



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

CAMPO DEL CONOCIMIENTO INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

BIOQUÍMICA CLÍNICA

**PARTICIPACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN DE OSTEOPONTINA
(OPN) EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

QBP. LIZET PAOLA HERNÁNDEZ GERMÁN

Tutor:

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Julio Granados Arriola. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, “Salvador Zubirán”.

VOCAL: Dr. José Manuel Rodríguez Pérez. Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”.

VOCAL: Dr. José Pedraza Chaverri. Facultad de Química, UNAM.

VOCAL: Dr. Fausto Sánchez Muñoz. Instituto Nacional de Cardiología, “Ignacio Chávez”.

SECRETARIO: Dr. Antonio Miranda Duarte. Instituto Nacional de Rehabilitación, “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genómica del

Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología
“Ignacio Chávez”

Bajo la tutoría del Dr. José Manuel Rodríguez Pérez



**MAESTRÍA y
DOCTORADO**^{en}
Ciencias Médicas
Odontológicas
y de la Salud



Agradecimientos

Como primer lugar, agradezco a Dios y a la Santísima Virgen de Guadalupe por brindarme salud durante mi estancia en la maestría.

Gracias a Dios por darme la fortaleza, sabiduría y espíritu de lucha para no desfallecer, sin su ayuda, no fuera posible emprender y culminar este camino tan sublime de la ciencia.

A los pacientes del proyecto GEA, por su apoyo para realizar este gran proyecto.

Al laboratorio de Endocrinología, del Instituto “Ignacio Chávez”, por su excepcional trabajo.

A los Doctores que integraron el jurado revisor, por su tiempo, dedicación, y constructivo aporte en la culminación de mi trabajo.

A la UNAM, Facultad de Química y el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud por brindarme un espacio en esta Institución.

También quiero agradecer al Dr. José Manuel Rodríguez Pérez por brindarme su apoyo, paciencia y enseñanzas, por tenderme la mano en difíciles momentos en los que quise desistir. Gracias estimado y querido Tutor.

Dedicatorias

Este trabajo es dedicado enteramente a mis Padres, han sido guía y dirección en mi vida, ellos han sido el sostén de caídas y triunfos. Mi hermosa mamita el mejor ejemplo que yo pudiera tener, a Dios y a ellos, les debo lo que he forjado con mucho esfuerzo en mi persona. A mis padres (Rita y Conrado), por ser ellos el apoyo en el cumplimiento de mis sueños y anhelos más profundos, a mi mami que tanto admiro y amo, de una forma muy especial, ya que es un ejemplo de una vida llena de esfuerzo y lucha por conseguir lo que se ha propuesto, una vida de entrega y sacrificio a su mayor pasión y amor: su familia. Pues siempre me ha alentado a cumplir mis metas, sin dejarlas inconclusas, dándome cada día los mejores consejos y ánimos de que yo puedo lograr todo lo que me proponga en la vida. A mi padre pues ha sido el sostén familiar, me ha dado ejemplo de transparencia, honorabilidad además virtudes que son esenciales en una vida buena como la paciencia, nobleza y templanza. A Jacqueline que es también un ejemplo de hermana mayor, de que el éxito es la suma de constantes esfuerzos, a mi amado hermanito Álvaro Iván que es la prueba fehaciente de que con Dios todo es posible, a mi querida niña Alondra quién ha sido fuente de alegría en este largo camino de formación. Unos Padres tan maravillosos y una familia así son un regalo de Dios, ellos son mi mayor fuente de inspiración, lo valen todo. ¡Los amo profundamente!

A mí querido amigo Adrián por tenderme la mano en momentos tan difíciles, por su motivación, comprensión y apoyo para culminar este proyecto. Dios me ha regalado un verdadero amigo en ÉL.

A una persona que ha comenzado a ser muy importante en mi vida (Ben), por su paciencia, comprensión y apoyo incondicional.

Esculpir en tu alma la imagen sublime que Dios concibió al formarte, es la noble labor a que damos el nombre de autoeducación. Este trabajo tiene que hacerlo cada una por sí misma, y nadie cumplirlo en su lugar, Oras podrán darte consejo, podrán indicarte el camino recto; pero en definitiva, tú has de ser quien sientas el deseo de formar en ti la noble imagen que Dios ha escondido en tu alma.

“En todas tus obras, grandes o pequeñas, mira a Dios” (II, 9, 31, 174)

ÍNDICE

Contenido

Abreviaturas	11
Resumen.....	14
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 MARCO TEÓRICO.....	15
1.1.1 Enfermedad arterial coronaria	15
1.1.2 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares	16
1.1.3 Enfermedades multifactoriales o complejas	21
1.1.4 Factores de riesgo.....	22
1.1.5 Fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria.....	23
1.1.6 Calcificación arterial coronaria	25
1.2 Antecedentes.....	28
1.2.1 Participación de osteopontina en EAC	28
1.2.2 Gen <i>OPN</i>	29
1.2.3 Proteína <i>OPN</i>	31
1.2.4 Estructura molecular de <i>OPN</i>	31
1.2.5 Regulación de <i>OPN</i>	33
1.2.6 Asociaciones con polimorfismos del gen <i>OPN</i>	35

ÍNDICE

2 .PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	39
5. HIPÓTESIS	39
6. OBJETIVO GENERAL	40
6.1 Objetivos particulares	40
7. MATERIAL Y MÉTODOS	41
7.1 Tipo de estudio	41
7.2 Población de estudio	41
7.3 Procedencia de los sujetos de estudio	41
7.4 Criterios de selección.....	42
7.4.1.Criterios de inclusión.....	42
7.4.2 Criterios de exclusión.....	42
7.5 Tamaño de muestra.....	42
7.6 Métodos.....	43
7.7 Método de recolección de datos	44
7.7.1 Métodos Clínicos y de Laboratorio.....	44
7.7.2 Análisis de Laboratorio.....	45
7.7.3 Extracción de ADN.....	46
7.7.4 Cuantificación de DNA.....	46
7.7.5 Sitios polimórficos analizados.....	47
7.7.6Determinación de los polimorfismos.....	47
7.7.7 Preparación de las placas de PCR para discriminación alélica.....	47
7.7.8 Discriminación alélica con el método Taqman.....	48
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
9. RESULTADOS	50

9.1 Características clínicas y metabólicas de los grupos estudiados.....	50
9.2 Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con enfermedad arterial coronaria prematura.....	52
9.3 Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con anomalías metabólicas en el grupo enfermedad arterial coronaria prematura.....	54
9.4 Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con anomalías metabólicas en el grupo control.....	56
10. DISCUSIÓN	58
11. CONCLUSIONES	63
12. PERSPECTIVAS	63
13. BIBLIOGRAFIA.....	65

Índice de Figuras

Figura 1. Anatomía de arteria normal	15
Figura 2. Principales causas de muerte por sexo.....	18
Figura 3. Imagen de la anatomía del corazón y vasos sanguíneos en el ser humano.....	19
Figura 4. Mortalidad ocasionada por enfermedades cardiovasculares.....	21
Figura 5. Fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria.....	24
Figura 6. Contribuyentes a la calcificación de la placa.....	27
Figura 7. Cromosoma 4, región de ubicación del gen humano Osteopontina.....	30
Figura 8. Estructura genómica y empalme alternativo de gen humano osteopontina.....	31
Figura 9. Diagrama esquemático de la estructura de osteopontina.....	32

Índice de Tablas

TABLA 1. Participación del polimorfismo rs2728127 de <i>OPN</i> en distintas enfermedades.....	35
TABLA 2. Participación del polimorfismo rs11730582 de <i>OPN</i> en distintas enfermedades.....	36
TABLA 3. Características clínicas y metabólicas de los grupos estudiados.....	51
TABLA 4. Prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en la población estudiada.....	52
TABLA 5. Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con enfermedad arterial coronaria prematura	53
TABLA 6. Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con anomalías metabólicas en el grupo enfermedad arterial coronaria prematura	55
TABLA 7. Asociación entre los polimorfismos del gen <i>OPN</i> con anomalías metabólicas en el grupo control.....	57

ABREVIATURAS

APN: Adiponectina.

Apo A1: apoproteína AI.

Apo B: apoproteína B.

Apo E: apoproteína E.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AS: Aterosclerosis subclínica.

AVC: Accidentes vasculares cerebrales.

BMP: Proteína morfo genética osea.

BSP1: Sialoproteína ósea 1.

CAC: Calcificación arterial coronaria.

CIMT: Del Inglés por las siglas; carotid intima–media thickness=grosor de la carótida intima-media.

CML: Células musculares lisas.

CV: Calcificación vascular.

DE: Desviación estándar.

EAC: Enfermedad arterial coronaria.

EACp: Enfermedad arterial coronaria prematura.

EC: Enfermedades cardiovasculares.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: Factor de crecimiento epidérmico.

ENT: Enfermedades no transmisibles.

ETA1: Proteína de activación temprana de linfocitos T 1.

GEA: Genética de la enfermedad aterosclerosa.

Hap Map: Proyecto internacional creado para desarrollar un mapa de haplotipos del genoma humano.

HDL: Lipoproteína de alta densidad, del inglés *high density lipoprotein*.

HVI: Hipertrofia ventricular izquierda.

IC: Intervalo de confianza.

ICV: Infarto cerebro vascular.

IM: Infarto del miocardio.

IMC: Índice de masa corporal.

INCICH: Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.

LDL: Lipoproteína de baja densidad, del inglés *low density lipoprotein*.

MAF: Frecuencia del alelo menor.

MGP: Proteína de Matriz Gla.

MMP: Metaloproteasas de matriz.

MYT1: Factor de transcripción de mielina 1

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPG: Osteoprotegerina.

OPN: Osteopontina.

OxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PIB: Producto Interno Bruto.

RM: Razón de momios.

SCA: Síndromes coronarios agudos.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SIBLING: Small integrin-binding ligand, N-Linked glycoprotein.

SNPS: Polimorfismos de un solo nucleótido.

SRAA: Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.

SSP1: Fosfoproteína secretada 1.

Taq Man: Sondas de hidrólisis diseñadas para incrementar la especificidad de la PCR cuantitativa.

TGF - β : Factor de crecimiento transformante beta.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α .

RESUMÉN

La Enfermedad Arterial Coronaria (EAC) es la primera causa de muerte en México y en el mundo. La EAC es un proceso inflamatorio crónico caracterizado por la alteración morfológica y funcional de la pared vascular que en estadios finales tiene como consecuencia la disminución del calibre de la luz arterial y como consecuencia final, el infarto al miocardio. Se ha demostrado que la genética es un factor determinante para el desarrollo y progresión de la EAC, sin embargo es una enfermedad multifactorial, por lo que no se han logrado dilucidar por completo los mecanismos involucrados. La proteína osteopontina (OPN) tiene un impacto en el desarrollo de la EAC, particularmente en la inhibición de calcio. Se ha mostrado su asociación con placas aterosclerosas calcificadas, al considerar una FAM mayor al 30%. Con el fin de determinar si los polimorfismos localizados en el gen *OPN* en pacientes con EAC, comparados con el grupo control, se asocian a la susceptibilidad o protección genética de la enfermedad, se realizó el análisis en la cohorte de individuos del proyecto de Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), con 1142 pacientes y 1073 personas sanas. Se les extrajo sangre periférica para la medición de parámetros metabólicos y obtención de DNA. Después se realizó la determinación de los SNPs por PCR en tiempo real con sondas Taqman. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros metabólicos entre el grupo de pacientes con EAC y el grupo control, así como una mayor prevalencia de los factores de riesgo en pacientes que en controles. Sin embargo, las frecuencias alélicas y genotípicas fueron similares en los grupos de estudio. Por otra parte, al realizar el análisis de forma independiente, el alelo rs11730582 *T* se asoció a un menor riesgo de padecer hipertensión arterial en pacientes con EAC. En conjunto, los hallazgos de las asociaciones entre los polimorfismos del gen *OPN*, pueden ser un respaldo importante en la comprensión de la patogénesis de la EAC y contribuyen a aclarar mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo de EAC. Se requieren más estudios de polimorfismos genéticos en otras regiones del gen *OPN*, así como la evaluación del desequilibrio de ligamiento, y el posible efecto funcional, para establecer la verdadera participación del gen en la EAC.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 MARCO TEÓRICO

1.1.1 La aterosclerosis o enfermedad arterial coronaria (EAC) es una enfermedad compleja, caracterizada por la acumulación de lípidos en las capas íntima y media arterial. Esa patología es progresiva, se desarrolla silenciosamente a lo largo de los años y suele estar muy avanzada cuando aparecen los síntomas (Libby et al 2002, Ross et al,1999) (Figura 1).

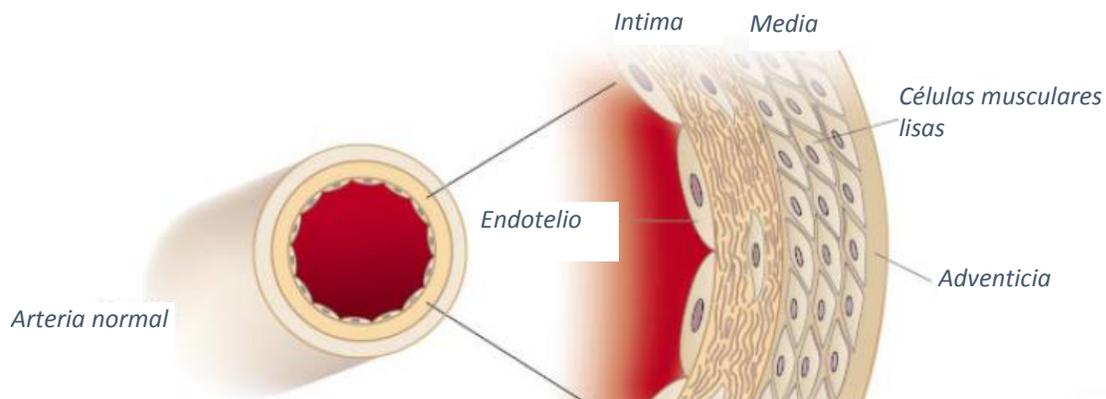


Figura.1 Anatomía de arteria normal, con la conformación de sus capas (intima, media y adventicia). Tomado de Libby et al, 2002

1.1.2 Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades cardiovasculares (EC) son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por EC que por cualquier otra causa. En México las EC representaron casi 20% de las defunciones totales en el país, son la primera causa de mortalidad, generando 50 mil decesos cada año.

Según el INEGI, el aumento en la esperanza de vida de los mexicanos ha provocado que la mayor parte de las defunciones se lleven a cabo en edades avanzadas. Se calcula que en el 2030 morirán cerca de 23.3 millones de personas alrededor del mundo por estas causas; en nuestro país, durante el 2017 ,88.6% se debieron a enfermedades y problemas relacionados con la salud y el 11.4% a causas externas, principalmente accidentes, homicidios y suicidios. Estas son las principales causas de muerte en México para hombres y mujeres, según el reporte del Instituto:

- 1.-Enfermedades del corazón (141,619).
- 2.-Diabetes mellitus (106,525).
- 3.-Tumores malignos (84,142).
- 4.-Enfermedades del hígado (38,833).
- 5.- Accidentes (36,215).
- 6.-Enfermedades cerebro vasculares (35,248).
- 7.- Agresiones/homicidios (32,079).

8.-Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (22,954).

9.-Influenza y neumonía (21,892).

10.-Insuficiencia renal (13,167).

Por problemas de salud, las tres principales causas de muerte tanto para hombres como para mujeres son: enfermedades del corazón (141 619, 20.1%), diabetes mellitus (106 525, 15.2%) y tumores malignos (84 142, 12.0%). Los homicidios son la séptima causa de muerte en la población en general (32 079, 4.6%) y la cuarta causa de muerte en hombres (28 522).

Del total de muertes por enfermedades del corazón, 53.1% (75 256 casos) correspondieron a hombres y 46.8 % (66 337 casos) a mujeres. El grupo de edad en el que se concentra el mayor número de fallecimientos es en el de 65 y más años (75.6%). (Figura 2, INEGI.2017)

Rango	Total	Hombres	Mujeres
1	Enfermedades del corazón 141 619	Enfermedades del corazón 75 256	Enfermedades del corazón 66 337
2	Diabetes mellitus 106 525	Diabetes mellitus 52 309	Diabetes mellitus 54 216
3	Tumores malignos 84 142	Tumores malignos 41 088	Tumores malignos 43 053
4	Enfermedades del hígado 38 833	Agresiones (homicidios) 28 522	Enfermedades cerebrovasculares 17 881
5	Accidentes 36 215	Enfermedades del hígado 28 400	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 140
6	Enfermedades cerebrovasculares 35 248	Accidentes 27 362	Enfermedades del hígado 10 418
7	Agresiones (homicidios) 32 079	Enfermedades cerebrovasculares 17 366	Influenza y neumonía 9 828
8	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 22 954	Influenza y neumonía 12 063	Accidentes 8 823
9	Influenza y neumonía 21 892	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas 11 814	Insuficiencia renal 5 757
10	Insuficiencia renal 13 167	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal 7 452	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal 5 567

■ Enfermedades del corazón
 ■ Diabetes Mellitus
 ■ Tumor maligno
 ■ Otras enfermedades no transmisibles
 ■ Accidentes
 ■ Agresiones (homicidios)
 ■ Enfermedades transmisibles

Figura 2. Principales causas de muerte por sexo en México (INEGI, 2017).

Las enfermedades no transmisibles (ENT) matan a 41 millones de personas cada año, lo que equivale al 71% de las muertes que se producen en el mundo. Cada año mueren por ENT 15 millones de personas de entre 30 y 69 años de edad; más del 85% de estas muertes "prematuras". En términos de economía, la muerte

prematura de personas con enfermedades no transmisibles, como las cardiovasculares y la diabetes, generan un impacto en los países de bajos y medianos ingresos ya que se calcula que pueden reducir hasta en un 6.77% el Producto Interno Bruto (PIB) (OMS 2017). El aumento en la prevalencia e importancia de las ENT, y específicamente de los factores de riesgo cardiovasculares tales como, hipertensión, diabetes, dislipidemia y obesidad, es el resultado de una interacción compleja entre salud, crecimiento económico y desarrollo. Lo anterior está fuertemente asociado con las tendencias universales, como el envejecimiento de la población mundial, la rápida urbanización no planificada y la globalización de estilos de vida poco saludables (Rosas, 2017).

Las enfermedades cardiovasculares (EC) son un grupo de enfermedades del corazón y de los vasos sanguíneos (Figura 3), entre los que se incluyen:

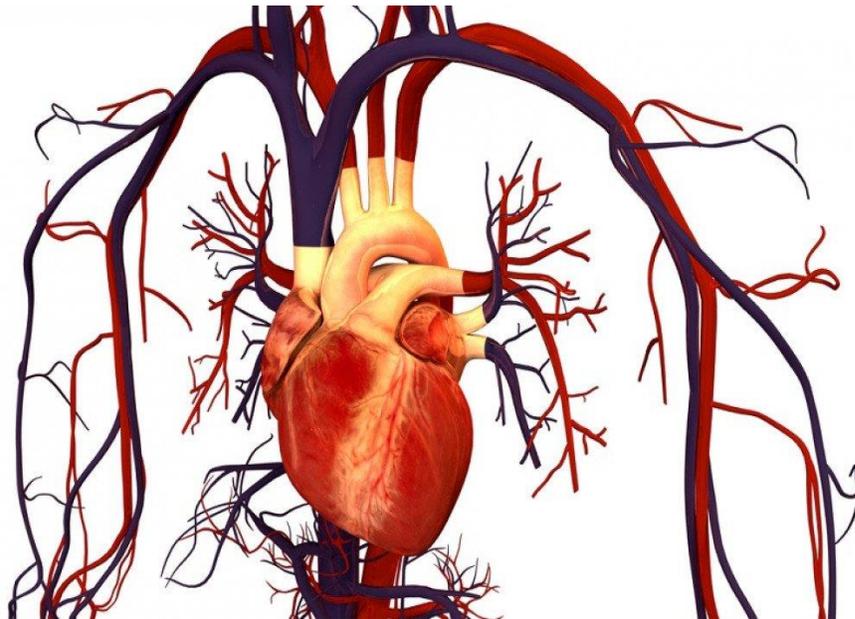


Figura 3. Imagen de la anatomía del corazón y vasos sanguíneos en el ser humano. (OMS, 2017)

- La cardiopatía coronaria: enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el músculo cardíaco.
- Las enfermedades cerebrovasculares: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro.
- Las arteriopatías periféricas: enfermedades de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores.
- La cardiopatía reumática: lesiones del músculo cardíaco y de las válvulas cardíacas debidas a la fiebre reumática, una enfermedad causada por bacterias denominadas estreptococos.
- Las cardiopatías congénitas: malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento.
- Las 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.

Los ataques al corazón y los accidentes vasculares cerebrales (AVC) suelen ser fenómenos agudos que se deben sobre todo a obstrucciones que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro. La causa más frecuente es la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos sanguíneos que irrigan el corazón o el cerebro. Los AVC también pueden deberse a hemorragias de los vasos cerebrales o coágulos de sangre. Los ataques cardíacos y los AVC suelen producirse en la presencia de múltiples factores de riesgo (OMS, 2017).

Del total de muertes ocasionadas por enfermedades del corazón, que asciende a 141 619 casos, las isquémicas ocupan el primer lugar con el 71.9% (101 877 casos), seguidas por las hipertensivas con 16.4% (23 215 casos), y las relacionadas con la circulación pulmonar y otras enfermedades del corazón con 11.1% (15 763 casos). A la fiebre reumática aguda y enfermedades cardíacas reumáticas les correspondió en conjunto, el 0.6% (764 casos).

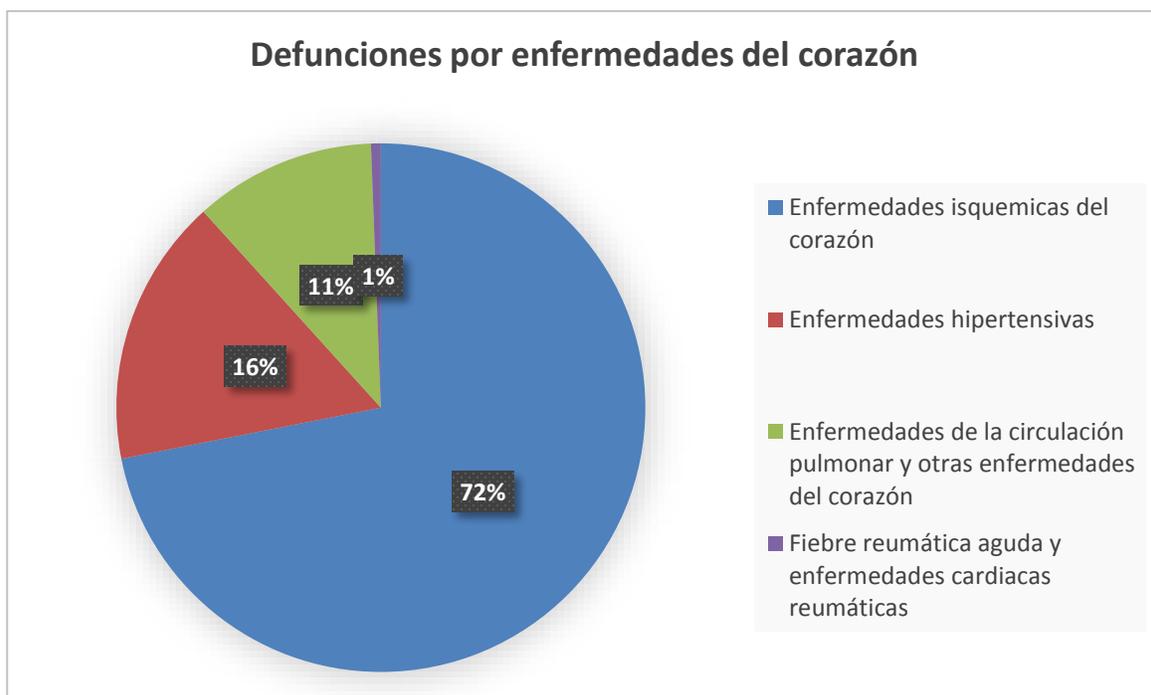


Figura 4. Mortalidad ocasionada por enfermedades cardiovasculares (INEGI, 2017).

1.1.3 Enfermedades multifactoriales o complejas

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad aterosclerosa desde la aterosclerosis asintomática y la angina estable hasta los llamados síndromes coronarios agudos (SCA): angina inestable, infarto del miocardio (IM) y muerte súbita, muestran una situación compleja en cuanto a que la aterosclerosis

representa el producto de múltiples influencias genéticas y ambientales que están interactuando. En las enfermedades multifactoriales o complejas existen diferentes genes involucrados en la etiología de la enfermedad junto con la participación de factores de riesgo modificables (ambientales y /o conductuales, estos últimos parcialmente controlados genéticamente), así como interacciones genotipo-genotipo e interacciones genotipo-ambiente. El número de genes cuya variación de secuencia estaría involucrada en la ocurrencia de enfermedades multifactoriales no se conoce con exactitud. (Santos Martín,2011)

1.1.4 Principales factores de riesgo

El término “*riesgo cardiovascular global*” comprende la probabilidad de presentar sintomatología debida a la presencia de aterosclerosis en diferentes sistemas orgánicos, manifestada como enfermedad coronaria, enfermedad cerebro vascular, falla cardiaca, enfermedad arterial periférica y enfermedad renal. (Lancet, 2002)

El término “factor de riesgo” se usó por primera vez en el contexto de cardiopatía coronaria hace 45 años por los investigadores del estudio de Framingham. Un factor de riesgo puede definirse como la característica de una persona que se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad específica, como la enfermedad cardiovascular (Toth et al. 2012).

Se han identificado varios “factores de riesgo tradicionales en la enfermedad cardiovascular como inactividad física, una dieta alta en lípidos, tabaquismo, obesidad, diabetes e hipertensión arterial, asociado con la edad y sexo (OMS, 2017).

1.1.5 Fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria

La EAC es un proceso oxidante, inflamatorio crónico caracterizado por la alteración morfológica y funcional de la pared vascular que en estadios finales tiene como consecuencia la disminución del calibre de la luz arterial (Hansson, 2005). La EAC puede comenzar con la disfunción del endotelio vascular, producida como una respuesta a una agresión ejercida en la pared vascular. Como consecuencia de este daño al endotelio, se produce una infiltración de lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) al espacio subendotelial en donde, al existir un ambiente de estrés oxidante, ocurre la peroxidación de los lípidos contenidos en las LDL. Las LDL oxidadas son factores quimiotácticos para monocitos circulantes, que atraviesan el endotelio vascular. Los macrófagos son capaces de fagocitar las LDL oxidadas a través de receptores “scavenger” iniciando el fenómeno inflamatorio (García-Moll et al, 1999). La falta de maquinaria enzimática suficiente para degradar los lípidos y lipoperóxidos, tiene como consecuencia un cúmulo de éstos en el citoplasma del macrófago, al cual se le denomina célula espumosa. Las células espumosas constituyen las etapas tempranas de formación del ateroma. Una vez establecido, el ateroma esta comúnmente compuesto de cantidades variables de células musculares lisas, macrófagos, linfocitos T, ésteres de colesterol y fosfolípidos.

Además, del 5 al 20% de su estructura está conformada por calcio. La placa continúa su crecimiento paulatino hasta llegar incluso a obstruir el lumen de la arteria, reduciendo el flujo sanguíneo y causando diferentes tipos de manifestaciones clínicas como el infarto al miocardio (Davies, 1996).

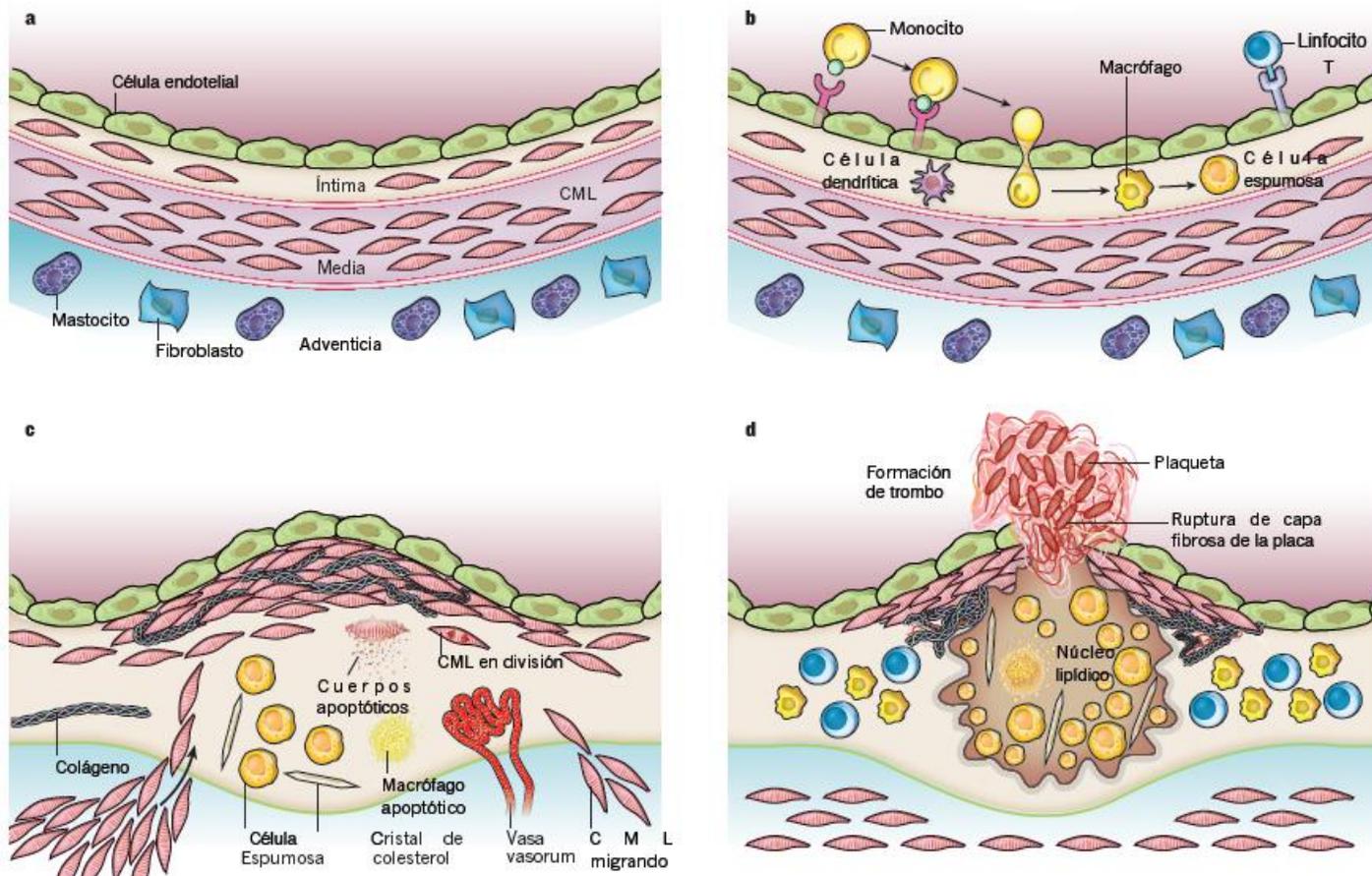


Figura 5. Fisiopatología de la Enfermedad Arterial Coronaria.

a) Representación de la histología de una arteria normal **b)** Formación temprana de ateroma: disfunción del endotelio vascular, infiltración de partículas LDL, peroxidación de LDL, quimiotaxis de monocitos, formación de células espumosas **c)** Establecimiento de ateroma: acumulación de células espumosas, migración de células musculares lisas, **d)** ruptura de ateroma: infiltración de linfocitos T, aumento considerable de macrófagos, células espumosas, esteres de colesterol, ruptura de capa fibrótica y formación de trombo. Tomada y adaptada de Libby et al. 2002

1.1.6 La calcificación arterial coronaria (CAC)

La CAC es un marcador específico de la presencia de aterosclerosis. Es un factor predictor de eventos coronarios futuros en sujetos asintomáticos (Posadas-Romero et al. 2016).

Dicho proceso es considerado una desregulación del metabolismo mineral del sistema cardiovascular, afecta predominantemente la aorta, arterias coronarias, arterias periféricas y la válvula aórtica.

Tradicionalmente, la calcificación vascular estaba considerada como un fenómeno pasivo asociado con la edad, pero recientes evidencias sugieren que los mecanismos de calcificación cardiovascular son similares a la osteogénesis (Demer & Tintut et al,2008).

El fosfato de calcio, en forma de hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] es el principal componente inorgánico del tejido óseo. Sus cristales crecen a partir de vesículas secretadas por los osteoblastos (Anderson et al,2003). Se ha demostrado que las células del músculo liso vascular se diferencian a células similares a los osteoblastos, generando vesículas de matriz que sirven como nido para la deposición de fosfato de calcio en la pared del vaso. Esto promueve la formación ectópica de tejido óseo y la creación de lo que se conoce generalmente como la calcificación vascular.

Ahora se reconoce que la calcificación vascular es un proceso complejo y altamente regulado que implica la activación de vías de señalización celular, inhibidores circulantes de la calcificación, factores genéticos y hormonas.

La calcificación vascular ectópica se evita por la presencia de inhibidores locales y circulantes que limitan la mineralización de los vasos. La disminución de la expresión o actividad de cualquiera de estos inhibidores, genéticos o adquiridos, crea un medio que favorece la calcificación vascular (Leopold ,2015).

Uno de los mecanismos incluye a la proteína de matriz Gla (MGP), que actúa al unir iones de calcio y eliminar su exceso, y también se une al cristal de calcio e inhibe el crecimiento del cristal (Price et al,1983). Fetuina-A es otro inhibidor importante de la calcificación, esta glicoproteína está presente en la circulación, donde se une a los iones de calcio e hidroxapatita (Brylka & Jahnen-Dechent ,2013). Osteopontina (OPN) inhibe la formación de cristales de apatita y promueve función de osteoclastos (Scatena et al., 2007). Esta fosfoproteína se observa en niveles elevados en arterias calcificadas, donde contrarresta la calcificación vascular (CV) (Kaartinen et al.,2007). Osteoprotegerina (OPG) es un miembro del factor de necrosis tumoral (TNF) α superfamilia de receptores, inhibe indirectamente la osteoclastogénesis (Hofbauer & Schoppet,2004) (Figura 6).



Figura 6. Contribuyentes a la calcificación de la placa.

Múltiples mecanismos contribuyen a la calcificación de la placa y están interactuando mutuamente con factores tradicionales de riesgo. Tomada y adaptada de (Avogaro et al. 2015)

Aunque el papel directo de la calcificación en la vulnerabilidad de la placa no se ha definido claramente, ha habido progresos significativos en la definición de los mecanismos de calcificación vascular.

La biomineralización es un proceso fisiológico normalmente restringido a huesos y dientes, sin embargo, bajo ciertas condiciones patológicas, las sales de calcio pueden depositarse en los tejidos blandos con efectos perjudiciales (Steitz et al, 2002 & Lund et al. 2009).

La mineralización patológica de las arterias se observa a menudo en las placas ateroscleróticas, lo que se traduce clínicamente en la reducción de la conformidad de la pared del vaso, asociado a hipertensión (Abedin et al., 2004).

Se ha demostrado que la micro calcificación en la capa fibrosa que recubre el núcleo necrótico de las placas ateroscleróticas podrían conducir a

microfracturas y ruptura de la placa, lo que lleva a la trombosis aguda e infarto al miocardio potencialmente mortales (Vengrenyuk et al., 2006, Virmani et al., 2006). La dilucidación de los mecanismos que resultan en la iniciación y desarrollo de aterosclerosis es crucial para identificar estrategias que inhiben la progresión de la enfermedad antes de que conduzca a consecuencias clínicas.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 Participación de Osteopontina en EAC

Dentro de este complejo proceso está involucrada de manera activa la proteína Osteopontina (OPN), un regulador clave en el desarrollo de EAC. La osteopontina es una proteína de matriz que contiene un motivo arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) que se une a las células a través de la Integrina α -, v - β 3, que funciona como un importante inhibidor de la calcificación (Abedin et al, 2004). Giachelli y colaboradores (1993), mostraron que OPN se asocia con placas aterosclerosas calcificadas.

Giachelli y colaboradores (1991) llevaron la investigación de la calcificación vascular a nivel molecular, demostrando la expresión de una proteína de la matriz ósea en una población especial de células musculares lisas vasculares. Posteriormente, otros grupos de investigación encontraron expresión de factores osteogénicos, como la proteína morfogenética ósea (BMP), osteopontina y MGP (Proteína de Matriz Gla) en células vasculares (Bostrom et al, 1993, Shanahan et al, 1994, Giachelli et al, 1993). La calcificación de células vasculares in vitro se ha

demostrado por varios grupos. Los cultivos primarios de células musculares lisas vasculares expresan proteínas óseas y minerales cuando se tratan con alfa glicerofosfato (Shioi et al,2009), que sirve como un donante de fosfato inorgánico en presencia de fosfatasa alcalina.

OPN inhibe directamente la calcificación de células en cultivo de músculo liso aórtico bovino (Giachelli et al., 1999), e inhibe la calcificación valvular aórtica in vivo (Steitz et al., 2002) lo más probable a través de auto agregación y adhesión a cristales de hidroxiapatita a través de restos de aminoácidos específicos (Hunter et al., 1994, Wada et al, .1999). Esta habilidad de osteopontina para bloquear el crecimiento de cristales puede tener importantes significado fisiológico y patológico (Abedin et al., 2004).

En ratones deficientes de *OPN* y *MGP* se evidencio un aumento de la calcificación aórtica en comparación con ratones deficientes sólo en *MGP*, consistente con el concepto de que OPN inhibe la mineralización (Speer et al., 2002).

1.2.2 gen de Osteopontina

El gen humano *OPN* se encuentra en el cromosoma 4 (4q21-q25), abarca alrededor de 11 kb, y consta de siete exones (Figura 7).La proteína está conformada de 314 residuos de aminoácidos (Young et al. ,1990).Con un peso molecular de 44-66 KD dependiendo del tipo celular. Es expresada por una sola copia del gen con 34-kDa (Vijayanirmala et al., 2015).

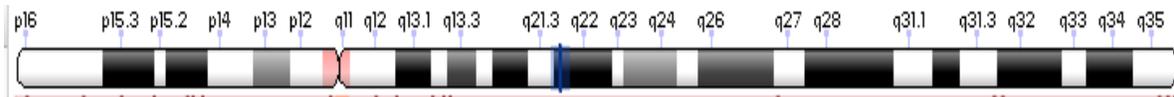


Figura 7. Cromosoma 4, región de ubicación del gen humano Osteopontina. Tomada y adaptada de Centro Nacional de Información Biotecnológica. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6696>

El empalme de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de *OPN* se ha descrito principalmente en tejidos humanos, en células tumorales (Anborgh et al., 2011 y Gimba & Tilli., 2013). Esto da como resultado tres variantes de empalme: OPN-a que es la isoforma de longitud completa, OPN-b que carece del exón 5 y OPN-c que carece del exón 4 (Figura 8).

Está descrito que las variantes de splicing de *OPN* tienen un papel no sólo en la malignidad, sino también en enfermedades degenerativas como la válvula aórtica calcificada. En esta condición, la expresión de OPN-a, OPN-b y OPN-c difiere con la progresión de la enfermedad, en donde OPN-a parecía alcanzar su punto máximo en las primeras etapas de la enfermedad, mientras que los niveles de OPN-b y OPN-c aumentaron con la calcificación aórtica más avanzada (Grau et al., 2012).

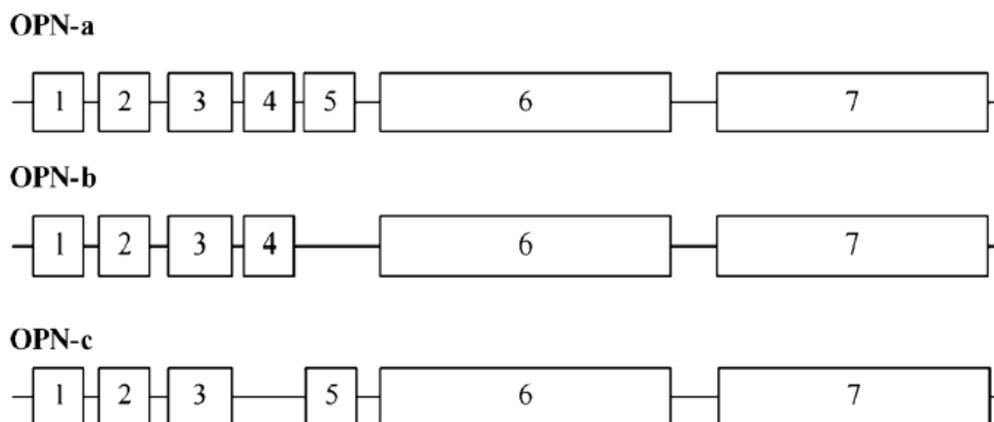


Figura 8. Estructura genómica y splicing alternativo de gen humano *OPN*. Exones 1 a 7 de *OPN* están representados por cajas. Los exones contenidos en las tres isoformas (a, b y c) de osteopontina humana identificadas. Tomada y adaptada de Pagel et al, 2014.

1.2.3 Osteopontina (OPN)

Fue identificada por primera vez en 1986 como una proteína de matriz de hueso en osteoblastos (Xin Zhang et al., 2013). Es un miembro de la pequeña unión a integrina N ligada a la familia de proteínas glicoproteínicas (SIBLING). Tiene varios nombres incluyendo la Proteína de activación temprana de los linfocitos T 1 (ETA1) fosfoproteína secretada 1 (SPP1) y sialoproteína ósea 1 (BSP1). La pluralidad de nombres representa la multifuncionalidad de OPN (Pagel et al., 2014).

1.2.4 Estructura molecular de OPN

Los dominios de interacción celular contienen la secuencia de unión celular de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) y la serina-valina-valina-tirosina-glutamato-leucina-arginina (SVVYGLR). Los dominios SVVYGLR y RGD activan la

transducción de la señal celular a través de la interacción con integrinas de superficie celular (Scatena et al., 2007).

El último sitio sólo se revela tras la escisión mediada por trombina. La actividad de OPN es la escisión enzimática. OPN tiene varios sitios de escisión. Los sitios de escisión incluyen: trombina y varias metaloproteinasas de matriz (MMP). El fragmento OPN N-terminal es probablemente el principal mediador proinflamatorio en las proteínas de la familia OPN. Otros estudios indican interacciones entre el fragmento C-terminal de la trombina escindida OPN y una variante CD44 (Weber et al., 2002) (Figura 9).

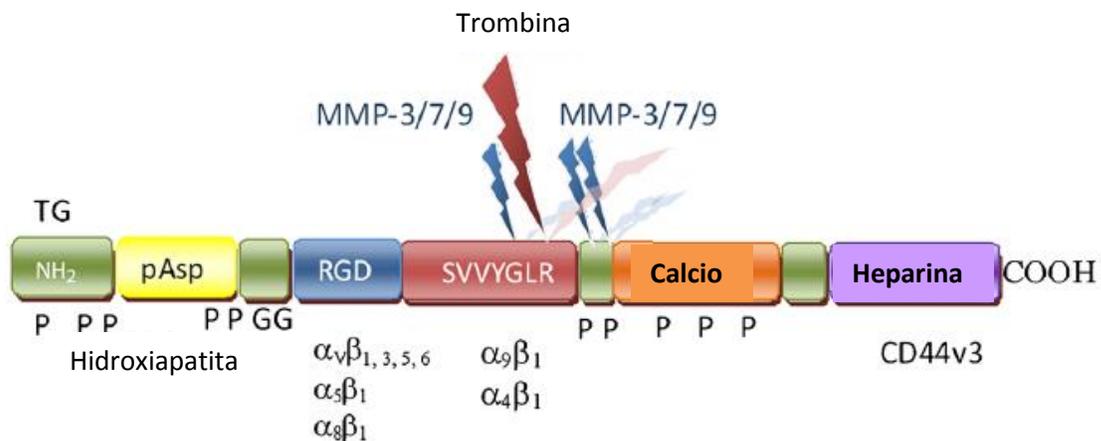


Figura 9. Diagrama esquemático de la estructura de osteopontina, muestra sitios de glicosilación (G), fosforilación (P) y escisión proteolítica por la trombina y matriz-metaloproteinasas. Sitios responsables RGD dependientes (RGD) y RGD independientes (SVVYGLR) unión a integrina, así como hidroxapatita (pAsp), sitios de unión a calcio y a heparina. Tomada y adaptada de Pagel et al, 2014.

La multifuncionalidad de OPN, se debe a su efecto pleitrópico en células de músculo liso, células endoteliales angiogénicas y macrófagos, dentro de las placas aterosclerosas calcificadas. Se puede encontrar en diversos tejidos como en tejido epitelial, además se encuentra en riñón, hueso y dientes, también como una proteína de tejido extra e intracelular. Como citoquina soluble en plasma y fluidos corporales como, orina, fluido seminal y leche materna (Denhardt et al., 2001).

1.2.5 Regulación de OPN

La expresión de OPN está altamente regulada por varios factores:

- Hormonas e incluyendo esteroides, ácido retinoico, glucocorticoides y 1,25-dihidroxi vitamina D3.
- Citosinas inflamatorias.
- Factores de diferenciación y crecimiento como Factor de crecimiento epidérmico (EGF) & Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β).

La diversidad funcional de OPN se atribuye a dos factores principales. En primer lugar, hay tres variantes de empalme conocidas (isoformas OPN-a, -b y -c), que tienen diferentes estructuras de dominio y función.

La otra causa para su rango funcional son la modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación, glucosilación, sulfatación y escisión enzimática (Sullivan et al., 2009, Chae et al. 2009).

Además de su empalme de ARNm aparentemente regulado, la OPN se modifica mucho postraduccionalmente. La fosforilación de serina y treonina, glicosilación y

sulfatación de tirosina, resultan en un monómero de peso molecular que oscila entre 41 y 75 kDa (Christensen , Petersen et al., 2008). Enfatizando el significado funcional de estas fosforilaciones, la proteína OPN no fosforilada aumenta la mineralización de células vasculares del músculo liso, mientras que OPN fosforilada es un potente inhibidor de la calcificación vascular (Jono et al., 2000). En otro estudio se demostró que la OPN altamente fosforilada en la región terminal COOH tiene mayor efecto inhibitorio sobre la adhesión celular a través de la integrina α (V) β (3) en comparación con formas menos fosforiladas (Christensen et al, 2012).

Precisamente la regulación de las modificaciones postraduccionales quizá represente un mecanismo de control de función de OPN (Lund et al, 2009). Por otra parte se ha evidenciado que la exposición de células musculares lisas a lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL) sobre regulan la expresión de OPN (Liu et al., 2014).

La OPN se sobre expresa por las células del músculo liso vascular en presencia de partículas oxLDL y acetiladas unidas a receptores scavenger promoviendo así el estrés oxidativo citosólico.

Dicha proteína está sobre regulada en sitios de las placas ateroscleróticas, y particularmente se asocia con macrófagos y células espumosas, media inflamación, y tiene un papel en la migración de macrófagos. Los autores propusieron que la sobrerregulación de OPN en células musculares lisas y células endoteliales se asocia y es mediado por estrés oxidante(Liu et al., 2014).

Liu et al y colaboradores, establecieron también la participación in vivo de OPN en la íntima de la aorta que regula deposición de precipitados de fosfato de calcio en respuesta al estrés oxidante. Mediante este proceso, la sobreexpresión de OPN en la lesión de aterosclerosis está asociada a la inhibición del calcio en la deposición del tejido. Estos datos implican a OPN como un mediador potencialmente importante cuya regulación positiva protege las células de la deposición distrófica de precipitados de calcio de la neoíntima arterial (Jímenez-Corona et al., 2012).

1.2.6 Asociaciones con polimorfismos del gen *OPN*

La comprensión de los factores genéticos que subyacen a la regulación de la transcripción del gen que codifica a la OPN puede ayudar a aclarar procesos patológicos relacionados con enfermedad arterial coronaria. A partir del 2004, ha habido un aumento en la información sobre la participación biológica de los polimorfismos del promotor *OPN* en diversas patologías (Giacopelli ., 2004) (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Participación del polimorfismo rs2728127 de *OPN* en distintas enfermedades.

HALLAZGOS	AUTOR	AÑO
La osteopontina y la asociación sistémica de lupus eritematoso: una probable interacción gen-género.	Han et al.	2008
El papel de los haplotipos de osteopontina (OPN / SPP1) en la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn.	Glas et al.	2011
Asociación entre polimorfismos en el gen de osteopontina (SPP1) y el primer episodio de urolitiasis de oxalato de calcio.	Safarinejad et al.	2013
Un polimorfismo promotor de osteopontina se asocia con agresividad en el cáncer de mama.	Ramchandani et al.	2013
Papel de la osteopontina en el lupus eritematoso sistémico.	Kaleta et al.	2014

Tabla 2. Participación del polimorfismo rs11730582 de *OPN* en distintas enfermedades.

HALLAZGOS	AUTOR	AÑO
El locus genético <i>OPN</i> está asociado con el riesgo de osteoartritis de rodilla: un estudio de casos y controles.	Shang et al.	2019
El polimorfismo de nucleótido único rs1126616 del gen de la osteopontina se asocia independientemente con eventos cardiovasculares en una cohorte de enfermedad renal crónica.	Cambray et al.	2019
Determinantes genéticos y reabsorción radicular apical externa postortodóntica en niños checos.	Borilova Linhartova et al.	2017
El polimorfismo de osteopontina aumenta la susceptibilidad a la metaplasia intestinal precancerosa gástrica en hombres infectados con <i>Helicobacter pylori</i> .	Chang et al.	2017
Asociación entre los polimorfismos promotores del gen <i>OPN</i> y el riesgo de cáncer: un metanálisis.	Liu et al.	2016
Asociación entre las variaciones genéticas <i>OPN</i> y el riesgo de nefrolitiasis.	Xiao et al.	2016
Asociación de variantes del promotor <i>SPP1</i> con susceptibilidad a la osteoartritis de cadera en la población china.	Lv et al.	2015
Polimorfismos del gen <i>OPN</i> , rs17524488 GG / G, rs11730582 T / C y rs9138 C / A, y riesgo de cáncer en una población china.	Mi et al.	2015
Los SNPs del gen de osteopontina (rs9138, rs11730582) median la susceptibilidad a la resorción de raíz externa en pacientes de ortodoncia.	Iglesias-Linares et al.	2014
Asociación de polimorfismos de osteopontina con riesgo de carcinoma nasofaríngeo.	Wang et al.	2014
Asociación entre polimorfismos de fosfoproteína-1 secretada (<i>SPP1</i>) y densidad mineral ósea baja en mujeres.	Chen et al.	2014
Papel de la osteopontina en el lupus eritematoso sistémico.	Kaletka et al.	2014
Asociación entre polimorfismos en el gen de osteopontina (<i>SPP1</i>) y el primer episodio de urolitiasis de oxalato de calcio.	Safarinejad et al.	2013
Un polimorfismo promotor de osteopontina se asocia con agresividad en el cáncer de mama.	Ramchandani et al.	2013
Los polimorfismos genéticos y otros factores de riesgo asociados con la osteonecrosis inducida por bisfosfonato de la mandíbula.	Katz et al.	2011
Los alelos de osteopontina están asociados con características clínicas en el lupus eritematoso sistémico.	Trivedi et al.	2011
El papel de los haplotipos de osteopontina (<i>OPN</i> / <i>SPP1</i>) en la susceptibilidad a la enfermedad de Crohn.	Glas et al.	2011
Asociaciones genéticas en vías relacionadas con interferón tipo I con autoinmunidad.	Delgado-Vega et al.	2010
Interacción gen-gen-sexo en polimorfismos de genes de citoquinas revelados por el fenotipo alfa de interferón sérico en dermatomiositis juvenil.	Niewold et al.	2010
La variación genética en el gen de la osteopontina está asociada con la susceptibilidad a la sarcoidosis en la población eslovena.	Maver et al.	2009

En nuestro trabajo la selección de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) se basó en estudios previos de las asociaciones de polimorfismos del promotor del

gen *OPN* con enfermedades cardiovasculares (Schmidt-Petersen et al., 2009). Posteriormente, Yueniwati y colaboradores (2016) analizaron el polimorfismo rs11730582 en la posición C-443T, e investigaron su relación con el incremento de grosor de la íntima-media carotídea en población asiática.

En el promotor del gen *OPN* han sido identificadas variaciones genéticas que afectan notablemente su expresión., la variante C-443T (rs11730582) se encuentra en la secuencia del promotor del gen *OPN* que está localizada en las regiones del sitio de unión del factor de transcripción MYT1. Este proceso hace que la unión por afinidad de la ARN polimerasa hacia el promotor aumente. En consecuencia, ocurre la sobreexpresión de *OPN* (Yueniwati et al., 2016). También se consideró una frecuencia del alelo menor (FAM) mayor al 30%. Hasta el momento, es de nuestro conocimiento, que el presente estudio es el único que incluye el análisis de polimorfismos en el gen *OPN* en pacientes mexicanos con aterosclerosis.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en México y en el mundo, la aterosclerosis o EAC es producto de múltiples influencias genéticas y ambientales que están interactuando.

La historia natural de la enfermedad arterial coronaria (EAC) comprende un largo período silente o asintomático (Rosamond W et al., 2007). Este hecho, aunado a la alta tasa de mortalidad y la genética como factor determinante, son evidencias que soportan que mientras más precoces se implementen medidas preventivas, más efectivas son en lograr una disminución del riesgo.

Es por ello que es de suma importancia establecer asociaciones genéticas que aumenten el riesgo de padecer la EAC en la población mexicana, y que resulte en una medida de prevención a la manifestación aguda de la enfermedad. La proteína osteopontina está involucrada en procesos importantes en el desarrollo de la EAC como la calcificación de la placa aterosclerosa. Se ha demostrado la participación de los polimorfismos del gen *OPN*, en reportes previamente publicados que asocian algunos de estos sitios polimórficos con eventos cardiovasculares. A pesar de ya se han realizado asociaciones de polimorfismos genéticos a la EAC en población mexicana (Martínez et al., 2017), hay sitios polimórficos cuya susceptibilidad o protección genética no se han estudiado, como es el caso de los polimorfismos del gen *OPN*, involucrado en el desarrollo de la EAC.

3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema grave de salud, generando la primera causa de mortalidad en México y en el mundo. La EAC es una enfermedad multifactorial. El gen *OPN* es relevante en la patogénesis del padecimiento. Se ha sugerido que algunos polimorfismos ubicados en el gen a estudiar pudieran estar relacionados con el proceso de deposición de calcio en la placa aterosclerosa, asociándose a la EAC en pacientes mexicanos.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las variantes genéticas estudiadas en el gen osteopontina confieren susceptibilidad o protección en el desarrollo de Enfermedad Arterial Coronaria?

5. HIPÓTESIS

Existe asociación de los polimorfismos estudiados en la región promotora del gen osteopontina con la enfermedad arterial coronaria en pacientes mexicanos.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar los polimorfismos (rs11730582, rs2728127) localizados en el gen *OPN* en pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria comparados con individuos control, se asocian a la susceptibilidad o protección genética de la enfermedad.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ✓ Determinar las frecuencias de las variantes ubicadas en el promotor del gen *OPN* en pacientes mexicanos con Enfermedad Arterial Coronaria y el grupo control.
- ✓ Comparar las frecuencias (alélicas y genotípicas) de las variantes de los dos grupos de estudio con el fin de definir si algún polimorfismo del gen estudiado pudiera conferir riesgo o protección a la EAC.
- ✓ Analizar la asociación de los polimorfismos con los parámetros metabólicos relacionados con la EAC.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Tipo de estudio

Casos y controles anidado en la cohorte del proyecto de Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA).

7.2 Población de estudio

Se realizó en una cohorte de individuos que provenía del proyecto GEA, el cual fue diseñado para estudiar las bases genéticas de la EAC, y evaluar las relaciones de los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales.

7.3 Procedencia de los sujetos de estudio

Los pacientes fueron seleccionados de la consulta externa y de los pacientes que acuden para cateterismo diagnóstico o terapéutico al Departamento de Hemodinámica del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Los participantes en el grupo control fueron seleccionados de la población que acudió con fines de donación al Banco de Sangre de nuestro Instituto. Se incluyeron individuos asintomáticos sin historia de aterosclerosis y/o enfermedad arterial coronaria prematura en familiares de primer grado y se aplicaron criterios de exclusión similares a los señalados para pacientes.

7.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.4.1 Criterios de inclusión

Los pacientes con diagnóstico de aterosclerosis, fueron definidos por historial personal de infarto al miocardio, angioplastia, cirugía de revascularización, o estenosis coronaria > al 50% determinada por angiografía, Solamente se incluyeron los pacientes con aterosclerosis de presentación prematura (edad al diagnóstico < de 55 años en hombres y < de 65 años en mujeres), que no presentaron eventos cardiovasculares agudos en los tres meses previos al estudio.

7.4.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad hepática, renal u oncológica, distiroidismo no tratado y aquellos con tratamiento corticosteroide.

7.5 Tamaño de muestra

Para el cálculo del tamaño de muestra, se consideró la frecuencia del alelo menor (MAF del inglés, minor allele frequency) de cada SNP (frecuencias del estudio 1000 genomas). Se usó el programa Quanto (versión 1.2.4), bajo la hipótesis de interacción gen-ambiente para el modelo dominante. Considerando que la prevalencia de enfermedad cardiovascular en la población mexicana es de 19%,

para un nivel de confianza del 99% ($\alpha :0.01$) y poder del 80%. Esta calculado para un OR de 2.

SNP	Alelos	Localización	MAF
rs2728127	A/G	Promotor	G: 0.227
rs11730582	C/T	Promotor	T: 0.430

El cálculo de tamaño de muestra fue de 1093 por grupo, sin embargo, es importante hacer notar que no se ha reportado la frecuencia del alelo menor de cada polimorfismo en la población mexicana, por lo que el tamaño de muestra es una aproximación.

Considerando que el tamaño de muestra ya está calculado para el proyecto GEA y nuestro estudio es anidado en la cohorte. A pesar de ello, se realizó el ejercicio del cálculo de tamaño de muestra para el estudio de los polimorfismos del gen *opn*, y se asegura que con este tamaño de muestra calculado, se encuentre la frecuencia en la población.

7.6 Métodos

Detección de calcio coronario

El calcio en arterias coronarias (CAC) es un marcador específico de aterosclerosis (Bolick, L. E., & Blankenhorn 1961) y por tanto, de infarto al miocardio y cuando es cuantificado por tomografía computada tiene correlación de 0.90 o mayor con el área de placa coronaria histológica. Fue de utilidad para diagnosticar aterosclerosis

subclínica y permite identificar a los individuos con riesgo aumentado de eventos coronarios (Detrano et al, 1996, Raggi et al., 2000). Con excepción de los pacientes con historia de cirugía de revascularización e implante de malla intracoronaria, en el presente estudio el CAC se determinó en algunos pacientes y todos los individuos control utilizando un tomógrafo multidetector de 64 canales (SomatomSensation, Siemens, Erlanger, Alemania). Las imágenes fueron interpretadas por un médico radiólogo con amplia experiencia en este tipo de estudios.

7.7 Método de recolección de datos

7.7.1 Métodos Clínicos y de Laboratorio

A todos los participantes se les aplicaron cuestionarios estandarizados para obtener información demográfica, nivel de escolaridad, ingreso económico, historia familiar y personal de enfermedad cardiovascular, hábitos dietarios, actividad física, consumo de alcohol y uso de medicamentos y suplementos. La dieta habitual durante el año previo fue evaluada utilizando un cuestionario de frecuencias de consumo, diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública (Hernández-Avila et al. 1998, Baecke et al. 1982). La actividad física se cuantificó mediante un cuestionario (Baecke et al. 1982), que proporciona información sobre frecuencia, intensidad y duración de la actividad, lo que le confiere una particular utilidad para analizar la correlación con variables de riesgo cardiovascular.

El peso de los individuos se midió en una báscula calibrada, y la talla, utilizando un estadímetro de pared SECA 222 (Hamburgo, Alemania). El índice de masa corporal

(IMC) fue calculado con la fórmula peso (kg) / talla (m²). La circunferencia de cintura se midió con una cinta métrica de fibra de vidrio, en el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se midió en posición sedente, después de por lo menos cinco minutos de reposo, utilizando un esfigmomanómetro digital WelchAllyn, series 52000 (Skaneateles Falls, NY EUA). En ayuno de 12 horas y después de reposo durante 20 minutos en posición sedente, se recolectaron 45 ml. de sangre venosa en tubos con ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) y en tubos sin anticoagulante. Después de centrifugar en frío, el plasma y el suero se dividieron en 16 alícuotas. A las alícuotas de plasma se añadieron inhibidores de proteasas (Aprotinina 100 KIU / ml, Benzamidina 1ml).

Todas las alícuotas se almacenaron a -70° C. Los lípidos, lipoproteínas y glucosa se cuantificaron en muestras frescas.

7.7.2 Análisis de Laboratorio

Las determinaciones de colesterol total, triglicéridos y glucosa en plasma, se realizaron en un autoanalizador Hitachi 902 (Boheringer Mannheim, Alemania), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania y Wako Chemicals, EUA). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad se determinó mediante un método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics) (Baecke et al. 1982). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad se calculó con la fórmula de Friedewald modificada por De Long (De Long et al. 1986). Las concentraciones de apoproteína B (apo B) y de apoproteína AI

(apo AI), se determinaron por inmunonefelometría en el laboratorio de endocrinología. La precisión y exactitud de las determinaciones de lípidos, son evaluadas periódicamente por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta, GA (CDC, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de insulina en suero se determinaron por radioinmunoanálisis (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, EUA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo en nuestro laboratorio son inferiores al 10%. Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INCICH). El presente proyecto cumplió los requisitos del comité Institucional de ética e investigación de nuestro Instituto en el registro del proyecto GEA.

7.7.3 Extracción de DNA

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el DNA genómico por medio de la técnica de expulsión salina. La integridad del DNA se verificó en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

7.7.4 Cuantificación de DNA

La cuantificación del DNA se realizó con el equipo automatizado nanoDrop (ND-1000 spectrophotometer), la longitud de onda con la que se dio lectura al DNA fue de 260 nm.

7.7.5 Sitios polimórficos analizados

Los polimorfismos estudiados en este proyecto fueron seleccionados considerando los reportes previamente publicados que asocian algunos de estos sitios polimórficos con eventos cardiovasculares; así como padecimientos con dislipidemias en otras poblaciones. Después de esto se revisó la frecuencia del alelo menor (MAF del inglés, minor allele frequency) de cada SNP en el proyecto (frecuencias del estudio 1000 genomas) y se incluyeron aquellos polimorfismos cuya frecuencia del alelo menor (MAF) fuera mayor al 20%. Dado esto, el proyecto incluyó el estudio de 2 polimorfismos ubicados como se presenta a continuación:

- OPN: C-443T(rs11730582), A-1748G (rs2728127)

*Nota: El **rs** representa el **ID-db SNP**: es el número de identificación en la base de datos del Centro Nacional de la Información en Biotecnología (www.ncbi.nlm.nih.gov).

7.7.6 Determinación de los polimorfismos

La determinación de los distintos polimorfismos se realizó utilizando sondas

Taq Man (Applied Biosystem) en un equipo de PCR en tiempo real.

7.7.7 Preparación de las placas de PCR para discriminación alélica

- Para la discriminación alélica se diluyó el DNA tanto de pacientes como de controles a una concentración de 10 ng/μl con agua libre de DNAsas.

- En la placa de 384 pozos se colocaron 4 μ l del DNA de 380 muestras (tanto de pacientes como de controles).
- Se agregaron 6 μ l del mix de amplificación a cada pozo el cual contenía los primers específicos para cada SNP del gen a estudiar.

7.7.8 Discriminación alélica con el método Taqman

- Para la discriminación alélica se utilizó un par de primers específicos para analizar la secuencia que flanquea al SNP a estudiar y se empleó una sonda que tiene unidos un fluoróforo reportero *reporter* y un fluoróforo apagador *quencher*. Cuando ambos fluoróforos están unidos a la sonda, el *reporter* no emite señal. Pero cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés (*target*) durante la reacción de PCR, la actividad exonucleasa 3' --> 5' de la Taq polimerasa separa al fluoróforo *reporter* del resto de la sonda, permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Se monitorea la señal fluorescente *reporter* que se va acumulando en ciclos sucesivos de PCR. El láser del equipo de Tiempo Real a través del foto detector procesó cada placa con los diferentes SNPs, y los datos escaneados fueron proporcionados por el software SDS 2.2 de la compañía Applied Biosystem.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las variables categóricas se expresan como proporción, las variables continuas como media \pm desviación estándar (DE) o mediana (rango intercuartílico). La comparación entre grupos se realizó utilizando la prueba de Chi cuadrada para variables categóricas, t de Student para variables continuas paramétricas y U de Mann Whitney para variables no paramétricas. Las características generales se muestran en la población de estudio estratificada de acuerdo a la presencia o ausencia de EAC prematura. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos que se analizaron se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de Chi cuadrada (X^2). El análisis de regresión logística multivariado razón de momios (RM) e intervalo de confianza al 95% (IC 95%) se usó para determinar la independencia de la asociación de los polimorfismos con la presencia de EAC prematura, de acuerdo a diferentes modelos de herencia (aditivo, dominante, heterocigoto, recesivo y codominante) ajustados por edad, sexo, IMC, tensión arterial sistólica y diastólica, grasa abdominal visceral, concentraciones de triglicéridos, apolipoproteína B, calcio sérico, adiponectina, y por actividad de fosfatasa alcalina. Para evaluar la independencia de la asociación entre los polimorfismos estudiados con los factores de riesgo cardiovascular y parámetros metabólicos en función a diferentes modelos de herencia, se realizaron análisis de regresión logística, ajustados por edad, sexo e IMC. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS v15.0 (SPSS Chicago, IL).

9. RESULTADOS

9.1 Características clínicas y metabólicas de los grupos estudiados

En el presente trabajo se analizaron 1,142 pacientes con Enfermedad Arterial Coronaria prematura y 1,073 personas del grupo control, con una edad promedio de 51 ± 9 años para controles y 54 ± 8 años para pacientes con EAC.

En la población de pacientes, el 80 % fueron del sexo masculino y el IMC fue de 28 kg/m^2 . Con respecto a la medición de grasa abdominal visceral y la concentración de triglicéridos, fue significativamente mayor en el grupo de pacientes en comparación con el grupo control ($p < 0.05$).

En los parámetros relacionados con calcificación vascular, los niveles de fosfatasa alcalina y calcio sérico no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Sin embargo, en los niveles de adiponectina se presentó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con valores más elevados en el grupo control que en los pacientes con EAC (Tabla 3).

Tabla 3. Características clínicas y metabólicas de los grupos estudiados

	Controles (n=1073)	EAC prematura (n=1142)	*p
Edad (años)	51 ± 9	54 ± 8	<0.001
Sexo (masculino %)	42.3	80.8	<0.001
Índice de masa corporal (kg/m ²)	27.9 [25.5-30.9]	28.3 [25.9-31.1]	0.007
Circunferencia de cintura (cm)	94 ± 11	98 ± 10	<0.001
Tensión arterial sistólica (mmHg)	113 [104-123]	116 [106-127]	<0.001
Tensión arterial diastólica (mmHg)	71 [65-77]	71 [66-78]	0.046
Grasa abdominal visceral (cm ²)	141 [106-181]	168 [129-218]	<0.001
Colesterol de la lipoproteína de alta densidad (mg/dL)	45 [36 -55]	37 [32-44]	<0.001
Colesterol de la lipoproteína de baja densidad (mg/dL)	116 [95-134]	91 [68-116]	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	145 [108-202]	162 [119-219]	<0.001
Apolipoproteína B (mg/dL)	94 [76-113]	79 [63-102]	<0.001
Apolipoproteína A (mg/dL)	134 [115-156]	120 [101-138]	<0.001
Lipoproteína (a) (mg/dL)	5.2 [2.3-11.5]	4.8 [2.4-14.1]	0.478
Glucosa (mg/dL)	90 [84-97]	95 [87-117]	<0.001
Proteína C reactiva de alta sensibilidad (mg/L)	1.5 [0.8-3.1]	1.2 [0.6-2.6]	<0.001
Adiponectina (µg/mL)	8.1 [5.0-12.8]	5.2 [3.2-8.1]	<0.001
Fosfatasa alcalina (IU/L)	81 [68-96]	76 [63-95]	<0.001
Calcio sérico (mg/dL)	9.7 ± 0.6	9.7 ± 0.7	0.278

Los datos se muestran como media ± desviación estándar, mediana [rango intercuartil] o porcentaje. T de Student , U de Mann Whitney o Chi cuadrada. EAC = Enfermedad arterial coronaria

La mayor parte de los factores de riesgo coronario analizados como, hipertrigliceridemia, grasa abdominal visceral elevada y obesidad, presentaron una mayor prevalencia en pacientes con EAC en comparación del grupo control. Debido a la ingesta de estatinas como parte del tratamiento farmacológico, el colesterol LDL y colesterol no HDL, la prevalencia fue menor en pacientes con EAC (colesterol LDL: 16.1%, Colesterol No HDL: 19.6%) respecto a los controles

(colesterol LDL: 29.6%, Colesterol No HDL: 28%). Respecto al porcentaje de hipoadiponectinemia, fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en pacientes que en controles. Es de notar la alta prevalencia de la hipertensión como factor de riesgo cardiovascular, con un porcentaje hasta el 68% en pacientes con EAC prematura en comparación con un 19% en el grupo control (Tabla 4).

Tabla 4. Prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en la población estudiada

	Control (n=1073)	EAC prematura (n=1142)	*p
Colesterol LDL \geq 130 mg/dL (%)	29.6	16.1	<0.001
Hipoalfalipoproteinemia (%)	52.1	66.9	<0.001
Hipertrigliceridemia (%)	47.5	56.2	<0.001
Colesterol No HDL $>$ 160 mg/dL (%)	28.0	19.6	<0.001
Obesidad (%)	30.5	35.0	0.024
Hipertensión (%)	19.2	68.0	<0.001
Grasa abdominal visceral elevada (%)	54.8	64.5	<0.001
Tabaquismo (%)	22.4	11.6	<0.001
Hipoadiponectinemia (%)	42.5	57.5	<0.001
Fosfatasa alcalina $>$ p75 (%)	37.6	38.9	0.569

Los datos se muestran como porcentaje. *Chi cuadrada.

EAC = enfermedad arterial coronaria, LDL = lipoproteína de baja densidad, HDL = lipoproteína de alta densidad

9.2 Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con enfermedad arterial coronaria prematura.

En el estudio molecular se genotipificaron dos polimorfismos (rs2728127 y rs11730582) del gen de osteopontina utilizando ensayos Taqman mediante la determinación de PCR

en tiempo real. La distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas de ambos sitios polimórficos fueron similares en los grupos estudiados ($p>0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con enfermedad arterial coronaria prematura.

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Frecuencia alélica(A/C)	EWH	Modelo	RM [IC al 95%]	P
	AA	AG	GG						
rs2728127									
Control (n=1073)	0.679	0.281	0.039	0.160	0.84	0.697	Aditivo	0.967 [0.804-1.164]	0.726
	729	302	42				Dominante	1.027 [0.829-1.271]	0.807
							Recesivo	0.595 [0.333-1.064]	0.080
EAC prematura (n=1142)	0.681	0.293	0.025	0.194	0.806	0.203	Heterocigoto	1.108 [0.890-1.381]	0.359
	778	335	29				Codominante 1	1.085 [0.869-1.354]	0.471
							Codominante 2	0.610 [0.339-1.095]	0.098
rs11730582									
Control (n=1073)	0.301	0.469	0.230	0.464	0.536	0.06	Aditivo	0.990 [0.863-1.137]	0.891
	323	503	247				Dominante	1.046 [0.841-1.303]	0.684
							Recesivo	0.923 [0.729-1.168]	0.503
EAC prematura (n=1142)	0.282	0.486	0.232	0.475	0.525	0.898	Heterocigoto	1.100 [0.901-1.342]	0.350
	322	555	265				Codominante 1	1.159 [0.828-1.623]	0.389
							Codominante 2	1.288 [0.875-1.896]	0.199

Los modelos se ajustaron por edad, sexo, índice de masa corporal, tensión arterial sistólica y diastólica, grasa abdominal visceral, concentraciones de triglicéridos, apolipoproteína B, calcio sérico, adiponectina, y por actividad de fosfatasa alcalina. EAC = enfermedad arterial coronaria, RM = razón de momios, IC = rango intercuartil. AA=Homocigoto alelo A, AG=Heterocigoto, GG=Homocigoto alelo G, CC=Homocigoto alelo C, CT=Heterocigoto, TT=Homocigoto alelo T.

9.3 Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con anomalías metabólicas en el grupo enfermedad arterial coronaria prematura.

Cuando se analizó de forma independiente a los grupos de estudio, se observaron diferencias significativas al analizar la asociación con anomalías metabólicas.

Al analizar solo al grupo de pacientes con EAC prematura se observó que el polimorfismo rs11730582 se asoció con un mayor riesgo de hipoadiponectinemia en los modelos aditivo (RM=1.30, IC=1.09-1.54, P=0.003), dominante (RM=1.46, IC =1.11-1.91, P=0.006), recesivo (RM=1.37, IC =1.02-1.84, P=0.032), codominante 1 (RM=1.37, IC =1.30-1.82, P=0.031) y codominante 2 (RM=1.67, IC=1.19-2.36, P=0.003). Adicionalmente se encontraron asociaciones de menor susceptibilidad con hipertensión arterial, bajo los modelos dominante (RM=0.72, IC =0.54-0.97, P=0.034) y codominante 1 (RM=0.70, IC =0.51-0.96, P=0.030). Finalmente el polimorfismo rs11730582 se asoció a menor riesgo con colesterol no HDL elevado, bajo los modelos aditivo (RM=0.80, IC =0.65-0.98, P=0.039) y codominante 2 (RM=0.63, IC =0.41-0.97, P=0.038). Todos estos modelos se ajustaron por edad, sexo e índice de masa corporal (Tabla 6).

Tabla 6. Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con anomalías metabólicas en el grupo enfermedad arterial coronaria prematura

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Frecuencia alélica(C)	Modelo	RM [IC 95%]	p
	CC	CT	TT					
rs11730582								
Hipoadiponectinemia						Aditivo	1.300 [1.096-1.543]	0.003
No (n=485)	0.322 156	0.474 230	0.205 99	0.441	0.559	Dominante	1.462 [1.117-1.912]	0.006
Si (n=657)	0.248 163	0.500 329	0.252 166	0.502	0.498	Recesivo	1.375 [1.027-1.840]	0.032
						Codominante 1	1.371 [1.301-1.824]	0.031
						Codominante 2	1.678 [1.191-2.365]	0.003
Hipertensión								
No (n=365)	0.241 88	0.521 190	0.238 87	0.499	0.501	Dominante	0.728 [0.543-0.976]	0.034
Si (n=777)	0.301 234	0.470 365	0.229 178	0.464	0.536	Codominante 1	0.709 [0.519-0.967]	0.030
Colesterol no HDL elevado								
No (n=918)	0.271 249	0.485 446	0.244 224	0.486	0.514	Aditivo	0.803 [0.652-0.989]	0.039
Si (n=224)	0.326 73	0.491 110	0.183 41	0.428	0.572	Codominante 2	0.637 [0.415-0.976]	0.038

Los modelos se ajustaron por edad, sexo e índice de masa corporal. FAM = frecuencia del alelo menor, RM = razón de momios, IC = rango intercuartil. CC=Homocigoto alelo C, CT=Heterocigoto, TT=Homocigoto alelo T.

9.4 Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con anomalías metabólicas en el grupo control.

En los participantes del grupo control, el polimorfismo rs2728127 se asoció con protección genética a hígado graso, con el modelo aditivo (RM=0.76, IC=0.59-0.98), P=0.038). Además el polimorfismo rs11730582 se asoció con menor riesgo de hipoadiponectinemia, con los modelos dominante (RM=0.72, IC=0.55-0.95, P=0.022) y codominante 1 (RM=0.72, IC=0.54-0.97, P=0.032), con una frecuencia mayor del genotipo *CT*. Por otro lado el mismo polimorfismo (rs11730582) se asoció a un mayor riesgo de niveles elevados de apolipoproteína B, con los modelos aditivo (RM=1.22, IC=1.014-1.473, P=0.035), dominante (RM=1.40, IC=1.03-1.90, P=0.031) y, finalmente con el modelo codominante 2 (RM=1.48, IC=1.01-2.17, P=0.039), también presentó una mayor frecuencia del genotipo *CT*. Todos estos modelos fueron ajustados por edad, sexo e índice de masa corporal (Tabla 7).

Tabla 7. Asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con anomalías metabólicas en el grupo control.

Polimorfismo	Frecuencia del genotipo			FAM	Frecuencia Alélica(A/C)	Modelo	RM [IC 95%]	P
	AA	AG	GG					
rs2728127	AA	AG	GG					
Hígado graso						Aditivo	0.766 [0.596-0.985]	0.038
No (n=729)	0.661 482	0.295 215	0.044 32	0.191	0.809			
Si (n=344)	0.704 242	0.263 90	0.033 11	0.164	0.836			
rs11730582	CC	CT	TT					
Hipoadiponectinemia						Dominante	0.728 [0.556-0.955]	0.022
No (n=617)	0.275 170	0.487 300	0.238 147	0.481	0.519	Codominante 1	0.728 [0.544-0.974]	0.032
Si (n=456)	0.339 155	0.439 200	0.222 100	0.441	0.559			
Apolipoproteína B elevada						Aditivo	1.222 [1.014-1.473]	0.035
No (n=771)	0.321 247	0.461 355	0.218 168	0.449	0.551	Dominante	1.400 [1.031-1.901]	0.031
Si (n=302)	0.250 76	0.490 148	0.260 79	0.503	0.497	Codominante 2	1.487 [1.019-2.170]	0.039

Los modelos se ajustaron por edad, sexo e índice de masa corporal. FAM = frecuencia del alelo menor, RM = razón de momios, IC = rango intercuartil. AA=Homocigoto alelo A, AG=Heterocigoto, GG=Homocigoto alelo G.

10. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se investigó el aporte de la genética como factor de riesgo asociado a la enfermedad, con un gen candidato que participa de manera importante en el proceso de la calcificación vascular. Se realizó un estudio de casos y controles, anidado en la cohorte del proyecto GEA. Analizamos dos polimorfismos de la región promotora del gen *OPN* (rs11730582, rs2728127) en 1142 pacientes con enfermedad arterial coronaria prematura (EAC p) y 1073 individuos sanos en población mexicana.

Las características clínicas, medidas antropométricas y demográficas de nuestra cohorte de población fueron significativamente diferentes entre los grupos de estudio. Se encontraron diferencias significativas en los parámetros metabólicos entre el grupo de pacientes con EAC p y el grupo control, así como una mayor prevalencia de los factores de riesgo en pacientes que en controles. Por otro lado, la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas fueron similares en los grupos de estudio. Sin embargo al realizar el análisis de forma independiente de los grupos de estudio; en los pacientes con EAC p, el alelo rs11730582 *T* se asoció a un menor riesgo de padecer hipertensión arterial sistémica. El polimorfismo está localizado en las regiones del sitio de unión del factor de transcripción MYT1. Este proceso hace que la unión por afinidad de la ARN polimerasa hacia el promotor aumente, en consecuencia ocurre la sobreexpresión de *OPN* (Yueniwati et al., 2016). Por otra parte, la osteopontina se expresa a niveles muy bajos en la arteria no lesionada, pero bajo diversas condiciones patológicas, la expresión de *OPN* presenta aumentos significativos en células endoteliales, de músculo liso e

inflamatorias (Isoda et al., 2002, Denhard et al, 2001, Giachelli et al, 1999). Incluso se ha demostrado que la expresión de OPN está específicamente regulada de manera positiva por el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en las células del músculo liso vascular (Lyle et al., 2014). Además la expresión de OPN está regulada por la angiotensina II y otros factores humorales implicados en la hipertensión. Sin embargo la contribución potencial de las fuerzas mecánicas resultantes que se producen como resultado de la presión arterial elevada no está clara. Se ha propuesto un aumento de la tensión de la pared circunferencial con hipertensión para iniciar una cascada de cambios complejos en el vaso sanguíneo que posteriormente conduce a alteraciones en el cumplimiento y la función vascular (Savoia & Schiftrín ,2006).

Caesar y colaboradores en 2017, respaldaron la hipótesis de que la expresión de OPN aumenta con la hipertensión en las células musculares lisas (CML) de la aorta a través de H_2O_2 , y que este aumento es un requisito previo para la remodelación vascular. Por lo anterior se debe tener cuidado al realizar la interpretación de los resultados obtenidos, ya que la asociación entre el polimorfismo rs11730582 y un menor riesgo de padecer hipertensión, es compleja. Además las funciones de OPN, involucradas en los procesos celulares como parte de la remodelación vascular, son diversas. Es necesario realizar estudios funcionales para aclarar los mecanismos involucrados. En un estudio de Hou X, Hu Z et al en 2014 realizado en población China se encontraron datos relacionados con nuestro trabajo; con 1092 pacientes diagnosticados de hipertensión arterial, se genotiparon 3 polimorfismos en la región promotora del gen *OPN*, incluido $-443C / T$ (rs11730582); ellos encontraron que ninguno de los SNPs estudiados en el gen

OPN se asoció con el riesgo y la gravedad de la hipertrofia ventricular izquierda (HVI).

En el grupo de pacientes con EACp el polimorfismo rs11730582 se asoció también con un mayor riesgo de presentar hipoadiponectinemia, bajo los diferentes modelos de herencia analizados. Actualmente, la adiponectina (APN) es una de las proteínas más estudiadas por su participación como nexo de unión entre la obesidad, la resistencia a la insulina y las enfermedades cardiovasculares.

En el trabajo de Mie Kurata y colaboradores en 2010 se sugirió que *OPN* y la adiponectina están relacionados entre sí subyacentes a los mecanismos del sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e inflamación. Existe evidencia de que la adiponectina tiene un efecto protector en el desarrollo de la aterosclerosis. Estudios en ratones que carecen del gen de la adiponectina presentan un mayor engrosamiento de la neointima de la carótida (Kubota et al,2002). Además, en ratones deletados del gen apoE^{-/-}, que presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar aterosclerosis, la expresión de adiponectina exógena disminuye la susceptibilidad de desarrollar dicha enfermedad (Okamoto et al,2002). Por otro lado, Yueniwati y su equipo en 2016 en Indonesia realizaron un estudio analítico de casos y controles en 20 muestras de casos y 12 de controles. Las muestras de casos fueron niños javaneses de entre 10 y 21 años con padres con isquemia de accidente cerebrovascular. Las muestras de control fueron niños con padres sanos. El propósito de este estudio fue examinar los polimorfismos (*T-443C* y *G-156G*) en el promotor *OPN*, identificados en niños javaneses con padres con ACV isquémico, e investigar su relación con el aumento de grosor de la carótida intima-media (CIMT). Como resultado del valor p 0.654 de la variante *T-143C* (rs11730582) con

CIMT, se demostró que la variación genética no es un factor de riesgo significativo en el aumento de CIMT, ya que el polimorfismo rs11730582 de *OPN* no representa un factor de riesgo para el aumento del grosor de la carótida intima-media, y la *APN* confiere un factor de protección.

Por estudios *in vitro* se ha postulado que los efectos protectores de la adiponectina serían debidos a su capacidad para disminuir los factores de adhesión vascular en las células endoteliales (Ouchi et al,1999).Esto le conferiría un papel clave, ya que la disfunción endotelial se considera una de las primeras manifestaciones de la aterosclerosis. La *APN* puede tener efectos anti-aterogénicos a través de la modulación del metabolismo lipídico. Estudios clínicos demostraron que los niveles de *APN* están correlacionados negativamente con los niveles en sangre de triglicéridos y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y positivamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Kazumi et al,2002, Hulthe et al,2003). El mismo polimorfismo se asoció a pacientes y controles, con riesgo o protección respectivamente, para hipoadiponectinemia, lo cual se correlaciona con nuestros resultados. En nuestro estudio se obtuvieron niveles estadísticamente significativos más elevados de triglicéridos en pacientes con EAC p que en los individuos del grupo control y se obtuvo una relación directamente proporcional a valores más bajos de *APN* en los pacientes con EAC p. Es posible que *OPN* tenga alguna interacción con *APN*, regulada por el SRAA en los mecanismos involucrados para el desarrollo de EAC. Sin embargo, es necesario realizar estudios funcionales para poder atribuir el efecto funcional de *OPN* en conjunto con *APN* en EAC.

Respecto a las asociaciones en el grupo control, el mismo polimorfismo rs11730582 se asoció a un mayor riesgo genético para niveles elevados de

apolipoproteína B. La Apo B es el único componente proteico de las LDL plasmáticas. Las concentraciones elevadas de Apo B se asocian a las enfermedades cardiovasculares, debido a la estrecha relación entre la Apo B y el grado de la aterosclerosis (Rifai et al,1999). Como se muestra en las tablas 3 y 4, se observaron valores más elevados de LDL, apolipoproteína B y mayor prevalencia de colesterol LDL y colesterol No HDL en el grupo control comparado con el grupo de pacientes, lo que puede deberse al tratamiento con estatinas para el control farmacológico de LDL, de los pacientes con EAC. El papel de la APN está ampliamente descrito por sus efectos antiinflamatorios, antiateroscleróticos, antilipogénicos e hipoglicemiantes. Además, la APN tiene un mecanismo protector en el desarrollo del hígado graso (García-Monzón et al., 2000). Se sugiere que estos hallazgos pueden estar relacionados con la asociación genética del polimorfismo rs2728127 en la protección genética de hígado graso en el grupo control.

Los SNPs incluidos en nuestro trabajo han sido asociados, en otros estudios, con un mayor riesgo a padecer enfermedades autoinmunes (Jürgen Glas et al., 2011), nefrolitiasis (Cambray et al., 2019, Xiao et al., 2016) y agresividad del cáncer de mama (Ramchandani et al., 2013). Es importante mencionar que existen escasos estudios de asociación de polimorfismos del gen *OPN* con enfermedades cardiovasculares, y de los cuales, han sido realizados en poblaciones diferentes, tomando en cuenta el mínimo de marcadores metabólicos y factores de riesgo asociados con EC. El presente estudio, es el primero que reporta la asociación de los polimorfismos del gen *OPN* con anomalías y parámetros metabólicos en pacientes y en personas sanas en la población mexicana.

11. CONCLUSIONES

En conclusión, tomando en cuenta los resultados de la población estudiada; medidas antropométricas y parámetros metabólicos, se identificaron marcadores bioquímicos importantes en el desarrollo de aterosclerosis que se encuentran más elevados en pacientes con EACp que en personas del grupo control. Sin embargo se encontró que no hay asociación entre los polimorfismos del gen *OPN* con EAC y el grupo control. Este trabajo ha proporcionado evidencia de que los dos polimorfismos en la región promotora del gen de *OPN* no se asocian con la EACp, pero sí con anomalías metabólicas relacionadas con la EAC.

En conjunto los hallazgos de esta asociación estadísticamente significativa entre los polimorfismos del gen *OPN* (rs11730582, rs2728127) con anomalías metabólicas en los grupos de estudio, puede ser un respaldo importante en la comprensión de patogénesis de la EAC y contribuye a aclarar los mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo de la EAC.

12. PERSPECTIVAS

Es necesario realizar análisis y estudios funcionales para comprender los mecanismos moleculares involucrados en las asociaciones de los polimorfismos del gen *OPN* con las anomalías metabólicas en la enfermedad arterial coronaria.

Si bien se incluyeron los SNP's C-443T (rs11730582), A-1748G (rs2728127) por su alta frecuencia, ubicación y relación en procesos de aterosclerosis. Sería de utilidad

estudiar más polimorfismos genéticos en otras regiones del gen *OPN*. Asimismo podría evaluarse el desequilibrio de ligamiento, y el posible efecto funcional, para establecer la verdadera participación del gen en la EAC.

Con la reciente aportación de la expresión de isoformas de *OPN* difiere con la progresión de la enfermedad se requieren estudios futuros para determinar la función que desempeña cada una de ellas.

Además consideramos importante que se midan en un futuro los niveles séricos de *OPN*, para analizar su utilidad como marcadores metabólicos predictivos en enfermedades cardiovasculares y analizar la asociación que presentan los niveles

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Abedin M, Tintut Y, Demer LL. Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2004;24: 1161–70.
2. Anborgh PH, Mutrie JC, Tuck AB, Chambers AF. Pre- and post-translational regulation of osteopontin in cancer. *J Cell Commun Signal* 2011; 5:111e22.
3. Ángeles-Martínez J, Posadas-Sánchez R, Llorente L, Álvarez-León E, Ramirez-Bello J, Villareal –Molina T, Lima G, Cardoso - Saldaña G, Rodríguez-Pérez JM, Pérez-Hernández N, Frago JM, Posadas-Romero C, Vargas Alarcón G., The rs7044343 Polymorphism of the Interleukin 33 Gene Is Associated with Decreased Risk of Developing Premature Coronary Artery Disease and Central Obesity, and Could Be Involved in Regulating the Production of IL-33 *PLoS One*. 2017 Jan 3;12(1):e0168828.
4. Anna Prats Puig, Implicaciones de la adiponectina de alto peso molecular en el eje tiroideo y el metabolismo óseo, Girona España, 2012.
5. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*. Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Kansas Medical Center, 2017 2.03;5:222–6
6. Avogaro A, Fadini GP, Mechanisms of ectopic calcification: implications for diabetic vasculopathy. *Cardiovascular Diagnosis and Therapy*, 2015;5(5):343-352
7. Baecke, J. A., Burema, J., & Deurenberg, P. (1982). Body fatness, relative weight and frame size in young adults. *British journal of nutrition*, 48(1), 1-6.
8. Bolick, L. E., & Blankenhorn, D. H. (1961). A quantitative study of coronary arterial calcification. *The American journal of pathology*, 39(5), 511.
9. Borgonio Cuadra MG, González Huerta NC, Rojas Toledo EX, Morales Hernández E, Pérez Hernández N, Rodríguez Pérez

JM,Tovilla Zárate CA,González Castro TB,Hernández Díaz J,López Narváez ML,Miranda Duarte A.

10. Borilova Linhartova P Cernochova P Kastovsky J Vrankova M Sirotkova ZL Izakovicova Holla. Genetic determinants and postorthodontic external apical root resorption in Czech children. *Oral disease*. Volume23, Issue1, January 2017, Pages 29-35.
11. Bostrom K, Watson KE, Horn S, Wortham C, Herman IM, Demer LL. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*. 1993; 91: 1800–1809.
12. Brylka L, Jahnen-Dechent W. The role of fetuin-A in physiological and pathological mineralization. *Calcif Tissue Int* 2013;93:355-64.
13. Bruemmer D, et al. Angiotensin II–accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Investig*. 2003; 112(9):1318.
14. Cambray S, Galimudi RK, Bozic M, Bermúdez-López M, Rodríguez I, Valdivielso JM. The rs1126616 Single Nucleotide Polymorphism of the Osteopontin Gene Is Independently Associated with Cardiovascular Events in a Chronic Kidney Disease Cohort. *J Clin Med*. 2019;8(5):592. Published 2019 Apr 29. doi:10.3390/jcm8050592
15. Chae S, Jun HO, Lee EG, Yang SJ, Lee DC, Jung JK, et al. Osteopontin splice variants differentially modulate the migratory activity of hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2009; 35:1409-16.
16. Chen JH, Chen YC, Mao CL, Chiou JM, Tsao CK, Tsai KS. Association between secreted phosphoprotein-1 (SPP1) polymorphisms and low bone mineral density in women. *PLoS One*. 2014;9(5):e97428. Published 2014 May 15. doi:10.1371/journal.pone.0097428
17. Christa Caesar, Alicia N. Lyle, Giji Joseph, Daiana Weiss, Fadi M. F. Alameddine, Bernard Lassègue, Kathy K. Griendling, and W. Robert , Cyclic Strain and Hypertension Increase Osteopontin Expression in the Aorta, Division of Cardiology, Atlanta, USA, 2017.

18. Christensen B, Klaning E, Nielsen MS, Andersen MH, Sorensen ES. C-terminal modification of osteopontin inhibits interaction with the α V β 3-integrin. *J Biol Chem* 2012;287:3788e97
19. Christensen B, Petersen TE, Sorensen ES. Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J* 2008; 411:53e61.
20. Davies MJ, Mann JM. Relation of Characteristics to Degree of Stenosis in Human Coronary Arteries, Vulnerable plaque. American Heart Association, *Circulation*. 1996;94: 928–931.
21. Delgado-Vega AM, Alarcón-Riquelme ME, Kozyrev SV. Genetic associations in type I interferon related pathways with autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2010;12 Suppl 1(Suppl 1):S2. doi:10.1186/ar2883
22. De Long, D. M., DeLong, E. R., Wood, P. D., Lippel, K., & Rifkind, B. M. (1986). A comparison of methods for the estimation of plasma low-and very low-density lipoprotein cholesterol: the Lipid Research Clinics Prevalence Study. *Jama*, 256(17), 2372-2377.
23. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation*. 2008; 117:2938–48.
24. Denhardt DT, Noda M, O'Regan AW, Pavlin D, Berman JS. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest* 2001; 107:1055e61.
25. Detrano R, Tzung Hsiai, Shaojung Wang, Puentes G, Fallavollita J, Shields P, Stanford, Wolfkiel C, Demetriou Georgiou, Budoff M, Judd Reed. Prognostic value of coronary calcification and angiographic stenoses in patients undergoing coronary angiography. *J Am Coll Cardiol*. 1996 Feb, 27 (2) 285-290.
26. Eftihia Sbarouni, Panagiota Georgiadou, Sofia Chatzikyriakou, et al. Osteopontin in relation to Prognosis following, Coronary Artery Bypass Graft Surgery, 2016.

27. Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, Ravazzolo R. Polymorphisms in the osteopontin promoter affect its transcriptional activity, 2004. *Physiol Genomics* 2004; 20:87–96.

28. García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular Ischaemic heart disease: inflammation markers and cardiovascular risk. *Revista Española de Cardiología*. 1999, Pages 990-1.003.

29. García-Monzón C, Martín-Pérez E, Iacono OL, Fernández-Bermejo M, Majano PL, Apolinario A, et al. Characterization of pathogenic and prognostic factors of nonalcoholic steatohepatitis associated with obesity. *J Hepatol* 2000; 33:716-24.

30. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol*. 1998;152 (2):353–358.

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

32. Giachelli C, Bae N, Lombardi D, Majesky M, Schwartz S. Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein I, 2aR). *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;177:867–873

33. Gimba ER, Tilli TM. Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer*. 2013; 331:11e7.

34. Glas J, Seiderer J, Bayrle C, et al. The role of osteopontin (OPN/SPP1) haplotypes in the susceptibility to Crohn's disease. *PLoS One*. 2011;6(12):e29309. doi:10.1371/journal.pone.0029309

35. Grau JB, Poggio P, Sainger R, Vernick WJ, Seefried WF, Branchetti E, et al. Analysis of osteopontin levels for the identification of asymptomatic patient with calcific aortic valve disease. *Ann Thorac Surg* 2012;93:79e86.
36. Han S, Guthridge JM, Harley IT, et al. Osteopontin and systemic lupus erythematosus association: a probable gene-gender interaction. *PLoS One*. 2008;3(3):e0001757. Published 2008 Mar 12. doi:10.1371/journal.pone.0001757
37. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005; 352:1685-95. Heart Protection Study Collaborative Group. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20 536 high-risk individuals: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002; 360:7-22.
38. Hecht H. The Deadly Double Standard (The Saga of Screening for Subclinical Atherosclerosis). *Am J Cardiol*. 2008; 101:1805-1807.
39. Hernández-Avila, J. E., Rodríguez, M. H., Rodríguez, N. E., Santos, R., Morales, E., Cruz, C., & Sepúlveda-Amor, J. (2002). Cobertura geográfica del sistema mexicano de salud y análisis espacial de la utilización de hospitales generales de la Secretaría de Salud en 1998. *Salud pública de México*, 44, 519-532.
40. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004; 292:490-5.
41. Hou X, Hu Z, Huang X, Chen Y, He X, Xu H, Wang N. Serum osteopontin, but not OPN gene polymorphism, is associated with LVH in essential hypertensive patients. Department of Cardiology, Hangzhou First Municipal Hospital & Hangzhou Hospital, Nanjing Medical University, China. 2014.
42. Hulthe J, Hulten LM, Fagerberg B: Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with

the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism* 52:1612-1614, 2003

43. Hummelshoj T, Ryder LP, Madsen HO, Odum N and Svejgaard A: A functional polymorphism in the *Eta-1* promoter is associated with allele specific binding to the transcription factor Sp1 and elevated gene expression. *Mol Immunol* 43: 980-986, 2006.
44. Hunter GK, Kyle CL, Goldberg HA. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: structural specificity of the osteopontin mediated inhibition of hydroxyapatite formation. *Biochem J.* 1994; 300:723–728.
45. INEGI. Estadísticas de mortalidad 2012. (Consultado el 4 de Marzo del 2015).
46. INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017. Comunicado de prensa Núm. 525/18 31 de Octubre de 2018 Página 1/3.
47. Iglesias-Linares A, Yañez-Vico RM, Moreno-Fernández AM , Mendoza-Mendoza Orce-Romero A , Solano-Reina E. Osteopontin gene SNPs (rs9138, rs11730582) mediate susceptibility to external root resorption in orthodontic patients. *Oral disease.* Volume 20, Issue 3 Pages: 223-324, e1-e134 April 2014
48. Isoda K, Nishikawa K , Kamezawa Y, Yoshida M , Kusuhashi M, Moroi M , Tada N , and Ohsuzu F. Osteopontin Plays an Important Role in the Development of Medial Thickening and Neointimal Formation, *Circ Res.* 2002; 91(1):77–82.
49. Jesper Hjortnaes, Sophie E.P. New, and Elena Aikawa*, Visualizing novel concepts of cardiovascular calcification, 2014. Reynolds JL, Joannides AJ, Skepper JN, McNair R, Schurgers LJ, Proudfoot D.
50. Jiménez Corona, Azucena Eunice & Damián-Zamacona, Salvador & Moreno, Abel & Mas-Oliva, Jaime. (2012). Osteopontin Upregulation in Atherogenesis Is Associated with

Cellular Oxidative Stress Triggered by the Activation of Scavenger Receptors. *Archives of medical research*. 43. 102-11. 10.1016/j.arcmed.2012.03.001.

51. Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem* 2000; 275:20197e203.
52. Kaartinen MT, Murshed M, Karsenty G, et al. Osteopontin upregulation and polymerization by transglutaminase 2 in calcified arteries of Matrix Gla protein-deficient mice. *JHistochem Cytochem* 2007; 55:375-86.
53. Kaleta B. Role of osteopontin in systemic lupus erythematosus. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2014;62 (6):475–482. doi:10.1007/s00005-014-0294-x
54. Katz J, Gong Y, Salmasinia D, Hou W, Burkley B, Ferreira P, Casanova O, Moreb J.S. Genetic polymorphisms and other risk factors associated with bisphosphonate induced osteonecrosis of the jaw *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2011, 40 (6) , pp. 605-611.
55. Kazumi T, Kawaguchi A, Sakai K, Hirano T, Yoshino G: Young men with high-normal blood pressure have lower serum adiponectin, smaller LDL size, and higher elevated heart rate than those with optimal blood pressure. *Diabetes Care* 25:971-976, 2002
56. Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, Kubota T, Moroi M, Matsui J, Eto K, Yamashita T, Kamon J, Satoh H, Yano W, Froguel P, Nagai R, Kimura S, Kadowaki T, Noda T: Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem* 277:25863-25866, 2002.
57. Kurata M, Okura T, Irita J, Enomoto D, Nagao T, Jotoku M, Ken-ichi Miyoshi & Higaki J (2010) The Relationship Between Osteopontin and Adiponectin in Patients with Essential Hypertension, *Clinical and Experimental Hypertension*, 32:6, 358-363, DOI: 10.3109/10641961003628494

58. Lanzer P, Boehm M, Sorribas V, et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. *Eur Heart J* 2014; 35:1515-25.
59. Leopold JA, M.D, Vascular Calcification: Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Calcification, *Trends Cardiovasc Med*. Author manuscript; available in PMC 2015.
60. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, December 2002. Vol. 420 | 19/26.
61. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenge in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011 May 19; 473(7347):317-25
62. Liu, J., Ren, Y., Kang, L., & Zhang, L. (2014). Oxidized low-density lipoprotein increases the proliferation and migration of human coronary artery smooth muscle cells through the upregulation of osteopontin. *International Journal of Molecular Medicine*, 33, 1341-1347.
63. Liu J, He C, Yuan Q, Wang Z, Xing C, Yuan Y. Association between promoter polymorphisms of OPN gene and cancer risk: a meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2015;9:87–97. Published 2015 Dec 30. doi:10.2147/OTT.S94606
64. Lund SA, Giachelli CM, Scatena M. The role of osteopontin in inflammatory processes. *J. Cell Commun. Signal*. (2009) 3:311–322 DOI 10.1007/s12079-009-0068-0.
65. Luo R, Li X, Jiang R, Gao X, Lu Z, Hua W. Serum concentrations of resistin and adiponectin and their relationship to insulin resistance in subjects with impaired glucose tolerance. *J Int Med Res* 2012; 40:621- 30.
66. Lyle AN, Remus EW, Fan AE, et al. Hydrogen peroxide regulates osteopontin expression through activation of transcriptional and translational pathways. *J Biol Chem*. 2014;289 (1):275–285. doi:10.1074/jbc.M113.489641
67. Maver A, Medica I, Salobir B, Tercej M, Peterlin B. Genetic variation in osteopontin gene is associated with susceptibility to

- sarcoidosis in Slovenian population. *Dis Markers*. 2009;27(6):295–302. doi:10.3233/DMA-2009-0675
68. Mazière C, Gomila C and Mazière JC: Oxidized low-density lipoprotein increases osteopontin expression by generation of oxidative stress. *Free Radical Bio Med* 48: 1382-1387, 2010.
69. Mi Y, Ren K, Dai F, Zhu L, Feng N. OPN gene polymorphisms, rs17524488 GG/G, rs11730582 T/C, and rs9138 C/A, and cancer risk in a Chinese population. *Sci Rep*. 2015;5:14164. Published 2015 Sep 15. doi:10.1038/srep14164
70. Niewold TB, Kariuki SN, Morgan GA, Shrestha S, Pachman LM. Gene-gene-sex interaction in cytokine gene polymorphisms revealed by serum interferon alpha phenotype in juvenile dermatomyositis. *J Pediatr*. 2010;157(4):653–657. doi:10.1016/j.jpeds.2010.04.034
71. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, Nishida M, Arita Y, Kumada M, Ohashi K, Sakai N Shimomura I, Kobayashi H, Terasaka N, Inaba T, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*106:2767-2770, 2002.
72. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades cardiovasculares, Datos y cifras, Mayo, 2017.
73. Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476, 1999.
74. Pagel CN, Wasgewatte Wijesinghe DK, Taghavi Esfandouni N Mackie EJ. Osteopontin, inflammation and myogenesis: influencing regeneration, fibrosis and size of skeletal muscle, *J. Cell Commun. Signal. Australia*, 2014.

75. Pereira G, Navarro D, Betancourt V, Reyes A. Niveles de lipoproteína (a) en mujeres de mediana edad. Informe preliminar. *Rev Cubana Endocrinol.* 1999; 10(2):104-9.
76. Posadas Romero C, López Bautista F, Díaz Rodas MA, Sánchez Posadas Rosalinda, Vargas Alarcón Gilberto. Prevalencia y extensión de la calcificación arterial coronaria en población mexicana asintomática cardiovascular: Estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa. Instituto Nacional de Cardiología. Ignacio Chávez, 2016.
77. Pradelli D, Faden G, Mureddu G, et al. Impact of aortic or mitral valve sclerosis and calcification on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *Int J Cardiol* 2013; 170:e51-5.
78. Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 117:765-71.
79. Qian Ge, Cheng-Chao Ruan^{1,2}, Yu Ma¹, Xiao-Feng Tang¹, Qi-Hong Wu, Ji-Guang Wang¹, Ding-Liang Zhu¹ & Ping-Jin Gao, Osteopontin regulates macrophage activation and osteoclast formation in hypertensive patients with vascular calcification, 2017 DOI: 10.1038/srep4025.
80. Raggi, P., Callister, T. Q., Coil, B., He, Z. X., Lippolis, N. J., Russo, D. J & Mahmarian, J. J. (2000). Identification of patients at increased risk of first unheralded acute myocardial infarction by electron-beam computed tomography. *Circulation*, 101(8), 850-855.
81. Ramchandani, D., & Ramchandani, D. (2013). An osteopontin promoter polymorphism is associated with aggressiveness in breast cancer. *Oncology Reports*, 30, 1860-1868. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2632>
82. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. En: Burtis CA, Ashwood ER, editores. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 3a ed. Filadelfia: W.B Saunders Company; 1999. p. 809-61.

83. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007; 115:e69-171.
84. Rosas-Peralta M, Arizmendi-Urbe E, Borrayo-Sánchez G. ¿De qué fallecen los adultos en México? Impacto en el desarrollo económico y social de la nación. La carga global de los padecimientos cardiovasculares. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2017;55(1):98-103
85. Ross R. *Atherosclerosis-An Inflammatory Disease. Mechanisms of disease*. Massachusetts Medical Society, 1999.
86. Safarinejad MR, Nayyer Shafiei, Shiva Safarinejad. Association between polymorphisms in osteopontin gene (SPP1) and first episode calcium oxalate urolithiasis. *Urolithiasis*. 2013 Aug; 41(4): 303–313. Published online 2013 Jun 20. doi: 10.1007/s00240-013-0582-7
87. Santos Martín J, *Epidemiología Genética*. The Netherlands Institute for Health Sciences, Santiago de Chile, 2011.
88. Savoia C, Schiffrin EL. Inflammation in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006; 15(2):152–158.
89. Scatena M, Liaw L, Giachelli CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2007;27:2302e9.
90. Shanahan CM, Cary NR, Metcalfe JC, Weissberg PL. High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994; 93:2393–2402.
91. Shang H, Hao Y, Hu W, Hu X, Jin Q. *OPN* gene locus is associated with the risk of knee osteoarthritis: a case-control study. *Biosci Rep*. 2019;39(2):BSR20182023. Published 2019 Feb 27. doi:10.1042/BSR20182023
92. Shioi A, Nishizawa Y, Jono S, Koyama H, Hosoi M, Morii H. glycerophosphate accelerates calcification in cultured bovine vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:2003–2009.

93. Schmidt-Petersen K, Brand E, Telgmann R, Nicaud V, Hagedorn C, et al.(2009) Osteopontin gene variation and cardio/cerebrovascular disease phenotypes. *Atherosclerosis* 206: 209–215.
94. Steitz SA, Speer MY, McKee MD, Liaw L, Almeida M, Yang H, Giachelli CM. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. *Am J Pathol.* 2002; 161:2035–2046.
95. Speer MY, McKee MD, Guldborg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J Exp Med.* 2002; 196:1047–1055.
96. Sullivan J, Blair L, Alnajar A, Aziz T, Ng CY, Chipitsyna G, et al. Expression of a pro-metastatic splice variant of osteopontin, OPNC, in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Surgery* 2009; 146:232e40.
97. T. Wolak Osteopontin, a multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease .*Atherosclerosis* 236, 327-337 (2014).
98. Trivedi T, Franek BS, Green SL, et al. Osteopontin alleles are associated with clinical characteristics in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:802581. doi:10.1155/2011/802581
99. Toth PP, Townsend R, Giménez Salvador. The year in cardiovascular risk, 2011-2012.
100. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* 2006; 103:14678–83.
101. Vijayanirmala Subraman, Muthukumar Thiyagarajan, N.Malathi, Sadhara T. Rajan OPN –Revisited *Journal of Clinical and Diagnostic Research.* Faculty of Dental Sciences, Sri Ramachandra University, Porur, Chennai, India, 2015.

102. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006; 47(8 Suppl.):C13–8.
103. Xin Zhang, Alfonso Eirin, Amir Lerman, and Liach O. Lerman. Osteopontin: as emerging therapeutic target in uraemic vascular disease. *Cardiovascular Research of the European Society of Cardiology*. 2013;98,332-333.
104. Xiao X, Dong Z, Ye X, et al. Association between *OPN* genetic variations and nephrolithiasis risk. *Biomed Rep*. 2016;5(3):321–326. doi:10.3892/br.2016.724
105. Xuwei Hou, Zhaohui Hu, Xiaohua Huang, Yan Chen, Xiuying He. Serum osteopontin, but not *OPN* gene polymorphism, is associated with LVH in essential hypertensive patients, *Journal of Molecular Medicine*, 2014.
106. Young MF, Kerr JM, Termine JD, et al. cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity, chromosomal location, and RFLP analysis of human osteopontin (*OPN*). *Genomics* 1990;7: 491–502.
107. Yueniwati Y, Yurina V, Sobah N, Rahayu E. Genetic variations in the osteopontin promoters T-443C and G-156GG increase carotid Intima–media thickness. *International Journal of General Medicine* 2016 :9 117–122
108. Wada T, Marc D. McKee, Susie Steitz, Cecilia M. Giachelli. Calcification of vascular smooth muscle cell cultures inhibition by osteopontin. *Circ Res*. 1999; 84(2):166–178.
109. Waller AH, et al. Osteopontin in cardiovascular disease: A potential therapeutic target. *Cardiol Rev*. 2010; 18(3):125–131.
110. Weber GF, Zawaideh S, Hikita S, Kumar VA, Cantor H, Ashkar S (2002) Phosphorylation-dependent interaction of osteopontin with its receptors regulates macrophage migration and activation. *J Leukoc Biol* 72(4):752–761.

