

División Académica de Ciencias de la Salud



**“Análisis del estado de metilación en la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles”**

**Tesis para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencias Biomédicas**

**Presenta:**

**Rosa Giannina Castillo Avila**

**Directores:**

**Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárata**

**Dr. José Manuel Rodríguez Pérez**

**Villahermosa, Tabasco.**

**Marzo 2020.**

# OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



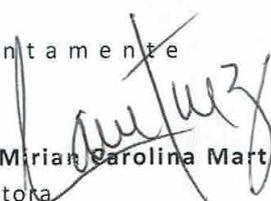
Of. No. 0237/DACS/JAEP  
04 de marzo de 2020

ASUNTO: Autorización impresión de tesis

**C. Rosa Giannina Castillo Avila**  
Maestría en Ciencias Biomédicas  
Presente

Comunico a Usted, que ha sido autorizada por el Comité Sinodal, integrado por los profesores investigadores Dr. Jorge Luis Blé Castillo, M. en C. Thelma Beatriz González Castro, Dra. Isela Esther Juárez Rojop, Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate y Dra. Alejandra Anlehu Tello, impresión de la tesis titulada: **"Análisis del estado de metilación en la región promotora del gen SORT1 en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles"**, para sustento de su trabajo recepcional de la Maestría en Ciencias Biomédicas, donde fungen como Directores de Tesis el Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate y el Dr. José Manuel Rodríguez Pérez.

A t e n t a m e n t e

  
Dra. Miriam Carolina Martínez López  
Directora



C.c.p.- Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zarate.- Director de Tesis  
C.c.p.- Dr. José manuel Rodríguez Pérez - Director de Tesis  
C.c.p.- Dr. Jorge Luis Blé Castillo - Sinodal  
C.c.p.- M. en C. Thelma Beatriz González Castro.- Sinodal  
C.c.p.- Dra. Isela Esther Juárez Rojop Sinodal  
C.c.p.- Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate.- Sinodal  
C.c.p.- Dra. Alejandra Anlehu Tello - Sinodal

C.c.p.- Archivo  
DC'MCML/MO'MACA/lkrd\*

Miembro CUMEX desde 2008  
Consorcio de  
Universidades  
Mexicanas  
UNA DE LAS INSTITUCIONES DE EDUCACIÓN SUPERIOR

Av. Cmel. Gregorio Méndez Magaña, No. 2838-A,  
Col. Tamulté de las Barrancas,  
C.P. 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco

Tel.: (993) 3581500 Ext. 6314. e-mail: posgrado.dacs@ujat.mx

[www.dacs.ujat.mx](http://www.dacs.ujat.mx)

 DIFUSION DACS

 DIFUSION DACS OFICIAL

 @DACSDIFUSION

# ACTA DE REVISIÓN DE TESIS



**UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO**

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

Jefatura del  
Área de Estudios  
de Posgrado



## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la ciudad de Villahermosa Tabasco, siendo las 10:30 horas del día 05 del mes de febrero de 2020 se reunieron los miembros del Comité Sinodal (Art. 71 Núm. III Reglamento General de Estudios de Posgrado vigente) de la División Académica de Ciencias de la Salud para examinar la tesis de grado titulada:

**"Análisis del estado de metilación en la región promotora del gen SORT1 en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles"**

Presentada por el alumno (a):

Castillo Avila Rosa Giannina  
Apellido Paterno Materno Nombre (s)  
Con Matrícula

1	8	1	E	5	7	0	0	8
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al Grado de:

### Maestro en Ciencias Biomédicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACIÓN DE LA TESIS** en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### COMITÉ SINODAL

Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate

Dr. José Manuel Rodríguez Pérez  
Directores de Tesis

Dr. Jorge Luis Bla Castillo

M. en C. Thelma Beatriz González Castro

Dra. Isela Esther Juárez Rojop

Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate

Dra. Alejandra Anlehu Tello

C.e.p.- Archivo  
DC/MCML/MO/MACA/lkrd\*

Miembro CUMEX desde 2008  
Consortio de  
Universidades  
Mexicanas  
UNA FUNDACIÓN ENLACE POR LAS GENERACIONES

Av Ornel. Gregorio Méndez Magaña, No. 2834-A,  
Col. Tamulté de las Barrancas,  
C.P. 86150, Villahermosa, Centro, Tabasco  
Tel.: (993) 2581500 Ext. 6314, e-mail: posgrado.dacs@ujat.mx

www.dacs.ujat.mx

DIFUSION DACS

DIFUSION DACS OFICIAL

@DACSDIFUSION

# CARTA DE CEDE DE DERECHOS



UNIVERSIDAD JUÁREZ  
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



División  
Académica  
de Ciencias de  
la Salud

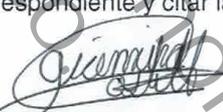
Dirección



## Carta de Cesión de Derechos

En la ciudad de Villahermosa Tabasco el día 10 del mes de enero del año 2020, el que suscribe, Rosa Giannina Castillo Avila, alumno del programa de la Maestría en Ciencias Biomédicas, con número de matrícula 181E57008 adscrito a la División Académica de Ciencias de la Salud, manifiesta que es autor intelectual del trabajo de tesis titulada: **"Análisis del estado de metilación en la región promotora del gen SORT1 en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles"**, bajo la Dirección del Dr. Carlos Alfonso Tovilla Zárate y el Dr. José Manuel Rodríguez Pérez, Conforme al Reglamento del Sistema Bibliotecario Capítulo VI Artículo 31. El alumno cede los derechos del trabajo a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficos o datos del trabajo sin permiso expreso del autor y/o director del trabajo, el que puede ser obtenido a la dirección: [juli\\_pasat@hotmail.com](mailto:juli_pasat@hotmail.com). Si el permiso se otorga el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Rosa Giannina Castillo Avila

Nombre y Firma

DIVISIÓN ACADÉMICA DE  
CIENCIAS DE LA SALUD



JEFATURA DEL ÁREA DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO

Sello

Av. Universidad s/n, Zona de la Cultura, Col. Magisterial, C.P. 86040 Villahermosa, Tabasco  
Tel. (993) 358.15.00 Ext. 6134

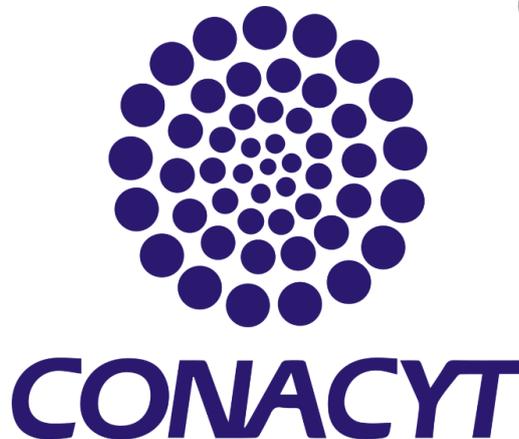
## RECONOCIMIENTO A LAS INSTITUCIONES PARTICIPANTES



Este proyecto fue realizado en las instalaciones del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, en el laboratorio de Genómica del Departamento de Biología Molecular.

Dirección: Dr. José Manuel Rodríguez Pérez.

La muestra obtenida para este estudio proviene de la Cohorte GEA “Genética de la Enfermedad Aterosclerosa”.



Alumna becaria del programa PNPC CONACYT

## DEDICATORIAS

**A todos los que siempre creyeron en mí y me impulsaron a emprender este gran camino lleno de retos y aprendizaje...**

***“La investigación de las enfermedades ha avanzado tanto que es cada vez más difícil encontrar a alguien que esté completamente sano”***

**Aldous Huxley.**

## AGRADECIMIENTOS

¡Gracias a Dios por la bendición de concluir esta maravillosa etapa!

Gracias a mis padres y hermanos por ser mi motor cada día.

Gracias al Dr. Tovilla por darme la oportunidad, confianza y amistad incondicional. Le agradezco por considerarme parte de su gran equipo de trabajo.

Gracias al Dr. José y la Dra. Nonanzit por recibirme en su laboratorio y hacerme sentir como en casa.

Gracias a la Dra. Isela, el Dr. Pedro, la Mtra. Vero, la Dra. Lilia, el Dr. Villar, el Dr. Fragoso, el Mtro. Hugo, la Dra. Posadas y el Dr. Gilberto por sus enseñanzas, apoyo y por ser parte importante de este logro.

Gracias especialmente al Laboratorio de Genómica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" por esa extraordinaria experiencia. Además, agradezco a todos mis compañeros y amigos de ambos laboratorios de Genómica: Cardiología y DAMC.

Gracias a Christian, Maloy y Antonio por apoyarme en este gran sueño.

¡No tengo palabras para expresar mi gratitud hacia Dios, hacia la vida y hacia cada persona especial que él coloca en este gran camino llamado vida!

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIAS.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	II
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	X
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Anatomía del corazón.....	3
2.1.1 Anatomía de las arterias coronarias.....	7
2.1.2 Anatomía y función de la pared vascular.....	8
2.2 Epidemiología.....	10
2.2.1 Generalidades de las enfermedades cardiovasculares.....	13
2.3 Enfermedad arterial coronaria.....	13
2.3.1 Fisiopatología/fisiopatogenia de la enfermedad arterial coronaria.....	14
2.3.2 Clasificación de la enfermedad arterial coronaria.....	17
2.3.3 Cuadro clínico.....	18
2.4 Factores de riesgo cardiovascular.....	20
2.4.1 Factores de riesgo modificables.....	21
2.4.2 Factores de riesgo no modificables.....	28

2.4.3 Calcio Arterial Coronario: factor de riesgo emergente.....	32
2.5 Aterosclerosis subclínica.....	35
2.6 Antecedentes particulares del proyecto.....	36
2.6.1 Epigenética.....	36
2.6.2 Principales mecanismos epigenéticos.....	37
2.7 Metilación del ADN.....	39
2.7.1 Metilación del ADN en enfermedades.....	43
2.7.2 Metilación en la región promotora de enfermedades cardiovasculares.....	44
2.8 Gen SORTILIN 1 (SORT1).....	45
2.8.1 Gen SORT1 y enfermedad arterial coronaria.....	49
3. ANTECEDENTES.....	53
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	54
4.1 Pregunta de investigación.....	55
5. JUSTIFICACIÓN.....	56
6. OBJETIVOS.....	59
6.1 Objetivo General.....	59
6.2 Objetivos Específicos.....	59
7. HIPÓTESIS.....	61
8. METODOLOGÍA.....	62
8.1 Diseño del estudio.....	62
8.2 Población de estudio.....	62
8.3 Muestra.....	62

8.4 Criterios de inclusión y exclusión.....	63
8.4.1 Criterios de inclusión generales para los tres grupos.....	63
8.4.2 Criterios de inclusión específicos para el grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria.....	64
8.4.3 Criterios de inclusión específicos para el grupo de aterosclerosis subclínica.....	64
8.4.4 Criterios de inclusión específicos para el grupo control.....	64
8.4.5 Criterios de exclusión en los tres grupos.....	64
8.5 Método de muestreo.....	65
8.6 Cálculo del tamaño de la muestra.....	65
8.7 Procedencia de los sujetos.....	66
8.8 Operacionalización de las variables.....	67
8.9 Recolección de datos y/o información.....	68
8.9.1 Entrevista e información sociodemográfica.....	68
8.9.2 Examen físico.....	69
8.9.3 Análisis de laboratorio.....	69
8.9.4 Detección de calcio coronario.....	70
8.10 Descripción operativa.....	70
8.10.1 Extracción del ADN.....	70
8.10.2 Cuantificación del ADN.....	71
8.10.3 Conversión del ADN con bisulfito.....	71
8.10.4 PCR para pirosecuenciación.....	71
8.10.5 Geles de agarosa.....	72

8.10.6 Pirosecuenciación.....	73
8.11 Análisis estadístico.....	74
8.12 Consideraciones éticas y legales.....	75
9. RESULTADOS.....	76
9.1 Características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas de los pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.....	76
9.2 Determinación del estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.....	78
9.3 Comparación de las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.....	80
9.4 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> con las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.....	81
9.5 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> con las medidas bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria.....	83
9.6 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> con las medidas bioquímicas y metabólicas en sujetos con aterosclerosis subclínica..	85
9.7 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen <i>SORT1</i> con el Calcio Arterial Coronario en pacientes con enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica.....	86

10. DISCUSIÓN.....	87
11. CONCLUSIÓN.....	92
12. PERSPECTIVAS.....	93
13. REFERENCIAS.....	94
14. ANEXOS.....	107
Anexo 1. Consentimiento informado controles (investigación bioquímica y tomográfica).....	107
Anexo 2. Consentimiento informado pacientes (investigación bioquímica y tomográfica).....	110
Anexo 3. Consentimiento informado pacientes (investigación genética).....	113
Anexo 4. Extracción del ADN.....	116
Anexo 5. Conversión de ADN con bisulfito.....	118
Anexo 6. PCR para pirosecuenciación.....	121
Anexo 7. Geles de agarosa.....	122
Anexo 8. Pirosecuenciación.....	124
Anexo 9. Producto final y evidencia.....	128

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de la enfermedad arterial coronaria.....	17
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de la puntuación de calcio en la arteria coronaria según la gravedad del compromiso aterosclerótico.....	33
<b>Tabla 3.</b> Operacionalización de las variables.....	67
<b>Tabla 4.</b> Primers empleados para PCR.....	72
<b>Tabla 5.</b> Comparación de las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas de los grupos de estudio.....	76
<b>Tabla 6.</b> Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas.....	82
<b>Tabla 7.</b> Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria y medidas bioquímicas y metabólicas.....	84
<b>Tabla 8.</b> Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de aterosclerosis subclínica y las medidas bioquímicas y metabólicas.....	85
<b>Tabla 9.</b> Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo control y aterosclerosis subclínica y el Calcio Arterial Coronario.....	86
<b>Figura 1.</b> Localización del corazón en el cuerpo humano.....	3
<b>Figura 2.</b> Vista posterior del corazón.....	5
<b>Figura 3.</b> Vista anterior del corazón.....	5
<b>Figura 4.</b> Vista anteroventral de los tabiques, aurículas y ventrículos.....	6
<b>Figura 5.</b> Anatomía de las arterias coronarias.....	7
<b>Figura 6.</b> Estructura de las capas de las arterias.....	8
<b>Figura 7.</b> Estructura de la pared vascular.....	9

<b>Figura 8.</b> Tres principales causas de muerte total y por sexo en México.....	11
<b>Figura 9.</b> Tasa de defunciones registradas por enfermedades del corazón en México 2008-2017 (por cada 10,000 habitantes).....	11
<b>Figura 10.</b> Defunciones por enfermedades del corazón en México. Cifras y porcentajes obtenidos del total de muertes ocasionadas por enfermedades del corazón (141,619 casos).....	12
<b>Figura 11.</b> Fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria.....	16
<b>Figura 12.</b> Signos y síntomas de la enfermedad arterial coronaria.....	18
<b>Figura 13.</b> Posibles áreas de dolor durante un ataque al corazón.....	20
<b>Figura 14.</b> Daño al miocardio posterior a la oclusión en las arterias coronarias.....	20
<b>Figura 15.</b> Factores de riesgo modificables y no modificables.....	21
<b>Figura 16.</b> Desarrollo de la aterosclerosis subclínica.....	35
<b>Figura 17.</b> Principales mecanismos epigenéticos.....	38
<b>Figura 18.</b> Represión de la expresión de genes por metilación.....	41
<b>Figura 19.</b> Localización del gen <i>SORT1</i> en el cromosoma 1.....	45
<b>Figura 20.</b> Conformación estructural de sortilina.....	47
<b>Figura 21.</b> Estructura de sortilina en la célula.....	47
<b>Figura 22.</b> Papel de los receptores de dominio Vps10p en el tráfico intracelular de proteínas.....	49
<b>Figura 23.</b> Sortilina y riesgo cardiovascular.....	50
<b>Figura 24.</b> Diseño metodológico del estudio.....	65
<b>Figura 25.</b> Esquema de la cascada de pirosecuenciación.....	73
<b>Figura 26.</b> Pirograma de muestras del grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica.....	78
<b>Figura 27.</b> Pirograma de sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de un paciente del grupo de enfermedad arterial coronaria.....	79

**Figura 28.** Pirograma de sitios CpG1 y CpG2 del grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica.....79

**Figura 29.** Medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2 y CpG3 de la región promotora del gen *SORT1* en el grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (subclínicos).....80

**Figura 30.** Medias de metilación de los sitios CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en el grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (subclínicos).....81

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**CIE-10:** Clasificación Internacional de Enfermedades

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono

**DNMT:** ADN Metiltransferasa

**EAC:** Enfermedad Arterial Coronaria

**ECV:** Enfermedad Cardiovascular

**GEA:** Genética de la Enfermedad Aterosclerosa

**HDL:** Lipoproteína de alta densidad (por sus siglas en inglés)

**HTA:** Hipertensión Arterial

**IM:** Infarto al miocardio

**IMC:** Índice de Masa Corporal

**LDL:** Lipoproteína de baja densidad (por sus siglas en inglés)

**MET:** Unidad de medida del Índice Metabólico (cantidad de energía que consume un individuo en reposo)

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**ON:** Óxido Nítrico

**PA:** Presión Arterial

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SICA:** Síndrome Isquémico Coronario Agudo

**SORT1:** Gen que codifica a la proteína sortilina

**TC:** Colesterol total (por sus siglas en inglés)

**UH:** Unidad de Hounsfield

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

**Agarosa:** es un polisacárido que se utiliza en electroforesis, cromatografía y otras técnicas de biología molecular.

**Aterosclerosis:** formación de placas (ateromas) en la parte íntima de las arterias.

**Aterosclerosis subclínica:** se define como la fase preclínica o asintomática de la aterosclerosis.

**Epigenética:** se refiere a los cambios en el ADN que no alteran la secuencia de nucleótidos, pero que afectan el fenotipo y la expresión génica.

**Gen:** es la unidad física básica de la herencia.

**Metilación:** principal mecanismo epigenético que consiste en añadir un grupo metilo al ADN, en el quinto carbono de los dinucleótidos de citosina, fosfato, guanina, denominados sitios CpG.

**Monocito:** es un tipo de glóbulo blanco agranulocito y su principal función es fagocitar.

**Pirosecuenciación:** es una técnica novedosa que permite determinar el orden de una secuencia de ADN a través de luminiscencia.

**Quimiotaxis:** es un mecanismo mediante el que las células se mueven como respuesta a un estímulo químico.

**Región promotora:** es una región de ADN que controla el inicio de la transcripción de una determinada porción del ADN.

**Sortilina:** proteína codificada por el gen *SORT1*.

**Trombo:** es un coágulo de sangre que se forma dentro de un vaso sanguíneo.

## RESUMEN

**Introducción:** La enfermedad arterial coronaria es una enfermedad multifactorial y representa la primera causa de mortalidad en la población mexicana. **Objetivo:** Evaluar el estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles. **Material y métodos:** Estudio de casos y controles (90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, 91 sujetos con aterosclerosis subclínica y 90 controles) anidado al proyecto Genética de la Enfermedad Aterosclerosa (GEA), transversal, prospectivo y analítico. Se realizó en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" ubicado en la Ciudad de México, por muestreo a conveniencia. Se analizó la metilación de 6 sitios CpG de la región promotora del gen *SORT1* por la técnica de pirosecuenciación con el equipo PyroMarkQ24 (QIAGEN) y sondas específicas. **Resultados:** Se observaron correlaciones positivas entre la insulina y los sitios CpG1 ( $r=0.144$ ,  $p=0.018$ ), CpG2 ( $r= 0.135$ ,  $p= 0.026$ ), CpG3 ( $r= 0.165$ ,  $p= 0.007$ ), CpG4 ( $r=0.135$ ,  $p= 0.027$ ) y CpG5 ( $r= 0.149$ ,  $p= 0.015$ ); el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA) y los sitios CpG3 ( $r= 0.138$ ,  $p= 0.023$ ), CpG5 ( $r= 0.128$ ,  $p= 0.036$ ) y CpG6 ( $r= 0.125$ ,  $p= 0.040$ ) en los tres grupos. Posteriormente, se realizó el análisis por cada grupo de estudio y se observaron correlaciones solo en el grupo de pacientes con la insulina y los sitios CpG1 ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG2 ( $r= 0.295$ ,  $p= 0.005$ ), CpG3 ( $r= 0.3$ ,  $p= 0.003$ ), CpG4 ( $r= 0.289$ ,  $p= 0.006$ ), CpG5 ( $r= 0.296$ ,  $p= 0.005$ ) y CpG6 ( $r= 0.276$ ,  $p= 0.009$ ); así como entre el HOMA y los sitios CpG1 ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ), CpG2 ( $r= 0.242$ ,  $p= 0.022$ ), CpG3 ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG4 ( $r= 0.232$ ,  $p= 0.029$ ), CpG5 ( $r= 0.271$ ,  $p= 0.010$ ) y CpG6 ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ). **Conclusiones:** estos hallazgos sugieren que a mayor nivel de insulina y HOMA, mayor metilación en los pacientes con enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, son necesarios más estudios en otras poblaciones y las mediciones del gen en suero.

**Palabras clave:** Enfermedad arterial coronaria, pirosecuenciación, *SORT1*, PyroMarkQ24, metilación, región promotora

## ABSTRACT

**Introduction:** Coronary artery disease is a multifactorial disease and represents the main cause of mortality in the Mexican population. **Objective:** To assess the methylation status of the CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 and CpG6 sites of the promoter region of the *SORT1* gene in patients with coronary artery disease, subclinical atherosclerosis and controls. **Material and methods:** Case-control study (90 patients with coronary artery disease, 91 subjects with subclinical atherosclerosis and 90 controls) nested in the Genetics of Atherosclerosis Disease (GEA), transverse, prospective and analytical project. It was carried out at the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" located in Mexico City, for convenience sampling. The methylation of 6 CpG sites of the promoter region of the *SORT1* gene was analyzed by the pyrosequencing technique with the PyroMarkQ24 (QIAGEN) equipment and specific probes. **Results:** Positive correlations were observed between insulin and CpG1 sites ( $r=0.144$ ,  $p=0.018$ ), CpG2 ( $r= 0.135$ ,  $p= 0.026$ ), CpG3 ( $r= 0.165$ ,  $p= 0.007$ ), CpG4 ( $r=0.135$ ,  $p= 0.027$ ) y CpG5 ( $r= 0.149$ ,  $p= 0.015$ ); homeostatic insulin resistance model (HOMA) and CpG3 sites ( $r= 0.138$ ,  $p= 0.023$ ), CpG5 ( $r= 0.128$ ,  $p= 0.036$ ) and CpG6 ( $r= 0.125$ ,  $p= 0.040$ ) in the three groups. Subsequently, the analysis was performed for each study group and correlations were observed only in the group of patients with insulin and CpG1 sites ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG2 ( $r= 0.295$ ,  $p= 0.005$ ), CpG3 ( $r= 0.3$ ,  $p= 0.003$ ), CpG4 ( $r= 0.289$ ,  $p= 0.006$ ), CpG5 ( $r= 0.296$ ,  $p= 0.005$ ) and CpG6 ( $r= 0.276$ ,  $p= 0.009$ ); as well as between HOMA and CpG1 sites ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ), CpG2 ( $r= 0.242$ ,  $p= 0.022$ ), CpG3 ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG4 ( $r= 0.232$ ,  $p= 0.029$ ), CpG5 ( $r= 0.271$ ,  $p= 0.010$ ) and CpG6 ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ). **Conclusions:** these findings suggest that the higher the level of insulin and HOMA, the greater the methylation in patients with coronary artery disease. However, more studies in other populations and serum gene measurements are necessary.

**Keywords:** Coronary artery disease, pyrosequencing, *SORT1*, PyroMarkQ24, methylation, promoter region

# 1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) determina que aproximadamente el 31 % de las muertes totales a nivel mundial son ocasionadas por enfermedades cardiovasculares (Kishore et al., 2018).

La enfermedad arterial coronaria (EAC) pertenece a este grupo de padecimientos y es la primera causa de mortalidad en la población mexicana (Lopez-Bautista et al., 2017). Esta enfermedad afecta con prevalencia al sexo masculino y se incrementa considerablemente con la edad, sin embargo, la complejidad etiológica ocasionada por la suma de factores de riesgo genéticos y modificables, así como ambientales, representan una pequeña parte de la variabilidad de la enfermedad y la dificultad en la especificidad de los tratamientos (C. Posadas-Romero et al., 2017).

La literatura muestra una asociación entre los factores de riesgo modificables y no modificables y su contribución en la evolución del padecimiento. En este sentido, el calcio coronario es un indicador de la presencia de EAC. Al respecto, se reportó una asociación entre la calcificación de la arteria coronaria, la mortalidad y los eventos coronarios (Panh et al., 2017). En este sentido, se han propuesto diversos genes que podrían implicarse en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, existe poca información sobre la participación del gen *SORT1*, que codifica a la proteína sortilina y se expresa en el corazón y en otros tejidos humanos.

En la actualidad, la metilación del ADN es una marca epigenética muy estudiada, pero hay pocos estudios en la literatura que describan su comportamiento en regiones promotoras (reguladoras), como en el caso de

otras patologías, en las que la metilación aberrante del ADN da como resultado una alteración en la expresión de genes (Wan et al., 2018).

Debido a esto, el presente estudio tuvo como objetivo analizar el estado de metilación de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 2. MARCO TEÓRICO

El sistema cardiovascular se forma en las etapas tempranas del desarrollo humano. Por consiguiente, durante la embriogénesis y la vida postnatal realiza funciones críticas: suministrar el oxígeno y los nutrientes necesarios en apoyo a la actividad metabólica de los diversos tejidos. Además, interviene en la eliminación de productos de desecho (Mazurek et al., 2017).

### 2.1 Anatomía del corazón

El corazón es un órgano hueco, pesa aproximadamente entre 200 y 450 gramos y se localiza en el mediastino medio, entre el tercer y sexto cartílago costal (ver Figura 1). Tiene forma de pirámide invertida con una base y un ápice, una cara esternocostal o anterior, una cara diafragmática o posterior y una cara lateral izquierda correspondiente a la pared libre del ventrículo izquierdo (Buckberg, Nanda, Nguyen, & Kocica, 2018).

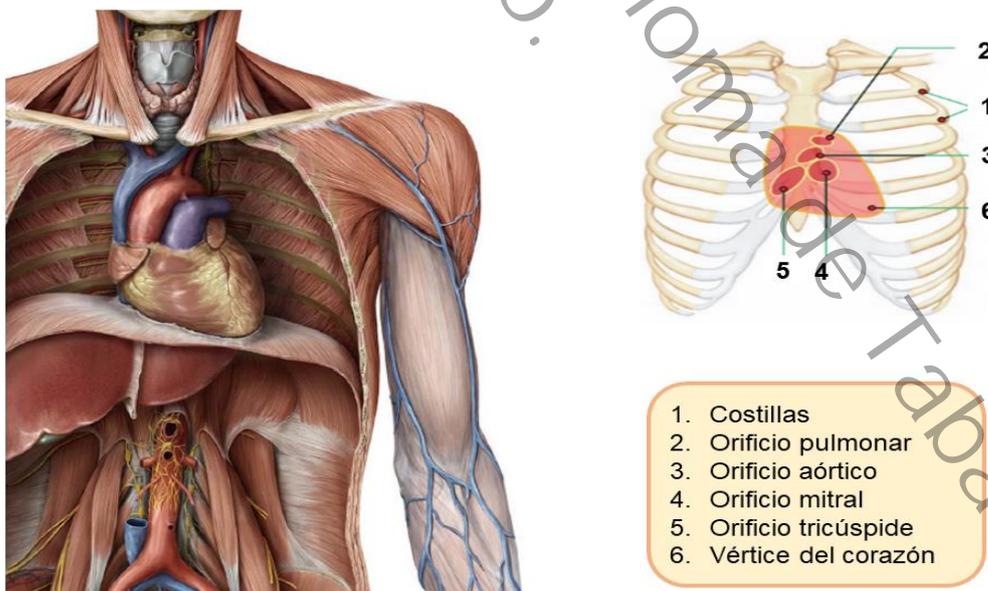


Figura 1. Localización del corazón en el cuerpo humano. Tomado y modificado de Atlas of Anatomy

Prometheus y Anatomía y fisiología del cuerpo humano (Gilroy Anne M, 2008).

Está conformado por un músculo con propiedades particulares que se denomina miocardio (mio=músculo y cardio=corazón). Las células llamadas cardiomiocitos constituyen el músculo cardíaco y poseen características especializadas (una forma más o menos rectangular de las células aisladas y una apariencia de estrías cruzadas) que le confieren la capacidad de contractilidad durante toda la vida (Ehler, 2016). La pared cardíaca vista desde el interior al exterior está constituida por tres capas: endocardio interno, miocardio grueso y epicardio externo. El endocardio está revestido por células endoteliales encargadas de mantener una superficie no trombogénica. El miocardio produce la fuerza necesaria para mover la sangre en cada contracción. El epicardio externo tiene la función de servir como una capa adicional de tejido conectivo y graso entre el corazón y el pericardio visceral seroso (Onwuka, King, Heuer, & Breuer, 2018; Rai, Sharma, Agrawal, & Agrawal, 2017).

Anatómicamente, el corazón está conformado por cuatro cavidades: dos cámaras superiores llamadas aurículas o átrios con paredes delgadas que actúan como reservorios y dos cámaras inferiores denominadas ventrículos (ver Figura 2) que reciben la sangre de las aurículas y la impulsan a las arterias. Las paredes ventriculares son más gruesas que las auriculares, sin embargo, el ventrículo izquierdo es la estructura cardíaca con mayor cantidad de tejido muscular (ver Figura 3), debido a que impulsa la sangre hacia la arteria aorta (Dini et al., 2019).

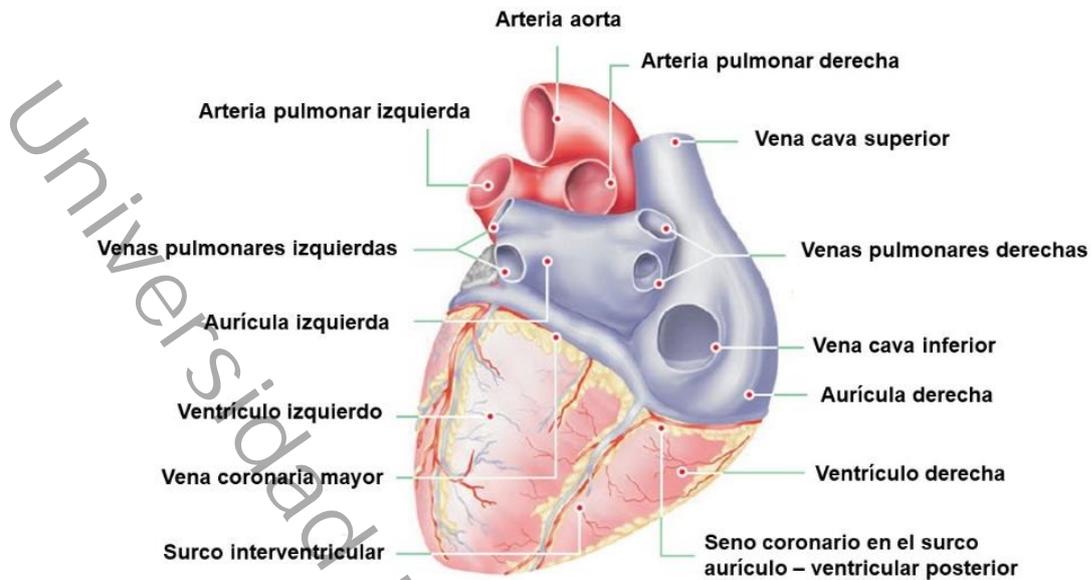


Figura 2. Vista posterior del corazón. Tomado y adaptado de Anatomía y fisiología del cuerpo humano (Barone LR, 2008).

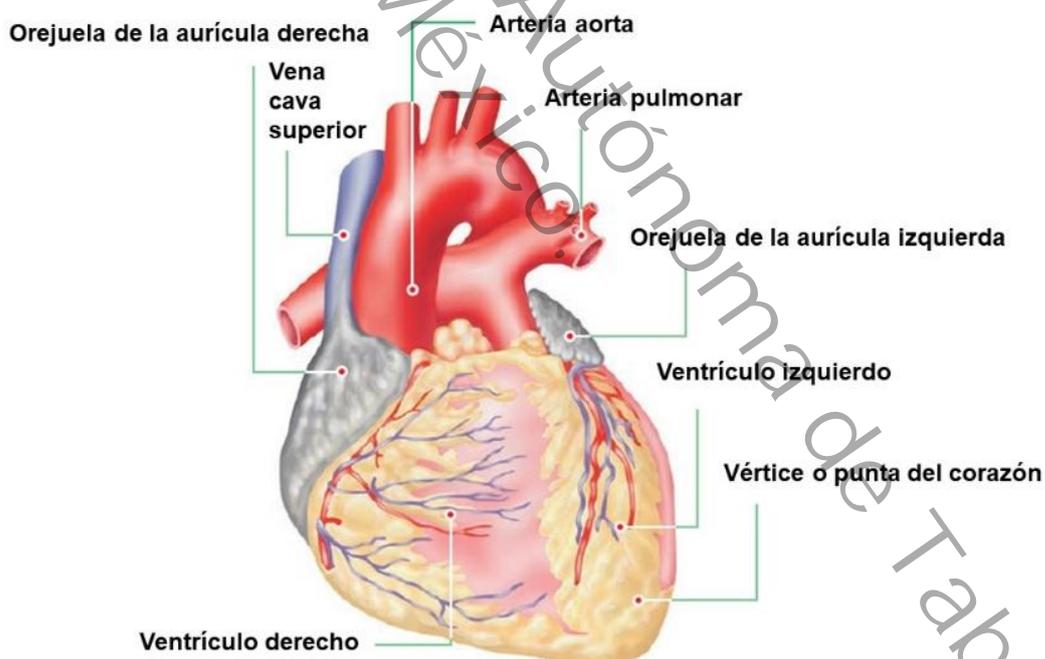


Figura 3. Vista anterior del corazón. Tomado y adaptado de Anatomía y fisiología del cuerpo humano (Barone LR, 2008).

Existen tabiques que dividen las estructuras cardiacas: auriculoventricular (divide las aurículas de los ventriculos), ventricular (divide a ambos

ventrículos), interauricular (divide a ambas aurículas) e interventricular (divide a ambos ventrículos) (Barone LR, 2008) (ver Figura 4).

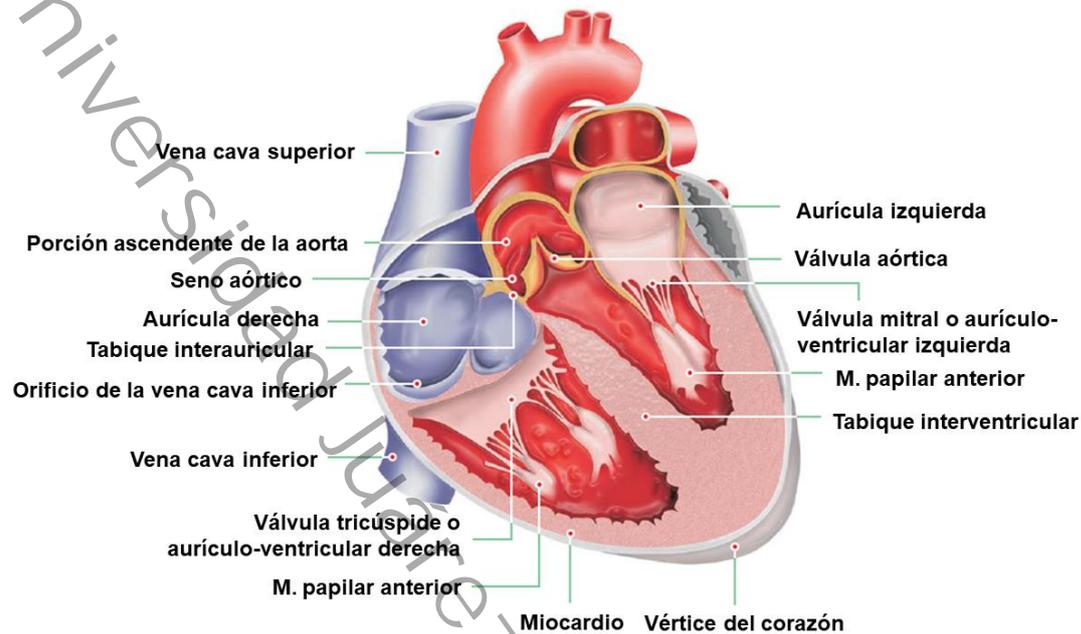


Figura 4. Vista anteroventral de los tabiques, aurículas y ventrículos. Tomado y adaptado de Anatomía y fisiología del cuerpo humano (Barone LR, 2008).

La aurícula derecha recibe la sangre rica en  $\text{CO}_2$  proveniente de las venas sistémicas y la transporta a través de la válvula tricúspide (tres valvas) al ventrículo derecho. Seguidamente, la sangre venosa (carboxigenada) se bombea a través de las válvulas semilunares por las arterias pulmonares hacia los pulmones para su posterior oxigenación y hematosis. Esta función es conocida como circulación menor o pulmonar.

Posteriormente, la aurícula izquierda recibe de las venas pulmonares la sangre rica en  $\text{O}_2$ , que recorre por la válvula mitral (bicúspide) hacia el ventrículo izquierdo para finalmente bombear la sangre arterial (rica en oxígeno) a todos los tejidos corporales, excepto a los pulmones. A este proceso se le denomina circulación mayor o sistémica (Gordan, Gwathmey, & Xie, 2015).

### 2.1.1 Anatomía de las arterias coronarias

La aorta es la principal arteria que transporta sangre al organismo. Las arterias coronarias son las encargadas de irrigar la sangre oxigenada al músculo cardiaco. En el corazón, la aorta se ramifica en dos principales vasos sanguíneos: el primero, la arteria coronaria derecha, se origina del seno coronario derecho e irriga la mitad derecha del miocardio (ver Figura 5). El segundo, la arteria coronaria izquierda, proviene del seno aórtico izquierdo, a partir de ahí, surge un tronco común “el tronco principal izquierdo” que da origen a la arteria coronaria circunfleja y arteria coronaria descendente anterior izquierda (Bo et al., 2018; Moosavi Tayebi et al., 2015).

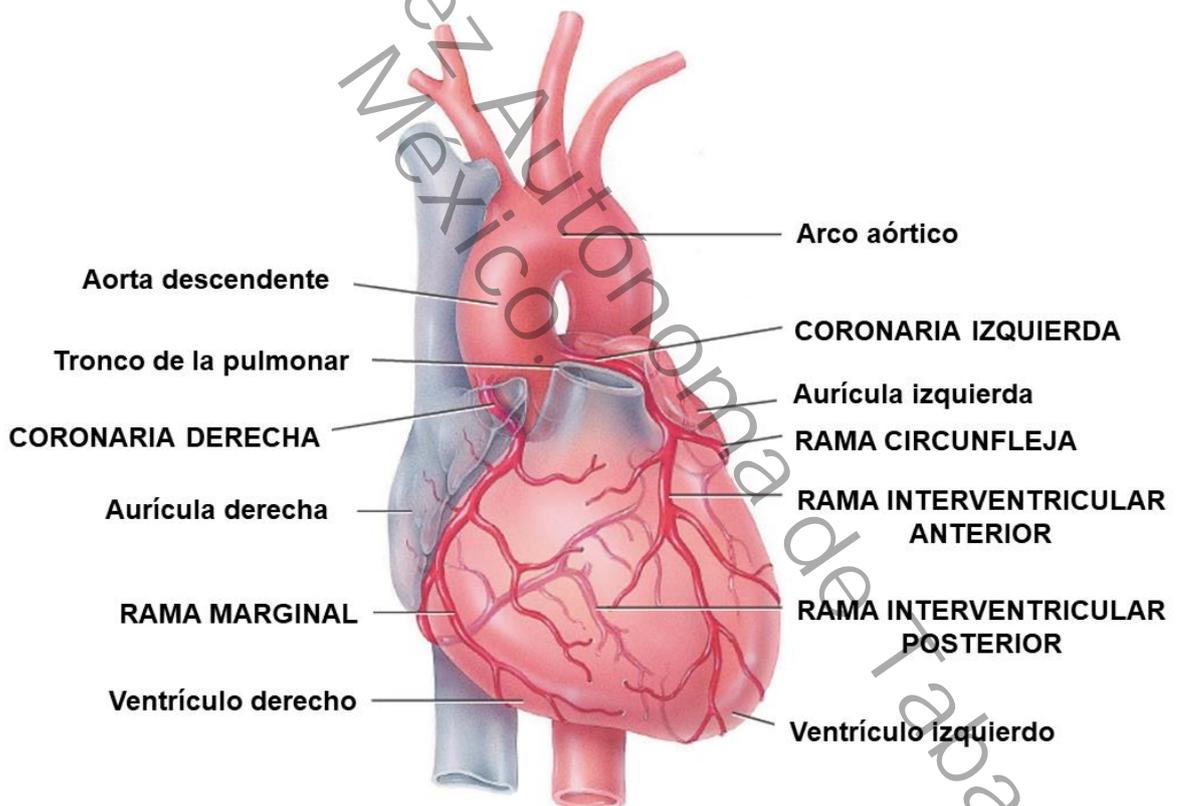


Figura 5. Anatomía de las arterias coronarias. Tomado y adaptado de Principios de Anatomía y fisiología, (Tortora J, 2014).

### 2.1.2 Anatomía y función de la pared vascular

Las arterias funcionan como vasos conductores y están constituidas estructuralmente por tres capas: la túnica íntima, túnica media y túnica adventicia (Mazurek et al., 2017) (ver Figura 6).

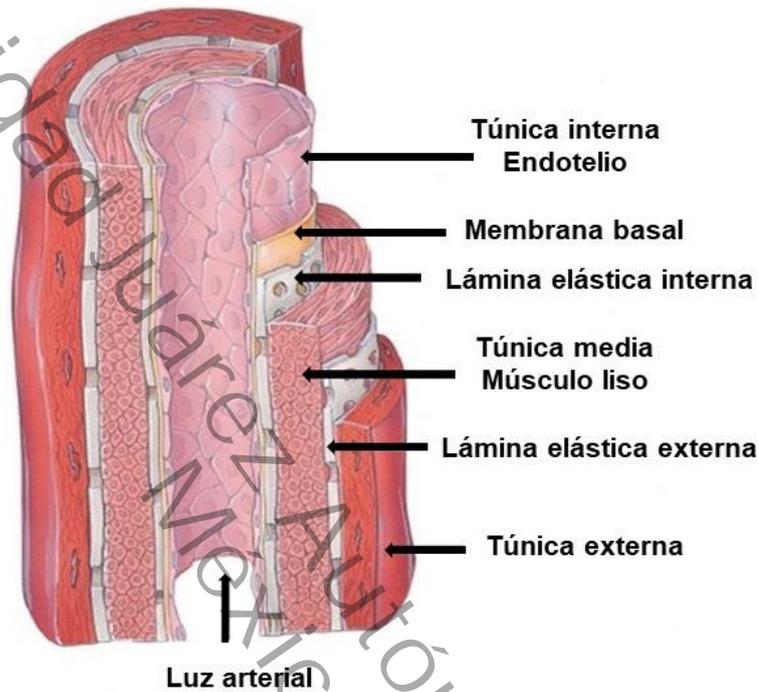


Figura 6. Estructura de las capas de las arterias. Tomado y adaptado de Principios de Anatomía y fisiología (Tortora J, 2014).

La capa más interna (túnica íntima), posee una única capa de células endoteliales y proporciona una superficie lisa para el flujo sanguíneo. La capa media (túnica media), está conformada por capas de elastina, colágeno y células de músculo liso para la dilatación o vasoconstricción vascular. La capa externa (túnica adventicia), está formada por fibras elásticas, colágeno y tejido conectivo para el soporte arterial (Jufri, Mohamedali, Avolio, & Baker, 2015; Rayner & Zheng, 2016) (ver Figura 7).

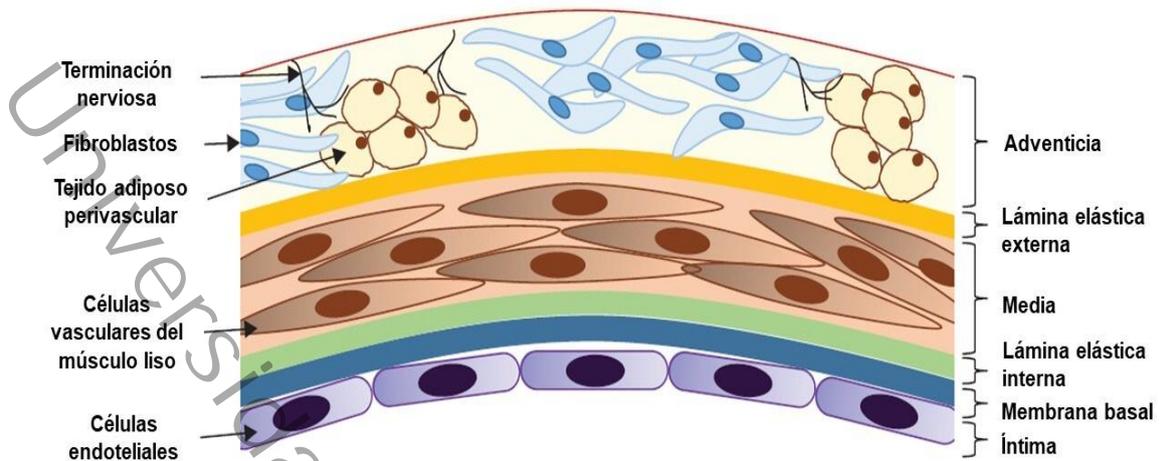


Figura 7. Estructura de la pared vascular. Tomado y adaptado (Marchio et al., 2019).

El endotelio es una barrera semipermeable con uniones intercelulares estrechas que regulan el paso de las moléculas a través de la pared vascular. Esta estructura es de gran importancia debido al mantenimiento del tono vascular a través de la liberación de factores vasodilatadores y vasoconstrictores, permeabilidad, regulación de la vascularización, preservación del estado antitrombótico, implicación en respuestas inflamatorias, inmunes y de homeostasis vascular. Además, el óxido nítrico (NO por sus siglas en inglés) se ve involucrado en la mayoría de las propiedades ateroprotectoras del endotelio (Marchio et al., 2019).

Las células endoteliales expresan una variación fenotípica dentro de la vasculatura, lo que ocasiona diversas respuestas biológicas al mismo estímulo que pueden repercutir en las células cercanas o adyacentes. La membrana basal parte de la matriz extracelular y se compone principalmente por diversos tipos de colágeno, proteoglicanos y fibronectina. Esta membrana brinda soporte mecánico y un entorno para la actividad de las moléculas y la interacción células. Los medios están constituidos principalmente de matriz extracelular y

células del músculo liso vascular. Existen dos fenotipos de células del músculo liso: el contráctil que es el más abundante y que puede cambiar su fenotipo bajo estímulos fisiopatológicos como la inflamación, al segundo el secretor (Marchio et al., 2019).

## **2.2 Epidemiología**

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de mortalidad y morbilidad a nivel mundial (Townsend, Nichols, Scarborough, & Rayner, 2015). En el año 2016, aproximadamente 18 millones de personas en el mundo fallecieron por este padecimiento. Esta cifra representa el 31% de las muertes globales y más de 39% (17 millones) de decesos en individuos menores de 70 años debido a comorbilidades por la enfermedad (Wicinski et al., 2018).

En el año 2011, la tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares de acuerdo al sexo en el mundo, fue de aproximadamente 181 a 281 mujeres y 363 a 443 hombres por cada 100,000 habitantes respectivamente (Mishra & Monica, 2019). Los países de ingresos bajos y medios contribuyen al 75% de la mortalidad por Enfermedades Cardiovasculares (Ruan et al., 2018).

En México, con base en cifras obtenidas por el INEGI, las enfermedades del corazón se han convertido en la primera causa de mortalidad en nuestro país (Rodriguez-Perez et al., 2018) (ver Figura 8 y Figura 9).

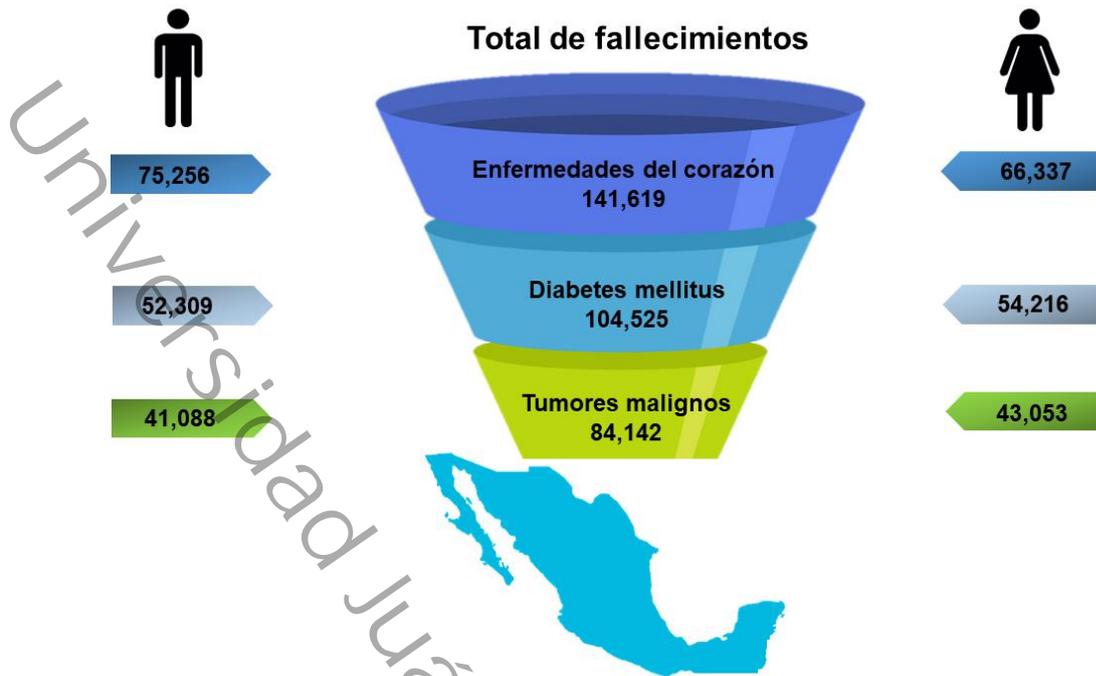


Figura 8. Tres principales causas de muerte total y por sexo en México. Fuente: INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017 (Comunicado de prensa). Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>



Figura 9. Tasa de defunciones registradas por enfermedades del corazón en México 2008-2017 (por cada 10,000 habitantes). Fuente: INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017 (Comunicado de prensa). Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>

La Enfermedad Arterial Coronaria es la más relevante de las enfermedades isquémicas (dentro de sus múltiples desenlaces incluye a la cardiopatía isquémica, debido a la aterosclerosis) es la mayor causa de mortalidad en los países industrializados, siendo más característica de este grupo de padecimientos (Khera & Kathiresan, 2017; Sharma, Chang, & Red-Horse, 2017).

Esta enfermedad afecta principalmente al sexo masculino y se incrementa de forma considerable con la edad. En México, su prevalencia aumentó desde el final de la primera mitad del siglo pasado, hasta convertirse en la primera causa de mortalidad entre la población (C. Posadas-Romero et al., 2017) (ver Figura 10). Además, las proyecciones hacia el año 2030, indican que la tendencia continuará en ascenso (Lopez-Bautista et al., 2017).

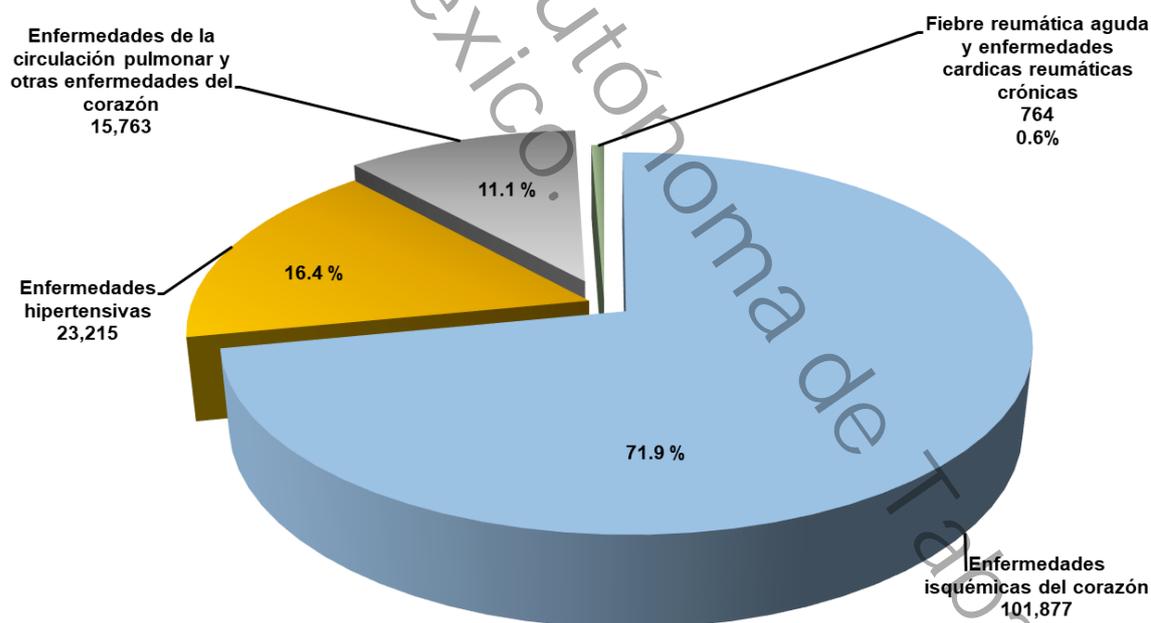


Figura 10. Defunciones por enfermedades del corazón en México. Cifras y porcentajes obtenidos del total de muertes ocasionadas por enfermedades del corazón (141,619 casos). Fuente: INEGI. Características de las defunciones registradas en México durante 2017 (Comunicado de prensa). Recuperado de: <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>

### **2.2.1 Generalidades de las enfermedades cardiovasculares**

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), enfermedades del corazón o enfermedades del sistema circulatorio, son un grupo de trastornos que involucran al sistema cardiovascular que incluyen el corazón, el pericardio y los vasos sanguíneos (Gonzalez-Castro et al., 2019; Jindal & Jindal, 2018). Están comprendidas en el capítulo IX entre los códigos 100-199 de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) (Evans-Meza, Perez-Fallas, & Bonilla-Carrion, 2019). Las principales Enfermedades Cardiovasculares son las siguientes: Enfermedad Arterial Coronaria, Enfermedad Arterial Periférica, Cardiopatías Congénitas y Enfermedad Cerebrovascular (Karunathilake & Ganegoda, 2018).

### **2.3 Enfermedad arterial coronaria**

La enfermedad arterial coronaria (EAC) es el tipo más común de enfermedad cardíaca y de acuerdo a la American Heart Association es la principal causa de eventos cardiovasculares (Mishra & Monica, 2019). Este padecimiento afecta con más frecuencia al sexo masculino y los síntomas de la enfermedad pueden aparecer 10 años más tarde en mujeres en comparación con los hombres (Ayatollahi, Gholamhosseini, & Salehi, 2019).

La EAC se caracteriza por la acumulación de lípidos en la pared de las arterias coronarias y conlleva a la formación de placa ateromatosa, disminuyendo el calibre arterial (Jindal & Jindal, 2018). Por consiguiente, se produce un bloqueo parcial o completo del suministro de sangre al miocardio (Karunathilake & Ganegoda, 2018) que conlleva a la aparición de eventos cardiovasculares agudos e infarto al miocardio (Emini Veseli et al., 2017).

A saber, la aterogénesis (formación de placa ateromatosa) es el resultado de la disfunción endotelial que involucra el estado trombótico y la inflamación vascular con vías patológicas (8). Las placas pueden permanecer estables y asintomáticas durante años mientras están intactas (Ouweneel, Verwilligen, & Van Eck, 2019). Sin embargo, pueden volverse inestables con rapidez y desencadenar la formación de trombos (Emini Veseli et al., 2017). Las placas avanzadas pueden ocasionar aterotrombosis y manifestarse de dos formas: ruptura de una lesión inestable o erosión superficial del endotelio. Las placas propensas a ruptura, se caracterizan por una capa fibrosa delgada con un núcleo lipídico grande y la presencia abundante de leucocitos inflamatorios. Por el contrario, las placas erosionadas con trombos superpuestos, presentan características más fibrosas y menos inflamatorias (Ouweneel et al., 2019).

Se ha demostrado que la acumulación de grasa (conocida como estría grasa) de la enfermedad inicia en la infancia. Sin embargo, el periodo de latencia es largo y comprende varios años, debido a ello, las manifestaciones clínicamente relevantes se presentan en adultos de mediana edad (Ayatollahi et al., 2019). Además, se ha descrito que los factores de riesgo promueven la activación endotelial y la inflamación vascular, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad (Ouweneel et al., 2019; Winzer, Woitek, & Linke, 2018).

### **2.3.1 Fisiopatología/fisiopatogenia de la enfermedad arterial coronaria**

La enfermedad arterial coronaria comienza con un proceso inflamatorio, en el que se produce una agresión a la pared vascular. Los factores de riesgo cardiovascular conducen a la activación endotelial por una producción disminuida de óxido nítrico, propiedades vasodilatadoras y antitrombóticas del

endotelio (Fioranelli et al., 2018). Seguidamente, las lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés) ingresan al espacio subendotelial en donde son oxidadas por las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y convertidas en lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL, por sus siglas en inglés). Esta oxidación produce quimiotaxis que promueve la expresión de moléculas de adhesión celular que atraen a los monocitos circulantes a la internalización al espacio subendotelial, para posteriormente diferenciarse en macrófagos (Antoniades, Antonopoulos, & Deanfield, 2019).

Los macrófagos comienzan a fagocitar a las oxLDL, a través de los receptores de superficie llamados scavengers, convirtiéndose en células espumosas que contribuyen a la formación de una estría grasa (Oppi, Luscher, & Stein, 2019).

Finalmente, la etapa tardía de la enfermedad involucra el desarrollo de la inflamación. En este proceso, intervienen células del músculo liso (SMC, por sus siglas en inglés) y linfocitos T activados, lo que resulta en una alta proliferación y posterior migración de SMC provenientes de la túnica media al espacio subendotelial (Emini Veseli et al., 2017). Las células migradas engrosan la pared arterial y la estría grasa evoluciona a una placa aterosclerótica estable. La remodelación estructural progresiva de las lesiones en desarrollo (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016) migración y proliferación de más SMC genera una capa fibrosa (Mimura & Itoh, 2015). Esta última, recubre un núcleo necrótico, derivado de la muerte celular apoptótica o necrótica de las células espumosas cargadas de lípidos, que contiene lipoproteínas oxidadas y cristales de colesterol y se acompaña de diversos grados de remodelación y calcificación de la matriz (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016; Marchio et al., 2019).

Durante su evolución, muchas placas desarrollan zonas de calcificación. La calcificación irregular se asocia con inestabilidad mecánica que puede promover la ruptura de la placa (Libby et al., 2019) (ver Figura 11).

La aterotrombosis puede ocurrir por la ruptura de una lesión inestable o por la erosión del endotelio (Ouweneel et al., 2019). Las lesiones inestables o vulnerables pueden liberar al espacio luminal los contenidos altamente trombogénicos del núcleo necrótico (Gimbrone & Garcia-Cardena, 2016) y desencadenar un evento aterotrombótico como un infarto al miocardio (Theodorou & Boon, 2018).

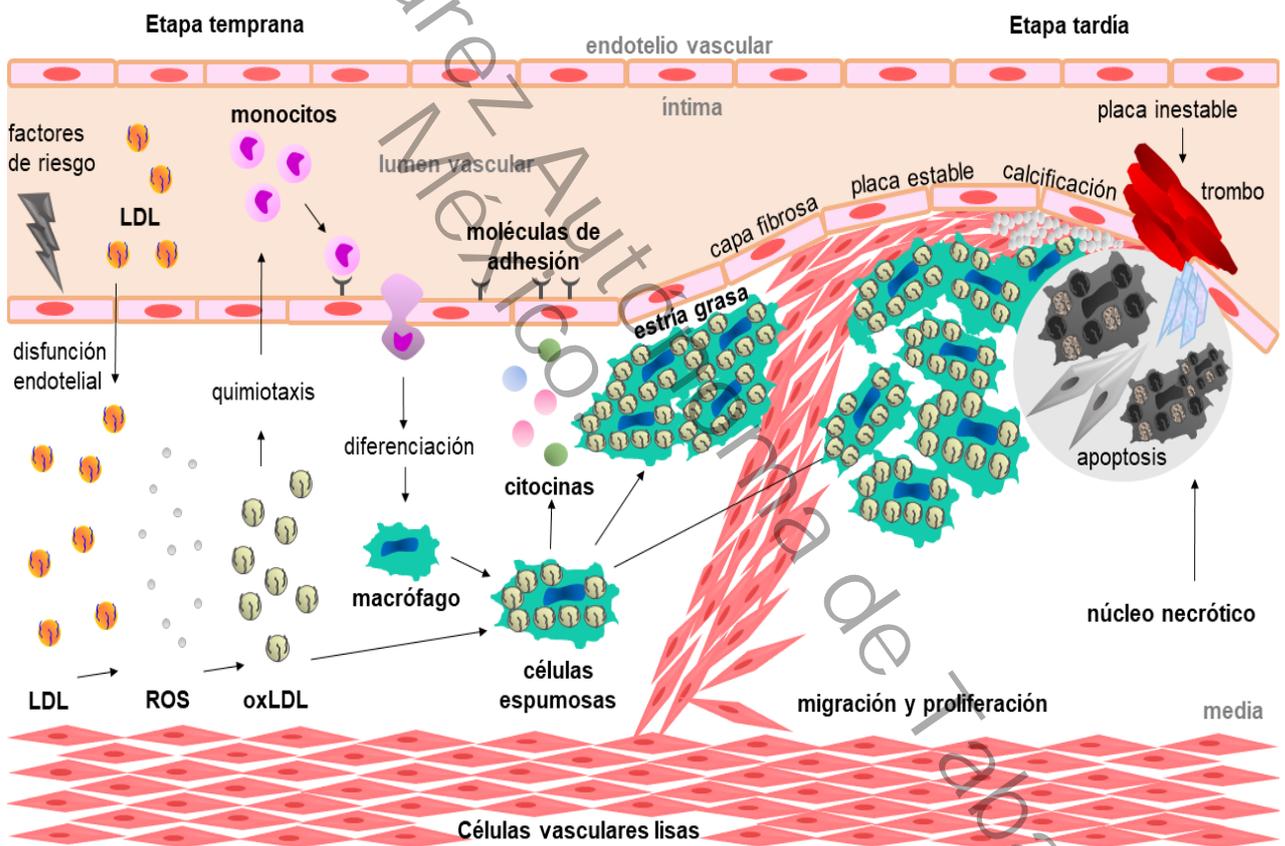


Figura 11. Fisiopatología de la enfermedad arterial coronaria.

### 2.3.2 Clasificación de la enfermedad arterial coronaria

La enfermedad arterial coronaria se clasifica con base en su pronóstico y manifestaciones clínicas y comprende un espectro de desórdenes clínicos que se describen en la Tabla 1 (Buccheri, D'Arrigo, Franchina, & Capodanno, 2018).

Tabla 1. Clasificación de la enfermedad arterial coronaria.

Presentación	Evento vascular
Angina estable	Sin rotura de placa, asintomática o limitante oclusión estable
Angina inestable IM sin elevación del segmento ST	Rotura de placa con oclusión transitoria o incompleta (bloqueo parcial)
IM con elevación del segmento ST	Rotura de placa con oclusión completa y necrosis tisular

IM: Infarto al Miocardio. Tomado y adaptado de NCBI, InformedHealth.org.

Angina de pecho: estado en el que se reduce considerablemente el aporte de sangre al músculo cardiaco, produciendo sensación de dolor (Karunathilake & Ganegoda, 2018).

Infarto al Miocardio: generalmente denominado ataque cardiaco, es un estado en el que se produce una necrosis del músculo cardiaco a consecuencia de la falta de disponibilidad de sangre oxigenada (Saleh & Ambrose, 2018). El infarto se diagnostica con y sin elevación del segmento ST, con base en los patrones específicos del electrocardiograma. En comparación con el infarto agudo al miocardio con elevación del segmento ST, el infarto sin elevación presenta un área luminal mayor en la arteria culpable, menor tamaño del infarto y menor

longitud en la ruptura de la placa. Las placas rotas son más pequeñas y más calcificadas (Salo et al., 2015).

### 2.3.3 Cuadro clínico

La etapa temprana de la enfermedad (aterosclerosis subclínica) puede permanecer asintomática durante años. Sin embargo, la enfermedad arterial coronaria sintomática ocurre décadas después del inicio de la aterosclerosis (Saleh & Ambrose, 2018) y puede desarrollar un cuadro clínico específico (Karunathilake & Ganegoda, 2018) (ver Figura 12).

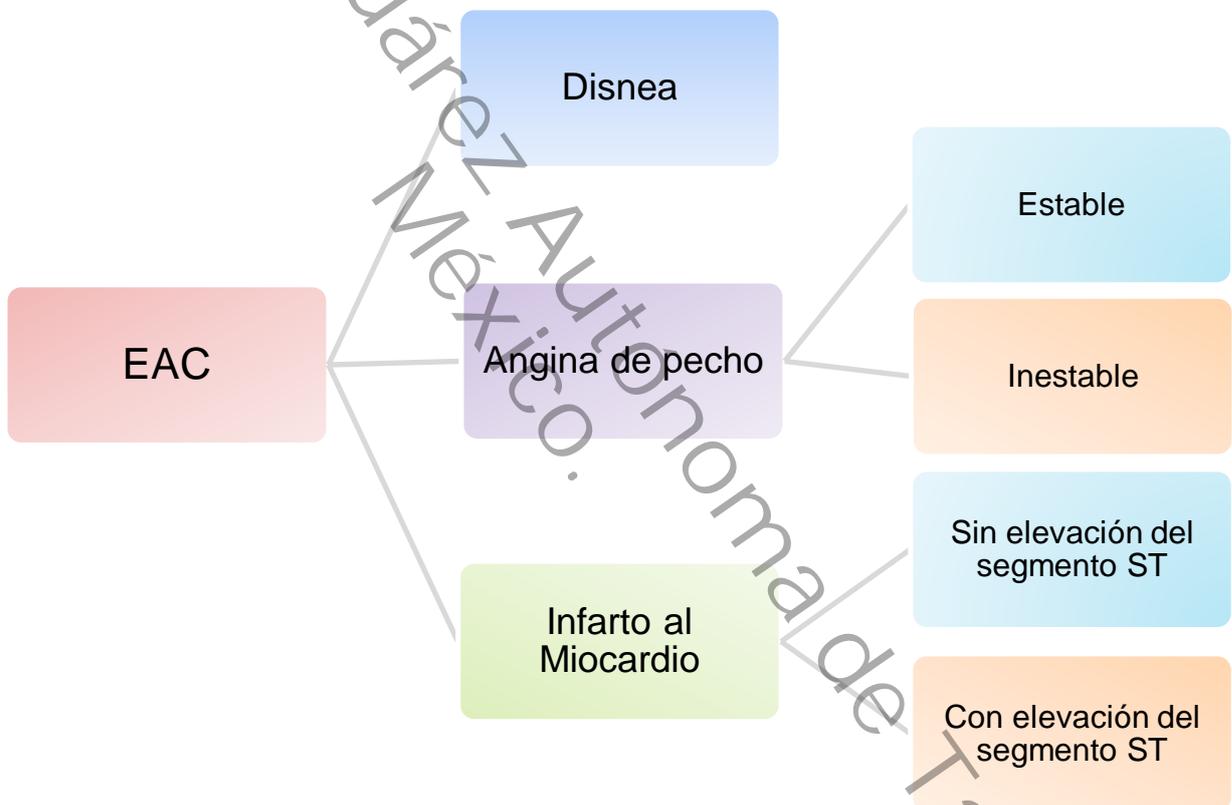


Figura 12. Signos y síntomas de la enfermedad arterial coronaria.

En el siguiente apartado, se describirán los signos y síntomas brevemente.

- Disnea: dificultad para respirar (Sajadi, Majidi, Abdollahimajd, & Jalali, 2017)
- Angina de pecho: sensación de presión o ardor en el esternón, que puede extenderse hacia los brazos, espalda, parte posterior del cuello y parte superior del abdomen o mandíbula

La angina de pecho se clasifica en: angina estable y angina inestable. Los síntomas se desencadenan ante esfuerzos físicos debido a la demanda de oxígeno del músculo cardíaco (Ford, Corcoran, & Berry, 2018).

Angina estable: la gravedad de los síntomas se mantiene debido a que el umbral permanece sin modificaciones durante un periodo de tiempo considerable. El paciente se recupera rápido posterior al reposo o ingesta de medicamentos (J.-S. Wang, Yu, Deng, Yuan, & Li, 2020).

Angina inestable: el dolor puede comenzar antes, prolongarse, presentarse con más frecuencia o mayor intensidad. Los síntomas empeoran de forma repentina sin necesidad de cambios en el esfuerzo, actividad física o si el umbral se modifica (Balla, Pavasini, & Ferrari, 2018).

- Infarto al miocardio: caracterizado por el dolor en el pecho que se irradia desde el brazo izquierdo hasta el cuello o la mandíbula, latidos anormales del corazón, fatiga, sudoración o sudor frío, debilidad, náuseas, indigestión, estrés, vómitos, ansiedad, dificultad para respirar (Lu, Liu, Sun, Zheng, & Zhang, 2015) (ver Figura 13).

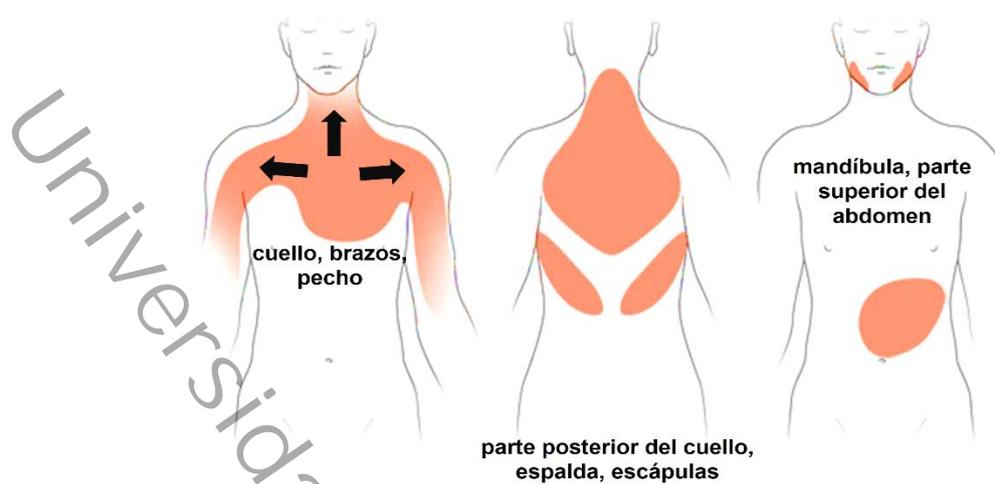


Figura 13. Posibles áreas de dolor durante un ataque al corazón. Tomado y adaptado de NCBI, InformedHealth.org.

Las etapas del daño al miocardio posterior al infarto dependen del tiempo transcurrido (Onwuka et al., 2018) (ver Figura 14).

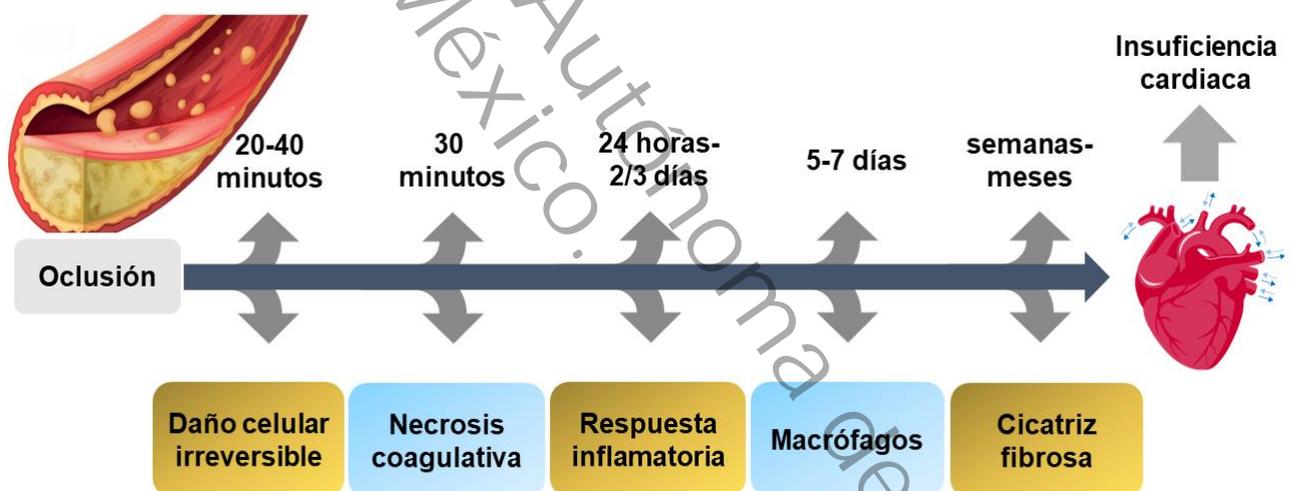


Figura 14. Daño al miocardio posterior a la oclusión en las arterias coronarias.

## 2.4 Factores de riesgo cardiovascular

Se define como factor de riesgo a cualquier característica, rasgo o exposición de un individuo que aumente la probabilidad de sufrir alguna enfermedad (Joshi & Bhagwat, 2018). El uso del término para enfermedades cardiovasculares fue

introducido por los investigadores William Kannel y Thomas Dawber del Framingham Heart Study en 1961 (Niiranen & Vasan, 2016). Los factores de riesgo cardiovascular como la edad, el tabaquismo, la obesidad y la hipertensión promueven la activación endotelial e inflamación vascular (Marchio et al., 2019).

Los factores de riesgo se clasifican en modificables, si las causas que lo ocasionan pueden prevenirse o tratarse; y no modificables cuando su origen no puede controlarse (Karunathilake & Ganegoda, 2018) (ver Figura 15).

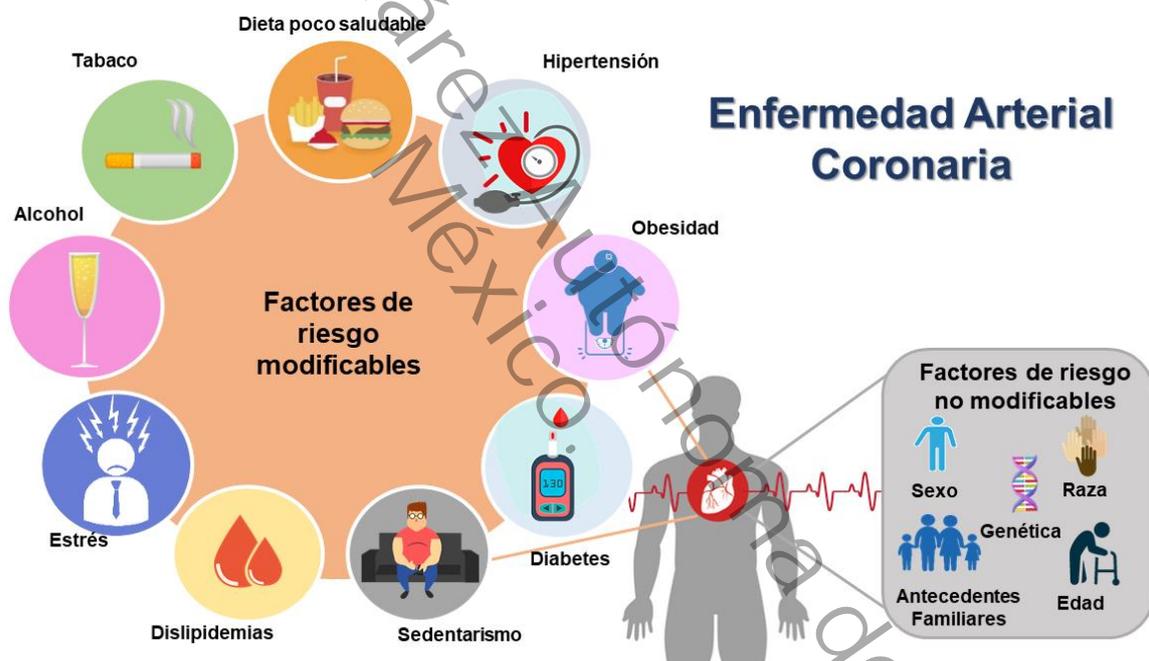


Figura 15. Factores de riesgo modificables y no modificables.

#### 2.4.1 Factores de riesgo modificables

De acuerdo a la OMS, se estima que alrededor del 75% de las enfermedades prematuras del corazón se pueden prevenir con el control y mejora de los factores de riesgo modificables (Stewart, Manmathan, & Wilkinson, 2017).

En este sentido, esta clasificación es uno de los objetivos actuales entre la población mundial para la prevención de padecimientos cardíacos.

El alcohol, la hipertensión arterial y el tabaquismo pertenecen a este grupo (Karunathilake & Ganegoda, 2018). A continuación, se describe la participación de todos los factores de riesgo modificables y su asociación con las enfermedades cardiovasculares.

**Alcohol:** el alcohol es la causa de 2.5 millones de fallecimientos anuales a nivel mundial. Según las normas actualizadas, se recomienda a las mujeres no ingerir más de 2 vasos al día y a los hombres no más de 3 vasos diarios (Ladouceur, 2017). En este sentido, se define como consumo excesivo de alcohol  $\geq 4$  bebidas estándar por día (Piano, 2017).

El alcohol se asocia con diversas afecciones cardiovasculares como enfermedad arterial periférica, enfermedad coronaria, hipertensión, cardiomiopatía, accidente cerebrovascular e infarto al miocardio. La ingesta alta y moderada se asocia con fibrinólisis deteriorada, incremento de la frecuencia cardíaca (Mostofsky, Chahal, Mukamal, Rimm, & Mittleman, 2016) y desarrollo de placa en las arterias, debido a la alteración funcional de las células endoteliales y a la disponibilidad de óxido nítrico (Piano, 2017). Por otra parte, hay estudios que sugieren un efecto cardioprotector en el consumo de dosis leves de alcohol, sin embargo estos beneficios deben compararse con los efectos fisiológicos dañinos al corazón; incluidos los cambios en la circulación, disfunción mitocondrial y muerte celular programada (Piano, 2017).

**Diabetes:** en la población adulta, la prevalencia de diabetes a nivel mundial incrementó de 4.7% en el año 1980 a 8.5% en el 2014 y aproximadamente

entre el 90 y 95% son portadores de diabetes mellitus tipo 2 (Henning, 2018). De acuerdo a cifras reportadas por la American Heart Association, el 68% de los adultos mayores de 65 años de edad con diabetes mellitus tipo 2, fallece a causa de enfermedades cardiovasculares, que la posiciona como la primera causa de mortalidad por complicaciones de la enfermedad (Hajar, 2017). Además, los pacientes diabéticos con resistencia a la insulina tienen un riesgo elevado de desarrollar un padecimiento cardíaco (Balakumar, Maung, & Jagadeesh, 2016). Asimismo, la diabetes es considerada un importante factor de riesgo cardiovascular, debido a que existe una activación de diversas respuestas de señalización en presencia de hiperglucemia que conllevan a la activación y disfunción endotelial, indicando el inicio temprano de la enfermedad aterosclerosa (Avogaro, 2016). Del mismo modo, la hiperglucemia y el exceso de ácidos grasos producen vasoconstricción, trombosis, inflamación vascular y aterogénesis (Henning, 2018).

**Dieta poco saludable:** en el año 2015, se reportaron un total de 5.2 millones de muertes en mujeres y 6.9 millones en hombres a nivel mundial, debido a hábitos alimenticios poco saludables (Benjamin et al., 2018).

En la actualidad, el ritmo de vida acelerado promueve la adopción de hábitos alimenticios poco saludables y frecuentes que repercuten en la salud cardiovascular.

Un hábito muy común es omitir el desayuno en las mañanas y se asocia con un incremento de riesgo cardiovascular (Uzhova et al., 2017).

El alto consumo de alcohol, carne roja procesada (hamburguesas, embutidos), bebidas azucaradas, papas fritas, así como los periodos muy cortos entre

comidas, se asocian con un aumento en la prevalencia de aterosclerosis subclínica y riesgo de cardiopatía coronaria (Penalvo et al., 2016). El consumo de carne roja sin procesar, dietas bajas en carbohidratos y elevadas en grasas, se asocian con un mayor riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Yu, Malik, & Hu, 2018).

**Estrés:** la literatura reporta una asociación entre el estrés psicológico y la disfunción endotelial transitoria y su repercusión en resultados cardiovasculares adversos en pacientes con enfermedad coronaria (Lima et al., 2019).

Los adultos con estrés en el entorno privado o laboral, tienen un aumento de 1.1 a 1.6 veces de riesgo de enfermedad coronaria o accidente cerebrovascular (Kivimaki & Steptoe, 2018). Al respecto, la inflamación aguda ocasionada por el estrés, puede acelerar la desestabilización de la placa aterosclerosa (Lagraauw, Kuiper, & Bot, 2015).

Por otro lado, las experiencias estresantes en la niñez como el consumo de sustancias en el hogar, el abuso físico y sexual, aumentan el riesgo de desarrollar afecciones crónicas en la salud. El estrés postraumático incrementa más del 50% el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular y 30% el riesgo de hipertensión arterial (Burg & Soufer, 2016).

**Hipertensión Arterial (HTA):** la hipertensión arterial sistémica es caracterizada por una presión arterial (PA) persistentemente alta en las arterias sistémicas. La PA es expresada como la proporción entre la presión arterial sistólica y la presión arterial diastólica. El rango normotensivo promedio es de 115/75 mmHg, a partir de ahí, el riesgo de enfermedad cardiovascular es gradual y continuo. Aproximadamente 1 de cada 4 adultos (874 millones) a nivel mundial,

es hipertenso (PA sistólica  $\geq 140$  mmHg). En sujetos entre los 40 y 69 años de edad, el incremento de 20 mmHg en la PA sistólica o 10 mmHg en la diastólica se asocian con más del doble de riesgo de accidente cerebrovascular y mortalidad por cardiopatía isquémica (Oparil et al., 2018).

La HTA predispone a todas las manifestaciones clínicas de la enfermedad cardiovascular, incluyendo enfermedad coronaria, angina de pecho, muerte súbita, insuficiencia cardiaca, fibrilación auricular, infarto al miocardio. Además, aumenta la carga de riesgo de 2 a 3 veces de enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Hajar, 2017; Oparil et al., 2018). La combinación de HTA con otros factores de riesgo como el sedentarismo y una dieta poco saludable (específicamente el consumo de sodio), multiplica el riesgo de mortalidad por la enfermedad (Cappuccio & Miller, 2016).

**Lípidos en sangre:** los lípidos implicados en la dislipidemia aterogénica, incluyen los niveles altos de Colesterol Total (TC), triglicéridos (TG, por sus siglas en inglés), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C, por sus siglas en inglés) y niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) (Suarez-Sanchez et al., 2019). En conjunto, se asocian con la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares (Dron & Hegele, 2017).

El colesterol es posiblemente el lípido más famoso y más importante en el desarrollo de la Enfermedad Cardiovascular. La American Heart Association (AHA, por sus siglas en inglés) ha definido los niveles de Colesterol Total (TC, por sus siglas en inglés) no tratado  $< 200$  mg/dL como un componente ideal de salud cardiovascular. La exposición a largo plazo de niveles de colesterol

moderadamente elevados durante mucho tiempo, podría participar en el posterior desarrollo de enfermedades cardiovasculares (Benjamin et al., 2019).

Los triglicéridos elevados tienen una fuerte asociación con otros parámetros y factores de riesgo como resistencia a la insulina, obesidad abdominal, hipertensión, disfunción endotelial e inflamación de bajo grado. Un nivel normal de TG es  $<175$  mg/dL (Dron & Hegele, 2017). Además, se reporta una fuerte asociación entre los niveles altos de TG y la enfermedad cardiovascular aterosclerosa (Benjamin et al., 2019).

Las personas con historia familiar de TC elevado y LDL-C tienen un riesgo 20 veces mayor de desarrollar padecimientos cardiovasculares (Benjamin et al., 2018).

**Inactividad física/sedentarismo:** se define como inactividad física a realizar cantidades insuficientes de actividad física, es decir, no cumplir con las pautas específicas establecidas. Por otra parte, se define como sedentarismo al comportamiento de vigilia en posición reclinada, sentada o acostada, con un bajo gasto energético  $\leq 1.5$  MET (1 MET=  $3,5$  mL  $O_2$ /kg x min) (Gonzalez, Fuentes, & Marquez, 2017).

En este sentido, la inactividad física y el sedentarismo se agrupan como un solo factor de riesgo cardiovascular y representan un problema entre la población a nivel mundial debido al desarrollo de diversas enfermedades, entre ellas las cardiovasculares y algunos factores de riesgo (Konevic, Martinovic, & Djonovic, 2015).

El sedentarismo se asocia a un control glucémico deficiente que incluye la reducción de la sensibilidad a la insulina y la absorción de glucosa (Panahi & Tremblay, 2018). Asimismo, el riesgo de fallecer a causa de enfermedad

cardiovascular es de 1.9 (intervalo de confianza del 95%) en comparación con quienes realizan actividad física o deporte (Hajar, 2017).

Por otro lado, el ejercicio se ha convertido en un elemento clave para la prevención de enfermedades cardiovasculares por sus múltiples beneficios sobre los niveles de colesterol alto, hipertensión arterial, reduce la mortalidad prematura y disminuye la probabilidad de enfermedades relacionadas con ECV como los ataques cardíacos repentinos, diabetes mellitus tipo 2 y accidentes cerebrovasculares (Benjamin et al., 2019). La OMS recomienda que los adultos entre 18 y 64 años deben realizar 150 minutos de actividad física de intensidad moderada o 75 minutos de actividad aeróbica vigorosa por semana para conseguir los beneficios del ejercicio (van der Ploeg & Hillsdon, 2017).

**Sobrepeso/obesidad:** la OMS define el sobrepeso como un IMC  $>25 \text{ km/m}^2$  y obesidad a un IMC  $\geq 30 \text{ km/m}^2$  (Lim et al., 2017; Ortega, Sui, Lavie, & Blair, 2016).

La obesidad está asociada con una rápida progresión de aterosclerosis, predisposición a desarrollar hipertensión arterial, tasas elevadas de remodelación del ventrículo, diabetes mellitus tipo 2, insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular e infarto al miocardio (Kachur, Lavie, de Schutter, Milani, & Ventura, 2017). Además se ha reportado que los niveles superiores de IMC normal durante la niñez, se asocian con un riesgo elevado de desarrollar cardiopatía congénita en la edad adulta (Hajar, 2017).

**Tabaquismo:** es considerado uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. En el año 2015, el consumo de

tabaco contribuyó aproximadamente a 7.2 millones de muertes a nivel mundial (Benjamin et al., 2018).

El tabaquismo se asocia con mortalidad por cardiopatía isquémica y aproximadamente duplica el riesgo de desarrollar la enfermedad, no obstante, la relación depende de la duración y cantidad de cigarrillos consumidos. Los estudios reportan que fumar incrementa el riesgo de sufrir infarto al miocardio o muerte súbita, sin embargo, ser fumador pasivo también aumenta el riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. Asimismo, el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular en fumadores menores de 50 años, es 10 veces mayor que en no fumadores de la misma edad (Hajar, 2017).

Los beneficios obtenidos casi de forma inmediata por el abandono del tabaco (reducción de infarto al miocardio no mortal y mortalidad por todas las causas) es variado, debido a que en ocasiones hay que esperar más de 20 años para revertir el riesgo asociado por completo (Hajar, 2017).

#### **2.4.2 Factores de riesgo no modificables**

Los factores de riesgo no modificables son: antecedentes familiares, edad, sexo, predisposición genética a la enfermedad y raza (Karunathilake & Ganegoda, 2018). Las asociaciones con las enfermedades cardiovasculares se describen a continuación.

**Antecedentes familiares:** la literatura reporta que la historia familiar se asocia  $\leq 30\%$  de riesgo de presentar enfermedad cardiovascular. Diversos autores definen que cualquier antecedente familiar (en edades prematuras o tardías) se asocia con mayor riesgo de enfermedad cardíaca. En contraste, otros estudios

afirman que los antecedentes familiares sólo son significativos en edades prematuras, es decir, en sujetos <50 o 55 años de edad (Bittencourt, 2018).

En poblaciones multiétnicas de personas con hipertensión arterial, los antecedentes familiares positivos de padecimientos cardiacos pueden utilizarse clínicamente en la identificación de individuos con un riesgo elevado de enfermedad cardiovascular sin accidente cerebrovascular (Valerio, Peters, Zwinderman, & Pinto-Sietsma, 2016). En los adolescentes, los antecedentes familiares paternos de padecimientos cardiovasculares y el tabaquismo materno se asocian con un riesgo elevado de desarrollar enfermedades cardiacas (Silva et al., 2017).

**Edad:** es un factor de riesgo cardiovascular en hombres mayores de 45 años y mujeres mayores de 55 años y se asocia con una alta probabilidad de sufrir un infarto al miocardio (Merz & Cheng, 2016).

Se estima que para el año 2035, aproximadamente uno de cada cuatro individuos tendrá 65 años o más. Estas cifras indican que el promedio de vida a nivel mundial está en aumento y con esto, la presencia de enfermedades cardiovasculares.

En los países desarrollados, la prevalencia de insuficiencia cardiaca en la población adulta es de 1 a 2% y en adultos mayores de 70 años es >10% (Steenman & Lande, 2017).

La literatura reporta una asociación entre la edad de aparición de la enfermedad cardiovascular en padres y la edad de inicio de la enfermedad cardiovascular en hijos (Allport, Kikah, Abu Saif, Ekokobe, & Atem, 2016). Por

último, el envejecimiento se asocia con insuficiencia cardíaca incidente (Lind, Sundstrom, Arnlov, & Lampa, 2018).

**Sexo:** el sexo se define como el conjunto de atributos biológicos que incluyen características físicas y fisiológicas, anatomía sexual y reproductiva, niveles y funciones hormonales y expresión génica. Se divide en masculino y femenino y está involucrado en diversos factores de riesgo cardiovasculares (Shufelt, Pacheco, Tweet, & Miller, 2018).

Al respecto, los hombres desarrollan hipertensión arterial en edades más tempranas, por lo que aumenta el riesgo de mortalidad por accidente cerebrovascular. Asimismo, heredar el cromosoma "Y" tiene una carga genética para el desarrollo de hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares.

Por otra parte, las mujeres tienen arterias coronarias de menor tamaño, lo que podría explicar en gran parte las diferencias en el diagnóstico de Síndrome Coronario Agudo (SICA) entre ambos sexos (Spence & Pilote, 2015).

Por otro lado, en las mujeres, los esteroides sexuales regulan los lípidos séricos. En los hombres, el depósito de lípidos ocasiona lesiones obstructivas en el interior de las arterias coronarias, sin embargo, en las mujeres el resultado es impreciso y se manifiesta como enfermedad isquémica no obstructiva. Además, la prevalencia de la calcificación de la arteria coronaria en hombres es mayor que en mujeres (Winham, de Andrade, & Miller, 2015).

**Predisposición genética a la enfermedad:** la literatura reporta que la carga o predisposición genética es un factor de riesgo relevante. En este sentido, puede superar el de riesgo de enfermedad cardiovascular, incluso más que los otros factores de riesgo (Knowles & Ashley, 2018).

Desde el año de 1950, diversos estudios clínicos han respaldado la idea de la participación genética en la Enfermedad Arterial Coronaria. En un estudio de más de 20,000 gemelos suecos se halló un mayor riesgo del padecimiento entre familiares cercanos con una heredabilidad aproximada del 50%. Además, un análisis de cuantificación en todo el genoma, estimó entre un 40 y 50% la heredabilidad de la enfermedad (Khera & Kathiresan, 2017).

**Raza:** el origen étnico y la raza representan aproximadamente una tercera parte del desajuste entre los años de vida entre blancos y afroamericanos. En este sentido, este factor influye significativamente en el riesgo de desarrollar padecimientos cardiovasculares (Ali & Al Suwaidi, 2019).

Existen variaciones en el conjunto de indicadores de salud para el desarrollo de enfermedades cardíacas entre los diversos grupos étnicos (razas). En este sentido, los afroamericanos tienen tasas más altas de mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Bell, Thorpe, Bowie, & LaVeist, 2018) y el doble de riesgo de mortalidad por enfermedad coronaria, debido a la mayor presencia de factores de riesgo. Además, tienen mayor incidencia de dislipidemias, hipertensión y diabetes después de los 45 años de edad (Howard et al., 2017).

Los estudios reportan que los mexico-americanos tienen un mayor riesgo de desarrollar Enfermedad Cardiovascular en comparación con los blancos no hispanos, aún posterior a ajustarse a los niveles de actividad física establecidos con base en cantidades moderada a vigorosa (Emerson & Gay, 2017).

En lo que respecta a la calcificación de la arteria coronaria, también varía de acuerdo al grupo étnico (Winham et al., 2015).

### **2.4.3 Calcio Arterial Coronario: factor de riesgo emergente**

La calcificación vascular es el resultado de la interacción de factores vasculares, genéticos y ambientales, que producen el depósito de calcio en la pared de las arterias coronarias. La calcificación puede afectar a la túnica íntima (calcificación aterosclerótica) o a la túnica media (esclerosis de Mönckenberg) (Perez-Hernandez et al., 2017).

La literatura reporta que el Calcio Arterial Coronario (CAC) se asocia significativamente con la presencia posterior de infarto al miocardio no fatal, mortalidad cardiaca y mortalidad por todas las causas (Neves, Andrade, & Moncao, 2017). En este sentido, la calcificación de la arteria coronaria predice de forma independiente un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular que los diversos factores de riesgo existentes (J. Chen et al., 2017). El calcio coronario es un resultado casi exclusivo de la aterosclerosis coronaria, excepto por los pacientes con insuficiencia renal, ya que pueden presentar calcificación medial. La cantidad de calcio se correlaciona con la extensión de la placa aterosclerótica presente en las arterias coronarias (Mlynarska, Mlynarski, & Sosnowski, 2019).

Un estudio reportó que los pacientes con CAC tienen 8 veces más riesgo de experimentar un evento cardiovascular (Naghavi et al., 2019).

El CAC representa una medida confiable para la estimación del riesgo por muerte coronaria, mortalidad por todas las causas e infarto al miocardio. Esta medida es de utilidad en pacientes asintomáticos (Kutkiene et al., 2019) ya que permite la reclasificación de sujetos con riesgo intermedio a grupos de bajo o alto riesgo (Malik et al., 2017). Además, el CAC está presente antes de la

estenosis coronaria clínicamente significativa (Papageorgiou, Briasoulis, Androulakis, & Tousoulis, 2017).

La puntuación asignada a una exploración de CAC, resume el grado y la extensión de calcio contenido en las arterias coronarias principales, definiendo la magnitud de la aterosclerosis presente en el sujeto de estudio (Burge et al., 2017).

El método Agatston es el sistema de puntuación estandarizado para cuantificar el CAC a partir de tomografías computarizadas sin contraste. La tomografía aumenta el área de la placa calcificada para obtener una mayor densidad de calcio, al identificar regiones de interés en las arterias coronarias y determinar el área de las lesiones  $>1\text{mm}^2$  en el área total, así como la densidad calcificada máxima a todas las lesiones  $>130$  Unidades Hounsfield (Burge et al., 2017). El puntaje se calcula al multiplicar el área calcificada por un factor de densidad de calcio en unidades de Hounsfield (UH) (Criqui et al., 2017) (ver Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de la puntuación de calcio en la arteria coronaria según la gravedad del compromiso aterosclerótico.

<b>Puntaje de calcio en la arteria coronaria</b>	<b>Carga de la placa</b>
0	Sin evidencia de EAC
0-10	Mínimo
11-100	Leve
101-400	Moderado
401-1000	Grave
$>1000$	Muy severo

EAC= Enfermedad Arterial Coronaria. Tomado y adaptado de (Perez-Hernandez et al., 2017).

En la puntuación, CAC >0 es un indicador de aterosclerosis sistémica (Faggiano et al., 2019). Además, las calcificaciones densas (mayores a 400 UH) se asocian con placas estables. Por el contrario, las microcalcificaciones (calcificaciones regulares), se asocian con placas vulnerables debido a que el capuchón fibroso (dependiendo de la proximidad entre microcalcificaciones y su orientación con respecto al flujo sanguíneo) puede incrementar el estrés del tejido local (Nakahara et al., 2017). Un puntaje de Agatston >400 se asocia con calcificación cardíaca y manifestaciones clínicas de enfermedad aterosclerosa y es predictivo de alto riesgo para futuros eventos cardiovasculares (Faggiano et al., 2019).

En individuos asintomáticos, la ausencia de Calcio Arterial Coronario representa la falta de Enfermedades Cardiovasculares. En este sentido, las personas con puntajes mínimos de CAC tienen mayor riesgo de enfermedad cardiovascular aterosclerótica y cardiopatías coronarias en comparación con quienes tienen un puntaje de 0 (Osawa et al., 2018).

La literatura reporta que la población latina tiene menor prevalencia de CAC en comparación de los caucásicos norteamericanos, a pesar de tener mayor carga de factores de riesgo coronario. En un estudio realizado en la población mexicana, los portadores de CAC mostraron prevalencias más altas de hipertensión, diabetes, dislipidemia y otros factores de riesgo. De igual forma, la prevalencia de CAC >0 unidades Agatston fue de 27% significativamente más alta en hombres (40%) que en mujeres (13%) (C. Posadas-Romero et al., 2017).

## 2.5 Aterosclerosis subclínica

La aterosclerosis subclínica en las arterias coronarias se define como un puntaje de calcio arterial coronario  $>0$  (Tarp et al., 2019). Este padecimiento representa la fase asintomática o preclínica de la aterosclerosis y es un indicador temprano de la carga aterosclerótica y desarrollo de la enfermedad (Osawa et al., 2018).

Debido a que la enfermedad crónica en las arterias evoluciona con el paso del tiempo, la etapa subclínica comprende las primeras etapas de vida (ver Figura 16), en donde el padecimiento puede permanecer sin signos clínicos, hasta la aparición de algún evento agudo como el infarto al miocardio (Singh, Pilkerton, Shrader, & Frisbee, 2018). La calcificación de la arteria coronaria es un marcador establecido de la aterosclerosis subclínica y predictora de la enfermedad cardíaca coronaria (Osawa et al., 2018).

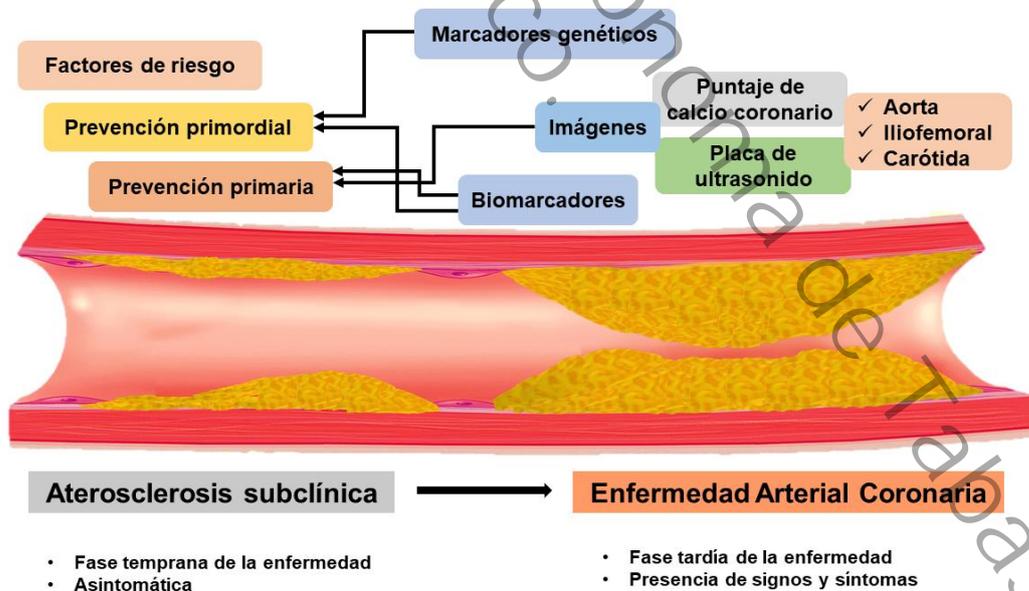


Figura 16. Desarrollo de la aterosclerosis subclínica. Tomado y modificado de (Nambi & Bhatt, 2017).

## **2.6 Antecedentes particulares del proyecto**

La enfermedad arterial coronaria (EAC) se asocia con múltiples factores de riesgo. Sin embargo, las influencias ambientales y genéticas estudiadas hasta el momento, sólo pueden explicar una pequeña parte de la variabilidad en el riesgo de la EAC, que es un gran obstáculo para su prevención y tratamiento. En la actualidad, el estudio de las enfermedades cardiovasculares se ha beneficiado y profundizado con la aparición de las tecnologías de alto rendimiento. La transcriptómica, metabolómica, proteómica y epigenómica son algunos ejemplos, a través de las que es posible abordar las contribuciones del genoma de forma particular (Musunuru et al., 2017).

### **2.6.1 Epigenética**

En el año de 1942, Conrad Waddington (1905-1975) introdujo el término epigenética para referirse a los cambios heredados en el fenotipo, sin cambios en el genotipo (Nebbioso, Tambaro, Dell'Aversana, & Altucci, 2018). En la actualidad, el significado se ha ampliado definiendo a la epigenética como el estudio de los cambios hereditarios en la actividad o función de los genes que no se asocian a cambios en la secuencia del ADN (85), o bien, a un fenotipo heredable que resulta de cambios en un cromosoma sin alteraciones en su secuencia de ADN (Nebbioso et al., 2018).

El ADN se empaqueta en la célula envuelto en un octámero de histonas formando la cromatina. Al respecto, la cromatina y sus modificaciones se consideran aspectos epigenéticos que influyen en la expresión génica (Sen, Shah, Nativio, & Berger, 2016). Las modificaciones epigenéticas explican la

forma en que el material genético se empaqueta y se utiliza sin cambiar la información genética.

La epigenética involucra todas las modificaciones funcionalmente relevantes en la cromatina nuclear que originan un cambio en la expresión génica, que no son ocasionadas por alteraciones o mutaciones en la secuencia primaria del ADN (Coco et al., 2019). Además, se ha considerado el estado de salud del individuo como una integración de múltiples señales ambientales que inician en el periodo de gestación y actúan mediante modificaciones epigenéticas (Tiffon, 2018).

### **2.6.2 Principales mecanismos epigenéticos**

Los mecanismos epigenéticos pueden influir en la actividad del gen a nivel transcripcional y postranscripcional e incluso, a nivel de traducción y modificaciones postraduccionales (Moosavi & Motevalizadeh Ardekani, 2016). Los principales cambios epigenéticos que tienen una participación activa en la regulación de la expresión génica son: la modificación de histonas postraduccionales, la regulación postranscripcional por microARN y la metilación del ADN (Palumbo, Mariotti, Iofrida, & Pellegrini, 2018) (ver Figura 17). Los mecanismos epigenéticos han adquirido gran relevancia debido a que las marcas epigenéticas incorrectas pueden provocar enfermedades infantiles, defectos en el nacimiento o síntomas de enfermedades en otros periodos de la vida (Moosavi & Motevalizadeh Ardekani, 2016).

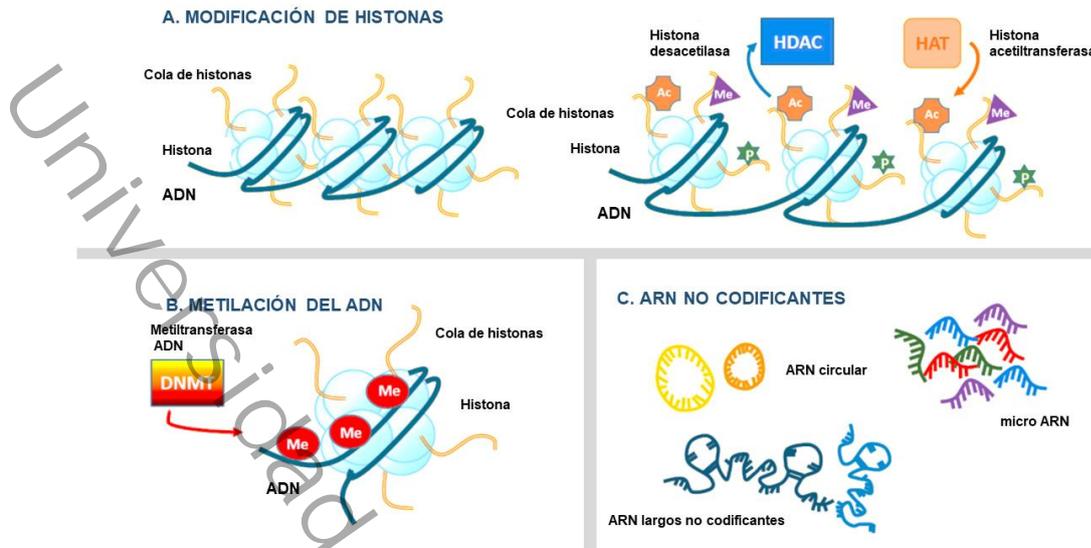


Figura 17. Principales mecanismos epigenéticos. Tomado y adaptado de (Coco et al., 2019).

### Modificaciones postraduccionales de histonas

Las modificaciones postraduccionales de histonas son modificaciones covalentes de las colas aminoterminales de las histonas dentro de las que se incluyen: metilación, fosforilación, ubiquitinación y acetilación (Palumbo et al., 2018). De acuerdo al tipo de modificaciones de histonas, el efecto puede relajar o compactar la estructura de la cromatina, sin embargo, ambos tienen un impacto directo en la expresión génica (Lannes, Rizzon, & Lerat, 2019). Las reacciones de acetilación en los residuos de lisina por la histona acetiltransferasa (cargas positivas) permiten que la cromatina esté menos condensada para la transcripción. Por el contrario, la histona desacetilasa es la encargada de las reacciones de desacetilación, debido a que incrementan el empaquetamiento de la cromatina e impiden que se realice la transcripción del ADN (Coco et al., 2019).

## **ARN no codificantes**

Los ARN no codificantes (ncRNA, por sus siglas en inglés) son un tipo de marca epigenética que intervienen y median diversos procesos intracelulares. El mecanismo de interferencia se debe a pequeños ncRNA que al asociarse con un complejo proteico, pueden dirigirse a los ARN mensajeros y desencadenar su degradación (Lannes et al., 2019). Los ARN no codificantes se agrupan en ncRNA pequeños y ncRNA largos (Coco et al., 2019). Los microARN (miRNAs, por sus siglas en inglés) son el tipo más caracterizado de ARN no codificantes y en su estructura, son cortos y monocatenarios de aproximadamente 19 a 24 nucleótidos. Los miRNAs, regulan el silenciamiento génico a nivel traduccional o transcripcional de genes que codifican a proteínas. Los ARN largos no codificantes (LncRNAs, por sus siglas en inglés) son otro tipo de ARN con un tamaño de más de 200 nucleótidos y funcionan como reguladores transcripcionales, remodeladores de la cromatina y reguladores postranscripcionales (Tiffon, 2018).

## **Metilación**

La metilación del ADN es una de las marcas epigenéticas mejor estudiadas y consiste en añadir grupos metilo al ADN. En los mamíferos se lleva a cabo predominantemente en el quinto carbono de los dinucleótidos de citosina, fosfato, guanina, denominados sitios CpG (Moore, Le, & Fan, 2013).

### **2.7 Metilación del ADN**

La metilación del ADN se realiza a través de tres enzimas nucleares ubicuas (DNMT1, DNMT3a y DNMT3b), pertenecientes a la familia de las ADN metiltransferasas. Estas enzimas son capaces de transferir residuos del grupo

metilo de la S-adenosilmetionina (SAM) a citosinas que no están metiladas en los dinucleótidos de citosina-guanina (CpG). Las DNMT inhiben la transcripción del ADN al bloquear las interacciones entre los factores de transcripción, el ARN polimerasa II y el ADN, esto ocurre al promover la formación de heterocromatina e interferir en el proceso de empalme (Palumbo et al., 2018). Existen tres tipos de enzimas DNMT que catalizan la metilación del ADN: DNMT3, también llamada metiltransferasa de mantenimiento, tiene la función de mantener el estado de metilación durante la replicación al reconocer el dinucleótido mCpG en la cadena madre y el nucleótido de metilo (CpG GpGm) en la cadena hija. Esta enzima permite la conservación y heredabilidad de los sitios metilados en la línea celular. Las DNMT3a y DNMT3b participan en la metilación de novo en ambas cadenas (Coco et al., 2019) y en CpG no metilados, produciendo nuevas marcas de metilación. La mayor parte de los sitios CpG se agrupan en loci específicos en el genoma y se ubican en promotores, exones y en menor cantidad en intrones (Palumbo et al., 2018). La metilación del ADN generalmente actúa en los promotores e induce el silenciamiento génico (es represiva) y su grado de metilación, está inversamente relacionado con la densidad CpG del promotor (Martinez, Gay, & Zhang, 2015; Tiffon, 2018).

Los promotores se clasifican en alta (HCG) y baja densidad (LCG) de acuerdo a la cantidad de sitios CpG, siendo los HCG los más abundantes en el genoma humano con el 72%.

En estudios recientes se ha sugerido que la metilación del cuerpo del gen, podría desempeñar un papel en el empalme del ARNm previo (Martinez et al., 2015).

La metilación en las regiones reguladoras de secuencias como promotores o potenciadores se asocia con la represión génica (Lanata, Chung, & Criswell, 2018). La represión se logra mediante un sistema de proteínas de reconocimiento de grupos metilo que reclutan factores específicamente programados para generar una estructura de cromatina cerrada, haciendo que el gen sea menos accesible para la transcripción (Dor & Cedar, 2018) (ver Figura 18). Se ha descrito que las regiones promotoras desmetiladas de genes, permiten y facilitan la transcripción génica al favorecer una apertura mecánica y la accesibilidad del ADN a su unión con el factor de transcripción y a la expresión génica (Lanata et al., 2018).

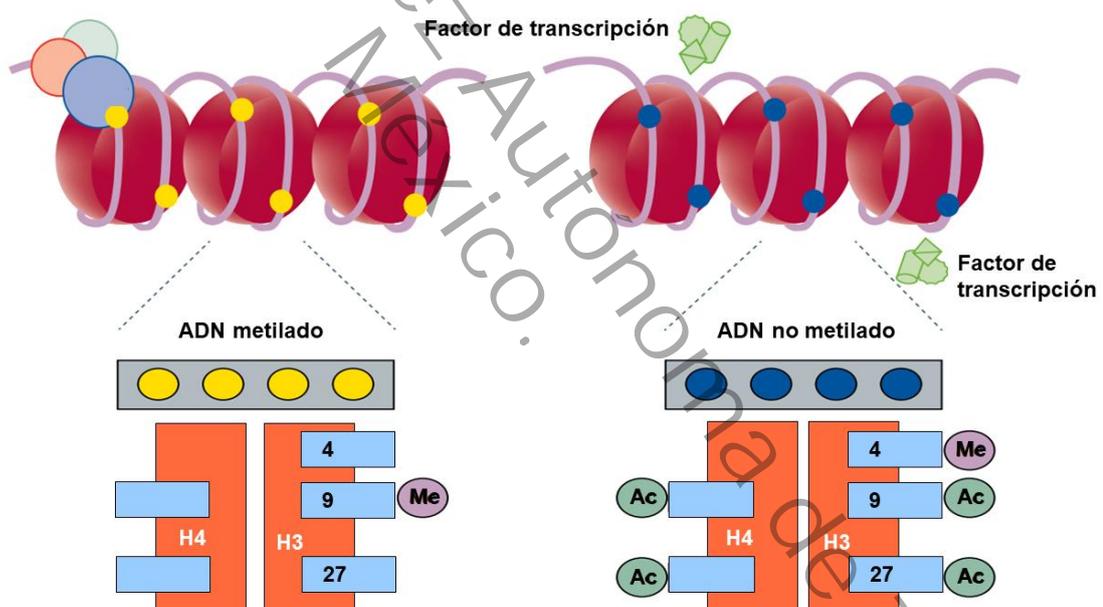


Figura 18. Represión de la expresión de genes por metilación. Tomado y adaptado de (Dor & Cedar, 2018).

Asimismo, la hipometilación en la región promotora y la hipermetilación en el cuerpo del gen se asocian con la expresión génica (Lanata et al., 2018).

Desde los primeros estudios, se asoció la metilación del ADN con una reducción de la expresión génica, sin embargo, la evidencia reciente sugiere

que su impacto en la expresión génica depende del contexto dentro del genoma (Yokoyama, Rutledge, & Medici, 2017). La evidencia reciente sugiere que la unión del factor de transcripción en algunas situaciones puede inducir hipometilación del ADN, debido a ello, es complejo establecer una regla general entre la transcripción génica y la metilación del ADN (Lanata et al., 2018).

La metilación del ADN se puede evaluar con métodos que emplean conversión de bisulfito de residuos de citosina a uracilo, secuenciación de moléculas de ADN único a base nanoporas, enzimas de restricción con especificidad para citosinas metiladas o no metiladas (Werner, Kelly, & Issa, 2017).

La pirosecuenciación es una técnica cuantitativa que proporciona un medio de alto rendimiento y rápido para detectar estimar cambios globales de metilación o detectar niveles de metilación en loci individuales (Delaney, Garg, & Yung, 2015).

La importancia de estudio de la metilación se debe a su papel esencial en la regulación de genes en respuesta a las señales de desarrollo y ambientales, así como su participación en la embriogénesis de los mamíferos. También, este mecanismo está involucrado en diversos procesos biológicos, dentro de los que se incluyen la regulación de la expresión génica y la inactivación del cromosoma X (Li & Zhang, 2014).

La metilación aberrante del ADN puede resultar en una regulación alterada de la expresión génica y se describe en diversas enfermedades como el cáncer, la enfermedad de Moyamoya y el Parkinson (Wan et al., 2018).

### 2.7.1 Metilación del ADN en enfermedades

La literatura reporta que en pacientes con leucemia y diversos tipos de cáncer, principalmente el de seno, la hipermetilación de las islas CpG en el promotor de genes clave, se ve implícita en el riesgo alto o bajo de resultados clínicos adversos. Además, el empleo terapéutico y pronóstico de los defectos de la metilación, se evidencian en muchos tipos de estos padecimientos (Werner et al., 2017). Otros autores reportan que la hipermetilación de la isla CpG3 en el promotor del gen *SEPT9* (asociado a otros tipos de cáncer), adquiere un papel como oncogén o gen supresor de tumores y refleja la probable presencia de cáncer colorrectal (Song, Jia, Peng, Xiao, & Li, 2017; Wasserkort et al., 2013). Por otra parte, la metilación del ADN de las islas CpG en la región promotora del gen *CDC2L1* (asociado a la regulación del ciclo celular en células eucariotas), fue del 50% en los tejidos queloides de pacientes en comparación con el 0% de los tejidos de piel en sujetos sanos (G. Zhang, Guan, Chen, Qian, & Liang, 2018).

Del mismo modo, un estudio de metilación en la región promotora de los genes *SNCA* y *PARK2* (implicados en la enfermedad de Parkinson de inicio temprano), reportó una hipometilación significativa en pacientes en comparación con el grupo control ( $p=0.013$  y  $p=0.03$  respectivamente), sugiriendo que ambos genes podrían contribuir en la patogénesis de la enfermedad (Eryilmaz et al., 2017). Otro estudio de genes candidatos y biomarcadores para la enfermedad de Moyamoya, asoció un sitio CpG hipometilado de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con la enfermedad (Sung et al., 2018).

Finalmente, en un estudio realizado por la técnica cuantitativa de pirosecuenciación con el equipo PyroMark Q24 (QIAGEN), se encontró que el gen *ALKGH3* (relacionado con la reparación del ADN por daño por alquilación en cáncer), presenta metilación del promotor CpG y silenciamiento transcripcional; asimismo, la metilación >20% de sitios CpG, se asocia con una supervivencia reducida en cáncer ( $p=0.012$ ) (Stefansson et al., 2017).

### **2.7.2 Metilación en la región promotora de enfermedades cardiovasculares**

En este sentido, la literatura reporta diversos estudios en los que se observaron patrones de metilación alterados en sitios CpG en pacientes con enfermedades cardiovasculares, entre ellas: insuficiencia cardíaca, miocardiopatía dilatada y miocardiopatía isquémica (Lan & Evans, 2019). Se reportó una hipermetilación del gen *SMAD7* (implicado en procesos inflamatorios y fibrosis) en el sitio CpG 5.8.15.16, en la región promotora de pacientes con aterosclerosis y en placas ateroscleróticas humanas (Wei et al., 2018). Además, se halló una hipermetilación en el promotor del gen *CTH* en pacientes con cirugía de injerto de derivación de la arteria coronaria (19.1%) en comparación con el grupo control (10.3%) ( $p=0.024$ ) en el sexo masculino, sin embargo, no se encontró significancia estadística en el sexo femenino ( $p=0.495$ ). Para finalizar, el estado de metilación se asoció como un factor predisponente para enfermedad cardiovascular en el sexo masculino (Giannakopoulou et al., 2017).

## 2.8 Gen SORTILIN 1 (*SORT1*)

El gen SORTILIN 1 (*SORT1*) se localiza en humanos en el cromosoma 1 en el locus 1p13.3. También se reporta en la literatura con los nombres alternativos de NTR3 (Receptor de neurotensina 3), Gp95 (Glicoproteína 95), NT3 y LDLQC6. Este gen tiene una longitud de 88,381 nucleótidos y está constituido por 23 exones (ver Figura 19).

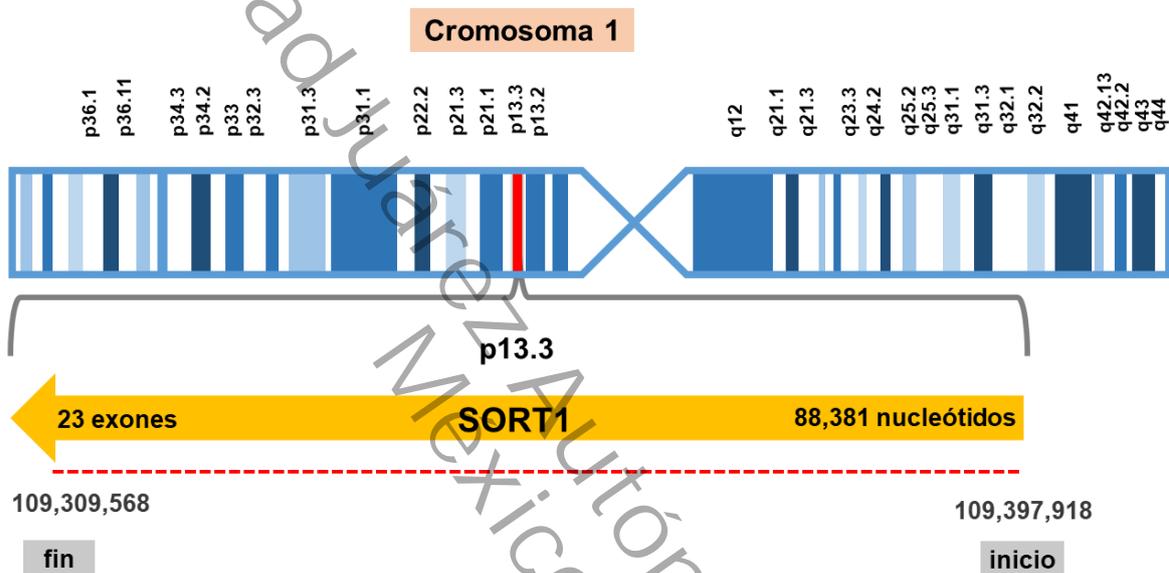


Figura 19. Localización del gen *SORT1* en el cromosoma 1.

El gen *SORT1* codifica a la proteína sortilina, que es una proteína transmembrana tipo 1 (Ho et al., 2019) y pertenece a una familia de receptores de clasificación de proteínas conocida como Vps10p (familia de clasificación de la Proteína Vacuolar 10) (Goettsch et al., 2017) que intervienen en la transducción de señales y el transporte de proteínas (Hermeij, 2009).

Las Vps10p están conformadas por 5 miembros: Sortilin, SorLa, SorCs1, SorCS2 y SorCs3 y tienen como característica en común un dominio Vps10p N-terminal (Hermeij, 2009). Esta familia tiene la capacidad de unirse a

diferentes ligandos y realizar diferentes funciones en distintos tejidos (Thaker & Frishman, 2014), ya sea como receptor, correceptor o en la clasificación de otras proteínas hacia vías secretoras o de degradación (Ho et al., 2019). Sin embargo, sortilina es la más relevante del grupo debido a sus múltiples funciones además de las ya mencionadas.

La proteína sortilina se escinde en la red trans-Golgi y desempeña un papel a nivel celular al intervenir en el transporte de proteínas entre el aparato de Golgi, la membrana plasmática, el endosoma y el lisosoma. Asimismo, se encarga de dirigir a las proteínas diana (enzimas, receptores de señalización y factores de crecimiento) a su destino, en los compartimientos endocíticos o secretorios de las células (Carlo, Nykjaer, & Willnow, 2014).

La proteína sortilina se ubica en 90% en las membranas intracelulares con predominio en Golgi y <10% en la superficie de la membrana celular (Kjolby, Nielsen, & Petersen, 2015).

Sortilina se purificó por primera vez de extractos de cerebro mediante cromatografía de afinidad y se clonó en una biblioteca de ADNc humano (Petersen et al., 1997). Esta proteína se expresa con abundancia en el sistema nervioso central (en particular en el cerebro), el corazón y otros tejidos y células, incluidos: testículos, riñón, grasa, esófago, colon, tiroides, duodeno, pulmón, intestino delgado, próstata, vejiga urinaria, vesícula biliar, endometrio, estómago, piel, glándula salival, bazo, médula ósea, apéndice, adrenal, hígado, páncreas, ovario, ganglio linfático (Itoh, Mizuno, Aikawa, & Aikawa, 2018; Roselli et al., 2015) y en diversas células específicamente en células Th1, macrófagos, células NK (Natural Killer), células dendríticas, microglia y

linfocitos T y B. También se expresa en el pulmón embrionario, lo que sugiere funciones específicas en órganos en desarrollo (Talbot et al., 2018).

La conformación estructural de sortilina, consiste en un propéptido N-terminal con sitios de escisión de furina, un dominio extracelular Vps10p, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática que alberga dos motivos de clasificación lisosomal (Strong, Patel, & Rader, 2014) (ver Figura 20 y Figura 21).

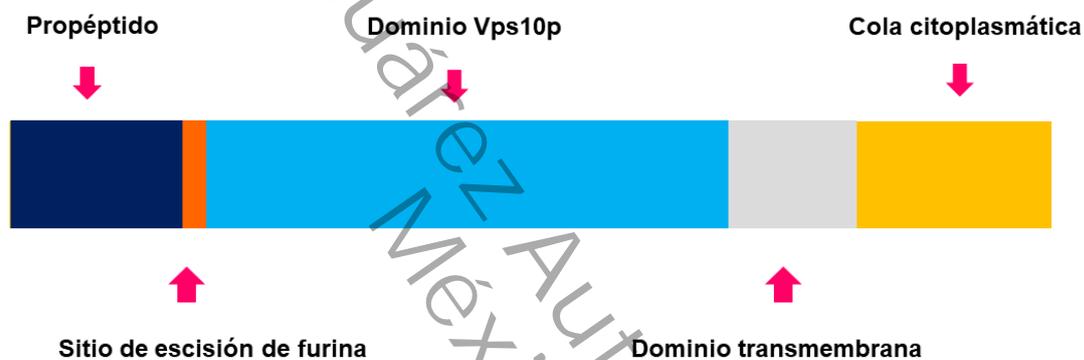


Figura 20. Conformación estructural de sortilina.

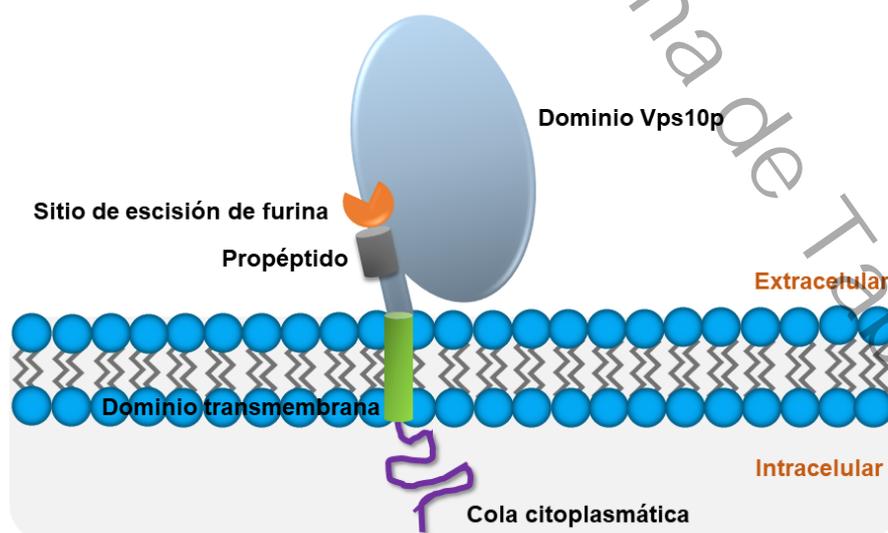


Figura 21. Estructura de sortilina en la célula.

Vps10p es un dominio de unión a ligando extracelular de 700 aminoácidos plegado en una hélice  $\beta$  de diez palas. Está conformado por tres dominios estructurales: una hélice  $\beta$  de 10 palas, dos dominios de nudos de cisteína llamados 10 CCa y 10 CCb (Talbot et al., 2018).

La prosortilina se activa mediante la escisión por furina de un propéptido de 44 aminoácidos. El propéptido escindido evita la unión prematura de ligandos y permanece unido al receptor hasta encontrar un pH bajo, por ejemplo en los endosomas tardíos (Januliene et al., 2017).

Las vías de tráfico intracelular de los receptores de dominio inician con la escisión del propéptido por las pro-proteinas convertasas en la red trans-Golgi (TGN, por sus siglas en inglés) que le confieren la actividad de receptor (Kjolby et al., 2010). Seguidamente, los receptores Vps10p asociados a proteínas, pueden secretarse del TGN (por medio de gránulos secretores) a vesículas extracelulares o dirigirse a la membrana plasmática a través de vesículas secretoras constitutivas. A continuación, los Vps10p pueden anclarse a la membrana y sufrir una escisión proteolítica por una desintegrina y metaloproteasa (ADAM 10 o 17) y posteriormente, liberarse en una forma soluble. Estos receptores de dominio, pueden mediar la internalización de socios proteicos de receptores de dominio Vps10p por endocitosis dependiente de AP-2 y clatrina. Después, los Vps10p pueden transportarse solos o acompañados entre los endosomas tempranos y la red trans-Golgi a través del complejo retrómero o el transporte anterógrado. Los endosomas tempranos maduran en endosomas tardíos o en cuerpos multivesiculares. Finalmente, los receptores de dominio Vps10p y sus acompañantes pueden dirigirse al

lisosoma para su degradación o exocitarse en exosomas (Talbot et al., 2018) (ver Figura 22).

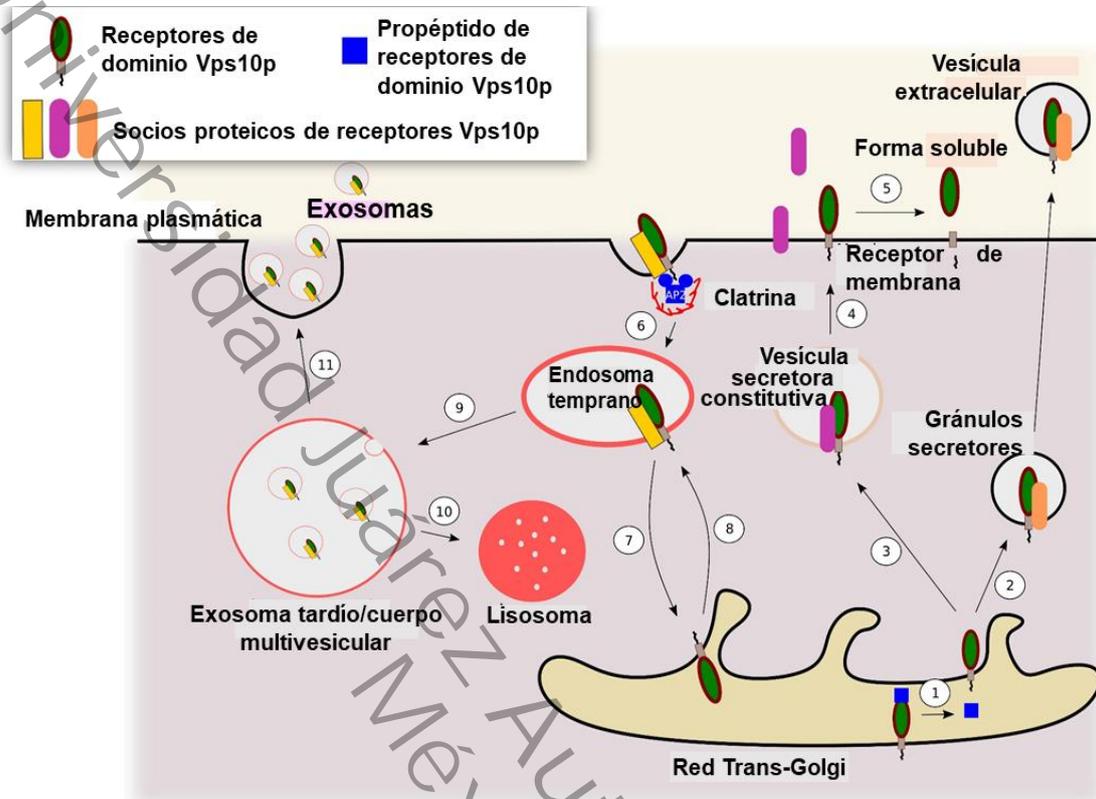


Figura 22. Papel de los receptores de dominio Vps10p en el tráfico intracelular de proteínas. Tomado y adaptado de (Talbot et al., 2018).

### 2.8.1 Gen *SORT1* y enfermedad arterial coronaria

El gen *SORT1* se identifica como un importante regulador en trastornos metabólicos y cardiovasculares. La literatura sugiere una participación de la proteína sortilina en el desarrollo y progresión de la enfermedad arterial coronaria. En este sentido, se involucra en diferentes mecanismos y factores de riesgo cardiovascular, entre ellos: metabolismo de lipoproteínas, biogénesis de Glut4, captación de glucosa en diabetes tipo 2, inflamación de la pared arterial y calcificación vascular (Talbot et al., 2018) (ver Figura 23).

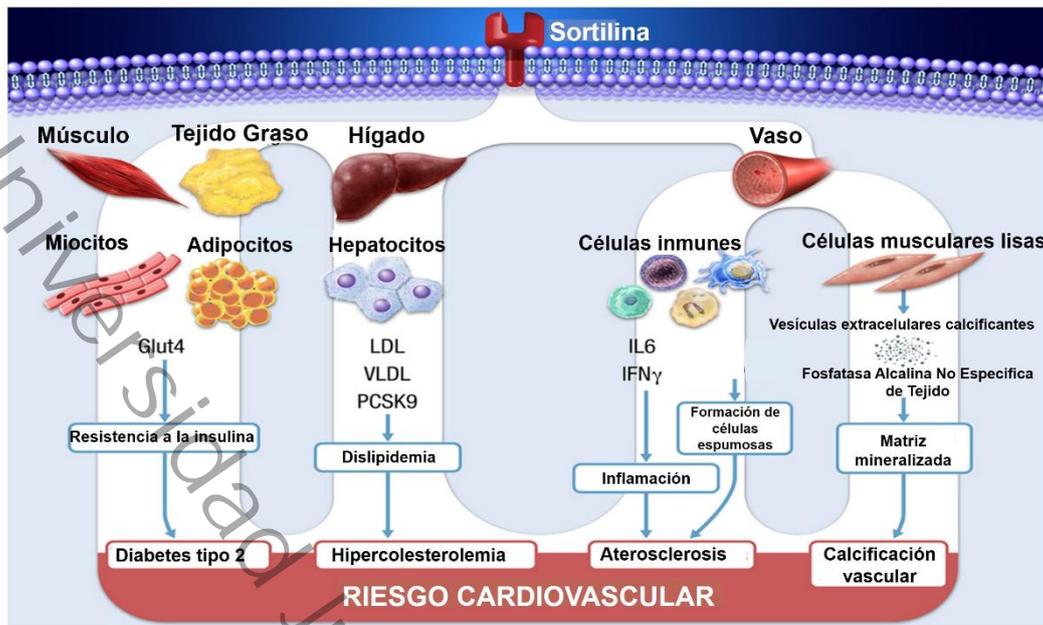


Figura 23. Sortilina y riesgo cardiovascular. Tomado y adaptado de (Goettsch, Kjolby, & Aikawa, 2018).

La evidencia apoya la participación del gen *SORT1* en las enfermedades cardiovasculares. Al respecto, se reporta que los niveles altos de la proteína sortilina en suero en hombres mayores de 50 años, se asocia con mayor riesgo de eventos cardiovasculares adversos, eventos cerebrovasculares y calcificación aórtica abdominal (Goettsch et al., 2017). Asimismo, la eliminación de *SORT1* en un modelo de ratón ateroesclerótico no impactó en los niveles de colesterol plasmático; sin embargo, disminuyó el desarrollo de lesiones ateroescleróticas tempranas y tardías (Mortensen et al., 2014).

Por otra parte, se ha descrito que la proteína sortilina en el hígado, se une a las LDL y promueve su absorción celular y degradación lisosómica; asimismo, participa en la internalización de las LDL por los macrófagos, provocando una disminución del flujo de salida del colesterol y un incremento en la acumulación de lípidos intracelulares (Patel et al., 2015). En este sentido, podría contribuir a la formación de células espumosas y posterior ateroesclerosis (Goettsch et al.,

2016). Sin embargo, existe controversia con estos resultados, debido a que en la literatura también se reportó la participación de sortilina en el reclutamiento de macrófagos a través de la incubación de LDL oxidado, agregado y nativo durante 20 horas y la posterior cuantificación mediante citometría de flujo. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre la captación de LDL entre los macrófagos del grupo control y del grupo deficiente de sortilina (Mortensen et al., 2014).

No obstante, sortilina se identificó como un receptor de alta afinidad para PCSK9 (éste último destina al receptor de lipoproteínas de baja densidad a su degradación lisosómica, produciendo un incremento en el colesterol LDL) en la red trans-Golgi al promover la secreción en hepatocitos primarios. A saber, en un estudio en ratones deficientes de sortilina, se observó una disminución de PCSK9 circulante y la presencia de la proteína en el hígado, produjo un aumento de PCSK9 plasmático (Goettsch et al., 2018; Gustafsen et al., 2014).

También se ha descrito la participación de sortilina en el sistema inmune. En células transfectadas, se observó una alta afinidad de IL-6 e IFN- $\gamma$  por el receptor. De igual forma, las células Th1 y los macrófagos (importantes en la formación de placa aterosclerótica) que carecen de sortilina, presentaron una secreción disminuida de IL-6 e IFN- $\gamma$  (Mortensen et al., 2014).

Para finalizar, se ha descrito que la proteína sortilina podría involucrarse con la calcificación vascular. Primero, en un estudio realizado en humanos y en ratones, se observó una alta expresión de la proteína en las arterias carótidas, arterias femorales y lesiones ateroscleróticas calcificadas. Además, la eliminación genética de sortilina en ratones con deficiencia del receptor LDL y

alimentados con dieta alta en grasas y colesterol (factores de riesgo para calcificación vascular), produjo una disminución en el desarrollo de la calcificación arterial sin afectar el número de osteoblastos, osteoclastos y la tasa de aposición mineral. Estos resultados sugieren una asociación específica entre sortilina y la calcificación vascular (Goettsch et al., 2016). Segundo, se ha descrito que la proteína sortilina regula la carga de la Proteína de Calcificación Tisular Fosfatasa Alcalina No Específica (TNAP) en las vesículas extracelulares (involucradas en la formación de microcalcificaciones) y participa en su reclutamiento, contribuyendo a la calcificación vascular (Goettsch et al., 2016).

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

### 3. ANTECEDENTES

Desde los años noventa, con el descubrimiento y caracterización de la proteína sortilina (Petersen et al., 1997), diferentes grupos de trabajo se interesaron en estudiar su implicación en diversas enfermedades, debido a la expresión de la proteína en múltiples tejidos. En este sentido, en la literatura se reportaron asociaciones con padecimientos como: Alzheimer (Andersson et al., 2016), cáncer de mama (Roselli et al., 2015) y enfermedades cardiovasculares (Coutinho, Bourbon, Prata, & Alves, 2013), entre las que destacaron el infarto al miocardio y la enfermedad arterial coronaria (Kleber et al., 2010; Strong & Rader, 2012).

Al respecto, los estudios propusieron una posible participación del gen *SORT1* con las enfermedades cardiovasculares involucrándole en los mecanismos del colesterol y triglicéridos (Shirts, Hasstedt, Hopkins, & Hunt, 2011). Además, se le relacionó con la hipercolesterolemia y en estudios en modelos animales, la ausencia de sortilina, favoreció a la formación de lesiones ateroscleróticas (Kjolby et al., 2010).

Por otra parte, se inició el estudio de las principales marcas epigenéticas y su asociación con las enfermedades cardíacas (por ejemplo, la miocardiopatía dilatada), dentro de las que destacó la metilación del ADN con la expresión de genes (Haas et al., 2013). Años más tarde, los estudios epidemiológicos comenzaron su abordaje hacia los factores de riesgo cardiovascular y su asociación con la metilación del ADN (Zhong, Agha, & Baccarelli, 2016).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades cardiovasculares representan la primera causa de mortalidad a nivel mundial (Mc Namara, Alzubaidi, & Jackson, 2019) y su incidencia aumentará debido al envejecimiento gradual de la población (Costantino et al., 2018). En México, con base en estadísticas del INEGI, en el año 2017, fallecieron un total de 141,617 habitantes debido a esta causa.

En este sentido, la enfermedad arterial coronaria (en décadas anteriores fue poco habitual entre la población mexicana) se posicionó como un padecimiento muy frecuente, hasta convertirse en la primera causa de mortalidad por enfermedad cardiovascular en el país (Carlos Posadas-Romero et al., 2017). Debido a que la enfermedad arterial coronaria es de origen multifactorial y en etapas tempranas permanece asintomática (aterosclerosis subclínica), se han propuesto diversos genes candidatos para el estudio de este padecimiento (Khera & Kathiresan, 2017).

La literatura reporta que el locus 1p13.3 en el cromosoma 1, involucra genes asociados a enfermedades cardíacas. El gen *SORT1* representa uno de ellos y se le asocia con estos padecimientos (Carlo et al., 2014). En la actualidad, varios grupos de trabajo, sugieren que la proteína sortilina, codificada por este gen, participa en múltiples mecanismos para el posible desarrollo de la aterosclerosis (Z. Zhang, Jiang, Yang, Lin, & Qin, 2018). Sin embargo, los resultados obtenidos son contradictorios y la participación de la proteína sortilina en la enfermedad arterial coronaria no se ha elucidado.

Por otra parte, las marcas epigenéticas como la metilación del ADN, se ven implícitas en la salud de los adultos, progresión y mitigación de las

enfermedades cardiovasculares (Rosa-Garrido, Chapski, & Vondriska, 2018). Sin embargo, no existen estudios que evalúen las diversas regiones del gen, en particular la promotora, en donde en enfermedades como el cáncer, se han encontrado diferencias e implicaciones directas con la fisiopatología, al activar o suprimir los genes (Souza et al., 2020). Debido a ello son necesarios estudios que involucren la metilación del gen *SORT1* en la región promotora y su asociación con la enfermedad arterial coronaria.

#### **4.1 Pregunta de investigación**

¿Existe un patrón diferencial de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 en la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles?

## 5. JUSTIFICACIÓN

En el año 2016, se estima que aproximadamente 18 millones de personas a nivel mundial, fallecieron a causa de una enfermedad cardiovascular. Esta cifra representa el 31% de las muertes totales en el mundo y más 39% de decesos en individuos menores de 70 años debido a complicaciones por estos padecimientos (Wicinski et al., 2018).

La enfermedad arterial coronaria es la primera causa de mortalidad en México y se estima que esta tendencia continuará en aumento para el año 2030 (Lopez-Bautista et al., 2017). En México, según las estadísticas obtenidas por el INEGI, en el año 2017 fallecieron 75,265 hombres y 66,337 mujeres, lo que se traduce en un gran número de pérdidas humanas, aún por encima de la diabetes mellitus (104,525 decesos anuales).

Se ha demostrado que la etapa temprana de la enfermedad inicia en la infancia. Posteriormente, el periodo de latencia comprende varios años. Sin embargo, las manifestaciones clínicas se presentan en adultos de mediana edad (Ayatollahi et al., 2019). Al respecto, la literatura describe que los factores de riesgo cardiovascular involucrados en la fisiopatología del padecimiento, promueven la activación endotelial e inflamación vascular (Ouweneel et al., 2019; Winzer et al., 2018), dentro de los que se incluye el calcio arterial coronario que es un factor predictivo de futuros eventos cardiovasculares y que confirma la presencia de enfermedad aterosclerótica (Shekar & Budoff, 2018).

En 2010, debido a la problemática global que representa ésta enfermedad, la American Heart Association (AHA) creó los objetivos de impacto 2020, con la finalidad de reducir las muertes por enfermedad cardiovascular y accidentes

cerebrovasculares en un 20% en la población estadounidense (Estrella et al., 2018). Sin embargo, estas medidas preventivas, de tratamientos e investigación, deben extrapolarse hacia cada población particular.

Por otra parte, se han propuesto diversos genes para el estudio de las enfermedades cardiovasculares, principalmente los que se ubican en el cromosoma 1, en el locus 1p13. El gen *SORT1*, se localiza en el locus 1p13 y codifica a la proteína sortilina. Este gen se ha asociado con enfermedades cardiovasculares mediante la participación de distintos mecanismos como el colesterol, triglicéridos, resistencia a la insulina y calcificación vascular. Sin embargo, la evidencia al respecto es poca y se desconoce su papel exacto en la enfermedad (Goettsch et al., 2018; X. Wang et al., 2018)

Por otro lado, el abordaje epigenético de las enfermedades ha tomado mucha importancia. La metilación del ADN es la principal marca epigenética estudiada, debido a su relación con el desarrollo celular, la modulación de eventos de empalme, la inactivación del cromosoma X, la estabilidad genómica y la regulación de la expresión génica específica del tejido (Martinez et al., 2015). Al respecto, se han descrito resultados contradictorios con respecto a la región del gen en estudio. En especial, se ha observado que la metilación en las regiones promotoras de múltiples genes asociados con cáncer, se encuentran hipermetiladas o hipometiladas y afectan de forma directa la transcripción génica (G. Chen et al., 2020; Lv et al., 2020). A partir de estos hallazgos, se ha brindado una mayor especificidad en los tratamientos de pacientes con esta enfermedad (Perrino et al., 2017). Sin embargo, las enfermedades cardiovasculares han sido poco estudiados desde esta perspectiva.

En este sentido, la literatura no muestra estudios de metilación en la región promotora de genes candidatos asociados a la enfermedad arterial coronaria, asimismo tampoco se ha descrito el estudio en sujetos con la enfermedad en etapa asintomática, es decir, aterosclerosis subclínica.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar el estado de metilación de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo General:

Evaluar el estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles

### 6.2 Objetivos Específicos:

- Determinar el estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles
- Comparar las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles
- Correlacionar las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles
- Correlacionar las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las medidas bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria

- Correlacionar las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las medidas bioquímicas y metabólicas en sujetos con aterosclerosis subclínica
- Correlacionar las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con el Calcio Arterial Coronario en pacientes con enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica

## 7. HIPÓTESIS

Nula ( $H_0$ ): No existe un patrón diferencial de metilación en los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.

Alternativa ( $H_1$ ): Existe un patrón diferencial de metilación en los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de en la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.

## 8. METODOLOGÍA

**8.1 Diseño del estudio:** casos y controles anidado al proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa), transversal, prospectivo y analítico.

**8.2 Población de estudio:** la población de estudio son mestizos mexicanos proveniente de la cohorte GEA del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

**8.3 Muestra:** se emplearon 3 grupos divididos en 90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, 91 sujetos con aterosclerosis subclínica y 90 controles, todos provenientes del proyecto GEA (Genética de la Enfermedad Aterosclerosa) perteneciente al Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en la Ciudad de México. El proyecto GEA fue diseñado como una cohorte de pacientes mexicanos con el objetivo de evaluar las bases genéticas de la enfermedad aterosclerosa y evaluar la relación entre los factores de riesgo tradicionales y emergentes con la presentación clínica y subclínica en la población adulta mexicana. El muestreo se realizó a conveniencia, en una fase transversal durante el periodo de junio del 2008 al mes de febrero del 2013 (C. Posadas-Romero et al., 2017). A todos los participantes se les determinó el calcio arterial coronario (marcador específico para la aterosclerosis e infarto al miocardio) a través de tomografía computada, en donde se logró diagnosticar la aterosclerosis subclínica e identificar a sujetos con riesgo creciente de presentar eventos coronarios.

El proyecto GEA involucra grupos de estudio bien caracterizados. Para fines del presente trabajo, la rigurosa selección consideró como pacientes a los sujetos que presentaron 2 o más infartos.

Del mismo modo, se consideraron como controles a aquellos que no presentaban calcio arterial coronario, además de niveles normales de colesterol, lípidos y glucosa. Por último, el grupo de aterosclerosis subclínica fue extraído del grupo control, considerándose a aquellos individuos con presencia de calcio arterial coronario, pero sin eventos coronarios o manifestaciones clínicas hasta el momento de las mediciones, es decir, este último grupo comprende a quienes probablemente con el paso del tiempo podrían desarrollar la enfermedad arterial coronaria (ver Figura 24).

**8.4 Criterios de inclusión y exclusión:** para la selección de la muestra de este proyecto, se establecieron criterios de inclusión y exclusión generales y específicos para cada grupo de estudio (pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles).

**8.4.1 Criterios de inclusión generales para los tres grupos:**

- Ambos sexos.
- Mayores de edad al momento del ingreso al estudio.
- Residentes de la Ciudad de México y área Metropolitana.
- Sujetos que hayan firmado el consentimiento informado.
- Participantes mestizos y dos generaciones previas.
- Un caso o control por familia.

#### **8.4.2 Criterios de inclusión específicos para el grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria:**

- Antecedente personal de Infarto al Miocardio, angioplastia, cirugía de revascularización o estenosis coronaria >50% determinada por angiografía.
- Presencia de 2 o más infartos.
- Edad <55 años en hombres y <65 años en mujeres al momento del diagnóstico de enfermedad arterial coronaria prematura.

#### **8.4.3 Criterios de inclusión específicos para el grupo de aterosclerosis subclínica:**

- Pacientes con CAC >0 (evaluado por tomografía).
- Sin manifestaciones clínicas de enfermedad arterial coronaria.

#### **8.4.4 Criterios de inclusión específicos para el grupo control:**

- Sujetos con 0 de CAC (evaluado por tomografía).
- Sujetos sin manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular.
- Sujetos sin antecedentes de historia familiar de enfermedad arterial coronaria prematura en familiares de primer grado.

#### **8.4.5 Criterios de exclusión en los tres grupos:**

- Individuos con presencia de enfermedades mentales.
- Pacientes con enfermedad oncológica.
- Sujetos con presencia de enfermedad hepática, renal, distiroidismo no tratado e insuficiencia cardiaca congestiva.

- Sujetos con tratamiento de corticoesteroides.
- Participantes que decidieron abandonar el estudio y/o no completar todas las fases.
- Participantes que se retractaron de firmar el consentimiento informado.
- Eventos cardiovasculares agudos tres meses previos al ingreso al estudio.
- Sujetos sin cuantificación del CAC.



Figura 24. Diseño metodológico del estudio.

**8.5 Método de muestreo:** a conveniencia.

**8.6 Cálculo del tamaño de la muestra:** se realizó un muestreo a conveniencia que incluyó 300 participantes divididos en tres grupos. Se integraron de la siguiente forma: 90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, 91 sujetos con aterosclerosis subclínica y 90 controles. El grupo control proviene de la base misma poblacional que los grupos de casos, por lo anterior se consideró la ausencia de sesgo de selección.

**8.7 Procedencia de los sujetos:** todos los sujetos incluidos en el estudio provienen del proyecto GEA.

Parte de los individuos del grupo control fueron seleccionados de la población que acude al banco de sangre del Instituto y otros fueron seleccionados de la población abierta. Dentro del grupo control se detectaron los sujetos con aterosclerosis subclínica; es decir, personas aparentemente sanas, pero con valores de calcio arterial coronario mayor a cero (CAC=0).

Todos los participantes provienen de la población mestizo mexicana. Para este estudio, se consideró mestizos mexicanos a los sujetos (él y sus dos generaciones previas) nacidos en México. Debido a la mezcla que existe entre la población mestizo mexicana, se evaluó el criterio de ancestría con el objetivo de descartar un sesgo étnico de selección. Además, para evaluar la posible influencia de estratificación poblacional, se empleó un panel de 265 marcadores informativos de ascendencia que diferencian entre ascendencia amerindia, europea y africana y genotipado en Illumina BeadStation empleando el ensayo GoldenGate. La ascendencia mundial se determinó empleando el software ADMIXTURE. La ascendencia global promedio no fue significativa entre casos y controles, obteniendo: ascendencia amerindia 55.8% vs 54.0%, caucásicos 34.3% vs 35.8% y africana 9.8% vs 10% (Posadas-Sanchez et al., 2017).

## 8.8 Operacionalización de las variables

Tabla 3. Operacionalización de las variables.

Variable	Operacionalización	Clasificación	Medida	Instrumento
Edad	Tiempo que ha vivido una persona al día en que se realizó el estudio	Cuantitativa	Discreta	Años
Sexo	Condición biológica que distingue al hombre de la mujer	Cualitativa	Nominal	Masculino Femenino
Alcohol	Consumo de bebidas alcohólicas	Cualitativa	Ordinal: dicotómica	Presencia Ausencia
Tabaco	Consumo de nicotina del tabaco	Cualitativa	Ordinal: dicotómica	Presencia Ausencia
Sedentarismo	Falta de actividad física	Cualitativa	Ordinal: dicotómica	Presencia Ausencia
Peso	Fuerza que genera la gravedad sobre el cuerpo humano	Cuantitativa	Continua	Kilogramos
Talla	Designa la altura de un individuo desde los pies hasta el vértice de la cabeza	Cuantitativa	Continua	Metros
Índice de masa corporal	Describe la relación entre el peso y la estatura	Cuantitativa	Continua	Peso(kg)/ estatura(m <sup>2</sup> )
Circunferencia de cintura	Medidas antropométricas para valorar la grasa visceral	Cuantitativa	Continua	Centímetros
Síndrome metabólico	Grupo de trastornos que se presentan al mismo tiempo y aumentan el riesgo de enfermedad cardiaca	Cualitativa	Ordinal: dicotómica	Presencia Ausencia
Tensión arterial sistólica	Presión ejercida (máxima) en las arterias que ocurre cerca del principio del ciclo cardíaco durante la sístole (contracción)	Cuantitativa	Continua	mmHg
Tensión arterial	Presión ejercida (mínima) en las arterias que ocurre en la fase de	Cuantitativa	Continua	mmHg

diastólica	diástole (relajación)				
Glucosa en ayunas	Medida del nivel de glucosa en sangre en ayunas	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
Insulina	Medida del nivel de insulina en sangre	Cuantitativa	Continua	μIU/mL	
Colesterol total	Cantidad de colesterol total en sangre (incluye HDL y LDL)	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
Triglicéridos	Compuesto químico obtenido al formarse ésteres de los tres grupos alcohol de la glicerina con ácidos, generalmente orgánicos	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
Colesterol LDL	Tipo de colesterol referente a lipoproteínas de baja densidad	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
Colesterol HDL	Tipo de colesterol referente a lipoproteínas de alta densidad	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
HOMA	Modelo homeostático para evaluar la resistencia a la insulina	Cuantitativa	Continua	Glucosa e insulina en ayunas	
GAT	Grasa abdominal total	Cuantitativa	Continua	cm <sup>3</sup>	
GAV	Grasa abdominal visceral	Cuantitativa	Continua	cm <sup>3</sup>	
GAS	Grasa abdominal subcutánea	Cuantitativa	Continua	cm <sup>3</sup>	
ApoA	Apolipoproteína A	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
ApoB	Apolipoproteína B	Cuantitativa	Continua	mg/dL	
CpG1,2,3,4,5,6	Media de metilación por cada sitio CpG	Cuantitativa	Continua	Medias de metilación	

## 8.9 Recolección de datos y/o información

### 8.9.1 Entrevista e información sociodemográfica

Los datos sociodemográficos (edad, sexo, escolaridad, estado civil) de los tres grupos de estudio (pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis

subclínica y controles) se obtuvieron mediante la aplicación de cuestionarios estandarizados con la información que ellos mismos proporcionaron. Asimismo, se obtuvo la historia personal y familiar de factores de riesgo cardiovascular, uso de medicamentos y consumo de sustancias (tabaco y alcohol) (ver Anexos 1-3). Por último, se empleó el cuestionario de frecuencias de consumo (diseñado y validado por el Instituto Nacional de Salud Pública) para evaluar los patrones de alimentación y la dieta habitual del año previo.

**8.9.2 Examen físico:** se aplicó el cuestionario de Baecke (Baecke Questionnaire) (Sadeghisani, Dehghan Manshadi, Azimi, & Montazeri, 2016) para medir la actividad física de los participantes, evaluando el trabajo, deporte y tiempo libre, así como la intensidad, frecuencia y la duración de la actividad. La talla se midió con un estadímetro mecánico de pared Seca 222 (Hamburgo, Alemania) y el peso con una báscula calibrada. El Índice de Masa Corporal (IMC) se calculó con la fórmula de peso (kg) / talla (m<sup>2</sup>). Para obtener la medición de circunferencia de cintura, se utilizó una cinta métrica de fibra de vidrio, considerando el punto medio de la distancia entre la parte inferior de la última costilla y la cresta iliaca. La tensión arterial se tomó en sedestación posterior a 5 minutos en reposo empleando un esfigmomanómetro digital Welch Allyn, serie 5200 (Skaneateles Falls, N.Y., E.U.A.).

**8.9.3 Análisis de laboratorio:** las determinaciones de triglicéridos, colesterol total y glucosa en plasma se realizaron en el autoanalizador Hitachi 902 (Boehringer Mannheim, Alemania), utilizando estuches enzimáticos comerciales (Roche Diagnostics, Mannheim Alemania y Wako Chemicals, E.U.A.). El colesterol de las lipoproteínas de alta densidad, se determinó mediante el método enzimático homogéneo (Roche Diagnostics, Mannheim

Alemania). El colesterol de las lipoproteínas de baja densidad fue calculado con la fórmula de Friedewald modificada por De Long. Las concentraciones de apolipoproteína B (apo B) y de apolipoproteína AI (apo A-I), se determinaron por inmunonefelometría (BN Pro Spec nephelometer, Dade Behring Marburg GmbH, Ge.). En el laboratorio de endocrinología, la exactitud y precisión 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 se determinaron por radioinmunoanálisis (Coat-A-count; Diagnostic Products, Los Angeles, CA). Todas las mediciones bioquímicas se realizaron en el Laboratorio de Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología.

**8.9.4 Detección de calcio coronario:** Se empleó un tomógrafo multidetector de 64 canales (Somatom Sensation, Siemens, Erlanger, Alemania) para la detección del calcio arterial coronario. El procedimiento se realizó a los pacientes (excepto a aquellos con antecedentes de cirugía de revascularización e implante de malla intracoronaria) y sujetos controles. Las imágenes fueron interpretadas por un médico radiólogo experto en el área.

## **8.10 Descripción operativa**

### **8.10.1 Extracción del ADN**

Se extrajeron 15 mL de sangre periférica de cada individuo en tubos BD Vacutainer EDTA (con anticoagulante para el análisis de sangre total) y a partir de esta muestra, se obtuvo ADN genómico a partir de la técnica de Tris-HCl (Lahiri & Nurnberger, 1991) (ver Anexo 4). Posteriormente, se verificó la

integridad del ADN en geles de agarosa al 1% teñidos con Midori Green Advance (agente intercalante del ADN).

### **8.10.2 Cuantificación del ADN**

La cuantificación del ADN se realizó en el Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (ThermoFisher) y se empleó una longitud de onda de lectura de 280 nm. Las muestras con índice de pureza de A260/A280 de 1.8 se consideraron como ADN puro.

### **8.10.3 Conversión del ADN con bisulfito**

Se utilizó el kit EpiTect Bisulfito (QIAGEN, Hilden, Alemania) para muestras a partir de 300 y 400 ng de ADN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Seguidamente, el producto obtenido se purificó en las columnas EpiTect Spin Column (QIAGEN, Hilden, Alemania) utilizando buffers y una serie de pasos de centrifugación. A continuación, el ADN tratado se sometió a lavados para remover los restos de bisulfito de sodio. Finalmente, se agregó buffer de elusión y se almacenó a -80 °C para su empleo posterior (ver Anexo 5).

### **8.10.4 PCR para pirosecuenciación**

El ADN tratado por bisulfito fue amplificado empleando el kit PyroMark Q24 AdvancedCpG (QIAGEN, Hilden, Alemania). Se emplearon los primers Reverse y Forward (PyroMark CpG Assay, QIAGEN) para un amplicón de 182 pares de bases con las características descritas en la Tabla 4.

Tabla 4. Primers empleados para PCR.

Primers Reverse and Forward	
Secuencia SORT1	CCGGGCCCCGGGAGACGCCGGGCGAGGCGGGGT
Reverse	TYGGGTTYGGGAGAYGTYGGGYGAGGYGGGGT
Forward	ATCGTCGATGATCGATCGTCGTAGTCG

Los reactivos y cantidades para cada reacción se prepararon de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los volúmenes de ADN y H<sub>2</sub>O variaron de acuerdo a cada muestra para un volumen final de 15 uL. Posterior a la preparación de las muestras, se empleó el termociclador Gene Amp™ PCR System 9700 (ThermoFisher, SCIENTIFIC), con las siguientes condiciones de ciclado: desnaturalización (95° 15 s), hibridación (45 ciclos de 94° 30 s, 56° 30 s y 72° 30 s) y extensión (72° 10 min). Finalmente, la reacción de PCR se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (ver Anexo 6).

#### 8.10.5 Geles de agarosa

Los productos de PCR (amplicones) se visualizaron en una cámara de electroforesis en gel (Thermo EC Midicell Primo EC330) a 60 Voltios en geles de agarosa (molecular grade, biolinemeridian BIOSCIENSE) al 3%, empleando buffer para electroforesis 10x TBE (ThermoScientific) al 0.5X y Bromuro de Etidio (EtBr) (IBI Scientific). A continuación, los geles de agarosa se visualizaron en el transiluminador (BioDoc-It UVP 3-Door Imaging System). Finalmente, los amplicones restantes (13 uL) se almacenaron a -20°C para su uso posterior en el pirosecuenciador (ver Anexo 7).

### 8.10.6 Pirosecuenciación

La pirosecuenciación de bisulfito es una metodología cuantitativa para la metilación del ADN (Mikeska, Felsberg, Hewitt, & Dobrovic, 2011). Cuando los nucleótidos son incorporados en la cadena de ADN analizada se presenta una liberación de pirofosfato y es convertido a ATP. La generación de ATP por medio de una reacción con luciferasa, produce una señal de luz detectable que es proporcional al número de nucleótidos incorporados a la cadena de ADN (Siqueira, Fouad, & Rocas, 2012) (ver Figura 25).

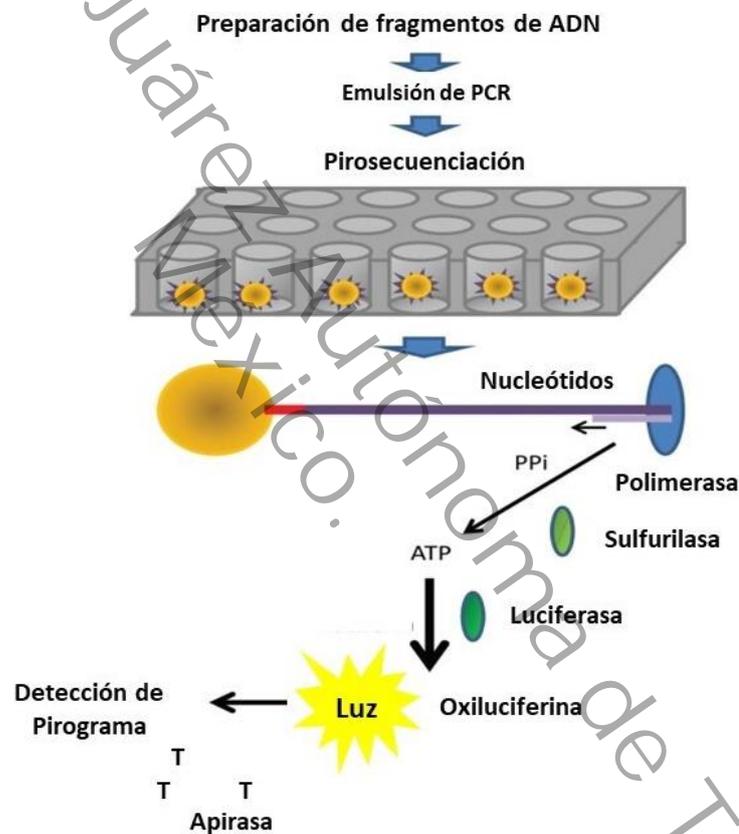


Figura 25. Esquema de la cascada de pirosecuenciación. Tomada y adaptada de (Siqueira et al., 2012).

Para este estudio, la pirosecuenciación se realizó con el kit PyroMark Q24 Advanced (QIAGEN, Hilden, Alemania) con oligonucleótidos específicos para la isla CpG del gen *SORT1* y el equipo PyroMark Q24 (QIAGEN).

Inicialmente se diluyeron los reactivos y almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo de acuerdo a las instrucciones de fabricante. Cada cadena de ADN biotinilada se aisló con 1 uL de estreptavidina-sefarosa HP, 40 uL de PyroMark Binding Buffer y 29 uL de High Purity Water para un volumen total de 70 uL, empleando placas para tubos de PCR de 24 pozos. Seguidamente, se procedió al llenado del cartucho PyroMark Q24 con los volúmenes adecuados de enzima, sustrato y nucleótidos para cada placa, de acuerdo a la información obtenida en la precorrida. Posteriormente se realizó un tratamiento alcalino en la estación de trabajo PyroMark Q24 (QIAGEN). Finalmente, los fragmentos de ADN de una sola cadena biotinilados, se secuenciaron empleando oligonucleótidos específicos de secuenciación en el equipo PyroMark Q24 (QIAGEN) (ver Anexo 8).

### **8.11 Análisis estadístico**

Se realizó la prueba Kolmogórov-Smirnov para la normalidad de la distribución de los datos. Las características clínico-demográficos, variables metabólicas y niveles de metilación entre los grupos de estudio: controles, pacientes y subclínicos; son presentados como medias  $\pm$  DE para variables continuas o porcentaje para variables categóricas. La comparación entre grupos fue realizada con la prueba estadística de ANOVA para datos paramétricos o Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Las variables dicotómicas se compararon por medio de la prueba Chi-cuadrada.

Los resultados de metilación, se analizaron con el Software PyroMark versión 2.0.2.5. para la obtención del porcentaje de metilación de las citosinas de cada sitio CpG. Las comparaciones de metilación entre los grupos se realizaron con

la prueba estadística Kruskal-Wallis. El coeficiente de correlación de Spearman se calculó para variables cualitativas ordinales y la correlación de Pearson para variables cuantitativas. El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa SPSS, versión 24.0. Se consideró una  $p < 0.05$  estadísticamente significativa.

### **8.12 Consideraciones éticas y legales**

Los pacientes recibieron una explicación verbal y escrita en donde se informaron los objetivos del proyecto para obtener su participación en el estudio. Todos los sujetos incluidos, recibieron y firmaron de forma voluntaria el consentimiento informado sin recibir remuneración económica. El estudio cumplió con los criterios de la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Institucional de Ética del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez (INCICH, número 15-915). Posteriormente, considerados los requisitos éticos de la institución, se inició al reclutamiento de los pacientes.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas de los pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles

El estudio incluyó un total de 90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, 91 sujetos con aterosclerosis subclínica y 90 controles. Todos los participantes provienen de la cohorte GEA y son de ascendencia mexicana.

Las características de los grupos de estudio se muestran en la Tabla 5. En total se estudiaron 271 sujetos, con una edad promedio de  $57.25 \pm 8.5$  años. Al respecto y como era de esperar, algunas características como el consumo de tabaco, alcohol, colesterol total y colesterol LDL, son más elevadas en el grupo control y en el de subclínicos que en el grupo de pacientes. Es muy probable que estos resultados se deban al tratamiento farmacológico con estatinas y asesoría sobre modificaciones en el estilo de vida que reciben los pacientes.

Tabla 5. Comparación de las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas de los grupos de estudio.

Característica	Grupo control (n=90)	Grupo EAC (n= 90)	Grupo aterosclerosis subclínica (n= 91)	Valor de p
<i>Características clínicas y sociodemográficas</i>				
Edad (años)	53.76 $\pm$ 8.86	55.36 $\pm$ 6.77	62.58 $\pm$ 7.28	<0.001
Sexo (n,%)				
Mujer	57 (51.8%)	9 (8.2%)	44 (40.0%)	<0.001
Hombre	33 (20.5%)	81 (50.3%)	47 (29.2%)	
Alcohol (sí)	69 (35.6%)	58(29.9%)	67(34.5%)	0.167
Tabaco (sí)	20 (40.8%)	14 (28.6%)	15 (30.6%)	0.452
Sedentarismo (sí)	26 (25.5%)	42 (41.2%)	34 (33.3%)	0.049

Tabla 5 (continuación)

<i>Medidas antropométricas</i>				
Peso (kg)	65.05 ± 9.16	78.24 ± 12.36	75.20 ± 13.93	<0.001
Talla (m)	1.60 ± 0.08	1.64 ± 0.07	1.59 ± 0.10	<0.001
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	25.26 ± 2.80	28.77 ± 3.94	29.30 ± 3.88	<0.001
CC (cm)	86.00 ± 9.15	99.26 ± 9.21	97.54 ± 10.75	<0.001
SM (sí)	0 (0%)	53 (52.5%)	48 (47.5%)	<0.001
TA Sistólica (mmHg)	109.53 ± 12.24	112.23 ± 15.23	126.49 ± 18.20	<0.001
TA Diastólica (mmHg)	67.64 ± 7.79	69.25 ± 9.01	74.47 ± 8.34	<0.001
<i>Medidas bioquímicas y metabólicas</i>				
Glucosa en ayunas (mg/dL)	86.79 ± 7.82	111.67 ± 48.00	112.24 ± 49.36	<0.001
Insulina (µIU/mL)	13.20 ± 5.72	22.50 ± 13.40	21.48 ± 12.68	<0.001
Colesterol total (mg/dL)	190.97 ± 29.37	156.33 ± 38.29	195.35 ± 39.73	<0.001
Triglicéridos (mg/dL)	101.427 ± 25.16	175.65 ± 74.79	185.92 ± 119.80	<0.001
Colesterol LDL (mg/dL)	113.87 ± 29.22	89.14 ± 32.64	119.29 ± 34.00	<0.001
Colesterol HDL (mg/dL)	60.86 ± 10.93	37.70 ± 8.69	45.41 ± 14.52	<0.001
Colesterol no HDL (mg/dL)	130.10 ± 30.39	116.50 ± 38.27	149.93 ± 39.61	<0.001
HOMA	2.83 ± 1.35	6.17 ± 4.48	5.80 ± 3.87	<0.001
GAT (cm <sup>3</sup> )	366.20 ± 124.48	440.03 ± 129.35	488.85 ± 144.90	<0.001
GAV (cm <sup>3</sup> )	113.87 ± 50.18	183.32 ± 73.99	185.57 ± 71.40	<0.001
GAS (cm <sup>3</sup> )	252.17 ± 98.53	256.71 ± 98.95	303.25 ± 110.01	<0.001
ApoA (mg/dL)	156.06 ± 39.27	114.03 ± 23.20	139.19 ± 31.98	<0.001
ApoB (mg/dL)	85.01 ± 25.50	76.03 ± 27.05	98.65 ± 28.62	<0.001
IL-6	4.76 ± 24.95	2.25 ± 3.70	4.0 ± 13.44	0.577
IL-10	7.77 ± 37.43	2.20 ± 4.93	3.51 ± 10.03	0.224

Los datos son presentados como medias ± DE o porcentaje. Chi cuadrada, ANOVA o Kruskal-Wallis de acuerdo a la distribución de los datos. EAC= enfermedad arterial coronaria, IMC= índice de masa corporal, CC= circunferencia de cintura, SM= síndrome metabólico, TA= tensión arterial sistólica o diastólica, HDL= lipoproteínas de alta densidad (por sus siglas en inglés), LDL= lipoproteínas de baja densidad (por sus siglas en inglés), HOMA= modelo homeostático de resistencia a la insulina, GAT= grasa abdominal total, GAV= grasa abdominal visceral, GAS= grasa abdominal subcutánea, ApoA= apolipoproteína A, ApoB= apolipoproteína B, IL= interleucina.

## 9.2 Determinación del estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles

Se determinó el estado de metilación de los tres grupos de estudio por la técnica cuantitativa de pirosecuenciación, con el equipo PyroMark Q24 (QIAGEN) y el Software PyroMark versión 2.0.2.5. (ver Figura 26).

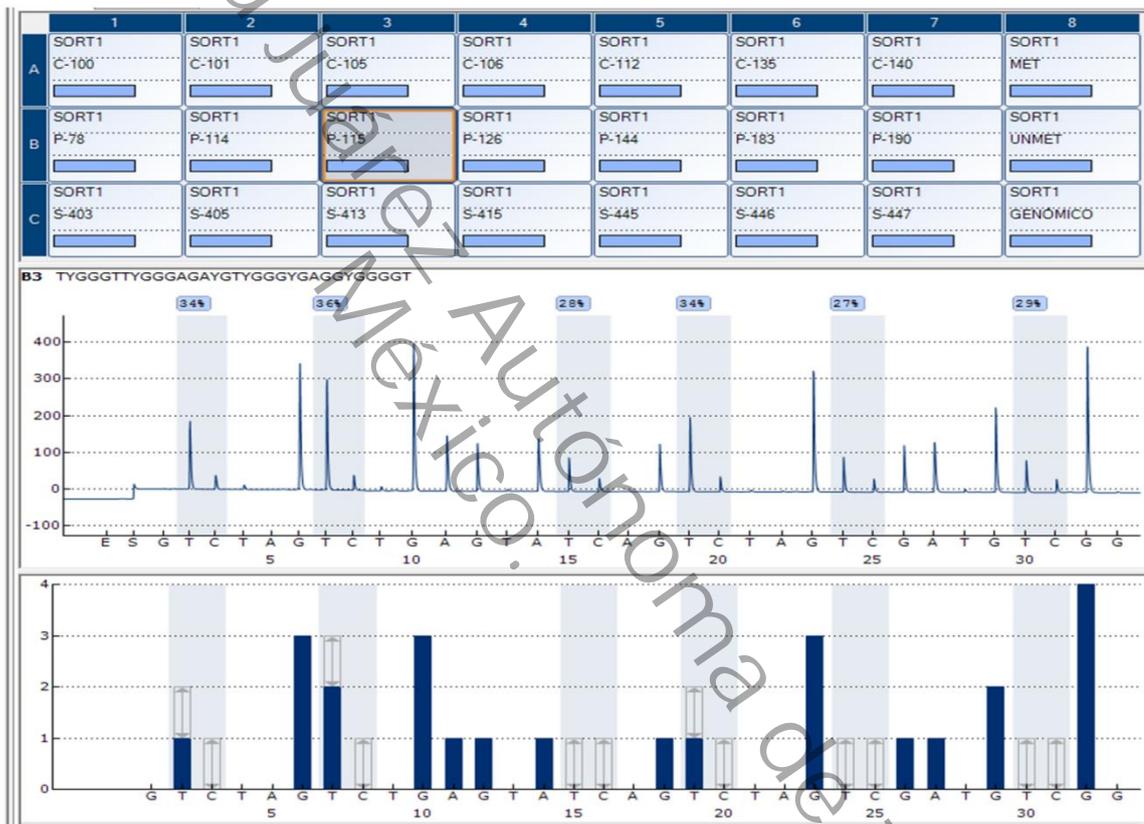


Figura 26. Pirograma de muestras del grupo de control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica.

Además, se obtuvieron las medias de metilación de los seis sitios CpG de cada participante (ver Figura 27) del grupo de controles, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (ver Figura 28).

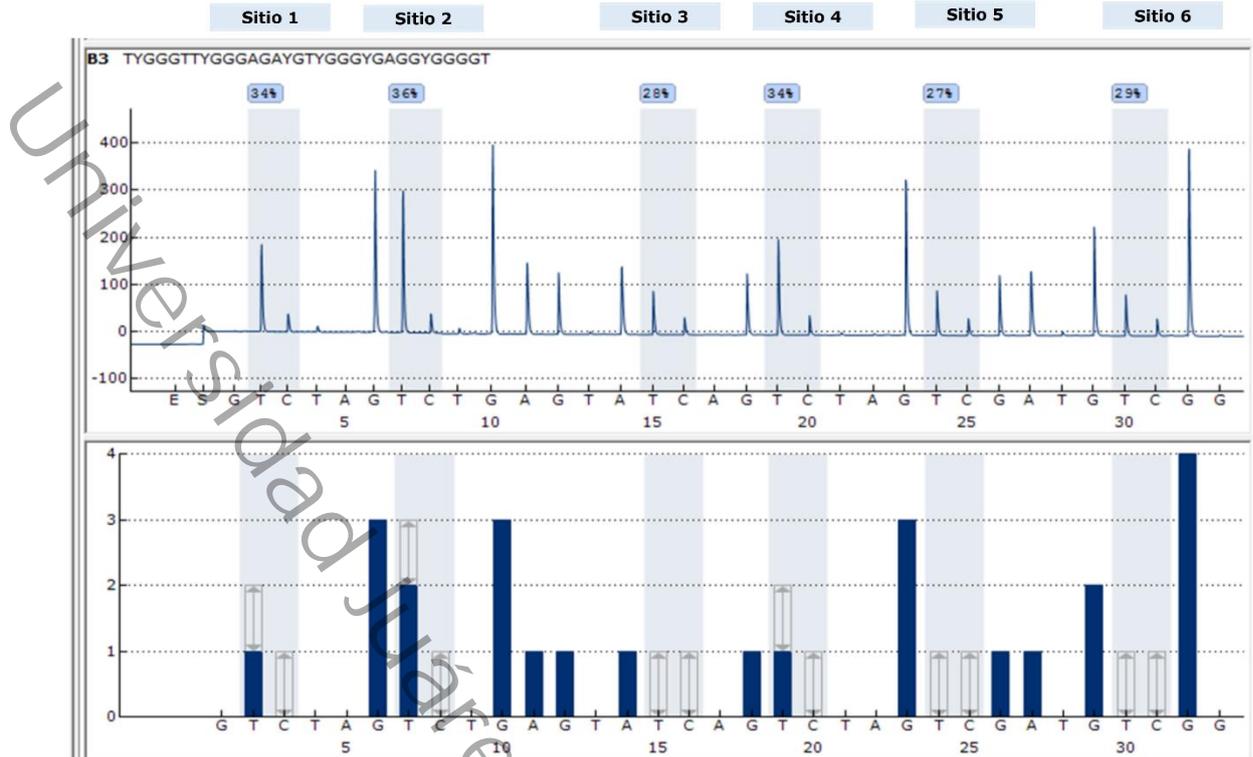


Figura 27. Pirograma de sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de un paciente con enfermedad arterial coronaria.

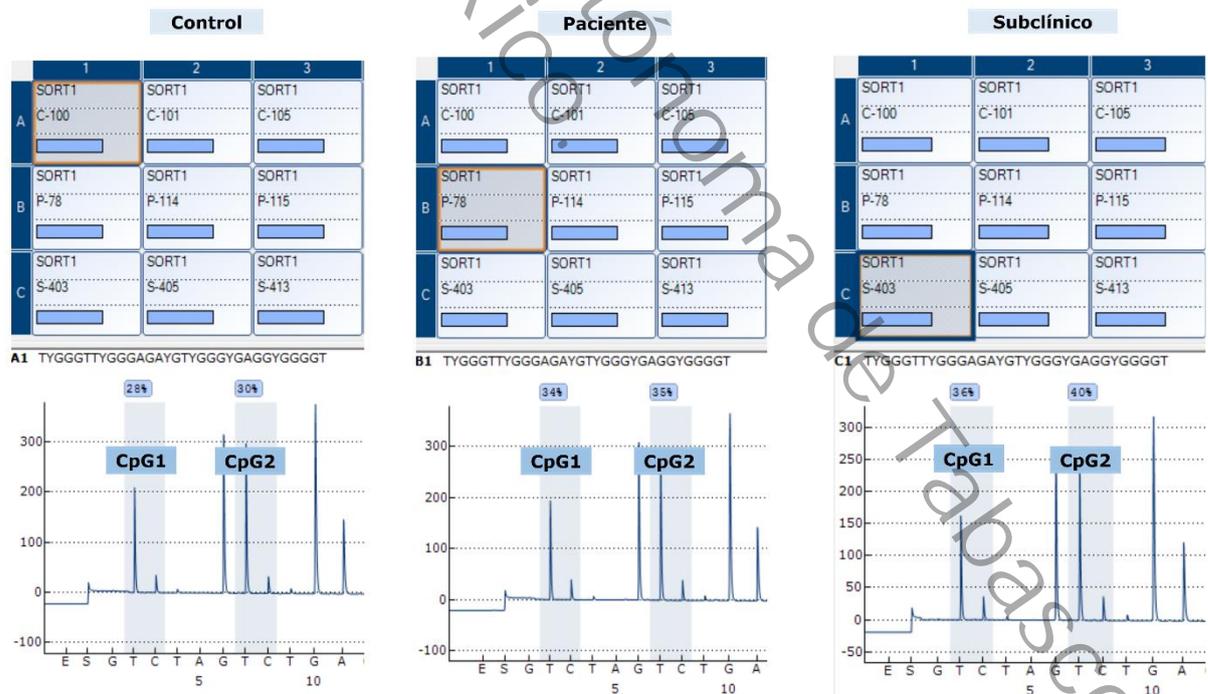


Figura 28. Pirograma de sitios CpG1 y CpG2 del grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica.

Para finalizar, se obtuvieron las medias de metilación totales de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6. El resultado fue de  $23.90 \pm 8.79$  en el grupo control,  $24.14 \pm 8.95$  en el grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria y  $23.37 \pm 8.96$  en el grupo de aterosclerosis subclínica.

### 9.3 Comparación de las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles

Posteriormente, se realizó una comparación entre las medias de metilación obtenidas por cada grupo de estudio de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6. Los resultados muestran una distribución similar entre el grupo control, pacientes con enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (ver Figura 29 y Figura 30).

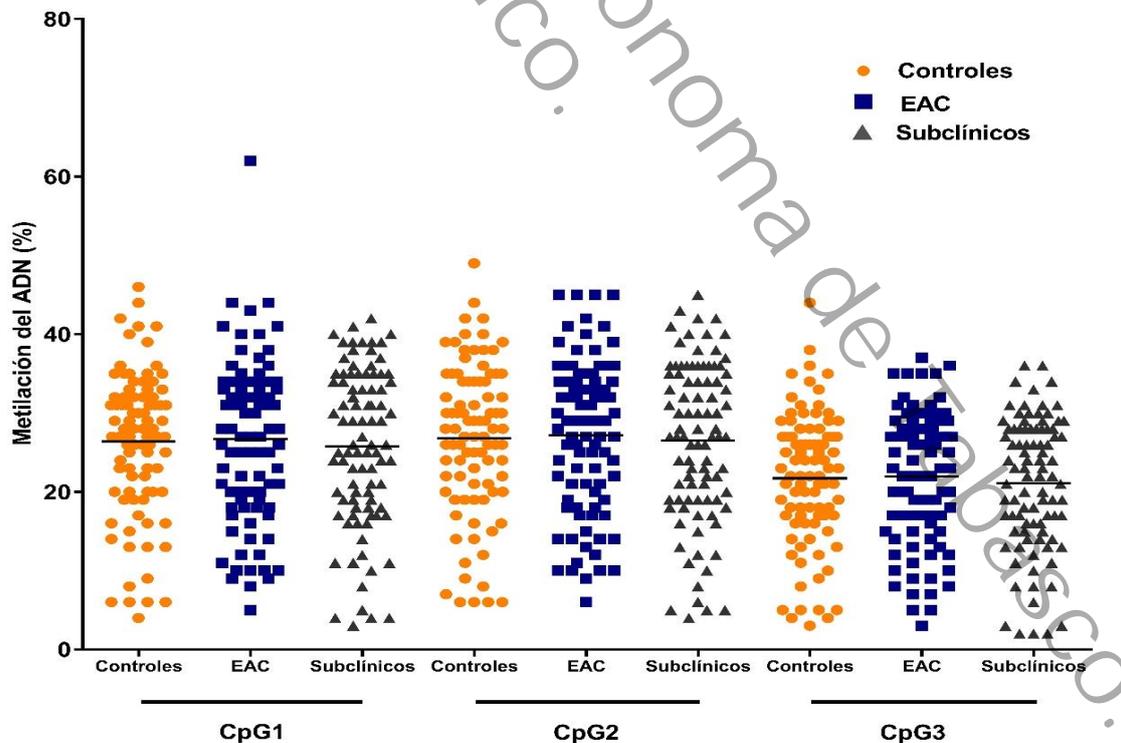


Figura 29. Medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2 y CpG3 de la región promotora del gen *SORT1* en el grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (subclínicos).

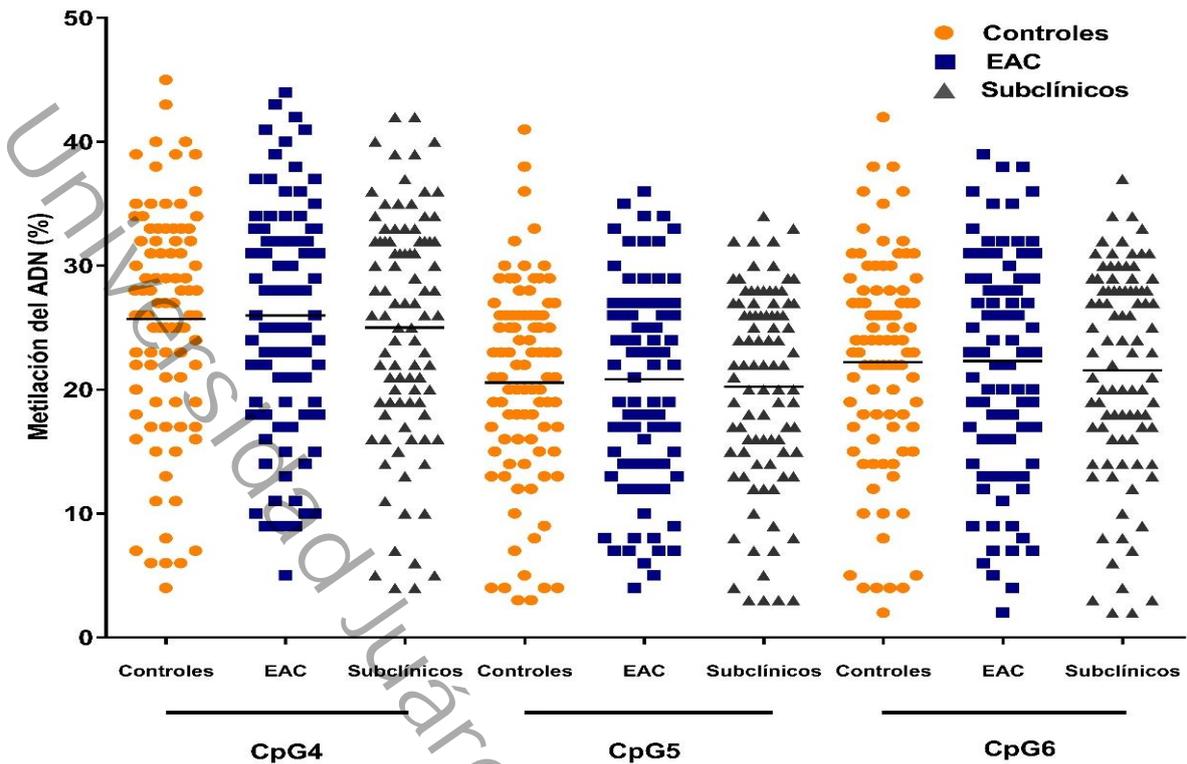


Figura 30. Medias de metilación de los sitios CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en el grupo control, enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica (subclínicos).

#### 9.4 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles

Se realizaron correlaciones entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles.

Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 6. Se observó una correlación positiva entre la insulina y los sitios CpG1 ( $r=0.144$ ,  $p=0.018$ ), CpG2

( $r= 0.135$ ,  $p= 0.026$ ), CpG3 ( $r= 0.165$ ,  $p= 0.007$ ), CpG4 ( $r=0.135$ ,  $p= 0.027$ ) y CpG5 ( $r= 0.149$ ,  $p= 0.015$ ). Además, se encontró una correlación positiva entre el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA, por sus siglas en inglés) y los sitios CpG3 ( $r= 0.138$ ,  $p= 0.023$ ), CpG5 ( $r= 0.128$ ,  $p= 0.036$ ) y CpG6 ( $r= 0.125$ ,  $p= 0.040$ ).

Tabla 6. Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis subclínica y controles las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas.

Características	CpG1		CpG2		CpG3		CpG4		CpG5		CpG6	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Sexo	-0.045	0.459	-0.051	0.401	-0.065	0.290	-0.052	0.396	-0.064	0.297	-0.059	0.334
Edad	-0.086	0.159	-0.088	0.151	-0.081	0.183	-0.067	0.271	-0.071	0.243	-0.057	0.351
IMC	-0.046	0.449	-0.030	0.622	-0.024	0.695	-0.019	0.761	-0.024	0.700	-0.028	0.644
Glucosa en ayunas	0.086	0.157	0.092	0.129	0.098	0.108	0.075	0.219	0.097	0.11	0.106	0.083
Insulina	<b>0.144</b>	<b>0.018</b>	<b>0.135</b>	<b>0.026</b>	<b>0.165</b>	<b>0.007</b>	0.135	<b>0.027</b>	0.149	<b>0.015</b>	0.149	0.15
Colesterol	0.036	0.552	0.020	0.740	0.003	0.965	0.011	0.852	0.009	0.885	0.012	0.847
Triglicéridos	0.080	0.18	0.082	0.17	0.074	0.227	0.051	0.399	0.069	0.258	0.074	0.225
Colesterol LDL	0.036	0.552	0.020	0.740	0.003	0.965	0.011	0.852	0.009	0.885	0.012	0.847
Colesterol HDL	-0.023	0.70	-0.040	0.513	-0.043	0.482	-0.034	0.582	-0.040	0.517	-0.036	0.554
Colesterol no HDL	0.021	0.727	0.013	0.82	-0.003	0.964	0.005	0.936	0.008	0.896	0.003	0.961
HOMA	0.115	0.060	0.114	0.061	<b>0.138</b>	<b>0.023</b>	0.106	0.081	<b>0.128</b>	<b>0.036</b>	<b>0.125</b>	<b>0.040</b>
GAT	-0.091	0.141	-0.083	0.180	-0.081	0.188	-0.074	0.230	-0.069	0.260	-0.078	0.204
GAV	-0.078	0.204	-0.068	0.267	-0.074	0.229	-0.070	0.258	-0.059	0.336	-0.063	0.310
GAS	-0.051	0.409	-0.056	0.367	-0.051	0.409	-0.046	0.46	-0.044	0.473	-0.053	0.386
ApoA	0.014	0.823	0.008	0.901	-0.002	0.977	0.000	0.994	-0.015	0.812	0.003	0.965
ApoB	0.011	0.851	0.007	0.913	-0.009	0.887	-0.003	0.966	-0.014	0.818	-0.005	0.941
IL-6	0.050	0.416	0.050	0.410	0.058	0.340	0.054	0.373	0.075	0.221	0.061	0.319
IL-10	0.023	0.75	0.022	0.718	0.030	0.623	0.031	0.617	0.043	0.476	0.048	0.431

IMC= índice de masa corporal, LDL= lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas en inglés, HDL= lipoproteínas de alta densidad, por sus siglas en inglés, HOMA= modelo homeostático de resistencia a la insulina, GAT= grasa total, GAV= grasa abdominal visceral, GAS= grasa abdominal subcutánea, ApoA= apolipoproteína A, ApoB= apolipoproteína B, IL= interleucina.

### **9.5 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las medidas bioquímicas y metabólicas en pacientes con enfermedad arterial coronaria**

En la Tabla 7 se muestran las correlaciones realizadas entre las medias de metilación de cada sitio CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 y CpG5) del grupo de pacientes y las medidas bioquímicas y metabólicas. Se observaron correlaciones negativas entre el colesterol total mg/dL y los sitios CpG3 ( $r = -0.234$ ,  $p = 0.026$ ), CpG4 ( $r = -0.215$ ,  $p = 0.042$ ) y CpG5 ( $r = -0.217$ ,  $p = 0.039$ ); el colesterol HDL y los sitios CpG3 ( $r = -0.234$ ,  $p = 0.026$ ), CpG4 ( $r = -0.215$ ,  $p = 0.042$ ) y CpG5 ( $r = -0.217$ ;  $p = 0.039$ ); ApoA y los sitios CpG2 ( $r = -0.219$ ,  $p = 0.038$ ), CpG3 ( $r = -0.248$ ,  $p = 0.018$ ), CpG5 ( $r = -0.267$ ,  $p = 0.011$ ) y CpG6 ( $r = -0.215$ ,  $p = 0.042$ ).

Asimismo, se hallaron correlaciones positivas entre la insulina y los sitios CpG1 ( $r = 0.275$ ,  $p = 0.009$ ), CpG2 ( $r = 0.295$ ,  $p = 0.005$ ), CpG3 ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.003$ ), CpG4 ( $r = 0.289$ ,  $p = 0.006$ ), CpG5 ( $r = 0.296$ ,  $p = 0.005$ ) y CpG6 ( $r = 0.276$ ,  $p = 0.009$ ); así como en el HOMA y los sitios CpG1 ( $r = 0.256$ ,  $p = 0.016$ ), CpG2 ( $r = 0.242$ ,  $p = 0.022$ ), CpG3 ( $r = 0.275$ ,  $p = 0.009$ ), CpG4 ( $r = 0.232$ ,  $p = 0.029$ ), CpG5 ( $r = 0.271$ ,  $p = 0.010$ ) y CpG6 ( $r = 0.256$ ,  $p = 0.016$ ).

Tabla 7. Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria y medidas bioquímicas y metabólicas.

Características	CpG1		CpG2		CpG3		CpG4		CpG5		CpG6	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Insulina	<b>0.275</b>	<b>0.009</b>	<b>0.295</b>	<b>0.005</b>	<b>0.310</b>	<b>0.003</b>	<b>0.289</b>	<b>0.006</b>	<b>0.296</b>	<b>0.005</b>	<b>0.276</b>	<b>0.009</b>
Colesterol total	-0.201	0.057	-0.206	0.051	<b>-0.234</b>	<b>0.026</b>	<b>-0.215</b>	<b>0.042</b>	<b>-0.217</b>	<b>0.039</b>	-0.178	0.093
Triglicéridos	0.163	0.125	0.142	0.182	0.124	0.246	0.100	0.346	0.116	0.275	0.117	0.271
Colesterol LDL	-0.099	0.356	-0.119	0.267	-0.149	0.164	-0.147	0.170	-0.129	0.228	-0.155	0.147
Colesterol HDL	-0.201	0.057	-0.206	0.051	<b>-0.234</b>	<b>0.026</b>	<b>-0.215</b>	<b>0.042</b>	<b>-0.217</b>	<b>0.039</b>	-0.178	0.093
Colesterol no HDL	-0.061	0.571	-0.081	0.450	-0.110	0.300	-0.107	0.314	-0.093	0.381	-0.116	0.278
HOMA	<b>0.256</b>	<b>0.016</b>	<b>0.242</b>	<b>0.022</b>	<b>0.275</b>	<b>0.009</b>	<b>0.232</b>	<b>0.029</b>	<b>0.271</b>	<b>0.010</b>	<b>0.256</b>	<b>0.016</b>
GAT	-0.061	0.57	-0.09	0.38	-0.085	0.444	-0.066	0.55	-0.095	0.39	-0.079	0.473
GAV	-0.051	0.644	-0.066	0.554	-0.054	0.625	-0.029	0.795	-0.045	0.686	-0.029	0.792
GAS	-0.063	0.56	-0.107	0.334	-0.084	0.445	-0.078	0.483	-0.106	0.339	-0.097	0.381
ApoA	-0.194	0.067	<b>-0.219</b>	<b>0.038</b>	<b>-0.248</b>	<b>0.018</b>	-0.241	0.22	<b>-0.267</b>	<b>0.011</b>	<b>-0.215</b>	<b>0.042</b>
ApoB	-0.069	0.515	-0.109	0.308	-0.131	0.220	-0.131	0.220	-0.143	0.178	-0.145	0.172
IL-6	0.208	0.052	0.241	0.235	0.028	0.246	0.021	0.272	0.010	0.236	0.240	0.025
IL-10	0.025	0.819	0.041	0.705	0.052	0.631	0.052	0.633	0.072	0.502	0.065	0.546

LDL= lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas en inglés, HDL= lipoproteínas de alta densidad, por sus siglas en inglés, HOMA= modelo homeostático de resistencia a la insulina, GAT= grasa total, GAV= grasa abdominal visceral, GAS= grasa abdominal subcutánea, ApoA= apolipoproteína A, ApoB= apolipoproteína B, IL= interleucina.

## 9.6 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con las medidas bioquímicas y metabólicas en sujetos con aterosclerosis subclínica

Por otra parte, en la Tabla 8 se muestran las correlaciones entre las medias de metilación de cada sitio CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 y CpG5) del grupo de aterosclerosis subclínica y las medidas bioquímicas y metabólicas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 8. Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo de aterosclerosis subclínica y las medidas bioquímicas y metabólicas.

Característica	CpG1		CpG2		CpG3		CpG4		CpG5		CpG6	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Insulina	-0.054	0.614	-0.039	0.717	-0.019	0.856	-0.029	0.786	-0.033	0.753	-0.014	0.894
Colesterol total	0.149	0.158	0.157	0.136	0.151	0.153	0.151	0.154	0.133	0.210	0.169	0.110
Triglicéridos	0.147	0.163	0.146	0.167	0.118	0.263	0.100	0.346	0.122	0.251	0.145	0.169
Colesterol LDL	0.122	0.249	0.122	0.248	0.120	0.259	0.127	0.231	0.111	0.296	0.129	0.224
Colesterol HDL	0.000	0.998	0.002	0.985	0.006	0.956	0.028	0.794	0.011	0.917	-0.008	0.943
Colesterol no HDL	0.125	0.239	0.123	0.244	0.123	0.247	0.112	0.290	0.100	0.347	0.142	0.180
HOMA	-0.034	0.746	0.001	0.990	0.002	0.984	-0.005	0.963	-0.002	0.985	0.011	0.915
GAT	-0.024	0.823	-0.020	0.850	-0.029	0.788	-0.016	0.879	-0.011	0.919	-0.010	0.927
GAV	0.074	0.485	0.076	0.473	0.051	0.630	0.049	0.647	0.67	0.530	0.081	0.447
GAS	-0.118	0.263	-0.111	0.294	-0.102	0.335	-0.082	0.441	-0.077	0.469	-0.097	0.360
ApoA	0.087	0.415	0.106	0.317	0.116	0.275	0.118	0.264	0.086	0.418	0.093	0.378
ApoB	-0.061	0.566	-0.062	0.560	-0.065	0.538	-0.074	0.489	-0.094	0.378	-0.059	0.577
IL-6	0.116	0.298	0.138	0.217	0.115	0.304	0.122	0.276	0.125	0.265	0.108	0.336
IL-10	0.086	0.442	0.070	0.534	0.068	0.546	0.060	0.592	0.081	0.467	0.069	0.540

LDL= lipoproteínas de baja densidad, por sus siglas en inglés, HDL= lipoproteínas de alta densidad, por sus siglas en inglés, HOMA= modelo homeostático de resistencia a la insulina, GAT= grasa total, GAV= grasa abdominal visceral, GAS= grasa abdominal subcutánea, ApoA= apolipoproteína A, ApoB= apolipoproteína B, IL= interleucina.

### 9.7 Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* con el Calcio Arterial Coronario en pacientes con enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica

Debido a que el Calcio Arterial Coronario (CAC) es un indicador de la presencia de aterosclerosis, se realizó una correlación entre las medias de metilación de cada sitio CpG estudiado del gen *SORT1* y la presencia de CAC en el grupo control y en el grupo de pacientes. Los resultados se muestran en la Tabla 9. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 9. Correlación entre las medias de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 del grupo control y aterosclerosis subclínica y el Calcio Arterial Coronario.

CAC	CpG1		CpG2		CpG3		CpG4		CpG5		CpG6	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Grupo control	-0.127	0.233	-0.099	0.353	-0.121	0.257	-0.106	0.321	-0.105	0.326	-0.126	0.237
Grupo aterosclerosis subclínica	-0.005	0.962	-0.20	0.848	-0.009	0.930	-0.012	0.930	-0.000	0.998	-0.011	0.916

CAC= calcio arterial coronario

## 10. DISCUSIÓN

*SORT1* es un nuevo gen que se asocia con factores de riesgo cardiovascular (Goettsch et al., 2018). En el presente trabajo, realizamos un estudio epigenético por pirosecuenciación que incluyó 271 participantes (divididos en tres grupos de estudio) provenientes de la cohorte GEA e identificamos 6 sitios CpG. El objetivo de este estudio fue evaluar el estado de metilación de los sitios CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6 de la región promotora del gen *SORT1* en 90 pacientes con enfermedad arterial coronaria, 91 sujetos con aterosclerosis subclínica y 90 controles.

Los datos mostraron respecto a las características clínicas, sociodemográficas, antropométricas, bioquímicas y metabólicas diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. Esto se explica debido a que se trata de poblaciones con características distintas: los pacientes reciben tratamiento farmacológico con estatinas y asesoría sobre modificaciones en el estilo de vida. Por otra parte, el grupo control está conformado por sujetos con ausencia de la enfermedad y un estilo de vida menos riguroso. Finalmente, las personas en fase subclínica no presentan la enfermedad y desconocen la presencia de calcio arterial coronario, como consecuencia tienen un estilo de vida menos riguroso.

Al determinar el estado de metilación de los 6 sitios CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6) en la región promotora del gen *SORT1* y después comparar las medias de metilación entre los grupos, se observó una distribución similar en los pacientes con enfermedad arterial coronaria  $24.14 \pm 8.95$ , sujetos con aterosclerosis subclínica  $23.37 \pm 8.96$  y controles  $23.90 \pm 8.79$  ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, al correlacionar las medias de metilación de cada

sitio CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 y CpG5) de los tres grupos de estudio con las variables clínicas y metabólicas, se observó una correlación positiva entre la insulina y los sitios CpG1 ( $r=0.144$ ,  $p=0.018$ ), CpG2 ( $r= 0.135$ ,  $p= 0.026$ ), CpG3 ( $r= 0.165$ ,  $p= 0.007$ ), CpG4 ( $r=0.135$ ,  $p= 0.027$ ) y CpG5 ( $r= 0.149$ ,  $p= 0.015$ ). Asimismo, se encontró una segunda correlación positiva entre el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA, por sus siglas en inglés) y los sitios CpG3 ( $r= 0.138$ ,  $p= 0.023$ ), CpG5 ( $r= 0.128$ ,  $p= 0.036$ ) y CpG6 ( $r= 0.125$ ,  $p= 0.040$ ) lo que indica que, a mayor nivel de insulina y HOMA, mayor metilación en los sitios CpG. Al respecto, la resistencia a la insulina involucra una compleja interacción de factores genéticos, ambientales y es una característica determinante de la diabetes tipo 2, que representa uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (De Rosa et al., 2018). Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Zhao et al., quienes realizaron un estudio en gemelos y observaron que los niveles de metilación de los cuatro sitios CpG estudiados se asociaron con resistencia a la insulina (medido por HOMA) y con un aumento en los niveles de metilación global (Zhao, Goldberg, Bremner, & Vaccarino, 2012).

Estos hallazgos son importantes debido a que la resistencia a la insulina y los niveles altos de glucosa, favorecen el estrés oxidativo y la disfunción endotelial promoviendo la aterogénesis (De Rosa et al., 2018). Además, el riesgo de presentar enfermedad arterial coronaria es aproximadamente tres veces mayor en sujetos que presentan resistencia a la insulina en comparación con los que no la desarrollan (Adeva-Andany, Martinez-Rodriguez, Gonzalez-Lucan, Fernandez-Fernandez, & Castro-Quintela, 2019).

Posteriormente, se realizaron correlaciones entre las medias de metilación de cada sitio CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4, CpG5 y CpG6) de los 3 grupos de estudio y las variables metabólicas. Se observó significancia estadística solo en el grupo de pacientes, en donde se obtuvieron correlaciones positivas entre la insulina y los sitios CpG1 ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG2 ( $r= 0.295$ ,  $p= 0.005$ ), CpG3 ( $r= 0.3$ ,  $p= 0.003$ ), CpG4 ( $r= 0.289$ ,  $p= 0.006$ ), CpG5 ( $r= 0.296$ ,  $p= 0.005$ ) y CpG6 ( $r= 0.276$ ,  $p= 0.009$ ); así como entre el HOMA con los sitios CpG1 ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ), CpG2 ( $r= 0.242$ ,  $p= 0.022$ ), CpG3 ( $r= 0.275$ ,  $p= 0.009$ ), CpG4 ( $r= 0.232$ ,  $p= 0.029$ ), CpG5 ( $r= 0.271$ ,  $p= 0.010$ ) y CpG6 ( $r= 0.256$ ,  $p= 0.016$ ), lo que indica que, a mayor nivel de insulina y HOMA, mayor metilación del gen. Estos resultados concuerdan con la participación de sortilina en trastornos metabólicos y cardiovasculares, incrementado el riesgo para contribuir a la iniciación y progresión de placas de aterosclerosis. Además, de manera particular, con la captación de glucosa en diabetes tipo 2 y biogénesis de GLUT4 (Talbot et al., 2018).

Por otro lado, se encontraron correlaciones negativas entre el colesterol total mg/dL y los sitios CpG3 ( $r= -0.234$ ,  $p= 0.026$ ), CpG4 ( $r= -0.215$ ,  $p= 0.042$ ) y CpG5 ( $r= -0.217$ ,  $p= 0.039$ ); el colesterol HDL y los sitios CpG3 ( $r= -0.234$ ,  $p= 0.026$ ), CpG4 ( $r= -0.215$ ,  $p= 0.042$ ) y CpG5 ( $r= -0.217$ ;  $p= 0.039$ ); ApoA y los sitios CpG2 ( $r= -0.219$ ,  $p= 0.038$ ), CpG3 ( $r= -0.248$ ,  $p= 0.018$ ), CpG5 ( $r= -0.267$ ,  $p= 0.011$ ) y CpG6 ( $r= -0.215$ ,  $p= 0.042$ ). Actualmente existe controversia con la participación de sortilina y la probable disminución del flujo de salida del colesterol al inducir el aumento en la acumulación de lípidos intracelulares (Patel et al., 2015); debido a que en otro grupo de estudio, contrario a los resultados obtenidos, no hubo diferencias en la captación de LDL en

macrófagos del grupo control, al compararse en modelos animales en donde se deletó el gen de *SORT1* (Mortensen et al., 2014).

Para finalizar, se realizó una correlación entre las medias de metilación de cada sitio CpG estudiado del gen y la presencia de CAC en el grupo control y en el grupo de aterosclerosis subclínica. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Con base en estos resultados, estudios recientes han mostrado el efecto de sortilina en el proceso de calcificación vascular. No obstante, esta participación no se ha elucidado por completo, por lo que se requieren más estudios para establecer un mecanismo molecular definido en la aterosclerosis subclínica (Goettsch et al., 2018).

Es importante mencionar, que este es el primer estudio que aborda el estado de metilación en la región promotora del gen *SORT1* en sujetos con Enfermedad Arterial Coronaria en población mexicana y por lo tanto son necesarios más estudios para replicar y validar los resultados mostrados. Además, el presente trabajo cuenta con varias fortalezas. 1) Es el primer estudio que aborda el estado de metilación en la región promotora del gen *SORT1* en sujetos con Enfermedad Arterial Coronaria en población mexicana. 2) El estudio incluyó datos tomográficos, clínicos y bioquímicos. Por lo tanto, se pudo realizar un gran número de correlaciones entre diferentes variables confusoras de riesgo cardiovascular. 3) Hasta el momento es el único trabajo que incluye un grupo con aterosclerosis subclínica con una caracterización tomográfica basada en los niveles de CAC. 4) El grupo control es considerado en base a niveles de CAC = 0 a diferencia de otros estudios que incluyen controles con un porcentaje mayor al 50% con estenosis, y debido a ello, podría existir un sesgo de selección (Peng et al., 2014). 5) Se utilizó un método

cuantitativo para analizar el porcentaje específico de metilación a diferencia de otros trabajos que emplean estrategias experimentales cualitativas (García-Cardona et al., 2014; Marusa Borgonio-Cuadra et al., 2018; Peng et al., 2014).

No obstante, el trabajo también presenta limitaciones. 1) Se trabajó con un diseño de tipo transversal, por lo que las conclusiones no reflejan causalidad. 2) La selección de los participantes no fue realizada al azar, por lo tanto, los hallazgos encontrados no son aplicables a la población general. 3) El nivel de metilación fue determinado a partir de ADN extraído de sangre periférica, sin embargo, hay evidencia en otro estudio de metilación realizados en pacientes con EAC por la dificultad de obtener el material genético de tejido específico (Peng et al., 2014).

Además, es importante considerar que las correlaciones halladas, aunque fueron estadísticamente significativa ( $p < 0.0$ ), muestran una tendencia ya que el valor de  $r$  se encuentra lejano a la unidad. Sin embargo, al tratarse de un estudio piloto, resulta interesante profundizar en mecanismos epigenéticos adicionales para establecer una mejor comprensión de las correlaciones encontradas.

En resumen, los presentes resultados muestran que el estado de metilación de varios sitios CpG en el promotor del gen de *SORT1* son afectados por el nivel de insulina y HOMA en los 3 grupos estudiados y también impactan en el grupo de pacientes con enfermedad arterial coronaria. Finalmente, en el mismo grupo de pacientes hay variación en el estatus de metilación por los niveles de Colesterol total, Colesterol HDL y ApoA.

## 11. CONCLUSIÓN

Los principales hallazgos de este estudio fueron las correlaciones obtenidas entre la insulina, el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA) y los sitios CpG (CpG1, CpG2, CpG3, CpG4 CpG5 y CpG6), que sugieren que a mayor nivel de HOMA e insulina, mayor metilación en los sitios CpG.

Sin embargo, estos datos deben ser interpretados de manera cautelosa, debido a que es necesario realizar la medición de los niveles en suero de *SORT1* para integrar la participación del estado de metilación en la regulación de la expresión del gen y así identificar nuevos mecanismos fisiopatológicos que participen en el desarrollo de la enfermedad. Por otra parte, futuros estudios podrían confirmar y validar los resultados obtenidos en otras poblaciones, con la finalidad de ser utilizados como un marcador epigenético de anomalías metabólicas en enfermedades complejas y multifactoriales.

## 12. PERSPECTIVAS

Este estudio será clave para la realización de futuras investigaciones en donde se involucre la metilación del gen *SORT1* en el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria y aterosclerosis subclínica en distintas poblaciones y áreas de conocimiento, como la epigenética y biología molecular; así como la posibilidad de establecer el mecanismo molecular de la enfermedad.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

### 13. REFERENCIAS

- Adeva-Andany, M. M., Martinez-Rodriguez, J., Gonzalez-Lucan, M., Fernandez-Fernandez, C., & Castro-Quintela, E. (2019). Insulin resistance is a cardiovascular risk factor in humans. *Diabetes Metab Syndr*, *13*(2), 1449-1455. doi:10.1016/j.dsx.2019.02.023
- Ali, M. T., & Al Suwaidi, J. (2019). Racial and ethnic differences in cardiovascular disease and outcome in type 1 diabetes patients. *Expert Rev Endocrinol Metab*, *14*(4), 225-231. doi:10.1080/17446651.2019.1613887
- Allport, S. A., Kikah, N., Abu Saif, N., Ekokobe, F., & Atem, F. D. (2016). Parental Age of Onset of Cardiovascular Disease as a Predictor for Offspring Age of Onset of Cardiovascular Disease. *PLoS One*, *11*(12), e0163334. doi:10.1371/journal.pone.0163334
- Andersson, C. H., Hansson, O., Minthon, L., Andreasen, N., Blennow, K., Zetterberg, H., et al. (2016). A Genetic Variant of the Sortilin 1 Gene is Associated with Reduced Risk of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *53*(4), 1353-1363. doi:10.3233/jad-160319
- Antoniades, C., Antonopoulos, A. S., & Deanfield, J. (2019). Imaging residual inflammatory cardiovascular risk. *Eur Heart J*. doi:10.1093/eurheartj/ehz474
- Avogaro, A. (2016). [Cardiovascular disease in diabetic patients: risk factors, clinical history and prevention]. *G Ital Cardiol (Rome)*, *17*(12 Suppl 2), 3s-12. doi:10.1714/2616.26910
- Ayatollahi, H., Gholamhosseini, L., & Salehi, M. (2019). Predicting coronary artery disease: a comparison between two data mining algorithms. *BMC Public Health*, *19*(1), 448. doi:10.1186/s12889-019-6721-5
- Balakumar, P., Maung, U. K., & Jagadeesh, G. (2016). Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Pharmacol Res*, *113*(Pt A), 600-609. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.040
- Balla, C., Pavasini, R., & Ferrari, R. (2018). Treatment of Angina: Where Are We? *Cardiology*, *140*(1), 52-67. doi:10.1159/000487936
- Barone LR, Rodríguez CE, Ghigliani ML, editors. (2008). *Anatomy and Physiology of the Human Body* (B. A. M. G. Clasa Ed. 2007-2008 ed.). Buenos Aires: MIRV Group Clasa.
- Bell, C. N., Thorpe, R. J., Jr., Bowie, J. V., & LaVeist, T. A. (2018). Race disparities in cardiovascular disease risk factors within socioeconomic status strata. *Ann Epidemiol*, *28*(3), 147-152. doi:10.1016/j.annepidem.2017.12.007
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., et al. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, *139*(10), e56-e528. doi:10.1161/cir.0000000000000659
- Benjamin, E. J., Virani, S. S., Callaway, C. W., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., et al. (2018). Heart Disease and Stroke Statistics-2018 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, *137*(12), e67-e492. doi:10.1161/cir.0000000000000558
- Bittencourt, M. S. (2018). Family History of Cardiovascular Disease: How Detailed Should It Be? *Mayo Clin Proc*, *93*(9), 1167-1168. doi:10.1016/j.mayocp.2018.07.010
- Bo, I., Semple, T., Cheasty, E., Rubens, M. B., Ho, S. Y., Rigby, M. L., et al. (2018). Left circumflex coronary artery from the pulmonary artery in scimitar syndrome. *Pediatr Radiol*, *48*(5), 632-637. doi:10.1007/s00247-017-4067-7
- Buccheri, S., D'Arrigo, P., Franchina, G., & Capodanno, D. (2018). Risk Stratification in Patients with Coronary Artery Disease: A Practical

- Walkthrough in the Landscape of Prognostic Risk Models. *Interv Cardiol*, 13(3), 112-120. doi:10.15420/icr.2018.16.2
- Buckberg, G. D., Nanda, N. C., Nguyen, C., & Kocica, M. J. (2018). What Is the Heart? Anatomy, Function, Pathophysiology, and Misconceptions. *Journal of cardiovascular development and disease*, 5(2), 33. doi:10.3390/jcdd5020033
- Burg, M. M., & Soufer, R. (2016). Post-traumatic Stress Disorder and Cardiovascular Disease. *Curr Cardiol Rep*, 18(10), 94. doi:10.1007/s11886-016-0770-5
- Burge, M. R., Eaton, R. P., Commerci, G., Cavanaugh, B., Ramo, B., & Schade, D. S. (2017). Management of Asymptomatic Patients With Positive Coronary Artery Calcium Scans. *J Endocr Soc*, 1(6), 588-599. doi:10.1210/js.2016-1080
- Cappuccio, F. P., & Miller, M. A. (2016). Cardiovascular disease and hypertension in sub-Saharan Africa: burden, risk and interventions. *Intern Emerg Med*, 11(3), 299-305. doi:10.1007/s11739-016-1423-9
- Carlo, A. S., Nykjaer, A., & Willnow, T. E. (2014). Sorting receptor sortilin-a culprit in cardiovascular and neurological diseases. *J Mol Med (Berl)*, 92(9), 905-911. doi:10.1007/s00109-014-1152-3
- Chen, G., Fan, X., Li, Y., He, L., Wang, S., Dai, Y., et al. (2020). Promoter aberrant methylation status of ADRA1A is associated with hepatocellular carcinoma. *Epigenetics*, 1-18. doi:10.1080/15592294.2019.1709267
- Chen, J., Budoff, M. J., Reilly, M. P., Yang, W., Rosas, S. E., Rahman, M., et al. (2017). Coronary Artery Calcification and Risk of Cardiovascular Disease and Death Among Patients With Chronic Kidney Disease. *JAMA Cardiol*, 2(6), 635-643. doi:10.1001/jamacardio.2017.0363
- Coco, C., Sgarra, L., Potenza, M. A., Nacci, C., Pasculli, B., Barbano, R., et al. (2019). Can Epigenetics of Endothelial Dysfunction Represent the Key to Precision Medicine in Type 2 Diabetes Mellitus? *Int J Mol Sci*, 20(12). doi:10.3390/ijms20122949
- Costantino, S., Camici, G. G., Mohammed, S. A., Volpe, M., Lüscher, T. F., & Paneni, F. (2018). Epigenetics and cardiovascular regenerative medicine in the elderly. *International journal of cardiology*, 250, 207-214. doi:10.1016/j.ijcard.2017.09.188
- Coutinho, M. F., Bourbon, M., Prata, M. J., & Alves, S. (2013). Sortilin and the risk of cardiovascular disease. *Rev Port Cardiol*, 32(10), 793-799. doi:10.1016/j.repc.2013.02.006
- Criqui, M. H., Knox, J. B., Denenberg, J. O., Forbang, N. I., McClelland, R. L., Novotny, T. E., et al. (2017). Coronary Artery Calcium Volume and Density: Potential Interactions and Overall Predictive Value: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *JACC Cardiovasc Imaging*, 10(8), 845-854. doi:10.1016/j.jcmg.2017.04.018
- De Rosa, S., Arcidiacono, B., Chiefari, E., Brunetti, A., Indolfi, C., & Foti, D. P. (2018). Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Frontiers in endocrinology*, 9, 2-2. doi:10.3389/fendo.2018.00002
- Delaney, C., Garg, S. K., & Yung, R. (2015). Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods Mol Biol*, 1343, 249-264. doi:10.1007/978-1-4939-2963-4\_19
- Dini, F. L., Galeotti, G. G., Terlizzese, G., Fabiani, I., Pugliese, N. R., & Rovai, J. (2019). Left Ventricular Mass and Thickness: Why Does It Matter? *Heart Fail Clin*, 15(2), 159-166. doi:10.1016/j.hfc.2018.12.013

- Dor, Y., & Cedar, H. (2018). Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet*, 392(10149), 777-786. doi:10.1016/s0140-6736(18)31268-6
- Dron, J. S., & Hegele, R. A. (2017). Genetics of Triglycerides and the Risk of Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 19(7), 31. doi:10.1007/s11883-017-0667-9
- Ehler, E. (2016). Cardiac cytoarchitecture - why the "hardware" is important for heart function! *Biochim Biophys Acta*, 1863(7 Pt B), 1857-1863. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.11.006
- Emerson, K. G., & Gay, J. (2017). Physical Activity and Cardiovascular Disease Among Older Adults: The Case of Race and Ethnicity. *J Aging Phys Act*, 25(4), 505-509. doi:10.1123/japa.2016-0012
- Emini Veseli, B., Perrotta, P., De Meyer, G. R. A., Roth, L., Van der Donckt, C., Martinet, W., et al. (2017). Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*, 816, 3-13. doi:10.1016/j.ejphar.2017.05.010
- Eryilmaz, I. E., Cecener, G., Erer, S., Egeli, U., Tunca, B., Zarifoglu, M., et al. (2017). Epigenetic approach to early-onset Parkinson's disease: low methylation status of SNCA and PARK2 promoter regions. *Neurol Res*, 39(11), 965-972. doi:10.1080/01616412.2017.1368141
- Estrella, M. L., Rosenberg, N. I., Durazo-Arvizu, R. A., Gonzalez, H. M., Loop, M. S., Singer, R. H., et al. (2018). The association of employment status with ideal cardiovascular health factors and behaviors among Hispanic/Latino adults: Findings from the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos (HCHS/SOL). *PLoS One*, 13(11), e0207652. doi:10.1371/journal.pone.0207652
- Evans-Meza, R., Perez-Fallas, J., & Bonilla-Carrion, R. (2019). Characteristics of mortality due to ischemic heart disease in Costa Rica from 1970 to 2014. *Arch Cardiol Mex*, 89(1), 33-45. doi:10.24875/acme.m19000006
- Faggiano, P., Dasseni, N., Gaibazzi, N., Rossi, A., Henein, M., & Pressman, G. (2019). Cardiac calcification as a marker of subclinical atherosclerosis and predictor of cardiovascular events: A review of the evidence. *Eur J Prev Cardiol*, 26(11), 1191-1204. doi:10.1177/2047487319830485
- Fioranelli, M., Bottaccioli, A. G., Bottaccioli, F., Bianchi, M., Rovesti, M., & Rocchia, M. G. (2018). Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Front Immunol*, 9, 2031. doi:10.3389/fimmu.2018.02031
- Ford, T. J., Corcoran, D., & Berry, C. (2018). Stable coronary syndromes: pathophysiology, diagnostic advances and therapeutic need. *Heart*, 104(4), 284-292. doi:10.1136/heartjnl-2017-311446
- Garcia-Cardona, M. C., Huang, F., Garcia-Vivas, J. M., Lopez-Camarillo, C., Del Rio Navarro, B. E., Navarro Olivos, E., et al. (2014). DNA methylation of leptin and adiponectin promoters in children is reduced by the combined presence of obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, 38(11), 1457-1465. doi:10.1038/ijo.2014.30
- Giannakopoulou, E., Konstantinou, F., Ragia, G., Tavridou, A., Karaglani, M., Chatzaki, E., et al. (2017). Epigenetics-by-Sex Interaction for Coronary Artery Disease Risk Conferred by the Cystathionine gamma-Lyase Gene Promoter Methylation. *OmicS*, 21(12), 741-748. doi:10.1089/omi.2017.0149
- Gilroy Anne M, M. B. R., Ross Lawrence M, editors. (2008). *Atlas of Anatomy Prometheus* (2nd ed.). New York: Thime.

- Gimbrone, M. A., Jr., & Garcia-Cardena, G. (2016). Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*, 118(4), 620-636. doi:10.1161/circresaha.115.306301
- Goettsch, C., Hutcheson, J. D., Aikawa, M., Iwata, H., Pham, T., Nykjaer, A., et al. (2016). Sortilin mediates vascular calcification via its recruitment into extracellular vesicles. *J Clin Invest*, 126(4), 1323-1336. doi:10.1172/jci80851
- Goettsch, C., Iwata, H., Hutcheson, J. D., O'Donnell, C. J., Chapurlat, R., Cook, N. R., et al. (2017). Serum Sortilin Associates With Aortic Calcification and Cardiovascular Risk in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 37(5), 1005-1011. doi:10.1161/atvbaha.116.308932
- Goettsch, C., Kjolby, M., & Aikawa, E. (2018). Sortilin and Its Multiple Roles in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(1), 19-25. doi:10.1161/atvbaha.117.310292
- Gonzalez-Castro, T. B., Hernandez-Diaz, Y., Perez-Hernandez, N., Tovilla-Zarate, C. A., Juarez-Rojop, I. E., Lopez-Narvaez, M. L., et al. (2019). Interleukin 6 (rs1800795) gene polymorphism is associated with cardiovascular diseases: a meta-analysis of 74 studies with 86,229 subjects. *Excli j*, 18, 331-355. doi:10.17179/excli2019-1248
- Gonzalez, K., Fuentes, J., & Marquez, J. L. (2017). Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases. *Korean J Fam Med*, 38(3), 111-115. doi:10.4082/kjfm.2017.38.3.111
- Gordan, R., Gwathmey, J. K., & Xie, L. H. (2015). Autonomic and endocrine control of cardiovascular function. *World J Cardiol*, 7(4), 204-214. doi:10.4330/wjc.v7.i4.204
- Gustafsen, C., Kjolby, M., Nyegaard, M., Mattheisen, M., Lundhede, J., Buttenschon, H., et al. (2014). The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab*, 19(2), 310-318. doi:10.1016/j.cmet.2013.12.006
- Haas, J., Frese, K. S., Park, Y. J., Keller, A., Vogel, B., Lindroth, A. M., et al. (2013). Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med*, 5(3), 413-429. doi:10.1002/emmm.201201553
- Hajar, R. (2017). Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views*, 18(3), 109-114. doi:10.4103/heartviews.heartviews\_106\_17
- Henning, R. J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*, 14(6), 491-509. doi:10.2217/fca-2018-0045
- Hermey, G. (2009). The Vps10p-domain receptor family. *Cell Mol Life Sci*, 66(16), 2677-2689. doi:10.1007/s00018-009-0043-1
- Ho, I. H. T., Liu, X., Zou, Y., Liu, T., Hu, W., Chan, H., et al. (2019). A Novel Peptide Interfering with proBDNF-Sortilin Interaction Alleviates Chronic Inflammatory Pain. *Theranostics*, 9(6), 1651-1665. doi:10.7150/thno.29703
- Howard, G., Safford, M. M., Moy, C. S., Howard, V. J., Kleindorfer, D. O., Unverzagt, F. W., et al. (2017). Racial Differences in the Incidence of Cardiovascular Risk Factors in Older Black and White Adults. *J Am Geriatr Soc*, 65(1), 83-90. doi:10.1111/jgs.14472
- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA. (2018, 31 de octubre). CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS EN MÉXICO DURANTE 2017 [Comunicado de prensa]. Recuperado 15 de septiembre, 2019, de <https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSocio demo/DEFUNCIONES2017.pdf>

- Itoh, S., Mizuno, K., Aikawa, M., & Aikawa, E. (2018). Dimerization of sortilin regulates its trafficking to extracellular vesicles. *J Biol Chem*, 293(12), 4532-4544. doi:10.1074/jbc.RA117.000732
- Januliene, D., Andersen, J. L., Nielsen, J. A., Quistgaard, E. M., Hansen, M., Strandbygaard, D., et al. (2017). Acidic Environment Induces Dimerization and Ligand Binding Site Collapse in the Vps10p Domain of Sortilin. *Structure*, 25(12), 1809-1819.e1803. doi:10.1016/j.str.2017.09.015
- Jindal, S., & Jindal, N. (2018). Psoriasis and Cardiovascular Diseases: A Literature Review to Determine the Causal Relationship. *Cureus*, 10(2), e2195. doi:10.7759/cureus.2195
- Joshi, A. S., & Bhagwat, N. M. (2018). The Relation of the Non-modifiable (Destiny) and Modifiable (Free Will) Factors in Metabolic Derangements. *Indian J Endocrinol Metab*, 22(6), 722-723. doi:10.4103/ijem.IJEM\_597\_18
- Jufri, N. F., Mohamedali, A., Avolio, A., & Baker, M. S. (2015). Mechanical stretch: physiological and pathological implications for human vascular endothelial cells. *Vasc Cell*, 7, 8. doi:10.1186/s13221-015-0033-z
- Kachur, S., Lavie, C. J., de Schutter, A., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2017). Obesity and cardiovascular diseases. *Minerva Med*, 108(3), 212-228. doi:10.23736/s0026-4806.17.05022-4
- Karunathilake, S. P., & Ganegoda, G. U. (2018). Secondary Prevention of Cardiovascular Diseases and Application of Technology for Early Diagnosis. *Biomed Res Int*, 2018, 5767864. doi:10.1155/2018/5767864
- Khera, A. V., & Kathiresan, S. (2017). Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nat Rev Genet*, 18(6), 331-344. doi:10.1038/nrg.2016.160
- Kishore, S. P., Blank, E., Heller, D. J., Patel, A., Peters, A., Price, M., et al. (2018). Modernizing the World Health Organization List of Essential Medicines for Preventing and Controlling Cardiovascular Diseases. *J Am Coll Cardiol*, 71(5), 564-574. doi:10.1016/j.jacc.2017.11.056
- Kivimaki, M., & Steptoe, A. (2018). Effects of stress on the development and progression of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol*, 15(4), 215-229. doi:10.1038/nrcardio.2017.189
- Kjolby, M., Andersen, O. M., Breiderhoff, T., Fjorback, A. W., Pedersen, K. M., Madsen, P., et al. (2010). Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab*, 12(3), 213-223. doi:10.1016/j.cmet.2010.08.006
- Kjolby, M., Nielsen, M. S., & Petersen, C. M. (2015). Sortilin, encoded by the cardiovascular risk gene SORT1, and its suggested functions in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep*, 17(4), 496. doi:10.1007/s11883-015-0496-7
- Kleber, M. E., Renner, W., Grammer, T. B., Linsel-Nitschke, P., Boehm, B. O., Winkelmann, B. R., et al. (2010). Association of the single nucleotide polymorphism rs599839 in the vicinity of the sortilin 1 gene with LDL and triglyceride metabolism, coronary heart disease and myocardial infarction. The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*, 209(2), 492-497. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.09.068
- Knowles, J. W., & Ashley, E. A. (2018). Cardiovascular disease: The rise of the genetic risk score. *PLoS Med*, 15(3), e1002546. doi:10.1371/journal.pmed.1002546
- Konevic, S., Martinovic, J., & Djonovic, N. (2015). Association of Socioeconomic Factors and Sedentary Lifestyle in Belgrade's Suburb, Working Class Community. *Iran J Public Health*, 44(8), 1053-1060.

- Kutkiene, S., Petrulioniene, Z., Laucevicius, A., Cerkauskiene, R., Kasiulevicius, V., Samuilis, A., et al. (2019). Is the coronary artery calcium score the first-line tool for investigating patients with severe hypercholesterolemia? *Lipids Health Dis*, 18(1), 149. doi:10.1186/s12944-019-1090-8
- Ladouceur, R. (2017). What if alcohol were harmful, even in moderation? *Can Fam Physician*, 63(10), 742.
- Lagraauw, H. M., Kuiper, J., & Bot, I. (2015). Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain Behav Immun*, 50, 18-30. doi:10.1016/j.bbi.2015.08.007
- Lahiri, D. K., & Nurnberger, J. I., Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19(19), 5444. doi:10.1093/nar/19.19.5444
- Lan, Y., & Evans, T. (2019). Epigenetic Regulation of Cardiac Development and Disease through DNA Methylation. *J Life Sci (Westlake Village)*, 1(2), 1-10.
- Lanata, C. M., Chung, S. A., & Criswell, L. A. (2018). DNA methylation 101: what is important to know about DNA methylation and its role in SLE risk and disease heterogeneity. *Lupus Sci Med*, 5(1), e000285. doi:10.1136/lupus-2018-000285
- Lannes, R., Rizzon, C., & Lerat, E. (2019). Does the Presence of Transposable Elements Impact the Epigenetic Environment of Human Duplicated Genes? *Genes (Basel)*, 10(3). doi:10.3390/genes10030249
- Li, E., & Zhang, Y. (2014). DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(5), a019133. doi:10.1101/cshperspect.a019133
- Libby, P., Buring, J. E., Badimon, L., Hansson, G. K., Deanfield, J., Bittencourt, M. S., et al. (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 56. doi:10.1038/s41572-019-0106-z
- Lim, J. U., Lee, J. H., Kim, J. S., Hwang, Y. I., Kim, T. H., Lim, S. Y., et al. (2017). Comparison of World Health Organization and Asia-Pacific body mass index classifications in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 12, 2465-2475. doi:10.2147/copd.s141295
- Lima, B. B., Hammadah, M., Kim, J. H., Uphoff, I., Shah, A., Levantsevych, O., et al. (2019). Association of Transient Endothelial Dysfunction Induced by Mental Stress With Major Adverse Cardiovascular Events in Men and Women With Coronary Artery Disease. *JAMA Cardiol*. doi:10.1001/jamacardio.2019.3252
- Lind, L., Sundstrom, J., Arnlov, J., & Lampa, E. (2018). Impact of Aging on the Strength of Cardiovascular Risk Factors: A Longitudinal Study Over 40 Years. *J Am Heart Assoc*, 7(1). doi:10.1161/jaha.117.007061
- Lopez-Bautista, F., Posadas-Romero, C., Cardoso-Saldana, G., Juarez-Rojas, J. G., Medina-Urrutia, A., Perez-Hernandez, N., et al. (2017). Association of vitamin D deficiency with coronary artery disease in Mexican population: Genetics of atherosclerotic disease (GEA) study. *Gac Med Mex*, 153(5), 566-574. doi:10.24875/gmm.17002930
- Lu, L., Liu, M., Sun, R., Zheng, Y., & Zhang, P. (2015). Myocardial Infarction: Symptoms and Treatments. *Cell Biochem Biophys*, 72(3), 865-867. doi:10.1007/s12013-015-0553-4
- Lv, D., Xing, C., Cao, L., Zhuo, Y., Wu, T., & Gao, N. (2020). PD-L1 gene promoter methylation represents a potential diagnostic marker in advanced gastric cancer. *Oncology letters*, 19(2), 1223-1234. doi:10.3892/ol.2019.11221
- Malik, S., Zhao, Y., Budoff, M., Nasir, K., Blumenthal, R. S., Bertoni, A. G., et al. (2017). Coronary Artery Calcium Score for Long-term Risk Classification in

- Individuals With Type 2 Diabetes and Metabolic Syndrome From the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *JAMA Cardiol*, 2(12), 1332-1340. doi:10.1001/jamacardio.2017.4191
- Marchio, P., Guerra-Ojeda, S., Vila, J. M., Aldasoro, M., Victor, V. M., & Mauricio, M. D. (2019). Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 8563845. doi:10.1155/2019/8563845
- Martinez, S. R., Gay, M. S., & Zhang, L. (2015). Epigenetic mechanisms in heart development and disease. *Drug Discov Today*, 20(7), 799-811. doi:10.1016/j.drudis.2014.12.018
- Marusa Borgonio-Cuadra, V., Miranda-Duarte, A., Rojas-Toledo, X., Garcia-Hernandez, N., Alfredo Sierra-Ramirez, J., Cardenas-Garcia, M., et al. (2018). Association between promoter hypermethylation of the DACT2 gene and tumor stages in breast cancer. *J buon*, 23(2), 361-365.
- Mazurek, R., Dave, J. M., Chandran, R. R., Misra, A., Sheikh, A. Q., & Greif, D. M. (2017). Vascular Cells in Blood Vessel Wall Development and Disease. *Adv Pharmacol*, 78, 323-350. doi:10.1016/bs.apha.2016.08.001
- Mc Namara, K., Alzubaidi, H., & Jackson, J. K. (2019). Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract*, 8, 1-11. doi:10.2147/iprp.s133088
- Merz, A. A., & Cheng, S. (2016). Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart*, 102(11), 825-831. doi:10.1136/heartjnl-2015-308769
- Mikeska, T., Felsberg, J., Hewitt, G. A., & Dobrovic, A. (2011). Analysing DNA methylation using bisulphite pyrosequencing. *Methods Mol Biol*, 791, 33-53. doi:10.1007/978-1-61779-316-5\_4
- Mimura, J., & Itoh, K. (2015). Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 221-232. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.019
- Mishra, R., & Monica. (2019). Determinants of cardiovascular disease and sequential decision-making for treatment among women: A Heckman's approach. *SSM Popul Health*, 7, 100365. doi:10.1016/j.ssmph.2019.100365
- Mlynarska, A., Mlynarski, R., & Sosnowski, M. (2019). Usefulness of the Coronary Artery Calcium Score in Predicting Subsequent Coronary Interventions-A Ten-Year Single-Center Perspective. *Int J Environ Res Public Health*, 16(12). doi:10.3390/ijerph16122132
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. doi:10.1038/npp.2012.112
- Moosavi, A., & Motevalizadeh Ardekani, A. (2016). Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*, 20(5), 246-258.
- Moosavi Tayebi, R., Wirza, R., Sulaiman, P. S., Dimon, M. Z., Khalid, F., Al-Surmi, A., et al. (2015). 3D multimodal cardiac data reconstruction using angiography and computerized tomographic angiography registration. *J Cardiothorac Surg*, 10, 58. doi:10.1186/s13019-015-0249-2
- Mortensen, M. B., Kjolby, M., Gunnarsen, S., Larsen, J. V., Palmfeldt, J., Falk, E., et al. (2014). Targeting sortilin in immune cells reduces proinflammatory cytokines and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 124(12), 5317-5322. doi:10.1172/jci76002
- Mostofsky, E., Chahal, H. S., Mukamal, K. J., Rimm, E. B., & Mittleman, M. A. (2016). Alcohol and Immediate Risk of Cardiovascular Events: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis. *Circulation*, 133(10), 979-987. doi:10.1161/circulationaha.115.019743

- Musunuru, K., Ingelsson, E., Fornage, M., Liu, P., Murphy, A. M., Newby, L. K., et al. (2017). The Expressed Genome in Cardiovascular Diseases and Stroke: Refinement, Diagnosis, and Prediction: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Cardiovasc Genet*, 10(4). doi:10.1161/hcg.0000000000000037
- Naghavi, M., Maron, D. J., Kloner, R. A., Berman, D. S., Budoff, M., Superko, H. R., et al. (2019). Coronary artery calcium testing: A call for universal coverage. *Prev Med Rep*, 15, 100879. doi:10.1016/j.pmedr.2019.100879
- Nakahara, T., Dweck, M. R., Narula, N., Pisapia, D., Narula, J., & Strauss, H. W. (2017). Coronary Artery Calcification: From Mechanism to Molecular Imaging. *JACC Cardiovasc Imaging*, 10(5), 582-593. doi:10.1016/j.jcmg.2017.03.005
- Nambi, V., & Bhatt, D. L. (2017). Primary Prevention of Atherosclerosis: Time to Take a Selfie? *J Am Coll Cardiol*, 70(24), 2992-2994. doi:10.1016/j.jacc.2017.10.068
- Nebbioso, A., Tambaro, F. P., Dell'Aversana, C., & Altucci, L. (2018). Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet*, 14(6), e1007362. doi:10.1371/journal.pgen.1007362
- Neves, P. O., Andrade, J., & Moncao, H. (2017). Coronary artery calcium score: current status. *Radiol Bras*, 50(3), 182-189. doi:10.1590/0100-3984.2015.0235
- Niiranen, T. J., & Vasana, R. S. (2016). Epidemiology of cardiovascular disease: recent novel outlooks on risk factors and clinical approaches. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 14(7), 855-869. doi:10.1080/14779072.2016.1176528
- Onwuka, E., King, N., Heuer, E., & Breuer, C. (2018). The Heart and Great Vessels. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 8(3). doi:10.1101/cshperspect.a031922
- Oparil, S., Acelajado, M. C., Bakris, G. L., Berlowitz, D. R., Cifkova, R., Dominiczak, A. F., et al. (2018). Hypertension. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 18014. doi:10.1038/nrdp.2018.14
- Oppi, S., Luscher, T. F., & Stein, S. (2019). Mouse Models for Atherosclerosis Research-Which Is My Line? *Front Cardiovasc Med*, 6, 46. doi:10.3389/fcvm.2019.00046
- Ortega, F. B., Sui, X., Lavie, C. J., & Blair, S. N. (2016). Body Mass Index, the Most Widely Used But Also Widely Criticized Index: Would a Criterion Standard Measure of Total Body Fat Be a Better Predictor of Cardiovascular Disease Mortality? *Mayo Clin Proc*, 91(4), 443-455. doi:10.1016/j.mayocp.2016.01.008
- Osawa, K., Nakanishi, R., McClelland, R. L., Polak, J. F., Bishop, W., Sacco, R. L., et al. (2018). Ischemic stroke/transient ischemic attack events and carotid artery disease in the absence of or with minimal coronary artery calcification: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 275, 22-27. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.05.027
- Ouweneel, A. B., Verwilligen, R. A. F., & Van Eck, M. (2019). Vulnerable plaque and vulnerable blood: Two critical factors for spontaneous atherothrombosis in mouse models. *Atherosclerosis*, 284, 160-164. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2019.03.006
- Palumbo, S., Mariotti, V., Iofrida, C., & Pellegrini, S. (2018). Genes and Aggressive Behavior: Epigenetic Mechanisms Underlying Individual Susceptibility to Aversive Environments. *Front Behav Neurosci*, 12, 117. doi:10.3389/fnbeh.2018.00117

- Panahi, S., & Tremblay, A. (2018). Sedentariness and Health: Is Sedentary Behavior More Than Just Physical Inactivity? *Front Public Health*, 6, 258. doi:10.3389/fpubh.2018.00258
- Panh, L., Lairez, O., Ruidavets, J. B., Galinier, M., Carrie, D., & Ferrieres, J. (2017). Coronary artery calcification: From crystal to plaque rupture. *Arch Cardiovasc Dis*, 110(10), 550-561. doi:10.1016/j.acvd.2017.04.003
- Papageorgiou, N., Briasoulis, A., Androulakis, E., & Tousoulis, D. (2017). Imaging Subclinical Atherosclerosis: Where Do We Stand? *Curr Cardiol Rev*, 13(1), 47-55.
- Patel, K. M., Strong, A., Tohyama, J., Jin, X., Morales, C. R., Billheimer, J., et al. (2015). Macrophage sortilin promotes LDL uptake, foam cell formation, and atherosclerosis. *Circ Res*, 116(5), 789-796. doi:10.1161/circresaha.116.305811
- Penalvo, J. L., Fernandez-Friera, L., Lopez-Melgar, B., Uzhova, I., Oliva, B., Fernandez-Alvira, J. M., et al. (2016). Association Between a Social-Business Eating Pattern and Early Asymptomatic Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 68(8), 805-814. doi:10.1016/j.jacc.2016.05.080
- Peng, P., Wang, L., Yang, X., Huang, X., Ba, Y., Chen, X., et al. (2014). A preliminary study of the relationship between promoter methylation of the ABCG1, GALNT2 and HMGR genes and coronary heart disease. *PLoS One*, 9(8), e102265. doi:10.1371/journal.pone.0102265
- Perez-Hernandez, N., Apton-Duque, G., Blachman-Braun, R., Vargas-Alarcon, G., Rodriguez-Cortes, A. A., Azrad-Daniel, S., et al. (2017). Vascular Calcification: Current Genetics Underlying This Complex Phenomenon. *Chin Med J (Engl)*, 130(9), 1113-1121. doi:10.4103/0366-6999.204931
- Perrino, C., Barabasi, A. L., Condorelli, G., Davidson, S. M., De Windt, L., Dimmeler, S., et al. (2017). Epigenomic and transcriptomic approaches in the post-genomic era: path to novel targets for diagnosis and therapy of the ischaemic heart? Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res*, 113(7), 725-736. doi:10.1093/cvr/cvx070
- Petersen, C. M., Nielsen, M. S., Nykjaer, A., Jacobsen, L., Tommerup, N., Rasmussen, H. H., et al. (1997). Molecular identification of a novel candidate sorting receptor purified from human brain by receptor-associated protein affinity chromatography. *J Biol Chem*, 272(6), 3599-3605. doi:10.1074/jbc.272.6.3599
- Piano, M. R. (2017). Alcohol's Effects on the Cardiovascular System. *Alcohol Res*, 38(2), 219-241.
- Posadas-Romero, C., Lopez-Bautista, F., Rodas-Diaz, M. A., Posadas-Sanchez, R., Kimura-Hayama, E., Juarez-Rojas, J. G., et al. (2017). [Prevalence and extent of coronary artery calcification in an asymptomatic cardiovascular Mexican population: Genetics of Atherosclerotic Disease study]. *Arch Cardiol Mex*, 87(4), 292-301. doi:10.1016/j.acmx.2016.12.004
- Posadas-Romero, C., López-Bautista, F., Rodas-Díaz, M. A., Posadas-Sánchez, R., Kimura-Hayama, E., Juárez-Rojas, J. G., et al. (2017). Prevalence and extent of coronary artery calcification in an asymptomatic cardiovascular Mexican population: Genetics of Atherosclerotic Disease study. [Prevalencia y extensión de la calcificación arterial coronaria en población mexicana asintomática cardiovascular: estudio Genética de la Enfermedad Aterosclerosa]. *Archivos de cardiología de Mexico*, 87(4), 292-301. doi:10.1016/j.acmx.2016.12.004

- Posadas-Sanchez, R., Perez-Hernandez, N., Rodriguez-Perez, J. M., Coral-Vazquez, R. M., Roque-Ramirez, B., Llorente, L., et al. (2017). Interleukin-27 polymorphisms are associated with premature coronary artery disease and metabolic parameters in the Mexican population: the genetics of atherosclerotic disease (GEA) Mexican study. *Oncotarget*, 8(38), 64459-64470. doi:10.18632/oncotarget.16223
- Rai, V., Sharma, P., Agrawal, S., & Agrawal, D. K. (2017). Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem*, 424(1-2), 123-145. doi:10.1007/s11010-016-2849-0
- Rayner, S. G., & Zheng, Y. (2016). Engineered Microvessels for the Study of Human Disease. *J Biomech Eng*, 138(11). doi:10.1115/1.4034428
- Rodriguez-Perez, J. M., Posadas-Sanchez, R., Blachman-Braun, R., Vargas-Alarcon, G., Posadas-Romero, C., Garcia-Flores, E., et al. (2018). A haplotype of the phosphodiesterase 4D (PDE4D) gene is associated with myocardial infarction and with cardiometabolic parameters: the GEA study. *Excli j*, 17, 1182-1190. doi:10.17179/excli2018-1608
- Rosa-Garrido, M., Chapski, D. J., & Vondriska, T. M. (2018). Epigenomes in Cardiovascular Disease. *Circulation research*, 122(11), 1586-1607. doi:10.1161/CIRCRESAHA.118.311597
- Roselli, S., Pundavela, J., Demont, Y., Faulkner, S., Keene, S., Attia, J., et al. (2015). Sortilin is associated with breast cancer aggressiveness and contributes to tumor cell adhesion and invasion. *Oncotarget*, 6(12), 10473-10486. doi:10.18632/oncotarget.3401
- Ruan, Y., Guo, Y., Zheng, Y., Huang, Z., Sun, S., Kowal, P., et al. (2018). Cardiovascular disease (CVD) and associated risk factors among older adults in six low-and middle-income countries: results from SAGE Wave 1. *BMC Public Health*, 18(1), 778. doi:10.1186/s12889-018-5653-9
- Sadeghisani, M., Dehghan Manshadi, F., Azimi, H., & Montazeri, A. (2016). Validity and Reliability of the Persian Version of Baecke Habitual Physical Activity Questionnaire in Healthy Subjects. *Asian J Sports Med*, 7(3), e31778. doi:10.5812/asjism.31778
- Sajadi, S. M. A., Majidi, A., Abdollahimajd, F., & Jalali, F. (2017). Relationship between Dyspnea Descriptors and Underlying Causes of the Symptom; a Cross-sectional Study. *Emergency (Tehran, Iran)*, 5(1), e62-e62.
- Saleh, M., & Ambrose, J. A. (2018). Understanding myocardial infarction. *F1000Res*, 7. doi:10.12688/f1000research.15096.1
- Salo, P. P., Vaara, S., Kettunen, J., Pirinen, M., Sarin, A. P., Huikuri, H., et al. (2015). Genetic Variants on Chromosome 1p13.3 Are Associated with Non-ST Elevation Myocardial Infarction and the Expression of DRAM2 in the Finnish Population. *PLoS One*, 10(10), e0140576. doi:10.1371/journal.pone.0140576
- Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166(4), 822-839. doi:10.1016/j.cell.2016.07.050
- Sharma, B., Chang, A., & Red-Horse, K. (2017). Coronary Artery Development: Progenitor Cells and Differentiation Pathways. *Annu Rev Physiol*, 79, 1-19. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-033953
- Shekar, C., & Budoff, M. (2018). Calcification of the heart: mechanisms and therapeutic avenues. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 16(7), 527-536. doi:10.1080/14779072.2018.1484282
- Shirts, B. H., Hasstedt, S. J., Hopkins, P. N., & Hunt, S. C. (2011). Evaluation of the gene-age interactions in HDL cholesterol, LDL cholesterol, and triglyceride levels: the impact of the SORT1 polymorphism on LDL cholesterol levels is

- age dependent. *Atherosclerosis*, 217(1), 139-141. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.03.008
- Shufelt, C. L., Pacheco, C., Tweet, M. S., & Miller, V. M. (2018). Sex-Specific Physiology and Cardiovascular Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1065, 433-454. doi:10.1007/978-3-319-77932-4\_27
- Silva, D. R., Werneck, A. O., Collings, P. J., Fernandes, R. A., Barbosa, D. S., Ronque, E. R. V., et al. (2017). Family history of cardiovascular disease and parental lifestyle behaviors are associated with offspring cardiovascular disease risk markers in childhood. *Am J Hum Biol*, 29(5). doi:10.1002/ajhb.22995
- Singh, S. S., Pilkerton, C. S., Shrader, C. D., Jr., & Frisbee, S. J. (2018). Subclinical atherosclerosis, cardiovascular health, and disease risk: is there a case for the Cardiovascular Health Index in the primary prevention population? *BMC Public Health*, 18(1), 429. doi:10.1186/s12889-018-5263-6
- Siqueira, J. F., Jr., Fouad, A. F., & Rocas, I. N. (2012). Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *J Oral Microbiol*, 4. doi:10.3402/jom.v4i0.10743
- Song, L., Jia, J., Peng, X., Xiao, W., & Li, Y. (2017). The performance of the SEPT9 gene methylation assay and a comparison with other CRC screening tests: A meta-analysis. *Sci Rep*, 7(1), 3032. doi:10.1038/s41598-017-03321-8
- Souza, A. M. d., Lopes, O. S., Liberato, A. d. L., Oliveira, P. J. R. d., Herrero, S. S. T., Nascimento, A. L. d., et al. (2020). Association between SNPs and Loss of Methylation Site on the CpG island of the Promoter Region of the Smoothed Gene, Potential Molecular Markers for Susceptibility to the Development of Basal Cell Carcinoma in the Brazilian Population. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 21(1), 25-29. doi:10.31557/APJCP.2020.21.1.25
- Spence, J. D., & Pilote, L. (2015). Importance of sex and gender in atherosclerosis and cardiovascular disease. *Atherosclerosis*, 241(1), 208-210. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.04.806
- Steenman, M., & Lande, G. (2017). Cardiac aging and heart disease in humans. *Biophys Rev*, 9(2), 131-137. doi:10.1007/s12551-017-0255-9
- Stefansson, O. A., Hermanowicz, S., van der Horst, J., Hilmarsdottir, H., Staszczak, Z., Jonasson, J. G., et al. (2017). CpG promoter methylation of the ALKBH3 alkylation repair gene in breast cancer. *BMC Cancer*, 17(1), 469. doi:10.1186/s12885-017-3453-8
- Stewart, J., Manmathan, G., & Wilkinson, P. (2017). Primary prevention of cardiovascular disease: A review of contemporary guidance and literature. *JRSM Cardiovasc Dis*, 6, 2048004016687211. doi:10.1177/2048004016687211
- Strong, A., Patel, K., & Rader, D. J. (2014). Sortilin and lipoprotein metabolism: making sense out of complexity. *Curr Opin Lipidol*, 25(5), 350-357. doi:10.1097/mol.0000000000000110
- Strong, A., & Rader, D. J. (2012). Sortilin as a regulator of lipoprotein metabolism. *Curr Atheroscler Rep*, 14(3), 211-218. doi:10.1007/s11883-012-0248-x
- Suarez-Sanchez, F., Vazquez-Moreno, M., Herrera-Lopez, E., Gomez-Zamudio, J. H., Peralta-Romero, J. J., Castelan-Martinez, O. D., et al. (2019). Association of rs2000999 in the haptoglobin gene with total cholesterol, HDL-C, and LDL-C levels in Mexican type 2 diabetes patients. *Medicine (Baltimore)*, 98(39), e17298. doi:10.1097/md.00000000000017298

- Sung, H. Y., Lee, J. Y., Park, A. K., Moon, Y. J., Jo, I., Park, E. M., et al. (2018). Aberrant Promoter Hypomethylation of Sortilin 1: A Moyamoya Disease Biomarker. *J Stroke*, *20*(3), 350-361. doi:10.5853/jos.2018.00962
- Talbot, H., Saada, S., Naves, T., Gallet, P. F., Fauchais, A. L., & Jauberteau, M. O. (2018). Regulatory Roles of Sortilin and SorLA in Immune-Related Processes. *Front Pharmacol*, *9*, 1507. doi:10.3389/fphar.2018.01507
- Tarp, J. B., Sorgaard, M. H., Christoffersen, C., Jensen, A. S., Sillesen, H., Celermajer, D., et al. (2019). Subclinical atherosclerosis in patients with cyanotic congenital heart disease. *Int J Cardiol*, *277*, 97-103. doi:10.1016/j.ijcard.2018.08.104
- Thaker, A. M., & Frishman, W. H. (2014). Sortilin: the mechanistic link between genes, cholesterol, and coronary artery disease. *Cardiol Rev*, *22*(2), 91-96. doi:10.1097/crd.0000000000000008
- Theodorou, K., & Boon, R. A. (2018). Endothelial Cell Metabolism in Atherosclerosis. *Front Cell Dev Biol*, *6*, 82. doi:10.3389/fcell.2018.00082
- Tiffon, C. (2018). The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*, *19*(11). doi:10.3390/ijms19113425
- Townsend, N., Nichols, M., Scarborough, P., & Rayner, M. (2015). Cardiovascular disease in Europe--epidemiological update 2015. *Eur Heart J*, *36*(40), 2696-2705. doi:10.1093/eurheartj/ehv428
- Uzhova, I., Fuster, V., Fernandez-Ortiz, A., Ordovas, J. M., Sanz, J., Fernandez-Friera, L., et al. (2017). The Importance of Breakfast in Atherosclerosis Disease: Insights From the RESA Study. *J Am Coll Cardiol*, *70*(15), 1833-1842. doi:10.1016/j.jacc.2017.08.027
- Valerio, L., Peters, R. J., Zwinderman, A. H., & Pinto-Sietsma, S. J. (2016). Association of Family History With Cardiovascular Disease in Hypertensive Individuals in a Multiethnic Population. *J Am Heart Assoc*, *5*(12). doi:10.1161/jaha.116.004260
- van der Ploeg, H. P., & Hillsdon, M. (2017). Is sedentary behaviour just physical inactivity by another name? *Int J Behav Nutr Phys Act*, *14*(1), 142. doi:10.1186/s12966-017-0601-0
- Wan, M., Bennett, B. D., Pittman, G. S., Campbell, M. R., Reynolds, L. M., Porter, D. K., et al. (2018). Identification of Smoking-Associated Differentially Methylated Regions Using Reduced Representation Bisulfite Sequencing and Cell type-Specific Enhancer Activation and Gene Expression. *Environ Health Perspect*, *126*(4), 047015. doi:10.1289/ehp2395
- Wang, J.-S., Yu, X.-D., Deng, S., Yuan, H.-W., & Li, H.-S. (2020). Acupuncture on treating angina pectoris: A systematic review. *Medicine (Baltimore)*, *99*(2), e18548-e18548. doi:10.1097/MD.00000000000018548
- Wang, X., Raghavan, A., Peters, D. T., Pashos, E. E., Rader, D. J., & Musunuru, K. (2018). Interrogation of the Atherosclerosis-Associated SORT1 (Sortilin 1) Locus With Primary Human Hepatocytes, Induced Pluripotent Stem Cell-Hepatocytes, and Locus-Humanized Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *38*(1), 76-82. doi:10.1161/atvbaha.117.310103
- Wasserkort, R., Kalmar, A., Valcz, G., Spisak, S., Krispin, M., Toth, K., et al. (2013). Aberrant septin 9 DNA methylation in colorectal cancer is restricted to a single CpG island. *BMC Cancer*, *13*, 398. doi:10.1186/1471-2407-13-398
- Wei, L., Zhao, S., Wang, G., Zhang, S., Luo, W., Qin, Z., et al. (2018). SMAD7 methylation as a novel marker in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*, *496*(2), 700-705. doi:10.1016/j.bbrc.2018.01.121

- Werner, R. J., Kelly, A. D., & Issa, J. J. (2017). Epigenetics and Precision Oncology. *Cancer J*, 23(5), 262-269. doi:10.1097/ppo.0000000000000281
- Wjciniski, M., Socha, M., Walczak, M., Wodkiewicz, E., Malinowski, B., Rewerski, S., et al. (2018). Beneficial Effects of Resveratrol Administration-Focus on Potential Biochemical Mechanisms in Cardiovascular Conditions. *Nutrients*, 10(11). doi:10.3390/nu10111813
- Winham, S. J., de Andrade, M., & Miller, V. M. (2015). Genetics of cardiovascular disease: Importance of sex and ethnicity. *Atherosclerosis*, 241(1), 219-228. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.03.021
- Winzer, E. B., Woitek, F., & Linke, A. (2018). Physical Activity in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc*, 7(4). doi:10.1161/jaha.117.007725
- Yokoyama, A. S., Rutledge, J. C., & Medici, V. (2017). DNA methylation alterations in Alzheimer's disease. *Environ Epigenet*, 3(2), dvx008. doi:10.1093/eep/dvx008
- Yu, E., Malik, V. S., & Hu, F. B. (2018). Cardiovascular Disease Prevention by Diet Modification: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol*, 72(8), 914-926. doi:10.1016/j.jacc.2018.02.085
- Zhang, G., Guan, Q., Chen, G., Qian, F., & Liang, J. (2018). DNA methylation of the CDC2L1 gene promoter region decreases the expression of the CDK11p58 protein and reduces apoptosis in keloid fibroblasts. *Arch Dermatol Res*, 310(2), 107-115. doi:10.1007/s00403-017-1801-9
- Zhang, Z., Jiang, W., Yang, H., Lin, Q., & Qin, X. (2018). The miR-182/SORT1 axis regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro and in vivo. *Exp Cell Res*, 362(2), 324-331. doi:10.1016/j.yexcr.2017.11.033
- Zhao, J., Goldberg, J., Bremner, J. D., & Vaccarino, V. (2012). Global DNA methylation is associated with insulin resistance: a monozygotic twin study. *Diabetes*, 61(2), 542-546. doi:10.2337/db11-1048
- Zhong, J., Agha, G., & Baccarelli, A. A. (2016). The Role of DNA Methylation in Cardiovascular Risk and Disease: Methodological Aspects, Study Design, and Data Analysis for Epidemiological Studies. *Circ Res*, 118(1), 119-131. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.305206

## 14. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento informado controles (investigación bioquímica y tomográfica)

Departamentos de Endocrinología y Genética del Instituto  
Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PARTICIPANTE SANO (Investigación Bioquímica y Tomografía)

TÍTULO: "Genética de la Enfermedad Aterosclerosa" (Proyecto GEA)

Investigadores principales: Dr. Gilberto Vargas Alarcón, Dra. María Teresa Villarreal Molina, Dr. Carlos Posadas Romero y Dr. Erick Kimura Hayama.

Estimado Señor(a):

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación debido a que usted se encuentra clínicamente sano y no está bajo ningún tratamiento. Antes de que decida participar, es importante que sepa por qué se está haciendo esta investigación y lo que implica. Por favor tómese todo el tiempo necesario para leer la siguiente información, coméntela, si así lo desea, con su médico, familiares o con sus amigos. Pregunte cualquier cosa que no le haya quedado del todo clara o si desea más información.

#### PROPÓSITO

El propósito de este estudio es investigar la función de las partículas de colesterol bueno, en pacientes con enfermedad arterial coronaria y compararlos con personas sanas como usted.

#### PROCEDIMIENTOS

Usted acudirá 1 vez al Departamento de Endocrinología, donde le atenderá un médico endocrinólogo. Si usted reúne las condiciones para el estudio y acepta participar, se le harán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le pedirá que conteste un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales.
2. El médico le hará un examen físico y medirá su estatura, peso, circunferencia de cintura, presión arterial y frecuencia cardíaca.
3. Se le tomará una muestra de sangre, equivalente a 3 cucharadas.
4. Será necesario que se presente en ayuno de 12 horas, sin haber ingerido exceso de bebidas alcohólicas.
5. Su muestra de sangre servirá para realizar estudios de colesterol y triglicéridos. También se realizarán estudios especiales del funcionamiento de las partículas de HDL (colesterol bueno).
6. Para conocer si las arterias de su corazón tienen placas de grasa calcificadas, se le practicará el estudio radiológico conocido como Tomografía Computada para evaluación del Índice de Calcio. Es un estudio no invasivo que no requiere de administración de medio de contraste por vía oral o intravenosa. La duración del estudio es de aproximadamente 10 minutos. Sin embargo, como el procedimiento requiere que la frecuencia cardíaca (número de latidos cardíacos por minuto) se encuentre por debajo de 80, en algunas personas es necesario administrar 50-100 mg de atenolol (medicamento que controla la frecuencia cardíaca) por vía oral antes de efectuar la tomografía, lo que puede aumentar el tiempo de estancia a 30-60 minutos en el departamento de Radiología. Para estudiar las arterias que llevan sangre al

cerebro, se medirá el grosor de la pared de estas arterias con ultrasonido. Este procedimiento no produce molestias, no tiene riesgos y se realiza en 5 minutos.

7. Se le practicará el estudio radiológico conocido como Tomografía Computada de un solo corte, para conocer la cantidad de grasa dentro de su abdomen (grasa visceral).

### **RIESGOS E INCONVENIENTES**

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días.

En caso de que usted padezca de asma, enfisema pulmonar, bronquitis crónica, baja presión o alergia conocida al atenolol, favor de comentarlo directamente con el personal que le aplicó el cuestionario o con los médicos del área de Radiología, quienes valorarán si usted puede o no recibir el atenolol. Después del estudio usted puede realizar normalmente sus actividades.

### **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y DERECHO DE LAS PERSONAS A TERMINAR SU PARTICIPACIÓN**

Su participación en este estudio es voluntaria. Si decide participar, se le pedirá que firme esta forma de consentimiento. Puede rehusarse a participar en el estudio.

### **CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LA INFORMACIÓN**

La información personal, la obtenida por el cuestionario y los resultados de laboratorio se codificarán (su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe que se genere del estudio).

Toda la información que se obtenga, se almacenará en un lugar seguro y nos ajustaremos a los procedimientos internos y regulaciones gubernamentales para proteger la información personal y de laboratorio. Sin embargo, la información que se obtenga por el cuestionario y la generada por el laboratorio se consultará para comprobar que es correcta y corresponde a los exámenes que le fueron practicados. Esto lo hará el personal que participa en la realización del estudio y que mantendrá la confidencialidad de su información.

Confirmando haber leído las declaraciones de la forma de consentimiento informado para la realización del estudio "Genética de la Enfermedad Aterosclerosa" (Proyecto GEA).

Confirmando también que el Dr. \_\_\_\_\_ me ha explicado toda la información y los procedimientos del estudio, el día \_\_\_\_ durante el proceso de consentimiento para este estudio.

Confirmando que se me ha dado la oportunidad de hacer las preguntas sobre el estudio y haber quedado satisfecho con las respuestas y explicaciones que se me proporcionaron.

Se me ha dado el tiempo suficiente para leer con cuidado la información, comentarla con otras personas y decidir si participo, o no, en este estudio.

Estoy de acuerdo con participar en este estudio.

Participante

\_\_\_\_\_  
Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del paciente

\_\_\_\_\_

Firma

Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Domicilio

Testigo 2

Fecha \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Domicilio

Firma de la persona

\_\_\_\_\_

Fecha

que aplicó la carta

Nombre completo

de consentimiento.

\_\_\_\_\_

Firma

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.  
México.

## Anexo 2. Consentimiento informado pacientes (investigación bioquímica y tomográfica)

Departamentos de Endocrinología y Genética del Instituto  
Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"



### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE (Investigación Bioquímica y Tomografía)

TÍTULO: "Genética de la Enfermedad Aterosclerosa" (Proyecto GEA)

Investigadores principales: Dr. Gilberto Vargas Alarcón, Dra. María Teresa Villarreal Molina,  
Dr. Carlos Posadas Romero y Dr. Erick Kimura Hayama.

Estimado Señor(a):

Se le está invitando a participar en este estudio de investigación debido a que usted tiene Enfermedad Arterial Coronaria (obstrucción de las arterias del corazón). Antes de que decida participar, es importante que sepa por qué se está haciendo esta investigación y lo que implica. Por favor tómese todo el tiempo necesario para leer la siguiente información, coméntela, si así lo desea, con su médico, familiares o con sus amigos. Pregunte cualquier cosa que no le haya quedado del todo clara o si desea más información.

#### PROPÓSITO

El propósito de este estudio es investigar la función de las partículas de colesterol bueno, en pacientes con enfermedad arterial coronaria, como usted, y compararlos con personas sanas.

#### PROCEDIMIENTOS

Usted acudirá 1 vez al Departamento de Endocrinología, donde le atenderá un médico endocrinólogo. Si usted reúne las condiciones para el estudio y acepta participar, se le harán las siguientes pruebas y procedimientos:

1. Se le pedirá que conteste un cuestionario para conocer sus antecedentes familiares y personales.
2. El médico le hará un examen físico y medirá su estatura, peso, circunferencia de cintura, presión arterial y frecuencia cardíaca.
3. Se le tomará una muestra de sangre, equivalente a 3 cucharadas.
4. Será necesario que se presente en ayuno de 12 horas, sin haber ingerido exceso de bebidas alcohólicas.
5. Su muestra de sangre servirá para realizar estudios de colesterol y triglicéridos.
6. Para conocer si las arterias de su corazón tienen placas de grasa calcificadas, se le practicará el estudio radiológico conocido como Tomografía Computada para evaluación del Índice de Calcio. Es un estudio no invasivo que no requiere de administración de medio de contraste por vía oral o intravenosa. La duración del estudio es de aproximadamente 10 minutos. Sin embargo, como el procedimiento requiere que la frecuencia cardíaca (número de latidos cardíacos por minuto) se encuentre por debajo de 80, en algunas personas es necesario administrar 50-100 mg de atenolol (medicamento que controla la frecuencia cardíaca) por vía oral antes de efectuar la tomografía, lo que puede aumentar el tiempo de estancia a 30-60 minutos en el departamento de Radiología. Para estudiar las arterias que llevan sangre al cerebro, se medirá el grosor de la pared de estas arterias con ultrasonido. Este procedimiento no produce molestias, no tiene riesgos y se realiza en 5 minutos.
7. Se le practicará el estudio radiológico conocido como Tomografía Computada de un solo corte, para conocer la cantidad de grasa dentro de su abdomen (grasa visceral).

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días.

En caso de que usted padezca de asma, enfisema pulmonar, bronquitis crónica, baja presión o alergia conocida al atenolol, favor de comentarlo directamente con el personal que le aplicó el cuestionario o con los médicos del área de Radiología, quienes valorarán si usted puede o no recibir el atenolol. Después del estudio usted puede realizar normalmente sus actividades.

## **BENEFICIOS**

La visita al médico, los exámenes de laboratorio y el estudio radiológico son sin costo para usted. Es importante que usted sepa que no percibirá pago alguno por participar de manera voluntaria en el estudio.

Con el estudio de Tomografía podremos estimar la cantidad de placas de grasa calcificadas en las arterias de su corazón, lo cual permitirá, junto con los resultados de lípidos en sangre, glucosa y sus cifras de tensión arterial, sugerir modificaciones en su estilo de vida y tratamiento médico como medidas preventivas de futuros eventos cardíacos.

Sus resultados de glucosa, grasas en la sangre, así como los de la Tomografía pueden ser recogidos en 2 semanas.

## **PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y DERECHO DE LAS PERSONAS A TERMINAR SU PARTICIPACIÓN**

Su participación en este estudio es voluntaria. Si decide participar, se le pedirá que firme esta forma de consentimiento. Puede rehusarse a participar en el estudio.

## **CONFIDENCIALIDAD Y PRIVACIDAD DE LA INFORMACIÓN**

La información personal, la obtenida por el cuestionario y los resultados de laboratorio se codificarán (su nombre no aparecerá en ninguna publicación o informe que se genere del estudio).

Toda la información que se obtenga, se almacenará en un lugar seguro y nos ajustaremos a los procedimientos internos y regulaciones gubernamentales para proteger la información personal y de laboratorio. Sin embargo, la información que se obtenga por el cuestionario y la generada por el laboratorio se consultará para comprobar que es correcta y corresponde a los exámenes que le fueron practicados. Esto lo hará el personal que participa en la realización del estudio y que mantendrá la confidencialidad de su información.

Confirmando haber leído las declaraciones de la forma de consentimiento informado para la realización del estudio "Genética de la Enfermedad Aterosclerosa" (Proyecto GEA).

Confirmando también que el Dr. \_\_\_\_\_ me ha explicado toda la información y los procedimientos del estudio, el día \_\_\_\_\_ durante el proceso de consentimiento para este estudio.

Confirmando que se me ha dado la oportunidad de hacer las preguntas sobre el estudio y haber quedado satisfecho con las respuestas y explicaciones que se me proporcionaron.

Se me ha dado el tiempo suficiente para leer con cuidado la información, comentarla con otras personas y decidir si participo, o no, en este estudio.

Estoy de acuerdo con participar en este estudio.

Paciente \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del paciente

\_\_\_\_\_

Firma

Testigo 1 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Domicilio

Testigo 2 \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

Nombre completo del testigo

\_\_\_\_\_

Firma

\_\_\_\_\_

Domicilio

Firma de la persona \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

que aplicó la carta

Nombre completo

de consentimiento.

\_\_\_\_\_

Firma

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

### Anexo 3. Consentimiento informado pacientes (investigación genética)



Departamentos de Endocrinología y Genética del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”



#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTE (Investigación genética)

TÍTULO: “Genética de la Enfermedad Aterosclerosa” (Proyecto GEA)

Investigadores principales: Dr. Gilberto Vargas Alarcón, Dra. María Teresa Villarreal Molina, Dr. Carlos Posadas Romero y Dr. Erick Kimura Hayama.

#### Propósito y Descripción:

Algunos científicos han conducido investigaciones para aprender cómo es que nuestros genes (ADN heredados de nuestros padres) afectan nuestras características físicas y nuestra salud. Sabemos que algunos genes controlan el color de ojos o del cabello de las personas, otros regulan si las personas se sienten mejor al tomar algún medicamento en particular, otros más pueden incrementar el riesgo de padecer enfermedades tales como la enfermedad de las arterias del corazón. Los Departamentos de Genética y Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y la Unidad de Biología Molecular y Medicina Genómica del Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, están realizando el estudio de genes que pueden estar relacionados con la enfermedad de las arterias del corazón. A usted se le ha invitado a formar parte de esta investigación genética, debido a que usted tiene Enfermedad Arterial Coronaria (obstrucción de las arterias del corazón).

El objetivo de este estudio genético incluye:

Identificar las razones genéticas del por qué personas como usted, padecen enfermedad de las arterias del corazón, y otras se encuentran clínicamente sanas.

Una muestra de sangre le será extraída para los objetivos antes mencionados. Científicos usarán su información clínica en conjunto con su material genético para conducir estudios relacionados con la enfermedad de las arterias del corazón.

Si existe algo diferente al estudio que usted no comprenda después de leer esta información, por favor pregunte al médico del estudio o a su equipo.

#### Procedimientos

El ADN será separado y analizado de su muestra de sangre. El ADN podrá ser almacenado o utilizado por los Departamentos de Genética y Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. Su muestra será codificada de acuerdo al número que se le asigne en el estudio. Cualquiera que tenga acceso a su muestra de ADN, sus resultados o su análisis, no tendrá acceso a su nombre.

Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

Número del paciente \_\_\_\_\_

## **Riesgos Físicos**

Durante el procedimiento para obtener la muestra de sangre de una vena del brazo, puede sentir alguna molestia o dolor ligero. En algunas personas se puede presentar un hematoma (moretón) que desaparece en varios días.

## **Riesgos de la Información**

Algunas personas están preocupadas porque a la información genética se le puede dar un mal uso. Dicha preocupación incluye la negación a un empleo y al acceso a un seguro médico. El Departamento de Genética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" se asegurará que nadie tenga acceso a la información genética de los estudios de su ADN (material genético) exceptuando los investigadores de los Departamentos de Genética y Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", de otras Instituciones participantes y de sus autoridades regulatorias. Su muestra no será identificada con su nombre. Los resultados genéticos identificables e individuales no serán publicados.

## **Beneficios**

El participar en esta investigación genética no tendrá beneficio inmediato para usted. Sin embargo, su participación en esta investigación podrá ayudar a las personas con enfermedad de las arterias del corazón en el futuro (incluyéndolo a usted posiblemente) a través de mejoras en los diagnósticos y los tratamientos. Esta investigación podrá permitir a los investigadores identificar algunos genes que favorecen la aparición de la enfermedad del corazón.

## **Confidencialidad**

El material genético obtenido de su sangre, será almacenado bajo la dirección del Departamento de Genética del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en un lugar seguro. El uso de su material genético, datos e información relacionada al protocolo será limitado a los investigadores de los Departamentos de Genética y Endocrinología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" y de otras Instituciones participantes y departamentos colaboradores. El uso de su material estará limitado a los propósitos mencionados anteriormente.

Iniciales del paciente \_\_\_\_\_

Número del paciente \_\_\_\_\_

## **Declaración Voluntaria**

Entiendo el propósito de la muestra de genotipo ADN, todas mis preguntas han sido aclaradas a mi satisfacción. Permiso libremente al equipo del estudio el obtener una muestra de mi sangre para el genotipo DNA.

PACIENTE	<input type="text"/>		
	Nombre del paciente		
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	Firma del paciente o de su representante legal		Fecha
		d d	m m m a a

INVESTIGADOR	<input type="text"/>		
	Firma de la persona que obtiene el Consentimiento Informado		
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
			Fecha
		d d	m m m a a

TESTIGO 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
	Nombre	Dirección		
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	Relación con el paciente	Firma	Fecha	
		d d	m m m a a	

TESTIGO 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>		
	Nombre	Dirección		
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	Relación con el paciente	Firma	Fecha	
		d d	m m m a a	

## Anexo 4. Extracción del ADN

### Protocolo para recolección y almacenamiento de muestras de sangre (ADN)

#### Consideraciones previas:



- Recolectar muestra de sangre por punción venosa en 2 tubos lila (EDTA) de 4ml o 6ml

**Nota:** para muestras que se procesarán para extracción dentro de los primeros 5 a 10 días posteriores, almacenar en refrigeración a 4°C. Para muestras que se procesarán posterior a 10 días, almacenar a -20°C (una vez descongeladas, no volver a refrigerar).

- Centrifugar a 2500 rpm x 10 minutos para separar plasma
- El plasma se deberá desechar en el recipiente de desechos de residuos peligrosos líquidos.

#### La cantidad y pureza del ADN, no se garantiza en los siguientes casos:

- Las muestras con volúmenes menores de sangre con base en su capacidad
- Las muestras con un tiempo de toma no refrigerada a 4°C
- Las muestras con un tiempo de toma de semanas o meses no refrigeradas según lo especificado
- Las muestras hemolizadas

### Extracción de muestras de ADN de sangre

1. En tubos falcon de 50 mL, etiquetar debidamente la muestra
2. Agregar la sangre contenida en los tubos lila (EDTA) cuidadosamente al tubo falcon de 50mL
3. Adicionar TKM I (Tris-HCl, EDTA, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Potasio) a pH 7.6 por medio de un vaso de precipitados al tubo lila hasta llenar tres cuartas partes, cuidando no derramar el contenido. Seguidamente, tapar el tubo y agitar vigorosamente
4. Verter el contenido del tubo lila al tubo falcon y continuar con los demás tubos

**Nota:** para 2 tubos lila llevar hasta la marca de 30 ml (tubos de 6ml) o 20 ml (tubos de 4 o 5 ml) con TKM I

5. Emplear una pipeta y con una punta (cortada a  $\frac{1}{4}$  aproximadamente) agregar 145 uL de Triton X-100 si se adicionaron hasta 30 mL
6. Agitar y continuar este paso sobre el roteador por 10 minutos
7. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos (todos los tubos deben tener el mismo volumen y debidamente equilibrados para no ocasionar error en la centrifuga)
8. Desechar el sobrenadante con precaución para no tirar el botón precipitado en el fondo del tubo porque contiene los leucocitos (desechar en un vaso de precipitado de 1000 mL y posteriormente verter en contenedor de residuos peligrosos para líquidos)
9. Lavar el botón con solución de TKM I y agregar volumen hasta la marca de 20 mL o según sea el caso (con base en el paso 4)
10. Agitar hasta que el contenido sea homogéneo y centrifugar a 2800 rpm durante 5 min
11. Desechar el sobrenadante de acuerdo al paso 8
12. Si el botón continúa sucio, realizar un último lavado con 15 mL de TKM I

13. Centrifugar a 2500 rpm por 5 min
14. Desechar el sobrenadante de acuerdo al paso 8
15. Adicionar 800 uL de TKM II (Tris-HCl, Cloruro de Magnesio, Cloruro de Potasio, Cloruro de Sodio y EDTA) al tubo falcon que contiene el botón de leucocitos
16. Verter el volumen contenido en el tubo falcon en tubos Eppendorf 1.5 mL etiquetados previamente, iniciando con el botón de leucocitos
17. Adicionar 50 uL de SDS 10% con una pipeta
18. Agitar con apoyo del vórtex y calentar a 55°C por 10 minutos (retirar 5 minutos previos y agitar hasta que la mezcla sea homogénea)
19. Posteriormente, adicionar con una pipeta 300 uL de solución 5M de NaCl
20. Agitar en el vórtex de forma suave y centrifugar a 11500 rpm por 5 minutos (precipitan proteínas)
21. Separar el sobrenadante en 2 tubos Eppendorf de 1.6 mL previamente etiquetados y limpios. Seguidamente, adicionar a cada tubo aproximadamente 530 uL (cuidando de no llevarse el botón del fondo). Desechar el tubo con el precipitado de proteínas
22. Agregar 900 uL de etanol absoluto e invertir 40 veces
23. Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos
24. Desechar el sobrenadante en un vaso de precipitado con precaución (para no eliminar el botón precipitado que se encuentra en el fondo del tubo porque contiene ADN)
25. Adicionar 800 uL de etanol frío al 70% y agitar con ayuda del vórtex (este paso es para lavar el exceso de sales)
26. Centrifugar a 14000 rpm por 5 minutos
27. Desechar el sobrenadante según el paso 24 y retirar el exceso de etanol sobre un papel absorbente
28. Secar el exceso de etanol en speed vac por 10 min
29. Adicionar la cantidad de 200 uL de agua inyectable para hidratar el ADN
30. Calentar a 55°C por 60 minutos
31. Posteriormente refrigerar a -20°C
32. Finalmente, realizar un gel de integridad y medir la pureza del ADN en el Nanodrop

## Anexo 5. Conversión de ADN con bisulfito

### Protocolo para conversión de ADN con bisulfito

Este protocolo es útil para procesar cantidades de ADN de 1 a 2 ug en un volumen de hasta 20 uL.

#### Consideraciones previas:

- Equilibrar muestras y buffers a temperatura ambiente (15-25°C)
- El ADN deberá estar cuantificado previamente para conocer el rendimiento de la purificación
- Cada alícuota del reactivo Bisulfite Mix alcanza para 8 reacciones. Una vez disuelto con agua libre de RNAsas y DNAsas proporcionadas en el kit, deberá almacenarse en congelación (temperatura de -20°C) hasta por 4 semanas
- El DNA Protect buffer deberá cambiar de tono verde olivo a azul posterior a la adición de DNA bisulfite mix, indicando un pH alcalino óptimo y una mezcla eficiente para la conversión
- Todos los pasos de centrifugación se realizarán a temperatura ambiente (15-25°C)
- Los buffers del kit (BD Desulfonation buffer y BW Wash buffer) se deberán preparar con etanol



#### Procedimiento:

**Nota:** antes de disolver el bisulfito se deberá dar un spin para que el liofilizado quede en el fondo del tubo

1. Disolver el número de alícuotas requerido de Bisulfite Mix agregando 800 uL de agua libre de RNAsas a cada alícuota. Seguidamente llevar al vórtex por aproximadamente 5 minutos hasta disolver por completo

**Nota:** si no se disuelve, colocar en baño de agua a 60°C y agitar hasta disolver. Posterior a este paso, no colocar en hielo.

2. Preparar las reacciones de bisulfito en tubos para PCR de 200 uL con base en los siguientes cálculos y respetando el orden.

Tabla 1. Componentes de la reacción con bisulfito

Componente	Volumen (para cada reacción)
DNAg en solución (1ng-2ng)	Variable (máximo 20 uL)
Agua libre de RNAsas	Variable
Bisulfite Mix (disuelta)	85
Buffer DNA Protect	35
Volumen total	140

**Nota:** el buffer DNA Protect evita la fragmentación asociada al tratamiento del DNA con bisulfito a altas temperaturas y Ph bajo. Proporciona una desnaturalización adecuada del DNA para conversión.

3. Cerrar el tubo de PCR y mezclar suficiente. Los tubos deben permanecer a temperatura ambiente. El buffer DNA protect deberá cambiar de tonalidad verde a azul que indica un buen mezclado y un pH adecuado para la reacción con bisulfito.
4. Centrifugar de forma breve para bajar cualquier residuo líquido de las paredes de los tubos.

5. Realizar la conversión con bisulfito del DNA empleando un termociclador (aproximadamente 5 horas) de acuerdo a las condiciones de ciclado de la siguiente tabla:

Tabla 2. Condiciones de ciclado para la conversión térmica con bisulfito

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	95	5 min
Incubación	60	25 min
Desnaturalización	95	5 min
Incubación	60	85 min (1h, 25 min)
Desnaturalización	95	5 min
Incubación	60	175 min
Hold	20	indefinido

**Nota:** la conversión mediante el ciclo térmico favorece la sulfonación y desaminación. La reacción se dejará toda la noche y posteriormente se procederá a la purificación del DNA convertido con bisulfito

### Purificación del ADN convertido con bisulfito

#### Consideraciones previas:

- Equilibrar los buffers y columnas a temperatura ambiente previo a la purificación
- De inmediato, cuando finalice la conversión con bisulfito, deberá centrifugar brevemente los tubos y transferir la reacción conversión, centrifugar brevemente los tubos y transferir la reacción de conversión a tubos limpios de 1.5 mL
- Todos los pasos se realizarán a temperatura ambiente



#### Procedimiento:

1. Adicionar 560 uL de buffer BL. Mezclar bien y transferir todo el contenido de la reacción de la columna de centrifugación sin tocar la membrana (volumen aproximado de 700 uL)
2. Centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto, Seguidamente desechar el filtrado y el tubo colector

**Nota:** el Buffer BL promueve la unión del DNA monocatenario convertido a la columna y tiene Tiocianato de Guanidinio que evita la degradación del DNA por DNAsas

#### Paso: lavado

3. Colocar tubos colectores limpios a las columnas y adicionar 500 uL de Buffer BW
4. Centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto. Desechar el filtrado y secar la boca del tubo colector en una gasa y volver a colocar

**Nota:** el Buffer BW de lavado elimina de manera eficiente el bisulfito residual

#### Paso: desulfonación

5. Adicionar 500 uL de Buffer BD (si el reactivo contiene precipitados, evitar trasferir) e incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (15-25°C). Cerrar el frasco de buffer BD posterior a su empleo para evitar la acidificación con el CO<sub>2</sub> del ambiente.

**Nota:** almacenar el Buffer BD en congelación de inmediato posterior a su uso y colocar el Buffer EB a baño María a 60°C para su empleo en el paso de elución

6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto y desechar el filtrado. Secar la boca del tubo colector con una gasa y colocar de nuevo la columna en el mismo tubo colector.

**Paso: 2 lavados con buffer BW**

7. Agregar 500 uL de Buffer BW
8. Centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto. Seguidamente desechar el filtrado y secar la boca del tubo colector con una gasa. Colocar de nuevo la columna en el tubo colector
9. Agregar 500 uL de Buffer BW
10. Centrifugar a 12,000 rpm durante 1 minuto. Seguidamente desechar el filtrado y secar la boca del tubo colector con una gasa. Colocar de nuevo la columna en un tubo colector nuevo
11. Después del segundo lavado, centrifugar a 13,000 rpm. Posteriormente, transferir la columna a un tubo limpio de 1.5 mL e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente con la tapa de la columna abierta (este último proceso es para evaporar cualquier líquido residual)

**Paso: elución**

12. Agregar 40 uL de buffer EB (el buffer debe estar a 60°C) en el centro de la membrana e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con el tubo cerrado y centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto
13. Agregar 20 uL de buffer EB (el buffer debe estar a 60°C) en el centro de la membrana e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente con el tubo cerrado y centrifugar a 12500 rpm durante 1 minuto
14. Almacenar a -20°C

## Anexo 6. PCR para pirosecuenciación

### Protocolo para PCR para pirosecuenciación

#### Consideraciones previas:

- Limpiar el área de trabajo
- Atemperar los reactivos (enzima, coral, primers y H<sub>2</sub>O) contenidos en el kit y las muestras
- Encender el termociclador
- Rotular los tubos a emplear y colocarlos en una gradilla con portagradillas para su uso posterior
- Realizar los cálculos para el número de muestras con base en la siguiente tabla:

Tabla 1. Cálculo para los reactivos de PCR para pirosecuenciación

Reactivos	1 muestra	10 muestras
PyroMark PCR Master Mix	7.5 uL	75 uL
Coral Load Concentrate	2.5 uL	25 uL
Primer pirosecuenciación (A+B)	2.5 uL	25 uL
Volumen total (reactivos)	12.5 uL	125 uL



#### Procedimiento:

1. Dar un spin a los reactivos y a las muestras
2. Preparar la Master Mix en un tubo nuevo de acuerdo al cálculo para el número de reacciones
3. Agregar la cantidad de Master Mix correspondiente a cada tubo
4. Adicionar el volumen de agua correspondiente para cada muestra
5. Agregar la cantidad de ADN a cada muestra y mezclar con ayuda de la pipeta

**Nota:** las cantidades de ADN y H<sub>2</sub>O variaron de acuerdo al cálculo de cada muestra para un volumen final de 15 uL.

6. Tapar los tubos y retirar el portagradillas
7. Transportar los tubos en la gradilla y abrir la tapa del termociclador

**Nota:** verificar que los tubos estén cerrados por completo

8. Colocar las muestras dentro del termociclador Gene Amp™ PCR System 9700 (ThermoFisher SCIENTIFIC) con las siguientes condiciones de ciclado:

Etapas	Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1 ciclo	95°C	15 segundos
Hibridación	45 ciclos	94°C	30 segundos
		56°C	30 segundos
		72°C	30 segundos
Extensión	1 ciclo	72°C	10 minutos

**Nota:** tiempo aproximado para obtener los productos de PCR 2 horas y media

9. Finalmente, los amplicones de almacenaron a -20°C para su visualización en geles de agarosa

## Anexo 7. Geles de agarosa

### Protocolo para la elaboración de geles de agarosa

**Objetivo:** Se realizarán geles de agarosa (molecular grade, biolinemeridian BIOSCIENSE) al 3%

#### Consideraciones previas:

- Los productos de PCR (amplicones) se visualizarán en una cámara de electroforesis en gel (Thermo EC Midicell Primo EC330) a 60 Voltios
- Se empleará Bromuro de Etidio (EtBr) (IBI Scientific) y buffer para electroforesis 10x TBE (ThermoScientific) al 0.5X
- Tener lista la carcasa para realizar el gel con los peines correspondientes
- Utilizar material de seguridad (guantes, bata, cubrebocas) debido al empleo del Bromuro de Etidio



#### Procedimiento:

1. Pesar la agarosa y medir el buffer para electroforesis de acuerdo a las siguientes especificaciones:

Tabla 1. Especificaciones para la realización de geles de electroforesis

Tamaño del gel	Volumen de buffer	Cantidad de agarosa
Grande	115 mL	3 g
Pequeño	50 mL	1.4 g

2. En un matraz, colocar la agarosa de acuerdo al cálculo para el gel deseado e incorporar el volumen de buffer correspondiente. Seguidamente mezclar realizando giros suaves hasta lograr una disolución uniforme
3. Seguidamente, calentar el matraz con todo el contenido en un horno de microondas hasta que burbujee
4. Retirar el matraz con algún material de apoyo

**Nota:** tener precaución al tomar el matraz porque estará muy caliente

5. Esperar a que entibie y agregar el volumen de bromuro de etidio de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2. Especificaciones para geles de agarosa

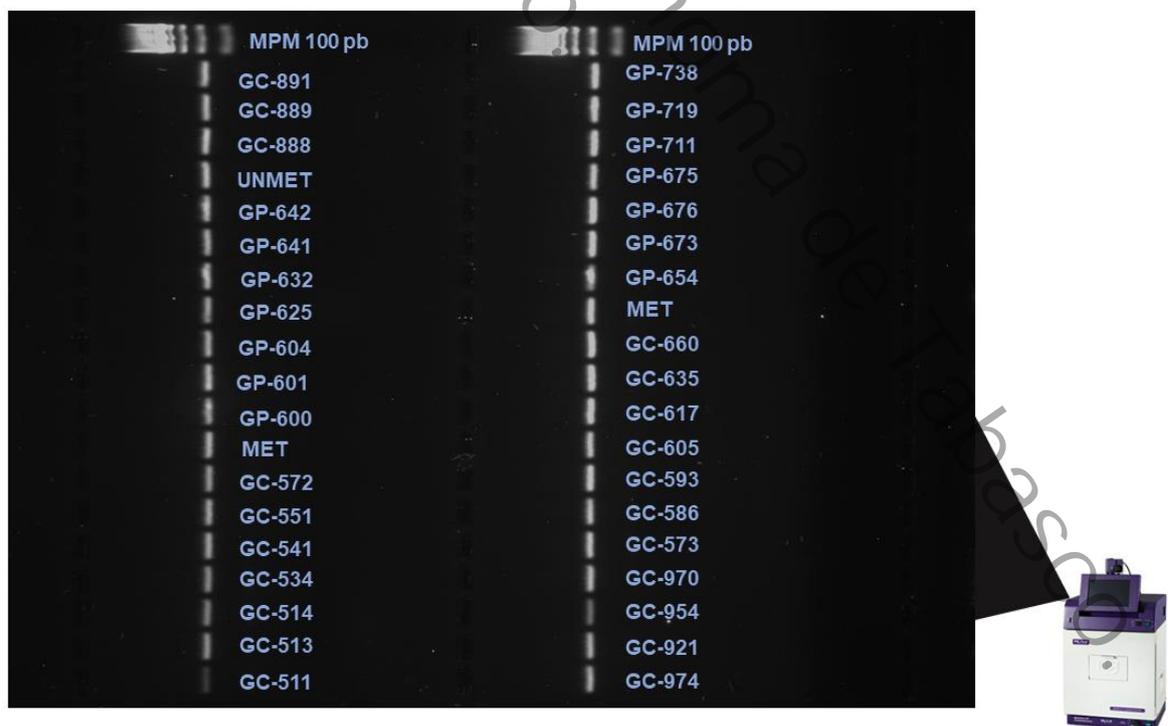
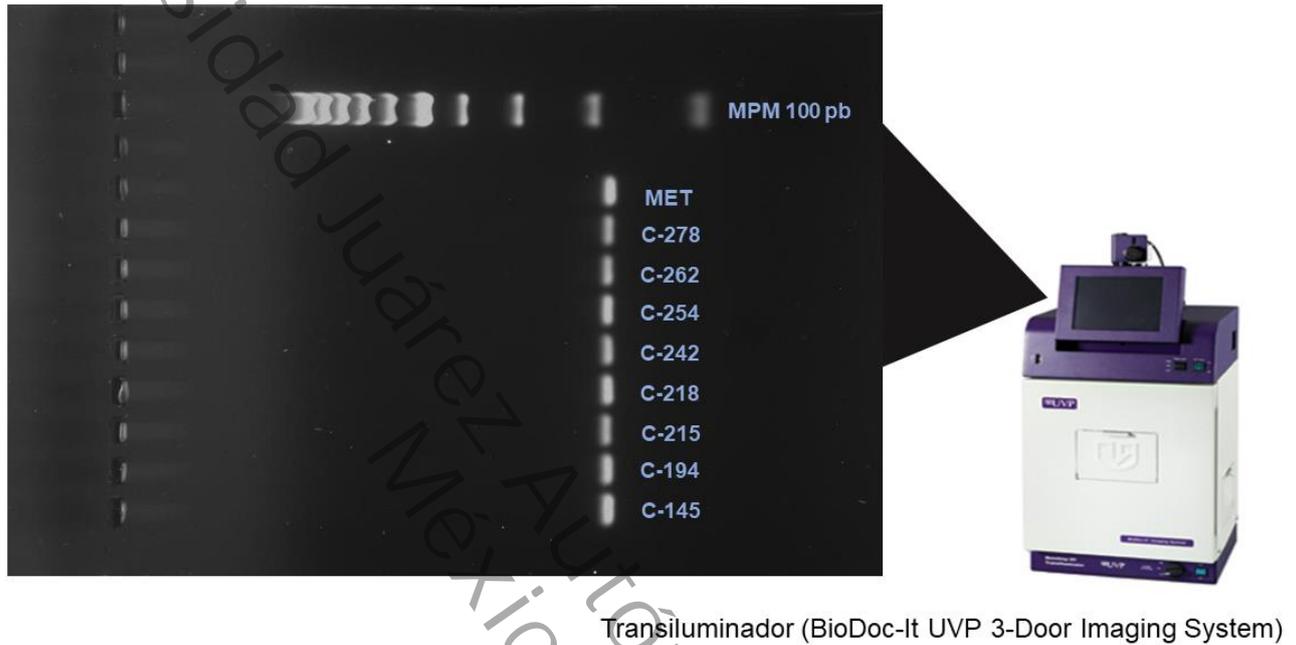
Cantidad de EtBr	Número de pozos en el peine
1 uL	20 (2 peines)
0.5 uL	12

6. Seguidamente, realizar giros suaves hasta obtener una mezcla homogénea de un ligero color rosa tenue y verter en la carcasa para el gel
7. Esperar a que polimerice por completo
8. Retirar los peines y trasladar la carcasa con el gel polimerizado a la cámara de electroforesis que contiene buffer para electroforesis 10x TBE (ThermoScientific) al 0.5X
9. Colocar el lado del gel con el peine hacia el lado negativo (izquierdo) para que corra al lado positivo (derecho)

**Nota:** el ADN tiene carga negativa por los grupos fosfato, debido a ello migrará hacia el lado positivo

10. Agregar 1uL de marcador de peso molecular de 100 pb y 1uL de buffer de carga (Gel Loading Dye 6X; ThermoScientific) a 2 uL de producto de PCR de cada muestra y cargar en el pozo correspondiente al diagrama previamente realizado
11. Dejar que corra a 60 V durante aproximadamente 45 minutos
12. Retirar el gel y visualizarlo en el transiluminador (BioDoc-It UVP 3-Door Imaging System)
13. La cantidad de amplicones restantes (13 uL) se almacenó a -20°C para su uso posterior en el pirosecuenciador

Visualización de geles de agarosa en transiluminador



## Anexo 8. Pirosecuenciación

### Protocolo para pirosecuenciación

#### Consideraciones previas:

- Se empleará el kit PyroMark Q24 Advanced (QIAGEN) y el equipo PyroMark Q24 Advanced (QIAGEN)
- Encender el equipo PyroMark Q24 Advanced 30 min previos a iniciar
- Los reactivos deben estar fuera del refrigerador y alcanzar la temperatura ambiente (15 C- 25 C)
- Precalentar el bloque de calentamiento a 80 °C y colocar el adaptador de placas de secuenciación para permitir el calentamiento (Q24 plate Holder)
- Preparar todos los buffers que se ocuparán en la estación de trabajo y probar que el manifold (de la estación de trabajo) funcione correctamente (realizar lavados con agua miliQ). Los postes del manifold deberán absorber el agua correctamente
- Todas las reacciones se realizarán a temperatura ambiente



#### Protocolo 1 de 4: inmovilización de los productos de PCR en perlas de sefarosa

1. Mover de forma gentil el recipiente que contiene la sefarosa streptavidina HP hasta alcanzar una solución homogénea
2. Preparar la reacción de inmovilización de DNA

**Nota:** pipetear la sefarosa con puntas de 100 uL, debido a que el diámetro de la punta es más ancho que el de puntas con 10 uL. Considerar que la sefarosa sedimenta rápidamente (se recomendable mezclar constantemente con la pipeta y no centrifugar)

Componentes	Volumen por muestra
Streptavidina sefarosa HP	1 uL
PyroMark Binding Buffer	40 uL
High Purity Water	29 uL
Volumen total	70 uL

**Nota:** el volumen de agua podrá variar dependiendo el volumen del producto de PCR que se utilice.

3. Añadir 70 uL de la reacción a una placa de 24 tubos tipo PCR. Mantener la solución homogénea (considerar que la sefarosa sedimenta rápidamente) pipeteando en repetidas ocasiones, cada vez que se agrega sefarosa en otro pozo o tubo nuevo
4. Añadir 10uL del producto de PCR biotoniado a cada pozo o tubo que contiene la mix de sefarosa preparada en el paso anterior. El volumen total por tubo deberá ser de 80 uL
5. Tapar los tubos o sellar la placa con papel parafilm
6. Agitar a temperatura ambiente (15 °C-25 °C) los tubos o la placa que contiene los productos de PCR, por 10 min a 1400 rpm
7. Proceder inmediatamente con el siguiente protocolo

#### Consideraciones previas:

- Antes de comenzar, disolver la enzima y sustratos liofilizados con 660 uL de agua ultra pura y mezclar sin vórtex. Asegurar que la mezcla esté completamente disuelta (dejando reposar entre 5 a 10 min). La mezcla no deberá ser turbia cuando se proceda a llenar el cartucho PyroMark Q24
- En la información de pre-corrída se podrán consultar los volúmenes adecuados de enzima, sustrato y nucleótidos para cada placa que se desee correr



#### Protocolo 2 de 4: llenado del cartucho PyroMark Q24

1. Los reactivos deberán estar a temperatura ambiente
2. Cargar la cantidad de volumen como lo indica el pre-run de cada corrida y acorde al esquema 1 (Ver figura 1)
3. Abrir el equipo e insertar el cartucho con la etiqueta de frente (label)
4. Cerrar el instrumento y continuar de inmediato con el protocolo 3

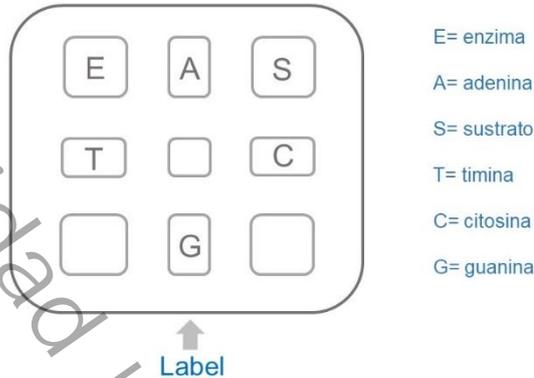


Figura 1. Esquema 1.



#### Protocolo 3 de 4: Preparación del ADN templado y primer de alineamiento

Este protocolo es para la preparación de ADN de una sola cadena y alineamiento del primer de secuenciación al templado antes del análisis de pirosecuenciación en el PyroMark Q24 Advanced

Consideraciones previas:

- Antes de comenzar, prepare la estación de trabajo
- El buffer de lavado tendrá que prepararse al 1x
- Lavar la estación de trabajo antes de emplear para asegurar que todos los filtros están funcionando (lavado con agua milli Q y dejar secar)

Procedimiento:

1. Diluir el primer de secuenciación con Anneling buffer como lo indica el frasco para que esté resuspendido a 10X
2. Preparar la reacción del primer 1X mezclando como lo indica a continuación:

Reactivo	Volumen
Primer secuenciación pirosecuenciación 10X	2 uL
Anneling buffer	18 uL

3. Añadir 20 uL del primer diluido (1X) a cada pozo en la placa de secuenciación.
4. Verificar que la estación de trabajo esté lista con todos los buffers como se indica en el esquema 2 (Ver figura 2)

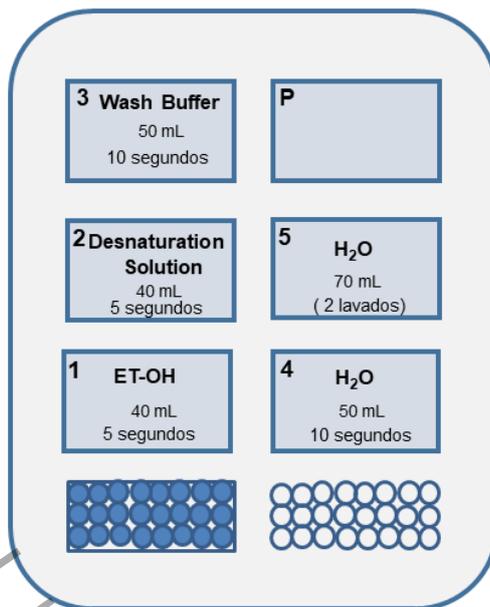


Figura 2. Esquema 2: Estación de trabajo

- Posterior a los 10 min en donde los productos de PCR se inmovilizan con las perlas de sefarosa (protocolo 1), colocar la placa en una gradilla
- Pipetear de 2 a 3 veces con cuidado para resuspender las perlas de sefarosa, con la finalidad de capturar la mayor cantidad posible
- Encender de inmediato la bomba y el vacío del manifold. Introducir los postecillos del manifold en la placa con cuidado (debido a que contienen los productos de PCR con sefarosa) y bajar el manifold hasta succionar el líquido por completo. Posteriormente, esperar de 15 a 20 segundos para asegurar la unión de las perlas a los postecillos

**Nota:** las perlas de sefarosa sedimentan rápido por lo que se deberán capturar de inmediato posterior a la agitación. Si transcurre más de 1 minuto, se deberá homogeneizar cada tubo de PCR que contenga la solución de sefarosa y ADN antes de succionar

- Inspeccionar que en la placa de PCR no existan residuos de sefarosa porque afectará el rendimiento y los resultados del pirograma
- Transferir el manifold (aun encendido) al contenedor que contiene 40 mL de etanol al 70% y espera alrededor de 5 segundos
- Transferir el manifold al contenedor que contiene 40 mL de solución desnaturalizante y realizar lavados por 5 segundos
- Transferir el manifold al contenedor que tiene 50 mL de buffer de lavado y esperar 10 segundos
- Sujetar el manifold y mantener en posición vertical durante 5 segundos para eliminar el exceso de líquido
- Llevar el manifold a la estación de trabajo y colocarlo a la altura y cerca de la placa de secuenciación. Apagar (OFF) el manifold e introducir cada uno de los postecillos en la solución del primer de secuenciación que contiene la placa
- Liberar las perlas de sefarosa en el Pyromark Q24 plate, con movimientos suaves de un lado a otro. Cuidar de no dañar la superficie de la placa con los postecillos del manifold
- Transferir el manifold al contenedor de agua ultrapura y agitar durante 10 segundos
- Encender el manifold (ON) y lavar los postecillos en el otro contenedor de agua con un volumen aproximado de 70 ml de agua ultra pura. Repetir este paso y secar los postecillos manteniendo el manifold en posición vertical durante 5 segundos
- Apagar el manifold y colocar en la estación de trabajo que está señalada como P
- Apagar la bomba de vacío
- Calentar la placa que contiene las muestras a 80°C durante 5 minutos colocándola encima del adaptador de la plancha de calentamiento

20. Remover el adaptador del calentador y colocar la placa de secuenciación dentro del equipo, esto no deberá exceder más de 30 segundos
21. Proceder de inmediato al siguiente protocolo



#### **Protocolo 4 de 4: corrimiento en el PyroMark Q24 Advance**

1. Asegurar que el cartucho y la placa de secuenciación se encuentren dentro del equipo
2. Cerrar el instrumento
3. Insertar el dispositivo USB en la entrada correspondiente localizada en la parte frontal del equipo (no retirar el USB hasta que el corrimiento haya finalizado)
4. Seleccionar corrida (RUN) en el menú principal con apoyo de las flechas y presionar OK
5. Seleccionar el archivo (FILE) con ayuda de las flechas y elegir SELECT para comenzar el corrimiento
6. Al finalizar la corrida y el instrumento, confirmar que ha salvado la corrida. Seguidamente elegir CLOSE
7. Remover USB
8. Abrir el instrumento
9. Retirar el cartucho y la placa de secuenciación
10. Girar y sacudir el cartucho de forma rápida para eliminar residuos. Seguidamente enjuagar con agua miliQ de 2 a 3 veces
11. Analizar la corrida

## Anexo 9. Producto final y evidencia

PHYSIOTHERAPY THEORY AND PRACTICE  
<https://doi.org/10.1080/09593985.2020.1712752>



### Evaluation of the quality of life in individuals with amputations in relation to the etiology of their amputation. A case-control study

Rosa Castillo-Avila, PT<sup>a</sup>, Pedro Arias-Vázquez, MD, PT<sup>a</sup>, Thelma González-Castro, PhD<sup>b,c</sup>, Carlos Tovilla-Zárate, PhD<sup>a</sup>, Isela Juárez-Rojop, PhD<sup>f</sup>, María López-Narváez, MD<sup>d</sup>, and Ana Fresán, PhD<sup>e</sup>

<sup>a</sup>División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Comalcalco, Tabasco, México; <sup>b</sup>División Académica Multidisciplinaria de Jalpa de Méndez, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Jalpa de Méndez, Tabasco, México; <sup>c</sup>División Académica de Ciencias de la Salud, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México C.P.; <sup>d</sup>Hospital General de Yajalón "Dr. Manuel Velasco Siles", Secretaría de Salud, Yajalón, Chiapas, México C.P.; <sup>e</sup>Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Ciudad de México, Tlalpan, México C.P

#### ABSTRACT

**Objectives:** Several studies indicate that limb amputations have a negative influence in the quality of life of those individuals who underwent amputation surgery. The aims of this study were to evaluate the quality of life in Mexican individuals with limb amputations compared with a control group, to identify demographic and clinical differences related to the etiology of the amputation, and to determine if they are associated with the quality of life observed in these patients. **Methods:** All participants were recruited from the Hospital "Dr. Gustavo A. Roviroso Pérez". The quality of life of all participants was evaluated using SF-36. **Results:** Individuals with amputations of vascular or trauma etiology, showed a diminished health-related quality of life when compared with the control group ( $p < .001$ ). We observed that individuals with amputations due to trauma were younger, mostly single, with more upper limb amputations and with a shorter period since amputation at the current assessment in comparison to individuals with amputations. **Conclusions:** Although limb amputation represents a surgical procedure necessary to preserve the life of a person, our results support that it negatively impacts the health-related quality of life of these individuals. Regardless of the etiology of the amputation, rehabilitation programs are primarily focused on reintegrating individuals to their everyday life. However, these programs may have poor results when patients have a poor quality of life. Therefore, quality of life assessment and early inclusion in programs that aim to improve the quality of life of individuals with amputations should be always taken into consideration.

#### ARTICLE HISTORY

Received 22 October 2018  
Revised 11 November 2019  
Accepted 3 December 2019

#### KEYWORDS

Limb amputations; Quality of life; Mexican population

#### Introduction

The World Health Organization estimates that 15% of the world population lives with some type of disability; in this sense, motor disabilities represent 52%, indicating a high number of people with musculoskeletal problems. For example, in the United Kingdom there are approximately 4,500 new amputees every year (Ladlow et al., 2015; Margolis and Jeffcoate, 2013). In the United States, approximately 1.9 million people have been reported to have lost limbs, which means that 1 in every 200 Americans have undergone an amputation (Meier and Heckman, 2014).

The impact of an amputation can result in psychosocial adjustments, severe self-esteem changes, and psychopathological symptoms. For instance, in a previous study, we reported a high frequency of depression and suicide behavior in patients with limb amputations

(Arias Vazquez et al., 2017). Additionally, amputations are often associated with other psychological disturbances that could affect social and free-time activities of these individuals (Ali and Fatima Haider, 2017). Many studies suggest that these disturbances could appear up to 7 years after the lower limb amputation (MacKenzie et al., 2006). In addition, social changes related to the amputation as well as the presence of psychological disturbances may have a direct negative impact over the quality of life of these patients (Horgan and MacLachlan, 2004; Padovani, Martins, Venancio, and Forni, 2015) which in general is highly reduced, not only for the changes that resulted directly from the amputations but also when rehabilitation is expected to produce little improvement (Bosma, Vahl, and Wisselink, 2013; Hawkins, Henry, Crandell, and Nguyen, 2014).

**CONTACT** Carlos Tovilla Zárate [alfonso\\_tovillaz@yahoo.com.mx](mailto:alfonso_tovillaz@yahoo.com.mx)

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at [www.tandfonline.com/iptp](http://www.tandfonline.com/iptp).

© 2020 Taylor & Francis Group, LLC

Universi

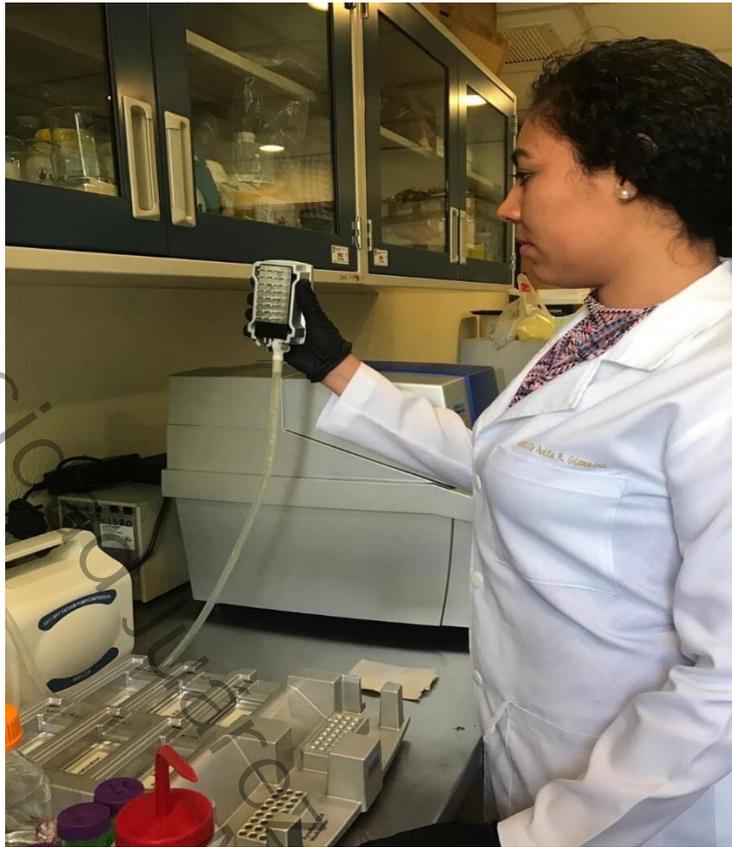


Figura 1. Estación de trabajo PyroMarkQ24 (QIAGEN).



Figura 2. Equipo de pirosecuenciación PyroMark Q24 (QIAGEN).



Figura 3. Laboratorio de Genómica Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.