



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

**“EXPRESIÓN DE microRNAs, *NOS3* y *ABCA1* EN MONOCITOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA
ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA EN PACIENTES MEXICANOS”**

**T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

M. en C. YAZMÍN ESTELA TORRES PAZ

TUTOR PRINCIPAL:

DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. RICARDO GAMBOA ÁVILA
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”
DRA. MARÍA TERESA VILLARREAL MOLINA
Instituto Nacional de Medicina Genómica



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ELENA SOTO LÓPEZ

SECRETARIO: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

VOCAL: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES

VOCAL: DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO

VOCAL: DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN:
INTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”

TUTORA: DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ

ASESOR TÉCNICO: DR. RICARDO GAMBOA ÁVILA

SUSTENTANTE: M. en C. YAZMÍN ESTELA TORRES PAZ

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Claudia Huesca Gómez, por permitirme unir a su grupo de trabajo y por el gran apoyo que me brindó a lo largo de todos estos años de maestría y doctorado, así como el tiempo que dedicó a revisar y corregir mis resultados, informes, artículos y tesis.

Al Dr. Ricardo Gamboa Ávila, por su apoyo técnico, así como el tiempo dedicado a revisar mis resultados, artículos y tesis.

A la Dra. María Elena Soto López, por su gran apoyo y asesoramiento en la parte estadística del presente estudio, por sus consejos y el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis.

A la Dra. María Teresa Villarreal Molina, por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de mi tesis, así como por su apoyo a lo largo de la realización del presente estudio.

Al Dr. Guillermo Cardoso Saldaña, por su excelente profesionalismo y asesoramiento en la técnica del eflujo de colesterol. A la Dra. Rocío Martínez Alvarado, por su dedicación y compromiso en este proyecto. Al Dr. Leonardo Del Valle Mondragón, por su asesoramiento y sus sabios consejos.

A los doctores Edgar Samuel Ramírez Marroquín, Xicotécatl Vásquez Jiménez y Víctor Sainz Escarrega, por la obtención de las muestras sanguíneas de los pacientes con EAC.

A mis compañeros, el Dr. Giovanni Fuentesvilla Álvarez y la M. en C. Nadia González Moyotl, por su amistad, las risas, consejos y buenos momentos.

Gracias a todos ellos por su gran apoyo en la realización del presente trabajo.

A los miembros del jurado, por el tiempo dedicado a la revisión y corrección de mi tesis, por sus consejos y su apreciable participación en mi examen de grado.

A mi alma mater, la UNAM, que me ayudó y me vio crecer a lo largo de toda mi trayectoria profesional.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT), por la beca otorgada durante el desarrollo del presente trabajo para la obtención del grado de Doctora en Ciencias.

El cuerpo humano es tan complejo como fascinante, todavía son muchos los secretos que esconde.

Lo que sabemos es tan sólo una gota de agua, lo que ignoramos es el océano

- Isaac Newton

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO 1

ÍNDICE DE FIGURAS..... 4

ÍNDICE DE TABLAS 5

ÍNDICE DE ABREVIATURAS 6

1. RESUMEN 9

2. INTRODUCCIÓN 11

 2.1. Enfermedades cardiovasculares 11

 2.2. Factores de riesgo cardiovascular 12

 2.3. Enfermedad arterial coronaria y placa aterosclerótica 13

 2.4. Diagnóstico de EAC..... 15

 2.5. Tratamiento farmacológico de la EAC..... 16

 2.6. Tratamiento quirúrgico de la EAC 188

 2.6.1. Cirugía de revascularización coronaria 18

 2.6.2. Intervención coronaria percutánea 18

 2.7. Receptores involucrados en aterosclerosis 19

 2.8. Transportador de membrana dependiente de ATP A1 (ABCA1) 20

 2.9. Transporte reverso del colesterol 22

 2.10. Óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3) 23

 2.11. miRNAs 26

 2.12. miRNAs en enfermedades cardiovasculares 29

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 32

4. JUSTIFICACIÓN 32

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 32

6. HIPÓTESIS..... 32

7. OBJETIVO GENERAL..... 33

8. OBJETIVOS PARTICULARES..... 33

9. DISEÑO DEL ESTUDIO 34

10. MATERIALES Y MÉTODOS 37

11. RESULTADOS..... 43

 11.1. Descripción de la población 43

 11.2. Expresión de los miRNAs de estudio en monocitos 44

11.2. Expresión de RNAm de estudio en monocitos.....	44
11.4. Relación entre EAC, genes de estudio y datos antropométricos.....	45
11.5. Correlación entre la expresión de los miRNAs y genes de estudio.....	46
11.6. Expresión de miRNAs y genes blanco de acuerdo con el consumo de estatinas.....	48
11.7. Expresión de miRNAs y genes blanco de acuerdo con el consumo de hipoglucemiantes....	50
11.8. Eflujo de colesterol.....	52
11.9. Relación entre eflujo de colesterol y la EAC.....	52
11.10. Correlación entre el eflujo de colesterol y la expresión de los miRNAs.....	53
12. DISCUSIÓN.....	55
13. CONCLUSIONES.....	64
14. PERSPECTIVAS.....	68
15. REFERENCIAS.....	69
16. ANEXOS.....	91
ANEXO 1. DATOS DE MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE PUBLICACIONES PREVIAS PARA EL CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA.....	91
ANEXO 2: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA.....	92
ANEXO 3: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	93
ANEXO 4: VALORES MÁXIMOS Y MEDIOS DEL GIMc EN POBLACIÓN HISPANA.....	94
ANEXO 5: SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES.....	95
ANEXO 6: EXTRACCIÓN DE MONOCITOS CON MICROPERLAS MACS®.....	96
ANEXO 7: EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE MONOCITOS.....	97
ANEXO 8: OBTENCIÓN DE HDL POR MEDIO DE ULTRACENTRIFUGACIÓN.....	98
ANEXO 9: EFLUJO DE COLESTEROL CON LA LINEA CELULAR J774.....	100
ANEXO 10: TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE RNA TOTAL.....	101
ANEXO 11: PCR EN TIEMPO REAL DE los RNAm.....	102
ANEXO 12: TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE miRNAs.....	103
ANEXO 13: PCR EN TIEMPO REAL DE miRNAs.....	104
ANEXO 14: EXPRESIÓN DE miRNAs Y GENES BLANCO DE ACUERDO CON EL CONSUMO DE ANTIHIPERTENSIVOS.....	105
ANEXO 15: CORRELACIÓN ENTRE DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y miRNAs/GENES BLANCO.....	106
ANEXO 16: CORRELACIÓN ENTRE EL EFLUJO DE COLESTEROL Y DATOS ANTROPOMÉTRICOS.....	108
ANEXO 17: SITIOS DE UNIÓN DE LOS miRNAs Y RNAm DE ESTUDIO.....	109

ANEXO 18: PUNTOS DE CORTE DE EXPRESIÓN DEL miRNA-33a-5p.....110

17. ARTÍCULOS PUBLICADOS.....111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una arteria normal.....	13
Figura 2. Formación de placa aterosclerótica	15
Figura 3. Estructura de <i>ABCA1</i>	21
Figura 4. Transporte reverso del colesterol.....	23
Figura 5. Estructura de <i>NOS3</i>	24
Figura 6. Síntesis de NO	25
Figura 7. Biosíntesis de miRNAs.....	27
Figura 8. miRNAs y genes de estudio	31
Figura 9. Diagrama de flujo del desarrollo del proyecto de investigación	42
Figura 10. Eflujo de colesterol de los grupos de estudio	52
Figura 11. Expresión de los miRNAs de estudio en monocitos de pacientes con EAC medicados	65
Figura 12. Expresión de miRNA-21-5p, miRNA-221-5p y miR-155-5p en monocitos de pacientes con EAC sin tratamiento.....	66
Figura 13. Expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miR-26a-5p en monocitos de pacientes con EAC sin tratamiento.....	67
Figura 14. Obtención de células mononucleares por gradiente de densidad	95
Figura 15. Extracción de monocitos con microperlas MACS®.....	96
Figura 16. Extracción de RNA total de monocitos	97
Figura 17. Obtención de HDL por ultracentrifugación.....	99
Figura 18. Diseño de una placa de 24 pozos para el ensayo de Eflujo de colesterol	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades cardiovasculares	11
Tabla 2. Clasificación de los factores de riesgo cardiovascular	12
Tabla 3. Definición de variables y valores de referencia	36
Tabla 4. Parámetros bioquímicos y antropométricos de la población de estudio	43
Tabla 5. Valores de expresión de los miRNAs de estudio entre el grupo con EAC y el grupo control	44
Tabla 6. Valores de expresión de los RNAm de estudio entre el grupo con EAC y el grupo control	45
Tabla 7. Asociación entre EAC, genes de estudio y datos antropométricos.....	46
Tabla 8. Correlaciones entre miRNAs y <i>ABCA1</i>	47
Tabla 9. Correlaciones entre miRNAs y <i>NOS3</i>	47
Tabla 10. Valores de expresión de los miRNAs y RNAm de estudio de acuerdo con el consumo de atorvastatina	49
Tabla 11. Valores de expresión de los miRNAs y RNAm de estudio de acuerdo con el consumo de hipoglucemiantes	51
Tabla 12. Relación entre el eflujo de colesterol y la EAC	53
Tabla 12. Relación entre el eflujo de colesterol y la EAC	53
Tabla 14. Correlación entre el eflujo de colesterol y miRNAs/genes blanco	54

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

EAC: Enfermedad arterial coronaria	rLDL: Receptor de LDL
ECV: Enfermedades cardiovasculares	MLV: Músculo liso vascular
OMS: Organización Mundial de la Salud	CML: Células del músculo liso
FR: Factor de riesgo	CMLV: Células musculares lisas vasculares
SSA: Secretaría de Salud	GIMc: Grosor de la íntima media carotídea
HTA: Hipertensión arterial	IECA: Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina
DM2: Diabetes mellitus tipo 2	ARA-II: Antagonistas del receptor a angiotensina II
IAM: Infarto agudo al miocardio	ESC: Sociedad Europea de Cardiología
LDL: Lipoproteínas de baja densidad	ICP: Intervención coronaria percutánea
HDL: Lipoproteínas de alta densidad	ABCA1: Transportador de membrana dependiente de ATP A1
ROS: Especies reactivas de oxígeno	CE: Colesterol esterificado
NO: Óxido nítrico	DTM: Dominio transmembranal
Ang II: Angiotensina II	NBD: Dominio de unión a ATP
LDLmod: LDL modificadas	ECD: Dominio extracelular
LDLox: LDL oxidadas	JAK2: Janus quinasa 2
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular1	STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3
VCAM-1: Molécula de adhesión vascular 1	IL-1β: Interleucina-1 β
MCP-1: Proteína 1 químicatrayente de monocitos	IL-6: Interleucina-6
M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos	TNF-α: Factor de necrosis tumoral- α
SR-BI: Receptor scavenger tipo BI	NF-κB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
SR-BII: Receptor scavenger tipo BII	TRC: Transporte reverso del colesterol
SR-AI: Receptor scavenger tipo AI	ApoA-I: Apolipoproteína A-I
SR-AII: Receptor scavenger tipo AII	

ApoB: Apolipoproteína B	GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
LCAT: Enzima lecitina/colesterol aciltransferasa	PKG: Proteína cinasa G
CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol	PKB: Proteína cinasa B
miRNAs: microRNAs	IP3R: Receptor inositol trifosfato
pri-miRNA: microRNA primario	O₂⁻: Anión superóxido
pre-miRNA: precursor de microRNA	ONOO⁻: Peroxinitrito
RNA: Ácido ribonucleico	3'-UTR: Región 3' no traducible
RNA_m: Ácido ribonucleico mensajero	Pol II: RNA Polimerasa II
nNOS o NOS1: Óxido nítrico sintasa neuronal	RISC: Complejo silenciador inducido por RNA
iNOS o NOS2: Óxido nítrico sintasa inducible	SREBP2: Proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 2
NOS3 o eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial	CTDSP: Fosfatasa pequeña
NO: Óxido nítrico	TMEM49: Proteína Transmembrana 49
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato	MIR155HG: Gen huésped MIR155
FMN: Mononucleótido de flavina	PBS: Buffer fosfato salino
FAD: Dinucleótido de flavina adenina	PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
BH4: Tetrahidrobiopterina	cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
COOH: Carboxilo terminal	NaOH: Hidróxido de sodio
NH₂: Amino terminal	D.S: Desviación estándar
CaM: Calmodulina	E.E: Error estándar
GC: Guanilato ciclasa	IMC: Índice de masa corporal
GTPc: Guanosín trifosfato cíclico	c-HDL: Colesterol HDL
	c-LDL: Colesterol LDL

PAS: Presión arterial sistólica

PAD: Presión arterial diastólica

FC: Frecuencia cardiaca

GC: Grupo control

NCEP: Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol

JNK: Cinasas c-Jun N-terminal

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

AKT: Proteína cinasa B

SOCS1: Gen supresor de la señalización de citocinas 1

AMPK: Proteína cinasa activada por AMP

E2F3: Factor de transcripción E2F 3

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA

PPAR γ : Receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas

LRX: Receptor nuclear hepático X

1. RESUMEN

Una de las enfermedades cardiovasculares más comunes es la enfermedad arterial coronaria (EAC), la cual ocupa el segundo lugar de mortalidad general en México. La causa principal de la EAC es el estrechamiento de las arterias coronarias debido a la aterosclerosis, en la cual, el reclutamiento e internalización de monocitos circulantes en la íntima arterial, constituye uno de los primeros pasos en su iniciación y progresión. Actualmente, se ha identificado una gran cantidad de pequeños RNAs no codificantes de cadena sencilla conocidos como microRNAs (miRNAs), involucrados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares. Se ha descrito que los miRNAs pueden regular genes que controlan la biogénesis y la captación de las HDL; así como el transporte reverso del colesterol, el estrés oxidante y la inflamación, lo cual demuestra que los miRNAs regulan eventos celulares vasculares clave a través de sus genes diana, por lo que, desempeñan un rol importante en la fisiopatología de la aterosclerosis. Además, se ha indicado que ciertos medicamentos pueden regular la expresión de los miRNAs, entre ellos, las estatinas y la metformina. Por consiguiente, el propósito del presente trabajo fue determinar la expresión de 6 miRNAs en monocitos y, su participación en la enfermedad arterial coronaria en pacientes mexicanos; así como la expresión de *ABCA1* y *NOS3*, los cuales participan en la formación de la placa aterosclerótica, y que, de acuerdo con investigaciones previas, estos son regulados directa o indirectamente por los miRNAs de estudio. En la población de estudio se incluyeron 110 individuos nacidos en México, quienes fueron captados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, de los cuales 50 fueron controles sanos y 60 presentaban EAC. En el grupo con EAC, la expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-155-5p y *NOS3* fue significativamente menor cuando se comparó con la expresión del grupo control ($p < 0.05$); por el contrario, la expresión de miRNA-21-5p, miRNA-26a-5p, miRNA-221-5p y *ABCA1* fue significativamente mayor en los pacientes con EAC ($p < 0.05$). En el caso de la expresión de miRNA-144-3p ($p = 0.925$), no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos. El aumento de la expresión de miRNA-26a-5p, miRNA-21-5p y miRNA-221-5p, así como la disminución de *NOS3*, se asoció con un mayor riesgo de presentar EAC. Por el contrario, la disminución de miRNA-33a-5p y el aumento de *ABCA1*, se asoció con un menor riesgo. Los resultados también mostraron que la metformina podría tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de miRNA-26a-5p, miRNA-21-5p y miRNA-221-5p; y que, la atorvastatina aumenta la expresión de *ABCA1*. Asimismo, se encontró una

disminución en el eflujo de colesterol de los pacientes que presentaban la enfermedad, lo cual se asoció con un mayor riesgo de presentar EAC. Por lo tanto, los resultados del presente estudio, nos indican que los miRNAs presentes en monocitos también participan en la formación de la placa aterosclerótica, y que, además, el hallazgo adicional sobre la regulación de la metformina sobre los miRNAs, puede dar lugar a nuevas estrategias terapéuticas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son un grupo de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, las cuales, constituyen la principal causa de defunción en México y el resto del mundo (**tabla 1**). De acuerdo con datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el 2015, 17.7 millones de personas murieron a causa de las ECV en todo el mundo, lo que representa el 31% de todas las muertes registradas. De esas defunciones, alrededor de 6,7 millones se debieron a accidentes cerebrovasculares y 7.4 millones a cardiopatías coronarias. Se estima que aproximadamente 23.6 millones de personas morirán por ECV en 2030 y, según las previsiones, seguirán siendo la primera causa de muerte en el mundo (OMS, 2018).

Tabla 1. Clasificación de las enfermedades cardiovasculares (OMS, 2018).

Enfermedad	Sitio de lesión
Cardiopatía coronaria	Vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco
Enfermedades cerebrovasculares	Vasos sanguíneos que irrigan el cerebro
Arteriopatías periféricas	Vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores
Cardiopatía reumática	Músculo cardíaco y válvulas cardíacas
Cardiopatías congénitas	Malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento
Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares	Coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones

En México, las ECV representan una de las principales causas de discapacidad y muerte prematura, por lo tanto, se considera un serio problema de salud pública. En 2012, alrededor de 109 mil personas murieron por alguna enfermedad cardiovascular, en su mayoría en la población adulta mayor de 65 años, principalmente hombres (SSA, 2014).

Los factores de riesgo cardiovascular consisten en hábitos o características biológicas que predicen la probabilidad de que una persona desarrolle una enfermedad cardiovascular. La presencia de un factor de riesgo (FR) no implica necesariamente una relación causa-efecto con la enfermedad, pero conocer e identificar estos factores juega un papel importante en la evaluación del riesgo cardiovascular (Lahoz, *et al.*, 2007). La modificación de los factores de riesgo reduce la morbimortalidad, por lo que es necesario introducir estudios que permitan el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno del grupo de riesgo de enfermedades cardiovasculares (SSA, 2014).

2.2. Factores de riesgo cardiovascular

Los factores de riesgo cardiovascular son divididos en: no modificables (edad, sexo, factores genéticos/historia familiar) o modificables: hipertensión arterial (HTA), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), tabaquismo, hipercolesterolemia y sobrepeso/obesidad (obesidad abdominal o visceral), principalmente asociados con la inactividad física (**tabla 2**). Estos son los factores de riesgo mayores e independientes, los cuales son muy comunes en nuestra población, siendo los que tienen una mayor asociación con las ECV. (Bejarano, *et al.*, 2011; SSA, 2014).

Tabla 2. Clasificación de los factores de riesgo cardiovascular (SSA, 2014).

Factores de riesgo mayores	Edad y sexo Antecedentes personales de enfermedad cardiovascular Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular (familiares 1er grado)	No modificables
	Tabaquismo Hipertensión arterial Diabetes mellitus Dislipidemias	
Factores de riesgo condicionantes	Obesidad Obesidad abdominal Sedentarismo	Modificables

2.3. Enfermedad arterial coronaria y placa aterosclerótica

Una de las enfermedades cardiovasculares más comunes es la enfermedad arterial coronaria (EAC), que ocupa el segundo lugar de mortalidad general en México (Velázquez, *et al.*, 2007). Los cambios estructurales en la anatomía de las arterias coronarias y consecuencias funcionales, juegan un papel sustancial en la patogénesis de la enfermedad (Hernández, *et al.*, 2002).

La causa principal de la EAC es la obstrucción del flujo sanguíneo en las arterias coronarias debido a su estrechamiento provocado por la aterosclerosis (Mirzaei, *et al.*, 2017). Sin embargo, la oclusión de la arteria coronaria provocada por un coagulo, la arteritis o disección coronaria, son otras razones que pueden afectar la circulación coronaria. Sus principales manifestaciones clínicas son: angina miocárdica, infarto agudo de miocardio (IAM), insuficiencia cardíaca y muerte súbita (Lahoz, *et al.*, 2007).

La aterosclerosis es una enfermedad sistémica que afecta simultáneamente a las arterias en diferentes sitios del cuerpo, pero con distinto grado de progresión. Se sitúa en las arterias que perfunden el corazón (coronarias), el cerebro (carótidas, vertebrales y cerebrales) y las extremidades inferiores (iliacas y femorales) (Viles, *et al.*, 2004). Es un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por el engrosamiento de la capa íntima y media arterial, con pérdida de la elasticidad (Lahoz, *et al.*, 2007). La íntima-media arterial está representada por el área de tejido que inicia desde el borde luminal de la arteria y termina en el límite, entre la media y la adventicia (**figura 1**) (Chain, *et al.*, 2005).

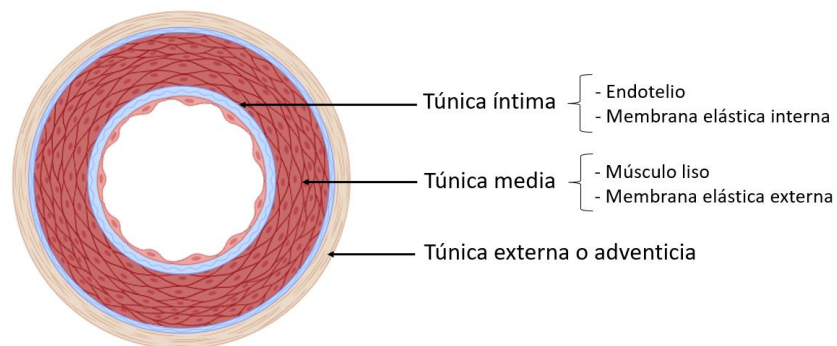


Figura 1. Estructura de una arteria normal.

Una arteria está compuesta por tres capas o túnicas: íntima, media y adventicia. La capa íntima es la más próxima al torrente sanguíneo y, está constituida por un epitelio simple denominado endotelio. La capa media está compuesta principalmente de fibras musculares lisas. La adventicia es la capa más externa y, está conformada por tejido conectivo (Creado con BioRender.com).

El proceso aterosclerótico, influenciado por los factores de riesgo cardiovascular, comienza en la capa íntima de la arteria y afecta gradualmente a las capas arteriales restantes (Aguilar-Shea, *et al.*, 2010). La lesión básica de la aterosclerosis es la placa de ateroma, compuesta fundamentalmente por lípidos [colesterol de lipoproteínas de baja densidad (c-LDL)], tejido fibroso y células inflamatorias (Lahoz, *et al.*, 2007). La génesis del ateroma comienza con un daño al endotelio, producido por factores de riesgo cardiovascular como: hipertensión arterial, dislipidemias, diabetes mellitus y obesidad (Badimón, *et al.*, 2006). Este daño al endotelio genera la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la consecuente disminución de la biodisponibilidad de vasodilatadores como el óxido nítrico (NO), así como el aumento de vasoconstrictores como la angiotensina II (Ang II), proceso conocido como disfunción endotelial (Bryce, *et al.*, 2014), lo que permite la internalización de LDL hacia la capa íntima arterial, donde son retenidas por proteoglicanos de la íntima y favorece su retención, modificación (LDLmod) y posteriormente su oxidación (LDLox) (Abdo, *et al.*, 2017). Las LDLox inducen la expresión y activación de moléculas de adhesión en la superficie endotelial (molécula de adhesión intercelular 1: ICAM-1, molécula de adhesión vascular 1: VCAM-1), así como factores quimioatrayentes (proteína 1 quimioatrayente de monocitos: MCP-1), que facilita la adhesión y migración de monocitos circulantes hacia la capa íntima-media arterial (Badimón, *et al.*, 2006), lo cual constituye un papel crucial en el proceso inicial de aterosclerosis (Pou, *et al.*, 2007). Posteriormente, estos monocitos se transformarán en macrófagos por acción de diversos factores de diferenciación incluido el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) (Carvajal, 2015). Los cambios en las LDL, permiten que estas lipoproteínas sean captadas por los macrófagos mediante endocitosis mediada por los receptores tipo basurero (scavenger) clase A y B, tipo I y II (SR-AI/II y SR-BI/II), y miembros de la familia del receptor de LDL (rLDL), y los transforma en células espumosas (Kumar, *et al.*, 2010) (**figura 2**).

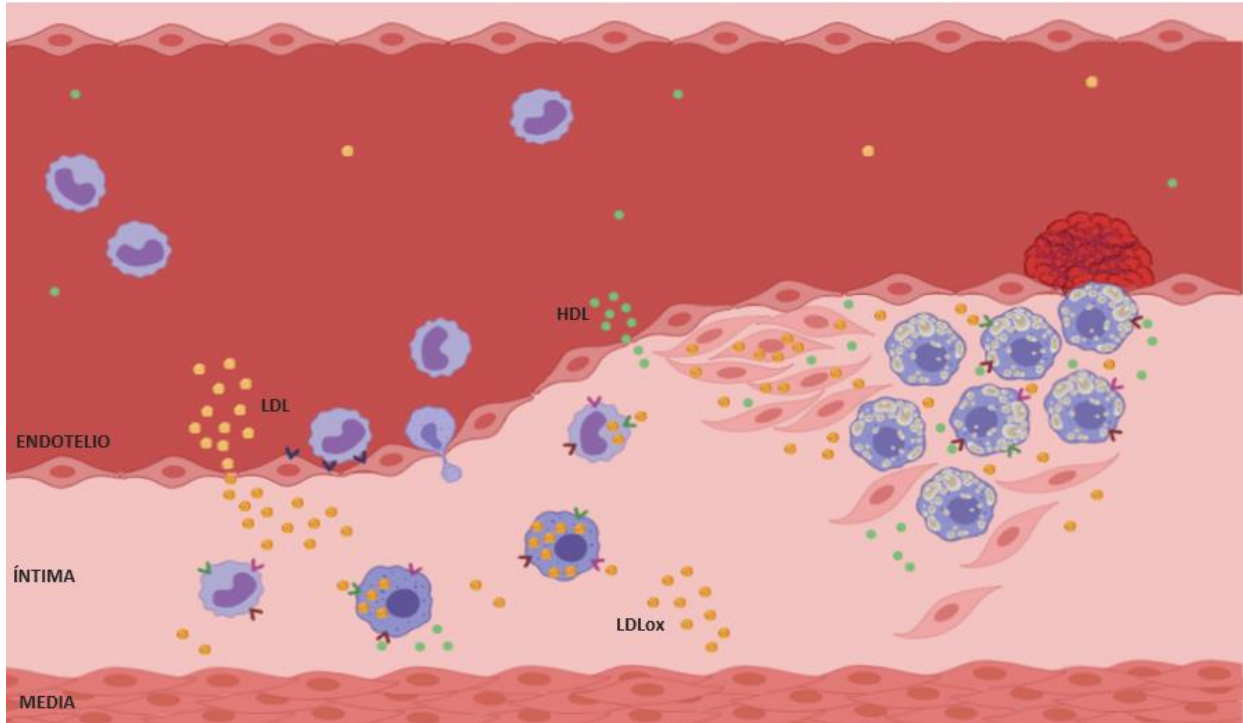


Figura 2. Formación de placa aterosclerótica.

La placa aterosclerótica comienza con un daño al endotelio, trayendo como consecuencia la aparición de moléculas de adhesión en la superficie del endotelio y la internalización de LDL hacia la íntima media arterial. Las moléculas de adhesión atraen monocitos hacia la íntima media donde, junto con los macrófagos y las células musculares lisas vasculares (CMLV), captan LDLs modificadas por agregación a través de endocitosis (Creado con BioRender.com).

2.4. Diagnóstico de EAC

Clínicamente, la EAC se define como una enfermedad que ocasiona síntomas de angina relacionados con estrés o ejercicio, a causa de un estrechamiento $\geq 50\%$ en el tronco común izquierdo, o $\geq 70\%$ en una o varias de las arterias importantes (coronaria derecha, descendente anterior y arteria circunfleja) (Montalescot, *et al.*, 2013). Por lo cual, la evaluación de los pacientes con riesgo de presentar EAC, requiere con frecuencia técnicas de imagen no invasivas, pruebas de esfuerzo, y pruebas bioquímicas estándar de laboratorio para el diagnóstico, estratificación del riesgo y planeación del tratamiento.

El diagnóstico no invasivo se basa en la detección de isquemia miocárdica en pacientes con placas ateroscleróticas que reducen el flujo sanguíneo en las arterias coronarias (Vallejo, *et al.*, 2009). Entre las pruebas no invasivas, se realiza una prueba de esfuerzo que permite evaluar la función cardíaca sometida a estrés, durante el cual, se monitoriza la presión arterial y se registra el patrón electrocardiográfico para determinar la frecuencia cardíaca y detectar cambios miocárdicos compatibles con isquemia (Grossman, *et al.*, 2014). Las pruebas de imagen comprenden el electrocardiograma, ecocardiograma y coronariografía. Las pruebas de sangre incluyen la cuantificación de lípidos (colesterol total, lipoproteínas de baja y alta densidad, y triglicéridos), glucosa, creatinina, proteína C reactiva, hematocrito y pruebas de función tiroidea (Montalescot, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la medición del grosor de la íntima-media carotídea (GIMc) permite identificar pacientes con aterosclerosis subclínica o riesgo de padecer alguna enfermedad cardiovascular. Es un método no invasivo en el que se mide la pared de la arteria carótida mediante el uso de un ultrasonido en modo bidimensional (Aguilar-Shea, *et al.*, 2010). La medición se realiza en tres zonas de la carótida: carótida común, carótida interna y seno carotídeo o bulbo (Stein, *et al.*, 2008). Los valores del GIMc varían según la edad, sexo y raza; se requiere una comparación con una población de referencia para determinar la normalidad o anormalidad de los datos obtenidos. Los valores de GIMc por encima del percentil 75 de la población de referencia se consideran patológicos, lo que indica que el individuo presenta aterosclerosis subclínica avanzada (Stein, *et al.*, 2008).

2.5. Tratamiento farmacológico de la EAC

Los fármacos recomendados para la prevención primaria de la EAC dependen de la enfermedad asociada. En pacientes con diabetes mellitus tipo 2, enfermedad metabólica que se caracteriza por una hiperglucemia (≥ 126 mg/dL) crónica causada por la incapacidad para utilizar eficazmente la insulina, se administran hipoglucemiantes orales (principalmente metformina o glibenclamida) o insulina (Kerner, *et al.*, 2014). En pacientes con hipertensión arterial, enfermedad crónica caracterizada por un aumento persistente de la presión en las arterias ($\geq 140/90$ mmHg), se recomienda el uso de beta-bloqueadores, calcioantagonistas, inhibidores de la enzima convertidora

de angiotensina (IECA) o antagonistas del receptor de angiotensina (ARA-II) (Kumar, *et al.*, 2010). Para el tratamiento de la dislipidemia, alteración de la concentración plasmática de los lípidos (colesterol total \geq 200 mg/dL, c-LDL \geq 130 mg/dL, c-HDL \leq 40 mg/dL y triglicéridos \geq 200 mg/dL) (NCEP, 2001), los fármacos de elección son las estatinas y/o fibratos (Hunter, *et al.*, 2017).

La guía de práctica clínica de la EAC estable, publicada por la Sociedad Europea de Cardiología (ESC) (Montalescot, *et al.*, 2013) indica que, el tratamiento óptimo para pacientes con EAC incluye por lo menos un medicamento para tratar los síntomas de la angina/ isquemia, además de un tratamiento coadyuvante para evitar eventos cardiovasculares. El tratamiento de primera línea para aliviar los síntomas y controlar la frecuencia cardíaca incluye nitratos de acción corta, bloqueadores de los canales de calcio y beta-bloqueadores, estos últimos son de primera elección para pacientes con hipertensión arterial (Mendoza-González, *et al.*, 2008). En el tratamiento de segunda línea, se deben incluir nitratos de acción prolongada, ivabradina, nicorandil, ranolazina, o trimetazidina, según la frecuencia cardíaca, presión arterial y tolerancia del paciente.

Los pilares del tratamiento médico en la prevención de eventos cardiovasculares son el ácido acetilsalicílico y las estatinas. El primero tiene como función, reducir la agregación plaquetaria y prevenir la formación de trombos. Por otra parte, en todos los pacientes se debe considerar el tratamiento con estatinas, independientemente de las cifras de c-LDL. Estos fármacos reducen los niveles de colesterol sérico, así como el contenido lipídico de la placa (Almeida, *et al.*, 2019). Sin embargo, también se conoce que estos medicamentos tienen un efecto antioxidante y antiinflamatorio (Wang, *et al.*, 2021; Vavlukis, *et al.*, 2022). Finalmente, si el paciente tiene hipertensión, diabetes o una función sistólica del ventrículo izquierdo inferior al 40%, se debe considerar la administración de un IECA o ARA-II. Sin embargo, cuando el tratamiento farmacológico no da resultados y la enfermedad progresa, es necesario someterse a un tratamiento quirúrgico.

2.6. Tratamiento quirúrgico de la EAC

2.6.1. Cirugía de revascularización coronaria

La cirugía de revascularización coronaria está indicada en el tratamiento del paciente con EAC, principalmente con enfermedad de tronco coronario izquierdo (estenosis $\geq 50\%$); enfermedad de tres vasos; y enfermedad de uno o dos vasos con compromiso proximal de la arteria descendente anterior. El objetivo del procedimiento es revascularizar y restablecer el flujo sanguíneo a un área del miocardio que actualmente recibe un flujo mínimo o nulo, así como prevenir una mayor lesión muscular o la muerte. Durante el procedimiento, se extrae un vaso sanguíneo del cuerpo del individuo, generalmente una arteria mamaria interna o una vena safena, para injertarlo en la arteria afectada. Un extremo del injerto se sutura a la aorta, y el otro extremo se sutura a la arteria coronaria afectada, por debajo de la obstrucción, lo que crea así un atajo o bypass (Al-Atassi, 2016).

2.6.2. Intervención coronaria percutánea

La intervención coronaria percutánea (ICP) se refiere a una familia de procedimientos mínimamente invasivos para abrir las arterias coronarias. Este tratamiento restablece el flujo sanguíneo y alivia los síntomas de las arterias obstruidas, eliminando el dolor en el pecho y la dificultad para respirar. En una ICP, el médico llega a un vaso bloqueado haciendo una pequeña incisión en la muñeca o en la parte superior de la pierna para poder pasar un catéter (un tubo delgado y flexible) a través de una arteria que conduce al corazón. El médico emplea imágenes de rayos X del corazón como guía para localizar el área bloqueada, posteriormente utilizan las técnicas ICP más apropiada para abrir el vaso. Existen diversos procedimientos:

Angioplastia con balón. Este es el procedimiento ICP básico. Un catéter con un diminuto globo doblado en la punta se introduce a través de un vaso sanguíneo hasta que llega al sitio donde la acumulación de placa está provocando la obstrucción. En ese momento, el globo se infla para comprimir la placa contra las paredes de la arteria. Esto ensancha el pasaje, restaurando el flujo de sangre al corazón. Finalmente, el globo se desinfla y se retira.

Angioplastia con stent. Generalmente, como parte del tratamiento con globo, colocan un stent (un tubo de malla diminuto) en el área del problema para mantener abierta la arteria después de retirar el globo. Se hace avanzar un pequeño alambre a través del bloqueo, para posteriormente introducir un catéter con globo cubierto con un stent sobre dicho alambre hasta el sitio del bloqueo. El inflado del globo expande el stent, y una vez que la placa se comprime contra la pared de la arteria y el stent está en su lugar, el globo se desinfla y se retira. La mayoría de los stent cuentan con recubrimientos que liberan lentamente medicamentos especiales, los cuales previenen el crecimiento de tejido cicatricial en la arteria, asegurando aún más un buen flujo sanguíneo y reduciendo la necesidad de un tratamiento futuro.

Aterectomía rotacional. En el caso de los pacientes que presentan obstrucciones particularmente difíciles, se utiliza una herramienta especial basada en un catéter para perforar los depósitos de placa calcificada.

ICP compatible con Impella. Para los pacientes con alto riesgo de complicaciones o con enfermedades cardíacas graves, se puede insertar temporalmente un pequeño dispositivo llamado bomba cardíaca Impella a través de la piel y dentro del corazón, para ayudar a su función de bombeo durante el procedimiento. Esto asegura que se mantenga el flujo de sangre a los órganos críticos.

2.7. Receptores involucrados en aterosclerosis

En los tres tipos celulares que participan dinámicamente en el desarrollo y progreso de la lesión celular: endotelio, monocito-macrófago y las células musculares lisas, existen receptores que captan lípidos o sus derivados, los cuales contribuyen a la formación de la placa aterosclerótica. Entre estos receptores se encuentran los receptores basurero “scavenger” (CD36 y SR-BI/II, SR-AI/II), la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y los miembros de la familia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (rLDL), que actúan como traductores de señales intracelular, por lo que desempeñan un papel importante en el transporte del colesterol celular (Moore, *et al.*, 2006). Además, existe otro receptor denominado transportador de membrana dependiente de ATP A1 (ABCA1) que, por el contrario, transporta el

exceso de colesterol proveniente de células periféricas, evitando así, la acumulación de lípidos en la capa íntima-media de la arteria y con ello, la formación de la placa aterosclerótica (Frikke-Schmidt, 2010).

2.8. Transportador de membrana dependiente de ATP A1 (ABCA1)

Los transportadores ABC son una familia de proteínas integrales de membrana que emplean la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para transportar diversas moléculas a través de la bicapa lipídica de la membrana celular, incluidos lípidos, aminoácidos, azúcares, ácidos biliares, xenobióticos, iones de metales pesados y conjugados, ácidos inorgánicos y péptidos para la presentación de antígenos (Phillips, 2018). Hasta la fecha, se han identificado 49 subtipos de transportadores ABC, los cuales se dividen en 7 subfamilias (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCG) en función de su estructura genética, secuencia de aminoácidos, organización del dominio, y análisis filogenético (Dean, *et al.* 2001).

La subfamilia ABCA incluye 12 miembros, los cuales, en su mayoría, se encargan de transportar lípidos o compuestos relacionados con los lípidos (Liu, 2019). Una de estas proteínas es ABCA1, ampliamente expresada en diversos tejidos: monocitos, macrófagos, células endoteliales, hepatocitos, células musculares, enterocitos y plaquetas, entre otros (Jacobo-Albavera, *et al.*, 2021). ABCA1 es una proteína de 220 kD codificada por un gen que contiene 50 exones ubicados en el cromosoma 9q31 (Voloshyna, *et al.*, 2011). Su estructura consta de 2261 aminoácidos y está compuesta por dos dominios transmembranales (DTM), dos dominios de unión a ATP (NBD, “Nucleotide Binding Domain”) y dos dominios extracelulares grandes (ECD1 y ECD2) (**figura 3**), los cuales contienen dos enlaces disulfuro intramoleculares, necesarios para la unión con la apolipoproteína A-I (ApoA-I) y la formación de las HDL (Wang, *et al.*, 2014). Cada DTM contiene seis hélices que atraviesan varias veces la membrana y su unión forma un canal que transloca al sustrato a través de la membrana; esta región determina la especificidad por el sustrato, ya que es la más divergente. Cada NBD tiene dos motivos consenso designados como Walker A y Walker B; el primero permite la unión del ATP y el segundo proporciona el residuo carboxilato que coordina y estabiliza el Mg^{2+} , cofactor en la hidrólisis del ATP (Moody, *et al.*, 2002; Hollenstein, *et al.*, 2007).

ABCA1 es una proteína clave en la homeostasis del colesterol. Este transportador está presente abundantemente en macrófagos, donde su expresión se encuentra estrictamente controlada por los niveles de colesterol intracelular (Voloshyna, *et al.*, 2011). Una de sus principales funciones antiaterogénicas es transportar colesterol y fosfolípidos celulares a apolipoproteínas pobres en lípidos, como la ApoA-I, a través del transporte reverso del colesterol, para formar partículas de HDL y proporcionar a las células un medio eficaz para eliminar el exceso de colesterol (Liu, *et al.*, 2012). Sin embargo, ABCA1 también ejerce funciones anti-inflamatorias a través de la activación de moléculas de señalización. En los macrófagos, la interacción de ABCA1 con la ApoA-I activa a la vía de señalización Janus quinasa 2/transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK2/STAT3), lo cual inhibe la producción de citoquinas inflamatorias como la interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Tang, *et al.*, 2009).

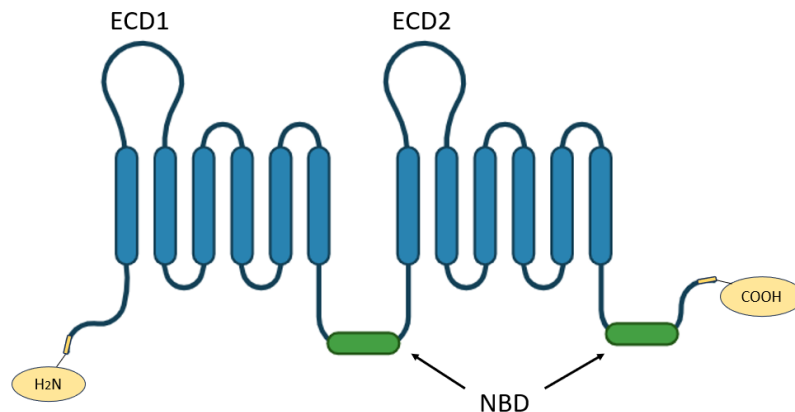


Figura 3. Estructura de ABCA1.

ABCA1 consta de dos dominios transmembranales hidrofóbicos (DTM), dos dominios de unión a nucleótidos intracelulares (NBD) y dos dominios extracelulares grandes (ECD1 y ECD2). Cada DTM contiene de 6 hélices que atraviesan la membrana y proporcionan la especificidad para el sustrato (Creado en BioRender.com).

2.9. Transporte reverso del colesterol

El transporte reverso de colesterol (TRC) es el proceso fisiológico mediante el cual, las HDL transportan el colesterol excedente de los tejidos periféricos hacia el hígado, donde es redistribuido a otros tejidos o eliminado del cuerpo por medio de la bilis (Marques, *et al.*, 2018). Este transporte contrarresta los eventos patológicos que conducen a la formación y desarrollo de la placa aterosclerótica. El TRC inicia con la síntesis de ApoA-I tanto en el hígado como en el intestino (Canfrán-Duque, *et al.*, 2014). En seguida, la ApoA-I libre de lípidos interactúa con el transportador de membrana ABCA1 para adquirir fosfolípidos y colesterol, a lo que se le denomina como eflujo de colesterol. La ApoA-I pobre en lípidos se convierte gradualmente en partículas discoidales de HDL (HDL nacientes o pre- β 1) enriquecidas en colesterol libre no esterificado, el cual, es esterificado por acción de la enzima lecitina/colesterol aciltransferasa (LCAT) para convertir a las partículas HDL discoidales en esféricas (HDL3 o madura) (Tsompanidi, *et al.*, 2010) (**figura 4**). Esta HDL madura puede seguir adquiriendo colesterol proveniente de los tejidos periféricos a través del transportador de membrana ABCG1, así como del receptor SR-B1 para formar HDL de mayor densidad (HDL2) (Talbot, *et al.*, 2018).

Posteriormente, existen dos formas para transportar el colesterol al hígado: directa e indirecta. En la primera, las moléculas de HDL maduras interactúan con SR-B1 en el hígado, lo que permite la transferencia de su contenido de colesterol. La molécula de HDL resultante puede reanudar la circulación y repetir el proceso de TRC. Por otra parte, de manera indirecta, las moléculas maduras de HDL transfieren el colesterol a las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B (ApoB), especialmente a las LDL, a cambio de moléculas de triacilglicerol. Este proceso es catalizado por la proteína transportadora de ésteres de colesterol (CETP). Por lo tanto, estas lipoproteínas pueden asociarse con sus receptores hepáticos y administrar su contenido de colesterol (Marques, *et al.*, 2018).

La capacidad de eflujo de colesterol por parte de las HDL a través de ABCA1 es considerada como una de las propiedades más importantes de estas lipoproteínas desde un punto antiaterogénico. Estudios recientes han identificado a los microRNAs (miRNAs), pequeños RNA no codificantes, como reguladores críticos en la homeostasis lipídica, ya que regulan genes implicados en el metabolismo del colesterol celular, entre ellos a ABCA1. Por lo que, algunos de

estos miRNAs participan también en la regulación del eflujo de colesterol y, por ende, en el TRC (Yang, *et al.*, 2015; Aryal, *et al.*, 2017).

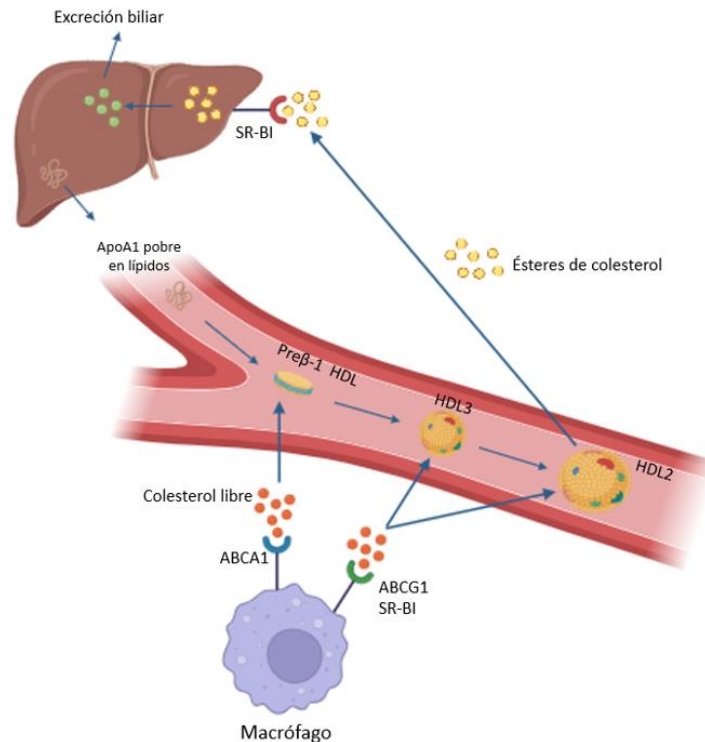


Figura 4. Transporte reverso del colesterol

La ApoA-I pobre en lípidos es secretada por el hígado e intestino; interactúa con el transportador de membrana ABCA1 adquiriendo colesterol libre y fosfolípidos para formar pequeñas HDL pre-β discoidales enriquecidas con colesterol libre, el cual es esterificado por la enzima LCAT convirtiendo a las HDL en esféricas (HDL3). Las HDL3 siguen adquiriendo colesterol de los tejidos periféricos mediante ABCG1 y SR-B1 formando HDL más densas (HDL2). Posteriormente, las HDL son transportadas hacia el hígado, donde el colesterol es redistribuido a otros tejidos o eliminado del cuerpo por medio de la bilis (Creada con BioRender.com).

2.10. Óxido nítrico sintasa endotelial (NOS3)

Otra molécula asociada con la fisiopatología de la aterosclerosis es el óxido nítrico (NO), un gas pequeño y soluble con propiedades vasodilatadoras, anti-inflamatorias y antioxidantes que desempeña un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular (Cyr, *et al.*, 2020). El NO es producido por tres isoformas diferentes de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS):

neuronal (nNOS o NOS1), inducible (iNOS o NOS2) y endotelial (eNOS o NOS3), de las cuales, NOS3 es la isoforma más importante para su síntesis en el sistema cardiovascular (Förstermann, *et al.*, 2012; Tenopoulou, *et al.*, 2020).

El gen *NOS3* está ubicado en el cromosoma 7q35-36 y consta de 26 exones que abarcan 21kb (Wu, *et al.*, 2021). Su estructura (**figura 5**) consta de un dominio reductasa C-terminal, que contiene sitios de unión para la coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), el mononucleótido de flavina (FMN) y el dinucleótido de flavina adenina (FAD); así como un dominio oxidasa N-terminal, que contiene sitios de unión para el grupo hemo, zinc, tetrahydrobiopterina (BH4) y L-arginina. Ambos dominios se encuentran unidos por una secuencia de unión a calmodulina. Además de la estructura catalítica, NOS3 forma homodímeros, lo cual es esencial para su actividad enzimática (Oliveira-Paula, *et al.*, 2016).

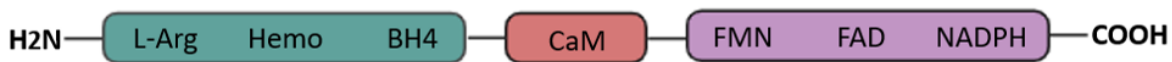


Figura 5. Estructura de NOS3

La estructura de *NOS3* consta de un dominio reductasa C-terminal (COOH): coenzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), mononucleótido de flavina (FMN) y dinucleótido de flavina adenina (FAD); así como un dominio oxidasa N-terminal (NH₂): sitios de unión para hemo, zinc, tetrahydrobiopterina (BH4) y L-arginina. Ambos dominios se encuentran unidos por una secuencia de unión a calmodulina (CaM) (Creada con BioRender.com).

NOS3 cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina en las células endoteliales y, en consecuencia, se produce NO a partir del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino de la arginina (Desjardins, *et al.*, 2006). Posteriormente, el NO se difunde a las células del músculo liso vascular (MLV) donde activa a la enzima guanilato ciclasa (GC), quién cataliza la conversión de guanosín trifosfato cíclico (GTPc) a guanosín monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc activa la proteína cinasa G (PKG) que fosforila al receptor inositol trifosfato (IP3R); esto reduce la concentración de Ca²⁺ citosólico libre, generando una relajación del MLV y vasodilatación (**figura 6**) (Rivero-Vilches, *et al.*, 2001; Benavides Trujillo, *et al.*, 2008).

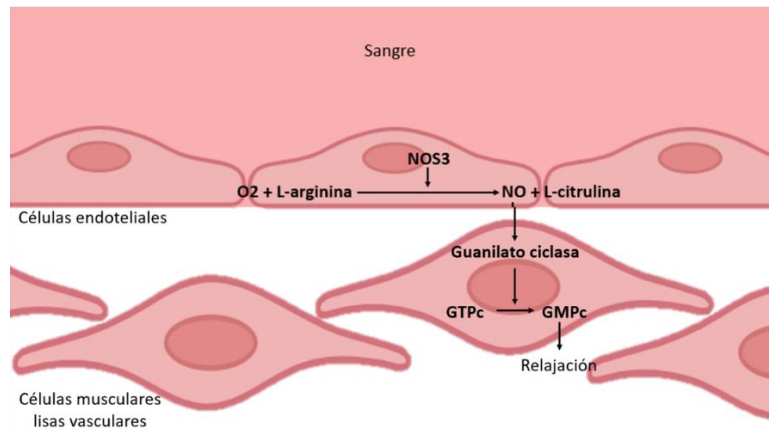


Figura 6. Síntesis de NO

La enzima NOS3 sintetiza NO a partir de la L-arginina y oxígeno. El NO activa al guanilato ciclasa en las células del músculo liso vascular (MLV) para producir GMPc a partir de GTPc, induciendo la relajación de los vasos sanguíneos (Creado con BioRender.com).

La pérdida en biodisponibilidad de NO conlleva a una disfunción endotelial que precede al desarrollo de aterosclerosis, por lo que, su disminución es un predictor independiente de riesgo cardiovascular (Alp, *et al.*, 2004). Varios factores contribuyen a la disminución del NO. El aumento de las ROS observado en la enfermedad vascular produce una mayor degradación de NO, ya que este reacciona con el anión superóxido (O_2^-) y genera peroxinitritos ($ONOO^-$). Además, las LDLox estimulan a la NADPH oxidasa, la cual oxida al cofactor BH₄ y convierte a NOS3 en una enzima generadora de ROS al catalizar la reducción desacoplada de O₂, produciendo O_2^- y disminuyendo la biodisponibilidad de NO (Chen, *et al.*, 2018).

Por otra parte, se ha identificado que los monocitos también expresan NOS3 (Mühl, *et al.*, 2003), lo cual contribuye a las propiedades proinflamatorias del NO. Los monocitos inducen la producción de TNF α en respuesta a lipopolisacáridos, quien activa a la proteína quinasa B (PKB), aumenta la actividad de NOS3 y con ello la producción de NO, el cual a su vez puede generar $ONOO^-$ al reaccionar con el anión O_2^- . Posteriormente, los peroxinitritos activan al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-kB), quien aumenta la liberación de TNF α , y activa una cascada de citocinas proinflamatorias (Mühl, *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se ha indicado que la expresión de NOS3 y la liberación de NO pueden regularse a través de la regulación postranscripcional del gen que codifica a NOS3, mediada por miRNAs.

2.11. miRNAs

Los miRNAs son pequeños ácidos ribonucleicos (RNA) no codificantes de cadena sencilla de aproximadamente 19 a 23 nucleótidos en su forma madura, los cuales son capaces de regular la expresión de múltiples especies de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) (Pirola, *et al.*, 2015). Se encuentran en exones e intrones de RNA no codificante, sin embargo, también pueden estar presentes en intrones de RNAm codificante, lo cual indica que algunos miRNAs pueden derivar de transcritos de intrones de pre-RNAm (Vázquez-Ortiz, *et al.*, 2006). Los miRNAs se unen generalmente a la región 3' no traducible (3'-UTR) de RNAm específicos de acuerdo con la complementariedad de sus secuencias, lo que puede promover la inhibición de su traducción o la degradación del RNAm (Ono, 2016).

El primer miRNA descrito fue lin-4 en *Caenorhabditis elegans* (Lee, *et al.*, 1993). A partir de entonces, se ha identificado una gran cantidad de miRNAs en el genoma de varias especies, incluidos los humanos, y el número continúa creciendo debido a los esfuerzos conjuntos de la biología molecular y la predicción bioinformática (Lugo-Trampe, *et al.*, 2009). Se sabe que más del 60% de los genes humanos que codifican para proteínas son regulados por miRNAs, y hasta el momento se han identificado aproximadamente 2500 miRNAs en humanos (Ono, 2016).

La mayoría de los miRNAs son generados a partir de un transcrito primario largo en un proceso secuencial dirigido por Drosha y Dicer, en la llamada vía canónica de generación de miRNAs (Pabón-Martínez, 2011) (**figura 7**). El miRNA es transcrito inicialmente en el núcleo como miRNA primario (pri-miRNA) por la RNA Polimerasa II (Pol II), a partir de un precursor largo de RNA (Lugo-Trampe, *et al.*, 2009). El pri-miRNA tiene usualmente varias kilobases de longitud y contiene estructuras en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle (stem-loop) (Lee, *et al.*, 2003). Posteriormente, el pri-miRNA es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 para formar un miRNA pre-maduro (pre-miRNA) de aproximadamente 70 nucleótidos (Lee, *et al.*, 2002). El pre-miRNA es transportado al citoplasma por la exportina-5, un receptor de transporte nuclear, donde es procesado por la ribonucleasa llamada Dicer para formar un dúplex de miRNA

maduro de aproximadamente 18 a 25 nucleótidos de largo (Kim, *et al.*, 2005; Ono, 2016). Los miRNAs maduros se incorporan al complejo silenciador inducido por RNA (RISC). El miRNA dúplex se separa, una cadena (3p, sentido) se degrada y la otra cadena (5p, antisentido) se incorpora a RISC. Este último funge como una "guía" para identificar a los RNAm blanco para que RISC pueda actuar sobre ellos postranscripcionalmente, ya sea inhibiendo la síntesis de proteínas o degradando al RNAm a través de un proceso de deadenilación (Lugo-Trampe, *et al.*, 2009; Ono, 2016). Sin embargo, reportes recientes han indicado que ambas cadenas pueden coexistir y ser funcionales (Choo, *et al.*, 2014).

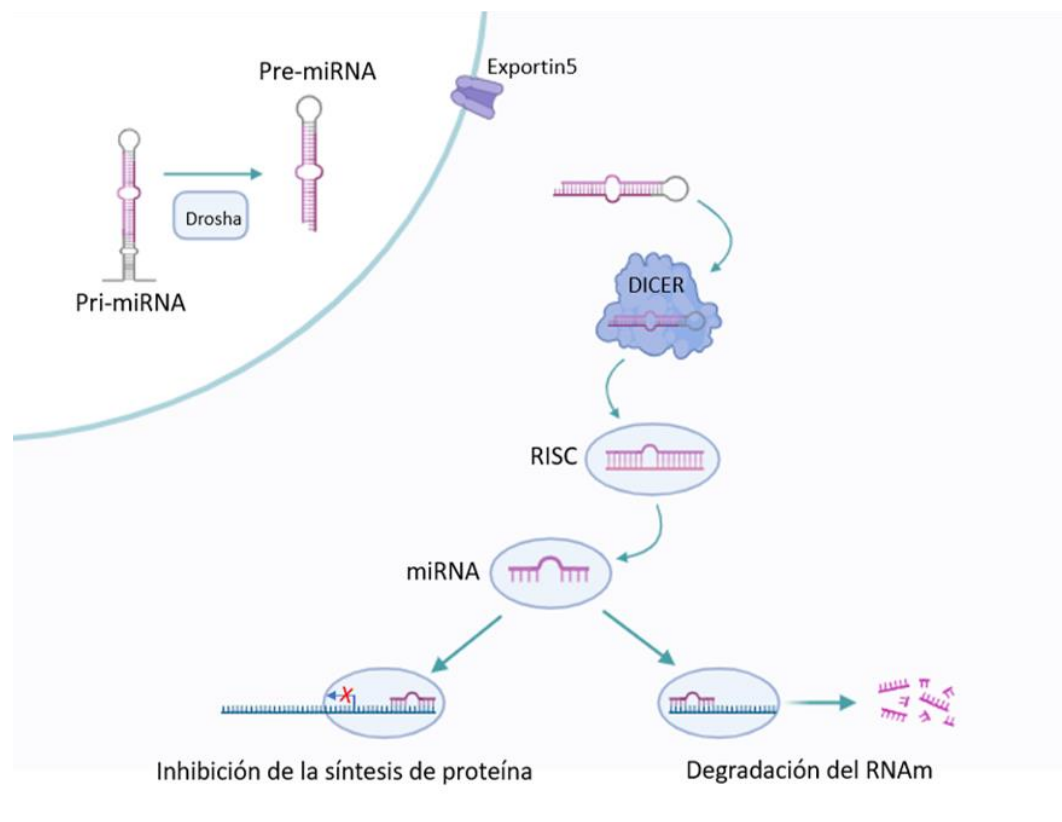


Figura 7. Biosíntesis de miRNAs.

El miRNA se transcribe inicialmente en el núcleo como pri-miRNA por medio de Pol II. Posteriormente es procesado por el complejo Droscha/Pasha para formar un pre-miRNA, el cual es transportado al citoplasma por exportina-5 y procesado por Dicer para formar un dúplex maduro. El miRNA maduro es incorporado a RISC, donde una de las cadenas es degradada y la otra es incorporada satisfactoriamente a RISC para identificar al RNAm blanco y actuar sobre él de manera post-transcripcional, ya sea inhibiendo la síntesis de la proteína o degradando al RNAm (Creado con BioRender.com).

La expresión de los miRNAs se puede ver afectada por diversos factores, entre ellos el consumo de ciertos fármacos, componentes dietéticos o metabolitos derivados de la dieta, contaminantes y otros xenobióticos. Por ejemplo, algunos agentes naturales como ácido fólico, vitamina E, curcumina, isoflavona, indol-3-carbinol y resveratrol, pueden modificar la expresión de ciertos miRNAs en células humanas, lo cual, conduce a una serie de cambios biológicos y patológicos (Koturbash, *et al.*, 2015). Por otra parte, se sabe que la expresión de los miRNAs también puede ser afectada por la administración de ciertos fármacos, entre ellos: estatinas, dexametasona, vinblastina, fluoxetina y enoxacina, ya sea al aumentar o disminuir su expresión (He, *et al.*, 2014; Mohajeri, *et al.*, 2018).

Los miRNAs desempeñan funciones importantes en la regulación de diversos procesos biológicos, incluidos, la embriogénesis, proliferación celular, crecimiento y diferenciación celular, apoptosis y tumorigénesis (Hata, *et al.*, 2013). Además de su presencia en diversos tejidos, existe una gran cantidad de miRNAs en diversos fluidos corporales, como por ejemplo, sangre, suero, plasma, orina, semen y leche materna (Weber, *et al.*, 2010), los cuales son altamente resistentes a las condiciones extremas, tales como degradación por actividad ribonucleasa, valores de pH extremos, altas temperaturas, ciclos repetidos de congelación-descongelación y almacenamiento prolongado (Mitchell, *et al.*, 2008), por lo que se han considerado como posibles biomarcadores pronóstico de diferentes patologías (Dumortier, *et al.*, 2013).

Estudios recientes han comprobado que los miRNAs circulantes pueden ser transportados en el medio extracelular asociados con lipoproteínas, principalmente HDL; así como a vesículas membranosas, incluidos exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos (Viereck, *et al.*, 2017; De Gonzálo-Calvo, *et al.*, 2017). Lo cual plantea la posibilidad de que puedan llevarlos a células receptoras, donde su captación parece ser dependiente del receptor SR-BI, alterando así su expresión génica (Chen, *et al.*, 2012). De esta manera los miRNAs desempeñan un papel crucial en la función celular y de órganos a través de la regulación de la expresión génica, así como mensajero para la comunicación célula-célula y diafonía (en inglés “crosstalk”) entre los órganos (Seneshaw, *et al.*, 2016).

2.12. miRNAs en enfermedades cardiovasculares

Los miRNAs desempeñan un papel importante en la fisiopatología cardiovascular y su expresión se encuentra alterada en diversas ECV, por lo tanto, el papel biológico de los miRNAs se convirtió en un campo de investigación de rápida evolución en estas enfermedades (Oliveira-Carvalho, *et al.*, 2012). Numerosos estudios han descrito cambios en la función y expresión de miRNAs en corazones humanos y tejidos vasculares enfermos (Van Rooij, *et al.*, 2012). Además, estudios de ganancia y pérdida de función han descubierto papeles prominentes para los miRNAs en trastornos cardiovasculares, tales como, hipertensión esencial, infarto agudo al miocardio, accidente cerebrovascular, hipertrofia cardíaca, síndrome coronario agudo, insuficiencia cardíaca, angiogénesis, estenosis vascular y fibrosis (Ono, 2016; Van Rooij, *et al.*, 2012).

Entre los miRNAs descritos en el sistema cardiovascular se encuentran el miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miRNA-26a-5p, los cuales regulan la expresión del gen de *ABCA1*, por lo que, participan en la biogénesis y el eflujo de colesterol celular (Rotllan, *et al.*, 2012; Li, *et al.*, 2015; Dlouhá, *et al.*, 2017). miRNA-33a está localizado en el intrón 16 del gen *SREBP2* en el cromosoma 22 (Chen, *et al.*, 2012); regula genes involucrados en el metabolismo de colesterol y oxidación de ácidos grasos. Su inhibición en modelos murinos resulta en un aumento de eflujo de colesterol a ApoA-I, lo cual incrementa los niveles de HDL en suero y produce la disminución de colesterol en los tejidos periféricos, especialmente en macrófagos y placas ateroscleróticas (Novák, *et al.*, 2015). El gen del miRNA-144 está ubicado en el cromosoma 17q11.2 (Zhou, *et al.*, 2020). Este miRNA participa en diversos procesos biológicos, incluidos proliferación, apoptosis, migración, ciclo celular y angiogénesis. También desempeña un rol esencial en la homeostasis del colesterol y regulación de la inflamación, ya que, de acuerdo con estudios *in vivo* e *in vitro*, su sobreexpresión en modelos murinos tiene como consecuencia una inhibición en el eflujo de colesterol, así como un aumento en la expresión de factores inflamatorios en la línea celular monocítica de leucemia humana THP-1 (Hu, *et al.*, 2014).

Los miembros de la familia del miRNA-26 están integrados dentro de los intrones de los genes que codifican a las proteínas del dominio carboxilo-terminal del polipéptido de la RNA polimerasa II, una familia de fosfatasa pequeña (CTDSP). miRNA-26a es generado a partir de 2 loci distintos: miRNA-26a-1 ubicado en el intrón del gen *CTDSPL* en el cromosoma 3p21.3 y miR-26a-2 ubicado en el intrón del gen *CTDSP2* en el cromosoma 12q14.1 (Li, *et al.*, 2021). miR-

26 desempeña diversas funciones en la regulación de aspectos clave del crecimiento, desarrollo y activación celular. Estudios recientes en diferentes tipos de celulares, incluidas las células del músculo liso vascular, células endoteliales, fibroblastos cardíacos y cardiomiocitos, sugieren que este miRNA podría tener implicaciones importantes en mecanismos de reparación vascular (Icli, *et al.*, 2014). En un estudio *in vitro* en células embrionarias de riñón humano se encontró que la sobreexpresión de miR-26a inhibe la expresión de *ABCA1*, lo que resulta en una reducción del eflujo de colesterol (Sun, *et al.*, 2012).

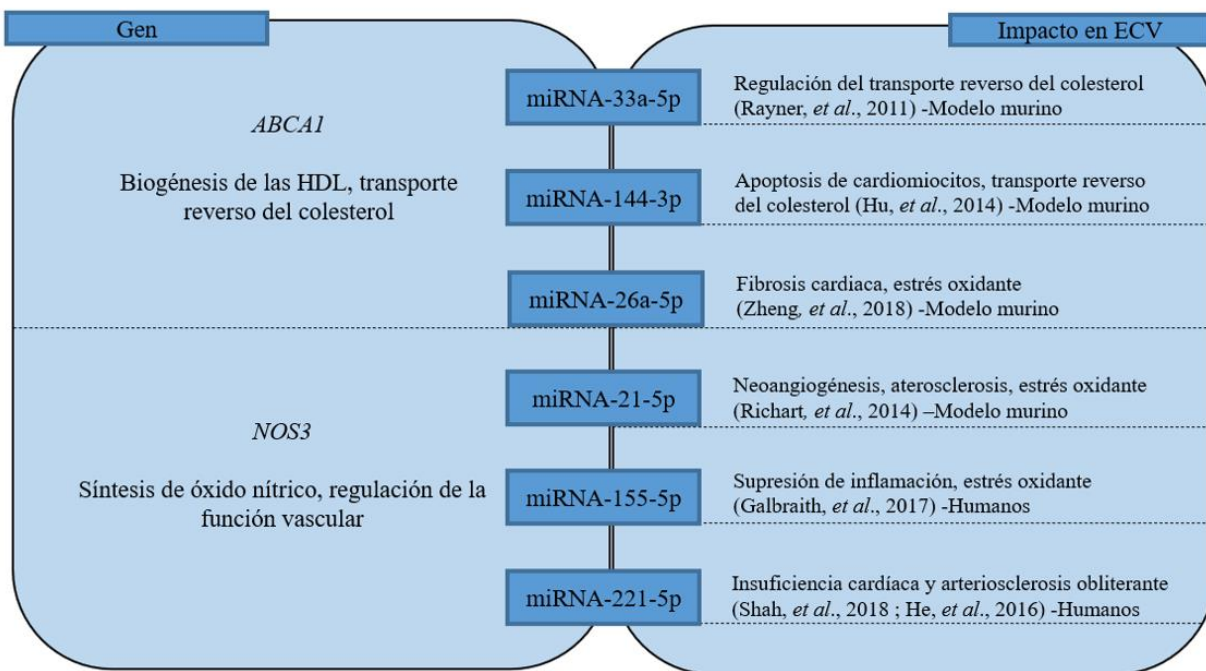
Asimismo, han sido identificados miRNAs asociados con procesos de estrés oxidante, tales como miRNA-155, miRNA-21 y miR-221, que, de acuerdo con estudios anteriores, se ha descrito que tienen una correlación negativa con *NOS3* (Zhu, *et al.*, 2011; Cengiz, *et al.*, 2015; Peñaloza, *et al.*, 2020). miRNA-155 está codificado por el gen huésped *MIR155* (*MIR155HG*) (Wu, *et al.*, 2017). Se encuentra altamente expresado en células B y T activadas, así como en monocitos/macrófagos. miR-155-5p desempeña un papel fundamental en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, incluidos la diferenciación del linaje hematopoyético, la inmunidad, inflamación, y en las enfermedades cardiovasculares (Elton, *et al.*, 2013). En un estudio previo, se encontró una disminución de la expresión de miR-155-5p en leucocitos de pacientes con EAC, así que, su desregulación podría estar participando en el proceso aterosclerótico (Sanliarp, *et al.*, 2020). Por otra parte, miR-21 está ubicado en el cromosoma 17q23.2, en una región intergénica con el extremo 3'UTR del gen que codifica para la proteína transmembrana 49 (*TMEM 49*) (Surina, *et al.*, 2021). Estudios han revelado que su expresión se encuentra desregulada en el corazón y en la vasculatura en condiciones de enfermedad cardiovascular, tales como enfermedad vascular proliferativa, hipertrofia cardíaca, insuficiencia cardíaca y enfermedad cardíaca isquémica. Además, desempeña funciones importantes en la proliferación y apoptosis de las células del músculo liso vascular y células cardíacas (Dai, *et al.*, 2020).

miRNA-221 está localizado en el cromosoma Xp11.3 (Ravegnini, *et al.*, 2019); sin embargo, no hay reportes previos que indiquen que existe una mayor expresión de este miRNA en mujeres. Se ha descrito que la cadena 3p de este miRNA regula diferentes procesos vasculares como la angiogénesis y envejecimiento vascular. Además, está involucrada en una variedad de mecanismos patológicos relacionados con los vasos, que incluyen la angiogénesis tumoral, inflamación aterosclerótica, remodelación vascular, fibrosis, calcificación vascular y disfunción endotelial

(Chistiakov, *et al.*, 2015). Sin embargo, años más recientes se ha indicado que la cadena 5p está asociada con remodelado inverso del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardíaca (Shah, *et al.*, 2018) y arteriosclerosis obliterante (He, *et al.*, 2016).

Por lo tanto, el presente estudio tiene como propósito, determinar la expresión de miRNAs en monocitos, células clave en la iniciación y progresión de la aterosclerosis, así como su implicación en la EAC en pacientes mexicanos sometidos a cirugía de revascularización coronaria. Seleccionamos a los miRNAs de estudio basados en una búsqueda bibliográfica, enfocándonos en miRNAs asociados con el TRC y estrés oxidante, principales mecanismos en la formación de placa aterosclerótica (**Figura 8**).

Figura 8. miRNAs y genes de estudio



ECV: Enfermedades cardiovasculares

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La aterosclerosis es considerada una enfermedad de salud pública por su comportamiento silencioso y su estrecha relación con la EAC, la cual constituye la segunda causa de mortalidad en la población adulta en nuestro país. De acuerdo con la OMS, en el 2015 murieron por esta causa 7.4 millones de personas en el mundo, y se estima que en los siguientes años el número de muertes por esta enfermedad aumenten considerablemente. Esto hace necesario que los estudios sean enfocados hacia nuevos mediadores involucrados en los mecanismos de la patogénesis de la aterosclerosis, como los miRNAs, ya que estos, al regular la expresión de genes importantes en dicho proceso, tales como *ABCA1* y *NOS3*, se convierten en importantes blancos terapéuticos en la prevención de esta problemática de salud mundial.

4. JUSTIFICACIÓN

Recientemente, se ha demostrado que los miRNAs regulan de manera post-transcriptacional la expresión de genes involucrados en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Por lo que, el estudio de miRNAs asociados con mecanismos que participan en la formación de placa aterosclerótica, como el TRC y estrés oxidante, en monocitos de pacientes mexicanos con EAC, nos permitirá tener un mejor conocimiento sobre la fisiopatología de la aterosclerosis, y de esta manera contribuir en un futuro en el desarrollo de posibles estrategias terapéuticas que puedan ser aplicadas en la prevención y aparición de las complicaciones de las enfermedades cardiovasculares.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué implicación tiene la desregulación en la expresión de los miRNAs, *NOS3* y *ABCA1* en monocitos de pacientes con EAC?

6. HIPÓTESIS

La desregulación en la expresión de miRNAs, *NOS3* y *ABCA1* en monocitos aumenta el riesgo de presentar EAC, ya que contribuye a la formación de la placa aterosclerótica.

7. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-26a-5p, miRNA-155-5p, miRNA-21-5p, miRNA-221-5p, *NOS3* y *ABCA1* en monocitos de pacientes con EAC.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de los miRNAs de estudio en monocitos de pacientes con EAC y sujetos control.

- Determinar la expresión del RNAm de *ABCA1* y *NOS3* en pacientes con EAC y sujetos control.

- Definir la correlación entre la expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-26a-5p y la expresión del RNAm de *ABCA1*.

- Establecer la correlación entre la expresión de miRNA-21-5p, miR-155-5p, miR-221-5p y la expresión del RNAm de *NOS3*.

- Evaluar el eflujo de colesterol en células J744 y asociarlo con la expresión de los miRNAs de estudio y el RNAm de *ABCA1*.

- Explicar la posible influencia de la desregulación en la expresión de estos miRNAs, en la biogénesis de la aterosclerosis.

9. DISEÑO DEL ESTUDIO

- Tipo de investigación

- Observacional, transversal de casos y controles

- Población de estudio

- Pacientes del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” que fueron reclutados entre 2018 y 2020

- Tamaño de muestra

- 50 Sujetos sin EAC (Grupo control)
- 50 Pacientes con EAC

Se calculó con los datos publicados en los últimos años por diferentes grupos de trabajo. Se tomaron en cuenta las medias y desviaciones estándar de dichas publicaciones (**Anexo 1**). El tamaño calculado para el presente estudio fue de 37 sujetos (Dong, *et al.*, 2017), sin embargo, se estableció un tamaño de muestra de 50 sujetos por grupo.

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde,

$Z_{(1-\alpha/2)}$ = 1.96 y 2.576 Para un nivel de confianza del 95% y 99%, respectivamente

$Z_{(1-\beta)}$ = 0.84 y 2.326 Para un poder estadístico 80% y 99%, respectivamente

S1 = Desviación estándar del grupo control

S2 = Desviación estándar del grupo problema

X1 = Media poblacional del grupo control

X2 = Media poblacional del grupo problema

- Criterios de selección

Criterios de inclusión

A) Grupo control

- Sujetos con grosor de la íntima media carotídeo (GIMc) normal según su edad y género (Stein, *et al.*, 2008).
- Estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación.
- Ser mexicano de nacimiento con al menos 2 generaciones anteriores de origen mexicano.

B) Grupo con EAC

- Pacientes con diagnóstico de EAC estable.
- Estenosis coronaria mayor del 50% determinada por angiografía.
- Pacientes programados para cirugía de revascularización de arterias en el Departamento de Cirugía del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.
- Estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación.
- Ser mexicano de nacimiento, con al menos 2 generaciones anteriores de origen mexicano.

Criterios de exclusión

A) Grupo control

- Presentar un GIMc elevado y/o presencia de placa.
- Tener antecedentes de enfermedad cardiovascular.
- Presencia de insuficiencia cardíaca congestiva.
- Presentar alguna enfermedad inflamatoria.
- Padecer alguna enfermedad crónico degenerativa.

B) Grupo con EAC

- Presencia de insuficiencia cardíaca congestiva.
- Presentar alguna enfermedad inflamatoria.
- Padecer alguna enfermedad crónico degenerativa.

Criterios de eliminación

- Volumen de sangre total insuficiente.
- Cantidad de monocitos menor a 1×10^6 células en 15 ml de sangre.
- No estar de acuerdo en participar en el estudio.

Tabla 3. Definición de variables y valores de referencia.

Nombre de la variable	Definición conceptual	Tipo de variable	Dimensión
Sexo	Características biológicas primarias y sexuales con las que nace un individuo	Cualitativa nominal dicotómica	Masculino Femenino
Edad	Tiempo que ha vivido un individuo desde su nacimiento hasta el momento del estudio	Cuantitativa discreta	Años
Índice de masa corporal (IMC)	Es un indicador de la relación entre el peso y la talla de un individuo que se utiliza para identificar sobrepeso y obesidad	Cuantitativa continua	Normal: 18.5-24.9 Kg/m ² Sobrepeso: ≥ 25-29.9 Kg/m ² Obesidad tipo I: ≥ 30-34.9 Kg/m ² Obesidad tipo II: ≥ 35-39.9 Kg/m ² Obesidad tipo III: ≥ 40 Kg/m ²
Colesterol Total	Valor que indica la concentración de colesterol total en sangre	Cuantitativa continua	Óptimo: < 200 mg/dL Limítrofe alto: 200-239 mg/dL Alto: ≥ 240 mg/dL
Triglicéridos	Moléculas de glicerol, esterificadas con tres ácidos grasos	Cuantitativa continua	Óptimo: < 150 mg/dL Limítrofe alto: 150-199 mg/dL Alto: 200-499 mg/dL Muy alto: ≥ 500 mg/dL
c-LDL	Lipoproteínas de baja densidad que transportan el colesterol al endotelio arterial	Cuantitativa continua	Óptimo: 100 mg/dL Cercano o sobre el óptimo: 100-129 mg/dL Limítrofe alto: 130-159 mg/dL Alto: >160 mg/dL
c-HDL	Lipoproteínas de alta densidad que participan en el transporte inverso del colesterol	Cuantitativa continua	Hombres: < 40 mg/dL Mujeres: < 50 mg/dL
Glucosa	Es el azúcar que circula en la sangre y la fuente principal de energía para los organismos vivos	Cuantitativa continua	Normal: <99 mg/dL Prediabetes: 100-125 mg/dL Diabetes: ≥126 mg/dL
Presión arterial	Es la presión que ejerce la sangre contra la pared de las arterias	Cuantitativa continua	Óptima: <120 y <80 mmHg Normal: 120-129 y/o 80-84 mmHg Normal alta: 130-139 y/o 85-89 mmHg HTA grado I: 140-159 y/o 90-99 mmHg HTA grado II: 160-179 y/o 100-109 mmHg HTA grado III: ≥180 y/o ≥110 mmHg
Frecuencia cardiaca	Es el número de veces que se contrae el corazón durante un minuto	Cuantitativa continua	Normal: 60-100 pulsaciones/min
GIMc	Es la medición del área de tejido que inicia desde el borde luminal de la arteria y termina en el límite entre la media y la adventicia	Cuantitativa continua	Depende de la edad, género y raza (mm)
Expresión de miRNAs	Expresión relativa de la cantidad de cada miRNA	Cuantitativa continua	Normalizados con el gen endógeno RNU6B
Expresión de ABCA1/NOS3	Expresión relativa de la cantidad del RNAm	Cuantitativa continua	Normalizados con el gen endógeno HPRT

- Consideraciones éticas

El protocolo de investigación, con número 18-1075, fue aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (**Anexo 2**). Todos los sujetos de estudio firmaron una carta de consentimiento informado, acorde a los principios éticos para la investigación médica con seres humanos, conforme a lo estipulado en la Declaración de Helsinki, modificada por el Congreso de Tokio, Japón (World Medical Association, 2013) (**Anexo 3**).

10. MATERIALES Y MÉTODOS

- Población de estudio

Se obtuvieron muestras sanguíneas de pacientes diagnosticados con EAC (Kouchoukos, *et al.*, 1994; Barner, *et al.*, 2001), quienes acudieron al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con daño en las arterias coronarias. Sus casos fueron presentados en la sesión médica quirúrgica (Heart time) para estandarizar los requisitos del tipo de cirugía de revascularización a considerar según la patología de cada paciente. Los sujetos del grupo control acudieron por invitación al Instituto para la toma de muestra sanguínea y ultrasonido para evaluar el GIMc. Todos los participantes respondieron cuestionarios estandarizados y validados, para obtener información sobre antecedentes familiares y médicos, consumo de alcohol y tabaco, y actividad física. La información necesaria también se obtuvo del expediente clínico de cada sujeto. Las principales comorbilidades encontradas en los pacientes con EAC fueron: hipertensión arterial y diabetes mellitus tipo 2. Los medicamentos de uso común eran estatinas, hipoglucemiantes y diversos antihipertensivos; por lo cual, de forma secundaria se analizó cada miRNA de estudio de acuerdo al consumo de dichos fármacos, para determinar si su expresión se veía afectada por éstos.

- Toma de muestra

Las muestras de sanguíneas se obtuvieron a través de punción venosa después de 12 horas de ayuno en tubos con ácido etilendiaminotetracético sódico (EDTA-Na). De un tubo se llevó a cabo

la separación del plasma mediante centrifugación para la determinación del perfil lipídico; de tres tubos se realizó la separación de monocitos y extracción de HDL.

- Medición de la íntima media arterial

Para asegurar que el grupo control no presentara aterosclerosis subclínica, se evaluó el GIMc a cada uno de ellos empleando un aparato de ultrasonido de alta resolución en modo B (Sonosite MicroMax), con un transductor de 13-6 MHz. El estudio se llevó a cabo en decúbito supino con el cuello extendido. Todas las mediciones de la íntima-media de la carótida común se realizaron en el plano longitudinal de la pared distal de la carótida, a 2 cm de la bifurcación del bulbo carotídeo. El GIMc se midió a través de la distancia entre la interfaz íntima-arteria-luz y la interfaz media-adventicia de la pared distal. Se tomaron cinco mediciones, tanto en la carótida izquierda como en la derecha. El GIMc se definió con el promedio de todas las mediciones. El GIMc elevado se consideró de acuerdo al p75 específico de población hispana por grupo de edad y género (Stein, *et al.*, 2008) (**Anexo 4**). El ultrasonido fue realizado por un solo observador, previamente capacitado.

- Determinaciones bioquímicas

Las concentraciones de colesterol total, triglicéridos (CT y TG) y glucosa en sangre se determinaron por métodos enzimáticos colorimétricos comerciales. El c-HDL se midió en el sobrenadante después de haber precipitado a las lipoproteínas que contienen ApoB por el método de precipitación con fosfotungstato de magnesio. El c-LDL se calculó con la fórmula de Friedewald (1972).

- Separación de monocitos

Para la obtención de monocitos se utilizó sangre total recolectada en tubos con EDTA-Na después de 12 horas de ayuno. La sangre total se diluyó en una proporción 1:1 con PBS 1X 1% heparina y posteriormente se añadió sobre una solución Histopaque 1077 (10771, Sigma-Aldrich)

manteniendo la proporción de sangre-PBS 1X 1% heparina. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos (**Anexo 5**). Posteriormente se recolectó la capa leuco-plaquetaria que se genera después de la centrifugación, entre el plasma y los eritrocitos. Finalmente, se aislaron monocitos CD14⁺ de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por selección positiva, utilizando columnas y microperlas CD14 humanas (MACS®, Miltenyi Biotec) (**Anexo 6**).

- Aislamiento de HDL

Las HDL fueron separadas del plasma por ultracentrifugación secuencial a 110,000 r.p.m en tubos de policarbonato de 3.2 mL. Las lipoproteínas que contienen ApoB (densidad<1.063 g/mL) se separaron a 110,000 r.p.m durante 2.10 h. Posteriormente las HDL (1.063<densidad<1.21 g/mL) se obtuvieron después de centrifugar a 110,000 durante 2.5 h, y se dializaron durante 24h con PBS 1X.

- Extracción de RNA total

El RNA se extrajo de los monocitos por medio de la técnica de Tripure™ (Roche Molecular Biochemicals) (**Anexo 7**).

- Transcripción reversa

Se realizó una retrotranscripción con 1µg de RNA total para la síntesis de cDNA siguiendo el protocolo del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription” (Applied Biosystems). El cDNA se guardó a -20°C.

La retrotranscripción de cada microRNA de estudio se llevó a cabo con 20 ng de RNA total. Las condiciones de ciclaje fueron 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C, y 4 min a 4°C. El cDNA se guardó a -20°C.

- Análisis de RNAm, miRNAs y validación de la cuantificación

La expresión del RNAm de *ABCA1* (Hs01059137_ml) y *NOS3* (Hs01574665_ml) en monocitos, se cuantificó empleando los ensayos comerciales “TaqMan Gene Expression” en el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc). Las condiciones de ciclaje fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C y 1 min a 60°C. Los niveles de expresión se determinaron por duplicado y se normalizaron con el gen endógeno HPRT (Hs99999909_ml).

La expresión de miRNA-33a-5p (hsa-miR-33a), miRNA-144-3p (hsa-miR-144), miRNA-26a-5p (hsa-miR-26a), miRNA-21-5p (hsa-miR-21), miRNA-155-5p (hsa-miR-155) y miRNA-221-5p (hsa-miR-221) en monocitos, se cuantificaron empleando ensayos TaqMan para microRNA utilizando el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc). Las condiciones de ciclaje fueron 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguidos por 40 ciclos de 15s a 95°C y 1 min a 60°C. Los niveles de expresión se determinaron por duplicado y se normalizaron con el gen endógeno RNU6B. Se realizó una cuantificación relativa por medio de la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak, *et al.*, 2001).

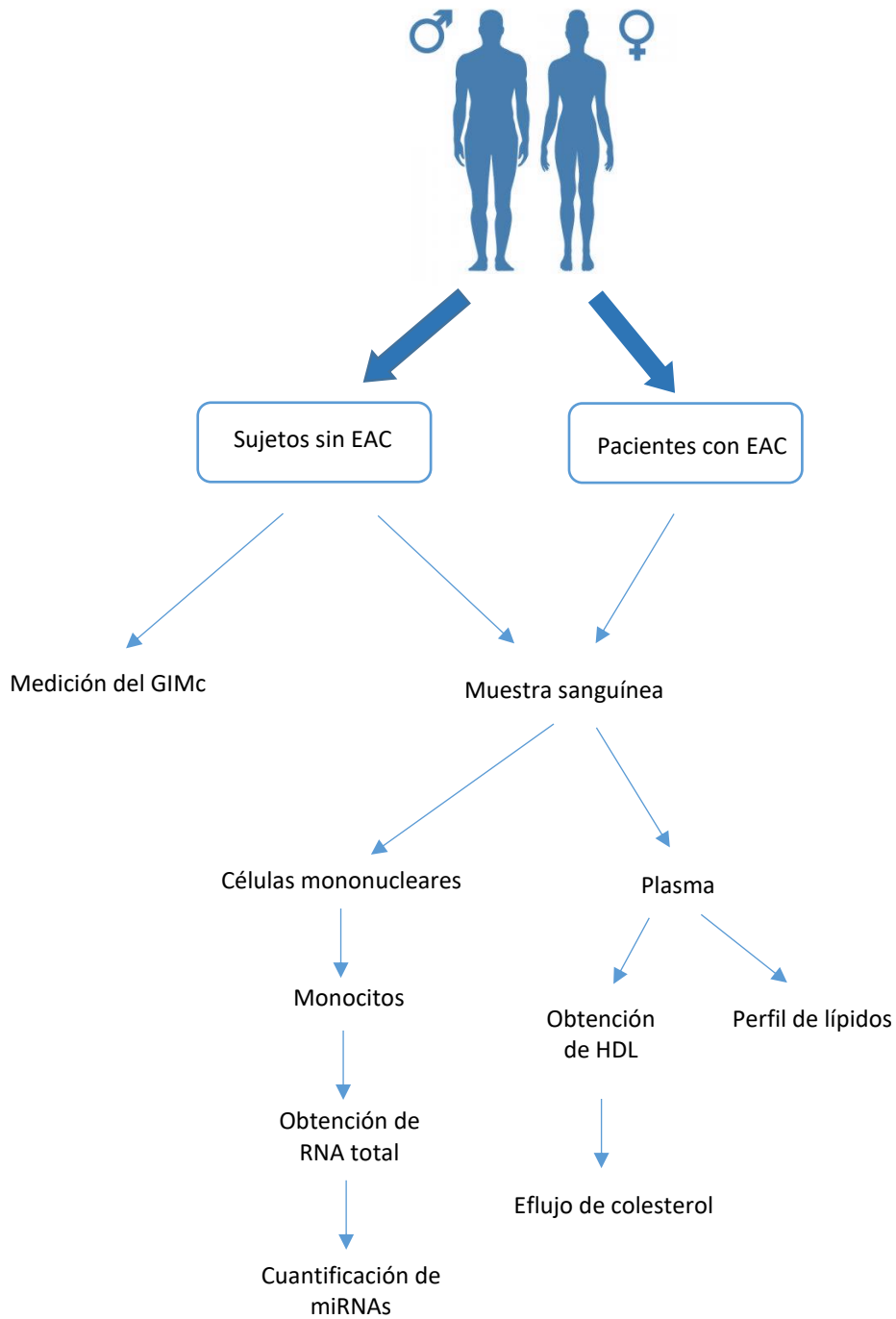
- Eflujo de colesterol

La capacidad de las HDL de aceptar colesterol de los macrófagos, se evaluó utilizando la línea celular J774 de macrófagos de ratón. Brevemente, las células se marcaron con [³H]-colesterol y se incubaron en medio RPMI-1640 con 50 µg/pozo de proteína HDL provenientes del plasma de los sujetos de estudio. Al término de la incubación, se retiró el medio y se removió la monocapa de células con NaOH. La radioactividad se midió tanto en el medio como en las células (radioactividad total por pozo). El porcentaje de radioactividad en el medio respecto a la radioactividad total corresponde al eflujo de colesterol.

- Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 22 (SPSS Inc. Chicago USA). Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables. Para las variables que presentaban una distribución normal, los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar (DS); en el caso de las variables discontinuas, los resultados se representaron con la mediana (mín-máx). La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba t de Student para variables continuas, y Chi^2 para variables discretas. Se realizó una prueba U de Mann-Whitney para las variables que no presentaron una distribución normal, así como para evaluar desenlaces del grupo control y los pacientes con EAC medicados y no medicados. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de regresión logística binaria con la construcción del modelo de acuerdo con las variables que resultaron de importancia. Finalmente, se realizó un análisis de correlación por medio de la prueba de Pearson; en el caso de los datos de expresión, estos se normalizaron calculando el logaritmo. Los resultados con valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

Figura 9. Diagrama de flujo del desarrollo del proyecto de investigación.



11. RESULTADOS

11.1. Descripción de la población

Tabla 1. Parámetros bioquímicos y antropométricos de la población de estudio

VARIABLES	CONTROLES (n=50)	EAC (n=60)	P
Edad (años)	48.67 ± 6.47	62.10 ± 11.75	< 0.001
Sexo [n (%)] M/F	30 (60.7%) / 20 (39.3%)	51 (85.3%) / 9 (14.7%)	0.001
IMC (kg/m ²)	27.75 ± 3.78	26.42 ± 3.90	0.849
Colesterol Total (mg/dL)	171.06 ± 24.47	138.26 ± 49.98	< 0.001
c-HDL (mg/dL)	45.80 ± 14.75	30.98 ± 7.90	< 0.001
c-LDL (mg/dL)	102.86 ± 23.17	90.61 ± 49.70	0.066
Triglicéridos (mg/dL)	131.48 ± 49.86	141.94 ± 62.30	0.302
Estatinas %	0%	72.0%	< 0.001
Glucosa (mg/dL)	93.76 ± 7.82	120.34 ± 48.78	< 0.001
Diabetes %	0%	43.0%	< 0.001
Hipoglucemiantes %	0%	20.0%	< 0.001
PAS (mmHg)	112.43 ± 9.12	127.33 ± 18.81	< 0.001
PAD (mmHg)	70.43 ± 6.01	79.60 ± 12.03	< 0.001
Hipertensión %	0%	55.0%	< 0.001
FC (pulsaciones/min)	65.44 ± 9.81	79.44 ± 13.10	< 0.001
Antihipertensivos %	0%	62.0%	< 0.001
Tabaquismo %	9.5%	17.1%	0.381
Alcoholismo %	0%	2.6%	< 0.001

Los datos se expresan como media ± desviación estándar. IMC: Índice de masa corporal; c-HDL: Colesterol de lipoproteínas de alta densidad; c-LDL: Lipoproteínas de baja densidad; PAS: Presión arterial sistólica; PAD: Presión arterial diastólica; FC: Frecuencia cardiaca; GIMc: Grosor de la íntima media carotídeo.

La población de estudio fue de 110 mexicanos reclutados en el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, de los cuales 50 fueron controles (GC) y 60 pacientes con EAC. De estos, en el grupo con EAC, 51 fueron hombres y 9 mujeres, por lo que la relación fue de 6:1.

La **tabla 4** muestra los principales parámetros bioquímicos y antropométricos de ambos grupos. Se puede observar que en el grupo de EAC, existe un aumento significativo en la edad ($p < 0.001$), glucosa ($p < 0.001$), presión arterial sistólica (PAS) ($p < 0.001$), presión arterial diastólica (PAD) ($p < 0.001$) y frecuencia cardiaca (FC) ($p < 0.001$). Por otra parte, en el grupo que presenta EAC, se encontró una disminución significativa del colesterol total ($p < 0.001$) y c-HDL ($p < 0.001$); en el caso del c-LDL, aunque no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos, el grupo con EAC presentó valores menores a los controles. Algunos de los factores de riesgo principales para desarrollar alguna enfermedad cardiovascular son la diabetes y la hipertensión, por lo que el 43.0% de los pacientes con EAC presentaron diabetes, y el 55.0% HTA.

11.2. Expresión de los miRNAs de estudio en monocitos

La expresión de los miRNAs de estudio se determinó en monocitos del grupo control y EAC por medio de la técnica de PCR en tiempo real. En la **tabla 5** se muestran los valores de expresión de cada miRNA por grupo. La expresión de miRNA-33a-5p y miRNA-155-5p fue menor en el grupo de EAC en comparación con la del grupo control ($p < 0.05$). Por otra parte, miRNA-144-3p no presentó diferencias significativas.

En el caso de la expresión de miRNA-26a-5p se observó un aumento significativo en el grupo de EAC en comparación con el grupo control; al igual que en la expresión de miRNA-21-5p y miRNA-221-5p ($p < 0.05$).

Tabla 5. Valores de expresión de los miRNAs de estudio entre el grupo con EAC y el grupo control

	Controles	EAC	p
miR-33a-5p	9.43 (0.61-50.75)	3.81 (0.30-15.98)	< 0.001
miR-155-5p	14.04 (0.74-78.72)	7.69 (0.91-33.15)	0.021
miR-144-3p	7.95 (0.41-77.53)	6.03 (0.10-70.01)	0.925
miR-26a-5p	5.26 (0.23-43.95)	9.91 (0.41-52.66)	0.033
miR-21-5p	7.54 (0.69-61.42)	15.13 (1.45-130.43)	0.001
miR-221-5p	7.47 (0.12-74.64)	21.12 (1.67-116.41)	< 0.001

Los datos expresan la mediana (mín-máx).

11.3. Expresión de RNAm en monocitos

En la **tabla 6** se muestran los valores de expresión de los RNAm de estudio. Uno de los genes blanco de miRNA-33a, miRNA-144 y miRNA-26a es el transportador *ABCA1*, por lo que se determinó su expresión en monocitos por medio de PCR en tiempo real. La expresión de *ABCA1* fue mayor en el grupo de EAC en comparación con el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.002$).

En el caso de miRNA-21, miRNA-155 y miRNA-221, estos tienen como gen blanco a *NOS3*, encargado de la síntesis de óxido nítrico, por lo tanto, también determinamos la expresión del RNAm en monocitos. De acuerdo con los resultados, su expresión fue menor en el grupo de EAC en comparación con el grupo control, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

Tabla 6. Valores de expresión de los RNAm de estudio entre el grupo con EAC y el grupo control

	Controles	EAC	p
<i>ABCA1</i>	9.84 (1.44-26.84)	14.64 (5.68-47.07)	0.002
<i>NOS3</i>	108.44 (5.70-1125.22)	27.01 (1.00-129.55)	< 0.001

Los datos expresan la mediana (mín-máx).

11.4. Relación entre EAC, genes de estudio y datos antropométricos

Para determinar los factores que influyen en el desarrollo de la EAC, se realizó un análisis de regresión logística binaria con la construcción del modelo de acuerdo con los parámetros bioquímicos, antropométricos y genes de estudio que tuvieron diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con EAC (Edad, sexo, colesterol total, c-HDL, glucosa, PAS, PAD, FC, *ABCA1*, *NOS3* y miRNAs de estudio). Los resultados mostraron que la disminución de la expresión de miRNA-33a-5p y el aumento de *ABCA1* tienen un efecto protector, debido a que se asocian con un menor riesgo de presentar EAC; mientras que, el aumento de la expresión de miRNA-21-5p, miRNA-221-5p, así como la disminución de *NOS3*, se asocia con un mayor riesgo

de presentar la enfermedad (**tabla 7**). La disminución del c-HDL, así como el aumento de la edad y PAS, también se asociaron a un mayor riesgo de presentar EAC, sin embargo, la razón de probabilidades (OR) fue baja.

Tabla 7. Asociación entre EAC, expresión de genes de estudio y datos antropométricos

	χ^2	OR	CI 95%	p
Edad	6.177	1.088	1.018-1.163	0.013
c-HDL	8.863	1.180	1.058-1.314	0.003
PAS	5.951	1.071	1.014-1.133	0.015
miRNA-33a-5p	4.139	0.135	0.020-0.929	0.042
miRNA-26a-5p	3.149	3.105	0.888-10.853	0.076
miRNA-21-5p	8.411	8.373	1.992-35.206	0.004
miRNA-221-5p	6.839	6.447	1.595-26.061	0.009
<i>ABCA1</i>	10.975	0.060	0.011-0.318	0.001
<i>NOS3</i>	6.222	6.622	1.404-31.250	0.017

χ^2 : Valor de Chi²; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%; p: Valor p entre variables.

11.5. Correlación entre la expresión de los miRNAs y genes de estudio

Al llevar a cabo la correlación de la expresión del miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miRNA-26a-5p con su gen blanco *ABCA1* en ambos grupos de estudio (**tabla 8**), sólo encontramos una correlación negativa y significativa con miRNA-26a-5p en el grupo control ($p=0.002$). Por otro lado, al correlacionar la expresión de miRNA-21-5p, miRNA-155-5p y miRNA-221-5p con su gen blanco *NOS3* (**tabla 9**), sólo observamos una correlación negativa y significativa con miRNA-155-5p en el grupo control ($p=0.043$). Los datos de expresión se normalizaron calculando el logaritmo.

Tabla 8. Correlaciones entre la expresión de miRNAs y *ABCA1*

	<i>ABCA1</i>			
	Controles		EAC	
	r	p	r	p
miRNA-33a-5p	0.004	0.978	0.154	0.290
miRNA-144-3p	- 0.279	0.074	-0.037	0.803
miRNA-26a-5p	- 0.466	0.002	-0.123	0.393

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

Tabla 9. Correlaciones entre la expresión de miRNAs y *NOS3*

	<i>NOS3</i>			
	Controles		EAC	
	r	p	r	p
miRNA-21-5p	-0.318	0.043	-0.029	0.845
miRNA-221-5p	-0.224	0.149	0.091	0.519
miRNA-155-5p	0.006	0.971	0.095	0.512

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

Además, también se realizó la correlación de la expresión de cada uno de los miRNAs de estudio con los datos obtenidos de los análisis bioquímicos y los datos antropométricos (**Anexo 15**). miRNA-33a-5p correlacionó negativa y significativamente con los niveles de triglicéridos en el grupo con EAC ($r = -0.376$, $p = 0.004$); miRNA-155-5p correlacionó negativa y significativamente con los niveles de c-LDL en el grupo control ($r = -0.320$, $p = 0.032$); además, miRNA-26a-5p correlacionó negativa y significativamente con la glucosa en el grupo con EAC ($r = -0.290$, $p = 0.026$); y miRNA-21-5p correlacionó negativamente con la glucosa ($r = -0.381$, $p = 0.003$), y positivamente con la frecuencia cardíaca ($r = 0.256$, $p = 0.048$), ambas significativas. *NOS3* correlacionó positiva y significativamente con la frecuencia cardíaca ($r = 0.292$, $p = 0.024$). Por otra parte, miRNA-144-3p, miRNA-221-5p y *ABCA1*, no presentaron correlaciones significativas con los datos clínicos.

11.6. Expresión de miRNAs y genes blanco de acuerdo con el consumo de estatinas

Debido a que el 72% de los pacientes con EAC estaban bajo tratamiento con atorvastatina, con la finalidad de determinar si la expresión de los genes de estudio varía con éste, dividimos al grupo de acuerdo con su consumo y los comparamos con el grupo control por medio de una prueba U de Mann-Whitney (**tabla 10**). La expresión de miRNA-33a-5p y miRNA-155-5p en el grupo medicado y no medicado mantuvo una disminución significativa en relación con el grupo control. Por el contrario, miRNA-21-5p mantuvo un aumento significativo en ambos grupos de EAC en relación con el grupo control.

Por otra parte, miRNA-144-3p y miRNA-26a-5p no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de estudio. Después, al comparar la expresión de miRNA-221-5p, encontramos un aumento significativo en los pacientes con EAC medicados, en comparación con el grupo control ($p= 0.002$). Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el grupo no medicado con respecto a los pacientes medicados y el grupo control.

Con respecto a los genes blanco, cabe resaltar que, la expresión de *ABCA1* mantuvo un aumento significativo en el grupo de EAC medicado con atorvastatina en comparación, tanto con el grupo control ($p= 0.002$), como con el grupo de EAC no medicado ($p= 0.030$). A pesar de lo anterior, cabe mencionar que, los pacientes con EAC tratados con atorvastatina, presentaron un ligero aumento en la concentración de c-HDL, en comparación con los enfermos no medicados; sin embargo, no fue significativo (31.82 mg/dL vs 28.85 mg/dL, respectivamente; $p= 0.183$).

La disminución de *NOS3* no se vio afectada por el uso de estatinas, ya que, en el grupo medicado y no medicado, se siguió observando una disminución significativa en comparación con el grupo control.

Tabla 10. Valores de expresión de los miRNAs y RNAm de estudio de acuerdo con el consumo de atorvastatina

	Controles (n=50)	EAC Grupo no medicado con atorvastatina (n=16)	p1	EAC Grupo medicado con atorvastatina (n=44)	p2	p3
miR-33a-5p	9.43 (0.61-50.75)	3.17 (1.20-15.63)	< 0.001	5.06 (0.30-15.98)	0.001	0.272
miR-155-5p	14.04 (0.74-78.72)	8.54 (0.91-27.64)	0.050	7.31 (0.96-33.15)	0.032	0.793
miR-144-3p	7.95 (0.41-77.53)	5.58 (0.21-67.11)	0.932	9.16 (0.50-70.01)	0.733	0.836
miR-26a-5p	5.26 (0.23-43.95)	10.75 (1.13-19.46)	0.227	9.03 (0.41-52.66)	0.303	0.773
miR-21-5p	7.54 (0.69-61.42)	14.06 (2.60-130.43)	0.011	18.17 (1.45-82.65)	0.008	0.620
miR-221-5p	7.47 (0.12-74.64)	21.12 (2.54-101.78)	0.073	20.64 (1.67-116.42)	0.002	0.522
<i>ABCA1</i>	9.84 (1.44-26.84)	12.34 (6.48-40.48)	0.985	17.15 (6.06-47.08)	0.002	0.030
<i>NOS3</i>	108.44 (5.70-1125.22)	26.38 (1.00-79.56)	< 0.001	23.98 (1.65-129.55)	< 0.001	0.786

Los datos expresan la mediana (mín-máx); p< 0.05; p1: EAC grupo no medicado vs controles; p2: EAC grupo medicado vs controles; p3: EAC Grupo no medicado vs EAC grupo medicado.

11.7. Expresión de miRNAs y genes blanco de acuerdo con el consumo de hipoglucemiantes

El 20% de los pacientes con EAC se encontraban bajo tratamiento con hipoglucemiantes, en su mayoría metformina, por lo que también dividimos a este grupo por el consumo de dichos fármacos y los comparamos con el grupo control (**tabla 11**). La expresión de miRNA-33a-5p se mantuvo disminuida tanto en el grupo de EAC medicado como en el no medicado, en comparación con el grupo control, sin embargo, sólo fue significativo en el grupo no medicado. La expresión de miRNA-21-5p presentó un aumento significativo en el grupo no medicado en comparación tanto con el grupo control, como con el grupo medicado con hipoglucemiantes; incluso, los niveles de expresión de este miRNA con el tratamiento, se asemejan al del grupo control. En el caso de miRNA-26a-5p y miRNA-221-5p, podemos observar que su expresión se mantuvo significativamente elevada en el grupo con EAC que no se encontraba bajo tratamiento en comparación con el grupo control. Por otra parte, la expresión de miRNA-144-5p, miRNA-155-5p y *ABCA1* no presentó diferencias significativas entre los tres grupos de estudio ($p > 0.05$). La expresión de *NOS3* se encontró disminuida en el grupo de EAC medicado y no medicado, en comparación con el grupo control.

Tabla 11. Valores de expresión de los miRNAs y RNAm de estudio de acuerdo con el consumo de hipoglucemiantes

	Controles (n=50)	EAC Grupo no medicado con hipoglucemiantes (n=48)	p1	EAC Grupo medicado con hipoglucemiantes (n=12)	p2	p3
miR-33a-5p	9.43 (0.61-50.75)	3.68 (0.30-15.98)	< 0.001	5.05 (0.84-15.26)	0.100	0.459
miR-155-5p	14.04 (0.74-78.72)	7.98 (0.91-33.15)	0.157	4.26 (2.63-21.63)	0.397	0.528
miR-144-3p	6.51 (0.41-48.34)	5.65 (0.10-68.93)	0.750	6.54 (1.74-17.42)	0.817	0.964
miR-26a-5p	5.26 (0.23-43.95)	10.75 (1.07-52.66)	0.016	4.91 (1.13-34.96)	0.851	0.092
miR-21-5p	7.54 (0.69-61.42)	15.43 (1.45-82.65)	0.001	7.35 (2.50-18.62)	0.983	0.022
miR-221-5p	7.47 (0.12-74.64)	21.79 (2.48-116.42)	< 0.001	11.01 (2.78-46.85)	0.321	0.086
<i>ABCA1</i>	9.84 (1.44-26.84)	12.20 (5.68-47.08)	0.087	12.95 (8.94-41.92)	0.086	0.339
<i>NOS3</i>	108.44 (5.70-1125.22)	25.11 (1.00-129.55)	< 0.001	23.98 (2.27-83.71)	< 0.001	0.776

Los datos expresan la mediana (mín-máx); p< 0.05; p1: EAC grupo no medicado vs controles; p2: EAC grupo medicado vs controles; p3: EAC Grupo no medicado vs EAC grupo medicado.

Cabe mencionar que, a pesar de que el 53.0% de los pacientes con EAC se encontraban medicados con antihipertensivos, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo medicado y no medicado en comparación con el grupo control (**Anexo 14**).

11.8. Eflujo de colesterol

Con el propósito de conocer la capacidad de las HDL de nuestros sujetos de estudio en el eflujo de colesterol, este mecanismo se evaluó con la línea celular J774 de macrófagos de ratón. Se encontró una disminución significativa del eflujo de colesterol en las HDL de los pacientes, en comparación con el grupo control (3.03 ± 0.16 vs 3.66 ± 0.19 , respectivamente; $p= 0.013$) (figura 10).

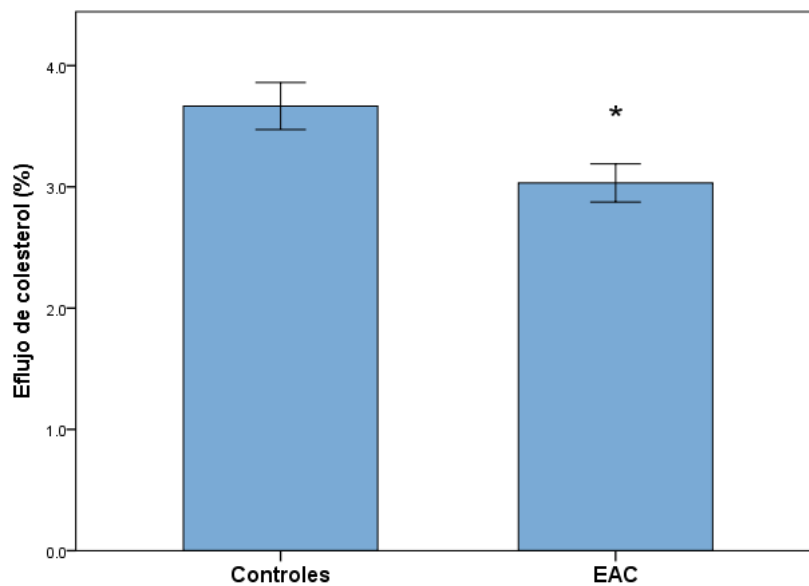


Figura 10. Eflujo de colesterol de los grupos de estudio. $p= 0.013$. Los datos expresan la media \pm E.E.

11. 9. Relación entre eflujo de colesterol y la EAC

Se realizó un análisis de regresión logística binaria con el propósito de determinar si el eflujo de colesterol influye en el desarrollo de la EAC. Los resultados mostraron que la disminución del eflujo de colesterol se asocia con un mayor riesgo de desarrollar EAC (tabla 12). Además, se encontró que, el no consumir estatinas cuando se tiene EAC, se asocia con una disminución en el eflujo de colesterol y por lo tanto un mayor riesgo de la enfermedad (tabla 13).

Tabla 12. Relación entre el eflujo de colesterol y la EAC

	χ^2	OR	IC 95%	p
Eflujo de colesterol	5.71	1.52	1.13 - 2.77	0.017

χ^2 : Valor de Chi²; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

Tabla 13. Relación entre el eflujo de colesterol y las estatinas

	χ^2	OR	IC 95%	p
Sin tratamiento con estatinas	4.555	2.659	1.083 - 6.528	0.033

χ^2 : Valor de Chi²; OR: Odds ratio; IC 95%: Intervalo de confianza del 95%.

11.10. Correlación entre el eflujo de colesterol y la expresión de los miRNAs

Por otro lado, para determinar si la expresión de los miRNAs se relaciona con el eflujo de colesterol, se realizó el siguiente análisis entre el grupo control y el grupo con EAC (**tabla 14**). Se observó que los 6 miRNAs de estudio correlacionaron negativamente con el eflujo de colesterol, sin embargo, todas estas correlaciones sólo fueron significativas en el grupo control ($p < 0.05$). En el caso de *ABCA1*, encontramos una correlación positiva y significativa entre su expresión y el eflujo de colesterol ($r = 0.321$, $p = 0.030$), pero de igual manera, sólo se observó en el grupo control. Además, no encontramos correlaciones significativas entre el eflujo de colesterol y la expresión de *NOS3* en ambos grupos de estudio. Los datos de expresión se normalizaron calculando el logaritmo.

Al dividir a los pacientes con EAC de acuerdo con el consumo de atorvastatina, se observó que en el grupo no medicado se mantuvo una correlación negativa entre nuestros 6 miRNAs de estudio y el eflujo de colesterol, sin embargo, sólo fue significativa en el caso de miRNA-21-5p ($p = 0.044$) y miRNA-221-5p ($p = 0.028$). Por otra parte, no se encontró una correlación significativa entre el eflujo de colesterol y los datos antropométricos (**Anexo 16**).

Tabla 14. Correlación entre el eflujo de colesterol y miRNAs/genes blanco

	Controles		EAC		EAC Grupo no medicado con atorvastatina		EAC Grupo medicado con atorvastatina	
	r	p	r	p	r	p	r	p
miR-33a-5p	-0.357	0.019	0.005	0.976	-0.022	0.947	-0.157	0.444
miR-144-3p	-0.625	< 0.001	-0.107	0.505	-0.124	0.701	-0.162	0.471
miR-155-5p	-0.594	< 0.001	-0.058	0.709	-0.518	0.070	-0.042	0.835
miR-21-5p	-0.538	< 0.001	-0.136	0.366	-0.614	0.044	0.125	0.525
miR-26a-5p	-0.592	< 0.001	-0.047	0.758	-0.190	0.555	0.093	0.643
miR-221-5p	-0.611	< 0.001	-0.087	0.576	-0.658	0.028	0.042	0.834
<i>ABCA1</i>	0.316	0.042	-0.008	0.962	0.362	0.248	-0.016	0.941
<i>NOS3</i>	0.053	0.733	0.001	0.994	-0.099	0.749	0.062	0.770

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

12. DISCUSIÓN

Existen varios estudios sobre la presencia de miRNAs en diferentes tipos celulares y su papel en las enfermedades cardiovasculares; sin embargo, la información de su expresión en los monocitos, células clave en la etapa inicial de la aterosclerosis, es limitada. El objetivo del presente estudio fue determinar la expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p, miRNA-26a-5p, miR-155-5p, miR-21-5p y miR-221-5p en monocitos de pacientes con EAC y controles sanos, así como la expresión de *NOS3* y *ABCA1*, y su participación en el desarrollo de dicha enfermedad. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de las HDL de aceptar colesterol utilizando la línea celular J774 de macrófagos de ratón.

Los resultados obtenidos sobre las características clínicas, muestran diferencias significativas entre los dos grupos de estudio. La media de edad de los pacientes con EAC (62 años) fue significativamente mayor, por lo que cabe señalar que esto confirma lo descrito por otros autores. ya que se demuestra que la edad es un factor de riesgo cardiovascular, y que la EAC se presenta en edades más avanzadas (Lahoz, *et al.*, 2007; NCEP, 2001). En el grupo con EAC, de los 60 pacientes, 51 fueron hombres y 9 mujeres, por lo que, la relación hombre-mujer fue de 6:1, y la media de edad en las mujeres fue de 69 años; datos similares a los reportados previamente, los cuales indican que el riesgo de presentar EAC es aproximadamente 4 veces superior en el varón que en la mujer antes de la menopausia (Lahoz, *et al.*, 2007; Cisneros Sánchez, *et al.*, 2013), ya que, de acuerdo con algunos estudios, los estrógenos tienen actividad protectora contra las complicaciones ateroscleróticas, y por ende, la insuficiencia hormonal ovárica en el momento de la menopausia se asocia con un aumento de los eventos cardiovasculares (Pérez-López, *et al.*, 2010).

En este estudio, en cuanto al perfil de lípidos, la media de colesterol total y c-LDL se encontró dentro de los valores de referencia en ambos grupos, sin embargo, los pacientes con EAC presentaron una disminución significativa; esto debido a que el 72% de los enfermos estaban bajo tratamiento con estatinas, las cuales, de acuerdo con Baigent, son fármacos que inhiben la síntesis de colesterol y contribuyen a la reducción significativa de la morbimortalidad cardiovascular (Baigent, *et al.*, 2005). En el caso del c-HDL, también se observó una menor concentración en el grupo de EAC, ya que la media fue de 30.98 mg/dl y, de acuerdo con el Programa Nacional de

Educación sobre el colesterol (NCEP), valores < 40 mg/dl se consideran un FR cardiovascular. Sin embargo, en este sentido, es conocido que el promedio de HDL en México es bajo, y si bien, esto puede deberse a la etnia, también puede relacionarse al estilo de vida y dieta (Martínez-Marroquín, *et al.*, 2023).

El grupo con EAC presentó concentraciones de glucosa elevadas y significativamente mayores, con una media de 120.34 mg/dL. Este aumento en las concentraciones de glucosa se refleja en la prevalencia alta de pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (43%). Como se ha reportado, esta enfermedad se asocia con un riesgo incrementado de EAC. De acuerdo con datos epidemiológicos, la EAC es tres veces más frecuente en población diabética en comparación con la población no diabética y, se considera la principal causa de muerte del paciente diabético (Florenzano, *et al.*, 2009). Además de la diabetes, otro de los principales factores de riesgo cardiovascular es la HTA. En el presente trabajo, la prevalencia de HTA en los pacientes con EAC fue del 55.0%, por lo cual, los valores de PAS y PAD fueron significativamente mayores en este grupo en comparación del grupo control. Los datos del estudio Framingham han demostrado que los niveles de presión arterial de 130-139/85-89 mmHg se asocian con un aumento del doble en el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular, en comparación con niveles por debajo de 120/80 mmHg (Vasan, *et al.*, 2001). Además, las cifras de presión arterial sistólica y diastólica, se asocian con la incidencia de EAC (De la Sierra, *et al.*, 2001).

Estudios epidemiológicos han establecido a la dislipidemia, DM2, HTA, obesidad y al tabaquismo como principales factores de riesgo cardiovascular. No obstante, estos factores no explican la totalidad del riesgo atribuible y, por lo tanto, son insuficientes para explicar el origen de las ECV (Portilla, *et al.*, 2014). La susceptibilidad de un individuo a padecer alguna enfermedad también está determinada por factores genéticos (Gil, *et al.*, 2017). Por lo que, en años recientes, los miRNAs han sido identificados como importantes moduladores de numerosos procesos fisiológicos que impactan en el crecimiento del organismo, el desarrollo, la homeostasis y la enfermedad (Najafi, *et al.*, 2010).

Los resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de miR-21-5p y miR-221-5p en monocitos de pacientes con EAC, así como una disminución de la expresión de miR-155-5p. Sin embargo, sólo la sobreexpresión de miR-21-5p y miR-221-5p se asoció con un mayor riesgo de presentar la enfermedad.

Investigaciones consistentes con las del presente estudio, han demostrado que la expresión de miRNA-21-5p aumenta en células mononucleares y plasma de pacientes con EAC, así como en arterias de aterosclerosis obliterante. (Sanlialp, *et al.*, 2020; Huang, *et al.*, 2019; Kumar, *et al.*, 2020). Este miRNA podría estar regulando citocinas inflamatorias a través de la vía de señalización de las cinasas c-Jun N-terminal (JNK) (Chen, *et al.*, 2020) o la vía de la fosfatidilinositol 3-cinasa [PI3K]/proteína cinasa B [AKT] (Lv, *et al.*, 2020), lo cual implicaría, la proliferación y migración de CMLV, y como resultado, una estenosis vascular más grave, así como un mal pronóstico de la EAC (Sun, *et al.*, 2019). Por otra parte, en el caso de miRNA-221-5p, algunos grupos de investigación han informado que su expresión se encuentra regulada al alza en plasma de pacientes con insuficiencia cardíaca y aterosclerosis obliterante (Shah *et al.*, 2018; He, *et al.*, 2016). Estudios en células endoteliales han indicado que la expresión de la cadena 3p de este miRNA aumenta en pacientes con EAC (Minami, *et al.*, 2009; Zhang, *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen reportes previos que analicen la cadena 5p en la EAC. Debido a lo cual, el presente estudio es el primero en demostrar que el aumento de miR-221-5p en monocitos podría estar participando en la formación de la placa de ateroma. Se empleó el programa TargetScan Human 7.2 de predicción bioinformática y como resultado, se identificó al gen supresor de la señalización de citocinas 1 (SOCS1) como un gen blanco directo de miR-221-5p. SOCS1 es un inhibidor de retroalimentación negativa de la señalización inducida por citocinas que actúan a través de la vía JAK/STAT, de modo que controla importantes procesos inflamatorios en las células vasculares (Liau, *et al.*, 2018). Por lo tanto, sería importante evaluar a SOCS1 a nivel de RNAm y proteína para determinar si la sobreexpresión de miR-221-5p podría promover, a causa de la inhibición de *SOCS1*, la producción de citocinas inflamatorias y la progresión de aterosclerosis a través de la activación de la vía JAK/STAT.

Además, también se demostró que el aumento de la expresión de miRNA-21-5p y miRNA-221-5p, se observó sólo en aquellos pacientes con EAC que no se encontraban medicados con metformina en comparación con el grupo control. Cuando se analizó la expresión de ambos miRNAs en los pacientes con EAC tratados con metformina, los valores fueron similares a los del grupo control. Reportes previos en pacientes diabéticos, presentaron que el tratamiento con metformina disminuye la expresión de miR-21-5p y miR-221-5p en plasma y arterias mamarias internas, respectivamente (Demirsoy, *et al.*, 2018; Coleman, *et al.*, 2013). Esto sugiere que la metformina también podría tener un efecto inhibitorio sobre la expresión de estos miRNAs en

monocitos. La metformina actúa como cardioprotector al activar al complejo enzimático AMPK (proteína cinasa activada por AMP), que interviene en una amplia gama de vías de señalización corriente abajo, por lo que, inhibe la proliferación, migración y angiogénesis de las células vasculares, así como la apoptosis de células endoteliales y cardiomiocitos, y, reduciendo el estrés oxidante y la respuesta inflamatoria (Wang, *et al.*, 2021; Bu, *et al.*, 2022). Pulito y cols. encontraron que la metformina inhibe la transcripción de miR-21-5p a través de la ocupación de sus regiones promotoras por el factor de transcripción E2F 3 (E2F3) (Pulito, *et al.*, 2017). Sin embargo, el mecanismo molecular por medio del cual, dicho fármaco regula la expresión de los miRNAs aún no se conoce por completo.

Por otro lado, se observó que la expresión de miRNA-155-5p se encuentra regulada a la baja en monocitos de pacientes con EAC. Zhu y cols. proponen que la expresión de este miRNA puede tener diferentes efectos de acuerdo con la etapa de desarrollo de la placa de aterosclerosis, y su regulación a la baja podría ser un mecanismo de retroalimentación que controla la sobre activación de células inmunes (Zhu, *et al.*, 2014). Por lo que, consideramos que miR-155-5p disminuye en los monocitos de pacientes con EAC en respuesta al aumento de citocinas inflamatorias a causa de la activación de las células inmunitarias. McCoy *et al.* propusieron un posible mecanismo; ellos demostraron que la IL-10, una potente citocina antiinflamatoria, inhibe la transcripción de miR-155 del gen BIC de manera dependiente de STAT3, lo que podría promover la expresión de genes antiinflamatorios (McCoy, *et al.*, 2010).

Con respecto al gen de la óxido nítrico sintasa endotelial (*NOS3*), se encontró una disminución significativa del RNAm en monocitos de los pacientes con EAC, la cual se asoció con un mayor riesgo de presentar dicha enfermedad. Esto confirma lo observado en algunos estudios anteriores en ratones, donde demuestran que la inhibición de NO induce EAC y diversas complicaciones cardiovasculares (Oliveira-Paula, *et al.*, 2016; Kuhlencordt, *et al.*, 2001). Investigaciones previas indican que la expresión de *NOS3* correlaciona negativamente con la expresión de miRNA-155-5p, miRNA-21-5p y miRNA-221-5p, tanto en modelos animales como en humanos (Rippe, *et al.*, 2012; Jing, *et al.*, 2017; Peñaloza, *et al.*, 2020). Con ayuda del programa TargetScan Human 7.2 de predicción bioinformática, encontramos que el miRNA-155-5p tiene un sitio de unión a una región de *NOS3*; no obstante, no encontramos sitios de unión con el miRNA-21-5p y miRNA-221-5p (**Anexo 17**). De acuerdo con el grupo de trabajo de Peñaloza, a través de un estudio *in silico*,

ellos identificaron que el miRNA-21-5p presenta seis sitios de unión a *NOS3*, pero con baja probabilidad estadística (Peñaloza, *et al.*, 2020). Por otra parte, un estudio anterior, demostró que la transfección de imitadores (mimic) del miRNA-221-5p en células endoteliales de venas de cordón umbilical humano (HUVEC), disminuyó los niveles de proteína de *NOS3*; a pesar de ello, no encontraron sitios de unión del miRNA-221-5p a *NOS3* (Suárez, *et al.*, 2007). Por lo que, de acuerdo con lo anterior, tanto miRNA-21-5p como miRNA-221-5p, regulan de manera indirecta a *NOS3* a través de la regulación de un gen intermediario. Tal es el caso del trabajo de Chen y cols., donde demuestran que el miRNA-221-5p disminuye la expresión de *NOS3* a través de la inhibición de AdipoR1 (gen del receptor a adiponectina 1). Este receptor, regula los efectos fisiológicos de la adiponectina, la cual, estimula la fosforilación de *NOS3* y la producción de NO (Chen, *et al.*, 2015). En el presente trabajo, no encontramos una correlación significativa entre *NOS3* y la expresión de miRNA-155-5p, miRNA-21-5p y miRNA-221-5p en EAC. Esto podría deberse al efecto de la metformina sobre la expresión de miRNA-21-5p y miRNA-221-5p o, que la disminución de *NOS3* en monocitos de pacientes con EAC no es causada por una regulación indirecta provocada por miRNA-21-5p y miRNA-221-5p, ni directa, en el caso de miRNA-155-5p; sin embargo, para este último, es necesario cuantificar la proteína para poder confirmarlo.

Por otra parte, también se encontró una disminución significativa de miRNA-33a-5p, así como un aumento significativo de miRNA-26a-5p en monocitos de pacientes con EAC. De los cuales, la disminución de miRNA-33a-5p se asoció a un menor riesgo de presentar la enfermedad. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión de miRNA-144-3p.

miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miRNA-26a-5p son miRNAs asociados con el metabolismo de lípidos, y uno de sus genes blanco es *ABCA1* (**Anexo 17**) (Gómez-Coronado, *et al.*, 2010). En la presente investigación, se identificó un aumento significativo de la expresión de *ABCA1* en los pacientes con EAC, asociado a un menor riesgo de presentar la enfermedad. Experimentos en modelos de ratones aterogénicos han demostrado que la sobreexpresión de *ABCA1* tiene un efecto cardioprotector sobre la aterosclerosis, lo cual aumenta significativamente el eflujo de colesterol y disminuye el tamaño de la placa (Singaraja, *et al.*, 2002). Además, estudios en líneas celulares y modelos murinos han indicado que la sobreexpresión de miRNA-33a-5p y miRNA-144-3p disminuye la expresión de *ABCA1* y los niveles de c-HDL en plasma, por lo que reduce el eflujo de colesterol a ApoA-I. Mientras que, la inhibición de estos miRNAs en ratones

con aterosclerosis, deriva en un aumento significativo de la expresión de *ABCA1*, lo que promueve el transporte reverso de colesterol y la disminución de la lesión aterosclerótica (Ono, *et al.*, 2015; Rayner, *et al.*, 2011; Ramírez, *et al.*, 2013; de Aguiar Vallim, *et al.*, 2013). Sin embargo, en el presente estudio, no se encontró una correlación significativa entre la expresión de miRNA-33a-5p y miRNA-144-3p con *ABCA1*. Debido a que los resultados del presente estudio mostraron una disminución significativa de la expresión de miRNA-33a-5p, contrario a lo reportado por otros autores (Ono, *et al.*, 2015; Rayner, *et al.*, 2011), se realizó un análisis de curvas ROC para determinar los puntos de corte del grupo control y los pacientes con EAC (**Anexo 18**), con lo cual se comprobó que la expresión de miRNA-33a-5p sí se encuentra elevada en los monocitos de pacientes con EAC. Cabe destacar que la mayoría de los pacientes con EAC estaban diagnosticados con DM2 e HTA, por lo que gran porcentaje de ellos se encontraban medicados con estatinas (en su mayoría atorvastatina), hipoglucemiantes (metformina) y antihipertensivos. Al dividir al grupo de EAC de acuerdo con el consumo de dichos fármacos, no encontramos un efecto sobre la expresión de miRNA-33a-5p y miRNA-144-3p con ninguno de los 3 grupos de medicamentos. Sin embargo, Zambrano y cols, encontraron que la expresión de miRNA-33a-5p disminuye significativamente en pacientes con hipercolesterolemia después de ser tratados con atorvastatina (10mg/día) durante un mes (Zambrano, *et al.*, 2018). Además, el grupo de trabajo de Gorur, encontró que la atorvastatina también disminuye la expresión de miRNA-144-3p en plasma de pacientes con EAC (Gorur, *et al.*, 2019). Con base a estas evidencias, no se descarta la posibilidad de que la atorvastatina esté inhibiendo la expresión de ambos miRNAs en monocitos de pacientes con EAC, y que, debido a esto, la disminución observada de miRNA-33a-5p en estas células tiene un efecto cardioprotector. Por otra parte, en el caso de *ABCA1*, existen evidencias de que el tratamiento con atorvastatina aumenta significativamente la expresión de su RNAm en células THP-1 diferenciadas a macrófagos, lo que incrementa el eflujo de colesterol hacia la ApoA-I (Argmann, *et al.*, 2005). Estos datos son similares a los reportados en el presente documento, ya que, al dividir al grupo de enfermos de acuerdo con el consumo de atorvastatina, se encontró que el aumento significativo observado en *ABCA1* se presentó sólo en los enfermos medicados con dicho fármaco.

Estudios con análisis bioinformáticos reportan que las estatinas pueden alterar la expresión de miRNAs en células relacionadas con la aterosclerosis, y han indicado que los genes blanco de miRNAs desregulados en pacientes con angina inestable tratados con estatinas, se encuentran

involucrados en la regulación de la vía de las Rho GTPasas en monocitos y plaquetas (Li, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2017). Las estatinas, al inhibir a la enzima HMG-CoA reductasa, reducen la producción de mevalonato e isoprenoides y, en consecuencia, la producción endógena de colesterol. A su vez, la reducción de isoprenoides disminuye la activación de la vía de señalización de las Rho GTPasas (Cerdea, *et al.*, 2012), una familia de proteínas que controlan diversas vías de transducción de señales en las células eucariotas, y desempeña un papel relevante en la regulación de funciones celulares, como la contracción del músculo liso vascular, organización del citoesqueleto de actina, adhesión y migración celular, citocinesis y expresión de genes asociados con inflamación y estrés oxidante; todos involucrados en la patogenia de la aterosclerosis (Shimokawa, *et al.*, 2002). Por lo que, las estatinas también podrían estar ejerciendo sus funciones ateroprotectoras regulando a diversos miRNAs en monocitos de pacientes con EAC a través de la inhibición de la vía de las Rho GTPasas. Por otra parte, la inhibición de esta vía, también tiene como consecuencia el aumento de la activación del receptor γ activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), un factor de transcripción que, a su vez, activa al receptor nuclear hepático X (LRX), el cual, regula múltiples genes del metabolismo de lípidos, incluido *ABCA1* (Sparrow, *et al.*, 2002; Cerdea, *et al.*, 2012). De acuerdo con nuestros resultados, la atorvastatina podría estar aumentando la expresión de *ABCA1* en monocitos a través de la inhibición de la síntesis de mevalonato. También debido a esto, probablemente no se observó una correlación significativa con los 3 miRNAs que tienen a *ABCA1* como gen blanco.

Cabe mencionar que a través de la inhibición de la vía de las proteínas GTPasas (Rho, Rac, Ras), las estatinas, también tienen la capacidad de reducir el estrés oxidante; esto a través de un decremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, así como de un aumento en la expresión de *NOS3* y concentración de NO (De las Heras, *et al.*, 2005; Lahera, *et al.*, 2007). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en el presente estudio no se observó un aumento en la expresión de *NOS3* por el tratamiento con estatinas.

Con respecto al miRNA-26a-5p, la atorvastatina no tuvo un efecto sobre su expresión, pero al dividir al grupo de EAC de acuerdo con el consumo de hipoglucemiantes, específicamente con metformina, observamos que el aumento significativo de miRNA-26a-5p se presentó sólo en aquellos pacientes con EAC que no se encontraban medicados con dicho fármaco, en cambio, los pacientes que sí consumían metformina, presentaron una expresión similar a la del grupo control.

Además, nuestros resultados mostraron una correlación negativa entre *ABCA1* y la expresión de miRNA-26a-5p; sin embargo, sólo fue significativa en el grupo control, probablemente por el efecto de la atorvastatina y metformina sobre cada uno de ellos, respectivamente. Nuestros datos difieren con los obtenidos por el grupo de trabajo de Jing, donde ellos observaron una disminución significativa de la expresión de miRNA-26a-5p en tejido coronario de ratones con EAC (Jing, *et al.*, 2019). Esta controversia entre los resultados se puede deber a que, la expresión de los miRNAs difiere dependiendo del tejido o célula blanco. Además, hasta el momento no existen estudios previos que relacionen a este miRNA con el transporte reverso del colesterol, por lo que, es necesario realizar otros experimentos en cultivos celulares o modelos murinos para comprobar si en monocitos, este miRNA regula de manera negativa a *ABCA1* en EAC. No obstante, cabe destacar que nuestro estudio es el primero en humanos en mostrar que el aumento de miRNA-26a-5p en monocitos podría estar participando en la formación de la placa aterosclerótica y que, además, su expresión podría ser inhibida por el tratamiento con metformina.

Asimismo, se evaluó el eflujo de colesterol, mecanismo crucial en el TRC, a través del estudio *in vitro* de la capacidad de las HDL de nuestros sujetos de estudio para captar el colesterol proveniente de macrófagos de ratón. Nuestros datos, en consistencia con diversos grupos de trabajo (Khera, *et al.*, 2017; Li, *et al.*, 2013; Saleheen, *et al.*, 2015), mostraron una disminución significativa del eflujo de colesterol en los pacientes que presentaban EAC en comparación con el grupo control, lo cual se asoció a un mayor riesgo de desarrollar dicha enfermedad. Sin embargo, no encontramos una correlación significativa entre la concentración de HDL y el eflujo de colesterol, comprobando que su funcionalidad es independiente de su concentración. Estos resultados nos indican que existe una menor capacidad funcional de las HDL de transportar el colesterol excedente de los tejidos periféricos, lo que provoca una disminución de la captación de colesterol; en consecuencia, este colesterol excedente se acumula en el interior de los macrófagos provocando la formación de células espumosas y el aumento del tamaño de la placa aterosclerótica.

Finalmente, el eflujo de colesterol correlacionó negativamente con la expresión de los 6 miRNAs de estudio y positivamente con *ABCA1*, sin embargo, dichas correlaciones sólo fueron significativas en el grupo control, lo cual pudo deberse al efecto de la medicación, no sólo sobre el eflujo, sino también sobre la expresión de los miRNAs y *ABCA1*. Por lo que, el aumento de la expresión de nuestros miRNAs de estudio podría estar involucrado con una disminución en el

eflujo de colesterol y en consecuencia con el aumento de la formación de la placa aterosclerótica, a través de la inhibición de genes blanco involucrados con dicha patología, por ejemplo, *ABCA1*.

Debido a lo anterior, se esperaría que al encontrar aumentada la expresión de *ABCA1*, y la expresión de miRNA-33a-5p disminuida en el grupo con EAC, el eflujo de colesterol de estos pacientes estaría aumentado, no disminuido. Por otra parte, debido a que el grupo de EAC que no consumía atorvastatina era reducido, no se encontraron diferencias significativas entre este grupo y el medicado. Sin embargo, de acuerdo con los resultados de la regresión logística binaria, el tratamiento con atorvastatina disminuye el riesgo de presentar un eflujo de colesterol bajo. Cabe mencionar que, a pesar de que la mayoría de los pacientes consumían atorvastatina, se desconoce el tiempo de evolución de su enfermedad, así como el tiempo que llevaban con el tratamiento. No obstante, de acuerdo con un estudio previo de Argmann y cols., ellos encontraron que la incubación con atorvastatina o simvastatina en células THP1 marcadas con [3H]-colesterol aumentó significativamente el eflujo de colesterol hacia ApoA-I y HDL3, lo cual fue consistente con la regulación positiva de *ABCA1* inducida por ambas estatinas (Argmann, *et al.*, 2005). Por lo que, en el caso del presente estudio, se necesitaría aumentar el tamaño de muestra del grupo no medicado para comprobar si el eflujo de colesterol se encuentra aún más reducido en aquellos pacientes que no consumen atorvastatina, y de esta manera comprobar que, efectivamente, dicho fármaco aumenta el eflujo de colesterol.

13. CONCLUSIONES

- Existe un aumento significativo en la expresión de miRNA-21-5p, miRNA-221-5p y miRNA-26a-5p en monocitos de pacientes con EAC, así como una disminución de miRNA-33a-5p y miRNA-155-5p.
- La sobreexpresión de miRNA-21-5p y miRNA-221-5p se asocia aun mayor riesgo de presentar la enfermedad; y, la disminución de miRNA-33a-5p se asocia con un menor riesgo.
- La disminución significativa de *NOS3* en monocitos de pacientes con EAC, se asocia con un mayor riesgo de presentar la enfermedad.
- El aumento significativo de la expresión de *ABCA1* en monocitos de pacientes con EAC, provocado por el tratamiento de atorvastatina, se asocia con un menor riesgo de desarrollar dicha enfermedad al aumentar el eflujo de colesterol.
- El tratamiento con metformina disminuye significativamente la expresión de miRNA-26a-5p, miRNA-21-5p y miRNA-221-5p en monocitos de pacientes con EAC.

Por lo tanto, en conjunto, estos resultados indican que los miRNAs presentes en los monocitos participan en la regulación de eventos celulares clave y, su desregulación se encuentra asociada a procesos patológicos como la aterosclerosis. Por lo que, estos miRNAs podrían ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico temprano de la EAC. Además, el hallazgo adicional sobre la regulación de la metformina sobre los miRNAs, puede dar lugar a la realización de ensayos clínicos aleatorizados para determinar la eficacia y seguridad de su uso, así como para confirmar su capacidad regulatoria como nueva estrategia terapéutica para la EAC. Por otro lado, puede dar perspectivas de estudio para analizar su utilidad predictiva en la respuesta favorable al tratamiento.

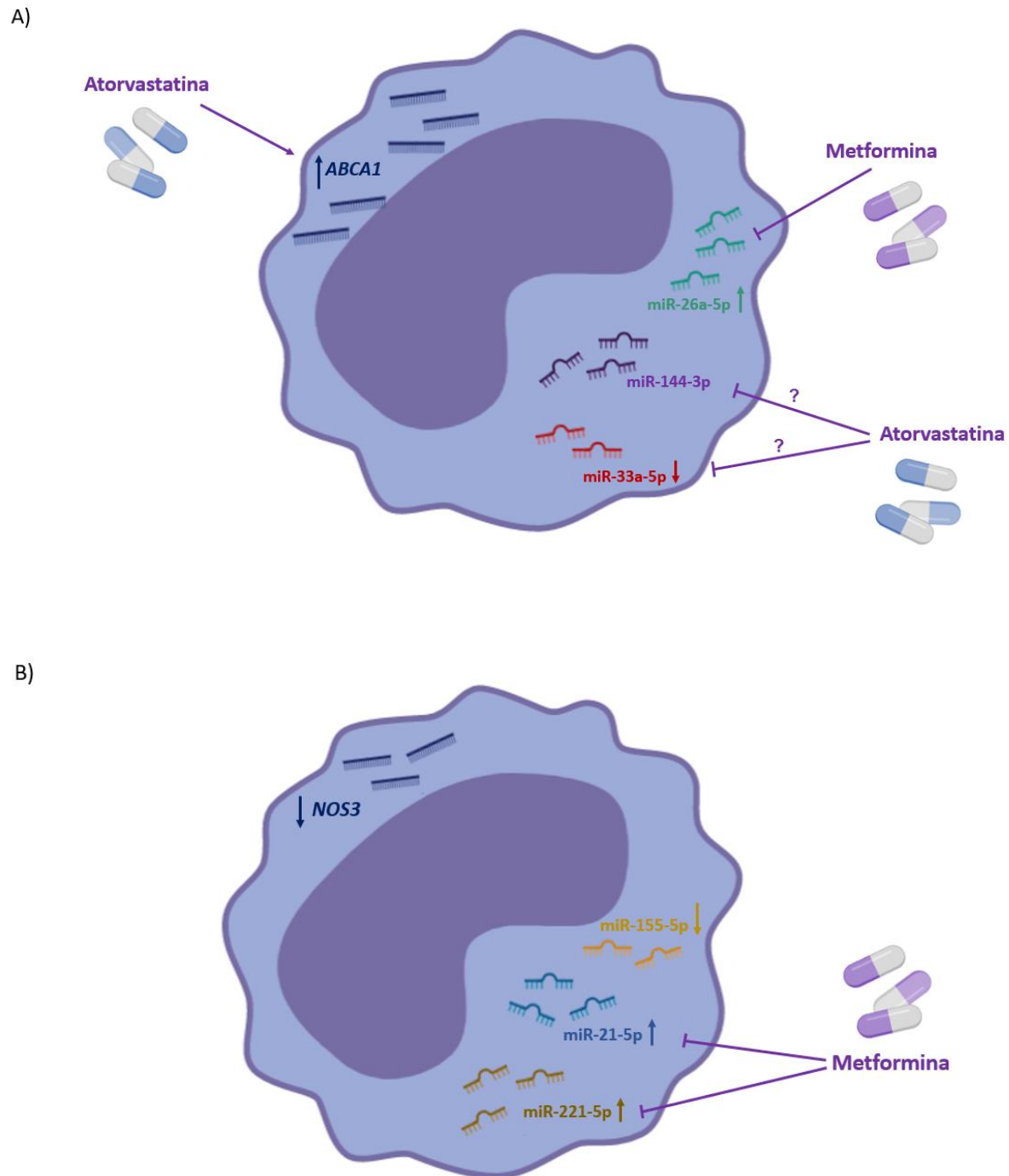


Figura 11. Expresión de los miRNAs de estudio en monocitos de pacientes con EAC medicados. A) Expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-5p, miRNA-26a-5p y *ABCA1*; **B)** Expresión de miRNA-221-5p, miRNA-21-5p, miRNA-155-5p y *NOS3* (Creado con BioRender.com).

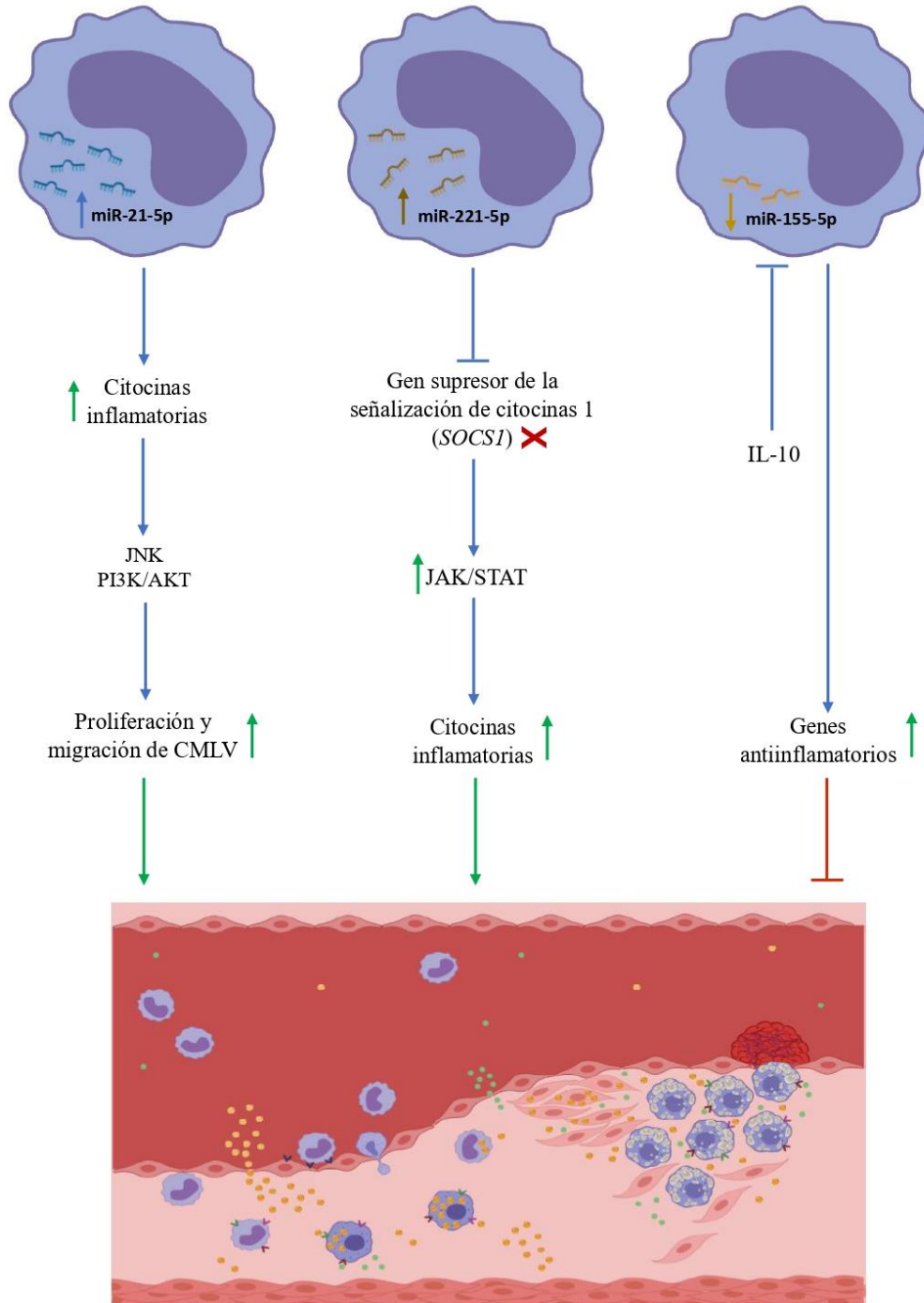


Figura 12. Expresión de miRNA-21-5p, miRNA-221-5p y miR-155-5p en monocitos de pacientes con EAC sin tratamiento. Mecanismos propuestos. La sobreexpresión de miRNA-21-5p puede provocar la proliferación y migración de CMLV a través de la activación de la vía de la JNK o la vía PI3K/AKT. La sobreexpresión de miR-221-5p puede aumentar la expresión de citocinas inflamatorias, a través de la activación de la vía JAK/STAT provocada por la inhibición de *SOCS1*. La inhibición de miR-155-5p puede aumentar la expresión de genes antiinflamatorios y con ello disminuir el tamaño de la placa aterosclerótica (Creado con BioRender.com).

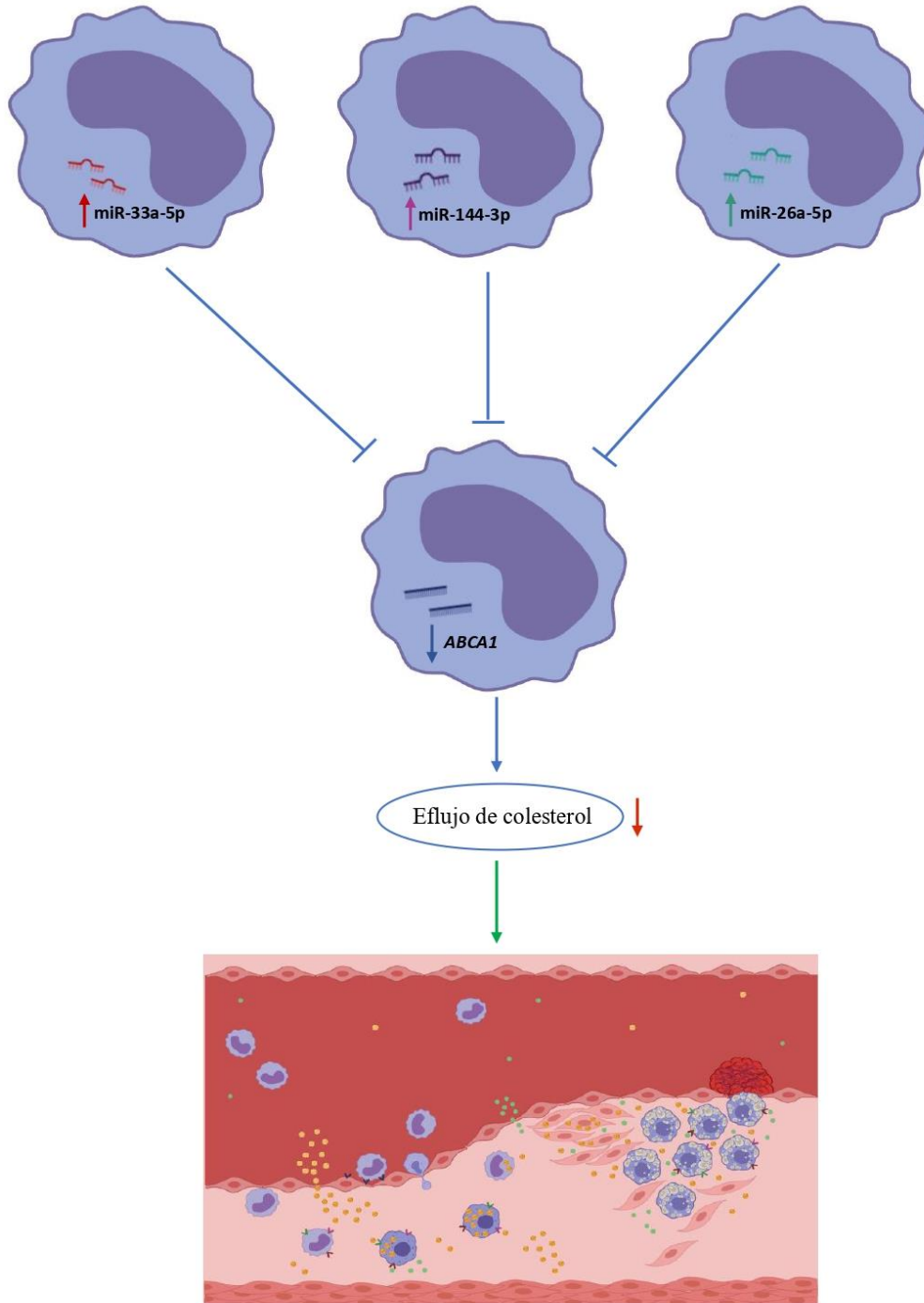


Figura 13. Expresión de miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miR-26a-5p en monocitos de pacientes con EAC sin tratamiento. Mecanismos propuestos. miRNA-33a-5p, miRNA-144-3p y miRNA-26a-5p inhiben la expresión de ABCA1. Por lo que, la sobreexpresión de estos miRNAs tiene como consecuencia una disminución en la expresión de ABCA1, lo que provoca un eflujo de colesterol bajo y con ello, un aumento en el tamaño de la placa aterosclerótica (Creado con BioRender.com).

14. PERSPECTIVAS

- Determinar la expresión de los 6 miRNAs en las HDL de los sujetos de estudio
- Aumentar el tamaño de muestra de pacientes con EAC medicados y no medicados con atorvastatina y metformina
- Evaluar el efecto de la atorvastatina y metformina sobre la expresión de los miRNAs de estudio y ABCA1, *in vivo* e *in vitro*.
- Determinar si los miRNAs de estudio regulan la expresión de ABCA1 y NOS3 a nivel de proteína en los monocitos de los sujetos de estudio.

15. REFERENCIAS

Abdo, A, Rayner, B, van Reyk, D, Hawkins, C (2017). Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. *Redox Biol.* (13): 623–632. <http://doi.org/10.1016/j.redox.2017.08.004>.

Aguilar-Shea AL, Gallardo-Mayo C, Calvo Manuel E, Zamorano Gómez JL (2010). Carotid intima-media thickness and its current usefulness. *Aten Primaria.* 42(9): 482-5. <http://doi.org/10.1016/j.aprim.2009.11.005>.

Almeida SO, Budoff M (2019). Effect of statins on atherosclerotic plaque. *Trends Cardiovasc Med.* 29(8): 451-455. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2019.01.001>.

Alp NJ, Channon KM (2004). Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(3): 413-420. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000110785.96039.f6>.

Al-Atassi T, Toeg HD, Chan V, Ruel M (2016). Coronary artery bypass grafting. In: Sellke FW, del Nido PJ, Swanson SJ, eds. *Sabiston and Spencer Surgery of the Chest*. 9^a Ed. Philadelphia: Elsevier.

Argmann, CA, Edwards, JY, Sawyez, CG, O'Neil, CH, Hegele, RA, Pickering, JG, Huff, MW (2005). Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 280(23): 22212-22221. <http://doi.org/10.1074/jbc.M502761200>.

Aryal B, Singh AK, Rotllan N, Price N, Fernández-Hernando C (2017). MicroRNAs and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 28(3): 273-280. <http://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000420>.

Badimón, L, Martínez-González, J (2006). Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol Supl.* (6): 21-30. [http://doi.org/10.1016/S1131-3587\(06\)74817-8](http://doi.org/10.1016/S1131-3587(06)74817-8)

Badimon L, Vilahur G (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 276(6): 618-32. <http://doi.org/10.1111/joim.12296>.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C (2005). Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomized trials of statins. *Lancet*. 366: 1267-1278. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67394-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67394-1).

Barner, HB, Sundt, TM, Bailey, M, Zang, Y (2001). Midterm results of complete arterial revascularization in more than 1,000 patients using an internal thoracic artery/radial artery T graft. *Ann Surg*. 234(4): 447-452. <http://doi.org/10.1097/00000658-200110000-00004>.

Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks H (2010). Ganong Fisiología médica. 23ª Ed. España: McGraw-Hill.

Bejarano JM, Cuixart CB (2011). Factores de riesgo cardiovascular y atención primaria: evaluación e intervención [Cardiovascular risk factors and Primary Care: evaluation and intervention]. *Aten Primaria*. 43(12): 668-77. <http://doi.org/10.1016/j.aprim.2011.10.002>.

Benavides Trujillo, MC, Pinzón Tovar, A (2008). Óxido nítrico: implicaciones fisiopatológicas. *Colombian Journal of Anesthesiology*. 36(1): 45-52.

Bryce, A, Morales-Villegas, E, Urquiaga, J, Larrauri-Vigna, C (2014). Recuperando la función endotelial. *An Fac Med*. 75(4): 367-373. <http://doi.org/10.15381/anales.v75i4.10859>.

Bu Y, Peng M, Tang X, Xu X, Wu Y, Chen AF, Yang X (2022). Protective effects of metformin in various cardiovascular diseases: Clinical evidence and AMPK-dependent mechanisms. *J Cell Mol Med*. 26(19): 4886-4903. <http://doi.org/10.1111/jcmm.17519>.

Canfrán-Duque A, Ramírez CM, Goedeke L, Lin CS, Fernández-Hernando C (2014). microRNAs and HDL life cycle. *Cardiovasc Res*. 103(3): 414-22. <http://doi.org/10.1093/cvr/cvu140>.

Carvajal, C (2015). LDL oxidada y la aterosclerosis. *Med. leg*. 32(1).

Cengiz, M, Yavuzer, S, Kılıçkiran, Avc, B, Yürüyen, M, Yavuzer, H, Dikici, SA, Karataş, ÖF, Özen, M, Uzun, H, Öngen, Z (2015). Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin Exp Hypertens*. 37(8): 643-649. <http://doi.org/10.3109/10641963.2015.1036064>.

Cerda, A, Hiroyuki Hirata, M, Crespo Hirata RD (2012). Molecular mechanisms underlying statin effects on genes involved in the reverse cholesterol transport Drug Metabol Drug Interact. 27(2): 101-111. <http://doi.org/10.1515/dmdi-2012-0007>.

Chain, SL, HL, Feldman, G, Valberdi, A. (2005). El espesor íntima-media carotídeo, un marcador de aterosclerosis subclínica y riesgo cardiovascular. Importancia de su valoración y dificultades en su interpretación. *Rev. Fed. Arg. Cardiol.* (34): 392-402.

Chen CF, Huang J, Li H, Zhang C, Huang X, Tong G, Xu YZ (2015). MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1. *Gene.* 565(2):246-51. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.014>.

Chen Z, Song S, Zhu J, Lai X (2020). Regulatory mechanism of MiR-21 in formation and rupture of intracranial aneurysm through JNK signaling pathway-mediated inflammatory response. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 13(7): 1834-1841.

Chen, X, Liang, H, Zhang, J, Zen, K, Zhang, CY (2012). Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol.* 22(3): 125-132. <http://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>.

Chen, WJ, Zhang, M, Zhao, GJ, Fu, Y, Zhang, DW, Zhu, HB, Tang, CK, (2012). MicroRNA-33 in atherosclerosis etiology and pathophysiology. *Atherosclerosis* (227): 201-208. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.11.025>.

Chen JY, Ye ZX, Wang XF, Chang J, Yang MW, Zhong HH, Hong FF, Yang SL (2018). Nitric oxide bioavailability dysfunction involves in atherosclerosis. *Biomed Pharmacother.* 97: 423-428. <http://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.122>.

Choo, KB, Soon, YL, Nguyen, PN, Hiew, MS, Huang, CJ (2014). MicroRNA-5p and -3p co-expression and cross-targeting in colon cancer cells. *J Biomed Sci.* (21): 95. <http://doi.org/10.1186/s12929-014-0095-x>.

Chistiakov, DA, Sobenin, IA, Orekhov, AN, Bobryshev, YV (2015). Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *Biomed Res Int.* 2015: 354517. <http://doi.org/10.1155/2015/354517>.

Cisneros Sánchez L, Carrazana Garcés E (2013). Factores de riesgo de la cardiopatía isquémica. *Revista Cubana de Medicina General Integral*. 29(4): 369-378.

Coleman CB, Lightell DJ Jr, Moss SC, Bates M, Parrino PE, Woods TC (2013). Elevation of miR-221 and -222 in the internal mammary arteries of diabetic subjects and normalization with metformin. *Mol Cell Endocrinol*. 374(1-2): 125-9. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2013.04.019>.

Cyr AR, Huckaby LV, Shiva SS, Zuckerbraun BS (2020). Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin*. 36(2): 307-321. <http://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>.

Dai B, Wang F, Nie X, Du H, Zhao Y, Yin Z, Li H, Fan J, Wen Z, Wang DW, Chen C (2020). The Cell Type-Specific Functions of miR-21 in Cardiovascular Diseases. *Front Genet*. (11): 563166. <http://doi.org/10.3389/fgene.2020.563166>.

De Aguiar Vallim, TQ, Tarling, EJ, Kim, T, Civelek, M, Baldán, Á, Esau, C, Edwards, PA (2013). MicroRNA-144 regulates hepatic ATP binding cassette transporter A1 and plasma high-density lipoprotein after activation of the nuclear receptor farnesoid X receptor. *Circ Res*. 112(12): 1602-1612. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300648>.

De Gonzalo-Calvo, D, Iglesias-Gutiérrez, E, Llorente-Cortés, V (2017). Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol*. 70(9): 763-769. <http://doi.org/10.1016/j.rec.2017.05.013>.

Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 11(7): 1156-66. <http://doi.org/10.1101/gr.184901>.

De la Sierra A, Bragulat E (2001). Hipertensión arterial y riesgo cardiovascular. *Medicina Integral*. 37(5): 197-202.

De las Heras N, Sanz-Rosa D, Miana M, Martín B, Cachafeiro V, Lahera V (2005). Las estatinas como antioxidantes. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 17(2): 23-30. [https://doi.org/10.1016/S0214-9168\(05\)73377-5](https://doi.org/10.1016/S0214-9168(05)73377-5).

Desjardins F, Balligand JL (2006). Nitric oxide-dependent endothelial function and cardiovascular disease. *Acta Clin Belg*. 61(6): 326-334. <http://doi.org/10.1179/acb.2006.052>.

Dlouhá D, Hubáček JA (2017). Regulatory RNAs and cardiovascular disease - with a special focus on circulating microRNAs. *Physiol Res.* 5; 66(Suppl 1): S21-S38. <http://doi.org/10.33549/physiolres.933588>.

Dong, J, Liang, YZ, Zhang, J, Wu, LJ, Wang, S, Hua, Q, Yan, YX (2017). Potential Role of Lipometabolism-Related MicroRNAs in Peripheral Blood Mononuclear Cells as Biomarkers for Coronary Artery Disease. *Journal of atherosclerosis and thrombosis.* 24(4): 430–441. <http://doi.org/10.5551/jat.35923>

Dumortier, O, Hinault, C, Van Obberghen, E (2013). MicroRNAs and metabolism crosstalk in energy homeostasis. *Cell Metab.* 18(3): 312-324. <http://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.06.004>.

Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL (2013). Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene.* 532(1): 1-12. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.009>.

Florenzano F, Zavala C (2009). Diabetes y enfermedad coronaria. *Rev. Med. Clin. Condes.* 20(5): 659-669.

Förstermann U, Sessa WC (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 33(7):829-837. <http://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 18(6): 499-502.

Frikke-Schmidt R (2010). Genetic variation in the ABCA1 gene, HDL cholesterol, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Atherosclerosis.* 208(2): 305-316. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.005>.

Galbraith, N, Burton, J, Ekman, MB, Kenney, J, Walker, S, Manek, S, Bishop, C, Carter, JV, Gardner, SA, Polk, H. (2017). IKK-16 decreases miRNA-155 expression and attenuates the human monocyte inflammatory response. *PLoS One.* 12(9): e0183987. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0183987>.

Gao, L, Zeng, H, Zhang, T, Mao, C, Wang, Y, Han, Z, Chen, K, Zhang, J, Fan, Y, Gu, J, Wang, C (2019). MicroRNA-21 deficiency attenuated atherogenesis and decreased macrophage infiltration by targeting Dusp-8. *Atherosclerosis*. (291): 78-86. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.10.003>.

Gil BM, Valero D (2017). Nuevas tecnologías para el diagnóstico genético. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 28(4): 538–545. doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.06.002.

Gómez-Coronado C (2010). Cellular cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Clin Invest Arterioscl*. 22(1): 12-16. http://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_4.

Gorur A, Celik A, Yildirim DD, Gundes A, Tamer L (2019). Investigation of possible effects of microRNAs involved in regulation of lipid metabolism in the pathogenesis of atherosclerosis. *Mol Biol Rep*. 46(1): 909-920. <http://doi.org/10.1007/s11033-018-4547-3>.

Grossman S, Porth, CM (2014). *Fisiopatología: Alteraciones de la salud. Conceptos básicos*. 9^a Ed. Barcelona: Wolters Kluwer.

Hamidpour, M, Bashash, D, Nehzati, P, Abbasalizadeh, M, Nikoogoftar, M, Hamidpour, R (2019). The expression of hSR-B1 on platelets of patients with coronary artery disease (CAD). *Clin Hemorheol Microcirc*. 71(1): 9-15. <http://doi.org/10.3233/CH-170311>.

Hata, A (2013). Functions of microRNAs in cardiovascular biology and disease. *Annu Rev Physiol*. (75): 69-93. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183737>.

He, XM, Zheng, YQ, Liu, SZ, Liu, Y, He, YZ, Zhou, XY (2016). Altered Plasma MicroRNAs as Novel Biomarkers for Arteriosclerosis Obliterans. *J Atheroscler Thromb*. 23(2): 196-206. <http://doi.org/10.5551/jat.30775>.

He, Y, Chevillet, JR, Liu, G, Kim, TK, Wang, K (2014). The effects of microRNA on the absorption, distribution, metabolism and excretion of drugs. *Br J Pharmacol*. 172(11): 2733-2747. <http://doi.org/10.1111/bph.12968>.

Hernández Cuan, Cristina, Mederos Pérez, Iraldo, Labrada Salvat, Carmen, Lorenzo Pérez, Enia, & Almaguer Rodríguez, Carmen. (2002). Variantes anatómicas de irrigación coronaria. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 6(Supl. 1), 784-791.

Hollenstein K, Frei DC, Locher KP (2007). Structure of an ABC transporter in complex with its binding protein. *Nature*. 446(7132): 213-216. <http://doi.org/10.1038/nature05626>.

Horie, T, Baba, O, Kuwabara, Y, Chujo, Y, Watanabe, S, Kinoshita, M, Horiguchi, M, Nakamura, T, Chonabayashi, K, Hishizawa, M, Hasegawa, K, Kume, N, Yokode, M, Kita, T, Kimura, T, Ono, K (2012). MicroRNA-33 deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc*. 1(6): e003376. <http://doi.org/10.1161/JAHA.112.003376>.

Hsu, A, Chen, SJ, Chang, YS, Chen, HC, Chu, PH (2014). Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction. *Biomed Res Int*. (2014): 418628. <http://doi.org/10.1155/2014/418628>.

Hu, YW, Hu, YR, Zhao, JY, Li, SF, Ma, X, Wu, SG, Lu, JB, Qiu, YR, Sha, YH, Wang, YC, Gao, JJ, Zheng, L, Wang, Q (2014). An agomir of miR-144-3p accelerates plaque formation through impairing reverse cholesterol transport and promoting pro-inflammatory cytokine production. *PLoS One*. 9(4): e94997. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094997>.

Huang S, Xu T, Huang X, Li S, Qin W, Chen W, Zhang Z (2019). miR-21 regulates vascular smooth muscle cell function in arteriosclerosis obliterans of lower extremities through AKT and ERK1/2 pathways. *Arch Med Sci*. 15(6): 1490-1497. <http://doi.org/10.5114/aoms.2018.78885>.

Hunter P, Hegele R (2017). Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. *Nat Rev Endocrinol*. 13(5): 278-288. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2016.210>.

Icli B, Dorbala P, Feinberg MW (2014). An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*. 24(6): 241-248. <http://doi.org/10.1016/j.tcm.2014.06.003>.

Jacobo-Albavera L, Domínguez-Pérez M, Medina-Leyte DJ, González-Garrido A, Villarreal-Molina T (2021). The Role of the ATP-Binding Cassette A1 (ABCA1) in Human Disease. *Int J Mol Sci*. 22(4): 1593. <http://doi.org/10.3390/ijms22041593>.

Ji, Y, Wang, N, Ramakrishnan, R, Sehayek, E, Huszar, D, Breslow, JL, Tall, AR (1999). Hepatic scavenger receptor BI promotes rapid clearance of high-density lipoprotein free

cholesterol and its transport into bile. *J. Biol. Chem.* (274): 33398–33402. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.47.33398>.

Jing C, Guo M, Bao X, Li T, Lin J, Lu X, Wang W (2017). Pitavastatin up-regulates eNOS production by suppressing miR-155 expression in lipopolysaccharide-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Ther.* 35 (5). <http://doi.org/10.1111/1755-5922.12282>.

Jing, R, Zhong, QQ, Long, TY, Pan, W, Qian, ZX (2019). Downregulated miRNA-26a-5p induces the apoptosis of endothelial cells in coronary heart disease by inhibiting PI3K/AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 23(11): 4940-4947. http://doi.org/10.26355/eurev_201906_18084.

Kalinowski L, Janaszak-Jasiecka A, Siekierzycka A, Bartoszewska S, Woźniak M, Lejnowski D, Collawn JF, Bartoszewski R (2016). Posttranscriptional and transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia: the role of microRNAs. *Cell Mol Biol Lett.* 6(21): 16. <http://doi.org/10.1186/s11658-016-0017-x>.

Kaski JC, Arrebola-Moreno AL (2011). Inflamación y trombosis en la fibrilación auricular [Inflammation and thrombosis in atrial fibrillation]. *Rev Esp Cardiol.* 64(7): 551-3. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.03.015>.

Kerner, W, Brückel, J (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 122(7): 384-386. <http://doi.org/10.1055/s-0034-1366278>.

Khera, AV, Demler, OV, Adelman, SJ, Collins, HL, Glynn, RJ, Ridker, PM, Rader, DJ, Mora, S (2017). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein particle number, and incident cardiovascular events: an analysis from the JUPITER trial (justification for the use of statins in prevention: an intervention trial evaluating rosuvastatin). *Circulation.* 135(25): 2494–2504. <http://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.025678>

Kim, SH, Kim, GJ, Umemura, T, Lee, SG, Cho, KJ (2017). Aberrant expression of plasma microRNA-33a in an atherosclerosis-risk group. *Mol Biol Rep.* 44(1): 79-88. <http://doi.org/10.1007/s11033-016-4082-z>.

Kim VN (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(5): 376-85.

Kimura, N, Futamura, K, Arakawa, M, Okada, N, Emrich, F, Okamura, H, Sato, T, Shudo, Y, Koyano, TK, Yamaguchi, A, Adachi, H, Matsuda, A, Kawahito, K, Matsumoto, K, Fischbein, MP (2017). Gene expression profiling of acute type A aortic dissection combined with in vitro assessment. *Eur J Cardiothorac Surg.* 52(4): 810-817. <http://doi.org/10.1093/ejcts/ezx095>.

Koturbash, I, Tolleson, WH, Guo, L, Yu, D, Chen, S, Hong, H, Mattes, W, Ning, B (2015). microRNAs as pharmacogenomic biomarkers for drug efficacy and drug safety assessment. *Biomark Med.* 9(11): 1153-1176. <http://doi.org/10.2217/bmm.15.89>.

Kouchoukos, NT, Wareing, TH, Daily, BB, Murphy, SF (1994). Management of the severely atherosclerotic aorta during cardiac operations. *J Card Surg.* 9(5): 490-494. <http://doi.org/10.1111/j.1540-8191.1994.tb00881.x>.

Kuhlencordt, PJ, Gyurko, R, Han, F, Scherrer-Crosbie, M, Aretz, TH, Hajjar, R, Picard, MH, Huang, PL (2001). Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 104(4): 448-454. <http://doi.org/10.1161/hc2901.091399>.

Kumar, A, Fausto, A. (2010). Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. *Saunders Elsevier*: 500.

Kumar, D, Narang, R, Sreenivas, V, Rastogi, V, Bhatia, J, Saluja, D, Srivastava, K (2020). Circulatory miR-133b and miR-21 as Novel Biomarkers in Early Prediction and Diagnosis of Coronary Artery Disease. *Genes.* 11(2): 164. <http://doi.org/10.3390/genes11020164>.

Lahera V, Goicoechea M, de Vinuesa SG, Miana M, de las Heras N, Cachofeiro V, Luño J (2007). Endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation in atherosclerosis: beneficial effects of statins. *Curr Med Chem.* 14(2): 243-8. <http://doi.org/10.2174/092986707779313381>.

Lahoz C, Mostaza JM. (2007). Enfermedad arterial no coronaria (I). La aterosclerosis como enfermedad sistémica. *Rev Esp Cardiol.* 60(2): 184-195. <http://doi.org/10.1157/13099465>.

Lee, RC, Feinbaum, RL, Ambros, V (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. (75): 843-54. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y).

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425(6956): 415-9. <http://doi.org/10.1038/nature01957>.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 21(17): 4663-70. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>.

Li C, Li Y, Lu Y, Niu Z, Zhao H, Peng Y, Li M (2021). miR-26 family and its target genes in tumorigenesis and development. *Crit Rev Oncol Hematol*. 157: 103124. <http://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103124>.

Li, J, Chen, Z, Ren, J, Song, J, Zhang, F, Zhang, J, Lee, C, Li, S, Geng, Q, Cao, C, Xu, N (2015). Effects of statin on circulating microRNAome and predicted function regulatory network in patients with unstable angina. *BMC Medical Genomics* 13(8): 12. <http://doi.org/10.1186/s12920-015-0082-4>.

Li, M, Zhang, J (2015). Circulating MicroRNAs: Potential and Emerging Biomarkers for Diagnosis of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases. *Biomed Res Int*. (2015): 730535. <http://doi.org/10.1155/2015/730535>.

Li, S, Cao, C, Chen, H, Song, J, Lee, C, Zhang, J, Zhang, F, Geng, Q, Li, Z, Li, J (2017). Atheroprotective effects of statins in patients with unstable angina by regulating the blood-borne microRNA network. *Molecular Medicine Reports* (16): 817-827. <http://doi.org/10.3892/mmr.2017.6616>.

Li, XM, Tang, WH, Mosior, MK, Huang, Y, Wu, Y, Matter, W, Gao, V, Schmitt, D, Didonato, JA, Fisher, EA, Smith, JD, Hazen, SL (2013). Paradoxical association of enhanced cholesterol efflux with increased incident cardiovascular risks. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33(7): 1696-1705. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301373>.

Liau NPD, Laktyushin A, Lucet IS, Murphy JM, Yao S, Whitlock E, Callaghan K, Nicola NA, Kershaw NJ, Babon JJ (2018). The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat Commun.* 19;9(1): 1558. <http://doi.org/10.1038/s41467-018-04013-1>.

Liu X (2019). Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions and Their Significance. *Adv Exp Med Biol.* 1141: 241-291.

Liu, Y, Tang, C (2012). Regulation of ABCA1 functions by signaling pathways. *Biochim Biophys Acta.* 1821(3): 522-529. http://doi.org/10.1007/978-981-13-7647-4_5.

Livak, KJ, Schmittgen, TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method. *Methods.* (25): 402–408. <http://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

Lugo-Trampe A, Trujillo-Murillo C (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria.* 11(44):187-192.

Lv X, Liang J, Wang Z (2020). MiR-21-5p reduces apoptosis and inflammation in rats with spinal cord injury through PI3K/AKT pathway. *Panminerva Med.* <http://doi.org/10.23736/S0031-0808.20.03974-9>.

Mahesh G, Biswas R (2019). MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 39(6): 321-330. <http://doi.org/10.1089/jir.2018.0155>.

Mardones, P, Quinones, V, Amigo, L, Moreno, M, Miquel, JF, Schwarz, M, Miettinen, HE, Trigatti, B, Krieger, M, VanPatten, S, Cohen, DE, Rigottu, A (2001). Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J. Lipid Res.* (42): 170–180.

Marques LR, Diniz, TA, Antunes BM, Rossi FE, Caperuto EC, Lira FS, Goncalves DC (2018). Reverse Cholesterol Transport: Molecular Mechanisms and the Non-medical Approach to Enhance HDL Cholesterol. *Front. Physiol.* (9): 1–11. <http://doi.org/10.3389/fphys.2018.00526>.

Martínez-Marroquín Y, Meaney A, Samaniego-Méndez V, Nájera N, Ceballos G, Fernández-Barros C, Meaney E (2023). The TG/HDL-c Lipid Ratio as a Cardiovascular Risk Marker in a

Mexican Urban Middle-Class Population: Do We Need a Risk Score Tailored for Mexicans? *J Clin Med.* 12(18): 6005. <http://doi.org/10.3390/jcm12186005>.

Mateo I, Morillas P, Quiles J, Castillo J, Andrade H, Roldán J, Agudo P, Bertomeu-Martínez V (2011). What measure of carotid wall thickening is the best atherosclerotic loading score in the hypertensive patient: maximum or mean value? *Rev Esp Cardiol.* 64(5): 417-420. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2010.06.007>.

McCoy CE, Sheedy FJ, Qualls JE, Doyle SL, Quinn SR, Murray PJ, O'Neill LA (2010). IL-10 inhibits miR-155 induction by toll-like receptors. *J Biol Chem.* 285(27): 20492-8. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.102111>

Mendoza-González C, Rosas M, Lomelí C, Lorenzo JA, Méndez A, Martínez-Reding J, Martínez-Sánchez C, Pastelín G, Férrez-Santander SM, Attie F (2008). Prevención y tratamiento de la hipertensión arterial sistémica en el paciente con enfermedad arterial coronaria. *Archivos de cardiología de México*, 78(Supl. 2): 58-73.

Minami Y, Satoh M, Maesawa C, Takahashi Y, Tabuchi T, Itoh T, Nakamura M (2009). Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur J Clin Invest.* 39(5): 359-367. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02110.x>.

Mineo, C, Deguchi, H, Griffin, JH, Shaul, PW (2006). Endothelial and antithrombotic actions of HDL. *Circ Res.* 98(11): 1352-1364. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000225982.01988.93>.

Mirzaei, H, Ferns, GA, Avan, A, Mobarhan, MG (2017). Cytokines and MicroRNA in Coronary Artery Disease. *Adv Clin Chem.* (82): 47-70. <http://doi.org/10.1016/bs.acc.2017.06.004>.

Mitchell P, Parkin R, Kroh E, Tewari M (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Biological Science.* 105 (30): 10513-10518. <http://doi.org/10.1073/pnas.080454910>.

Mohajeri, M, Banach, M, Atkin, SL, Butler, AE, Ruscica, M5, Watts, GF, Sahebkar A (2018). MicroRNAs: Novel Molecular Targets and Response Modulators of Statin Therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 39(11): 967-981. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2018.09.005>.

Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F (2013). Guía de Práctica Clínica de la ESC 2013 sobre diagnóstico y tratamiento de la cardiopatía isquémica estable. *Rev Esp Cardiol.* 67(2): 135.e1-e81. <http://doi.org/10.1016/j.recesp.2013.11.006>.

Moody JE, Millen L, Binns D, Hunt JF, Thomas PJ (2002). Cooperative, ATP-dependent association of the nucleotide binding cassettes during the catalytic cycle of ATP-binding cassette transporters. *J Biol Chem.* 277(24): 21111-4. <http://doi.org/10.1074/jbc.C200228200>.

Moore KJ, Freeman MW (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(8): 1702-11. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000229218.97976>.

Morris R, Kershaw NJ, Babon JJ (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci.* 27(12):1984-2009. <http://doi.org/10.1002/pro.3519>.

Mühl H, Pfeilschifter J (2003). Endothelial nitric oxide synthase: a determinant of TNF α production by human monocytes/macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 310(3): 677-680. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.039>.

Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, Li Y, Shioda T, Cohen DE, Gerszten RE, Näär AM. (2010). MicroRNA-33 and the SREBP host genes cooperate to control cholesterol homeostasis. *Science.* 328(5985):1566-1569. <http://doi.org/10.1126/science.1189123>.

Nazari-Jahantigh M, Wei Y, Noels H, Akhtar S, Zhou Z, Koenen RR, Heyll K, Gremse F, Kiessling F, Grommes J, Weber C, Schober A (2012). MicroRNA-155 promotes atherosclerosis by repressing Bcl6 in macrophages. *J Clin Invest.* 122(11): 4190-4202. <http://doi.org/10.1172/JCI61716>.

NCEP (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 285(19): 2486-2497. <http://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.

Novák, J, Olejníčková, V, Tkáčová, N, Santulli, G (2015). Mechanistic Role of MicroRNAs in Coupling Lipid Metabolism and Atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol.* 887: 79-100. http://doi.org/10.1007/978-3-319-22380-3_5.

Oliveira-Carvalho, V, Carvalho, VO, Silva, MM, Guimarães, GV, Bocchi, EA. (2012). MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? *Arq Bras Cardiol.* 98(4): 362-369.

Oliveira-Paula, GH, Lacchini, R, Tanus-Santos, JE (2016). Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene.* 575(2 Pt 3): 584-599. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.061>.

Ono K (2016). Functions of microRNA-33a/b and microRNA therapeutics. *J Cardiol.* 67(1): 28-33. <http://doi.org/10.1016/j.jjcc.2015.10.017>.

Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T (2015). MicroRNA-33a/b in lipid metabolism – novel “thrifty” models. *Circ J.* 79(2): 278-284. <http://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-1252>.

Pabón-Martínez V (2011). MicroARNs: una visión molecular. *Rev. Univ. Ind. Santander.* 43(3): 289-297.

Peñaloza E, Soto-Carrasco G, Krause BJ. MiR-21-5p directly contributes to regulating eNOS expression in human artery endothelial cells under normoxia and hypoxia (2020). *Biochem Pharmacol.* 182: 114288. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114288>.

Pérez-López, FR, Larrad-Mur, L, Kallen, A, Chedraui, P, Taylor, HS (2010). Gender differences in cardiovascular disease: hormonal and biochemical influences. *Reprod Sci.* 17(6): 511-531. <http://doi.org/10.1177/1933719110367829>.

Phillips MC (2018). Is ABCA1 a lipid transfer protein? *J Lipid Res.* 59(5): 749-763. <http://doi.org/10.1194/jlr.R082313>.

Pirola, CJ, Fernández, T, Castaño, G (2015). Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: from serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut.* 64(5): 800–812. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-306996>.

Pizzini, A, Lunger, L, Demetz, E, Hilbe, R, Weiss, G, Ebenbichler, C, Tancevski, I (2017). The Role of Omega-3 Fatty Acids in Reverse Cholesterol Transport: A Review. *Nutrients*. 6; 9(10). <http://doi.org/10.3389/fnut.2021.767535>.

Portilla E, Muñoz W, Sierra C (2014). Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Revista Colombiana de Cardiología*. 21(5): 318-326. <http://doi.org/10.1016/j.rccar.2014.09.003>.

Pulito C, Mori F, Sacconi A, Goeman F, Ferraiuolo M, Pasanisi P, Campagnoli C, Berrino F, Fanciulli M, Ford RJ, Levrero M, Pediconi N, Ciuffreda L, Milella M, Steinberg GR, Cioce M, Muti P, Strano S, Blandino G (2017). Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities. *Cell Discov*. (3): 17022.

Pou J, Rebollo A, Alegret M (2007). El monocito/macrófago como diana terapéutica en la aterosclerosis. *Clin Invest Arterioscl*. 19(2): 92-108. [http://doi.org/10.1016/S0214-9168\(07\)74180-4183](http://doi.org/10.1016/S0214-9168(07)74180-4183).

Rai, H, Parveen, F, Kumar, S, Kapoor, A, Sinha, N (2014). Association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with coronary artery disease: an updated meta-analysis and systematic review. *PLoS One*. 9(11): e113363. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0113363>.

Ramírez, CM, Rotllan, N, Vlassov, AV, Dávalos, A, Li, M, Goedeke, L, Aranda, JF, Cirera-Salinas, D, Araldi, E, Salerno, A, Wanschel, A, Zavadil, J, Castrillo, A, Kim, J, Suárez, Y, Fernández-Hernando, C (2013). Control of cholesterol metabolism and plasma high-density lipoprotein levels by microRNA-144. *Circ Res*. 112(12): 1592-1601. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300626>.

Ravegnini G, Cargnin S, Sammarini G, Zanotti F, Bermejo JL, Hrelia P, Terrazzino S, Angelini S (2019). Prognostic Role of miR-221 and miR-222 Expression in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. 11(7): 970. <http://doi.org/10.3390/cancers11070970>.

Rayner, KJ, Sheedy, FJ, Esau, CC, Hussain, FN, Temel, RE, Parathath, S, van Gils, JM, Rayner, AJ, Chang, AN, Suarez, Y, Fernandez-Hernando, C, Fisher, EA, Moore, KJ (2011). Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest*. 121(7): 2921-2931. <http://doi.org/10.1172/JCI57275>.

- Rayner K, Moore K (2014). microRNA control of HDL Metabolism and function. *Circ Res.* 114(1): 183-192. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300645>.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009). ABC transporters: the power to change. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 10(3): 218–227. <http://doi.org/10.1038/nrm2646>.
- Rippe C, Blimline M, Magerko KA, Lawson BR, LaRocca TJ, Donato AJ, Seals DR (2012). MicroRNA changes in human arterial endothelial cells with senescence: relation to apoptosis, eNOS and inflammation. *Exp Gerontol.* 47(1): 45-51. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2011.10.004>.
- Rivero-Vilches F, de Frutos S, Rodríguez-Puyol M, Rodríguez-Puyol D, Saura M (2001). Guanylate cyclases: physiological processes mediated by cyclic GMP. *Nefrología.* 21(3): 233-239.
- Rotllan, N, Fernández-Hernando, C (2012). MicroRNA Regulation of Cholesterol Metabolism. *Cholesterol.* 2012: 847849. <http://doi.org/10.1155/2012/847849>.
- Rotllan, N, Ramírez, CM, Aryal, B, Esau, CC, Fernández-Hernando, C (2013). Therapeutic silencing of microRNA-33 inhibits the progression of atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 33(8): 1973-1977. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301732>.
- Saleheen, D, Scott, R, Javad, S, Zhao, W, Rodrigues, A, Picataggi, A, Lukmanova, D, Mucksavage, ML, Luben, R, Billheimer, J, Kastelein, JJ, Boekholdt, SM, Khaw, KT, Wareham, N, Rader, DJ (2015). Association of HDL cholesterol efflux capacity with incident coronary heart disease events: a prospective case-control study. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 3(7): 507-513. [http://doi.org/10.1016/S2213-8587\(15\)00126-6](http://doi.org/10.1016/S2213-8587(15)00126-6).
- Sánchez Quesadaa, JL, Ordóñez Llanos, J (2010). Antioxidant and antiinflammatory properties of high-density lipoproteins. *Clin Invest Arterioscl.* 22(Supl 1): 17-21. [http://doi.org/10.1016/S0214-9168\(10\)70014-0](http://doi.org/10.1016/S0214-9168(10)70014-0).
- Sanlialp, M, Dodurga, Y, Uludag, B, Alihanoglu, YI, Enli, Y, Secme, M, Bostanci, HE, Cetin, Sanlialp, S, Tok, OO, Kaftan, A, Kilic, ID (2020). Peripheral blood mononuclear cell microRNAs in coronary artery disease. *J Cell Biochem.* 121(4): 3005-3009. <http://doi.org/10.1002/jcb.29557>.

Seneshaw, M, Mirshani, F, Min, H, Asgharpour, A, Mirshahi, S, Daita, K, Boyett, S, Santhekadur, P, Fuchs, M, Sanyal, A (2016). Fast and simplified method for high through-put isolation of miRNA from highly purified high density lipoprotein. *J Vis Exp.* (113): 54257. <http://doi.org/10.3791/54257>.

Sepúlveda Saavedra J, Soto Domínguez A (2014). *Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular*. 2ª Ed. México: McGraw Hill.

Shah R, Ziegler O, Yeri A, Liu X, Murthy V, Rabideau D, Xiao CY, Hanspers, K, Belcher, A, Tackett, M, Rosenzweig, A, Pico, AR, Januzzi, JL, Das, S (2018). MicroRNAs Associated With Reverse Left Ventricular Remodeling in Humans Identify Pathways of Heart Failure Progression. *Circ Heart Fail.* 11(2): e004278. <http://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004278>.

Shen WJ, Asthana S, Kraemer FB, Azhar S (2018). Scavenger receptor B type 1: expression, molecular regulation, and cholesterol transport function. *J Lipid Res.* 59(7): 1114-1131. <http://doi.org/10.1194/jlr.R083121>.

Shen, WJ, Azhar, S, Kraemer, FB (2018). SR-B1: A Unique Multifunctional Receptor for Cholesterol Influx and Efflux. *Annu Rev Physiol.* (80): 95–116. <http://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121550>.

Shimokawa H. Rho-kinase as a novel therapeutic target in treatment of cardiovascular diseases (2002). *J Cardiovasc Pharmacol.* 39(3): 319-27. <http://doi.org/10.1097/00005344-200203000-00001>.

Singaraja, RR, Fievet, C, Castro, G, James, ER, Hennuyer, N, Clee, SM, Bissada, N, Choy, JC, Fruchart, JC, McManus, BM, Staels, B, Hayden, MR (2002). Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest.* 110: 35–42. <http://doi.org/10.1172/JCI15748>.

Sirtori, C (2014). The pharmacology of statins. *Pharmacological Research.* (88): 3–11.

Sparrow, CP, Baffic, J, Lam, MH, Lund, EG, Adams, A, Fu, X, Hayes, N, Jones, AB, Macnaul, KL, Ondeyka, J, Singh, S, Wang, J, Zhou, G, Moller, DE, Wright, SD, Menke, JG (2002). A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1

mRNA and stimulating cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 277(12): 10021-10027. <http://doi.org/10.1074/jbc.M108225200>.

SSA. Programa Sectorial de Salud (2014). Prevención y control de la obesidad y riesgo cardiovascular 2013-2018.

Stein JH, Korcarz CE, Hurst RT, Lonn E, Kendall CB, Mohler ER, Najjar SS, Rembold CM, Post WS; American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force (2008). Use of carotid ultrasound to identify subclinical vascular disease and evaluate cardiovascular disease risk: a consensus statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force. Endorsed by the Society for Vascular Medicine. *J Am Soc Echocardiogr.* 21(2): 93-111. <http://doi.org/10.1016/j.echo.2007.11.011>.

Suárez Y, Fernández-Hernando C, Pober JS, Sessa WC (2007). Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 100(8): 1164-73. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000265065.26744.17>.

Sun D, Zhang J, Xie J, Wei W, Chen M, Zhao X (2012). MiR-26 controls LXR-dependent cholesterol efflux by targeting ABCA1 and ARL7. *FEBS Lett.* 586(10):1472-1479. <http://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.068>.

Sun HX, Zeng DY, Li RT, Pang RP, Yang H, Hu YL, Zhang Q, Jiang Y, Huang LY, Tang YB, Yan GJ, Zhou JG (2012). Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertension.* 60(6): 1407-1414. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.197301>.

Sun P, Tang LN, Li GZ, Xu ZL, Xu QH, Wang M, Li L (2019). Effects of MiR-21 on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in rats with atherosclerosis via the Akt/ERK signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 23(5):2216-2222. http://doi.org/10.26355/eurrev_201903_17269.

Surina S, Fontanella RA, Scisciola L, Marfella R, Paolisso G, Barbieri M (2021). miR-21 in Human Cardiomyopathies. *Front Cardiovasc Med.* 8: 767064. <http://doi.org/10.3389/fcvm.2021.767064>.

Talbot CPJ, Plat J, Ritsch A, Mensink RP (2018). Determinants of cholesterol efflux capacity in humans. *Prog Lipid Res.* (69): 21-32. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.12.001>.

Tang C, Oram JF (2009). The cell cholesterol exporter ABCA1 as a protector from cardiovascular disease and diabetes. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 563-572. <http://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2009.03.011>.

Tenopoulou M, Doulias PT (2020). Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. *F1000Res.* 9: F1000 Faculty Rev-1190. <http://doi.org/10.12688/f1000research.19998.1>.

Tsai, PC, Liao, YC, Wang, YS, Lin, HF, Lin, RT, Juo, SH (2013). Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers for cerebrovascular disease. *J Vasc Res.* 50(4): 346-354. <http://doi.org/10.1159/000351767>.

Tsompanidi EM, Brinkmeier MS, Fotiadou EH, Giakoumi SM, Kypreos KE (2010). HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 208(1): 3-9. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2009.05.034>.

Valacchi, G, Sticozzi, C, Lim, Y, Pecorelli, A (2011). Scavenger receptor class B type I: a multifunctional receptor. *Ann N Y Acad Sci.* (1229): E1-7. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06205.x>.

Vallejo E (2009). Enfermedad arterial coronaria o cardiopatía isquémica: dos entidades distintas con diferentes procedimientos diagnósticos. *Arch Cardiol Mex.* 79(4): 279-285.

Van Rooij, E, Olson, E (2012). MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. *Nat Rev Drug Discov.* (11): 860-872. <http://doi.org/10.1038/nrd3864>.

Vasan R, Larson MG, Leip EP, Kannel WB, Levy D (2001). Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet.* (358): 1682-1686. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)06710-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06710-1).

Vázquez-Ortiz G, Piña-Sánchez P, Salcedo M (2006). Great potential of small RNAs: RNA interference and microRNA. *Rev Invest Clin.* 58(4):335-49.

Vavluki A, Vavlukis M, Mladenovska K, Dimovski A, Muñoz-García N, de Santisteban Villaplana V, Padro T, Badimon L (2022). Antioxidative Effects of Rosuvastatin in Low-to-Moderate Cardiovascular Risk Subjects. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 43(1): 65-75. <http://doi.org/10.2478/prilozi-2022-0007>.

Velázquez O, Barinagarrementería Aldatz FS, Rubio Guerra AF, Verdejo J, Méndez Bello MA, Violante R, Pavía A, Alvarado-Ruiz R, Lara A (2007). Morbidity and mortality by ischemic heart disease and stroke in Mexico. *Arch Cardiol Mex*. 77(1): 31-39.

Vickers, KC, Palmisano, BT, Shoucri, BM, Shamburek, RD, Remaley, AT (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 13(4): 423-433. <http://doi.org/10.1038/ncb2210>.

Viereck, J, Thum, T (2017). Circulating Noncoding RNAs as Biomarkers of Cardiovascular Disease and Injury. *Circ Res*. 120(2): 381-399. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308434>.

Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ (2004). Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 25(14): 1197-207. <http://doi.org/10.1016/j.ehj.2004.03.011>.

Voloshyna I, Reiss AB (2011). The ABC transporters in lipid flux and atherosclerosis. *Prog Lipid Res*. 50(3): 213-224. <http://doi.org/10.1016/j.plipres.2011.02.001>.

Wagner, J, Riwanto, M, Besler, C, Knau, A, Fichtlscherer, S, Röxe, T, Zeiher, AM, Landmesser, U, Dimmeler, S (2013). Characterization of levels and cellular transfer of circulating lipoprotein-bound microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 33(6): 1392-400. <http://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.300741>.

Wang G, Lin F, Wan Q, Wu J, Luo M (2021). Mechanisms of action of metformin and its regulatory effect on microRNAs related to angiogenesis. *Pharmacol Res*. 164: 105390. <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105390>.

Wang, R, Dong, LD, Meng, XB, Shi, Q, Sun, WY (2015). Unique MicroRNA signatures associated with early coronary atherosclerotic plaques. *Biochem Biophys Res Commun.* 464(2): 574-579. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07.010>.

Wang S, Smith JD (2014). ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *Biofactors.* 40(6): 547-554. <http://doi.org/10.1002/biof.1187>.

Wang, X., Huo, R., Liang, Z., Xu, C., Chen, T., Lin, J., Li, L., Lin, W., Pan, B., Fu, X., & Chen, S. (2022). Simvastatin Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation and Ameliorates Lung Injury in Hyperoxia-Induced Bronchopulmonary Dysplasia via the KLF2-Mediated Mechanism. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022: 8336070. <http://doi.org/10.1155/2022/8336070>.

Watanabe S, Mu W, Kahn A, Jing N, Li JH, Lan HY, Nakagawa T, Ohashi R, Johnson RJ (2004). Role of JAK/STAT pathway in IL-6-induced activation of vascular smooth muscle cells. *Am J Nephrol.* 24(4): 387-92. <http://doi.org/10.1159/000079706>.

Weber, JA, Baxter, DH, Zhang, S, Huang, DY, Huang, KH, Lee, MJ, Galas, DJ, Wang, K (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem.* 56(11): 1733-1741. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>.

World Medical Association (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 310(20): 2191-2194.

Wu X, Wang Y, Yu T, Nie E, Hu Q, Wu W, Zhi T, Jiang K, Wang X, Lu X, Li H, Liu N, Zhang J, You Y (2017). Blocking MIR155HG/miR-155 axis inhibits mesenchymal transition in glioma. *Neuro Oncol.* 19(9): 1195-1205. <http://doi.org/10.1093/neuonc/nox017>.

Wu Y, Ding Y, Ramprasath T, Zou MH (2021). Oxidative Stress, GTPCH1, and Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling in Hypertension. *Antioxid Redox Signal.* 34(9): 750-764. <http://doi.org/10.1089/ars.2020.8112>.

Yang Z, Cappello T, Wang L (2015). Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharm Sin B.* 5(2): 145-150. <http://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.01.002>.

Yu L, Cao G, Repa J, Stangl H (2004). Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. *J Lipid Res.* 45(5): 889-899. <http://doi.org/10.1194/jlr.M300461-JLR200>.

Zambrano T, Hirata RDC, Hirata MH, Cerda Á, Salazar LA (2018). Statins differentially modulate microRNAs expression in peripheral cells of hyperlipidemic subjects: A pilot study. *Eur J Pharm Sci.* (117): 55-61. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.02.007>.

Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ (2011). Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 405(1): 42-46. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.119>.

Zhang YH, Xia LH, Jin JM, Zong M, Chen M, Zhang B (2015). Expression level of miR-155 in peripheral blood. *Asian Pac J Trop Med.* 8(3): 214-219. [http://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60318-7](http://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60318-7).

Zheng L, Sihuang L, Chengyu L (2018). mir-26a-5p regulates cardiac fibroblast collagen expression by targeting ULK1. *Sci Rep.* 8(1): 2104. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-20561-4>.

Zhou L, Li C, Gao L, Wang A (2015). High-density lipoprotein synthesis and metabolism. *Molecular Medicine Reports* (12): 4015-4021. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.3930>.

Zhou M, Wu Y, Li H, Zha X (2020). MicroRNA-144: A novel biological marker and potential therapeutic target in human solid cancers. *Journal of Cancer.* 11(22): 6716-6726. <http://doi.org/10.7150/jca.46293>.

Zhu GF, Yang LX, Guo RW, Liu H, Shi YK, Ye JS, Yang ZH (2014). microRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score. *Coron Artery Dis.* 25(4): 304-310. <http://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000088>.

Zhu N, Zhang D, Chen S, Liu X, Lin L, Huang X, Guo Z, Liu J, Wang Y, Yuan W, Qin Y (2011). Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis.* (215): 286-293. <http://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.12.024>.

16. ANEXOS

ANEXO 1. DATOS DE MEDIAS Y DESVIACIONES ESTÁNDAR DE PUBLICACIONES PREVIAS PARA EL CÁLCULO DEL TAMAÑO DE MUESTRA

miRNA	Controles X±D.E	Enfermos X±D.E	α Error	Poder estadístico	Tamaño de muestra	Muestra	Referencia
miR-33a	3.15 ± 0.76 (n= 18)	15.77 ± 3.24 (n= 18)	0.05	0.80	1	Plasma	Kim, <i>et al.</i> , 2017
			0.01	0.99	2		
	8.55±2.67 (n= 161)	12.84 ± 4.91 (n= 161)	0.05	0.80	12	Células mononucleares	Dong, <i>et al.</i>, 2017
		0.01	0.99	37			
miR-26a-5p	9.38 ± 0.65 (n= 31)	7.96 ± 0.75 (n= 31)	0.05	0.80	4	Suero	Hsu, <i>et al.</i> , 2014
			0.01	0.99	11		
miR-155-5p	2.70 ± 0.31	0.98 ±0.22	0.05	0.80	1	Células mononucleares	Zhang, <i>et al.</i> , 2015
			0.01	0.99	2		
	2.06 ± 0.41	0.13 ±0.25	0.05	0.80	1	Plasma	Zhang, <i>et al.</i> , 2015
			0.01	0.99	2		
	2.73 ± 1.70 (n= 56)	1.05 ± 0.81 (n=54)	0.05	0.80	9	Células mononucleares	Zhu, <i>et al.</i> , 2014
			0.01	0.99	28		
miR-21-5p	1.0 ± 0.2 (n= 9)	2.8 ± 0.4 (n= 8)	0.05	0.80	1	Dissección aórtica	Kimura, <i>et al.</i> , 2017
			0.01	0.99	2		
miR-221-3p	0.8 ± 0.6 (n=3)	1.75 ± 0.75 (n=3)	0.05	0.80	8	Arteria coronaria	Wang, <i>et al.</i> , 2015
			0.01	0.99	25		

X: Media; D.E: Desviación estándar.

ANEXO 2: APROBACIÓN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y DE ÉTICA



SALUD
SECRETARÍA DE SALUD



Instituto Nacional de Cardiología
Ignacio Chávez
Evolución Continua



Carta de Aceptación de Proyecto de Investigación

Ref: INCAR-DG-DI-182-2018

No. de protocolo en el INCAR:	18-1075
Nombre del estudio:	Estudio de miRNAs asociados a HDL y su implicación en la formación de placa aterosclerótica en pacientes con EAC.
Número del estudio:	----
Sitio donde se realizará el estudio:	Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Domicilio del sitio donde se realizará el estudio:	Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, C.P. 14080. Tlalpan, Ciudad de México.

Ciudad de México, a 28 de septiembre de 2018.

Dr. Ricardo Gamboa Ávila
Investigador Responsable del Proyecto
Departamento de Fisiología
Presente.

Dr. Gamboa:

Me permito informar a usted, que su propuesta de proyecto de investigación, ha sido revisada y aprobada por los Comités de Investigación y de Ética en Investigación, en sus sesiones ordinarias del 28 de agosto y 18 de septiembre de 2018, respectivamente.

Ambos Comités revisaron y aprobaron la siguiente documentación:

1. Propuesta de proyecto de investigación, en español.
2. Consentimiento Informado, en español.

Le envío un cordial saludo.

Atentamente,

Dr. Jesús Vargas Barrón
Director de Investigación.

ANEXO 3: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA “IGNACIO CHAVEZ”****CONSENTIMIENTO INFORMADO**

Nombre del paciente _____

Domicilio: _____

Teléfono casa: _____ **cel.** _____

No. Expediente/afiliación: _____

Por medio de la presente doy mi consentimiento para participar de manera voluntaria y sin percepción económica alguna, en el protocolo de investigación intitulado “Estudio de microRNAs asociados con HDL y su implicación en la formación de placa aterosclerótica en pacientes con EAC”. Por lo cual acepto donar una muestra de sangre para la obtención de suero, plasma, HDL y leucocitos; sin costo alguno. Entiendo que los datos generados, así como el nombre (s) de (los) participante (s) son totalmente confidenciales y anónimos.

Me han explicado la importancia y utilidad de la investigación, así mismo he comprendido las explicaciones, las cuales me han dado de manera clara y sencilla. El médico que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado. También comprendo que, en cualquier momento y sin necesidad de dar explicación alguna puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

NOMBRE Y FIRMA DEL RESPONSABLE
DEL PROYECTO

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

DOMICILIO DEL TESTIGO

DOMICILIO DEL TESTIGO

MEXICO, CDMX. A _____ DEL MES DE _____ DE _____

ANEXO 4: VALORES MÁXIMOS Y MEDIOS DEL GIMc EN POBLACIÓN HISPANA

VALOR MÁXIMO									VALOR MEDIO								
DER	HOMBRES HISPANOS				MUJERES HISPANAS				DER	HOMBRES HISPANOS				MUJERES HISPANAS			
Edad/ percentila	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	Edad/ percentila	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.61	0.67	0.72	0.78	0.61	0.67	0.72	0.72	25th	0.53	0.60	0.65	0.71	0.51	0.57	0.65	0.63
50th	0.74	0.82	0.88	0.89	0.67	0.77	0.87	0.88	50th	0.62	0.67	0.78	0.81	0.58	0.69	0.76	0.78
75th	0.87	0.95	1.05	1.05	0.78	0.91	1.00	1.03	75th	0.73	0.82	0.90	0.92	0.67	0.77	0.87	0.92
IZQ	HOMBRES HISPANOS				MUJERES HISPANAS				IZQ	HOMBRES HISPANOS				MUJERES HISPANAS			
Edad/ percentila	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	Edad/ percentila	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.62	0.72	0.77	0.77	0.61	0.66	0.72	0.77	25th	0.55	0.61	0.68	0.72	0.51	0.58	0.62	0.68
50th	0.72	0.83	0.94	0.94	0.66	0.77	0.83	0.88	50th	0.64	0.72	0.80	0.86	0.58	0.68	0.72	0.77
75th	0.88	0.97	1.11	1.11	0.78	0.89	0.97	1.02	75th	0.75	0.85	0.98	0.97	0.68	0.79	0.86	0.91

IZQ: Carótida del lado izquierdo; DER: Carótida del lado derecho (Stein, *et al.*, 2009).

ANEXO 5: SEPARACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES

1. Obtener muestra sanguínea en tubos con EDTA.
2. Diluir la sangre en una proporción 1:1 en PBS IX-Heparina 1%.
3. Añadir la mezcla anterior sobre una solución de “Ficoll-Hypaque” manteniendo la proporción de sangre-PBS 1X 1% heparina. Apoyar la punta de la pipeta sobre la pared del tubo para dejar deslizar la sangre suavemente sobre el Ficoll y poder formar una interfase.
4. Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 30 minutos, a temperatura ambiente y sin freno.
5. Retirar cuidadosamente de la centrifuga. Se formarán 4 fases de acuerdo con el gradiente de densidad: La fase más densa contiene eritrocitos, encima se encuentra el Ficoll, seguido de la fase que contiene a las células mononucleares (CMN) y, por último, la fase que contiene el plasma. Empleando una micropipeta, recuperar la capa que contiene a las CMN en un tubo de 15 mL.
6. Lavar las CMN con PBS 1X mediante centrifugación durante 5 min.
7. Recuperar las CMN en un tubo eppendorf de 1.5 mL, y resuspenderlas con 1mL de buffer de monocitos. Guardar a 4°C.

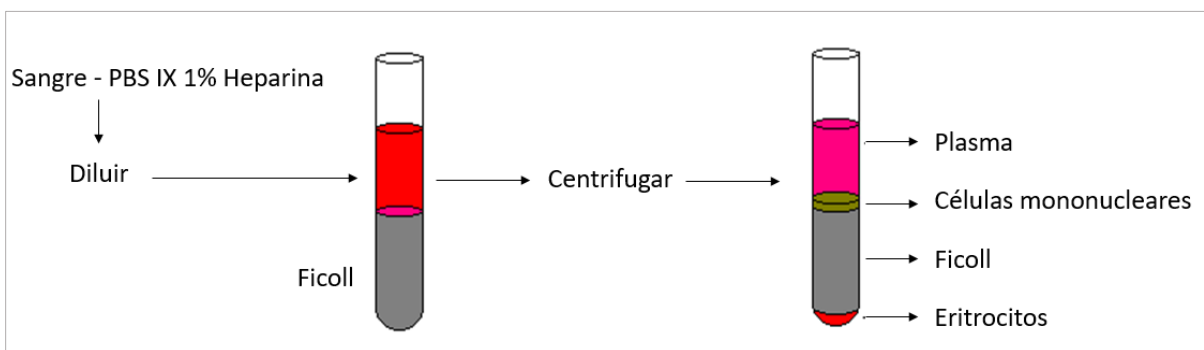


Figura 14. Obtención de células mononucleares por gradiente de densidad

ANEXO 6: EXTRACCIÓN DE MONOCITOS CON MICROPERLAS MACS®

1. Centrifugar las CMN recuperadas en buffer de monocitos a 1300 r.p.m durante 10 min, a 4°C.
2. Aspirar el sobrenadante y resuspender el pellet de células en 80 µL de buffer de monocitos para un total de 10^7 células.
3. Agregar 20 µL de microperlas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos contra monocitos CD14⁺ para un total de 10^7 células.
4. Mezclar con micropipeta e incubar 15 min a una temperatura de 2-8°C.
5. Lavar las células agregando 1-2 mL de buffer de monocitos y centrifugando a 1300 r.p.m durante 10 min a 4°C.
6. Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 500 µL de buffer de monocitos.
7. Montar la columna MS en el magneto y agregar 500 µL de buffer de monocitos para preparar la columna.
8. Agregar las células resuspendidas dentro de la columna.
9. Realizar 3 lavados con 500 µL de buffer de monocitos.
10. Desmontar la columna del magneto y colocarla dentro de un tubo eppendorf de 1.5 mL.
11. Agregar 1 mL de buffer de monocitos dentro de la columna y con ayuda del émbolo recuperar los monocitos obtenidos.
12. Centrifugar los monocitos a 9000 r.p.m durante 5 min, a temperatura ambiente.
13. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet de monocitos en 1 mL de Tripure. Guardar a -80°C.

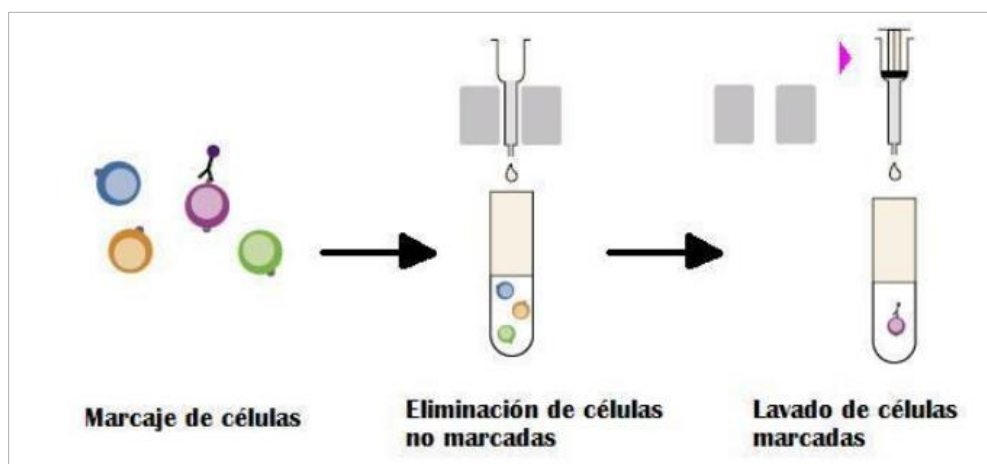


Figura 15. Extracción de monocitos con microperlas MACS®

ANEXO 7: EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE MONOCITOS

1. Descongelar las muestras de monocitos almacenadas en 1 mL de tripure.
2. Añadir 200 μ L de cloroformo a cada muestra.
3. Tapar los tubos y agitarlos vigorosamente en el vortex.
4. Incubar los tubos a temperatura ambiente durante 10 min.
5. Centrifugar a 10,500 r.p.m durante 15 min a 4°C.
6. Se formarán 3 fases. Transferir la fase superior acuosa a un eppendorf de 1.5 mL para la extracción de RNA. Guardar el resto del volumen a 4°C para el aislamiento de DNA y proteínas.
7. Añadir 750 μ L de isopropanol frío. Tapar los tubos y mezclar invirtiéndolos varias veces.
8. Incubar los tubos 10 min a temperatura ambiente para precipitar el RNA.
9. Centrifugar a 10,500 r.p.m durante 15 min a 4°C.
10. Eliminar el sobrenadante y añadir 1.5 mL de etanol al 75% a cada tubo. Se puede guardar a 4°C durante 1 semana o a -80°C durante 1 mes.
11. Centrifugar a 8,000 r.p.m durante 20 min a 4°C. Se formará un pellet de RNA.
12. Eliminar el sobrenadante. Secar al aire para que se evapore el exceso de etanol.
13. Resuspender el pellet en agua libre de RNAsas. Guardar a -80°C.

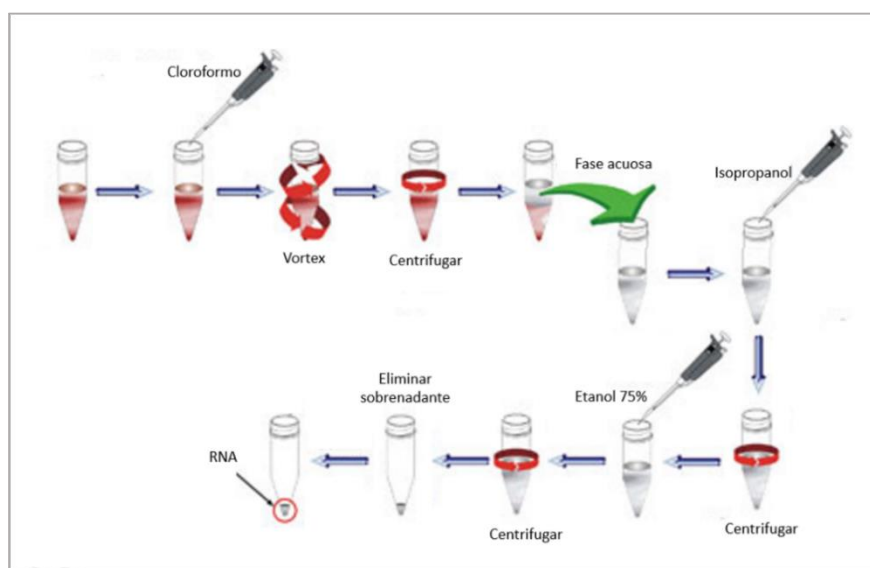


Figura 16. Extracción de RNA total de monocitos

ANEXO 8: OBTENCIÓN DE HDL POR MEDIO DE ULTRACENTRIFUGACIÓN

1. Ajustar 1 mL de plasma a una densidad de 1.063 g/mL con KBr $d=1.21$ g/ml, calculando el volumen necesario de KBr a usar con la fórmula:

$$\frac{((\text{Volumen inicial})(\text{Densidad final} - \text{Densidad inicial}))}{\left(\text{Densidad del KBr con el que se ajusta} - 1.063 \frac{\text{g}}{\text{mL}}\right)}$$

$$= \frac{((1.0 \text{ mL})(1.063 \text{ g/mL} - 1.006 \text{ g/mL}))}{(1.21 \text{ g/mL} - 1.063 \text{ g/mL})} = 0.387 \text{ mL}$$

2. Agregar 1 mL de plasma a un tubo de policarbonato, mezclar con 387 μL de la solución KBr $d= 1.21$ g/mL para tener una densidad final de 1.063 g/mL.

3. Adicionar 1.5 mL de la solución KBr $d= 1.063$ g/mL cuidadosamente por las paredes del tubo para formar 2 fases.

4. Equilibrar bien los tubos con KBr antes de meterlos a la ultracentrífuga.

5. Centrifugar 2h 30 min, a 95,000 r.p.m, a 10°C en la ultracentrífuga.

6. Separar y desechar el sobrenadante (Top ApoB).

7. Mezclar el infranadante y medir el volumen (≈ 1.2 mL) para ajustar con KBr sólido a una densidad de 1.21 g/mL con la siguiente fórmula:

$$\frac{((\text{Volumen})(\text{Densidad final} - \text{Densidad inicial}))}{1 - [(\text{Densidad final})(0.312)]}$$

$$= \frac{((1.2 \text{ mL})(1.21 \text{ g/mL} - 1.063 \text{ g/mL}))}{1 - [(1.21 \text{ g/mL})(0.312)]} = 0.28 \text{ g}$$

8. Agregar 0.28g de KBr y mezclar cuidadosamente con el vórtex.

9. Adicionar 1.5 mL de la solución KBr $d= 1.21$ g/mL cuidadosamente por las paredes del tubo para formar 2 fases.
10. Equilibrar bien los tubos con KBr antes de meterlos a la ultracentrífuga.
11. Centrifugar 3h 15 min, a 95,000 r.p.m, a 10°C en la ultracentrífuga.
12. Colectar el sobrenadante (HDL) y transferir a otro tubo de policarbonato (≈ 800 μL).
13. Agregar 2.0 mL de la solución KBr $d= 1.21$ g/mL por las paredes del tubo.
14. Equilibrar bien los tubos con KBr antes de meterlos a la ultracentrífuga.
15. Centrifugar 3h 15 min, a 95,000 r.p.m, a 10°C en la ultracentrífuga (Lavado).
16. Recuperar el sobrenadante (HDL) en un microtubo de 1.5 mL (≈ 600 μL).
17. Dializar con PBS 10mM pH= 7.4 toda la noche (realizar 2 cambios).
18. Cuantificar la proteína por el Método de Lowry.

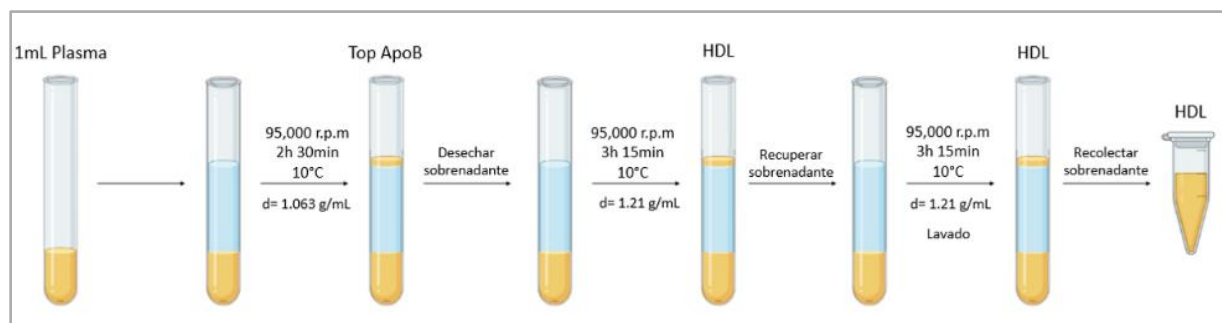


Figura 17. Obtención de HDL por ultracentrifugación

ANEXO 9: EFLUJO DE COLESTEROL CON LA LINEA CELULAR J774

1. Sembrar 200 mil células por pozo en 1 mL de medio RPMI suplementado con SFB al 10% en placas de 24 pozos. Mantener en incubadora a 37°C con CO₂ al 5% durante 24h.

*Diluir un frasco de RPMI-1640 en 900 mL de agua estéril, agregar 2g de bicarbonato de sodio y 0.29 g de L-glutamina. Adicionar 10 mL de mezcla de antibióticos penicilina/estreptomicina 100X y 100 mL de SFB (10%). Ajustar pH a 7.4.

2. Marcar las células con colesterol tritiado: 1.0 mL de RPMI-SFB10% + 0.5μCi [3H]-colesterol + 2 μg de inhibidor de ACAT.

*Pesar 5mg del inhibidor de ACAT y diluir en 2.5 mL de DMSO (2 mg/mL). Por cada 100 mL de RPMI, se agregan 100μL de Stock del inhibidor (2 μg/mL).

3. 24h después, lavar 1 vez cada pozo con 1mL de RPMI no suplementado (sin SFB).

4. Incubar la mitad izquierda de la placa con 1.0 mL de RPMI no suplementado + 0.4% de ASB + 2 μg de inhibidor de ACAT. La mitad derecha con 1.0 mL de RPMI no suplementado + 0.4% de ASB + 2 μg de inhibidor de ACAT + AMPc.

*Pesar 5mg de AMPc y diluir en 337.5 μL de agua estéril (0.015mg/μL). Por cada 10 mL de RPMI no suplementado + 0.4% de ASB, se agregan 100μL de AMPc.

5. Después de 18h, lavar 1 vez cada pozo con 1mL de RPMI no suplementado.

6. Agregar las HDL a una concentración de 20 μg/mL de RPMI no suplementado (500 μL por pozo).

*Son 6 pozos por tratamiento (3 sin AMPc y 3 con AMPc).

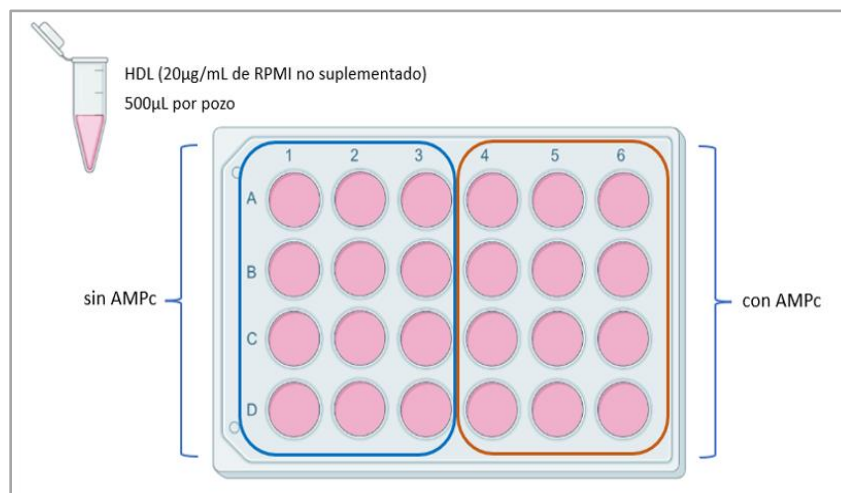


Figura 18. Diseño de una placa de 24 pozos para el ensayo de Eflujo de colesterol

ANEXO 10: TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE RNA TOTAL

Siguiendo las indicaciones del kit “HighCapacity cDNA Reverse Transcription”:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:
 - 2.0 μ L de RT Random Primers (10x)
 - 0.8 μ L de dNTPs (100 mM)
 - 1.0 μ L de Transcriptasa reversa (50 u/ μ L)
 - 2.0 μ L de Buffer (10x)
 - 1.0 μ L de inhibidor de RNasa (20 u/ μ L)
 - 3.2 μ L de agua libre de RNasas
2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.
3. En tubos de 0.2 mL, agregar 10 μ L de la mezcla anterior y 10 μ L de RNA total a una concentración final de 0.05 μ G/ μ L.
4. Centrifugar cada tubo para mezclar las muestras.
5. Colocar los tubos adecuadamente en
6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25 °C	37 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

7. Guardar las muestras de cDNA total a -80 °C

ANEXO 11: PCR EN TIEMPO REAL DE los RNAm

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:
 - 0.63 μ L del Ensayo TaqMan del miRNA específico de estudio (20x)
 - 6.25 μ L de Master Mix
 - 17.12 μ L de agua libre de RNasas
2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.
3. En una placa de 96 pozos, agregar 24 μ L de la mezcla anterior y 1 μ L de cDNA total
4. Centrifugar la placa para mezclar las muestras.
5. Colocar la placa adecuadamente en
6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Cada uno de 40 ciclos			
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15s	1 min

ANEXO 12: TRANSCRIPCIÓN REVERSA DE miRNAs

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:

- 0.75 μ L del Primer específico del miRNA de estudio (20x)
- 0.15 μ L de dNTPs (100 mM)
- 1.0 μ L de Transcriptasa reversa (50 u/ μ L)
- 1.5 μ L de Buffer (10x)
- 0.19 μ L de inhibidor de RNasa (20 u/ μ L)
- 8.66 μ L de agua libre de RNasas
- 0.75 μ L Spike in control cel-miR-39

2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.

3. En tubos de 0.2 mL, agregar 13 μ L de la mezcla anterior y 2 μ L de RNA total a una concentración final de 10 ng/ μ L.

4. Centrifugar cada tubo para mezclar las muestras.

5. Colocar los tubos adecuadamente en

6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	16 °C	42 °C	85 °C	4 °C
Tiempo	30 min	30 min	5 min	∞

7. Guardar las muestras de cDNA total a -80 °C

ANEXO 13: PCR EN TIEMPO REAL DE miRNAs

1. En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar por muestra:
 - 1.0 μ L del Ensayo TaqMan del miRNA específico de estudio (20x)
 - 10.0 μ L de Master Mix
 - 7.0 μ L de agua libre de RNasas
2. Mezclar con ayuda de una micropipeta y mantener en frío.
3. En una placa de 96 pozos, agregar 18 μ L de la mezcla anterior y 2 μ L del
4. Centrifugar la placa para mezclar las muestras.
5. Colocar la placa adecuadamente en
6. Las condiciones de ciclaje son las siguientes:

	Cada uno de 40 ciclos			
	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2 min	10 min	15s	1 min

ANEXO 14: EXPRESIÓN DE miRNAs Y GENES BLANCO DE ACUERDO CON EL CONSUMO DE ANTIHIPERTENSIVOS

	Controles (n=50)	EAC Grupo no medicado con antihipertensivos (n=23)	p1	EAC Grupo medicado con antihipertensivos (n=37)	p2	p3
miR-33a-5p	9.43 (0.61-50.75)	3.61 (0.58-15.26)	0.001	4.08 (0.31-15.98)	0.002	0.539
miR-155-5p	13.10 (0.74-61.64)	8.92 (1.30-20.71)	0.322	6.06 (0.91-33.15)	0.080	0.207
miR-144-3p	8.15 (0.41-77.53)	5.58 (0.10-67.11)	0.634	6.71 (0.21-70.01)	0.698	0.426
miR-26a-5p	5.31 (0.23-43.95)	9.58 (3.76-31.82)	0.123	9.03 (1.06-52.66)	0.127	0.644
miR-21-5p	7.58 (0.69-61.42)	14.78 (1.45-123.36)	0.008	14.47 (2.07-130.43)	0.015	0.607
miR-221-5p	8.25 (0.12-74.70)	22.24 (10.03-64.55)	0.006	17.60 (2.47-116.42)	0.008	0.394
<i>ABCA1</i>	9.97 (1.44-26.84)	12.17 (5.68-28.88)	0.282	12.16 (6.58-46.47)	0.081	0.461
<i>NOS3</i>	108.44 (5.70-1125.22)	30.93 (1.65-129.55)	< 0.001	22.86 (1.00-124.21)	< 0.001	0.132

p1: EAC grupo no medicado vs controles; p2: EAC grupo medicado vs controles; p3: EAC Grupo no medicado vs EAC grupo medicado; Los datos expresan la mediana (mín-máx); p< 0.05.

ANEXO 15: CORRELACIÓN ENTRE DATOS ANTROPOMÉTRICOS Y miRNAs/GENES BLANCO

	miRNA-33a-5p				miRNA-155-5p			
	Controles		EAC		Controles		EAC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	-0.153	0.289	0.129	0.330	0.054	0.711	-0.067	0.612
IMC	0.001	0.997	-0.034	0.797	-0.089	0.539	0.079	0.549
Colesterol total	0.030	0.840	0.032	0.809	-0.228	0.123	-0.087	0.513
c-LDL	-0.187	0.219	0.032	0.810	-0.320	0.032	-0.048	0.722
c-HDL	0.134	0.354	0.236	0.075	0.091	0.531	-0.010	0.940
Triglicéridos	-0.192	0.192	-0.376	0.004	-0.023	0.876	0.080	0.559
Glucosa	0.140	0.336	-0.025	0.852	-0.026	0.861	-0.022	0.869
PAS	0.122	0.407	-0.003	0.980	0.116	0.426	0.025	0.849
PAD	-0.016	0.913	-0.099	0.456	-0.033	0.823	0.025	0.851
FC	-0.275	0.053	0.014	0.918	-0.175	0.224	0.336	0.009

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

	miRNA-144-5p				miRNA-26a-5p			
	Controles		EAC		Controles		EAC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	-0.002	0.990	0.050	0.712	0.228	0.115	-0.076	0.565
IMC	-0.128	0.380	-0.006	0.964	-0.105	0.471	-0.017	0.899
Colesterol total	-0.062	0.683	0.046	0.732	-0.126	0.404	0.077	0.560
c-LDL	-0.188	0.221	0.053	0.697	-0.125	0.418	-0.060	0.657
c-HDL	0.198	0.172	-0.073	0.593	0.210	0.148	0.050	0.709
Triglicéridos	-0.112	0.455	-0.128	0.357	-0.044	0.773	0.060	0.657
Glucosa	0.041	0.783	-0.072	0.597	0.250	0.086	-0.290	0.026
PAS	-0.044	0.768	0.082	0.543	0.008	0.958	-0.097	0.462
PAD	-0.221	0.127	0.103	0.443	-0.239	0.102	-0.108	0.413
FC	-0.031	0.833	0.193	0.146	-0.180	0.216	0.125	0.341

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

	miRNA-21-5p				miRNA-221-5p			
	Controles		EAC		Controles		EAC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	0.060	0.677	-0.169	0.197	0.028	0.847	-0.077	0.560
IMC	-0.061	0.676	-0.048	0.715	0.014	0.925	0.084	0.529
Colesterol total	-0.053	0.722	0.089	0.502	-0.201	0.175	0.059	0.660
c-LDL	0.030	0.844	0.087	0.518	-0.167	0.266	0.085	0.530
c-HDL	0.211	0.141	0.128	0.337	0.241	0.092	0.181	0.177
Triglicéridos	0.058	0.697	-0.012	0.931	0.013	0.931	-0.017	0.903
Glucosa	0.108	0.461	-0.381	0.003	0.066	0.651	-0.204	0.125
PAS	0.060	0.683	-0.101	0.442	0.054	0.717	-0.086	0.516
PAD	-0.072	0.623	-0.085	0.516	-0.128	0.379	0.018	0.893
FC	-0.212	0.139	0.256	0.048	-0.121	0.403	0.208	0.114

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

	ABCA1				NOS3			
	Controles		EAC		Controles		EAC	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad	-0.157	0.278	0.085	0.533	-0.184	0.200	-0.058	0.661
IMC	-0.030	0.839	-0.035	0.801	0.216	0.131	0.013	0.924
Colesterol total	0.282	0.055	-0.174	0.199	0.052	0.726	0.077	0.561
c-LDL	0.211	0.164	-0.181	0.185	-0.111	0.468	0.122	0.356
c-HDL	0.055	0.703	0.164	0.233	0.090	0.534	0.130	0.326
Triglicéridos	-0.083	0.577	-0.252	0.068	-0.218	0.133	0.181	0.178
Glucosa	-0.212	0.144	0.194	0.152	0.080	0.586	-0.031	0.812
PAS	-0.077	0.601	0.006	0.968	0.003	0.986	-0.180	0.170
PAD	0.025	0.862	-0.153	0.260	0.236	0.100	-0.023	0.863
FC	-0.128	0.375	-0.176	0.193	0.075	0.607	0.292	0.024

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

ANEXO 16: CORRELACIÓN ENTRE EL EFLUJO DE COLESTEROL Y DATOS ANTROPOMÉTRICOS

	Controles		EAC		EAC Grupo no medicado		EAC Grupo medicado	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Edad (años)	0.035	0.812	0.096	0.507	0.237	0.435	-0.179	0.345
IMC (kg/m ²)	0.019	0.899	-0.204	0.155	-0.014	0.964	-0.200	0.290
Col T (mg/dl)	0.010	0.948	0.035	0.809	-0.051	0.868	0.056	0.767
c-HDL (mg/dl)	-0.166	0.259	0.077	0.594	0.093	0.762	0.102	0.593
c-LDL (mg/dl)	0.065	0.673	0.022	0.881	-0.014	0.964	0.014	0.943
Triglicéridos (mg/dl)	-0.236	0.114	0.126	0.392	0.187	0.561	0.100	0.604
Glucosa (mg/dl)	-0.145	0.326	0.094	0.516	0.325	0.279	-0.055	0.774
PAS (mmHg)	-0.191	0.202	0.168	0.244	0.275	0.363	0.091	0.632
PAD (mmHg)	-0.022	0.882	0.090	0.536	0.336	0.261	-0.152	0.422
FC (pulsaciones/min)	0.243	0.096	-0.083	0.569	-0.319	0.288	0.007	0.972

r: Coeficiente de correlación; p<0.05 (Prueba de Pearson).

ANEXO 17: SITIOS DE UNIÓN DE LOS miRNAs Y RNAm DE ESTUDIO

mRNA	miRNA	Posición en la región 3' UTR	Bases emparejadas entre RNAm (arriba) y miRNA (abajo)	Tipo unión
<i>ABCA1</i>	miR-33a-5p	150-157	5' ...CAAUGCAAUGCAAUU-CAAUGCAA... 3' ACGUUACGUUGAUGUUACGUG	8 mer
		1475-1482	5' ...UUUUUUUAAUUGCAA---CAAUGCAA... 3' ACGUUACGUUGAUGUUACGUG	8 mer
<i>ABCA1</i>	miR-26a-5p	227-233	5' ...GCUCUCAAGUGAAAGACUUGAAU... 3' UCGGAUAGGACCUAAUGAACUU	7mer-A1
<i>ABCA1</i>	miR-144-3p	116-123	5' ...GAAGAAGUAAACUGGAUACUGUA... 3' UCAUGUAGUAGAUUUGACAU	8 mer
		2687-2693	5' ...AACCAAACCUACACUACUGUAU... 3' UCAUGUAGUAGAUUUGACAU	7mer-A1
<i>NOS3</i>	miR-155-5p	133-139	5' ...AGGCUGCAAGGAUUCAGCAUUAU... 3' UGGGGAUAGUGCUAAUCGUAAUU	7mer-m8
<i>NOS3</i>	miR-221-5p	-----	-----	-----
<i>NOS3</i>	miR-21-5p	-----	-----	-----

**ANEXO 18: PUNTOS DE CORTE DE EXPRESIÓN DEL miRNA-33a-5p
(ANÁLISIS DE CURVAS ROC)**

	Controles	EAC	EAC Grupo no medicado con atorvastatina	EAC Grupo medicado con atorvastatina
miR-33a-5p	4.6582	7.6833	3.5633	3.7471



Article

Overexpression of microRNA-21-5p and microRNA-221-5p in Monocytes Increases the Risk of Developing Coronary Artery Disease

Yazmín Estela Torres-Paz ^{1,2}, Ricardo Gamboa ¹, Giovanni Fuentevilla-Álvarez ^{1,3}, María Elena Soto ⁴,
Nadia González-Moyotl ^{1,5}, Rocío Martínez-Alvarado ⁶, Margarita Torres-Tamayo ⁶,
Edgar Samuel Ramírez-Marroquín ⁷, Xicoténcatl Vásquez-Jiménez ⁷, Víctor Sainz-Escarrega ⁷
and Claudia Huesca-Gómez ^{1,*}

- ¹ Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City 14080, Mexico; rgamboa_2000@yahoo.com (R.G.); fuentevilla_alvarez@hotmail.com (G.F.-Á.); nadigm93@gmail.com (N.G.-M.)
 - ² Postgraduate Program in Medical, Dental and Health Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México City 04510, Mexico
 - ³ Biochemistry Department, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City 11350, Mexico
 - ⁴ Immunology Department, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City 14080, Mexico; mesoto50@hotmail.com
 - ⁵ Master’s Program in Health Science, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City 11350, Mexico
 - ⁶ Endocrinology Department, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City 14080, Mexico; orssino@yahoo.com (R.M.-A.); mtt1199@yahoo.com (M.T.-T.)
 - ⁷ Cardiothoracic Surgery Department, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City 14080, Mexico; samuelramirez50@gmail.com (E.S.R.-M.); dr.xicovasquez@hotmail.com (X.V.-J.); victorsainze@gmail.com (V.S.-E.)
- * Correspondence: claudia.huesca@cardiologia.org.mx



Citation: Torres-Paz, Y.E.; Gamboa, R.; Fuentevilla-Álvarez, G.; Soto, M.E.; González-Moyotl, N.; Martínez-Alvarado, R.; Torres-Tamayo, M.; Ramírez-Marroquín, E.S.; Vásquez-Jiménez, X.; Sainz-Escarrega, V.; et al.

Overexpression of microRNA-21-5p and microRNA-221-5p in Monocytes Increases the Risk of Developing Coronary Artery Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8641. <https://doi.org/10.3390/ijms24108641>

Academic Editors: Cristina Vassalle and Melania Gaggini

Received: 18 April 2023

Revised: 5 May 2023

Accepted: 9 May 2023

Published: 12 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: MicroRNAs (miRs) regulate gene expression at the post-transcriptional level and are found to be present in monocytes. This study aimed to investigate miR-221-5p, miR-21-5p, and miR-155-5p, their expression in monocytes, and their role in coronary arterial disease (CAD). The study population comprised 110 subjects, and RT-qPCR was used to examine the miR-221-5p, miR-21-5p, and miR-155-5p expressions in monocytes. Results: the miR-21-5p ($p = 0.001$) and miR-221-5p ($p < 0.001$) expression levels were significantly higher in the CAD group, and the miR-155-5p ($p = 0.021$) expression levels were significantly lower in the CAD group; only miR-21-5p and miR-221-5p upregulation was found to be associated with an increased CAD risk. The results show significant increases in miR-21-5p in the unmedicated CAD group with the metformin patients vs. the healthy control group ($p = 0.001$) and vs. the medicated CAD group with metformin ($p = 0.022$). The same was true for miR-221-5p in the CAD patients unmedicated with metformin vs. the healthy control group ($p < 0.001$). Our results from Mexican CAD patients show that the overexpression in monocytes of miR-21-5p and miR-221-5p increases the risk of the development of CAD. In addition, in the CAD group, the metformin downregulated the expression of miR-21-5p and miR-221-5p. Also, the expression of endothelial nitric oxide synthase (NOS3) decreased significantly in our patients with CAD, regardless of whether they were medicated. Therefore, our findings allow for the proposal of new therapeutic strategies for the diagnosis and prognosis of CAD and the evaluation of treatment efficacy.

Keywords: microRNA; monocytes; coronary artery disease

1. Introduction

Coronary arterial disease (CAD) is the pathologic process of atherosclerosis affecting the coronary arteries and is considered the most common type of heart disease [1]. The

main cardiovascular risk factor is the formation of atherosclerotic plaque [2,3]. The process begins with the reactive oxygen species' (ROS) overproduction in the intima layer of the coronary artery, an increase in vasoconstrictors, and a decrease in vasodilation agents, which is known as endothelial dysfunction [4]. This damage causes greater endothelial permeability, allowing the passage of low-density lipoproteins (LDL) to the intima, where they are oxidized by ROS [5]. Nitric oxide (NO) is the main vasodilator affected during the atherosclerotic process. Endogenous production is dependent on the activity of the enzyme endothelial NO synthase (eNOS) [6]. The bioavailability of NO is affected due to an increase in ROS, which is a hallmark feature of endothelial dysfunction in vascular disease states [7]. According to the literature, the expression of eNOS (NOS3) and the NO release can be regulated post-transcriptionally by small non-coding RNAs (miRs) [8].

The recruitment and internalization of circulating monocytes into the arterial intima constitutes one of the first steps in the initiation and progression of atherosclerosis [6]. Monocytes have been identified as expressing microRNAs (miRs). MiRNAs are small non-coding RNA sequences that are present in the genomes of a great variety of organisms and that bind to the 3' untranslated region (UTR) of specific mRNAs according to the complementarity of their sequences. As a result of this bind, miRNAs can inhibit translation or promote mRNA degradation [9,10], and are consequently involved in the regulation of gene expression at the post-transcriptional level. Moreover, they are considered molecular markers for the detection of various diseases because of their presence in various body fluids, such as serum and plasma. Some of the miRs have been found to be involved in inflammation and oxidative stress, and their dysregulation has been implicated in various diseases, including cardiovascular diseases and atherosclerotic plaque formation [11].

Some of the miRs found to be involved in inflammation and oxidative stress—processes occurring during the pathogenesis of atherosclerosis—include miR-21-5p, miR-155-5p, and miR-221-5p. MiR-21-5p has been described as being highly expressed in different cell types of the cardiovascular system; however, under cardiovascular disease conditions, its expression is deregulated in the heart and vasculature [12]. MiR-21 is abundant in the vessel wall and responds with differential expression upon shear or mechanical stress to the vessel. In humans, miR-21 is expressed in most cell types but is highly expressed in podocytes, dendritic cells, and CD14⁺ monocytes [13]. MiRNA-21 expression on endothelial cells has been found to be significantly upregulated by shear stress treatment and to cause an anti-apoptotic effect by directly targeting the PTEN tumor suppressor gene [14]; its overexpression inhibits the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR α), resulting in the upregulation of the expressions of VCAM-1 and MCP-1 [15].

On the other hand, it is known that miR-221-3p regulates different vascular physiological processes and is involved in various vascular-related pathological mechanisms [16]. Nevertheless, in recent years, the 5p chain of this miR has been associated with left ventricular reverse remodeling, heart failure [17], and arteriosclerosis obliterans [18]. Another miR related to the inflammation process is miR-155-5p; its expression is affected by various inflammatory signals, including lipopolysaccharide, interferon- β , tumor necrosis factor, and the atheromatous process [19,20]. Hematopoietic miR-155-5p deficiency in hyperlipidemic mice increases the development of atherosclerotic plaques, thus decreasing their stability [21]. In previous studies, the analysis of monocyte miRNA expression profiles has been based on identifying differences in expression between different subsets of monocytes [22,23]. However, little is known about the role of miRs on monocytes in atherosclerotic plaque formation. Thus, in the present study, we aimed to characterize the expression of miR-21-5p, miR-155-5p, and miR-221-5p in the monocytes of CAD patients and elucidate the details of their role in this disease.

2. Results

2.1. Characteristics of the Study Population

The study population consisted of 110 Mexicans recruited at the National Cardiology Institute Ignacio Chávez: 50 patients were in the healthy control group (CG), and 60 pa-

tients were in the CAD group. Table 1 shows the main biochemical and anthropometric parameters of these groups. The CAD group shows significantly higher values of age ($p < 0.001$), glucose ($p < 0.001$), systolic blood pressure (SBP) ($p < 0.001$), diastolic blood pressure (DBP) ($p < 0.001$), and heart rate ($p < 0.001$), and significantly lower values of CT ($p < 0.001$) and HDL-C ($p < 0.001$). A 43% prevalence of diabetes was reported among the CAD patients, and 55% of them had arterial hypertension (HT).

Table 1. Biochemical and anthropometric parameters of the study population.

Variable	Controls (n = 50)	CAD (n = 60)	p
Age (years)	48.67 ± 6.47	62.10 ± 11.75	<0.001
Gender % M/W	60.7%/39.3%	85.3%/14.7%	0.001
BMI (kg/m ²)	27.75 ± 3.78	26.42 ± 3.90	0.849
Total cholesterol (mg/dL)	171.06 ± 24.47	138.26 ± 49.98	<0.001
HDL-C (mg/dL)	45.80 ± 14.75	30.98 ± 7.90	<0.001
LDL-C (mg/dL)	102.86 ± 23.17	90.61 ± 49.70	0.066
Triglycerides (mg/dL)	131.48 ± 49.86	141.94 ± 62.30	0.302
Statins %	0%	72.0%	<0.001
Glucose (mg/dL)	93.76 ± 7.82	120.34 ± 48.78	<0.001
Diabetes %	0%	43.0%	<0.001
Hypoglycemic agents %	0%	20.0%	<0.001
SBP (mmHg)	112.43 ± 9.12	127.33 ± 18.81	<0.001
DBP (mmHg)	70.43 ± 6.01	79.60 ± 12.03	<0.001
Hypertension %	0%	55.0%	<0.001
CF (pulsations/min)	65.44 ± 9.81	79.44 ± 13.10	<0.001
Antihypertensive %	0%	62.0%	<0.001
Smoking %	9.5%	17.1%	0.381
Alcoholism %	0%	2.6%	<0.001

The data are expressed as a mean ± SD (Student's *t*-test) or as a percentage (chi2 test). BMI: Body mass index; HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; CF: cardiac frequency.

2.2. miR Expression in Monocytes

MiR expression in monocytes was significantly higher in the CAD group compared with the control group (CG) in the case of miR-21-5p (median: 15.13 (min. 1.45–max. 130.43) vs. median: 7.54 (min. 0.69–max. 61.42); $p = 0.001$, respectively) (Figure 1A), as well as in the case of miR-221-5p (median: 21.12 (min. 1.67–max. 116.41) vs. median: 7.47 (min. 0.12–max. 74.64); $p < 0.001$, respectively) (Figure 1B). On the contrary, miR-155-5p expression was significantly lower in the CAD group compared with the CG (median: 7.69 (min. 0.91–max. 33.15) vs. median: 14.04 (min. 0.74–max. 78.72); $p = 0.021$, respectively) (Figure 1C).

2.3. NOS3 Expression in Monocytes

NOS3 is responsible for the synthesis of nitric oxide in blood vessels, and its mRNA is targeted by miR-21-5p, miR-155-5p, and miR-221-5p [24,25]. The binding of multiple miRNAs to the same mRNA through different target sites can have a considerable effect on gene function [25]. Therefore, we also determined the expression of NOS3 mRNA in the monocytes. Its expression was significantly lower in the CAD group compared to the CG (median: 27.01 (min. 1.00–max. 129.55) vs. median: 108.44 (min. 5.70–max. 1125.22); $p < 0.001$, respectively) (Figure 1D).

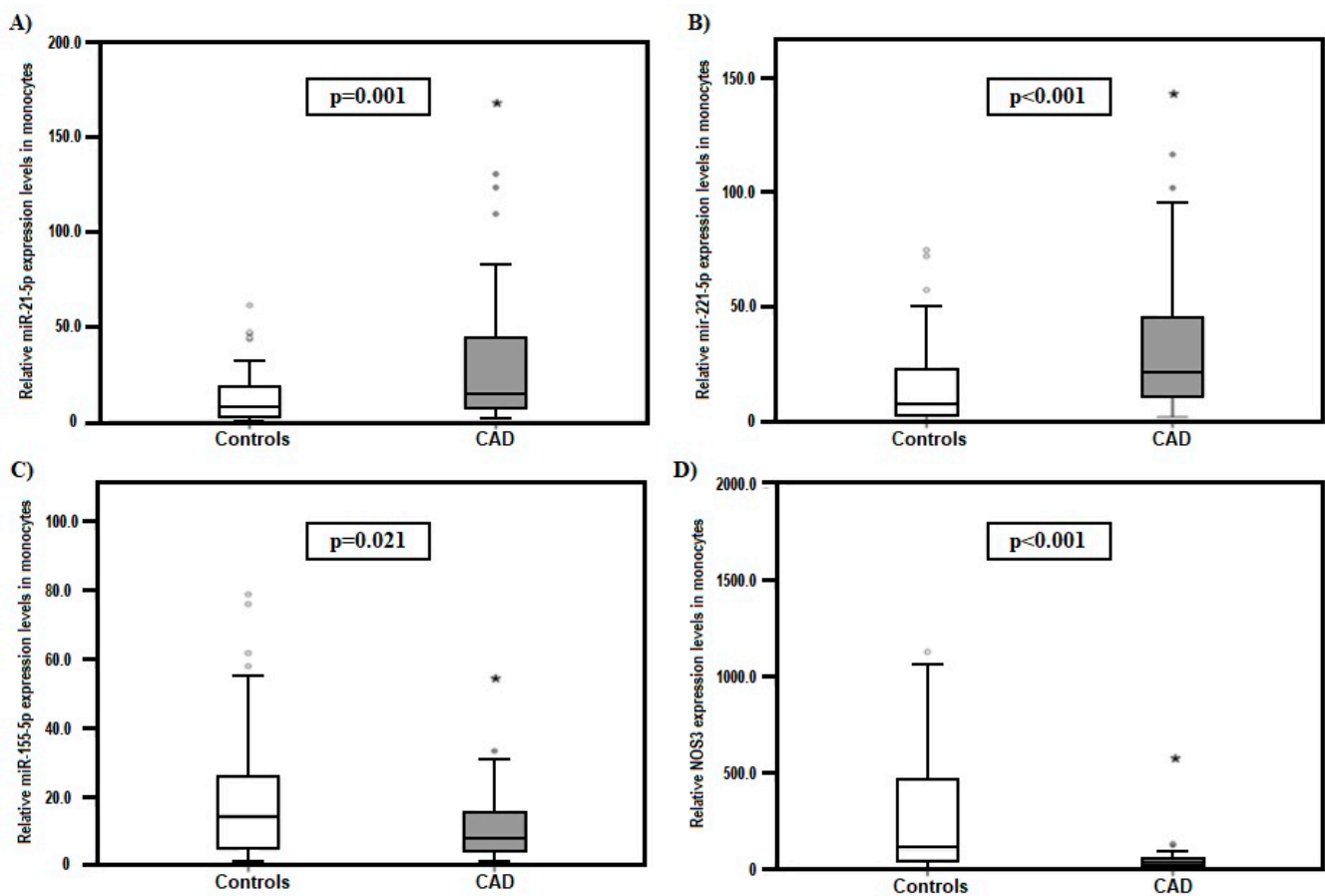


Figure 1. Comparison between CG and CAD patients' expression levels in monocytes of (A) miR-21-5p, (B) miR-221-5p, and (C) miR-155-5p, (D) NOS3 expression. The data were normalized to RNU6B. The data are expressed as medians (min.–max.) (Mann–Whitney U test). * $p > 0.05$.

2.4. Association of Clinical Parameters and miR/NOS3 Expression with the Risk of Developing CAD

Binary logistic regression analysis was used to identify whether the deregulation of miR expression influences the development of CAD using the clinical parameters and miRs that were shown to be statistically significantly different between the control group and the CAD group (sex, age, total cholesterol, HDL-C, glucose, SBP, DBP, miR-21-5p, miR-155-5p, miR-221-5p, and NOS3). Table 2 shows that increased miR-21-5p and miR-221-5p expression and decreased NOS3 expression are associated with a higher risk of CAD; conversely, HDL-C is a protective factor against CAD. We also found that increasing age and SBP are weakly associated with CAD.

Table 2. Association between clinical parameters and miR/NOS3 expression with risk of developing CAD.

	χ^2	OR	CI 95%	p
Age	6.177	1.088	1.018–1.163	0.013
HDL-C	8.863	0.848	0.761–0.945	0.003
SBP	5.951	1.071	1.014–1.133	0.015
miR-21-5p	8.411	8.373	1.992–35.206	0.004
miR-221-5p	6.839	6.447	1.595–26.061	0.009
NOS3	23.647	19.61	5.920–66.670	<0.001

χ^2 : chi² value; OR: odds ratio; CI: confidence interval (binary logistic regression analysis).

2.5. miR/NOS3 Expression with the Use of Drugs

Because most of the CAD patients were medicated with different drugs, a Kruskal–Wallis test was performed between the CG and medicated and unmedicated CAD patients to determine whether the expression of the studied miRs/NOS3 varies according to the use of metformin, statins, or antihypertensive drugs. NOS3 mRNA expression showed an increase in the control group versus the medicated and unmedicated CAD patients with metformin. MiR-21-5p expression levels were higher in the unmedicated CAD patients with metformin compared with the healthy control group ($p = 0.001$) and in the CAD medicated group with metformin ($p = 0.022$) (Table 3). Moreover, miR-221-5p expression in the unmedicated CAD patients with metformin was significantly higher than that in the healthy control group ($p < 0.001$), and it showed a tendency to be higher than that in the hypoglycemic-medicated patients ($p = 0.086$). We found no differences in the expression of miRs or NOS3 between the medicated and unmedicated groups due to the consumption of statins and antihypertensive drugs.

Table 3. Comparison between controls and CAD patients either unmedicated or medicated with metformin regarding expression of the study miRs/NOS3.

	Control	CAD Unmedicated Group with Metformin	p1	CAD Medicated Group with Metformin	p2	p3
	<i>n</i> = 50	<i>n</i> = 48		<i>n</i> = 12		
NOS3	108.44 (5.70–1125.22)	25.11 (1.00–129.55)	0.001	23.98 (2.27–83.71)	0.001	0.776
miR-21-5p	7.54 (0.69–61.42)	15.43 (1.45–82.65)	0.001	7.35 (2.50–18.62)	0.983	0.022
miR-221-5p	7.47 (0.12–74.64)	21.79 (2.48–116.42)	<0.001	11.01 (2.78–46.85)	0.321	0.086
miR-155-5p	14.04 (0.74–78.72)	7.98 (0.91–33.15)	0.049	4.26 (2.63–21.63)	0.050	0.528

The data are expressed as median (min–max). p1 = CAD unmedicated group with metformin vs. healthy controls, p2 = CAD medicated group with metformin vs. control, p3 = CAD unmedicated group with metformin vs. CAD medicated group with metformin (Kruskal–Wallis test).

3. Discussion

Several studies have indicated the potential role of circulating miRNA levels as valuable biomarkers for different disease processes. However, the information is limited regarding their role in monocytes, cells that are critical in the initial stage of atherosclerosis.

In our study, we demonstrated that monocytes from CAD patients increased the expression of miR-21-5p and miR-221-5p and decreased the expression of miR-155-5p and NOS3. However, only the overexpression of miR-21-5p and miR-221-5p was found to be associated with an increased CAD risk. Previous reports have shown that the expression of miR-21-5p is elevated in the mononuclear cells and plasma of CAD patients [24,25]. This miR could potentially be involved by regulating inflammatory cytokines through the JNK signaling pathway [26] or the phosphatidylinositol 3-hydroxy kinase [PI3K]/protein kinase B [AKT] pathway [27], which would cause vascular smooth muscle cell proliferation and migration, resulting in more severe vascular stenosis and worsening CAD [28]. According to the literature, miRNA-21 overexpression inhibits the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α), resulting in the upregulation of the expressions of VCAM-1 and MCP-1 [15]. Furthermore, hydrogen peroxide and lipopolysaccharide (LPS) have been found to differentially affect the expression of miR-21 in endothelial cells before and after co-culture with monocytes [29]. These studies demonstrate the role of miR-21 in the development of the atherosclerosis process; however, the effect of increased miR-21 expression in endothelial cells in the context of atherosclerosis requires further examination.

Some researchers have reported that miR-221-5p expression is upregulated in plasma from patients with heart failure and atherosclerosis obliterans [17,30]. In addition, studies in endothelial cells have shown that the expression of the 3p chain of this miR is elevated in patients with CAD [15,31]. However, there are no previous reports of the 5p chain in this disease. Therefore, the present study is the first to demonstrate that an increase in

miR-221-5p in monocytes could facilitate the formation of atheromatous plaque. We used the network-based bioinformatic prediction TargetScan Human 7.2 program and identified the suppressor of the cytokine signaling 1 (SOCS1) gene as a direct anti-inflammatory target of the miR-221-5p. SOCS1 is a negative feedback inhibitor of signaling induced by the cytokines that act via the JAK/STAT pathway, and it controls the essential inflammatory processes in vascular cells [32]. Hence, the overexpression of miR-221-5p could promote the production of inflammatory cytokines and the progression of atherosclerosis through the inhibition of SOCS1.

CAD management is affected by associated pathologies such as diabetes mellitus (DM), which results in a two to four times higher CVD risk. It should be noted that because a high percentage of our patients with CAD had type 2 diabetes mellitus and arterial hypertension, most received medication for these. Therefore, to verify that the expression of these miRs is directly associated with CAD, a binary logistic regression analysis was performed; it was confirmed that their deregulation, either up or down, is a risk factor for developing the disease (as shown in the Table 2). If the deregulation in the expression of these was due to other comorbidities—in this case type 2 diabetes mellitus or hypertension—the expression of the miRNAs and NOS3 would not have given us a significant result in the regression, and this would have indicated that the deregulation observed in its expression was not directly associated with CAD but rather with one of these comorbidities or other confounding variables.

However, it is difficult to separate the effects of diabetes, arterial hypertension, and medication from the effects of CAD on miRNA expression and NOS3 levels. It is necessary to consider the difficulty in finding patients with CAD who are not treated, and thus the need to increase the sample size of this type of patient. A follow-up study could be done on our study subjects to (1) Determine whether healthy controls that presented a high expression of miRNA-21-5p and miRNA-221-5p develop CAD in the following years. Conversely, to determine whether those healthy subjects who presented a high expression of miR-NA-155-5p and NOS3 do not present with CAD (protective effect). (2) To determine whether patients with CAD who presented with a high expression of miRNA-21-5p and miRNA-221-5p have complications resulting from the disease or a poor prognosis.

According to the results of the treatment with the metformin, the patients with CAD who did not receive the medication have higher expression of miR-21-5p and miR-221-5p than both the control group and the group of CAD patients medicated with metformin. Previous reports have shown that treatment with metformin decreases the expression of both miR-21-5p in plasma and miR-221-5p in internal mammary arteries in diabetic patients [33,34]. This suggests that metformin also has an inhibitory effect on miR-21-5p and miR-221-5p expression in monocytes. Metformin acts as a cardioprotector by activating the AMPK (AMP-activated protein kinase) enzyme complex, which is involved in a wide range of downstream signaling pathways; participating in the apoptosis of endothelial cells and cardiomyocytes; inhibiting the proliferation, migration, and angiogenesis of vascular cells; and in mitigating oxidative stress and the inflammatory response [35,36]. Pulito et al. found that metformin inhibits miR-21-5p transcription through the occupancy of its promoter regions by E2F transcription factor 3 (E2F3) [37]. Nevertheless, the molecular mechanism of metformin in regulating the expression of the studied miRs is still not fully known.

No significant differences were found with respect to miR-221-5p, miR-21-5p, miR-155-5p, and NOS3 expressions grouped by CAD patients and their consumption of different antihypertensive and lipid-lowering drugs. This result is likely due to the wide variety of treatments involving antihypertensive drugs (Diuretics, Beta-blockers, ACE inhibitors, Angiotensin II receptor blockers, Calcium channel blockers, Alpha blockers, Alpha-2 Receptor Agonists, Vasodilators) and lipid-lowering drugs (statins, Fibrate, ezetimibe) in patients with CAD.

In our study, the miR-155-5p was also shown to be downregulated in the CAD patients. It has been suggested in the literature that miR-155-5p expression may have different effects depending on the stage of atheromatous plaque development. Its downregulation

could represent a feedback mechanism for controlling the overactivation of immune cells. According to a previous mouse model study with atherosclerosis, the expression of miRNA-155-5p decreases in these cells in response to inflammation, and thus it could be associated with the formation of atherosclerotic plaque [38].

Therefore, we recognize that miR-155-5p expression decreases in the monocytes of CAD patients in response to an increase in inflammatory cytokines caused by immune cell activation. McCoy et al. proposed a possible mechanism, showing that IL-10, a potent anti-inflammatory cytokine, inhibits the transcription of miR-155-5p of the BIC gene in a STAT3-dependent manner, which could result in the promoted expression of anti-inflammatory genes [39]. Zhu et al. demonstrated that miR-155-5p could have an anti-inflammatory effect by targeting mitogen-activated protein kinase 10 (MAP3K10), preventing the development and progression of atherosclerosis [19]. Studies on rodents demonstrate that the lack of miR-155-5p in bone marrow-derived cells increased the incidence of atherosclerosis in LDLR-KO mice [40]. Moreover, another study found that miR-155-5p partially mediated the effect of inflammatory stimuli (TNF α) induced endothelial nitric oxide synthase downregulation in HUVEC cells [41].

We observed that the decrease in miR-155-5p was even more significant among CAD patients receiving metformin treatment. The reduction of miR-155-5p in the B cells of subjects with DM who take metformin has been found to cause AMPK activation and, consequently, the inhibition of the pro-inflammatory cytokine TNF α [21]. Furthermore, it is known that miR-155-5p is induced by ox-LDL and proinflammatory stimuli in the monocyte/macrophages, which promotes a proinflammatory environment in which various cytokines are triggered [42]. However, most of our patients with CAD had low LDL levels due to atorvastatin and low susceptibility to oxidation. Studies show that simvastatin pretreatment ameliorates TNF α (20 ng/mL) induced miR-155-5p expression in HUVECs, further clarifying how statin modulation of the mevalonate-geranylgeranyl pyrophosphate-RhoA signaling pathway has anti-atherosclerotic effects [43]. Therefore, it is necessary, for example, to carry out complementary studies in vivo to ensure that its inhibition in mice with atherosclerosis produces a decrease in the size of the plaque.

Furthermore, we observed a significant decrease in NOS3 expression in the monocytes of the CAD group. A previous study in mice demonstrated that NOS3 deficiency increased atherosclerotic plaque formation and induced coronary artery disease and several cardiovascular complications, including spontaneous aortic aneurysm and dissection [44]. In addition, a study of hypertensive patients indicated that miR-21-5p expression was positively correlated with cIMT and negatively correlated with serum nitric oxide concentrations and plasma activity NOS3 [24], as in our study. Previous studies are related the expression of miRNA-21-5p and miRNA-221-5p with NOS3 in both animal models and in humans [45,46]. Recent reports have also demonstrated that miR-21-5p is induced during hypoxia by HIF-1-activating Akt, which could indirectly affect NO levels [47]. Studies have also indicated that miR-221-3p inhibits adiponectin-stimulated NOS3 phosphorylation and NO production [48], which supports the inverse correlation we found between the levels of expression of miR221 and NOS3. Cerda et al. demonstrated that endothelial cells that were transfected showed a decrease in miR-221 after statin treatment that was correlated with the increase in NOS3 mRNA levels [49]. On the other hand, Suárez et al. observed that the transfection of miRNAs mimicked in endothelial cells decreased the protein levels of NOS3 [50]. In the case of miRNA-21-5p, a significant increase in the expression of miRNA-21-5p correlated positively with CIMT and negatively with the expression of NOS3 and nitric oxide was found in hypertensive patients with a high intima media thickness [24].

In summary, our results show that the overexpression of miR-21-5p and miR-221-5p in monocytes is a risk factor in the development of CAD in the Mexican population. Hence, miR-21-5p and miR-221-5p could both participate in the development of atherosclerotic plaques by inhibiting target genes that participate in this pathological process. Moreover, metformin could exert a protective effect by decreasing the expression of miR-21-5p and miR-221-5p. Further, the expression of NOS3 decreased significantly in our patients with

CAD, regardless of whether they were medicated. Our work verifies the role of these miRs in the Mexican population, whose genetic load is different from the Caucasian population, on whom most such studies have been carried out. Therefore, our findings allow for the suggestion of new therapeutic strategies for the diagnosis and prognosis of CAD and the evaluation of treatment efficacy.

One limitation of our study was cardiovascular treatment, as it varied among patients, and most patients were treated with two or more medications. However, the recruitment of patients without any type of treatment was very difficult. The effect of metformin in reducing miRNA expression should be investigated further in vivo or in vitro in other models. Therefore, more studies with larger sample sizes can help us elucidate the association of different miRs in CAD patients with different medical treatments. It would be interesting to study patients with subclinical atherosclerosis and CAD patients who have had the disease for different numbers of years, to determine whether the expression of miRs increases or decreases as the disease progresses.

4. Materials and Methods

4.1. Research Population

A total of 110 Mexican subjects (60 patients diagnosed with CAD and 50 control subjects) were recruited at the National Institute of Cardiology Ignacio Chávez. The inclusion criteria for both groups were Mexican by birth and having at least three previous generations of Mexican origins. CAD was defined as a disease that causes stress- or exercise-related symptoms of angina due to a narrowing of $\geq 50\%$ in the left common trunk or $\geq 70\%$ in one or more of the major arteries. The diagnosis as non-invasive was based on the presence of myocardial ischemia in patients with atheromatous plaques. The criterion for the control group was not presenting with any comorbidity; to ensure that the patients in the control group did not have atheroma or subclinical atherosclerosis, their carotid intima-media thickness (cIMT) was evaluated using ultrasonography. All the participants answered standardized and validated questionnaires to obtain information on their family and medical history, alcohol and tobacco consumption, and physical activity. Information was also obtained from the clinical record of each subject. The research protocol 18-1075 was approved by the Institute's Research and Ethics Committees. Informed consent to participate was signed by all the patients, with full consideration for the ethical principles for medical research involving human beings, as stipulated in the Declaration of Helsinki and modified by the Tokyo Congress, Japan [51].

4.2. Blood and Plasma Samples

Blood samples were obtained by venipuncture after 12 h of fasting in tubes with ethylenediaminetetraacetic acid sodium (EDTA-Na) for plasma and monocyte isolation. Plasma was immediately subjected to separation through centrifugation for the determination of the lipid profile total cholesterol (TC), triglycerides, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and glucose.

4.3. Laboratory Analysis

Glucose, TC, and triglycerides were analyzed using enzymatic colorimetric methods (Roche-Syntex/Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). HDL-C was measured after the precipitation of low-density and very low-density lipoproteins with phosphotungstate/Mg²⁺ (Roche-Syntex), and LDL-C was estimated by the equation of Friedewald [52], with the modifications detailed by De Long [53]. All the assays were performed according to an external quality control scheme (Lipid Standardization Program, Center for Disease Control in Atlanta, GA, USA). We followed the National Cholesterol Education Project (NCEP) Adult Treatment Panel (ATP III) guidelines and thus defined dyslipidemia according to the following levels: cholesterol ≥ 200 mg/dL; LDL-C ≥ 130 mg/dL; HDL-C < 40 mg/dL for men and < 50 mg/dL for women; and triglyceride ≥ 150 mg/dL.

4.4. Monocyte Isolation

Whole blood collected in EDTA tubes was diluted 1:1 with 1X PBS–1% heparin and subsequently added to a Ficoll-Histopaque solution (Sigma, Sigma, St. Louis, MO, USA, Catalog Number 10771). The samples were centrifuged at 1300 rpm for 30 min, and the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were generated after the centrifugation. Then, positive selection to obtain monocytes was carried out using CD14-mAb-coated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany; Catalog Number 130-050-201) following the manufacturer's instructions (purity of $95 \pm 98\%$). An aliquot of 1 mL of Tripure™ reagent (Roche Life Science, Penzberg, Germany) was added for collecting the monocytes. The cells were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.5. RNA Extraction

The total RNA, including miRs, was extracted from the monocyte samples using Tripure™ isolation reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA, Catalog Number 11667165001). The total RNA was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.6. miR Quantitative Real-Time

Reverse transcription was performed using the samples of the total RNA from the monocytes to obtain the cDNAs of the study miRs using specific primers for the mature forms of each one and the TaqMan miRNA RT kit (TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA, Catalog Number A28007). The quantification of the miR-21-5p (hsa-miR-21-5p), miR-155-5p (hsa-miR-155-5p), and miR-221-5p (hsa-miR-221-5p) via a real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using a commercial kit (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) employing the CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cycling conditions were 2 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and then 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The expression levels were measured in duplicate and normalized to the reference gene RNU6B (NR_002752). The relative expression was calculated with the comparative threshold cycle (CT) method, and the data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method [54].

4.7. mRNA Quantitative Real-Time PCR

The TR-qPCR was performed using 1 μg of the total RNA for cDNA synthesis according to the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). The cDNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. NOS3 (Hs01574665_m1) and was measured using a commercially available kit (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) employing the CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The cycling conditions were 2 min at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 10 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by 40 cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1 min at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The gene expression levels were determined in duplicate and normalized with the reference gene HPRT (Hs99999909_m1).

4.8. Statistical Analysis

The data were analyzed using SPSS version 22 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A descriptive analysis of all the variables was performed, and the results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The comparison between the groups was rendered using Student's t-test for continuous variables. The Mann–Whitney U test was performed for the variables that did not present a normal distribution. The Kruskal–Wallis test was performed using a comparison of the medians to evaluate the outcomes of the control group, the unmedicated CAD patients, and the CAD patients medicated with statins or antihypertensive and hypoglycemic agents. Subsequently, a binary logistic regression analysis was conducted to explore the association between the study miRs and the CAD. Finally, a correlation analysis was conducted using the Pearson test. The p values of <0.05 were considered as indicating significant differences.

4.9. Sample Size

The sample size was calculated using the data published in recent years by various researchers. The means and standard deviations in the data were considered. The calculated size of the present study was 28 subjects [19]; however, a sample size of 50 subjects per group was established.

$$n = \frac{(Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2 (S_1^2 + S_2^2)}{(X_1 - X_2)^2}$$

$(Z_{1-\alpha/2}) = 1.96$ y 2.576 for a confidence level of 95% and 99%, respectively

$(Z_{1-\beta}) = 0.84$ y 2.326 for a statistical power of 80% and 99%, respectively

S_1 = Standard deviation of the control group

S_2 = Standard deviation of the group problem

X_1 = Control of population means of the group

X_2 = Population mean of the problem group.

Author Contributions: Conception and design of the research: Y.E.T.-P. and C.H.-G.; Acquisition of data: Y.E.T.-P., R.G., G.F.-Á., N.G.-M., R.M.-A. and M.T.-T.; Participation in patient enrolment, surgical procedures, and sample collection: E.S.R.-M., X.V.-J. and V.S.-E.; Analysis and interpretation of the data: M.E.S., R.G., Y.E.T.-P. and C.H.-G.; Statistical analysis: M.E.S., R.G. and Y.E.T.-P.; Writing of the manuscript: Y.E.T.-P., R.G. and C.H.-G.; Critical revision of the manuscript for intellectual content: R.G., C.H.-G., Y.E.T.-P. and G.F.-Á. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted following the Declaration of Helsinki and approved by the Institute's Research and Ethics Committees of the Instituto Nacional de Cardiología, with the research protocol number 18-1075. Informed consent was obtained from all the patients included in the study.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data repository Figshare DOI 10.6084/m9.figshare.21295830.

Acknowledgments: The authors thank the participants of this study. The first author is grateful to the Postgraduate Program in Medical, Dental and Health Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), as well as to CONACYT for the scholarship granted with CVU number 589883.

Conflicts of Interest: The authors have no personal, financial, commercial, or academic conflicts of interest to declare.

References

- Hanson, M.A.; Fareed, M.T.; Argenio, S.L.; Agunwamba, A.O.; Hanson, T.R. Coronary Artery Disease. *Prim. Care* **2013**, *40*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Camaré, C.; Pucelle, M.; Nègre-Salvayre, A.; Salvayre, R. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 18–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bentzon, J.F.; Otsuka, F.; Virmani, R.; Falk, E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ. Res.* **2014**, *114*, 1852–1866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cyr, A.R.; Huckaby, L.V.; Shiva, S.S.; Zuckerbraun, B.S. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit. Care Clin.* **2020**, *36*, 307–321. [[CrossRef](#)]
- Abdo, A.I.; Rayner, B.S.; van Reyk, D.M.; Hawkins, C.L. Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction. *Redox Biol.* **2017**, *13*, 623–632. [[CrossRef](#)]
- Pou, J.; Rebollo, A.; Alegret, M. El monocito/macrófago como diana terapéutica en la aterosclerosis. *Clin. Investig. Arterioscl.* **2007**, *19*, 92–108. [[CrossRef](#)]
- Oliveira-Paula, G.H.; Lacchini, R.; Tanus-Santos, J.E. Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms. *Gene* **2016**, *575*, 584–599. [[CrossRef](#)]
- Alp, N.J.; Channon, K.M. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2004**, *24*, 413–420. [[CrossRef](#)]

9. Bhaskaran, M.; Mohan, M. MicroRNAs: History, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. *Vet. Pathol.* **2014**, *51*, 759–774. [[CrossRef](#)]
10. Ono, K.; Horie, T.; Nishino, T.; Baba, O.; Kuwabara, Y.; Kimura, T. MicroRNAs and High-Density Lipoprotein Cholesterol Metabolism. *Int. Heart J.* **2015**, *56*, 365–371. [[CrossRef](#)]
11. Pirola, C.J.; Fernandez Gianotti, T.; Castano, G.O.; Mallardi, P.; San Martino, J.; Mora Gonzalez Lopez Ledesma, M.; Flichman, D.; Mirshahi, F.; Sanyal, A.J.; Sookoian, S. Circulating microRNA signature in non-alcoholic fatty liver disease: From serum non-coding RNAs to liver histology and disease pathogenesis. *Gut* **2015**, *64*, 800–812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Cheng, Y.; Zhang, C. MicroRNA-21 in Cardiovascular Disease. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* **2010**, *3*, 251–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chistiakov, D.A.; Sobenin, I.A.; Orekhov, A.N.; Bobryshev, Y.V. Human miR-221/222 in Physiological and Atherosclerotic Vascular Remodeling. *BioMed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 354517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Shah, R.; Ziegler, O.; Yeri, A.; Liu, X.; Murthy, V.; Rabideau, D.; Xiao, C.Y.; Hanspers, K.; Belcher, A.; Tackett, M.; et al. MicroRNAs Associated With Reverse Left Ventricular Remodeling in Humans Identify Pathways of Heart Failure Progression. *Circ. Heart Fail.* **2018**, *11*, e004278. [[CrossRef](#)]
15. He, X.-M.; Zheng, Y.-Q.; Liu, S.-Z.; Liu, Y.; He, Y.-Z.; Zhou, X.-Y. Altered Plasma MicroRNAs as Novel Biomarkers for Arteriosclerosis Obliterans. *J. Atheroscler. Thromb.* **2016**, *23*, 196–206. [[CrossRef](#)]
16. Landgraf, P.; Rusu, M.; Sheridan, R.; Sewer, A.; Iovino, N.; Aravin, A.; Pfeffer, S.; Rice, A.; Kamphorst, A.O.; Landthaler, M.; et al. A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. *Cell* **2007**, *129*, 1401–1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Weber, M.; Baker, M.B.; Moore, J.P.; Searles, C.D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *393*, 643–648. [[CrossRef](#)]
18. Zhou, J.; Wang, K.C.; Wu, W.; Subramaniam, S.; Shyy, J.Y.; Chiu, J.J.; Li, J.Y.; Chien, S. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor- α in an autoregulatory loop to modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10355–10360. [[CrossRef](#)]
19. Zhu, G.-F.; Yang, L.-X.; Guo, R.-W.; Liu, H.; Shi, Y.-K.; Ye, J.-S.; Yang, Z.-H. microRNA-155 is inversely associated with severity of coronary stenotic lesions calculated by the Gensini score. *Coron. Artery Dis.* **2014**, *25*, 304–310. [[CrossRef](#)]
20. Mahesh, G.; Biswas, R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J. Interf. Cytokine Res.* **2019**, *39*, 321–330. [[CrossRef](#)]
21. Donners, M.M.P.C.; Wolfs, I.M.J.; Stöger, L.J.; Van Der Vorst, E.P.C.; Pöttgens, C.C.H.; Heymans, S.; Schroen, B.; Gijbels, M.J.J.; de Winther, M. Hematopoietic miR155 Deficiency Enhances Atherosclerosis and Decreases Plaque Stability in Hyperlipidemic Mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zawada, A.M.; Zhang, L.; Emrich, I.E.; Rogacev, K.S.; Krezdorn, N.; Rotter, B.; Fliser, D.; Devaux, Y.; Ziegler-Heitbrock, L.; Heine, G.H. MicroRNA profiling of human intermediate monocytes. *Immunobiology* **2017**, *222*, 587–596. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dang, T.-M.; Wong, W.-C.; Ong, S.-M.; Li, P.; Lum, J.; Chen, J.; Poidinger, M.; Zolezzi, F.; Wong, S.-C. MicroRNA expression profiling of human blood monocyte subsets highlights functional differences. *Immunology* **2015**, *145*, 404–416. [[CrossRef](#)]
24. Cengiz, M.; Yavuzer, S.; Avci, B.K.; Yürüyen, M.; Yavuzer, H.; Dikici, S.A.; Karataş, F.; Özen, M.; Uzun, H.; Öngen, Z. Circulating miR-21 and eNOS in subclinical atherosclerosis in patients with hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* **2015**, *37*, 643–649. [[CrossRef](#)]
25. Zhu, N.; Zhang, D.; Chen, S.; Liu, X.; Lin, L.; Huang, X.; Guo, Z.; Liu, J.; Wang, Y.; Yuan, W.; et al. Endothelial enriched microRNAs regulate angiotensin II-induced endothelial inflammation and migration. *Atherosclerosis* **2011**, *215*, 286–293. [[CrossRef](#)]
26. Kumar, A.; Fausto, A. Robbins & Cotran. In *Pathologic Basis of Disease*, 10th ed.; Elsevier España, S.L.U.: Barcelona, Spain, 2020; ISBN 9780323531139.
27. Sanlialp, M.; Dodurga, Y.; Uludag, B.; Alihanoglu, Y.I.; Enli, Y.; Secme, M.; Bostanci, H.E.; Sanlialp, S.C.; Tok, O.O.; Kaftan, A.; et al. Peripheral blood mononuclear cell microRNAs in coronary artery disease. *J. Cell Biochem.* **2020**, *121*, 3005–3009. [[CrossRef](#)]
28. Chen, Z.; Song, S.; Zhu, J.; Lai, X. Regulatory mechanism of MiR-21 in formation and rupture of intracranial aneurysm through JNK signaling pathway-mediated inflammatory response. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2020**, *13*, 1834–1841.
29. Lv, X.; Liang, J.; Wang, Z. MiR-21-5p reduces apoptosis and inflammation in rats with spinal cord injury through PI3K/AKT pathway. *Panminerva Med.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Sun, P.; Tang, L.-N.; Li, G.-Z.; Xu, Z.-L.; Xu, Q.-H.; Wang, M.; Li, L. Effects of MiR-21 on the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in rats with atherosclerosis via the Akt/ERK signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2019**, *23*, 2216–2222. [[CrossRef](#)]
31. Talepoor, A.G.; Kalani, M.; Dahaghani, A.S.; Doroudchi, M. Hydrogen Peroxide and Lipopolysaccharide Differentially Affect the Expression of MicroRNAs 10a, 33a, 21, 221 in Endothelial Cells Before and After Coculture With Monocytes. *Int. J. Toxicol.* **2017**, *36*, 133–141. [[CrossRef](#)]
32. Minami, Y.; Satoh, M.; Maesawa, C.; Takahashi, Y.; Tabuchi, T.; Itoh, T.; Nakamura, M. Effect of atorvastatin on microRNA 221/222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. *Eur. J. Clin. Investig.* **2009**, *39*, 359–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Zhang, Q.; Kandic, I.; Kutryk, M.J. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *405*, 42–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liao, N.P.D.; Laktyushin, A.; Lucet, I.S.; Murphy, J.M.; Yao, S.; Whitlock, E.; Callaghan, K.; Nicola, N.A.; Kershaw, N.J.; Babon, J.J. The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1558. [[CrossRef](#)]

35. Demirsoy, I.H.; Ertural, D.Y.; Balci, Ş.; Çınkır, Ü.; Sezer, K.; Tamer, L.; Aras, N. Profiles of Circulating miRNAs Following Metformin Treatment in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Med. Biochem.* **2018**, *37*, 499–506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Coleman, C.B.; Lightell, D.J., Jr.; Moss, S.C.; Bates, M.; Parrino, P.E.; Woods, T.C. Elevation of miR-221 and -222 in the internal mammary arteries of diabetic subjects and normalization with metformin. *Mol. Cell Endocrinol.* **2013**, *374*, 125–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Wang, G.; Lin, F.; Wan, Q.; Wu, J.; Luo, M. Mechanisms of action of metformin and its regulatory effect on microRNAs related to angiogenesis. *Pharmacol. Res.* **2021**, *164*, 105390. [[CrossRef](#)]
38. Bu, Y.; Peng, M.; Tang, X.; Xu, X.; Wu, Y.; Chen, A.F.; Yang, X. Protective effects of metformin in various cardiovascular diseases: Clinical evidence and AMPK -dependent mechanisms. *J. Cell Mol. Med.* **2022**, *26*, 4886–4903. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Pulito, C.; Mori, F.; Sacconi, A.; Goeman, F.; Ferraiuolo, M.; Pasanisi, P.; Campagnoli, C.; Berrino, F.; Fanciulli, M.; Ford, R.J.; et al. Metformin-induced ablation of microRNA 21-5p releases Sestrin-1 and CAB39L antitumoral activities. *Cell Discov.* **2017**, *3*, 17022. [[CrossRef](#)]
40. McCoy, C.E.; Sheedy, F.J.; Qualls, J.E.; Doyle, S.L.; Quinn, S.R.; Murray, P.J.; O'Neill, L.A. IL-10 Inhibits miR-155 Induction by Toll-like Receptors. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20492–20498. [[CrossRef](#)]
41. Zhu, J.; Chen, T.; Yang, L.; Li, Z.; Wong, M.M.; Zheng, X.; Pan, X.; Zhang, L.; Yan, H. Regulation of MicroRNA-155 in Atherosclerotic Inflammatory Responses by Targeting MAP3K10. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e46551. [[CrossRef](#)]
42. Sun, H.-X.; Zeng, D.-Y.; Li, R.-T.; Pang, R.-P.; Yang, H.; Hu, Y.-L.; Zhang, Q.; Jiang, Y.; Huang, L.-Y.; Tang, Y.-B.; et al. Essential Role of MicroRNA-155 in Regulating Endothelium-Dependent Vasorelaxation by Targeting Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Hypertension* **2012**, *60*, 1407–1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Alimoradi, N.; Firouzabadi, N.; Fatehi, R. Metformin and insulin-resistant related diseases: Emphasis on the role of microRNAs. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *139*, 111662. [[CrossRef](#)]
44. Feinberg, M.W.; Moore, K.J. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 703–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Verjans, R.; Peters, T.; Beaumont, F.J.; van Leeuwen, R.; van Herwaarden, T.; Verhesen, W.; Munts, C.; Bijnen, M.; Henkens, M.; Diez, J.; et al. MicroRNA-221/222 Family Counteracts Myocardial Fibrosis in Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Hypertension* **2018**, *71*, 280–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Elton, T.S.; Selemón, H.; Elton, S.M.; Parinandi, N.L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* **2013**, *532*, 2189–2196. [[CrossRef](#)]
47. Perry, M.M.; Moschos, S.A.; Williams, A.E.; Shepherd, N.J.; Larner-Svensson, H.M.; Lindsay, M.A. Rapid Changes in MicroRNA-146a Expression Negatively Regulate the IL-1 β -Induced Inflammatory Response in Human Lung Alveolar Epithelial Cells. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 5689–5698. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Kuhlencordt, P.J.; Gyurko, R.; Han, F.; Scherrer-Crosbie, M.; Aretz, T.H.; Hajjar, R.; Picard, M.; Huang, P.L. Accelerated Atherosclerosis, Aortic Aneurysm Formation, and Ischemic Heart Disease in Apolipoprotein E/Endothelial Nitric Oxide Synthase Double-Knockout Mice. *Circulation* **2001**, *104*, 448–454. [[CrossRef](#)]
49. Kalinowski, L.; Janaszak-Jasiecka, A.; Siekierzycka, A.; Bartoszewska, S.; Woźniak, M.; Lejnowski, D.; Collawn, J.F.; Bartoszewski, R. Posttranscriptional and transcriptional regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia: The role of microRNAs. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2016**, *21*, 16. [[CrossRef](#)]
50. Chen, C.-F.; Huang, J.; Li, H.; Zhang, C.; Huang, X.; Tong, G.; Xu, Y.-Z. MicroRNA-221 regulates endothelial nitric oxide production and inflammatory response by targeting adiponectin receptor 1. *Gene* **2015**, *565*, 246–251. [[CrossRef](#)]
51. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* **2013**, *310*, 2191–2194. [[CrossRef](#)]
52. Friedewald, W.T.; Levy, R.I.; Fredrickson, D.S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **1972**, *18*, 499–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. DeLong, D.M.; DeLong, E.R.; Wood, P.D.; Lippel, K.; Rifkind, B.M. A Comparison of Methods for the Estimation of Plasma Low- and Very Low-Density Lipoprotein Cholesterol. *JAMA* **1986**, *256*, 2372–2377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Increased expression of miR-33a in monocytes from Mexican hypertensive patients in elevated carotid intima-media thickness

Yazmín Estela Torres-Paz¹ · Claudia Huesca-Gómez¹ · Fausto Sánchez-Muñoz² · Rocío Martínez-Alvarado³ · Ma.Elena Soto² · Margarita Torres-Tamayo³ · Giovanny Fuentesvilla-Álvarez¹ · Ricardo Gamboa¹

Received: 25 April 2018 / Revised: 25 July 2018 / Accepted: 27 July 2018
© Springer Nature Limited 2018

Abstract

miR-33a has been described as a key regulator in the initiation and progression of atherosclerosis. However, its role in arterial hypertension (HTA) has not been elucidated. Therefore, the aim of this study was to determine the association between the expression of miR-33a (5p and 3p) and the carotid intima-media thickness (cIMT) in samples of monocytes and serum from hypertensive patients. The miR-33a-5p and miR-33a-3p expression in monocytes and serum from Mexican hypertensive patients were examined by RT-PCR. This study involved 84 subjects (42 normotensive subjects and 42 patients with essential hypertension). Our study revealed that miR-33a-5p expression was significantly upregulated in the monocytes of hypertensive patients compared with the control group ($p = 0.001$), while miR-33a-3p was significantly downregulated ($p = 0.013$). miR-33a-5p upregulation [OR: 5.53, 95% CI: 2.01–15.20; $p = 0.001$], as well as miR-33a-3p downregulation [OR: 3.32, 95% CI: 1.45–7.60; $p = 0.004$] in monocytes, was associated with an increased risk of developing hypertension. In addition, miR-33a-5p upregulation in hypertensive patients was associated with an increased risk of presenting cIMT [OR: 5.99, 95% CI: 1.10–32.85; $p = 0.039$]. Moreover, we found no significant differences in the expression of both strands of miR-33a in serum of our patients. Our results showed an upregulation of miR-33a-5p and downregulation of miR-33a-3p in monocytes, these data are associated with cIMT, which could be a risk factor for the development of hypertension. In addition, upregulation of miR-33a-5p in monocytes from Mexican hypertensive patients could be involved in the development of atherosclerosis.

Introduction

Arterial hypertension (HTA) is a key risk factor for the development of cardiovascular diseases [1]. Hemodynamic stress, endothelial dysfunction, oxidative stress, and vascular inflammation are the main processes by means of

which HTA favors the formation of atherosclerotic plaque [2]. Changes originated in the arterial wall due to this pathology progressive increase the carotid intima-media thickness (cIMT) [3]. However, until now there is no knowledge of all the genes involved in the regulation of these processes.

One of the main events in atherosclerotic lesion progression is the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) in the arterial wall. The principal multi-ligand transmembrane receptor involved in the uptake of aggregated LDL (agLDL) is the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) [4]; LRP1 contains sterol regulatory element (SRE) sequences, accordingly it can be regulated through sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), a family of membrane-bound transcription factors composed of two genes [5]. Considerable evidence supports the silencing of either SREBP-1 or SREBP-2 in vascular smooth muscle cells (VSMC) enhanced LRP1 whereas overexpression of both isoforms decreased LRP1 expression [5, 6], demonstrating that both SREBP-1 and

These authors contributed equally: Torres-Paz Yazmín Estela, Huesca-Gómez Claudia

✉ Ricardo Gamboa
rgamboaa_2000@yahoo.com

¹ Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City, Mexico

² Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City, Mexico

³ Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, México City, Mexico



Article

Lack of Association between Cytokine Genetic Polymorphisms in Takayasu's Arteritis in Mexican Patients

María Elena Soto ¹, Claudia Huesca-Gómez ², Yazmín Torres-Paz ²,
Giovanny Fuentesvilla-Álvarez ² and Ricardo Gamboa ^{2,*}

¹ Immunology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, México City 14080, Mexico; sotele@cardiologia.org.mx

² Physiology Department, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI, Tlalpan, Mexico City 14080, Mexico; claudia.huesca@cardiologia.org.mx (C.H.-G.); yazminestela@hotmail.com (Y.T.-P.); fuentesvilla_alvarez@hotmail.com (G.F.-Á.)

* Correspondence: rgamboaa_2000@yahoo.com; Tel.: +52-(55)-55-73-29-11 (ext. 25402)

Received: 11 October 2019; Accepted: 27 November 2019; Published: 3 December 2019



Abstract: *Aim:* To investigate the relation between polymorphisms in the interleukin 10 (*IL*)-10, tumor necrosis factor (*TNF*)- α , transforming growth factor (*TGF*)- β and interferon (*IFN*)- γ genes and Takayasu's arteritis in the Mexican population. *Methods:* A case-control study was performed to investigate the associations of *IL*-10, *TNF*- α , *TGF*- β and *IFN*- γ polymorphisms in a sample of 52 Takayasu's arteritis patients, diagnosed according to the criteria of the American College of Rheumatology and EULAR PRINTO criteria when the patients were under 18 years of age; 60 clinically healthy unrelated Mexican individuals by the 5' exonuclease TaqMan polymerase chain reaction. Polymorphic haplotypes were constructed after linkage disequilibrium analysis. *Results:* Significant differences were not found in the distribution for genotype and allele frequencies of the polymorphisms studied between healthy controls and Takayasu's arteritis patients. Likewise, significant associations were not detected in the haplotype analysis with the different genes studied. *Conclusions:* These findings suggest that the polymorphisms in *IL*-10, *TNF*- α , *TGF*- β and *IFN*- γ might not contribute to the susceptibility of Takayasu's arteritis in the Mexican population.

Keywords: cytokines; Takayasu's arteritis; polymorphisms; Mexican population

1. Introduction

Takayasu's arteritis (TA) is an inflammatory disease that affects medium and large arteries, predominantly the aorta and its main branches. The arterial inflammation can lead to wall thickening, arterial stenosis, fibrosis, thrombus formation, and progressive occlusion [1]. The clinical manifestations of Takayasu's arteritis usually appear in childbearing-age women [1,2].

Inflammation in Takayasu's arteritis begins around the vasa vasorum and it is accompanied by the infiltration of several inflammatory cells, leading to granuloma formation. At this stage, the production of inflammatory mediators is markedly increased [3,4]. This response includes many factors such as CD4⁺/CD8⁺ lymphocytes, macrophages and pro-inflammatory cytokines.

Cytokines are involved in synergistic and antagonistic interactions, exhibiting both positive and negative regulatory effects [5]. Several studies have related single nucleotide polymorphisms (SNPs) of some cytokine genes to risk factors in inflammatory processes. The formation of granulomas in giant cell arteritis and vascular granulomatous are also related [6,7]. Among the cytokines that might be involved, tumor necrosis factor (TNF)- α , a powerful immunomediator and proinflammatory cytokine



Association between the transporters ABCA1/G1 and the expression of miR-33a/144 and the carotid intima media thickness in patients with arterial hypertension

Claudia Huesca-Gómez¹ · Yazmín Estela Torres-Paz¹ · Rocío Martínez-Alvarado² · Giovanni Fuentesvilla-Álvarez¹ · Leonardo Del Valle-Mondragón³ · Margarita Torres-Tamayo² · Ma. Elena Soto⁴ · Ricardo Gamboa¹ 

Received: 22 October 2019 / Accepted: 7 December 2019

© Springer Nature B.V. 2019

Abstract

ATP-binding cassette membrane transporters (ABC), functions as an outflow facilitator of phospholipids and cellular cholesterol, playing an important role in the development of atherosclerosis and arterial hypertension. ABC's transporters could post-transcriptionally regulated by miRs. Evaluate the association in the transporters ABCA1 and ABCG1 with the expression of miR-33a and miR-144 and the carotid intima media thickness (cIMT) in patients with essential arterial hypertension. The miR-33a-5p, miR-144-3p and mRNA ABCA1 and ABCG1 expression in monocytes from Mexican hypertensive patients were examined by RT-PCR. The miR-33a and miR-144 expression in monocytes and mRNA ABCA1 and ABCG1 from Mexican hypertensive patients were examined by RT-PCR. This study involved 84 subjects (42 normotensive subjects and 42 patients with essential hypertension). Our study revealed that miR-33a expression ($p=0.001$) and miR-144 ($p=0.985$) were up-regulated, meanwhile, ABCA1 and ABCG1 transporters were down-regulated ($p=0.007$ and $p=0.550$ respectively) in hypertensive patients compared with the control group. The trend remains for miR33a/ABCA1 in presence of cIMT. Moreover, an inverse correlation was found with the expression levels of ABCA1 and ABCG1 as well as in HDL-C with miR-33a and miR-144. Our results showed an increase in the expression of miR-33a and miR-144 and an inverse correlation in their target ABCA1 and ABCG1; it may be associated with essential arterial hypertension in patients with cIMT and as consequence for atheromatous plaque.

Keywords miR-33a · miR-144 · ABC transporters · Arterial hypertension · Carotid intima-media thickness

Introduction

Hypertension, a chronic elevation of blood pressure is an indisputable risk factor of cardiovascular diseases such as myocardial infarction, stroke, and is also the leading cause of chronic renal failure.

It is known that the pathophysiology of arterial hypertension is multifactorial, which implies hemodynamic stress, endothelial deregulation, vascular smooth muscle dysfunction, increased oxidative stress, activation of the sympathetic nervous system as well as the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAA). The activation of these factors leads to changes in the arterial wall which cause a progressive increase in the cIMT and favors the development of atherosclerosis. In monocytes/macrophages it has been observed that they participate in the process of inflammation and in the formation of foam cells that lead to the progression of atherosclerotic plaques through different pathways

✉ Ricardo Gamboa
rgamboaa_2000@yahoo.com

¹ Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No 1, Col. Sección XVI, C.P. 14080 Mexico City, Mexico

² Department of Endocrinology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Mexico City, Mexico

³ Department of Pharmacology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Mexico City, Mexico

⁴ Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Mexico City, Mexico

Monocyte Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP1) Expression Correlates with cIMT in Mexican Hypertensive Patients

Ricardo Gamboa,¹ María José Jaramillo-Estrella,¹ María del Rocio Martínez-Alvarado,¹ María Elena Soto,¹ Yazmin Estela Torres-Paz,¹ David de Gonzalo-Calvo,² Leonardo Del Valle-Mondragón,¹ Rebeca López-Marure,¹ Vicenta C. Llorente-Cortés,² Claudia Huesca-Gómez¹ 

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez,¹ Ciudad de México - Mexico

Hospital de Sant Pau - Lipids and Cardiovascular Pathology Group,² Barcelona, Catalunya – Spain

Abstract

Background: Arterial hypertension (HTA) represents a major risk factor for cardiovascular morbidity and mortality. It is not yet known which specific molecular mechanisms are associated with the development of essential hypertension.

Objective: In this study, we analyzed the association between LRP1 monocyte mRNA expression, LRP1 protein expression, and carotid intima media thickness (cIMT) of patients with essential hypertension.

Methods: The LRP1 monocyte mRNA expression and protein levels and cIMT were quantified in 200 Mexican subjects, 91 normotensive (NT) and 109 hypertensive (HT). Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

Results: HT patients group had highly significant greater cIMT as compared to NT patients ($p=0.002$) and this correlated with an increase in the expression of LRP1 mRNA expression (6.54 vs. 2.87) ($p = 0.002$) and LRP1 protein expression (17.83 vs. 6.25), respectively ($p = 0.001$). These differences were maintained even when we divided our study groups, taking into account only those who presented dyslipidemia in both, mRNA ($p = 0.041$) and proteins expression ($p < 0.001$). It was also found that Ang II mediated LRP1 induction on monocytes in a dose and time dependent manner with significant difference in NT vs. HT (0.195 ± 0.09 vs. 0.226 ± 0.12 , $p = 0.046$).

Conclusion: An increase in cIMT was found in subjects with hypertension, associated with higher mRNA and LRP1 protein expressions in monocytes, irrespective of the presence of dyslipidemias in HT patients. These results suggest that LRP1 upregulation in monocytes from Mexican hypertensive patients could be involved in the increased cIMT. (Arq Bras Cardiol. 2021; 116(1):56-65)

Keywords: Monocytes; LRP1; mRNA; Hypertension/epidemiology; Mexico; Carotid Intima Media Thickness.

Introduction

Arterial hypertension (HTA) is a chronic and multifactorial disease that constitutes a serious public health problem.¹ Hypertension rarely causes symptoms in the early stages; it is a silent killer, causing accelerated atherosclerosis, damage to major organs, disability, and death from cardiovascular diseases.²

Atherosclerotic lesions include altered endothelial cells, circulating monocytes, vascular smooth muscle cells (VSMC) migration, and foam cell development.³ The altered endothelium allows the entrance and retention of low density lipoprotein (LDL) into the intima layer.⁴ Once LDL is trapped in the arterial intima, it undergoes changes, such as oxidation and aggregation, that facilitate its uptake by intimal monocytes-macrophages and VSMC through their recognition by non-

classic LDL receptors.⁵ These receptors are not regulated by cholesterol and allow a massive uptake of modified LDL, causing intracellular lipid accumulation.

The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1), which is a transmembrane multiligand receptor⁶ belonging to the LDLR family, is expressed in different cells such as neurons, fibroblasts, tumoral cells, hepatocytes, vascular smooth muscle cells, and monocytes and macrophages.^{7, 8} It is known to participate in the uptake of modified LDL⁹ and is over expressed in atherosclerotic plaques in both animal and human models.^{10, 11}

Furthermore, *LRP1* gene expression is increased in mononuclear cells from patients with coronary occlusion.^{12, 13} In monocytes and macrophages, *LRP1* contributes to the uptake of modified aggregated LDL.^{14, 15} Nevertheless, the effects of hypertension on *LRP1* expression in humans are not exactly known. Therefore, obtaining circulating monocytes made it possible to study the mechanisms of their participation in the formation of atherosclerotic plaque.¹⁶ In another way, the cIMT is considered an excellent non-invasive marker for cardiovascular disease; it has been associated with atherosclerosis and cardiovascular risk factors^{17, 18} and the prevalence of cardiovascular disease, proving it is useful in the diagnosis of atherosclerosis.¹⁹⁻²¹ Accordingly, the purpose of this

Mailing Address: Claudia Huesca-Gómez •

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chavez – Physiology - “. Juan Badiano No 1, Col. Sección XVI Mexico 14080 – Mexico










E-mail: claudia.huesca@cardiologia.org.mx

Manuscript received August 09, 2019, revised manuscript February 07, 2020, accepted March 16, 2020

DOI: <https://doi.org/10.36660/abc.20190535>

RESEARCH ARTICLE

Analysis of *GPR126* polymorphisms and their relationship with scoliosis in Marfan syndrome and Marfan-like syndrome in Mexican patients

Maria Elena Soto ^{1,2#}, Giovanni Fuentesvilla-Alvarez ^{3,4#}, Solange Gabriela Koretzky ⁵, Gilberto Vargas-Alarcón ⁶, Yazmín Estela Torres-Paz ³, Sergio Enrique Meza-Toledo ⁴, Israel Pérez-Torres ⁷, Claudia Huesca-Gómez ^{3*}, and Ricardo Gamboa ^{3*}

Marfan syndrome (MFS) is an inherited connective tissue disorder. As the spinal growth depends on the delicate balance of forces, conditions that affect musculoskeletal matrix often lead to spinal deformities. A large cross-sectional study revealed a 63% prevalence of scoliosis among patients with MFS. Multi-ethnic genome-wide association studies and analyses of human genetic mutations showed that variations and mutations of G protein-coupled receptor 126 (*GPR126*) locus are associated with multiple skeletal defects, including shorter stature and adolescent idiopathic scoliosis. The study included 54 patients with MFS and 196 control patients. The DNA was extracted from peripheral blood using the saline expulsion method and single nucleotide polymorphism (SNP) determination was carried out using TaqMan probes. Allelic discrimination was performed by RT-qPCR. Significant differences in genotype frequencies were found for SNP rs6570507 in relation to MFS and sex (recessive model, odds ratio [OR] 2.46, 95% confidence interval [CI] 1.03–5.87; $P = 0.03$) and rs7755109 (overdominant model, OR 0.39, 95% CI 0.16–0.91; $P = 0.03$). The most significant association was found in SNP rs7755109, where the frequency of genotype AG was significantly different between MFS patients with scoliosis and those without (OR 5.68, 95% CI 1.09–29.48; $P = 0.04$). This study, for the first time, examined the genetic association of SNP *GPR126* with the risk of scoliosis in patients with connective tissue diseases. The study revealed that SNP rs7755109 is associated with the presence of scoliosis in Mexican patients with MFS.

Keywords: G protein-coupled receptor 126 (*GPR126*), Marfan syndrome (MFS), single nucleotide polymorphism (SNP), scoliosis.

Introduction

Marfan syndrome (MFS) is an inherited connective tissue disorder caused by heterozygous mutations in the *FBNI* gene, which encodes the extracellular matrix protein fibrillin-1 [1]. MFS is considered as one of the most lethal conditions in Mendelian inheritance [2]. The *FBNI* gene can undergo a range of mutations, such as missense or nonsense mutations, insertions or deletions that occur within or outside of the frame, and mutations affecting exonic or splice sites. In approximately 40% of MFS cases, mutations in the *FBNI* gene lead to haploinsufficiency. Meanwhile, dominant negative mutations account for approximately 60% of cases. These mutations modify the components of fibrillin-1 and thus affect interaction with other proteins from the extracellular matrix. A variety of effects of these mutations have been described at the protein level; they include changes to the secondary structures of proteins, which can lead to a delay in protein secretion or an increased susceptibility.

Furthermore, truncation codon mutations are linked with the onset of severe skeletal and skin lesions [3]. As the spinal growth depends on the delicate balance of forces, conditions that affect musculoskeletal matrix often lead to spinal deformities. A large cross-sectional study revealed a 63% prevalence of scoliosis among patients with MFS. However, many of these curves were minor and only 10%–20% needed treatment. The curve patterns resembled those seen in patients with idiopathic scoliosis, with thoracolumbar and thoracic curves being the most common types. Interestingly, there was a higher prevalence of triple curves noted in these cases [4, 5]. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is a complex three-dimensional deformity of the spine, including variable degrees of changes across the frontal, sagittal, and axial planes. It affects 2%–3% of the adolescent population [6] with the incidence of 1 in every 300–1000 live births; women are affected more frequently than men [7]. While both genetic and epigenetic factors have been associ-

¹Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México; ²Cardiovascular Line Department in American British Cowdray (ABC) Medical Center, México City, México; ³Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México; ⁴Department of Biochemistry, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City, México; ⁵Editorial Department, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México; ⁶Research Direction, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México; ⁷Department of Cardiovascular Biomedicine, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, México.

*Correspondence to Claudia Huesca-Gómez: claudia.huesca@cardiologia.org.mx; Ricardo Gamboa: rgamboaa_2000@yahoo.com

#Maria Elena Soto and Giovanni Fuentesvilla-Alvarez equally contributed to this work and share first authorship

DOI: 10.17305/bb.2023.9268

© 2023 Soto et al. This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Expressions of mRNA and encoded proteins of mitochondrial uncoupling protein genes (*UCP1*, *UCP2*, and *UCP3*) in epicardial and mediastinal adipose tissue and associations with coronary artery disease

Claudia Huesca-Gómez¹
<https://orcid.org/0000-0002-6806-3484>

Yazmín Estela Torres-Paz¹
<https://orcid.org/0000-0001-9835-703X>

Giovanny Fuentesvilla-Álvarez¹
<https://orcid.org/0000-0002-1819-8444>

Nadia Janet González-Moyotl¹
<https://orcid.org/0000-0003-0672-5048>

Edgar Samuel Ramírez-Marroquín²
<https://orcid.org/0000-0002-4210-1307>

Xicótencaatl Vásquez-Jiménez²
<https://orcid.org/0000-0001-9071-803X>

Víctor Sainz-Escarrega²
<https://orcid.org/0000-0002-0611-9745>

María Elena Soto³
<https://orcid.org/0000-0003-1332-2888>

Reyna Samano⁴
<https://orcid.org/0000-0001-5490-1363>

Ricardo Gamboa¹
<https://orcid.org/0000-0001-9102-4240>

¹ Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Fisiología, Ciudad de México, México
² Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Cirugía Cardiorrágica, Ciudad de México, México
³ Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Departamento de Inmunología, Ciudad de México, México
⁴ Instituto Nacional de Perinatología, Coordinación de Nutrición y Bioprogramación, Ciudad de México, México

ABSTRACT

Objective: To evaluate the expression of *UCP1*, *UCP2*, and *UCP3* mRNA and encoded proteins in epicardial and mediastinal adipose tissues in patients with coronary artery disease (CAD). **Subjects and methods:** We studied 60 patients with CAD and 106 patients undergoing valve replacement surgery (controls). Expression levels of *UCP1*, *UCP2*, and *UCP3* mRNA and encoded proteins were measured by quantitative real-time PCR and Western blot analysis, respectively. **Results:** We found increased *UCP1*, *UCP2*, and *UCP3* mRNA levels in the epicardial adipose tissue in the CAD versus the control group, and higher *UCP1* and *UCP3* mRNA expression in the epicardial compared with the mediastinal tissue in the CAD group. There was also increased expression of UCP1 protein in the epicardial tissue and UCP2 protein in the mediastinum tissue in patients with CAD. Finally, *UCP1* expression was associated with levels of fasting plasma glucose, and *UCP3* expression was associated with levels of high-density lipoprotein cholesterol and low-density cholesterol in the epicardial tissue. **Conclusions:** Our study supports the hypothesis that higher mRNA expression by *UCP* genes in the epicardial adipose tissue could be a protective mechanism against the production of reactive oxygen species and may guard the myocardium against damage. Thus, UCP levels are essential to maintain the adaptive phase of cardiac injury in the presence of metabolic disorders. Arch Endocrinol Metab. 2023;67(2):214-23

Keywords

Mitochondrial uncoupling proteins; mediastinal adipose tissue; epicardial adipose tissue; cardiovascular disease

Correspondence to:

Ricardo Gamboa
 Departamento de Fisiología,
 Instituto Nacional de Cardiología
 “Ignacio Chávez”
 Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI.
 cp. 14380, Ciudad de México, México

Received on Feb/23/2022
 Accepted on Aug/3/2022

DOI: 10.20945/2359-399700000582



Article

Impact on the Clinical Evolution of Patients with COVID-19 Pneumonia and the Participation of the *NFE2L2/KEAP1* Polymorphisms in Regulating SARS-CoV-2 Infection

María Elena Soto ^{1,2,†} , Giovanni Fuentesvilla-Álvarez ^{3,4,†} , Adrián Palacios-Chavarría ⁵ , Rafael Ricardo Valdez Vázquez ⁵, Héctor Herrera-Bello ⁵, Lidia Moreno-Castañeda ⁵, Yazmín Estela Torres-Paz ³, Nadia Janet González-Moyotl ³ , Idalia Pérez-Torres ⁶, Alfredo Aisa-Alvarez ^{5,7}, Linaloe Manzano-Pech ⁸, Israel Pérez-Torres ⁸ , Claudia Huesca-Gómez ³ and Ricardo Gamboa ^{3,*}

- ¹ Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI, México City 14380, Mexico
 - ² Cardiovascular Line in American British Cowdray (ABC) Medical Center, I.A.P. ABC I.A.P. ABC Sur 136 No. 116 Col. Las Américas, México City 01120, Mexico
 - ³ Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI, México City 14380, Mexico
 - ⁴ Department of Biochemistry, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), Manuel Carpio y Plutarco Elias Calles, Col. Miguel Hidalgo, México City 11350, Mexico
 - ⁵ Critical Care Unit of the Temporal COVID-19 Unit, Citibanamex Center Av. del Conscripto 311, Lomas de Sotelo, Hipódromo de las Américas, Miguel Hidalgo, México City 11200, Mexico
 - ⁶ Department of Genetic, Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, Doctor Márquez 162, Col. Doctores, México City 06720, Mexico
 - ⁷ Critical Care in American British Cowdray (ABC) Medical Center, I.A.P. ABC I.A.P. ABC Sur 136 No. 116 Col. Las Américas, México City 01120, Mexico
 - ⁸ Department of Cardiovascular Biomedicine, Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, Juan Badiano No. 1. Col. Sección XVI, México City 14380, Mexico
- * Correspondence: rgamboaa_2000@yahoo.com
† These authors contributed equally to this work.



Citation: Soto, M.E.; Fuentesvilla-Álvarez, G.; Palacios-Chavarría, A.; Vázquez, R.R.V.; Herrera-Bello, H.; Moreno-Castañeda, L.; Torres-Paz, Y.E.; González-Moyotl, N.J.; Pérez-Torres, I.; Aisa-Alvarez, A.; et al. Impact on the Clinical Evolution of Patients with COVID-19 Pneumonia and the Participation of the *NFE2L2/KEAP1* Polymorphisms in Regulating SARS-CoV-2 Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 415. <https://doi.org/10.3390/ijms24010415>

Academic Editor: Evgenii Gusev

Received: 21 October 2022

Revised: 8 December 2022

Accepted: 13 December 2022

Published: 27 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In patients with severe pneumonia due to COVID-19, the deregulation of oxidative stress is present. Nuclear erythroid factor 2 (NRF2) is regulated by KEAP1, and NRF2 regulates the expression of genes such as *NFE2L2-KEAP1*, which are involved in cellular defense against oxidative stress. In this study, we analyzed the participation of the polymorphisms of *NFE2L2* and *KEAP1* genes in the mechanisms of damage in lung disease patients with SARS-CoV-2 infection. Patients with COVID-19 and a control group were included. Organ dysfunction was evaluated using SOFA. SARS-CoV-2 infection was confirmed and classified as moderate or severe by ventilatory status and by the Berlin criteria for acute respiratory distress syndrome. SNPs in the gene locus for *NFE2L2*, rs2364723C>G, and *KEAP1*, rs9676881A>G, and rs34197572C>T were determined by qPCR. We analyzed 110 individuals with SARS-CoV-2 infection: 51 with severe evolution and 59 with moderate evolution. We also analyzed 111 controls. Significant differences were found for rs2364723 allele G in severe cases vs. controls ($p = 0.02$); for the rs9676881 allele G in moderate cases vs. controls ($p = 0.04$); for the rs34197572 allele T in severe cases vs. controls ($p = 0.001$); and in severe vs. moderate cases ($p = 0.004$). Our results showed that *NFE2L2* rs2364723C>G allele G had a protective effect against severe COVID-19, while *KEAP1* rs9676881A>G allele G and rs34197572C>T minor allele T were associated with more aggressive stages of COVID-19.












Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; pathogenesis; inflammation; *NFE2L2*; *KEAP1*; single nucleotide polymorphism

1. Introduction

The coronavirus SARS-CoV-2 belongs to the genus β -*coronavirus*, which is responsible for the current acute respiratory syndrome, COVID-19. It is known that, in each wave of

RESEARCH ARTICLE

The usefulness of the genetic panel in the classification and refinement of diagnostic accuracy of Mexican patients with Marfan syndrome and other connective tissue disorders

Giovanny Fuentesvilla-Álvarez ^{1,2#}, María Elena Soto ^{3,4,5#}, Yazmín Estela Torres-Paz ¹, Sergio Enrique Meza-Toledo ², Gilberto Vargas-Alarcón ⁵, Nadia González-Moyotl ¹, Israel Pérez-Torres ⁶, Linaloe Manzano-Pech ⁶, Ana Maria Mejía ⁷, Claudia Huesca-Gómez ¹, and Ricardo Gamboa ^{1*}

Marfan syndrome (MFS) is a multisystem genetic disorder with over 3000 mutations described in the fibrillin 1 (*FBN1*) gene. Like MFS, other connective tissue disorders also require a deeper understanding of the phenotype–genotype relationship due to the complexity of the clinical presentation, where diagnostic criteria often overlap. Our objective was to identify mutations in patients with connective tissue disorders using a genetic multipanel and to analyze the genotype–phenotype associations in a cohort of Mexican patients. We recruited 136 patients with MFS and related syndromes from the National Institute of Cardiology. Mutations were identified using next-generation sequencing. To examine the correlation between mutation severity and severe cardiovascular conditions, we focused on patients who had undergone Bentall–de Bono surgery or aortic valve repair. The genetic data obtained allowed us to reclassify the initial clinical diagnosis across various types of connective tissue disorders. The transforming growth factor beta receptor 2 (*TGFBR2*) rs79375991 mutation was found in 10 out of 16 (63%) Loeys–Dietz patients. We observed a high prevalence (65%) of more severe mutations, such as frameshift indels and stop codons, among patients requiring invasive treatments like aortic valve-sparing surgery, Bentall and de Bono procedures, or aortic valve replacement due to severe cardiovascular injury. Although our study did not achieve precise phenotype–genotype correlations, it underscores the importance of a multigenetic panel evaluation. This could pave the way for a more comprehensive diagnostic approach and inform medical and surgical treatment decision making.

Keywords: Marfan syndrome (MFS), other connective tissue disease, next-generation sequencing (NGS) sequencing, genetic mutations, cardiovascular damage, Mexican patients.

Introduction

Marfan syndrome (MFS) is one of the most common inherited disorders affecting connective tissue, with primary clinical manifestations in the skeletal, ocular, and cardiac systems [1]. Reduced survival is primarily due to aortic complications, such as aortic root dilatation and dissection. Other cardiovascular issues like aortic dissection, mitral valve prolapse, aortic rupture, tricuspid valve prolapse, and proximal pulmonary artery enlargement [2] are the most significant causes of morbidity and mortality in this pathology and occur in up to 25% of patients during childhood. Mutations in the fibrillin 1 (*FBN1*) gene, which encodes fibrillin-1, are the lead-

ing cause of MFS and can be identified in 91%–95% of subjects with classic Marfan [3]. MFS is a multisystem genetic disease characterized by autosomal dominant inheritance and high penetrance, which can be considered 100% [1]. Patients with *FBN1* mutations display a range of phenotypes from mild to severe. Over 3000 mutations in the *FBN1* gene have been described in patients with MFS [4]. However, the relationship between phenotype and genotype still requires clarification due to the complex clinical presentation of MFS and the significant overlap of diagnostic criteria with other Marfan-like disorders. Mutations in a wide variety of genes, such as *TGFBR1*, transforming growth factor beta receptor 2 (*TGFBR2*), *SMADs*,

¹Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, Mexico; ²Department of Biochemistry, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional (IPN), México City, Mexico; ³Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, Mexico; ⁴Cardiovascular Line in American British Cowdray (ABC) Medical Center, México City, Mexico; ⁵Research Direction, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, Mexico; ⁶Department of Cardiovascular Biomedicine, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, Mexico; ⁷Department of Blood Bank, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México City, Mexico.

*Correspondence to Ricardo Gamboa: rgamboaa_2000@yahoo.com

#Giovanny Fuentesvilla-Álvarez and María Elena Soto equally contributed to this work and share first authorship.

DOI: 10.17305/bb.2023.9578

© 2023 Fuentesvilla-Álvarez et al. This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).