefropatía diabética (121), cáncer colorrectal (122), enfermedades neurodegenerativas (123, 124), entre otras. En esta parte del estudio, evaluamos al individuo con ACS con un puntaje de calcio de 1030.60 UA y su respectivo control, y otro sujeto con ACS con un puntaje de calcio de 400.60 y su respectivo control; las imágenes mostraron similitudes en cuanto a forma y tamaño. Por otra parte, como se observa en las imágenes obtenidas por TEM, existe la presencia de otras estructuras, las cuales probablemente son proteínas o lipoproteínas presentes en el plasma sanguíneo, las cuales comparten ciertas propiedades físicas con las EVs, como el tamaño y la densidad, tal y como lo reporta Brennan, *et al.* (125). Lo anterior pone en evidencia que el aislamiento de las EVs constituye uno de los retos actuales para obtener una mejor caracterización de éstas.

Además, se realizó la caracterización bioquímica de las EVs, por lo que primero se determinó la concentración de proteína total contenida en las EVs mediante un ensayo colorimétrico con la finalidad de realizar una inmunodetección de los marcadores proteicos CD9 y CD63 por Western Blot, a proteína constante. Comparamos la media de concentración de proteínas contenidas en las EVs de los individuos con ACS y controles; sin embargo, no hubo diferencias entre ambos grupos, ya que se obtuvo un valor de $P=0.1392$. Posteriormente, se identificaron las tetraspaninas CD9 y CD63 en las EVs plasmáticas de los individuos de ambos grupos. Estos datos nos permitieron comprobar que se lograron aislar las EVs plasmáticas de los individuos con ACS y controles, principalmente exosomas y microvesículas. De acuerdo con lo reportado por Kowal, *et al.* (126), estas dos tetraspaninas forman parte de un grupo de proteínas característico en las EVs de tamaño pequeño como exosomas, lo que respalda los resultados de nuestro estudio. Sin embargo, el análisis densitométrico de estos marcadores no mostró diferencias estadísticas entre los grupos de participantes. Por otra parte, podemos observar que la concentración de proteína total, tuvo una tendencia a la baja en las EVs de individuos con ACS, aunque se sabe que en condiciones inflamatorias, las EVs circulantes se incrementan (76). También se ha reportado que el número de EVs circulantes disminuye en individuos con mayor edad y que además, incrementan su capacidad para ser incorporadas por las células receptoras (127). El estudio proteómico de las EVs resulta de gran interés, ya que en 2019 un estudio elaborado por Gidlöf, *et al.* (128), mostraron que los individuos que padecieron un infarto de miocardio, expresaban un perfil proteómico en sus EVs totalmente diferente al perfil proveniente del plasma sanguíneo, por lo que será importante evaluar el proteoma de las EVs de individuos con y sin ACS en un futuro y su potencial uso como biomarcadores diagnósticos.

El estudio mostró que las EVs plasmáticas de los individuos con ACS y controles son similares en cuanto a tamaño, forma y contenido proteico, por lo que se decidió caracterizar los microRNAs contenidos en ellas. Para los ensayos de expresión diferencial fue necesario determinar el método del aislamiento de las EVs que permitiera obtener un mejor rendimiento de RNA total. Este paso fue determinante, ya que se han descrito varias técnicas de aislamiento de las EVs, cada una de ellas con sus ventajas y sus limitantes. La gran diversidad de métodos de aislamiento de las EVs nos habla acerca del reto metodológico que representa hoy su obtención, los estudios y análisis de las EVs y su contenido involucran la mayor parte de las veces, la aplicación de más de un método de obtención, como fue realizado en este estudio, ya que esto depende de las aplicaciones que se les quiera dar a las EVs en estudios posteriores. Hoy en día existe un esfuerzo sustancial por estandarizar y crear guías y protocolos para el estudio de las vesículas (129). Aunque la ultracentrifugación es el método de separación de las EVs más comúnmente empleado, como señala Gardiner, *et al.* (130), nuestro ensayo mostró que el kit comercial exoRNeasy Serum/Plasma de QIAGEN, permitió obtener un mayor rendimiento de RNA total contenido en las EVs, lo cual fue esencial para su aplicación posterior: el análisis de expresión diferencial de los microRNAs mediante microarreglos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Enderle, *et al.* (131) quienes señalaron que este método aisló las EVs

y purificó RNA total contenido en ellas en igual o mayor cantidad en comparación con la ultracentrifugación, sugiriendo que es un método confiable, rápido y estandarizado para la obtención de RNA transportado en EVs a partir de suero o plasma. El uso de esta tecnología permite una mayor integridad y concentración de las EVs, lo que podría explicar el mejor rendimiento del RNA total y la reproducibilidad en los ensayos de expresión (132).

En años recientes, el estudio de las vesículas extracelulares ha tomado gran relevancia debido a que son un mecanismo de comunicación intercelular muy efectivo, así como por el tipo de cargamento que transportan, como los microRNAs, los cuales participan en la regulación de diversos procesos celulares que ayudan a mantener el equilibrio dinámico y el adecuado funcionamiento, y también intervienen en el desarrollo de múltiples enfermedades como la aterosclerosis, por lo que su potencial uso como biomarcadores o blancos terapéuticos, es de gran interés (133). Nuestro estudio encontró la expresión diferencial de 19 microRNAs contenidos en las EVs plasmáticas de individuos con ACS y controles: 8 regulados a la alta y 11 regulados a la baja con respecto al grupo control, con un valor de veces de cambio ± 2 y un valor de $P < 0.05$ como significativo. Cabe destacar que, en la fase subclínica de la aterosclerosis, el papel de las EVs plasmáticas y su contenido como los microRNAs no ha sido abordado de manera profunda, en comparación con los estudios desarrollados en la fase clínica de la enfermedad. Por ejemplo, Martínez-Sales, *et al.* (134) en su estudio sobre la psoriasis describe un incremento de las microvesículas derivadas de las células endoteliales y su papel en el proceso inflamatorio y la disfunción endotelial, así como su probable relación con la evidencia de aterosclerosis subclínica de estos pacientes. Otro estudio llevado a cabo por Suades, *et al.* en 2015 (135) mostró que en los pacientes con alto riesgo cardiovascular por los niveles elevados de LDL, hubo un incremento en las microvesículas circulantes derivadas de plaquetas con respecto al grupo control, las cuales mostraban un actividad procoagulante al estar enriquecidas con factor tisular, lo que correlacionó directamente con placas aterosclerosas ricas en lípidos, e inversamente con placas calcificadas evidenciadas por resonancia magnética en la fase subclínica de la aterosclerosis, considerando así a las microvesículas como una potencial herramienta en el pronóstico y diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, en 2020, el estudio realizado por Agudiez, *et al.* (136) caracterizó los exosomas presentes en orina y determinó el enriquecimiento de metabolitos como el ácido 4-amino hipúrico, N-1-meltinicotamida y el ácido cítrico en ellos, evidenciando así el papel de los exosomas en los procesos metabólicos en la aterosclerosis subclínica y su posible uso como biomarcadores. Por lo tanto, otra relevancia de nuestro trabajo radica en que, en la actualidad, no existe un estudio previo en el que se hayan caracterizado los microRNAs contenidos en las EVs plasmáticas en individuos con aterosclerosis subclínica.

El análisis *in silico* de los microRNAs regulados a la baja con respecto al grupo control mostró su implicación en los procesos de proliferación y supervivencia celulares, así como en el proceso de la angiogénesis. Estos resultados son interesantes, ya que se infiere que los genes que favorecen los procesos anteriores están sobreexpresados en los controles mientras que en el grupo de ACS se encuentran posiblemente silenciados. La vía de señalización PI3K-akt-mTor, tiene un papel determinante en la progresión de la EAC, ya que como señala W Qin, *et al.* (137), la inhibición de esta vía favorece los procesos de apoptosis y la acumulación de elementos de la matriz extracelular, lo que genera cambios estructurales en los vasos sanguíneos o en el músculo cardíaco. Además, durante la aterosclerosis subclínica, cuando la placa aterosclerosa ya está formada, se modifican las características del flujo sanguíneo, y tal como señala Iurciuc, *et al.* (138), los cambios en la luz del vaso sanguíneo, la reducción de su capacidad de distensión y contractibilidad, la calcificación de la pared del vaso, promueven, en conjunto, el desarrollo de vasos colaterales después de la zona de oclusión. Esta evidencia concuerda con las probables vías en las que participan los microRNAs encontrados en

este estudio. Por otra parte, los microRNAs a la alta podrían estar involucrados en el silenciamiento de las proteínas que participan en las uniones adherentes de las células, por lo que podrían incrementar la permeabilidad de las células endoteliales, proceso determinante en el progreso y desarrollo de la aterosclerosis y sus graves consecuencias (9, 14). Otra vía posiblemente implicada y silenciada por los microRNAs regulados a la alta en el grupo control, es la del transporte y absorción de hierro. Las altas concentraciones sanguíneas de este mineral promueven la oxidación de las LDL, disfunción y activación endotelial, que incrementa la adhesión de monocitos y su trans migración hacia el espacio subendotelial; además, favorece la calcificación, proliferación, y apoptosis de las células del musculo liso (139, 140), eventos fundamentales en el desarrollo de la aterosclerosis. A continuación, se muestra un resumen gráfico de los hallazgos de este estudio (Figura 23).

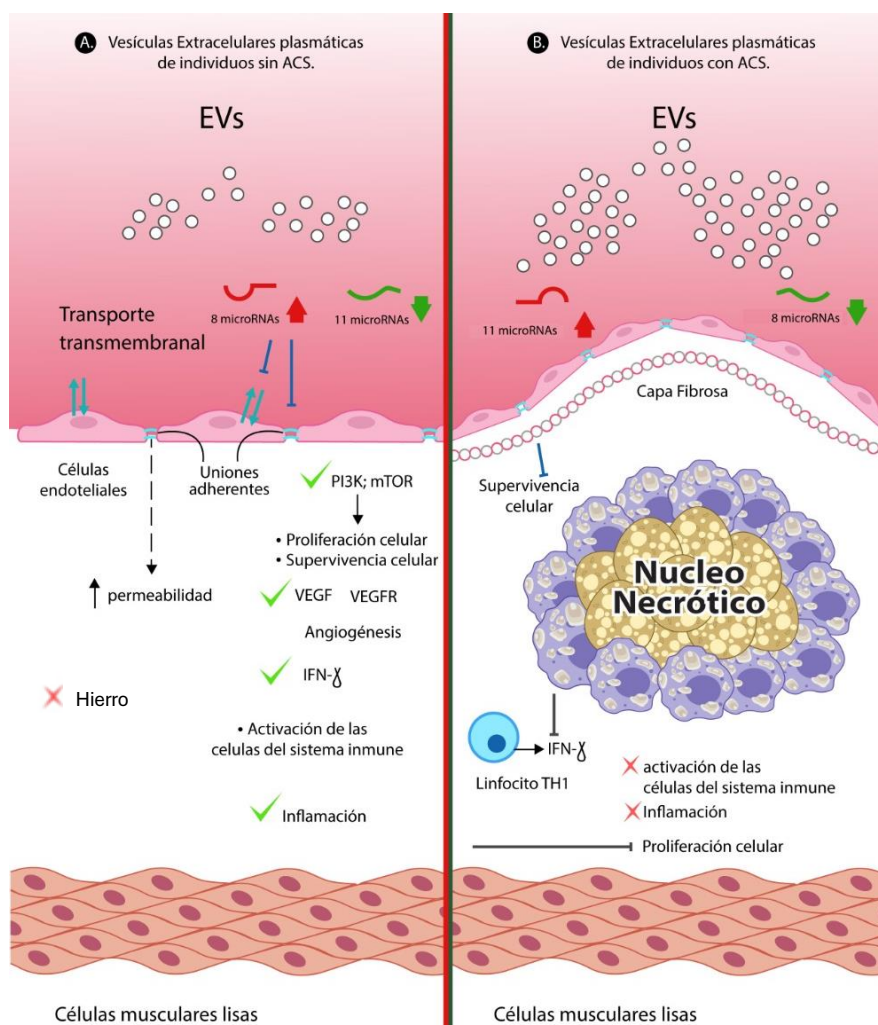


Figura 23. Las EVs plasmáticas de individuos con ACS y de controles, contienen un perfil de microRNAs expresados diferencialmente. **(A)** Las EVs de individuos controles contienen 8 microRNAs regulados a la alta, los cuales podrían silenciar proteínas que participan en las uniones celulares adherentes, lo que podría incrementar la permeabilidad de las células endoteliales y favorecer el ingreso de las LDL al espacio subendotelial. Otra vía silenciada es la absorción y transporte de hierro. Además, contienen 11 microRNAs regulados a la baja que favorecen las vías de proliferación, supervivencia celular e inflamación. **(B)** Las EVs de individuos con ACS contienen 8 microRNAs regulados a la baja, lo que favorece el incremento de la absorción del hierro, mineral implicado en el proceso de aterogénesis, y 11 microRNAs regulados a la alta por lo que las vías de supervivencia y proliferación celular, así como la activación de las células del sistema inmune y las vías de inflamación como la del IFN- γ podrían estar silenciadas por estos microRNAs en las etapas avanzadas de la enfermedad. **Imagen realizada con InkScape.**

Consideramos que aún era posible abordar más variables y realizar más experimentos, pero es importante señalar que el cese de actividades presenciales como medida preventiva para cortar la cadena de contagios durante la pandemia por la COVID-19 nos obligó a acotar los objetivos de esta tesis. En un futuro próximo, será necesario evaluar el origen celular de estas vesículas extracelulares a través de la citometría de flujo, lo cual enriquecerá de manera sustancial los hallazgos de este trabajo. Sin duda alguna, es esencial validar esta probable firma molecular de microRNAs a través de ensayos de RT-qPCR y realizar más análisis bioinformáticos de las vías moleculares relacionadas con estos microRNAs en conjunto e individualmente y ensayos funcionales. Los hallazgos de este estudio representan una valiosa ventana de exploración en el vasto entendimiento de la enfermedad aterosclerosa en sus etapas más tempranas.

10. Conclusiones

Identificamos EVs provenientes de individuos con ACS y controles, las cuales son similares en cuanto tamaño y forma. Estas EVs comparten marcadores proteicos característicos como CD9 y CD63.

Existe una expresión diferencial de los microRNAs transportados en las EVs entre sujetos con ACS y controles, lo que sugiere la existencia de una firma molecular asociada al proceso de aterosclerosis, lo que podría en un futuro ayudar a identificar individuos con riesgo de padecer sus complicaciones en etapas más tempranas.

11. Perspectivas

- ✓ Validar los resultados de expresión diferencial de microRNAs obtenidos a través de los microarreglos mediante RT-qPCR.
- ✓ Determinar el origen celular de las EVs mediante citometría de flujo.
- ✓ Explorar el perfil proteómico de la EVs en el contexto de la aterosclerosis.
- ✓ Realizar análisis bioinformáticos complementarios.
- ✓ Evaluar el uso de estos microRNAs como herramientas diagnósticas.
- ✓ Realizar ensayos funcionales de algunos de estos microRNAs.

12. Referencias bibliográficas

1. Antman EM, Selwyn AP, Loscalzo J. Ischemic Heart Disease. Harrison's Cardiovascular Medicine 2nd ed. USA: McGraw-Hill Education; 2013. p. 385-406.
2. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circulation research*. 2016;118(4):535-46.
3. WHO: Cardiovascular Diseases 2019 2019 [Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
4. Yahagi K, Davis HR, Arbustini E, Virmani R. Sex differences in coronary artery disease: pathological observations. *Atherosclerosis*. 2015;239(1):260-7.
5. Pathak LA, Shirodkar S, Ruparelia R, Rajebahadur J. Coronary artery disease in women. *Indian Heart J*. 2017;69(4):532-8.
6. Posadas-Romero C, López-Bautista F, Rodas-Díaz MA, Posadas-Sánchez R, Kimura-Hayama E, Juárez-Rojas JG, et al. Prevalencia y extensión de la calcificación arterial coronaria en población mexicana asintomática cardiovascular: estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa. *Archivos de cardiología de México*. 2017;87(4):292-301.
7. INEGI. Nota Técnica. Estadísticas de defunciones registradas 2019. 2019 [Available from: https://www.inegi.org.mx/contenidos/programas/mortalidad/doc/defunciones_registradas_2019_nota_tecnica.pdf].
8. INEGI. Estadísticas de defunciones registradas de enero a junio de 2021. Comunicado de prensa No. 24/22 2022 [Available from: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2022/dr/dr2021.pdf>].
9. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nature Reviews Disease Primers*. 2019;5(1):56.
10. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Blood Vessels. In: Elsevier, editor. *Robbin and Coltran Pathologic Basis of Disease*. 9th ed. USA2015. p. 491-504.
11. D'Ardes D, Santilli F, Guagnano M, Bucci M, Cipollone F. From Endothelium to Lipids, Through microRNAs and PCSK9: A Fascinating Travel Across Atherosclerosis. *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention*. 2020:1-8.
12. Pirillo A, Bonacina F, Norata GD, Catapano AL. The interplay of lipids, lipoproteins, and immunity in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2018;20(3):12.
13. Marchio P, Guerra-Ojeda S, Vila JM, Aldasoro M, Victor VM, Mauricio MD. Targeting early atherosclerosis: A focus on oxidative stress and inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
14. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clinical Science*. 2018;132(12):1243-52.
15. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105(9):1135-43.
16. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *Journal of Cell Biology*. 2015;209(1):13-22.
17. Poston RN. Atherosclerosis: integration of its pathogenesis as a self-perpetuating propagating inflammation: a review. *Cardiovascular endocrinology & metabolism*. 2019;8(2):51.
18. Bäck M, Yurdagül A, Tabas I, Öörni K, Kovanen PT. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Cardiology*. 2019;16(7):389-406.
19. Gisterå A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13(6):368.
20. 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. *New England Journal of Medicine*. 2008;358(13):1336-45.

21. Gepner AD, Young R, Delaney JA, Budoff MJ, Polak JF, Blaha MJ, et al. Comparison of carotid plaque score and coronary artery calcium score for predicting cardiovascular disease events: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Journal of the American Heart Association*. 2017;6(2):e005179.
22. Lo-Kioeng-Shioe MS, Vavere AL, Arbab-Zadeh A, Schuijff JD, Rochitte CE, Chen MY, et al. Coronary calcium characteristics as predictors of major adverse cardiac events in symptomatic patients: insights from the CORE 320 multinational study. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(6):e007201.
23. van der Bijl N, Joemai RM, Geleijns J, Bax JJ, Schuijff JD, de Roos A, et al. Assessment of Agatston coronary artery calcium score using contrast-enhanced CT coronary angiography. *American Journal of Roentgenology*. 2010;195(6):1299-305.
24. Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, Zusmer NR, Viamonte M, Detrano R. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computed tomography. *Journal of the American College of Cardiology*. 1990;15(4):827-32.
25. McClelland RL, Jorgensen NW, Budoff M, Blaha MJ, Post WS, Kronmal RA, et al. 10-year coronary heart disease risk prediction using coronary artery calcium and traditional risk factors: derivation in the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) with validation in the HNR (Heinz Nixdorf Recall) study and the DHS (Dallas Heart Study). *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;66(15):1643-53.
26. Papageorgiou N, Briasoulis A, Androulakis E, Tousoulis D. Imaging subclinical atherosclerosis: where do we stand? *Current cardiology reviews*. 2017;13(1):47-55.
27. Pletcher MJ, Tice JA, Pignone M, Browner WS. Using the coronary artery calcium score to predict coronary heart disease events: a systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2004;164(12):1285-92.
28. Greenland P, Alpert JS, Beller GA, Benjamin EJ, Budoff MJ, Fayad ZA, et al. 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines developed in collaboration with the American Society of Echocardiography, American Society of Nuclear Cardiology, Society of Atherosclerosis Imaging and Prevention, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society of Cardiovascular Computed Tomography, and Society for Cardiovascular Magnetic Resonance. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56(25):e50-e103.
29. Neves PO, Andrade J, Monção H. Coronary artery calcium score: current status. *Radiologia brasileira*. 2017;50(3):182-9.
30. Libby P. Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med*. 2013;368:2004-13.
31. Civeira Murillo E, Nogal Saez FD, Álvarez Ruiz A, Ferrero Zorita J, Alcantara A, Aguado G, et al. Recomendaciones para el diagnóstico y tratamiento del síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST. *Medicina intensiva*. 2010;34(1):22-45.
32. Khera AV, Emdin CA, Drake I, Natarajan P, Bick AG, Cook NR, et al. Genetic risk, adherence to a healthy lifestyle, and coronary disease. *New England Journal of Medicine*. 2016;375(24):2349-58.
33. Said MA, van de Vegte YJ, Zafar MM, van der Ende MY, Raja GK, Verweij N, et al. Contributions of interactions between lifestyle and genetics on coronary artery disease risk. *Current Cardiology Reports*. 2019;21(9):89.
34. Santos RD, Gidding SS, Hegele RA, Cuchel MA, Barter PJ, Watts GF, et al. Defining severe familial hypercholesterolaemia and the implications for clinical management: a consensus statement from the International Atherosclerosis Society Severe Familial Hypercholesterolemia Panel. *The Lancet Diabetes & endocrinology*. 2016;4(10):850-61.
35. Poznyak AV, Grechko AV, Wetzker R, Orekhov AN. In Search for Genes Related to Atherosclerosis and Dyslipidemia Using Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(6):2097.
36. Chen Y, Rollins J, Paigen B, Wang X. Genetic and genomic insights into the molecular basis of atherosclerosis. *Cell metabolism*. 2007;6(3):164-79.

37. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nature Reviews Genetics*. 2017;18(6):331.
38. del Pilar Valencia-Morales M, Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, et al. The DNA methylation drift of the atherosclerotic aorta increases with lesion progression. *BMC medical genomics*. 2015;8(1):1-9.
39. Zhou X, Han X, Wittfeldt A, Sun J, Liu C, Wang X, et al. Long non-coding RNA ANRIL regulates inflammatory responses as a novel component of NF- κ B pathway. *RNA biology*. 2016;13(1):98-108.
40. Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR. Nutrition and atherosclerosis. *Archives of Medical Research*. 2015;46(5):408-26.
41. Stallones RA. The association between tobacco smoking and coronary heart disease. *International journal of epidemiology*. 2015;44(3):735-43.
42. Psaltopoulou T, Hatzis G, Papageorgiou N, Androulakis E, Briasoulis A, Tousoulis D. Socioeconomic status and risk factors for cardiovascular disease: impact of dietary mediators. *Hellenic journal of cardiology*. 2017;58(1):32-42.
43. Csige I, Ujvárosy D, Szabó Z, Lórinicz I, Paragh G, Harangi M, et al. The impact of obesity on the cardiovascular system. *Journal of Diabetes Research*. 2018;2018.
44. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1·25 million people. *The Lancet*. 2014;383(9932):1899-911.
45. Naito R, Miyauchi K. Coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *International heart journal*. 2017;17-191.
46. Leentjens J, Bekkering S, Joosten LA, Netea MG, Burgner DP, Riksen NP. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis. *Circulation research*. 2018;122(5):664-9.
47. Zeng L, Talukdar HA, Koplev S, Giannarelli C, Ivert T, Gan L-M, et al. Contribution of gene regulatory networks to heritability of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2019;73(23):2946-57.
48. van der Harst P, Verweij N. Identification of 64 novel genetic loci provides an expanded view on the genetic architecture of coronary artery disease. *Circulation research*. 2018;122(3):433-43.
49. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N Engl J Med*. 2018;379(10):958-66.
50. Van Niel G, d'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(4):213.
51. Van Der Vorst EP, de Jong RJ, Donners MM. Message in a microbottle: Modulation of vascular inflammation and atherosclerosis by extracellular vesicles. *Frontiers in cardiovascular medicine*. 2018;5:2.
52. Colombo M, Raposo G, Théry C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*. 2014;30:255-89.
53. Mallocci M, Perdomo L, Veerasamy M, Andriantsitohaina R, Simard G, Martinez MC. Extracellular vesicles: mechanisms in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*. 2019;30(6):813-56.
54. Kalra H, Drummen GP, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: introducing the next small big thing. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):170.
55. Merchant ML, Rood IM, Deegens JK, Klein JB. Isolation and characterization of urinary extracellular vesicles: implications for biomarker discovery. *Nature Reviews Nephrology*. 2017;13(12):731-49.
56. Christ L, Raiborg C, Wenzel EM, Campsteijn C, Stenmark H. Cellular functions and molecular mechanisms of the ESCRT membrane-scission machinery. *Trends in biochemical sciences*. 2017;42(1):42-56.
57. Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*. 2020;367(6478).
58. Akers JC, Gonda D, Kim R, Carter BS, Chen CC. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of neuro-oncology*. 2013;113(1):1-11.

59. Babst M. MVB vesicle formation: ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current opinion in cell biology*. 2011;23(4):452-7.
60. Bevers E, Comfurius P, Dekkers D, Harmsma M, Zwaal R. Regulatory mechanisms of transmembrane phospholipid distributions and pathophysiological implications of transbilayer lipid scrambling. *Lupus*. 1998;7(2_suppl):126-31.
61. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology*. 2005;20(1):22-7.
62. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Current Biology*. 2009;19(22):1875-85.
63. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
64. Atkin-Smith GK, Tixeira R, Paone S, Mathivanan S, Collins C, Liem M, et al. A novel mechanism of generating extracellular vesicles during apoptosis via a beads-on-a-string membrane structure. *Nat Commun*. 2015;6:7439.
65. Hauser P, Wang S, Didenko VV. Apoptotic bodies: selective detection in extracellular vesicles. *Signal Transduction Immunohistochemistry: Springer*; 2017. p. 193-200.
66. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of cell science*. 2013;126(24):5553-65.
67. Kowal J, Tkach M, Théry C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current opinion in cell biology*. 2014;29:116-25.
68. Jeppesen DK, Fenix AM, Franklin JL, Higginbotham JN, Zhang Q, Zimmerman LJ, et al. Reassessment of exosome composition. *Cell*. 2019;177(2):428-45. e18.
69. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 2007;9(6):654-9.
70. Stahl PD, Raposo G. Extracellular vesicles: exosomes and microvesicles, integrators of homeostasis. *Physiology*. 2019;34(3):169-77.
71. Hobor F, Dallmann A, Ball NJ, Cicchini C, Battistelli C, Ogrodowicz RW, et al. A cryptic RNA-binding domain mediates Syncrin recognition and exosomal partitioning of miRNA targets. *Nature communications*. 2018;9(1):1-16.
72. Villarroya-Beltri C, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Cabo F, Pérez-Hernández D, Vázquez J, Martín-Cofreces N, et al. Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature communications*. 2013;4:2980.
73. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief C, et al. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(3):1161-72.
74. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *Journal of extracellular vesicles*. 2014;3(1):24641.
75. Skog J, Würdinger T, Van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Curry WT, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature cell biology*. 2008;10(12):1470-6.
76. Boulanger CM, Loyer X, Rautou P-E, Amabile N. Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nature reviews cardiology*. 2017;14(5):259-72.
77. Peng M, Liu X, Xu G. Extracellular Vesicles as Messengers in Atherosclerosis. *J Cardiovasc Transl Res*. 2020;13(2):121-30.
78. Rezaie J, Rahbarghazi R, Pezeshki M, Mazhar M, Yekani F, Khaksar M, et al. Cardioprotective role of extracellular vesicles: A highlight on exosome beneficial effects in cardiovascular diseases. *J Cell Physiol*. 2019;234(12):21732-45.
79. Deng W, Tang T, Hou Y, Zeng Q, Wang Y, Fan W, et al. Extracellular vesicles in atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 2019;495:109-17.

80. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *The American journal of pathology*. 2008;173(4):1210-9.
81. Jansen F, Li Q, Pfeifer A, Werner N. Endothelial- and Immune Cell-Derived Extracellular Vesicles in the Regulation of Cardiovascular Health and Disease. *JACC Basic Transl Sci*. 2017;2(6):790-807.
82. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock*. 2006;26(5):464-71.
83. Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor. *Journal of cellular physiology*. 2007;212(1):174-81.
84. Rautou P-E, Leroyer AS, Ramkhalawon B, Devue C, Duflaut D, Vion A-C, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1–dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation research*. 2011;108(3):335-43.
85. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald, GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *The Journal of clinical investigation*. 1998;102(1):136-44.
86. Hoyer FF, Giesen MK, Nunes França C, Lütjohann D, Nickenig G, Werner N. Monocytic microparticles promote atherogenesis by modulating inflammatory cells in mice. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012;16(11):2777-88.
87. Paone S, Baxter AA, Hulett MD, Poon IKH. Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(6):1093-106.
88. Huber LC, Jüngel A, Distler JH, Moritz F, Gay RE, Michel BA, et al. The role of membrane lipids in the induction of macrophage apoptosis by microparticles. *Apoptosis*. 2007;12(2):363-74.
89. Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*. 2008;19(2):96-103.
90. Paudel KR, Panth N, Kim D-W. Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression. *Scientifica*. 2016;2016.
91. Niu C, Wang X, Zhao M, Cai T, Liu P, Li J, et al. Macrophage foam cell–derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(10):e004099.
92. Passos LSA, Lupieri A, Becker-Greene D, Aikawa E. Innate and adaptive immunity in cardiovascular calcification. *Atherosclerosis*. 2020.
93. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell–derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circulation research*. 2011;109(1):e1-e12.
94. Buendía P, de Oca AM, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *The FASEB Journal*. 2015;29(1):173-81.
95. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circulation research*. 2015;116(8):1312-23.
96. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:402.
97. Bronze-da-Rocha E. MicroRNAs expression profiles in cardiovascular diseases. *BioMed research international*. 2014;2014.
98. Maqbool R, Hussain MU. MicroRNAs and human diseases: diagnostic and therapeutic potential. *Cell and tissue research*. 2014;358(1):1-15.
99. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(8):509-24.
100. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(1):5-20.
101. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*. 2019;167:12-24.

102. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M. Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*. 2014;2014.
103. Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends in cell biology*. 2007;17(3):118-26.
104. Liu H, Lei C, He Q, Pan Z, Xiao D, Tao Y. Nuclear functions of mammalian MicroRNAs in gene regulation, immunity and cancer. *Mol Cancer*. 2018;17(1):64.
105. Hafiane A, Daskalopoulou SS. Extracellular vesicles characteristics and emerging roles in atherosclerotic cardiovascular disease. *Metabolism*. 2018;85:213-22.
106. He S, Wu C, Xiao J, Li D, Sun Z, Li M. Endothelial extracellular vesicles modulate the macrophage phenotype: Potential implications in atherosclerosis. *Scand J Immunol*. 2018;87(4):e12648.
107. Njock M-S, Cheng HS, Dang LT, Nazari-Jahantigh M, Lau AC, Boudreau E, et al. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing antiinflammatory microRNAs. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2015;125(20):3202-12.
108. Chang YJ, Li YS, Wu CC, Wang KC, Huang TC, Chen Z, et al. Extracellular MicroRNA-92a Mediates Endothelial Cell-Macrophage Communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2019;39(12):2492-504.
109. Nguyen MA, Karunakaran D, Geoffrion M, Cheng HS, Tandoc K, Perisic Matic L, et al. Extracellular Vesicles Secreted by Atherogenic Macrophages Transfer MicroRNA to Inhibit Cell Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(1):49-63.
110. Krohn JB, Hutcheson JD, Martínez-Martínez E, Aikawa E. Extracellular vesicles in cardiovascular calcification: expanding current paradigms. *The Journal of physiology*. 2016;594(11):2895-903.
111. Jansen F, Stumpf T, Proebsting S, Franklin BS, Wenzel D, Pfeifer P, et al. Intercellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2017;104:43-52.
112. Villarreal-Molina T, Posadas-Romero C, Romero-Hidalgo S, Antúnez-Argüelles E, Bautista-Grande A, Vargas-Alarcón G, et al. The ABCA1 gene R230C variant is associated with decreased risk of premature coronary artery disease: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *PLoS One*. 2012;7(11):e49285.
113. Alkagiet S, Tziomalos K. Vascular calcification: the role of microRNAs. *Biomolecular concepts*. 2017;8(2):119-23.
114. Barquera S, Hernández-Barrera L, Trejo-Valdivia B, Shamah T, Campos-Nonato I, Rivera-Dommarco J. Obesidad en México, prevalencia y tendencias en adultos. *Ensanut 2018-19. Salud Pública de México*. 2020;62(6).
115. Kolhe R, Hunter M, Liu S, Jadeja RN, Pundkar C, Mondal AK, et al. Gender-specific differential expression of exosomal miRNA in synovial fluid of patients with osteoarthritis. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
116. Garcia-Contreras M, Shah SH, Tamayo A, Robbins PD, Golberg RB, Mendez AJ, et al. Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.
117. Cheng H, Fang H, Xu R, Fu M, Chen L, Song X, et al. Development of a rinsing separation method for exosome isolation and comparison to conventional methods. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019;23(12):5074-83.
118. Zhu J, Liu B, Wang Z, Wang D, Ni H, Zhang L, et al. Exosomes from nicotine-stimulated macrophages accelerate atherosclerosis through miR-21-3p/PTEN-mediated VSMC migration and proliferation. *Theranostics*. 2019;9(23):6901.
119. Li M, Liu Y, Chen J, Liu T, Gu Z, Zhang J, et al. Platelet bio-nanobubbles as microvascular recanalization nanoformulation for acute ischemic stroke lesion theranostics. *Theranostics*. 2018;8(18):4870.
120. D'Ascenzo F, Femminò S, Ravera F, Angelini F, Caccioppo A, Franchin L, et al. Extracellular vesicles from patients with Acute Coronary Syndrome impact on ischemia-reperfusion injury. *Pharmacological Research*. 2021:105715.

121. Wu F, Chen Y, Xiao H, Zou Z, Ning J, Chen H, et al. Value of podocalyxin levels in urinary extracellular vesicles for diagnosis of diabetic nephropathy. *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*. 2018;38(9):1126-30.
122. Zheng X, Xu K, Zhou B, Chen T, Huang Y, Li Q, et al. A circulating extracellular vesicles-based novel screening tool for colorectal cancer revealed by shotgun and data-independent acquisition mass spectrometry. *Journal of extracellular vesicles*. 2020;9(1):1750202.
123. Beretta C, Nikitidou E, Streubel-Gallasch L, Ingelsson M, Sehlin D, Erlandsson A. Extracellular vesicles from amyloid- β exposed cell cultures induce severe dysfunction in cortical neurons. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-14.
124. Manek R, Moghieb A, Yang Z, Kumar D, Kobessiy F, Sarkis GA, et al. Protein biomarkers and neuroproteomics characterization of microvesicles/exosomes from human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury. *Molecular neurobiology*. 2018;55(7):6112-28.
125. Brennan K, Martin K, FitzGerald S, O'Sullivan J, Wu Y, Blanco A, et al. A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific reports*. 2020;10(1):1-13.
126. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(8):E968-E77.
127. Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode N, Bæk R, Jørgensen M, et al. Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Sci Rep*. 2017; 7: 1342.
128. Gidlöf O, Evander M, Rezeli M, Marko-Varga G, Laurell T, Erlinge D. Proteomic profiling of extracellular vesicles reveals additional diagnostic biomarkers for myocardial infarction compared to plasma alone. *Scientific reports*. 2019;9(1):1-13.
129. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*. 2018;7(1):1535750.
130. Gardiner C, Vizio DD, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M, et al. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of extracellular vesicles*. 2016;5(1):32945.
131. Enderle D, Spiel A, Coticchia CM, Berghoff E, Mueller R, Schlumpberger M, et al. Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136133.
132. Shao H, Im H, Castro CM, Breakefield X, Weissleder R, Lee H. New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev*. 2018;118(4):1917-50.
133. Shoeibi S. Diagnostic and theranostic microRNAs in the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2020;228(1):e13353.
134. Martínez-Sales V, Vila V, Ricart JM, Vayá A, Todolí J, Nández C, et al. Increased circulating endothelial cells and microparticles in patients with psoriasis. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2015;60(3):283-90.
135. Suades R, Padro T, Alonso R, Mata P, Badimon L. High levels of TSP1+/CD142+ platelet-derived microparticles characterise young patients with high cardiovascular risk and subclinical atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2015;114(6):1310-21.
136. Agudiez M, Martinez PJ, Martin-Lorenzo M, Heredero A, Santiago-Hernandez A, Molero D, et al. Analysis of urinary exosomal metabolites identifies cardiovascular risk signatures with added value to urine analysis. *BMC Biol*. 2020;18(1):192.
137. Qin W, Cao L, Massey IY. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2021;476(11):4045-59.
138. Iurciuc S, Cimpean AM, Mitu F, Heredea R, Iurciuc M. Vascular aging and subclinical atherosclerosis: why such a "never ending" and challenging story in cardiology? *Clin Interv Aging*. 2017;12:1339-45.

139. Xu S. Iron and atherosclerosis: the link revisited. *Trends in Molecular Medicine*. 2019;25(8):659-61.
140. Vinchi F, Muckenthaler MU, Da Silva MC, Balla G, Balla J, Jeney V. Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level. *Frontiers in pharmacology*. 2014;5:94.