



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA XOCHIMILCO
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Reporte final de protocolo de investigación

Proyecto:

Efecto de las lipoproteínas de alta densidad aisladas de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo sobre la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos humanos.

Sede:

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez
Departamento de Biología Molecular

MPSS:

Margarita Jaqueline Gutiérrez Saldaña

Asesor externo:

Dra. María de Jesús Luna Luna

Asesor interno:

Dr. Rafael Bojalil Parra

Periodo:

febrero 2024 - enero 2025

Efecto de las lipoproteínas de alta densidad aisladas de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo sobre la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos humanos

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en México y la enfermedad aterosclerosa coronaria es una de las principales afecciones dentro de este grupo. La enfermedad aterosclerosa coronaria es un proceso inflamatorio que puede llegar a la calcificación del ateroma, causando estrechamiento de las arterias y, en casos graves, obstrucción de la circulación y eventos isquémicos agudos como el síndrome isquémico coronario agudo y el evento vascular cerebral. El tejido adiposo epicárdico (TAE) ha ganado importancia en este proceso debido a su proximidad con las arterias coronarias. Se ha demostrado que el TAE expresa genes relacionados con la calcificación del ateroma, como el gen *SPP1* que codifica para la proteína osteopontina (OPN), la cual experimenta diversas modificaciones postraduccionales. Sin embargo, aún se desconoce la principal fuente de OPN, la abundancia de las isoformas del gen *SPP1* en el ateroma y las modificaciones que puedan afectar su función.

Se ha observado una asociación estadística entre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la expresión de *SPP1* en el TAE, sugiriendo que las HDL podrían regular la expresión de las isoformas de OPN. Por ello, se propone este estudio para investigar la regulación de la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos humanos estimulados con HDL de pacientes con SICA y sujetos control. Se espera encontrar una relación entre la composición y distribución de las HDL y la expresión de las isoformas de *SPP1*, lo cual podría contribuir a entender mejor los mecanismos involucrados en la aterosclerosis coronaria.

El estudio del TAE y su relación con la expresión de genes como *SPP1* es importante para comprender los mecanismos que llevan al desarrollo de placas ateroscleróticas y su calcificación. Se ha demostrado que el TAE de pacientes con enfermedad coronaria expresa genes relacionados con la calcificación del ateroma, lo cual sugiere su participación en este proceso.

El presente proyecto de investigación pretende definir la regulación de la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en adipocitos cardiacos estimulados con HDL, con el fin de entender el impacto de las HDL sobre el TAE y su impacto sobre los mecanismos que llevan a la formación y calcificación de las placas ateroscleróticas. Se espera que los resultados de este estudio puedan contribuir a identificar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad aterosclerosa coronaria y reducir su impacto en la población mexicana.

Planteamiento del problema y justificación

Las enfermedades cardiovasculares, en particular la enfermedad aterosclerosa coronaria, representan una grave problemática de salud en México, siendo la principal causa de muerte en el país. La enfermedad involucra una serie de eventos celulares que culminan en la formación de placas aterosclerosas que pueden romperse y provocar eventos vasculares agudos. Se ha observado una asociación entre la composición y distribución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la expresión de genes relacionados con la calcificación en tejido adiposo epicárdico, sugiriendo un papel importante de las HDL en la regulación de la enfermedad.

La disfunción del endotelio vascular y la inflamación favorecen la progresión de las placas aterosclerosas, las cuales tienden a calcificarse. Se ha demostrado que el tejido adiposo epicárdico puede contribuir a la inflamación y calcificación de las placas aterosclerosas, y se ha encontrado una mayor expresión de genes relacionados con la calcificación en este tejido en pacientes con enfermedad aterosclerótica coronaria.

La osteopontina (OPN) es una proteína asociada con la progresión del ateroma y se ha observado que su presencia aumenta en arterias con placas aterosclerosas calcificadas. La expresión de diferentes isoformas de OPN puede variar en función de las modificaciones postraduccionales y la fosforilación de la proteína. El estudio de la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos estimulados con HDL de pacientes con síndrome isquémico coronario agudo y sujetos control puede proporcionar información importante sobre el potencial de las HDL como reguladoras de la expresión génica en TAE.

Hipótesis

La expresión del RNA mensajero de las isoformas del gen *SPP1* se modifica en función de la composición y tamaño de las HDL.

Objetivo General

Determinar los cambios de expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos humanos estimulados con HDL de pacientes con SICA y sujetos control.

Objetivos específicos

1. Diseñar las sondas correspondientes a cada isoforma del gen *SPP1*.
2. Estandarizar las condiciones de amplificación de las sondas mediante PCR punto final.
3. Obtener muestras de sangre de pacientes con SICA y sujetos control.
4. Caracterizar las subpoblaciones de HDL previamente aisladas, mediante electroforesis en condiciones nativas.
5. Estandarizar el método de diferenciación de los preadipocitos cardiacos en adipocitos maduros.
6. Estimular los adipocitos cardiacos en cultivo con HDL aisladas de pacientes con SICA y controles.
7. Determinar la expresión génica de las isoformas de *SPP1* por PCR en tiempo real.

Antecedentes

La enfermedad aterosclerosa coronaria es un ciclo vicioso de inflamación que puede progresar hasta la calcificación del ateroma. Además de reducir la luz arterial, la placa puede romperse desencadenando un proceso trombótico que culmina por ocluir la circulación y provocar un episodio vascular isquémico agudo cuyas manifestaciones clínicas más frecuentes son el síndrome isquémico coronario agudo (SICA) y el evento vascular cerebral. En este contexto, es bien aceptado que las lipoproteínas de alta densidad (HDL) juegan un papel anti-aterogénico, aunque los mecanismos involucrados aún siguen en debate [1,2]. Se ha sugerido que la actividad biológica de estas lipoproteínas es dependiente de su tamaño y características fisicoquímicas [3] de ahí la importancia de caracterizarlas.

En investigaciones previas, hemos demostrado una asociación estadística entre la composición y distribución de las HDL con la expresión de genes relacionados con la calcificación [4] en tejido adiposo epicárdico sugiriendo una nueva función de estas lipoproteínas como se expondrá más adelante. La disfunción del endotelio vascular favorece un proceso inflamatorio que permite el desarrollo y progresión de las placas aterosclerosas, las cuales tienden a calcificarse. Hasta el momento, el mecanismo que dirige tal proceso no ha sido bien definido [5]. Por muchos años, la hipertrofia del tejido adiposo visceral abdominal ha sido considerada uno de los principales factores de riesgo de aterosclerosis debido a la inflamación sistémica y las anormalidades metabólicas que la acompañan. Sin embargo, tales argumentos son inconsistentes con el hecho de que sólo un grupo específico de arterias desarrollan aterosclerosis, las arterias coronarias principalmente. En este sentido, se requiere de un participante local que contribuya con el proceso aterogénico a través de la expresión de genes que codifican proteínas no sólo pro- inflamatorias sino pro-calcificantes. Dado que las placas aterosclerosas suelen encontrarse en sitios adyacentes a tejido adiposo epicárdico (TAE) [5], el estudio de la adiposopatía de este depósito de tejido adiposo cobra relevancia.

Diversos estudios han encontrado una asociación entre el volumen del TAE y la enfermedad aterosclerosa coronaria (EAC). En este sentido, pacientes con EAC tienen un mayor grosor de TAE comparado con sujetos sin EAC [6-9]. Además de que mediadores proinflamatorios como TNF- α , interleucina-6 y MCP-1 se expresan en mayor cantidad mientras que las adipocinas protectoras como adiponectina y omentina tienden a disminuir en el TAE de pacientes con EAC comparado con el TAE de sujetos sin EAC [10-13]. Djabery y colaboradores observaron que el volumen de TAE es mayor en sujetos con un puntaje de calcio arterial coronario >10 comparado con sujetos con puntaje de calcio arterial coronario ≤ 10 [14]. En el estudio CESAR se concluyó que la prevalencia de un puntaje de calcio arterial coronario >0 incrementa con el grosor y volumen de TAE medido por ecocardiografía y por tomografía computada [15]. Estos estudios apoyan fuertemente la participación del TAE no sólo en la formación sino también en la calcificación de la placa aterosclerosa.

Previamente, se ha demostrado que el TAE expresa genes relacionados con la calcificación del ateroma tal como *SPPI* que codifica para osteopontina (OPN), una proteína que se ha aislado del ateroma, especialmente en aquellos que presentan calcificación. El gen *SPPI*

experimenta corte y empalme alternativo generando 5 isoformas: OPN-a, OPN-b, OPN-c, OPN-d y OPN-e de las cuales se conoce muy poco a nivel cardiovascular. Ha sido demostrado que el producto proteínico de *SPP1*, OPN, experimenta diversas modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, glicosilación, escisión enzimática por trombina y metaloproteasas, haciéndolo muy versátil. Hasta la fecha se desconoce la principal fuente de OPN, la abundancia de las isoformas del gen *SPP1* en el ateroma y las modificaciones que presentan y que pueden repercutir en su función. Sin embargo, el TAE podría ser una fuente importante de dichas isoformas y la expresión de éstas podría estar regulada por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) como lo han sugerido estudios previos del mismo laboratorio donde se llevará a cabo el presente protocolo, donde se observó una asociación estadística de ciertas subpoblaciones de estas lipoproteínas con los niveles de expresión de *SPP1* en el TAE.

Se ha demostrado que las HDL regulan la expresión de TNF- α en miofibroblastos de la válvula aórtica sugiriendo una nueva función para estas lipoproteínas como reguladores de la expresión génica. Dicha función estaría determinada por la composición y distribución de las subpoblaciones de HDL.

En el marco de este proyecto de investigación proponemos a las HDL como reguladores de la expresión de las isoformas del gen *SPP1* en un modelo de adipocitos cardiacos humanos como un primer acercamiento a su posible regulación en el TAE. Se incluirán 40 pacientes con SICA y 40 sujetos control que hayan firmado el consentimiento informado. El tamaño muestral es por conveniencia debido a que no existen antecedentes suficientes al respecto para un cálculo estadístico de la n. A cada paciente se le tomará una muestra de sangre para el aislamiento y caracterización de las subpoblaciones de HDL. Se utilizarán adipocitos cardiacos humanos diferenciados *in vitro*, los cuales serán estimuladas con las HDL aisladas y se determinará el nivel de expresión génica de cada isoforma en los adipocitos.

Materiales y Métodos

Diseño del estudio: Transversal

Tipo de investigación: Experimental

Tipos de diseños: Casos y controles

Características del estudio:

a) Por la participación del investigador: Analítico

b) Por temporalidad del estudio: Transversal

b) Por la lectura de los datos: Prolectivo

d) Por el análisis de datos: Analítico

Universo: Pacientes diagnosticados con SICA en un rango de 40-65 años que ingresen a la unidad coronaria del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” (INC). Sujetos control provenientes del banco de sangre del INC.

Unidades de observación: Adipocitos cardiacos humanos.

Método de muestreo: Tamaño muestral a conveniencia debido a que no existen antecedentes suficientes respecto a la expresión del RNA mensajero de las isoformas del gen *SPP1* para un cálculo estadístico de la n.

Tamaño de muestra: El grupo de estudio estará integrado por 40 pacientes que ingresen a la unidad coronaria y sean diagnosticados con SICA. El grupo control estará formado por 40 sujetos clínica y bioquímicamente sanos.

Criterios de inclusión: Se incluirán en el grupo de estudio a pacientes de sexo masculino de entre 40 y 65 años. Pacientes con comorbilidades tales como diabetes, hipertensión y obesidad o que estén bajo tratamiento farmacológico antidiabético podrán ingresar al estudio. El grupo control estará formado por sujetos del sexo masculino de entre 40 y 65 años con un índice de masa corporal normal (18.5-24.9 Kg/m²) que acudan al banco de sangre del INC y presenten valores bioquímicos normales sin tratamientos farmacológicos. A todos los sujetos se les informará acerca del estudio y se les pedirá que firmen la carta de consentimiento informado correspondiente.

Criterios de exclusión: Los pacientes que presenten alguna de las alteraciones abajo mencionadas serán excluidos del estudio en cualquiera de los grupos: insuficiencia renal (creatinina >1.5mg/dL), hiperparatiroidismo o alteraciones conocidas del metabolismo de calcio, distiroidismo, tabaquismo activo, alcoholismo, daño hepático. Además, se excluirán a pacientes con stents o cirugías cardiacas previas, pacientes que no acepten participar en el protocolo bajo consentimiento informado.

Variable(s) independientes:

1. Expresión de gen *SPP1* en adipocitos cardiacos humanos.

Variable(s) dependientes:

1. Composición lipídica y distribución de las lipoproteínas de alta densidad
2. Perfil bioquímico (colesterol, triacilglicérol, colesterol-HDL, glucosa).

Recolección de datos:

Obtención de muestras sanguíneas: Se tomó una muestra de 20 mL sangre venosa en ayuno en tubos con EDTA como anticoagulante de cada sujeto incluido en el estudio. Se determinaron las concentraciones de colesterol, triacilglicérol, colesterol-HDL, triacilglicérol de HDL y glucosa. Asimismo, se realizó el aislamiento y la caracterización de las subpoblaciones de HDL. El plasma restante se congeló en alícuotas a -70°C para análisis posteriores.

Aislamiento y análisis de los lípidos de las HDL: Las HDL se aislaron mediante ultracentrifugación secuencial. Brevemente, la densidad del plasma fue ajustada con KBr sólido a 1.063 g/mL y fue ultracentrifugado a 100 000 rpm, 2.5 horas a 10°C . El sobrenadante que contenía a las VLDL, IDL y LDL fue eliminado y el infranadante se ajustó a una densidad de 1.21 g/mL y fue ultracentrifugado durante 3 horas a 100 000 rpm y 10°C . Las HDL contenidas en el sobrenadante fueron extraídas y centrifugadas a 1.25 con solución de KBr para mejorar su pureza. Las HDL aisladas fueron dializadas en buffer fosfatos (10 mM, pH 7.4).

El diámetro hidrodinámico de las HDL se estimó de acuerdo con la técnica previamente estandarizada en nuestro laboratorio [24-26]. El radio hidrodinámico de las subclases de HDL (HDL2b 10.58-12.36 nm, HDL2a 9.94-0.58 nm, HDL3a 8.98-9.94, HDL3b 8.45-8.98 nm, HDL3c 7.90-8.45 nm) separadas en electroforesis en condiciones nativas, se analizaron utilizando como referencia marcadores de alto peso molecular (tiroglobulina de 17 nm, ferritina de 12.2 nm, catalasa de 10.4 nm, lactato deshidrogenasa de 8.2 nm y albúmina de 7.1 nm, kit Pharmacia, UK). Se determinaron además las concentraciones plasmáticas de los lípidos de las subclases de HDL (colesterol total y triacilglicérol) por métodos enzimáticos en fase semisólida sobre el gel de poliacrilamida según lo hemos descrito previamente [25,26].

Diseño de las sondas para cada isoforma del gen SPP1: Las sondas fueron diseñadas con las plataformas Primer Blast y Primer Design.

Estandarización de las condiciones de amplificación: Las condiciones de amplificación se estandarizaron mediante PCR punto final probando diferentes temperaturas.

Cultivo de células precursoras de adipocitos: Las células precursoras de adipocitos cardiacos humanos (Cell applications, INC., San Diego, CA.) congeladas fueron despertadas, se sembraron en una caja de 75 cm² para su proliferación y fueron incubadas con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (20% concentración final). Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Sin embargo, las células no fueron viables. Por esta razón, células estromales de tejido adiposo cardiaco de conejo en congelación fueron

despertadas. Dichas células proliferaron hasta alcanzar la confluencia y fueron sembradas en cajas de doce pozos (100 000 células/pozo). Una vez en confluencia (85%) fueron tratadas para su diferenciación en adipocitos cardiacos. La diferenciación de las células precursoras se realizó mediante la estimulación con 3- isobutilmetilxantina (0.5 mM), indometacina (200 μ M), dexametasona (5 μ M) e insulina (10 μ g/mL) como medio de diferenciación y con insulina (10 μ g/mL) como parte del medio de mantenimiento. Las células fueron estimuladas con el medio de diferenciación por cuatro días y después fue remplazado con medio de mantenimiento por 2 días. Este esquema fue repetido hasta que las gotas de lípidos se formaron en el citoplasma de un 85% de las células (3 semanas aproximadamente).

Estimulación de los adipocitos cardiacos con HDL: Los adipocitos cardiacos fueron incubados durante una hora con medio completo deslipidado (10% de suero fetal bovino deslipidado y 1x de penicilina/estreptomicina) a 37°C y 5% CO₂. Al término de esta incubación, las células recibieron medio de cultivo nuevo deslipidado y las HDL de los pacientes y sujetos aisladas a una concentración final de colesterol-HDL de 50 mg/dL durante 8 horas a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el período de incubación, las células fueron recolectadas para los ensayos de expresión.

Extracción de RNA total y generación de cDNA: Los adipocitos cardiacos fueron desprendidos y homogeneizados en trizol y posteriormente centrifugados para eliminar la capa de lípidos que se formó en la superficie. El RNA total fue extraído con el kit comercial RiboPureTMRNA Purification Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Además, se trató con buffer DNAsa libre de RNAsa (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) para eliminar la posible contaminación con DNA. La DNAsa se inactivo mediante la adición de EDTA. Finalmente, la pureza e integridad del RNA aislado fueron evaluadas espectrofotométricamente a 260/280 nm y en el gel de agarosa al 1%, respectivamente. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de 0.5 μ g de RNA total utilizando el kit comercial SuperScript® VILOTM cDNA synthesis (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Resultados

Se realizó el perfil de lípidos mediante métodos colorimétricos de las muestras sanguíneas de los pacientes con SICA (n=40) y sujetos control (n=40). Los pacientes con SICA tuvieron concentraciones menores de colesterol, triacilgliceroles y colesterol-HDL con respecto al grupo control (figura 1). Además, la concentración de glucosa en los sujetos control fue de 108.74 mg/dL (93.62-124.66) y en el grupo SICA fue de 129.30 mg/dL (102.25-177.75). En el grupo SICA el 17% y el 36% de los pacientes estaban bajo tratamiento con estatinas y antihipertensivos, respectivamente. Los pacientes con SICA tuvieron un IMC de 26.56 (24.68-29.30) y 47% eran diabéticos.

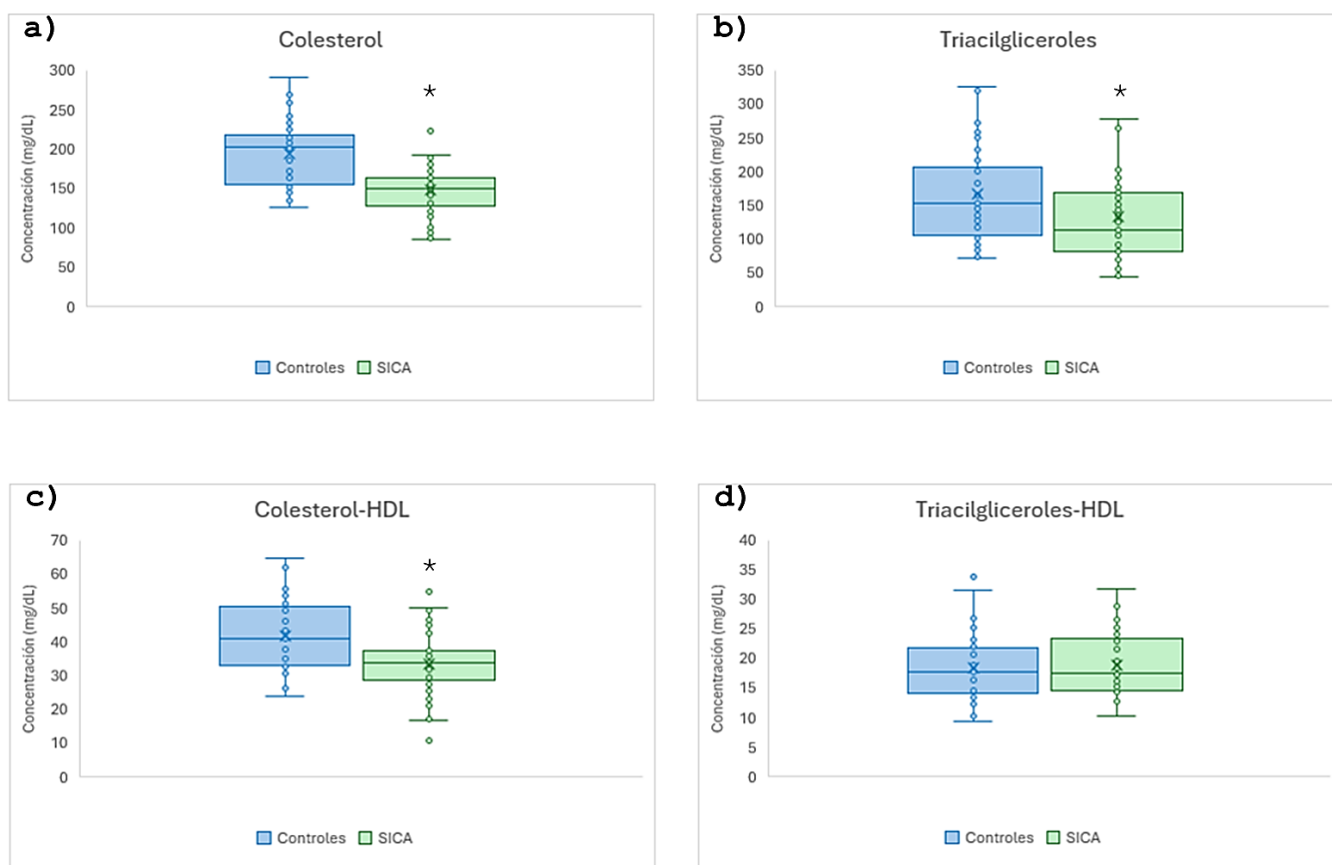


Figura 1.- Perfil de lípidos de los pacientes SICA y sujetos control. Los resultados se presentan como la media y el rango intercuartilar (cajas). Prueba U de Mann Whitney, *p<0.05.

Con la ayuda de la biblioteca digital NCBI se lograron identificar las secuencias genéticas de cada una de las isoformas del gen *SPP1*. Se realizó el alineamiento de todas las secuencias de las isoformas de *SPP1* con el programa “MultAlin”. En la figura 2 se presenta el alineamiento de todas las isoformas del gen *SPP1* y es de resaltar que en las primeras 257 pb se encontraron las diferencias entre cada isoforma y fue la zona considerada para el diseño específico de las sondas.



Figura 3.- Análisis de las sondas de cada isoforma en Primer-Blast. Las sondas presentaron una alta especificidad al reconocer sólo las isoformas del gen *SPP1* de humano.

Para establecer la temperatura de alineamiento de cada isoforma se consideró la Tm obtenida en el Primer Blast y se realizó una PCR punto final de gradiente de temperatura, seguido del corrimiento de los amplicones en geles de agarosa al 1.5%. Posteriormente, se realizó la qPCR usando SYBR Green. La figura 10 muestra los amplicones generados por qPCR bajo las siguientes condiciones: 95°C/10 min [(95°/15 seg | Tm/1 min) 35 ciclos] (figura 4). A excepción de la isoforma “e”, todas las demás isoformas correspondieron al tamaño indicado por el programa Primer Blast (isoforma a=137 pb, isoforma b=153 pb, isoforma c=151 pb, isoforma d= 113 pb e isoforma e=158 pb).

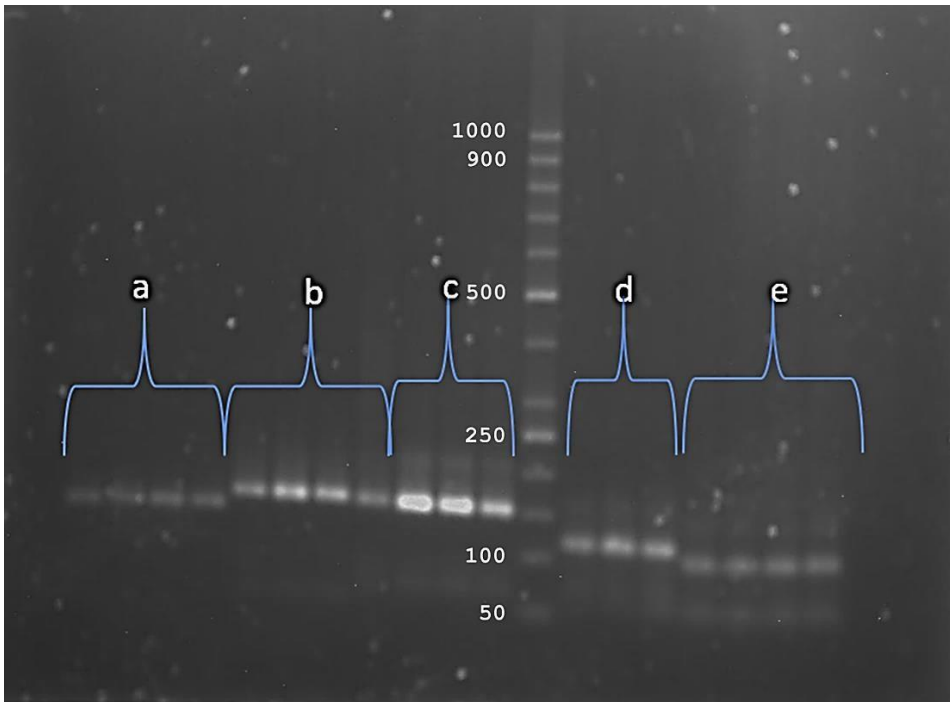


Figura 4.- Identificación del tamaño de los amplicones generados para las isoformas del gen *SPP1* por qPCR.

Las isoformas b, c y d presentaron inespecificidad, ya que se observa más de un amplicón. Para mejorar la amplificación realizamos diversas modificaciones, sin embargo, no logramos mejorar la especificidad. Por lo tanto, se realizó la búsqueda bibliográfica de sondas pre-diseñadas. Todas las sondas encontradas tenían condiciones para otros reactivos diferentes a SYBR Green, por lo que se optó por estandarizar las condiciones.

En la figura 5 se muestra el gradiente de temperatura que realizamos por PCR punto final para cada isoforma.

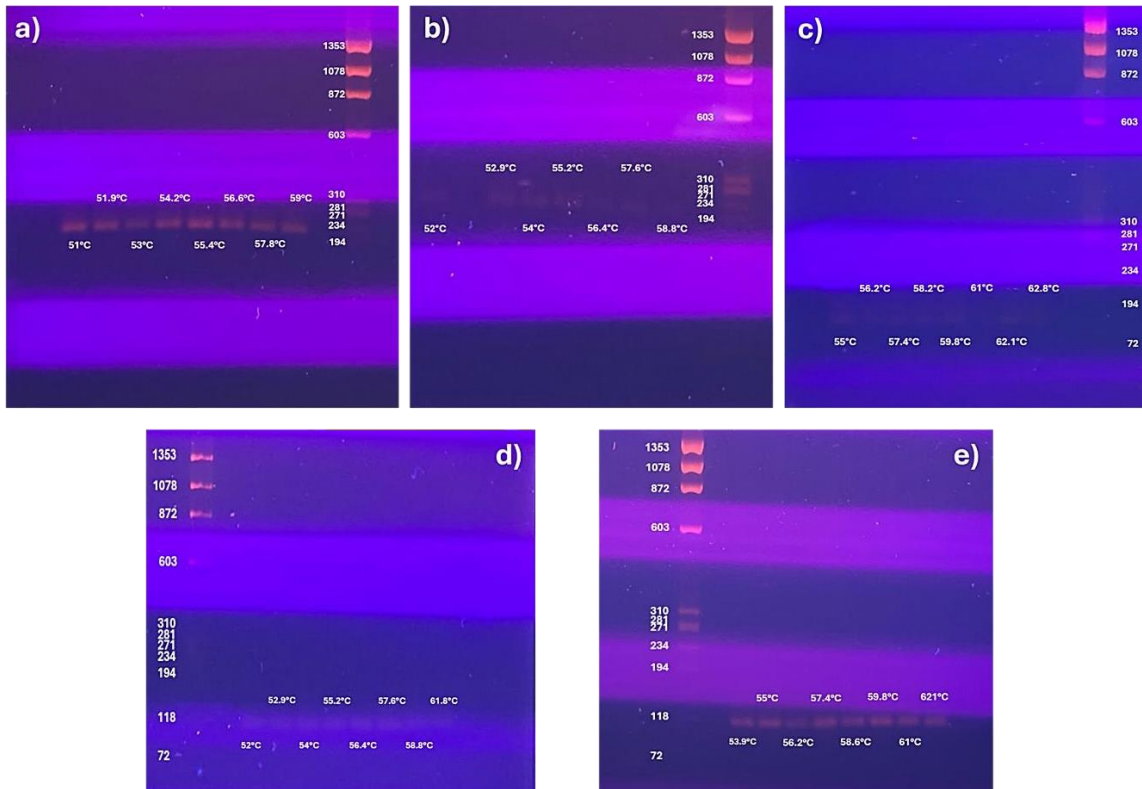


Figura 5.- PCR punto final de cada isoforma del gen *SPPI*. Cada inciso corresponde a la isoforma correspondiente y las condiciones para todas fueron 95°C por 10 minutos, (95°C por 5 segundos, Tm 55°C por 10 segundos y 72°C por 15 segundos por 45 ciclos) y 40°C por 30 segundos.

Las temperaturas elegidas para realizar los experimentos de tiempo real fueron: para la isoforma “a” 55.4°C, isoforma “b” 55.2°C, isoforma “c” 55°C, isoforma “d” 58°C e isoforma “e” 59°C.

Las células de la fracción estromal de tejido adiposo cardiaco de conejo fueron diferenciados a adipocitos maduros, que son caracterizados por la presencia de gotas de lípidos en su citoplasma. La presencia de dichas gotas fue puesta de manifiesto mediante la tinción con rojo oleoso (figura 6). Este modelo tuvo que ser utilizado debido a que las obtenidas comercialmente y destinadas para el presente proyecto no fueron viables. Por cuestiones de disponibilidad y tiempos de entrega no fue posible adquirir un nuevo lote prontamente.

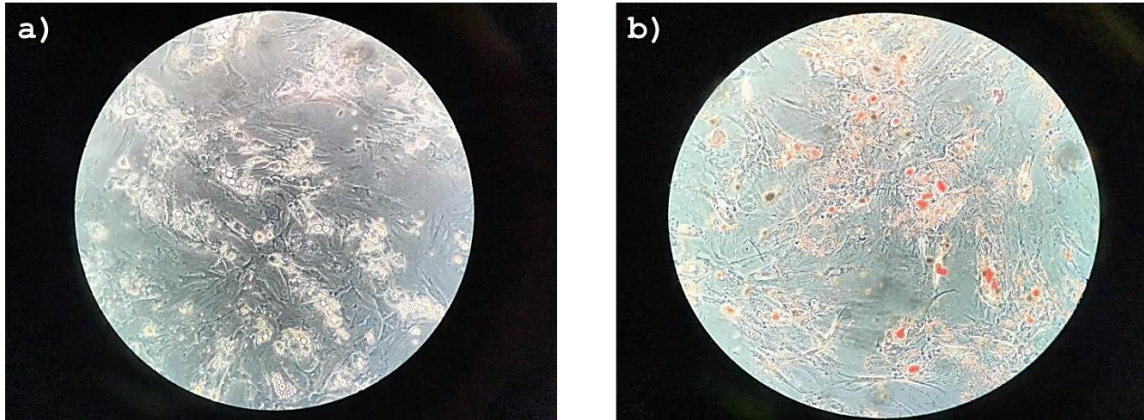


Figura 6.- Adipocitos maduros en medio de cultivo sin tinción (a) y con tinción con rojo oleoso (b).

Debido a que las HDL se aíslan sólo hasta que las células eran estimuladas, el análisis de las subpoblaciones está en proceso. En la figura 7 se presenta la distribución relativa de las subpoblaciones de HDL así como su contenido de colesterol y triacilglicérols de algunas muestras del grupo SICA y grupo control.

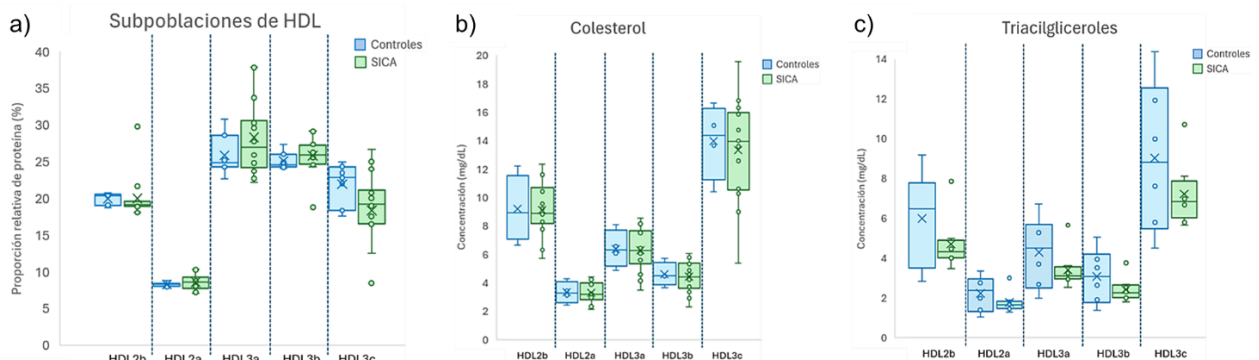


Figura 7.- (a) Proporción de las subpoblaciones de HDL. Concentración de colesterol total (b) y de triacilglicérols (c) de las HDL usadas para estimular los adipocitos maduros en cultivo (n total=15).

Hasta el momento se ha logrado el aislamiento de RNA de 15 pozos de células estimuladas con HDL de sujetos control o con SICA, hemos realizado la generación de cDNA, el cual ha sido almacenado para su posterior uso en los ensayos de qPCR.

Discusión

En el presente proyecto logramos obtener y realizar el perfil de lípidos de todas las muestras de los pacientes con SICA y los sujetos control propuestos. Además, realizamos la estandarización de las condiciones de amplificación para las isoformas del gen *SPP1*. El cultivo y la diferenciación de adipocitos realizadas permitió contribuir en la realización de un artículo original que actualmente se encuentra en revisión. Finalmente, sólo algunas HDL de pacientes SICA y sujetos control han sido caracterizadas.

Los niveles menores de colesterol plasmático observados en los pacientes con SICA puede deberse al consumo de estatinas, un fármaco común en este tipo de pacientes. En concordancia, los niveles de colesterol-HDL también fueron menores en comparación con el grupo control. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado una relación negativa entre el riesgo de desarrollar enfermedad aterosclerosa coronaria y la concentración de colesterol-HDL. En este sentido, la hipoalfalipoproteinemia presentada en el grupo SICA es consistente con todos esos estudios. Debido a que las HDL pueden ser modificadas en diferentes enfermedades, la sola determinación del colesterol en estas lipoproteínas no es suficiente. Por tal motivo, realizamos la determinación de los triacilgliceroles y no observamos cambios significativos entre el grupo SICA y el grupo control. La composición y distribución de las subclases de HDL aparentemente es similar entre ambos grupos, los resultados presentados sólo fueron descriptivos ya que el proyecto todavía no es concluido. La importancia de caracterizar la estructura de las HDL radica en identificar si las subclases pueden regular de manera diferencial la expresión génica del gen *SPP1*.

La secuencia del gen *SPP1* se caracteriza por tener un contenido elevado de citosinas y guaninas, lo que representó un reto para el diseño de las sondas de cada isoforma. A pesar de que el análisis en Primer Blast indicó que nuestras sondas identificaban específicamente cada isoforma, el análisis de los productos generados por PCR presentó más de un amplicón para cada isoforma. Cambios en la concentración de MgCl₂, temperatura, concentración de cDNA y sondas fueron realizados para mejorar la especificidad. Sin embargo, al menos un amplicón inespecífico continuaba presente. Diversos estudios a nivel de cáncer han reportado sondas para algunas isoformas del gen *SPP1*, pero al realizar el análisis con Primer Blast no todas resultaron específicas. Cambios en las condiciones de amplificación y en las concentraciones de las sondas fueron realizados y se logró obtener un amplicón para cada isoforma, los cuales serán utilizados para los ensayos de expresión génica.

El estudio de tejido adiposo se ha centrado en los adipocitos, principal tipo celular de este tejido. Para ello, los estudios *in vitro* han utilizado preferencialmente el uso de líneas celulares como la 3T3-L1 que son de ratón y los han diferenciado a adipocitos maduros. Sin embargo, existe una variabilidad entre los diferentes depósitos de tejido adiposo visceral que no puede ser ignorada. Por esta razón, se adquirieron dos lotes comerciales de preadipocitos cardiacos humanos, pero lamentablemente no fueron viables. Uno de los problemas de los cultivos primarios es justo su viabilidad, no siempre son resistentes al proceso de congelación. De esta manera, diseñamos un modelo de adipocitos cardiacos de conejo como un primer

acercamiento a lo que podría ocurrir en el TAE de humanos. Nuestro modelo fue reproducible e incluso permitió su uso en otro proyecto en el cual fui partícipe y generó un artículo original que actualmente se encuentra en revisión en Cells, MDPI.

Las células precursoras se diferenciaron en adipocitos maduros en aproximadamente un 75% y actualmente se está realizando la estimulación de las células con las HDL aisladas de los pacientes SICA y el grupo control.

Conclusiones

Es necesario terminar el estudio para generar una conclusión certera en torno a la hipótesis planteada.

Podemos comentar que los resultados obtenidos parcialmente hasta el momento sugieren que los cambios en la concentración de colesterol-HDL entre los pacientes con SICA y los sujetos control podrían presentar diferencias en las subclases de HDL que impactarían en su potencial para regular la expresión génica en adipocitos cardiacos, como hemos expuesto en el artículo original del cual fui partícipe.

Referencias Bibliográficas:

- [1] Luna-Luna M, Niesor E, Pérez-Méndez Ó. HDL as Bidirectional Lipid Vectors: Time for New Paradigms. *Biomedicines*. 2022; 10: 1180.
- [2] Pérez-Méndez Ó, Pacheco HG, Martínez-Sánchez C, Franco M. HDL-cholesterol in coronary artery disease risk: function or structure? *Clin Chim Acta*. 2014; 429: 111-122.
- [3] von Eckardstein A, Huang Y, Assmann G. Physiological role and clinical relevance of high density lipoprotein subclasses. *Curr Opin Lipidol*. 1994; 5: 404-416.
- [4] Luna-Luna M, Cruz-Robles D, Ávila-Vanzzini N, Herrera-Alarcón V, Martínez-Reding J, Criales Vera S, Sandoval-Zárate J, Vargas-Barrón J, Martínez-Sánchez C, Tovar-Palacio AR, Fragoso JM, Carreón-Torres E, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez Ó. Differential expression of osteopontin, and osteoprotegerin mRNA in epicardial adipose tissue between patients with severe coronary artery disease and aortic valvular stenosis: association with HDL subclasses. *Lipids Health Dis*. 2017; 16: 156.
- [5] Luna-Luna M, Zentella-Dehesa A, Pérez-Méndez Ó. Epicardial Adipose Tissue in the Progression and Calcification of the Coronary Artery Disease. In: Tappia, P.S., Bhullar, S.K., Dhalla, N.S. (eds) *Biochemistry of Cardiovascular Dysfunction in Obesity*. *Advances in Biochemistry in Health and Disease*, 2020, vol 20. Springer, Cham.
- [6] Silaghi A, Piercecchi-Marti MD, Grino M, Leonetti G, Alessi MC, Clement K, Dadoun F, Dutour A. Epicardial adipose tissue extent: relationship with age, body fat distribution, and coronaropathy. *Obesity (Silver Spring)*. 2008; 16: 2424-2430.
- [7] de Feyter PJ. Epicardial adipose tissue: an emerging role for the development of coronary atherosclerosis. *Clin Cardiol* 2011; 34: 143–144.
- [8] de Vos AM, Prokop M, Roos CJ, Meijjs MF, van der Schouw YT, Rutten A, Gorter PM, Cramer MJ, Doevendans PA, Rensing BJ, Bartelink ML, Velthuis BK, Mosterd A, Bots ML. Peri-coronary epicardial adipose tissue is related to cardiovascular risk factors and coronary artery calcification in post-menopausal women. *Eur Heart J*. 2008; 29: 777-783.
- [9] Ueno K, Anzai T, Jinzaki M, Yamada M, Jo Y, Maekawa Y, Kawamura A, Yoshikawa T, Tanami Y, Sato K, Kuribayashi S, Ogawa S. Increased epicardial fat volume quantified by 64-multidetector computed tomography is associated with coronary atherosclerosis and totally occlusive lesions. *Circ J*. 2009; 73: 1927-1933.
- [10] Creely SJ, McTernan PG, Kusminski CM, Fisher FM, Da Silva NF, Khanolkar M, Evans M, Harte AL, Kumar S. Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292: E740-E747.
- [11] Cheng KH, Chu CS, Lee KT, Lin TH, Hsieh CC, Chiu CC, Voon WC, Sheu SH, Lai WT. Adipocytokines and proinflammatory mediators from abdominal and epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease. *Int J Obes (Lond)*. 2008; 32: 268- 274.
- [12] Cesari M, Pessina AC, Zanchetta M, De Toni R, Avogaro A, Pedon L, Dorigatti F, Maiolino G, Rossi GP. Low plasma adiponectin is associated with coronary artery disease but not with hypertension in high-risk nondiabetic patients. *J Intern Med*. 2006; 260: 474-

483.

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

[14] Djaberri R, Schuijf JD, van Werkhoven JM, Nucifora G, Jukema JW, Bax JJ. Relation of epicardial adipose tissue to coronary atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 2008; 102: 1602- 1607.

[15] Kim BJ, Kang JG, Lee SH, Lee JY, Sung KC, Kim BS, Kang JH. Relationship of Echocardiographic Epicardial Fat Thickness and Epicardial Fat Volume by Computed Tomography with Coronary Artery Calcification: Data from the CAESAR Study. *Arch Med Res*. 2017; 48: 352-359.

[16] Luna-Luna M, Criales-Vera S, Medina-Leyte D, Díaz-Zamudio M, Flores-Zapata A, Cruz-Robles D, López-Meneses M, Olvera-Cruz S, Ramírez-Marroquín S, Flores- Castillo C, Fragoso JM, CarreónTorres E, Vargas-Barrón J, Vargas-Alarcón G, Pérez- Méndez Ó. Bone Morphogenetic Protein-2 and Osteopontin Gene Expression in Epicardial Adipose Tissue from Patients with Coronary Artery Disease Is Associated with the Presence of Calcified Atherosclerotic Plaques. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020; 13: 1943-1951.

[17] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6696>. Último acceso 25 junio 2022.

[18] Luna-Luna M, Medina-Urrutia A, Vargas-Alarcón G, Coss-Rovirosa F, Vargas-Barrón J, PérezMéndez Ó. Adipose Tissue in Metabolic Syndrome: Onset and Progression of Atherosclerosis. *Arch Med Res*. 2015; 46: 392-407.

[19] Wolak T. Osteopontin- A multi-modal marker and mediator in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis* 2014; 236: 327-337.

[20] Matsui Y, Rittling SR, Okamoto H, Inobe M, Jia N, Shimizu T, Akino M, Sugawara T, Morimoto J, Kimura C, Kon S, Denhardt D, Kitabatake A, Uede T. Osteopontin deficiency attenuates atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23: 1029-1034.

[21] Hirota S, Imakita M, Kohri K, Ito A, Morii E, Adachi S, Kim H-M, Kitamura Y, Yutani C, Nomura S. Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1993; 143: 1003-1007.

[22] Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, Yoshida M, Kusuhara M, Moroi M, Tada N, Ohsuzu F. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res*. 2002; 91: 77-82.

[23] Jono S, Peinado C, Giachelli CM. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*. 2000; 275: 20197-20203.

[24] Toledo-Ibelle P, García-Sánchez C, Ávila-Vazzini N, Carreón-Torres E, PosadasRomero C, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Enzymatic assessment of cholesterol on electrophoresis gels for estimating HDL size distribution and plasma concentrations of HDL subclasses. *J Lipid Res* 2010; 51: 1610-1617.

[25] Juárez-Meavepeña M, Carreón-Torres E, López-Ororio C, García-Sánchez C, Gamboa

R, Torres-Tamayo M, Fragoso JM, Rodríguez-Pérez JM, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. The *Srb1*+1050T Allele Is Associated with Metabolic Syndrome in Children but Not with Cholesteryl Ester Plasma Concentrations of High-Density Lipoprotein Subclasses. *Metab Syndr Relat Disord* 2012; 10: 110-116.

[26] García-Sánchez C, Torres-Tamayo M, Juárez-Meavepeña M, López-Osorio C, Toledo-Ibelle P, Monter-Garrido M, Cruz-Robles D, Carreón-Torres E, Vargas-Alarcón G, Pérez-Méndez O. Lipid plasma concentrations of HDL subclasses determined by enzymatic staining on polyacrylamide electrophoresis gels in children with metabolic syndrome. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 292-298.