

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
LA CIUDAD DE MÉXICO

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE LA CIUDAD DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

“ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DEL FACTOR DE NECROSIS
TUMORAL (TNF- α)-238 Y - 308 EN PACIENTES CON INFARTO AGUDO AL
MIOCARDIO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A:

Q.C. Nonanzit Iracema Pérez Hernández

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. Sara Frías Vázquez

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez

MÉXICO D.F.

JULIO 2007

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

UACM

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
LA CIUDAD DE MÉXICO

Nada humano me es ajeno



El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en el Posgrado en Ciencias Genómicas y el Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con el apoyo del CONACyT a través del proyecto No. 50352-M/241417.

TUTORES:

Dra. Sara Frías Vázquez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

ASESOR:

Dr. José Humberto Nicolini Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A José Manuel: Por ser siempre quien me motiva, quien me anima, quien se desvela conmigo, quien es mi mejor amigo, quien siempre supo que terminaría y sé que siempre cuento con él. Te amo.

A mis papás Paty y Marcos: por hacerme sentir siempre que lo que hago es lo mejor y por su apoyo incondicional.

A mi hermano Adrián: por inyectarme siempre su energía.

A la extensa Fam. Pérez: por animarme en mis escapaditas a Xalapa y consentirme tanto como siempre lo han hecho.

Al Dr. Gilberto Vargas Alarcón: por sus sabios consejos así como por su amistad y por confiar en mí.

A la Dra. Sara Frías Vázquez: por su gran amabilidad, conocimientos y su paciencia.

A mis amigos Nan, Cheye y Jorgito: porque simplemente son buenos amigos, me ayudan y me hacen reír en todo momento.

A mis amigos de la Maestría Alma, Alberto, Carlitos, Patiti, Vero y Vicenta: porque siempre me apoyaron en los momentos más duros de estudio y me animaron en TODO momento.

También agradezco a todos los catedráticos de este Posgrado por sus conocimientos.

A todas y cada una de estas personas mi infinita gratitud

INDICE

INDICE

INTRODUCCIÓN	10
CAPÍTULO I. GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES COMPLEJAS	13
➤ Estudios en familias	14
➤ Estudios en gemelos	14
➤ Estudios en individuos dados en adopción	15
➤ Análisis de ligamiento	15
➤ Estudios de asociación	15
➤ Causas de asociación	16
➤ Uso de SNP's en los estudios de asociación	17
CAPÍTULO II. CORAZÓN FISIOLÓGIA DEL MÚSCULO CARDIACO	19
➤ Circulación coronaria	19
➤ Factores que influncian la circulación coronaria	22
➤ Cardiopatía isquémica	22
➤ Etiología de la cardiopatía isquémica	23
➤ Consecuencias metabólicas de la isquemia miocárdica	23
➤ Manifestaciones funcionales de la isquemia miocárdica	24
➤ Infarto agudo del miocardio	24
➤ Tratamiento de la cardiopatía isquémica	27
CAPÍTULO III. EPIDEMIOLOGÍA	30
CAPÍTULO IV. ATROSCLOROSIS	32
➤ Mecanismos para la iniciación y progresión de la aterosclerosis --	33
➤ Estabilidad de la placa y reacciones inflamatorias	35
➤ Lipoproteínas e inflamación	37
CAPÍTULO V. ATROTROMBOSIS	40
➤ Mecanismos inflamatorios en aterotrombosis	41
➤ Inflamación y disfunción endotelial	44
➤ Efectos anti-inflamatorios de reducción de lípidos	44

➤ Marcadores inflamatorios para predicciones clínicas de riesgo	45
CAPÍTULO VI. FACTORES DE RIESGO A INFARTO	52
VI. I. NUEVOS CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO DE INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO	49
➤ Criterios de IAM agudo, en evolución o reciente	49
* Troponinas cardíacas	49
* CK-MB	49
➤ Criterios de IAM establecido (o antiguo)	51
CAPÍTULO VII. CITOCINAS EN INFARTO	52
➤ Desencadenamiento de producción de citocinas	
➤ infarto postmiocardial	53
➤ Mecanismo de estrés desencadena producción de citocinas	54
➤ Vías de amplificación de citocinas	55
➤ Citocinas en la alteración de contractilidad cardíaca	55
➤ Restauración de las heridas	55
CAPÍTULO VIII. GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL	56
➤ Características del gen TNF- α	57
➤ Polimorfismo del gen TNF- α	59
➤ Función biológica	59
➤ Señalización por la familia de receptores del TNF	60
CAPÍTULO IX. ESTUDIOS EN OTRAS POBLACIONES	63
CAPÍTULO X. OBJETIVOS	65
➤ Objetivo general	66
➤ Objetivos específicos	66
CAPÍTULO XI. JUSTIFICACIÓN	68
CAPÍTULO XI. HIPÓTESIS	69

CAPÍTULO XII. METODOLOGÍA	70
➤ Diseño	71
➤ Universo de estudio	71
➤ Criterios de inclusión	71
➤ Criterios de exclusión	72
➤ Requerimiento adicional para ambos grupos	72
➤ Análisis estadístico	73
CAPÍTULO XIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	74
➤ Extracción de DNA	75
➤ Determinación de los polimorfismos	76
CAPÍTULO XIV. RESULTADOS	77
A) Electroferograma de TNF-238 heterocigoto	78
B) Electroferograma de TNF-238 homocigoto	78
C) Electroferograma de TNF-308 heterocigoto	79
D) Electroferograma de TNF-308 homocigoto	79
TABLA 3. Frecuencias alélicas (fa) y genotipos (fg) de -238	80
TABLA 4. Frecuencias alélicas (fa) y genotipos (fg) de -308	81
CAPÍTULO XV. DISCUSIÓN	82
CAPÍTULO XVI. CONCLUSIONES	86
ANEXOS	88
BIBLIOGRAFÍA	96

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, un número creciente de observaciones ha demostrado que la inflamación juega un papel muy importante en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones, hasta el punto de que, actualmente, la aterosclerosis se considera una enfermedad inflamatoria (1, 2). El fenómeno inflamatorio se inicia cuando las lipoproteínas circulantes quedan atrapadas en la matriz extracelular subendotelial y se oxidan, adquiriendo así propiedades proinflamatorias que dan lugar a una cadena de eventos que van desde el depósito de monocitos circulantes que exacerbaban la respuesta inflamatoria al fagocitar los lípidos, la producción excesiva de elementos de la matriz extracelular y reclutamiento de nuevas células. Todos estos eventos van provocando un aumento en el volumen del ateroma o placa ateromatosa y la consecuente disminución de la luz arterial llegando incluso a ocluirla por completo lo que generará isquemia del tejido irrigado por tal vaso. Sin embargo, otro evento frecuente es que ocurra la ruptura de la placa, con lo que se exponen componentes subendoteliales altamente trombogénicos que generan trombosis arterial y por lo tanto isquemia, que dependiendo del vaso sanguíneo que se trate, será la menor o mayor lesión al tejido, en especial cardíaco (3, 4).

El infarto es el cuadro clínico provocado por la muerte de una porción del músculo cardíaco; este se produce cuando se obstruye completamente una arteria coronaria, a lo cual se suprime el aporte sanguíneo y cuando el músculo cardíaco carece de oxígeno durante demasiado tiempo, el tejido de esa zona muere y no se regenera; así que cuanto más dure el ataque, más daño sufrirá el corazón y mayor será la posibilidad de mortalidad.

Si el corazón se expone a un sobreesfuerzo pueden aparecer trastornos y formarse un coágulo de sangre (*trombosis coronaria*) que a su vez puede tapar una arteria semiobstruida y así interrumpir el suministro de sangre a las fibras del músculo cardíaco y ocasionar el *infarto*.

El infarto se manifiesta con dolores o presión en la zona torácica, sensación de agotamiento, cansancio, mareos y dolor o calambres en el brazo izquierdo. Normalmente el infarto no sucede de forma repentina, puede llegar causado por la *ateroesclerosis* que es un proceso prologado que estrecha los vasos coronarios debido a los depósitos grasos que obstruyen las arterias coronarias que rodean y nutren el corazón; o bien la angina de pecho, que suele ocurrir cuando se exige al corazón un esfuerzo superior ó cuando hay tensión emocional, manifestándose una opresión o dolor temporal que suele preceder al *infarto*.

CAPÍTULO I

GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES COMPLEJAS

I. GENÉTICA DE LAS ENFERMEDADES COMPLEJAS

Tradicionalmente, los genetistas se han dedicado al estudio de trastornos relativamente poco comunes causados por alteraciones cromosómicas o defectos de un solo gen. Este hecho ha conducido a importantes avances en el mapeo y caracterización de los genes responsables de un gran número de enfermedades monogénicas o mendelianas. Sin embargo, las enfermedades mendelianas constituyen sólo una pequeña parte del total de las enfermedades genéticas en el ser humano. La mayoría de las malformaciones congénitas y enfermedades comunes como la diabetes, el asma, el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, son el resultado de la compleja interacción entre factores ambientales y múltiples genes. Los recientes avances en la secuenciación del genoma humano, la construcción del mapa que contiene las variantes polimórficas de una sola base (SNPs-siglas en inglés) y el gran desarrollo de la tecnología molecular e informática, proveen un nuevo punto de partida para el entendimiento de las bases genéticas de las enfermedades complejas.

Las enfermedades o fenotipos causados por la interacción aditiva de múltiples genes se denominan poligénicas, pero cuando además intervienen factores ambientales, éstas se definen como multifactoriales o complejas. Se piensa que los factores genéticos y ambientales son capaces de causar enfermedad cuando, en combinación, alcanzan en umbral de susceptibilidad (5).

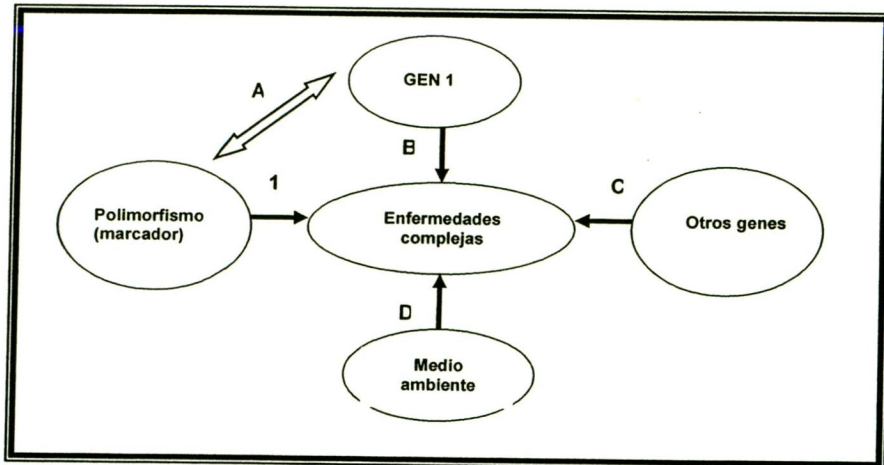


FIGURA 1. Las enfermedades complejas son el resultado de la compleja interacción de múltiples genes con el medio ambiente. El mapeo de genes en los estudios de asociación se basan en la correlación de un marcador con la enfermedad (1) y dependen tanto de la correlación entre el marcador y el locus de la enfermedad (A) así como de la correlación fenotipo-genotipo (B).

La evidencia de que los factores genéticos juegan un papel importante en el desarrollo de las enfermedades complejas viene principalmente de estudios epidemiológicos que comparan la frecuencia de una enfermedad en individuos genéticamente relacionados con la de la población general. Hay diversos métodos utilizados para determinar la participación de factores genéticos en las enfermedades multifactoriales como lo son:

- Estudios en familias. Definen el riesgo que existe a desarrollar cierta enfermedad entre los parientes de los casos afectados; este riesgo es proporcional al grado de parentesco que se tenga con el paciente. También se deben tomar en cuenta los genes que comparten así como el ambiente en común.
- Estudios en gemelos. Para diferenciar la influencia cuantitativa de los factores genéticos y ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Este tipo de estudios comparan la frecuencia con la que se presenta una enfermedad en ambos gemelos monocigóticos (concordancia) con la de gemelos dicigóticos.

- Estudios en individuos dados en adopción. Son utilizados para estimar la contribución de los factores genéticos en las enfermedades complejas. Se incluyen niños nacidos de padres que padecen alguna enfermedad y que son adoptados por padres que no la padecen. La frecuencia con la que estos niños desarrollan la enfermedad se compara con la de los niños dados en adopción nacidos de padres sin la enfermedad (5).

Para hacer el mapeo genéticos de las enfermedades complejas se encuentran disponibles una gran variedad de estrategias como:

- Análisis de ligamiento. Se refiere a las posiciones de los loci en el mismo cromosoma y cuando los alelos de dos loci son transmitidos juntos en la siguiente generación, debido a su estrecha proximidad. Se realizan en individuos relacionados, ya sea en hermanos o en pedigríes extensos. Estos estudios permiten determinar si un marcador genético y el gen que predispone a la enfermedad se encuentran físicamente ligados mediante el análisis de la cosegregación del marcador y el fenotipo de la enfermedad.

A partir del uso de los marcadores genéticos en los estudios de ligamiento, la genética médica ha mostrado un importante progreso. El descubrimiento de los fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs-siglas en ingles) y, posteriormente, de los microsatélites o repetidos cortos en tándem (STRs-siglas en ingles), condujeron al mapeo de un gran número de genes responsables de las enfermedades mendelianas.

En las enfermedades complejas es difícil obtener grandes pedigríes multigeneracionales debido a la participación de múltiples genes y a la fuerte influencia de los factores ambientales en su desarrollo. Por lo tanto, el análisis tradicional de ligamiento resulta ser impráctico para el estudio de estas enfermedades.

- Estudios de asociación. Los conceptos de asociación y ligamiento son frecuentemente confundidos. A diferencia de los estudios de ligamiento, donde se analiza la cosegregación de un marcador con la

enfermedad entre los miembros de una familia, los estudios de asociación comparan las frecuencias del marcador entre casos no relacionados y controles, e investigan su ocurrencia simultánea con la enfermedad a nivel de la población. Es decir, se entiende como la confirmación estadística que define la concurrencia de alelos o fenotipos en la población general. Una significativa asociación del marcador con la enfermedad sugiere un gen candidato en la etiología de la enfermedad.

Por otro lado, los estudios de ligamiento siempre conducen a asociación, pero en la mayor parte de los casos esta asociación es solamente intrafamiliar, es decir, no existe asociación a nivel de la población; en cambio, la asociación puede o no ser debida a ligamiento (5).

➤ Causas de asociación:

- 1) Efecto directo del marcador alélico en estudio. Algunas ocasiones el marcador utilizado es un polimorfismo intragénico que altera la secuencia de aminoácidos o afecta la transcripción, por lo que los diferentes alelos pueden mostrar diferencias en la cantidad o calidad del producto génico y tener un efecto directo en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.
- 2) Desequilibrio de ligamiento. Si la causa de asociación es debida a este desequilibrio, esto significa que el gen portador de la mutación se encuentra en estrecha proximidad al marcador polimórfico. Debido a que el desequilibrio de ligamiento depende del efecto fundador ejercido sobre la población, una enfermedad puede mostrar asociación con los alelos diferentes de un marcador en diferentes poblaciones.
- 3) Estratificación de la población. Si en una población existen subgrupos que no tienden a mezclarse, esto puede condicionar a que tanto la enfermedad como algunos marcadores alélicos podrían ser más comunes entre los individuos de un subgrupo. Para evitar falsas asociaciones secundarias a la estratificación de la población, los controles deberán ser pareados con los casos por factores relevantes como etnicidad y origen geográfico (5).

➤ Uso de SNPs en los estudios de asociación

En los estudios de asociación se ha considerado que los marcadores genéticos de elección para el mapeo de genes son los polimorfismos denominados SNPs (polimorfismos de un único nucleótido). Estos marcadores son la fuente más común de variación genética en el ser humano y se estima que en promedio existe un SNP cada 1,000 a 2,000 nucleótidos. Por lo tanto, el genoma humano contiene 3,200 millones de nucleótidos, entonces se puede deducir que existen de 1.6 a 3.2 millones de SNPs.

Reconociendo el potencial de los SNPs en el mapeo genético de las enfermedades complejas se formó un grupo internacional encaminado a la caracterización de los mismos. Los resultados de este esfuerzo internacional han reportado un mapa conteniendo 1.42 millones de SNPs distribuidos en todo el genoma humano. (5)

CAPÍTULO II

CORAZÓN

II. CORAZÓN

II. FISIOLÓGIA DEL MÚSCULO CARDIACO

El corazón está compuesto por tres tipos principales de miocardio: músculo auricular, músculo ventricular y las fibras musculares excitadoras y conductoras especializadas. Los tipos de músculo auricular y ventricular se contraen en gran medida de la misma manera que el músculo esquelético, con la diferencia de que la duración de la contracción es mucho mayor. Por otra parte, las fibras excitadoras y conductoras especializadas se contraen sólo débilmente debido a que contienen pocas fibrillas contráctiles (6).

➤ Circulación coronaria

La circulación coronaria es muy importante, debido a que proporciona oxígeno y nutrientes al corazón; el cual a su vez, genera la presión de perfusión con sangre de todos los tejidos del cuerpo (7).

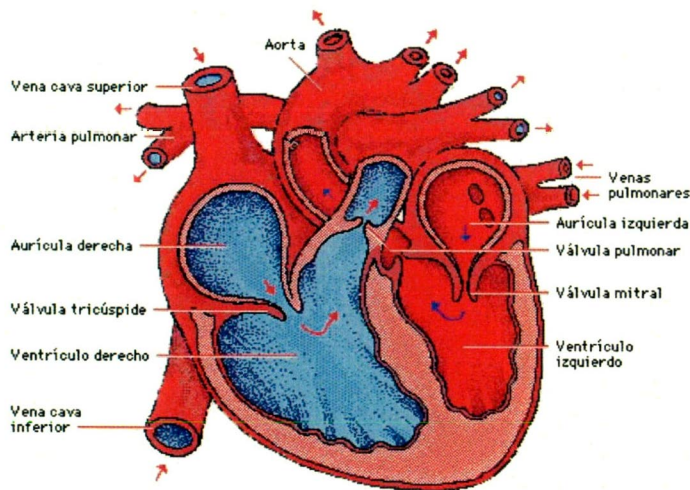


FIGURA 2. Circulación coronaria

La circulación nutritiva del corazón se realiza por medio de las arterias coronarias izquierda y derecha, las cuales tienen su origen en la aorta ascendente, inmediatamente por encima de la válvula sigmoidea.

La arteria coronaria izquierda se divide después de un corto trayecto en la arteria circunfleja, en la arteria descendente anterior y en una rama septal. La arteria coronaria izquierda da la irrigación de la aurícula izquierda, del ventrículo izquierdo, de la región anterior del tabique interventricular, así como de los *vasa vasorum* de la arteria pulmonar.

La arteria coronaria derecha se divide en un número variable de arterias descendentes, las cuales dan la irrigación del ventrículo derecho, de la parte posterior del tabique interventricular, del nodo sinoauricular y del nodo auriculoventricular.

El origen de la irrigación arterial de la región posterior ventricular es variable. En 50% de los individuos depende de la arteria coronaria derecha, en 20% de la arteria coronaria izquierda y en 30% de ambas arterias. La irrigación del nodo sinoauricular depende en 70% de los individuos de la arteria coronaria derecha, en 25% de la arteria coronaria izquierda y en 5% de las dos arterias. El nodo auriculoventricular recibe sangre, sólo de la arteria coronaria derecha en 80% de las personas, sólo de la arteria coronaria izquierda en 10% y de ambas arterias en 10%. La rama izquierda del haz de His, recibe sangre de las dos arterias coronarias y de la rama derecha de la arteria coronaria izquierda.

Las arterias coronarias grandes se dividen en ramas más y más pequeñas, las cuales se distribuyen sobre la superficie del corazón para formar las **arterias epicárdicas**. De igual manera, estas últimas dan ramas que penetran al interior del miocardio, en ángulos rectos con respecto a la superficie del corazón (vasos intramurales). La densidad de los capilares en la circulación coronaria es grande ($\sim 3\,000/\text{mm}^2$) debido al metabolismo elevado y casi exclusivamente aeróbico del corazón.

La circulación coronaria no cuenta con anastomosis entre las ramas grandes de las arterias coronarias, pero sí se presentan anastomosis entre las ramas pequeñas. En el ser humano se reportan entre 30 y 50 anastomosis intercoronarias con diámetros entre 100 y 200 μm en el tabique interventricular, así como en la región subendocárdica de la pared miocárdica. Existen también algunos cientos de anastomosis entre ramas de una misma

arteria coronaria (anastomosis intracoronarias) con diámetros de alrededor de 200 μm . Las **anastomosis colaterales**, que permiten el paso de la sangre de una arteria coronaria a otra, se desarrollan en 1 a 2 meses, luego de la oclusión de una arteria coronaria (7).

La hipertrofia miocárdica aumenta el tamaño de cada miocito, sin cambiar el número total de miocitos y de capilares. Como consecuencia, aumenta la distancia de difusión del oxígeno y por ello el centro de las fibras musculares hipertrofiadas se vuelve hipóxico.

El sistema venoso coronario se divide en un sector superficial y un sector profundo. El sector superficial transporta la mayor parte de la sangre venosa coronaria. Se compone de las venas cardíacas anteriores y de las venas cardíacas grandes, las cuales se abren en la aurícula derecha a través del seno venoso coronario. El sector profundo de la circulación venosa coronaria se representa por vasos que se abren de manera directa en las cavidades cardíacas, incluye los canales arteriosinuosoidales y las venas de Thebesio.

Los canales arterioluminales son pequeñas arterias o arteriolas coronarias, que se abren de manera directa en las aurículas o en los ventrículos. Los canales arteriosinuosoidales son arteriolas que atraviesan las paredes cardíacas y se dividen en sinusoides irregulares, éstas a su vez, se abren en las cavidades cardíacas. (6)

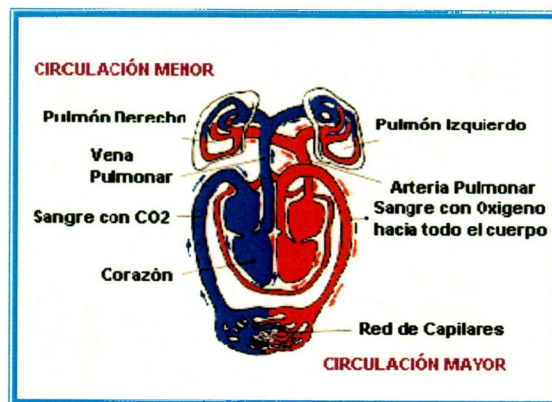


FIGURA 3. Ubicación de los principales vasos

➤ **Factores que influncian la circulación coronaria.**

En seres humanos, el flujo coronario de reposo es de 60 a 90 mL/100 g tejido ventricular izquierdo/ min (5% de gasto cardiaco o 250 mL/min en un adulto normal). Durante el ejercicio intenso, el flujo coronario puede aumentar 4 a 5 veces por arriba del valor de reposo.

La extracción del oxígeno desde la sangre coronaria es casi máxima durante el reposo (70 a 75%). Por tanto, el aumento del suministro de oxígeno para el miocardio se realiza de manera casi exclusiva, a través del aumento del flujo coronario. Asimismo, existe una estrecha correlación entre el consumo de oxígeno del corazón y el flujo coronario. Otros factores que influncian el consumo de oxígeno del miocardio, son la concentración de la hemoglobina, la presión parcial del oxígeno de la sangre arterial y la morfología de la curva de disociación de la oxihemoglobina.

Para regular el flujo coronario se realiza la acción de tres tipos de factores: físicos, neurohumorales y metabólicos.

Los factores físicos que determinan el flujo coronario son la presión aórtica y la resistencia en el lecho vascular coronario.

La presión aórtica es la fuerza que desplaza la sangre en el sistema vascular coronario, es producida por el corazón y su aumento resulta en un incremento del flujo coronario y la resistencia del lecho vascular coronario tiene dos componentes: el tono vasoconstrictor del músculo liso vascular coronario y la compresión extravascular sistólica, producida por la contracción del miocardio.

Los factores neurohumorales, la estimulación simpática produce un aumento importante del flujo coronario. Las catecolaminas aumentan la frecuencia y la fuerza de contracción del corazón, lo cual aumenta el metabolismo miocárdico, produce vasodilatación coronaria y aumenta el flujo coronario. Estos efectos son dependientes de la estimulación de los receptores miocárdicos adrenérgicos de tipo β_1 . Por otro lado el aumento de la contractilidad cardiaca aumenta la compresión extrínseca de los vasos coronarios, mientras que la taquicardia reduce el período de diástole. Ambos factores reducen el flujo coronario. Los vasos coronarios también poseen receptores adrenérgicos tipo α_1 , con acción vasoconstrictora, y de tipo β_2 , con acción vasodilatadora.

Los factores metabólicos, en condiciones normales, la presión arterial se mantiene en límites bastante estrechos, por el reflejo barorreceptor, por tanto, la magnitud del flujo coronario depende de modo específico del metabolismo miocárdico. La muy estrecha correlación entre el metabolismo miocárdico y el flujo coronario, se explica por la liberación de varios metabolitos vasoactivos a partir del miocardio (7).

➤ **Cardiopatía isquémica**

Representa un aporte inadecuado de oxígeno al miocardio debido a la oclusión parcial o total de una arteria coronaria. Las principales manifestaciones de la cardiopatía isquémica son: disminución de la contractilidad cardíaca y acumulación en el miocardio de productos de la glicólisis anaeróbica. Según el grado de imbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno, la isquemia puede clasificarse en ligera, moderada o severa. La isquemia puede afectar una zona limitada del corazón, en este caso se denomina **isquemia regional** o puede afectar el corazón entero (**isquemia global**). La abolición completa del flujo a una región del miocardio, se llama **isquemia total**. Cuando la isquemia es severa y prolongada, los miocitos se dañan de manera irreversible (infarto del miocardio).(7).

➤ **Etiología de la cardiopatía isquémica.**

Una causa común de la oclusión de las arterias coronarias es la **aterosclerosis**, una enfermedad degenerativa arterial con origen en alteraciones del metabolismo lipídico. El aumento prolongado de la concentración sanguínea del colesterol, hace que esta sustancia se deposite en la región subendotelial arterial, para formar así placas ateroscleróticas. Los depósitos de colesterol se calcifican y perforan el endotelio con lo cual obstruyen de manera progresiva el lumen arterial. Cuando la oclusión del lumen arterial coronario es mayor de 75%, aparece el dolor cardíaco llamado **angina pectoris**. Si las placas aterolcleróticas se rompen, los fragmentos resultantes migran hacia regiones más distales del árbol arterial coronario, para formar émbolos. La superficie rugosa de las placas ateroscleróticas y de sus fragmentos favorece la adhesión de las plaquetas sanguíneas, el depósito de fibrina y la aparición de un coágulo local.

El infarto agudo del miocardio puede producirse por émbolos de otro origen diferente al de las placas ateroscleróticas. Por ejemplo, los émbolos pueden producirse por trombos murales de la aurícula izquierda o del ventrículo izquierdo, o por vegetaciones valvulares producidas por la endocarditis bacteriana (7).

➤ **Consecuencias metabólicas de la isquemia miocárdica.**

En el miocardio isquémico se reduce con rapidez la concentración de los fosfatos macroenergéticos. La fosfocreatina desaparece varios segundos después de instalar la isquemia miocárdica, mientras que las reservas de ATP disminuyen a 35% de su valor normal en menos de 15 min. La concentración miocárdica de ADP aumenta en un inicio en más de dos veces, pero disminuye después de 10 min de isquemia, debido a su conversión en AMP. En el miocardio isquémico se acumulan con rapidez lactato (el producto terminal de la glicólisis anaeróbica) y disminuye la contractilidad miocárdica.

El miocardio contiene reservas de triglicéridos. Durante la isquemia miocárdica aumenta el proceso de lipólisis, estimulado por la descarga de catecolaminas. Por tanto, en el miocardio isquémico se acumulan ácidos grasos, acil CoA y acil carnitina.

Durante la isquemia miocárdica se activan enzimas proteolíticas intracelulares, las cuales degradan el citoesqueleto, lo cual disminuye la resistencia mecánica del sarcolema (7).

➤ **Manifestaciones funcionales de la isquemia miocárdica.**

La contractilidad miocárdica se suprime de 5 a 10 seg después del inicio de la isquemia. Esta respuesta tan rápida es una consecuencia de la depleción del ATP y de la acumulación de metabolitos (H^+ y fosfatos inorgánicos) en las células miocárdicas.

Otra consecuencia muy temprana de la isquemia miocárdica es la pérdida de K^+ desde los miocitos, iniciada quizá por su despolarización. En algunos minutos la concentración intersticial miocárdica de K^+ puede subir de 4.5 hasta 15 mM/L.

Los miocitos isquémicos acumulan Ca^{2+} en su interior de maneja rápida, lo cual resulta en la activación de varias enzimas intracelulares (proteasas,

lipasas), así como en el aumento del consumo de ATP y en la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Las manifestaciones electrofisiológicas de la isquemia miocárdica, son la depresión del segmento T-Q (debido a la despolarización diastólica parcial del miocardio inducida por el aumento del potasio intersticial) y la elevación del segmento ST.

Durante la primera hora, tras la instalación de la isquemia, se produce una liberación progresiva de noradrenalina, desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas miocárdicas. También se incrementa el número de receptores β adrenérgicos miocárdicos, cuya estimulación acelera la glicólisis anaeróbica y aumenta el influjo de calcio en los miocitos. Este último efecto aumenta el riesgo de aparición de trastornos de ritmo cardíaco e intensifica el proceso de lesión miocárdica isquémica. (7)

➤ **Infarto agudo del miocardio**

Debido a la ausencia de anastomosis entre las ramas grandes de las arterias coronarias, la oclusión brusca de una arteria coronaria resulta en la necrosis isquémica del miocardio, irrigado por la respectiva arteria (**infarto agudo del miocardio**). La necrosis de las células miocárdicas empieza 20 min después de la obstrucción arterial, sin embargo, no es completa sino hasta 3 a 6 h después.

La zona más vulnerable al infarto es la región subendocárdica del ventrículo izquierdo. Lo anterior se debe a una mayor reducción del flujo sanguíneo en esta zona, luego de la oclusión parcial de una arteria coronaria, así como un mayor consumo de oxígeno en esta región. Por tanto, en seres humanos, casi todos los infartos agudos del miocardio se inician en la zona subendocárdica del ventrículo izquierdo y un gran porcentaje de ellos se limitan a esta misma zona.

El infarto agudo del miocardio produce un dolor de muy alta intensidad localizado en la región precordial, con irradiación al brazo izquierdo, hombro derecho, cuello, maxilar inferior o brazo derecho. Este dolor se genera por sustancias liberadas por las células lesionadas (ácido láctico, iones de potasio, histamina, cininas), las cuales estimulan las fibras nerviosas sensitivas cardíacas. Los miocitos lesionados liberan enzimas como la creatincinasa y la

deshidrogenada láctica. Medir la concentración sanguínea de estas enzimas es un importante criterio de diagnóstico del infarto agudo del miocárdico. El cambio característico del electrocardiograma (ECG) en el infarto agudo del miocardio consiste en la aparición de ondas Q profundas, de necrosis en las derivaciones que captan señales de la zona infartada. Además, también aparecen cambios de tipo lesional (elevación o subdenivelación del segmento ST) e isquémico, con origen en las zonas adyacentes a la infartada. Las complicaciones del infarto agudo del miocardio son:

1. Los trastornos del ritmo y conducción cardiacos.
2. El choque cardiogénico
3. La insuficiencia mitral.
4. La pericarditis.
5. El aneurisma cardiaco
6. La rotura cardiaca.

La fibrilación ventricular es la causa de muerte más frecuente, después de un infarto agudo del miocardio. Puede instalarse de manera inmediata después del infarto, pero también después de varias horas, días o semanas. Los pacientes que sobreviven a un infarto agudo del miocardio son propensos a trastornos de ritmo cardiaco, como la taquicardia paroxística ventricular, que degenera con facilidad en fibrilación ventricular.

El choque cardiogénico se produce por la falla de la bomba cardiaca y aparece cuando la zona infartada representa más de 30 a 40% de la masa del ventrículo izquierdo. La subsecuente disminución del gasto cardiaco produce hipotensión arterial, y disminución de la presión de perfusión coronaria, lo cual acentúa las lesiones miocárdicas. La dilatación del corazón o la disfunción de los músculos papilares generan insuficiencia mitral (regurgitación de la sangre del ventrículo izquierdo a la aurícula izquierda), que contribuye también a disminuir el gasto cardiaco.

La región miocárdica infartada pierde la capacidad de contracción. Por tanto, el aumento de la presión ventricular durante la sístole, hace que la zona infartada haga relieve hacia fuera. Este movimiento paradójico (diskinesia) de la pared ventricular infartada reduce la capacidad de bombeo cardiaco. En 3 a 4% de los infartos agudos del miocardio se forma una dilatación aneurismal de la pared ventricular izquierda, cuyo tamaño aumenta durante varios días o

semanas. La rotura del corazón se produce en 5 a 25% de los pacientes con infarto agudo del miocardio y afecta los músculos papilares, el tabique interventricular o la pared del ventrículo izquierdo. La consecuencia fatal de la rotura cardiaca es la insuficiencia cardiaca aguda.

La recuperación tras un infarto agudo del miocardio consiste en el reemplazo de la zona de necrosis con tejido fibroso, el cual forma una cicatriz. El miocardio normal restante se hipertrofia para compensar la pérdida de masa muscular. Si la oclusión de una arteria coronaria es lenta y progresiva, durante semanas o meses, se desarrolla una circulación colateral, la cual provee al miocardio con suficiente sangre para prevenir la aparición de la necrosis. La circulación colateral coronaria se desarrolla a partir de vasos preexistentes, cuyo endotelio y músculo liso proliferan bajo de la acción de varios metabolitos liberados por el miocardio isquémico (7).

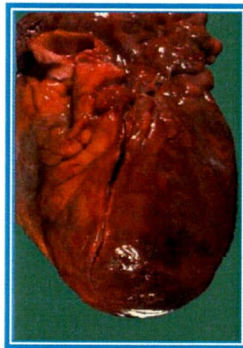


FIGURA 4. Corazón infartado

➤ **Tratamiento de la cardiopatía isquémica.**

El tratamiento quirúrgico de la cardiopatía isquémica, consiste en dos tipos de intervenciones, la derivación aortocoronaria y la angioplastia transluminal.

La derivación aortocoronaria consiste en insertar un fragmento de vena safena entre la raíz de la aorta y el segmento de la arteria coronaria, ubicado más allá de la región estenozada.

La angioplastia transluminal consiste en dilatar la región estenozada de una arteria coronaria con el empleo de un catéter con un balón inflable en la punta. El catéter se introduce en una arteria periférica y de ahí se desplaza hasta la aorta ascendente bajo control radiológico. El catéter se introduce después en la arteria coronaria afectada hasta llegar a la región estenozada. Aquí el balón se infla, lo cual produce una dilatación orgánica de la estenosis que puede durar varios años.

Existe un gran número de fármacos que dilatan las arterias coronarias y alivian el dolor relacionado con la cardiopatía isquémica (*angina pectoris*). Estos fármacos son sobre todo los nitratos (p. ej., nitroglicerina), los cuales reducen el trabajo y la demanda de oxígeno del corazón, debido a la reducción de la precarga cardíaca (por vasodilatación venosa), y de la poscarga cardíaca, (por vasodilatación arteriolar). La reducción del trabajo cardíaco y de la demanda de oxígeno generada por los nitratos es mayor que la reducción del flujo coronario producida por la disminución de la presión aórtica, esto explica su acción benéfica en la *angina pectoris*. Se ha demostrado que los nitratos favorecen también el desarrollo de la circulación colateral coronaria y, al igual que los bloqueadores de los canales de calcio, dilatan las arterias coronarias en el sitio de la estenosis.

Los bloqueadores de los receptores β adrenérgicos (p. ej., propranolol) se utilizan también para el tratamiento de la cardiopatía isquémica, debido a su efecto de decremento de la frecuencia cardíaca y de la presión arterial, lo cual resulta en una menor demanda miocárdica de oxígeno (7).

CAPÍTULO III

EPIDEMIOLOGÍA

III. EPIDEMIOLOGÍA

Una de las características de la transición epidemiológica es la sustitución de las enfermedades transmisibles por las crónicas. En este fenómeno destacan tres aspectos: el primero es que el ritmo del descenso de los problemas infecciosos es más rápido y el impacto de las intervenciones es casi inmediato, mientras que el ascenso de las enfermedades crónicas es lento pero constante. El segundo es que la protección y las intervenciones dirigidas al control de las enfermedades infecciosas benefician sobre todo a la población infantil, mientras que en el caso de las enfermedades crónicas existe un común denominador de riesgos al que toda la población se ve expuesta en tanto aumenta su edad. El tercero y último es que mientras en los problemas transmisibles la curación es inmediata y casi siempre se acompaña de inmunidad permanente, en las enfermedades crónico-degenerativas el proceso es lento, no hay inmunidad, su severidad va en aumento y es discapacitante (8).

La transición epidemiológica obliga a analizar la magnitud del proceso salud-enfermedad desde la perspectiva del incremento en la prevalencia, las necesidades de prevención, los costos de la atención de estas enfermedades, las necesidades de rehabilitación y la planeación de los servicios de salud que deben atender una demanda creciente de servicios médicos especializados, de alto costo, dependientes de la tecnología y de bajo impacto en la salud poblacional.

En México actualmente cinco de cada diez personas mayores de 45 años padece de problemas del corazón y 17 mueren al día por alguna complicación cardiovascular. Se estima que para el año 2010 uno de cada diez mexicanos estará en riesgo de padecer infartos.

En nuestro país las enfermedades del corazón ocupan el primer lugar en la tasa nacional de mortalidad, en segundo lugar la diabetes mellitus, seguido por los tumores malignos y por las enfermedades cerebrovasculares. (9)

CAPÍTULO IV

ATEROSCLEROSIS

IV. ATHEROSCLEROSIS

En el concepto clásico, la lesión aterosclerótica es caracterizada como una placa intimal elevada, la cual consiste en tejido fibroso encapsulando un núcleo de lípidos. Estas lesiones contienen células de músculo liso, algunas de las cuales podrían tener lípidos fagocitados. Igualmente se conoce que los macrófagos están abundantemente presentes, en particular circundante al núcleo de lípidos, conocido como ateroma. Se considera que los macrófagos juegan un papel importante en la fagocitosis de lípidos, y en sus funciones como células scavenger intentando remover las partículas grasosas que están infiltradas en la íntima. La patogénesis de la aterosclerosis se ha visto principalmente como un desorden de lípidos con flujo excesivo de lípidos dentro de la pared arterial, contribuyendo los macrófagos a las lesiones eventuales por el "scavenging" de lípidos.

Muy poco se sabe del mecanismo de contribución de las células del músculo liso a la lesión elevada y ciertamente no entendida de macrófagos como parte de una reacción inflamatoria.

Las mayores contribuciones relacionadas al papel de la inflamación de la interplaca, con los macrófagos actuando no sólo como scavenger pero ciertamente también como células inmunocompetentes interactuando con otras células inflamatorias como los linfocitos y mastocitos. (10)

Se han observado en las lesiones tres lipoproteínas que son consideradas aterogénicas cuando se elevan en el plasma: son las lipoproteínas de baja densidad (LDL); especialmente las pequeñas densas LDL, el resto de las lipoproteínas (también conocidas como β -VLDL encontradas en la hiperlipidemia tipo III y en alimentos de grasa animal) y lipoproteína (a). Estas lipoproteínas aterogénicas depositadas en la íntima, son sujetas a modificaciones químicas, como lo son la oxidación, desencadenando una serie de reacciones biológicas. Las LDL oxidadas (oxLDL) son invariablemente asociadas con células espumosas en las lesiones. Las Lp (a), aunque también están presentes en las lesiones, son raras, y algunas veces son asociadas con la formación de células espumosas y tienden a ser asociadas con la matriz extracelular. (11)

La función biológica de la Lp (a) en el desarrollo de lesiones continua siendo desconocida, pero en estudios recientes Fan y colaboradores usando

apolipoproteínas humanas (a) [apo a] en conejos transgénicos, revelaron que la Lp (a) puede actuar como un mediador pro-inflamatorio que aumenta la formación de lesiones. Estudios de microscopía electrónica de lesiones ateroscleróticas en el humano revelaron que existe una íntima interacción entre las células T y macrófagos.

Estudios de inmunohistoquímica han establecido que varias citocinas derivadas de diferentes células vasculares están presentes en lesiones en todos los estadios en la aterosclerosis. Una de las citocinas más importantes derivadas de los linfocitos T es el interferón gamma (INF- γ), el cual juega diversos papeles mediando la formación de células espumosas, la proliferación de células de músculo liso y regulando la producción de metaloproteinasas de matriz, que tienen influencia en la estabilidad de la placa. Estas observaciones sugieren que los mecanismos mediados por la inmunidad celular pueden estar envueltos en la patogénesis de la aterosclerosis (11).

➤ **Mecanismos para la iniciación y progresión de la aterosclerosis**

El colesterol de origen animal ha sido muy usado para investigaciones de los eventos tempranos de la aterogénesis, los cuales usualmente no son estudiados en humanos. Durante los años 80's, una serie de estudios en los cuales utilizaron colesterol animal, establecieron que la adherencia de células mononucleares era uno de los eventos tempranos en la aterosclerosis. Encontraron que las células mononucleares se adhieren a través de moléculas de adhesión 1 (VCAM-1), moléculas de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), P-selectinas y E-selectinas. Se incrementó la expresión de estas moléculas consideradas responsables de la adherencia de células endoteliales, monocitos, linfocitos T y de su unión preferencial a la superficie arterial. Estas moléculas de adhesión son altamente reguladas por la elevación de los niveles de lipoproteínas aterogénicas [oxLDL y Lp(a)] y citocinas *in vitro*. Estas moléculas son críticas en la iniciación de la formación de lesiones producidas en ratones modificados en los cuales estas moléculas son generalmente deficientes (11).

Las VCAM juegan un papel muy importante más que ICAM-1 en la iniciación de la adherencia de los monocitos a las células endoteliales durante la aterogénesis.

Después de que los monocitos y los linfocitos T se unen a la superficie de la pared arterial, estos migran dentro del espacio subendotelial. Los monocitos se diferencian y se transforman en macrófagos los cuales forman parte de las células espumosas. Esta migración subendotelial es inducida por la presencia de mediadores bioreactivos llamados quimioatrayentes localizados en la íntima. Los quimioatrayentes deben estar presentes en la íntima y ser capaces de inducir quimiotaxis en monocitos. Entre ellos se incluyen las oxLDL, la Lp (a), MCP-1, interleucina (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). MCP-1 y Lyso-PC (un componente de ox-LDL) pueden ser los más importantes y son los quimioatrayentes primeramente caracterizados en la lesión. MCP-1 fue encontrada en las lesiones en estadios tempranos y pueden ser producidos por células endoteliales y también macrófagos. La función de MCP-1 depende del receptor específico CCR-2 presente en la superficie de los monocitos. Deficiencias en la proteína MCP-1 o en los receptores CCR-2 reducen significativamente la lesión desarrollada en los ratones apoE KO, sugiriendo que MCP-1 es un mediador crítico del recubrimiento de los monocitos en la íntima. Las oxLDL pueden inhibir la movilidad de los macrófagos, aunque el mecanismo de este fenómeno todavía no está bien definido. Lo anterior sugiere que en un futuro la aterosclerosis pueda tratarse con drogas cuyo blanco sean la molécula de adhesión o quimioatrayentes para monocitos y macrófagos (11).

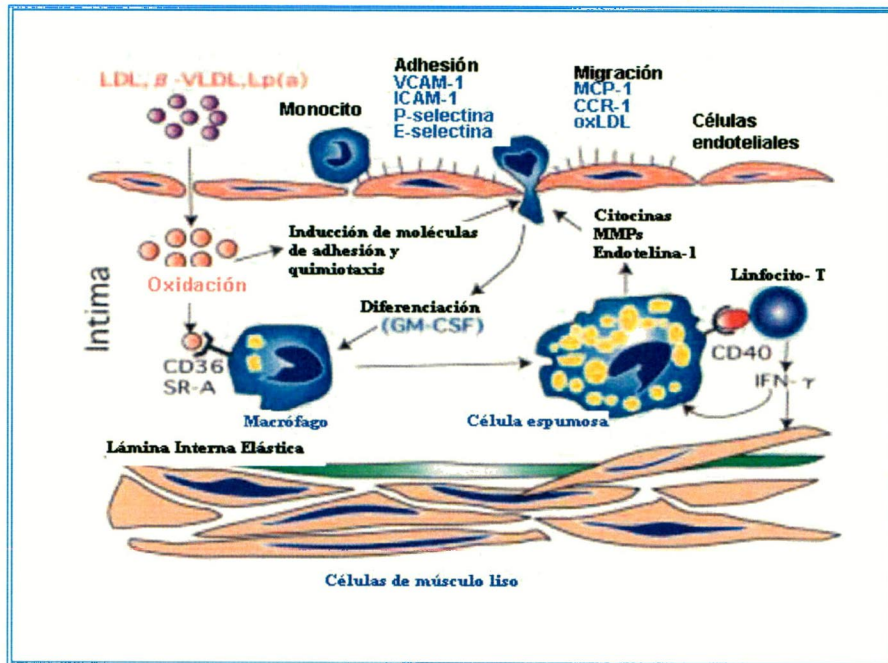


FIGURA 5. Mecanismos de la patogénesis de la aterosclerosis.

La elevación de las lipoproteínas aterogénicas del plasma [LDL, beta-VLDL y Lp (a)] puede llevar a la formación de depósitos de éstas lipoproteínas en la íntima. Estas lipoproteínas aterogénicas pueden llegar a inducir una serie de cambios biológicos, que incluyen un aumento de moléculas de adhesión en células endoteliales, la adhesión y migración de monocitos y linfocitos T. Estos monocitos pueden llegar a diferenciarse en macrófagos debido a la acción de la GM-CSF y en estos últimos se depositan lipoproteínas aterogénicas por medio de receptores scavenger y son transformadas dentro de los macrófagos en células espumosas. Por último las interacciones entre las células espumosas, linfocitos y las células del músculo liso junto con diversas citocinas y otros efectos biológicos son las que deciden el destino de las lesiones.

➤ **Estabilidad de la placa y reacciones inflamatorias**

La típica placa aterosclerótica (también llamada ateroma o placa fibrosa) contiene lípidos o núcleo necrótico cubierto por una capa fibrótica que consiste en una mezcla de células de músculo liso y matriz extracelular.

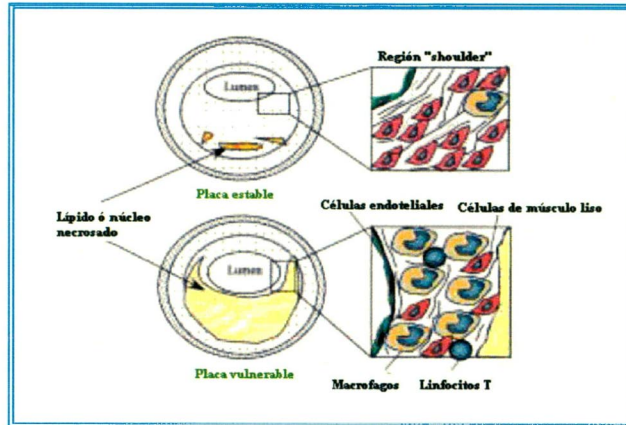


FIGURA 6. Ilustración esquemática de las placas estable e inestable.

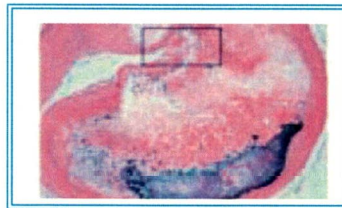


FIGURA 7. Una típica placa inestable de aterosclerosis coronaria humana.

La base de las lesiones, llamadas "shoulder", contiene un número de macrófagos derivados de células espumosas y linfocitos T. Se cree que estos componentes pueden determinar el destino de la placa, llamados estabilidad y desestabilidad de la placa. La placa común puede ser morfológicamente diferente y son clínicamente relevantes: La estabilidad de la placa y desestabilidad o placa vulnerable.

La placa estable esta compuesta de un pequeño núcleo de lípidos cubiertos por una gruesa capa fibromuscular.

La placa inestable contiene una gran cantidad de núcleos lipídicos, y un gran número de células inflamatorias, especialmente en la base de las lesiones.

Las placas estables son las de mayor riesgo para la estenosis u oclusión cuando estas causan una significativa reducción vascular del lumen, la placa vulnerable es fatal ya que usualmente desencadena síndrome coronario agudo y si esta placa se rompe produce trombosis. La acumulación de macrófagos y linfocitos T juegan un papel crítico porque los macrófagos pueden producir metaloproteinasas de matriz (MMPs), las cuales pueden potenciar la ruptura. Las citocinas como TNF, IL-1 y el factor estimulador de colonias macrófago-granulocitos (MG-CSF) presentes en las lesiones pueden también regular la secreción de MMPs semejantes.

Una interacción entre los linfocitos T y los macrófagos pueden también regular la producción de macrófagos derivados de MMPs. El ligando CD-40 en las células T puede unir al receptor CD-40 a los macrófagos, un proceso en el cual se induce la síntesis de MMPs. Los linfocitos T pueden también influenciar la estabilidad de la placa a través de la liberación de INF- γ , el cual inhibe la proliferación de células del músculo liso y la producción de matriz. Podría ser importante el uso de inhibidores de MMP para reducir el riesgo de la ruptura de la placa en pacientes con enfermedad arterial coronaria (11).

➤ **Lipoproteínas e inflamación**

La aterosclerosis es un tipo específico de proceso de inflamación crónica. Todas las lipoproteínas aterogénicas, una vez depositadas en la íntima, pueden ejercer directa o indirectamente efectos proinflamatorios. Las oxLDL pueden inducir expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y desencadenar la migración de monocitos hacia la íntima. Por otro lado, las oxLDL pueden estimular la producción de muchos mediadores inflamatorios de otras células vasculares, resultando en diversas respuestas inflamatorias en la pared arterial.

Experimentos donde usaron ratones apoE KO demostraron que la administración continua del antagonista del receptor de endotelina-1 (SB209670) produjo reducción importante de la aterosclerosis, independientemente de los niveles de colesterol en plasma.

Las lipoproteínas (Lp) son macromoléculas pseudomicelares, constituidas principalmente por lípidos antipáticos (fosfolípidos y colesterol libre), lípidos no polares (triacilgliceroles y ésteres de colesterol) y por proteínas llamadas apolipoproteínas (Apo). Los lípidos no polares se sitúan en el interior de las lipoproteínas. Los lípidos antipáticos se organizan en una monocapa en la superficie del complejo, presentando sus grupos polares hacia el medio acuoso. Las apolipoproteínas estabilizan la monocapa de fosfolípidos, modulan la actividad de ciertas enzimas y la relación de estas últimas con sus receptores. De esta manera el transporte de lípidos en plasma esta garantizado (12).

Las lipoproteínas se clasifican de acuerdo a su densidad en cinco clases:

1. Quilomicrones (Qm), son las lipoproteínas más grandes y menos densas ($d < 0.94$).
2. VLDL (Very Low-Density Lipoproteins), lipoproteínas de muy baja densidad ($0.94 < d < 1.006$).
3. IDL (Intermediate-Density-Lipoproteins), lipoproteínas de densidad intermedia ($1.006 < d < 1.019$).
4. LDL (Low-Density Lipoproteins), lipoproteínas de baja densidad ($1.019 < d < 1.063$).
5. HDL (High-Density Lipoproteins), lipoproteínas de alta densidad ($1.063 < d < 1.210$).

También se clasifican por su contenido de apolipoproteínas ó lipoproteínas en apolipoproteína A [Lp (a)] y apolipoproteína B [Lp (b)] (36).

Los lipoperóxidos formados son compuestos ligeramente oxidantes, pero generan compuestos fuertemente oxidantes que alteran la estructura de las LDL llamadas **LDL oxidadas (LDL_{ox})** (13).

Las oxLDL, Lp(a) y otras lipoproteínas aterogénicas podrían también desencadenar procesos inflamatorios induciendo la expresión de moléculas de adhesión, la quimiotaxis de monocitos, y la proliferación de células de músculo liso. En estudios recientes, los conejos transgénicos que no tienen Lp (a) endógena presentaron incremento de arterosclerosis aórtica. Las lesiones ateroescleróticas en estos conejos se caracterizan por incremento de proliferación celular y de Lp (a) que es obtenida de los depósitos en la lesión.

Las lipoproteínas aterogénicas ejercen diversos efectos induciendo reacciones inflamatorias crónicas durante la formación de la lesión. Importantemente, estas lipoproteínas aterogénicas pueden aumentar la producción de citocinas por células vasculares, y a través de mecanismos autócrinos y parácrinos, la reacción inflamatoria puede desencadenar un ciclo vicioso resultando en la progresión de la lesión. En contraste la HDL, una lipoproteína anti-aterogénica que protege de la aterogénesis vía transporte reverso de colesterol, juega un papel muy importante como un factor anti-inflamatorio. Las funciones benéficas de las HDL podrían abrir rutas para el tratamiento a futuro de la arterosclerosis. A continuación en las tabla 1 y 2 se presentan los posibles efectos de las oxLDL y HDL. (11)

Tabla 1. Posibles efectos proaterogénicos de LDL oxidadas

Efectos	Posibles mecanismos
Adhesión de monocitos en las células endoteliales ↑.	Incremento en la expresión de moléculas en células endoteliales.
Quimiotaxis de monocitos y linfocitos T ↑.	Inducción en la producción de MCP-1 y efecto quimioatrayente directo.
Receptor A scavenger y CD36↑.	Activación de AP-1 y factores de transcripción ets.
Formación de células espumosas ↑.	Aumenta las LDL oxidadas mediadas por receptores scavenger.
Inducción de genes proinflamatorios.	Activación de NFκB y AP-1 e incrementa el AMPc.
Incremento de muerte celular.	Activación de apoptosis y formación de cristales de colesterol
Trombosis↑.	Inducción del factor tisular, incremento en la agregación plaquetaria.
Funciones vasculares débiles.	Disfunción de ET-1 y NO.
Ruptura de la placa ↑.	Incremento en la producción de MMPs.

↑: Aumento

Tabla 2. Posibles efectos anti-aterogénicos de las HDL.

Efecto.	Posibles mecanismos.
Inhibición de la formación de la lesión ↓.	Transporte reverso de colesterol.
Adhesión de monocitos en las células endoteliales ↓.	Inhibición de moléculas de adhesión y disminución en la producción de citocinas.
Trombosis↓.	Modulación de antitrombóticos endoteliales y propiedades profibrinolíticas.
Efectos antioxidantes ↑.	Modulación de paroxonasa.
Muerte celular ↓.	Inhibición de apoptosis.
Proliferación celular ↓.	Inhibición de la proliferación de SMC.

↓Disminuye ó inhibe

CAPÍTULO V

ATEROTROMBOSIS

V. ATERTOTROMBOSIS

➤ Mecanismos inflamatorios en aterotrombosis

La adherencia y subsecuente transmigración de leucocitos al otro lado del endotelio vascular son mediados por moléculas de adhesión celular (CAMs). Las selectinas son moléculas de adhesión que median la circulación inicial de células inflamatorias sólo en células endoteliales. Las P-selectinas son almacenadas en los gránulos α de plaquetas y en los cuerpos Weibel-Palade de células endoteliales y pueden ser rápidamente redistribuidos en la superficie de estas células después de la estimulación por agonistas como la trombina y ADP. E-selectina es sintetizada de novo por células endoteliales cuando son activadas por interleucina-1 (IL-1) o factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).

Hay evidencias que sugieren que las selectinas juegan un papel en estadios tempranos de aterogénesis. E-selectina y P-selectina son preferencialmente expresadas en el endotelio por encima de las placas ateroscleróticas. Se sabe que la administración de anticuerpos anti-P-selectina resulta en una reducción de monocitos circulantes. La deficiencia de P-selectina en ratones genera una ausencia completa de leucocitos circulantes y estos ratones desarrollan menos lesiones ateromatosas y son protegidos de la hiperplasia neointimal después del daño vascular. Esto sugiere que el bloqueo de P-selectina podría ser una estrategia de terapia potencial para la disminución de restenosis.

La molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1) y la molécula-1 de adhesión vascular (VCAM-1) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas de CAMs. Los macrófagos y las células endoteliales expresan ICAM-1 en respuesta a citocinas inflamatorias como la IL-1, el TNF- α y el interferón- γ , sin embargo, la expresión de VCAM-1 esta restringida principalmente a células endoteliales. Las citocinas estimulan a las células endoteliales para que estas produzcan proteína-1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1), factor estimulante de colonias monocíticas, e IL-6, y esto conlleva a la amplificación de la cascada inflamatoria. Por otro lado la expresión de ICAM-1 en células endoteliales se ha demostrado sobre todos los tipos de placa ateromatosa.

El TNF- α es una citocina pleiotrópica producida por una variedad de células incluyendo macrófagos, células endoteliales, y células de músculo liso. El TNF- α , el interferón- γ y la IL-1 estimulan la producción de IL-6 por células de músculo liso. La IL-6 es expresada en lesiones ateromatosas de humanos y es el principal estímulo hepático para la producción de proteína C-reactiva (PCR).

La PCR es un reactante de fase aguda que sirve como un reconocimiento molecular en el sistema inmune innato. La PCR como tradicionalmente se piensa es un marcador de la inflamación vascular, sin que juegue un papel directo en el proceso inflamatorio. Sin embargo, evidencias recientes sugieren que la PCR puede contribuir directamente al estado proinflamatorio. La PCR estimula la liberación de citocinas inflamatorias como son la IL-1b, la IL-6, el TNF- α en los monocitos y puede también actuar directamente como un estímulo proinflamatorio para las células fagocíticas por unión al receptor Fc γ RII. Recientemente también se ha demostrado que la PCR promueve la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 por células endoteliales y media la inducción de MCP-1 en células endoteliales, un efecto que es inhibido por simvastatina y fenofibratos.

La PCR se ha encontrado localizada directamente en la placa ateromatosa donde se lleva a cabo el reclutamiento de monocitos. Esta proteína es un activador de complemento y se localiza junto al complejo de ataque a la membrana en lesiones ateroscleróticas tempranas. La principal fuente de producción de la PCR es el hígado. Sin embargo, recientes datos muestran que los tejidos arteriales pueden producir PCR como una fuente de proteínas complementarias. La PCR podría ser un activador endógeno del complemento en las lesiones ateromatosas.

Las placas ateromatosas maduras, desarrollan una capa fibrosa con un núcleo lipídico mientras que la placa vulnerable es caracterizada por una capa fibrosa y un gran pool de lípidos. El colágeno intersticial, producido por las células del músculo liso, confiere fuerza ténsil y estabilidad para la capa fibrosa (14).

La ruptura de la capa fibrosa resulta en un derramamiento del pool de lípidos protrombóticos dentro del lumen, probablemente anunciando un evento

de isquemia aguda. En los tejidos, el incremento en la cantidad de células endoteliales y macrófagos es un evento inicial de trombosis. La IL-1 y el TNF- α estimulan la expresión del factor tisular por células endoteliales, las cuales expresan el ligando CD40 (CD154) que también está unido a leucocitos y que pueden estimular el factor de expresión tisular. La expresión en plaquetas de CD154 ilustra una potencialmente importante interacción entre vías pro inflamatorias y protrombóticas.

A pesar de todos los estudios realizados a la fecha, el proceso que lleva al desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, no queda claro. La atención se ha enfocado en los procesos infecciosos como un potencial instigador de dicha respuesta. Las infecciones con organismos como *Helicobacter pylori* pueden incrementar la circulación de citocinas. Por otro lado, los procesos de infección locales persistentes en la placa aterosclerótica por organismos intracelulares como *Chlamydia pneumoniae* y citomegalovirus, podrían potencialmente estimular el proceso inflamatorio. Fisiológicamente, los datos con respecto al valor de las pruebas para anticuerpos para estos y otros agentes infecciosos en estudios prospectivos epidemiológicos de riesgo cardiovascular son inconclusos.

La respuesta inflamatoria puede generarse en diferentes sitios. Aunque muchos marcadores inflamatorios son derivados del hígado, incluyendo la PCR, el fibrinógeno, y la proteína del suero amiloide A, bajos niveles podrían también ser derivados de otras fuentes incluyendo el endotelio. La producción de marcadores inflamatorios es estimulada por citocinas circulantes como la IL-6 y el TNF- α . Estas citocinas pueden ser generadas de una variedad de fuentes sistémicas, incluyendo el tejido adiposo y cualquiera de las células inflamatorias presentes en la lesión aterosclerótica, en la pared arterial o en otra parte (14).

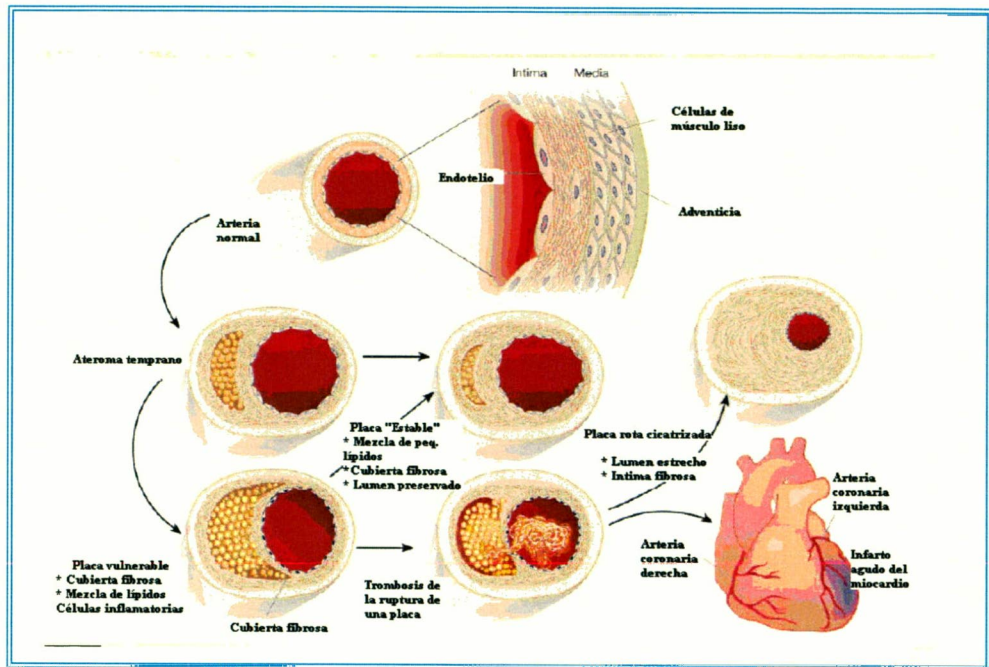


FIGURA 8. Inflamación en aterosclerosis (15)

➤ Inflamación y disfunción endotelial

En algunos trabajos se ha estudiado el daño endotelial generado por la respuesta inflamatoria, así como la relación entre la inflamación sistémica y el síndrome isquémico. Pacientes con enfermedad arterial coronaria presentan niveles elevados de PCR/CRP asociados al daño vascular endotelial. De forma importante, la normalización de los niveles de PCR se asocia con un significativo mejoramiento en la respuesta endotelial. En trabajos recientes también se ha demostrado que los niveles de PCR están inversamente relacionados a la síntesis de óxido nítrico basal endotelial. Estos datos sugieren que la disfunción endotelial puede ser un factor importante en la relación entre el grado de inflamación crónica y la enfermedad cardiovascular. Interesantemente, la terapia con estatina en humanos regula la síntesis de óxido nítrico endotelial y mejora la vasodilatación coronaria dependiente del endotelio después de un mes de tratamiento (14).

➤ **Efectos anti-inflamatorios de reducción de lípidos**

La reducción de lípidos se ha encontrado que tiene efectos favorables en los procesos inflamatorios en la placa ateromatosa. Por ejemplo, conejos tratados con una dieta alta en colesterol desarrollan ateroma con un alto número de macrófagos y pool de lípidos. Estos macrófagos sobre-expresan MMP-1, la enzima limitante en el rompimiento del colágeno. Y si los conejos se someten a una dieta baja en colesterol, el número de macrófagos y los niveles de MMP-1 se reducen de forma importante.

La terapia con estatina tiene efectos saludables en la composición de la placa. La fluvastatina y la lovastatina bajan la expresión de MMP-1 en células endoteliales vasculares humanas en tiempo y manera dosis dependiente. La fluvastatina y la pravastatina incrementan la producción de procolágeno por células de músculo liso. La pravastatina causa cambios favorables en la placa ateromatosa independiente de su efecto sobre el colesterol. La pravastatina administrada a monos funciona como un vasodilatador, disminuye la cantidad de macrófagos en la íntima, la calcificación en la media y en general hay menos neovascularización. La placa carótida humana presenta cambios favorables con terapia de pravastatina, la cual reduce la cantidad de macrófagos, la actividad de MMP-2, y el alto contenido de colágeno.

Las estatinas también causan disminución en la expresión de ICAM-1 soluble (sICAM-1) y lipopolisacáridos, estos inducen secreción de IL-6 y TNF- α . La simvastatina reduce la expresión de TNF- α y de IL-1b por los monocitos, mientras que la atorvastatina reduce los niveles de MCP-1 en la íntima en los conejos hipercolesterolémicos. Este efecto esta relacionado con la reducción en la activación del factor κ B, un factor de transcripción implicado en la inducción de otras citocinas proinflamatorias, como la IL-1 y el TNF- α , y la regulación de la expresión de E-selectinas. Las estatinas lipofílicas también producen disminución de la expresión del factor tisular y de la actividad en los cultivos de monocitos humanos derivados de macrófagos (14).

➤ **Marcadores inflamatorios para predicciones clínicas de riesgo**

La hiperlipidemia esta presente en casi todos los pacientes que tienen infarto al miocardio. El efecto de los mediadores inflamatorios en la aterogénesis y en la vulnerabilidad de la placa, esta dado por los niveles en plasma de dichos mediadores. Estos niveles pueden predecir el riesgo de un individuo a tener ruptura de la placa. Los marcadores candidatos incluyen las P-selectinas, sICAM-1, IL-6, TNF- α y PCR.

En la aterogénesis, se ha investigado el valor de CAMs para predecir el riesgo vascular en sujetos sanos. Después de la activación de las citocinas, las CAMs están cubriendo la superficie de las células endoteliales y los leucocitos y sus niveles pueden ser medidos en circulación en plasma. El papel patogénico de estas CAMs circulantes todavía no es claro, estas moléculas pueden servir como marcadores de activación del endotelio y la inflamación vascular.

Las P-selectinas solubles son un predictor independiente de un futuro riesgo cardiovascular, estas fueron estudiadas en mujeres sanas en el Women's Health Study (WHS). Los niveles de P-selectinas fueron significativamente altos en mujeres quienes tuvieron eventos cardiovasculares al comparar con mujeres sin daño cardiovascular. Por otro lado, en el Physicians' Health Study (PHS), donde se estudiaron hombres sanos, los sICAM-1 fueron predictores independientes de riesgo cardiovascular. Las mediciones basales fueron más altas en hombres que desarrollaron infarto al miocardio que en aquellos sin esta patología.

En otro estudio (Atherosclerosis Risk in Communities-ARIC), se reporto que sICAM-1 es un predictor independiente de enfermedad arterial coronaria. Sin embargo, en los estudios PHS y ARIC, los niveles en plasma de VCAM-1 no se asociaron con incremento en el riesgo cardiovascular. Estos datos sugieren que puede haber diferencias importantes en el papel que juegan diferentes CAMs en la aterogénesis (14).

CAPÍTULO VI

FACTORES DE RIESGO A INFARTO

VI. FACTORES DE RIESGO A INFARTO

Son las características que posee un individuo y que se asocian de forma estadística con la prevalencia de la enfermedad coronaria o con la tasa de acontecimientos de la misma. Los principales factores de riesgo que se asocian con la enfermedad coronaria son:

- Edad (Según los registros de la Sociedad Mexicana de Cardiología la edad oscila entre los 45 años, pero en ocasiones entre los 30 y 35 años).
- Género masculino
- Niveles elevados de colesterol
- Hipertrigliceridemia
- Presión arterial alta
- Tabaquismo
- Diabetes
- Antecedentes familiares de la enfermedad
- Obesidad
- Sedentarismo

Otros factores de riesgo: Es difícil cuantificar y clasificar los diferentes factores sociales que pueden influir en el desarrollo que lleva al infarto. En general se acepta que éste tiene más incidencia en las comunidades industrializadas, pero también en éstas es donde se aplican mejor las medidas de prevención secundaria. En el medio rural sucedería al contrario, al igual que en los estratos sociales más bajos.

También es muy complejo identificar los factores psicológicos de una persona que pueden influir en su riesgo cardiovascular (16).

VI. I. NUEVOS CRITERIOS DE DIAGNÓSTICO DE INFARTO DE MIOCARDIO

En el año 2000, la European Society of Cardiology (ESC), en colaboración con el American College of Cardiology (ACC), han establecido nuevos criterios para el diagnóstico de infarto de miocardio (IM). Son los siguientes:

➤ Criterios de IAM, en evolución o reciente

Cualquiera de los 2 criterios siguientes:

1- Aumento característico y disminución progresiva (troponina) o aumento y disminución más rápida (CK-MB) de marcadores biológicos de necrosis miocárdica, acompañados de al menos uno de los siguientes:

- ☐ Síntomas de isquemia.
- ☐ Aparición de nuevas ondas Q de necrosis en el electrocardiograma (ECG)
- ☐ Cambios en el ECG sugestivos de isquemia (elevación o depresión del segmento ST).
- ☐ Intervención coronaria (por ej. angioplastia coronaria) (17).

2- Hallazgos anatomopatológicos de IAM.

* Troponinas cardíacas

Son proteínas que forman parte de los mecanismos de regulación de la contracción del músculo cardíaco, están presentes en las fibras miocárdicas. La troponina es una proteína globular de gran tamaño, contiene tres subunidades polipeptídicas: troponina C (fijadora de calcio), troponina I (inhibidora de la interacción actina-miosina) y troponina T (fijadora de tropomiosina).

Cuando se necrosan las células del tejido miocárdico, estas pierden la integridad de la membrana celular y las moléculas intracelulares difunden hacia la microcirculación y a los linfáticos. Estas macromoléculas se detectan en la circulación periférica y constituyen los marcadores bioquímicos específicos de daño al miocardio. Las isoformas cardíacas específicas son troponina T y troponina I, que pueden ser medidas en laboratorio utilizando sistemas inmunoenzimáticos, inmunocromatográficos y de quimioluminiscencia entre

otros; permitiéndonos distinguir entre pacientes con IAM, de aquéllos que presentan dolor en el pecho de origen no cardíaco. Así pues la troponina es utilizada para establecer diagnóstico diferencial y pronóstico de los pacientes que presenten un síndrome coronario agudo (18).

* CK-MB

Es una de las tres isoformas tisulares (con CK-BB y CK-MM) de la creatina kinasa (CK). CK es la enzima principal del metabolismo muscular, que cataliza la reacción reversible de la fosforilación de la creatina por el trifosfato de adenosina (ATP). El CK-MB está compuesto de dos subunidades (PM = 40.000 cada una), la subunidad M, expresada en el músculo, y la subunidad B, expresada en el cerebro. La isoenzima CK-MB se sitúa principalmente en el miocardio, con un 20% de la actividad total de CK. Pueden hallarse cantidades superiores al 5% en otros órganos, como la próstata, bazo o músculo esquelético, y las cantidades de CK-MB pueden variar en función del tipo de músculo. Tras un infarto agudo de miocardio, los niveles de CK-MB en circulación reflejan la lesión en el miocardio. CK-MB aumenta rápidamente hasta alcanzar niveles máximos (en 12 horas) y después desciende a niveles normales (36-72 horas). Esta pauta de aumento y descenso de los valores de CK-MB junto con los cambios evolutivos en el ecocardiograma y un historial de dolor torácico se consideran normalmente como diagnóstico de un IAM. Las mediciones de CK-MB también pueden ayudar en la evaluación no invasiva de la eficacia de la reperusión miocárdica después de terapia trombolítica. Los niveles elevados de CK-MB también se asocian con trauma del músculo esquelético, pero no tienen las características de aumento y descenso de los niveles de CK-MB en el IAM. Se utilizó originalmente tecnología de inmunoinhibición para medir la actividad de CK-MB, que se comparó con la medición de la actividad total de CK (cociente CK-MB/CK). Sin embargo, la presencia de CK-BB, adenilato ciclasa (AK) y formas atípicas de CK (macro-CK), que no se neutralizan con anticuerpos anti-M en las muestras, produjo ocasionalmente una sobrestimación de los resultados de CK-MB. Hoy día, se utilizan muchas técnicas inmunoenzimáticas para medir la masa de CK-MB (ng/mL), que presenta una buena correlación con la medición de la actividad de CK-MB, sin las interferencias de CK-BB, macro-CK y AK (19, 20).

➤ **Criterios de IAM establecido (o antiguo)**

Cualquiera de los 2 criterios siguientes:

1- Aparición de nuevas ondas Q patológicas en ECG seriados. El paciente puede recordar o no síntomas previos.

Los marcadores bioquímicos de necrosis miocárdica pueden haberse normalizado, dependiendo del tiempo transcurrido desde el proceso agudo.

2- Hallazgos anatomopatológicos de IAM cicatrizado o en proceso de cicatrización.

Los avances tecnológicos y los cambios en la terapéutica son las principales causas para redefinir los criterios diagnósticos del IAM, ya que se disponen actualmente de determinaciones bioquímicas más sensibles y específicas de necrosis miocárdica. Además, trata de unificar criterios de las diferentes organizaciones y sociedades científicas (17).

CAPÍTULO VII

CITOCINAS EN INFARTO

VII. CITOCINAS EN INFARTO

➤ Desencadenamiento de producción de citocinas

Las citocinas son péptidos señalizadores y mediadores químicos que se producen como una respuesta a una agresión a un tejido, y causan la respuesta inflamatoria.

En general, las citocinas actúan a través de receptores de alta afinidad localizados en la superficie celular. La mayoría de las citocinas son moléculas multifuncionales que ejercen diferentes acciones en las diferentes células sobre las que actúan. La acción que inducirán variará a su vez según sean las condiciones microambientales. Las funciones de las citocinas se traslapan, siendo pocas las que tienen una única función. Las citocinas suelen actuar de forma local, ya sea autocrina o paracrina, pero algunas como la IL-6, tiene funciones endocrinas. La producción de citocinas, incluyendo las proinflamatorias, es una respuesta fisiológica a la lesión tisular. Su principal función es la coordinación de la eliminación de microorganismos invasores y la eliminación de tejidos lesionados. De esta forma se evita la estimulación excesiva del sistema inmune, que podría inducir reacciones de hipersensibilidad (21).

Las citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , la IL-1 β , y la IL-6 no son expresadas constitutivamente en el corazón normal. La regulación y producción de estas citocinas representa una respuesta intrínseca o una respuesta de estrés innato contra daño al miocardio. En el modelo de roedores con infarto al miocardio, existe una importante regulación de citocinas en el miocardio incluyendo el TNF- α , la IL- β , y la e IL-6. Esta regulación puede regresar a niveles normales si el infarto es pequeño. Sin embargo si el infarto es mayor, o si la respuesta inflamatoria de la persona es excesiva puede ser que se regulen citocinas o exista una segunda señal de regulación de estas, que corresponde a la fase de remodelación crónica. La segunda señal también puede ampliarse para implicar las zonas remotas no infartadas, mediando importantes procesos de remodelación en el miocardio. La elevación en la expresión de citocinas precede el consecuente incremento en la actividad de la metaloproteinasa de matriz (MMP) en el área infartada, así como el incremento de péptidos natriuréticos (ANP y BNP) y expresión de colágeno en el miocardio no infartado (22).

➤ **Mecanismo de estrés desencadenan producción de citocinas**

Las citocinas como el TNF- α y la IL-6 son rápidamente liberadas en la zona isquémica central durante el infarto.

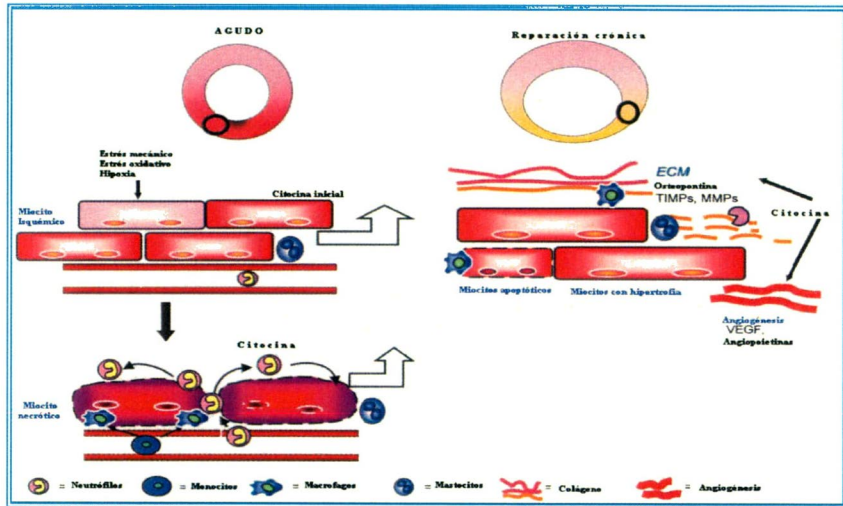


FIGURA 9. Inducción de citocinas inflamatorias después de la isquemia al miocardio y sus efectos en la remodelación cardíaca aguda y crónica.

En estudios recientes Kapadia y colaboradores mostraron que el esfuerzo hemodinámico podría desencadenar la producción en el miocardio de TNF- α de novo en un tiempo no mayor a los 30 minutos. Los mecanismos de estrés que están asociados con el infarto al miocardio producen de manera inmediata TNF- α e IL-6. Los estímulos mecánicos que actúan a través de potentes sensores (integrinas, citoesqueleto y proteínas del sarcómero) se convierten en 3 principales vías de transducción de señales que son, proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), transducción de señales JAK y activador de transcripción (STAT), y también las vías dependientes de calcineurina. Todas estas vías activan los factores de transcripción nuclear río abajo como lo son NF- κ B y AP-1, las cuales son requeridas para la expresión de genes de citocinas incluyendo el TNF- α y la IL-6 (22).

➤ **Vías de amplificación de citocinas**

Las citocinas también tienen la habilidad para amplificarse a través de retroalimentación positiva marcando el factor de transcripción NF- κ B. Por ejemplo, la regulación de citocinas como TNF- α en un área localizada del miocardio, ej. región isquémica, puede fácilmente inducir la regulación del TNF- α en el miocardio vecino normal, destacando los efectos amplificados de la citocina. Irwin y colaboradores demostraron que el mRNA del TNF- α fue mayormente detectable en zonas peri-infartadas durante los primeros días del infarto. Por otro lado, 35 días después del infarto, la “zona normal contra lateral” en el corazón infartado presenta altos niveles de expresión de TNF- α (22).

➤ **Citocinas alterando la contractilidad cardiaca**

Las citocinas son capaces de disminuir la función del ventrículo izquierdo y directa o indirectamente la contractilidad del miocito. En cuanto a la zona dañada, tanto el TNF- α como la IL-6 reducen la contractilidad, siendo una respuesta adaptativa para la disminución de la demanda de energía del miocardio. Estas citocinas también atenúan la contractilidad del miocito directamente a través de la reducción sistólica $[Ca^{2+}]$ alterando la función del retículo sarcoplásmico. Sin embargo, el TNF- α es también capaz de disminuir la contractilidad del miocito indirectamente a través del óxido nítrico atenuando la sensibilidad de los miofilamentos (22).

➤ **Restauración de las heridas**

Los procesos de remodelación aguda mediados por las citocinas y las células inflamatorias en el miocardio infartado también inician los procesos de reparación de las heridas. Esto incluye la fagocitosis y la reabsorción de los tejidos necrosados e hipertrofia de los miocitos que apenas viven, la degradación y la síntesis de la matriz de soporte como lo son el colágeno y las integrinas, y la proliferación de los miofibroblastos y angiogénesis/vasculogénesis (22).

CAPÍTULO VIII

GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

VI. GEN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α)

➤ Característica del gen TNF- α

El gen que codifica el TNF- α esta ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 en la región p21.3, dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase III. Se ubica entre los loci del HLA-B (región CMH clase I) y HLA-DR (CMH clase II) (23). El gen TNF- α tiene un tamaño de 3.6 Kb y está conformado por cuatro exones; el primero se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los tres restantes codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa. Además este gen posee tres intrones cuya función es desconocida (Figura 6). El TNF- α se une a los receptores de superficie celular TNF-R1 y TNF-R2, los cuales son activados mediante la respuesta fisiológica del TNF- α , incluyendo la apoptosis en miocitos cardiacos. Se ha observado que el TNF induce una respuesta al crecimiento hipertrófico y a la apoptosis en miocitos cardiacos y sugiere que este tiene un papel muy importante en la homeostasis miocardial (24). La unión a sus receptores de superficie celular provoca cascadas de señalización intracelular que pueden resultar en la activación de factores de transcripción como el factor nuclear- κ B (NF- κ B) o dominios de muerte como las caspasas. Estos modulan la expresión del gen TNF- α y pueden amplificar la inflamación o promover la apoptosis (25). Esta regulación transcripcional del gen es mediada vía el promotor 5' (26).

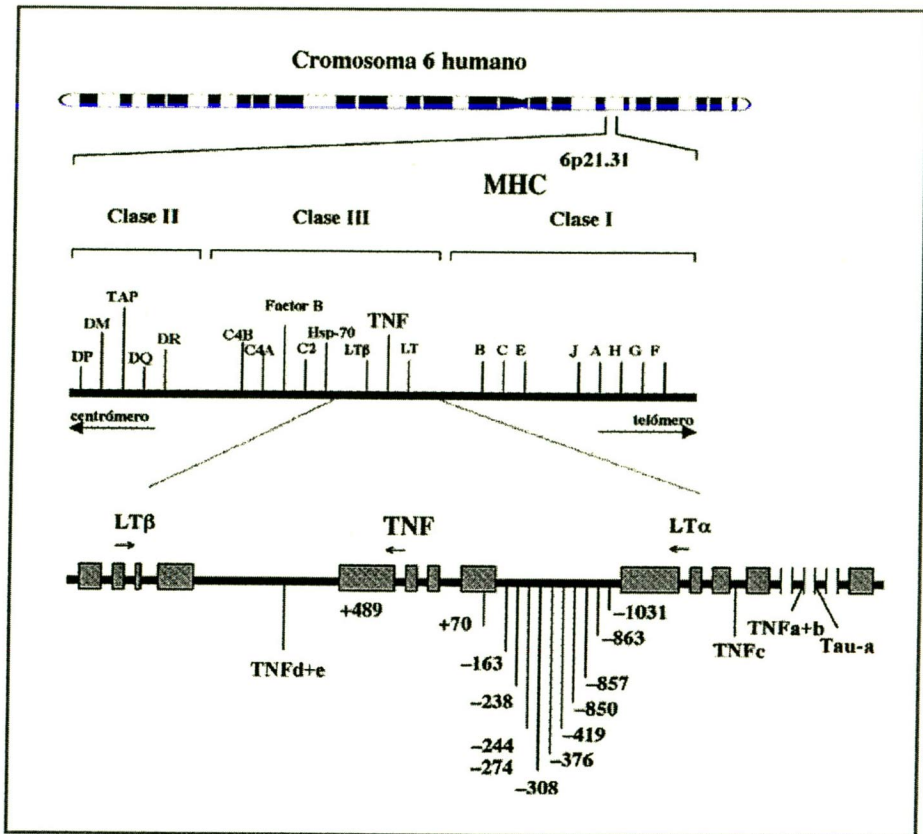


FIGURA 10. Conformación genética del TNF- α . El gen del TNF- α es representado en la parte superior, en el brazo corto del cromosoma 6, en la posición 6p21.3, formando parte del complejo mayor de histocompatibilidad clase III. En esta región se encuentran genes que codifican para las moléculas TNF- α y TNF- β , además están los genes para la linfotóxina. Cada uno de estos genes es codificado en la dirección que indican las flechas y son regulados de forma independiente. Además, se indica la ubicación de las regiones polimórficas, hasta ahora identificadas para el gen TNF, las cuales comprenden 5 microsatélites (denominados con las letras a, b, c, d, e) y 19 cambios de un único nucleótido (SNP). Estos SNP están representados con un cambio, o delección, de sus respectivas bases en la parte inferior de la figura. En la +691 el polimorfismo está dado por una delección de G (27).

➤ Polimorfismo del TNF- α

El locus del TNF- α posee una variedad de sitios polimórficos en la región codificante y en su vecindad. Como lo es el polimorfismo de nucleótido sencillo (SNP), que consiste en el cambio de un nucleótido que puede detectarse en cualquier lugar del DNA, ya sea en las secuencias regulatorias en el extremo 5' (promotor) o después de la región codificante (región no transcrita del extremo 3' [UTR]). El polimorfismo de nucleótido sencillo se ha descrito en varias posiciones, pero las posiciones a estudiar en este proyecto son las siguientes, la posición -308, la cual es una mutación puntual en la que la presencia de guanina define la variante TNF1 y la presencia de adenina la variante TNF2. El segundo polimorfismo radica en la posición -238 donde la variante TNFG contiene guanina, mientras que la variante TNFA contiene adenina (26).

➤ Función biológica

El TNF es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda y su principal fuente celular son los monocitos y macrófagos activados, aunque también puede ser producida por células endoteliales, células NK y linfocitos T y B (26). Una de las funciones biológicas del TNF es que estimula en las células endoteliales la expresión del factor tisular, que es un activador potente de la coagulación, e inhibe la expresión de la trombomodulina, que es un inhibidor de la coagulación (28). La respuesta inflamatoria y la producción de TNF son los componentes integrales de la respuesta del huésped para tejidos dañados y juegan un papel particularmente activo después del infarto al miocardio. Las citocinas son liberadas para modular la reparación del tejido y la adaptación después del daño.

En el momento inicial, las citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa son producidas tan pronto se sufre el infarto al miocardio. El TNF- α no está expresado en condiciones normales en el corazón. La regulación y producción de esta citocina representa una respuesta innata al estrés contra el daño del miocardio.

La concentración del TNF- α se eleva rápidamente en la zona isquémica central durante el infarto pero generalmente es más elevado en las zonas que bordean la zona afectada. El estrés isquémico representa un potente factor desencadenante para la producción de esta citocina, principalmente en la zona peri-infartada. Kapadia y colaboradores reportaron que debido al estrés del miocardio se puede desencadenar una producción de TNF- α de novo cada 30 minutos y esto es principalmente para amplificar los efectos de la citocina (22).

La estimulación de la secreción del TNF- α en respuesta a la isquemia miocárdica o infarto tiene efectos en el miocardio que provocan 4 cambios directamente en los miocitos cardíacos y que contribuyen a la remodelación fenotípica: 1) apoptosis progresiva de miocitos, 2) hipertrofia de miocitos, 3) defectos en la contractilidad, y 4) transducción inflamatoria. Las citocinas tienen efectos adicionales en la matriz extracelular, integrinas y regeneración vascular y cardíaca. Citocinas como el TNF- α IL-1, y la IL-6 son de las más comúnmente asociadas con los procesos de remodelación post-infarto (22).

Se ha reportado que la expresión del TNF - α se induce en el miocardio en respuesta a una variedad de formas de lesiones cardíacas como la isquemia miocárdica, la disfunción ventricular derecha, la cardiomiopatía y el edema pulmonar (24), lo que puede ser un factor importante en la perpetuación del daño coronario y final desencadenamiento del infarto.

➤ **Señalización por la familia de receptores del factor de necrosis tumoral.**

La familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF) estimula la transcripción génica o induce la apoptosis en una amplia variedad de células. Los prototipos de esta familia son los receptores para el TNF, denominado receptor del TNF tipo I (TNF-RI) y receptor del TNF tipo II (TNF_RII). Los miembros de esta familia son proteínas de membrana tipo I con dominios extracelulares ricos en cisterna conservados, y entre ellos se incluyen los receptores del TNF, el receptor de la linfotoxina- β (LT- β R), Fas y CD40. Los ligandos para estos receptores tienen una estructura típica, con un plegamiento en pirámides triangulares homotriméricas. Estos ligandos son proteínas secretadas y proteínas de membrana que son expresadas habitualmente por

las células del sistema inmunitario y, entre ellas se encuentra el TNF, el ligando de Fas y el ligando de CD40.

La capacidad de diferentes miembros de la familia de receptores del TNF de activar la expresión génica o de apoptosis se debe a la presencia de uno de dos motivos estructurales conservados en las regiones citoplasmáticas de los receptores. El TNF-RI y la molécula Fas comparten un motivo de secuencia que recibe el nombre de motivo de muerte debido a que la mutación o la delección de esta región impide que las moléculas del TNF-RI o Fas liberen señales inductoras de la apoptosis. El dominio de muerte es un dominio de interacción proteína-proteína para el ensamblaje de proteínas que contienen el dominio de muerte y que interaccionan, denominado TRADD (dominio de muerte asociado al receptor del TNF) ó FADD (dominio de muerte asociado a Fas), con las regiones intracelulares de las moléculas de TNF-RI o Fas agrupadas, respectivamente. El TNF-RI puede unirse a FADD indirectamente uniéndose primero a TRADD, al cual puede unirse al FADD por el mismo dominio de interacción proteína-proteína. La unión de estas proteínas adaptadoras da lugar al ensamblaje de un complejo que activa la caspasa 8, la cual a continuación activa las caspasas efectoras que inducen la apoptosis.

TNF-RII, LT- β R y CD40 comparten un motivo citoplásmico diferente que se une a una familia de moléculas adaptadoras llamadas factores asociados al receptor del TNF (TRAF). Hasta la fecha, se han identificado 6 TRAF. Los factores TRAF 1 y 2 interaccionan con el TNF-RII, el TRAF-2 y el TRAF-3, interaccionan con CD40, y el TRAF-4 interacciona con LT- β R. El TNF-RI puede unirse indirectamente al TRF-2 por medio de la proteína adaptadora TRADD. Las moléculas adaptadoras asociadas al TNF-RI también pueden unirse a una serina-treonina quinasa, denominada RIP (proteína de interacción con el receptor). Diversos estudios con ratones sometidos a inhibición génica selectiva que carecen de TRAF-2 o RIP indican que el TRAF-2 activa la enzima quinasa N terminal de Jun (JNK), que a continuación activa el factor de transcripción AP-1 (proteína de activación-1), mientras que la RIP activa el factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear - κ B). Así, la unión de ligandos a los miembros de la familia de receptores del TNF que contienen dominios citoplásmicos de unión al TRAF da lugar a la estimulación de la transcripción

génica de las células diana. Este es el mecanismo por el que CD40 transmite señales activadoras a las células B y a los macrófagos. Debe señalarse que no se conocen completamente estas vías (28).

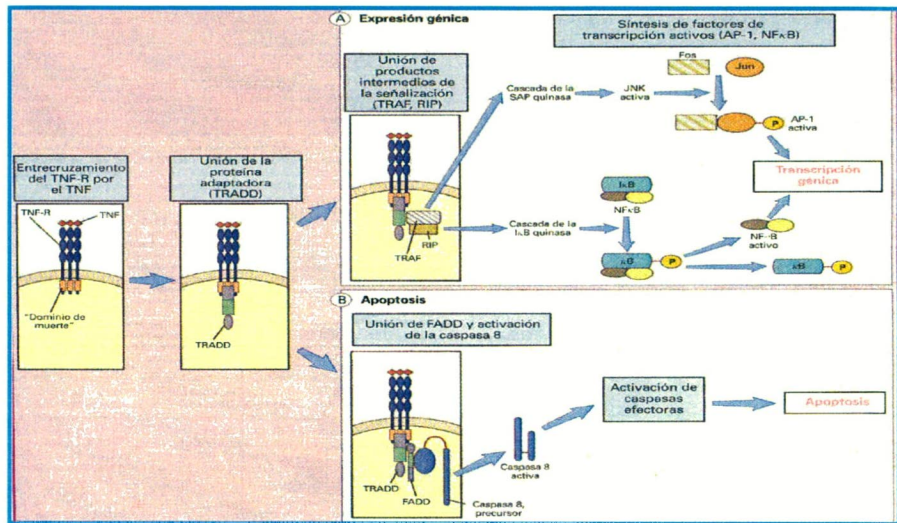


FIGURA 11. Transducción de señales por los receptores del TNF.

CAPÍTULO IX.

ESTUDIOS EN OTRAS POBLACIONES

IX. ESTUDIOS EN OTRAS POBLACIONES

Existen estudios previos en los que se ha relacionado a los SNPs -238 y -308 con la protección o susceptibilidad al desarrollo de diversas enfermedades (29). Estos sitios polimórficos también han sido estudiados en enfermedad arterial coronaria, IAM, angina inestable y shock cardiogénico obteniéndose diversos resultados de acuerdo a la población estudiada. Bennet y cols reportaron asociación del TNF- α -308 con incremento del riesgo a padecer infarto agudo al miocardio en individuos franceses y esta asociación se incremento al realizar el mismo estudio en personas fumadoras (22). Otros estudios en poblaciones donde se analizó la posición TNF-238 en ingleses no se encontró asociación con enfermedad arterial coronaria. En la población Francesa, TNF-238 tampoco se asocio a infarto agudo al miocardio. A diferencia con la posición TNF-308, esta se asocio a infarto agudo al miocardio tanto en la población Francesa como en la Brasileña (Tabla).

Estos antecedentes sugieren que la alteración en la cantidad o calidad de la producción de las citocinas pueden formar parte de los eventos que llevan al infarto, así como la respuesta del miocardio al infarto. La importancia de los procesos de remodelación cardíaca post-infarto en el paciente que sobrevive es la de estar bien documentados para futuros casos y subsiguientes estudios (30).

TABLA 3. TNF- α en enfermedades cardiovasculares en otras poblaciones.

POLIMORFISMO	ENFERMEDAD	RESULTADOS	REFERENCIA
-238	Enfermedad arterial coronaria	No asociado Ingleses	Allen RA, et al. Eur J Clin Invest (31).
	Infarto al miocardio	No asociado Franceses	Herrmann SM, et al. Eur J Clin Invest (32)
-308	Infarto al miocardio	Asociado Brasileños	Padovani J, et al. Thrombosis Research (33).
	Angina inestable	No factor de riesgo Belgas	Appoloni O, et al. Ches (34).
	Infarto al miocardio	Asociado Franceses	Bernard V, et al. Clin Chem Lab Med (35).
	Shock cardiogénico	Susceptible Franceses	Herrmann SM, et al. Eur J Clin Invest (32).

CAPÍTULO X

OBJETIVOS

X. OBJETIVO GENERAL

El objetivo del presente trabajo fue investigar la asociación entre los polimorfismos del TNF- α (-238 y -308) y la susceptibilidad y/o protección al desarrollo del infarto agudo del miocardio en la población mexicana.

X. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar las frecuencias de las variantes ubicadas en los sitios polimórficos del promotor del gen que codifica para TNF- α en un grupo de pacientes mexicanos con infarto agudo al miocardio.
- 2.- Determinar estas mismas variantes en un grupo control sin antecedentes familiares ni clínicos de infarto agudo del miocardio, pareados por edad, sexo, y origen étnico.
- 3.- Una vez definidas estas frecuencias, compararlas entre los dos grupos de estudio con el fin de definir si algún polimorfismo del TNF- α estudiado pudiera estar confiriendo susceptibilidad y/o protección para el desarrollo de este padecimiento en la población mexicana.

CAPÍTULO XI

JUSTIFICACIÓN

E

HIPÓTESIS

XI. JUSTIFICACION

El Infarto agudo del miocardio (IAM) es un padecimiento de etiología multifactorial, donde se requiere de un individuo susceptible desde el punto de vista genético y quien en presencia de un factor ambiental desarrolla padecimientos cardiovasculares como el IAM. Según datos del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional en México se registran 50 mil muertes al año por IAM.

La inflamación en la aterosclerosis es una respuesta vascular frente a una gran variedad de estímulos. Se caracteriza por el movimiento de células desde la luz vascular hacia el interior de la pared arterial en el lugar en el que se ha iniciado el estímulo nocivo, esto bajo la influencia de factores quimiotácticos, producidos localmente. Cuando el estímulo inflamatorio es persistente o se repite continuamente se producirá una inflamación crónica. El infiltrado de células inmunitarias típico de la inflamación crónica está compuesto por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. La liberación crónica de mediadores de la inflamación producirá lesión tisular, cicatrización y la posible pérdida de la función tisular.

El estudio del TNF- α es importante porque este gen codifica para proteínas relevantes en la patogénesis del Infarto Agudo del Miocardio, pretendiendo definir a este gen como un marcador de susceptibilidad o resistencia a este cada vez más común padecimiento; actualmente en la medicina genómica no sólo se trata de combatir este tipo de padecimientos sino principalmente de prevenirlos realizando estudios que ayuden a evitar en la medida de lo posible este padecimiento.

XI. HIPOTESIS

Si el TNF- α participa en el proceso inflamatorio que conlleva al desarrollo de la placa ateromatosa y por tanto al IAM y sus genes presentan sitios polimórficos que regulan su producción, algunos de sus alelos podrían diferenciar a los pacientes de los individuos control y ser por tanto marcadores de susceptibilidad y/o protección para este padecimiento.

CAPÍTULO XII

METOLOGÍA

XII. METODOLOGIA

➤ Diseño

Se trata de un estudio transversal de casos y controles.

➤ Universo de estudio

Pacientes

Se estudiaron 150 pacientes mexicanos, no relacionados entre sí, cuyo seguimiento clínico se realiza en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" que cumplieran con los criterios clínicos y ecocardiográficos para IAM y que habían ingresado al Departamento de Urgencias y Unidad Coronaria de este instituto.

Controles

1. Se incluyeron 150 individuos sanos no relacionados que fueron pareados con los pacientes considerando edad y sexo.
2. Para ser considerado sano, el grupo control debió estar libre de síntomas y sin antecedentes familiares y/o clínicos de enfermedad cardiovascular, principalmente IAM y presentar un electrocardiograma normal.

➤ Criterios de Inclusión

1. El individuo estudiado debió ser mexicano y que dos generaciones previas a él fueran nacidas en México.
2. Consentimiento informado firmado.
3. Contestar un cuestionario.
4. Edad mayor de 18 años menores de 70 años
5. Que al momento del ingreso tuvieran:
 - A. Síntomas de infarto agudo del miocardio de localización inferior (IAM-INF) caracterizado por dolor de tipo anginoso (localizado en el precordio, el cual se puede irradiar hacia la base del cuello, la mandíbula o hacia las extremidades superiores) de más de 30

minutos de duración, el cual haya sucedido en las últimas seis horas, que puede estar acompañado de síntomas neurovegetativos como diaforesis, sensación de náuseas y/o vómito, sensación y/o acción de micción o defecación.

➤ **Criterios de exclusión**

1. Que en el cuestionario se observaran las siguientes características:
 - a) La no ingesta excesiva de grasas
 - b) Medicamentos
 - c) Fumadores, etc.
2. Que se encontraran en periodo de embarazo o lactancia.
3. Síntomas sugestivos de disección aórtica.
4. Pacientes con enfermedades como cerebro vasculares, isquemia cerebral transitoria o cualquier indicio de daño estructural del sistema nervioso central v.g. neoplasia intracraneal o intraespinal, aneurisma o malformación arteriovenosa.
5. Pacientes con traumatismo que lo hayan llevado a sufrir infarto.
6. Cualquier historia de accidentes Retinopatía diabética hemorrágica u otra condición hemorrágica oftálmica.
7. Obesidad.

➤ **Requerimiento adicional para ambos grupos (pacientes y controles)**

- A todos los individuos se les invito a participar en el presente estudio y se obtuvo consentimiento informado voluntario.
- El estudio fue de riesgo mínimo ya que solo incluyo la venopunción antecubital para la obtención de 15 ml de sangre periférica.
- El presente proyecto cumplió los requisitos del comité institucional de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología.

➤ **Análisis estadístico**

Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos que se analizaron se obtuvieron por conteo directo y posteriormente se compararon con las de los controles sanos no relacionados. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada (χ^2). Las diferencias entre grupos se determinaron usando la prueba de χ^2 de Mantel-Haenzel, la cual combina tablas de contingencia de 2x2 usando el programa estadístico EPIINFO (V. 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, GA, USA). Cuando el número comparado en alguna celda fue menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El valor de p fue corregido (p_C) multiplicando su valor por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con nivel de significancia establecido como $p_C < 0.05$. La fuerza de asociación se estimó como razón de momios (RM) con el intervalo de confianza del 95% (IC) utilizando el método de Woolf (36).

CAPÍTULO XIII

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

XIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

➤ Extracción de DNA

Se tomaron 15 ml de sangre periférica de cada individuo en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante. A partir de esta muestra se extrajo el DNA genómico por medio de la técnica de expulsión salina (37).

A partir de DNA genómico, se estudiaron los siguientes sitios polimórficos:

- TNF- α : polimorfismos -238G/A y -308G/A ubicados en la región promotora del gen.
- Electroforesis para verificar que el peso del amplificado sea el correcto.

GEL DE AGAROSA AL 1.5%

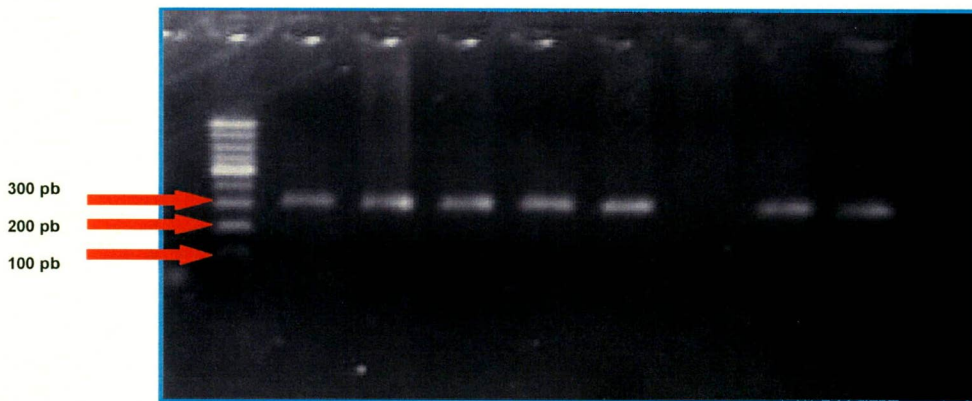


FIGURA 12. Visualización en transiluminador de luz ultravioleta del gel de agarosa al 1.5%.Peso esperado de 300 pb.

➤ Determinación de los polimorfismos

Se utilizó la secuenciación directa, que es el estándar de oro ya que permite conocer la región de estudio base por base. En nuestro laboratorio contamos con un secuenciador de 4 capilares de alta capacidad para realizar las determinaciones en los tiempos propuestos. Cada muestra de DNA genómico fue amplificada por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando parejas de iniciadores que cubren la región donde se localiza el polimorfismo (Anexo 3). Una vez obtenidos los productos deseados amplificados por PCR, éstos fueron purificados utilizando un kit especializado para tal efecto (Wizard, Promega, Madison, WI). Los productos purificados fueron utilizados para realizar una PCR de secuenciación con el kit Dye terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Los productos de ésta PCR también fueron purificados y para este fin se usaron columnas Spin Dye Ex (QIAGEN, Hilden, Alemania). Finalmente se realizó la secuenciación automatizada de los productos de la PCR en un secuenciador de 4 capilares Perkin Elmer tipo ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

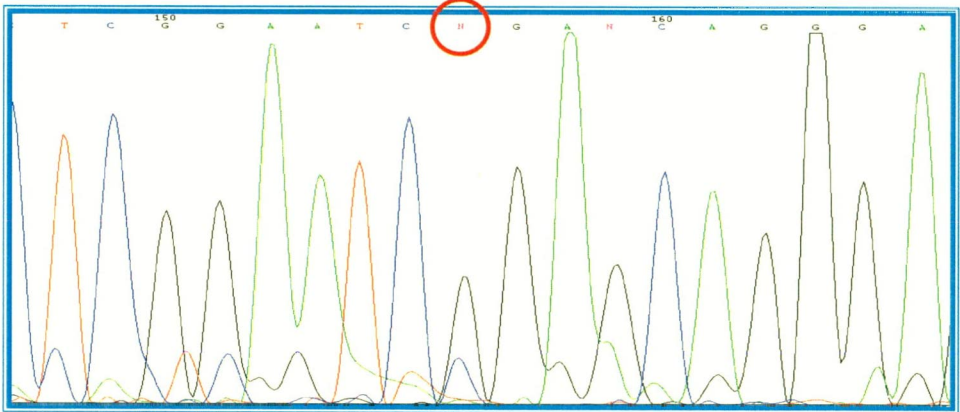
CAPÍTULO XIV

RESULTADOS

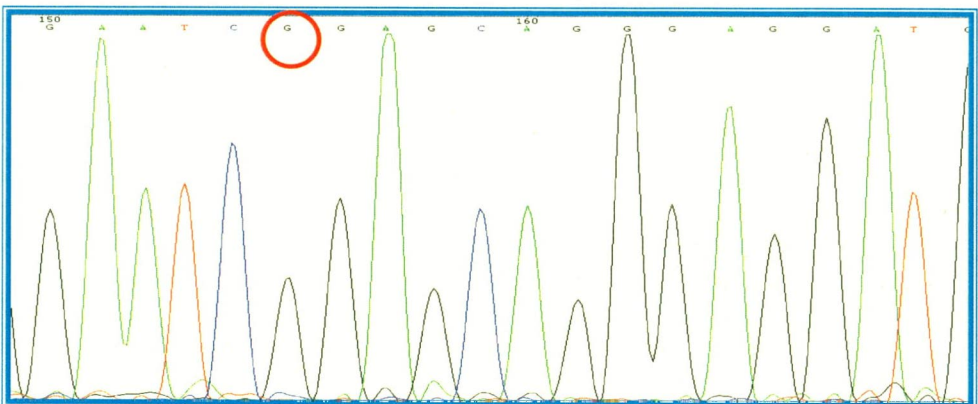
XIV. RESULTADOS

En las figuras A, B, C y D se muestran los electroferogramas de individuos: heterocigoto -238 G/A (fig. A), homocigoto -238 G/G (fig. B), heterocigoto -308 T1/T2 (fig. C) y homocigoto -308 T1/T1 (fig. D) obtenidos por secuenciación directa.

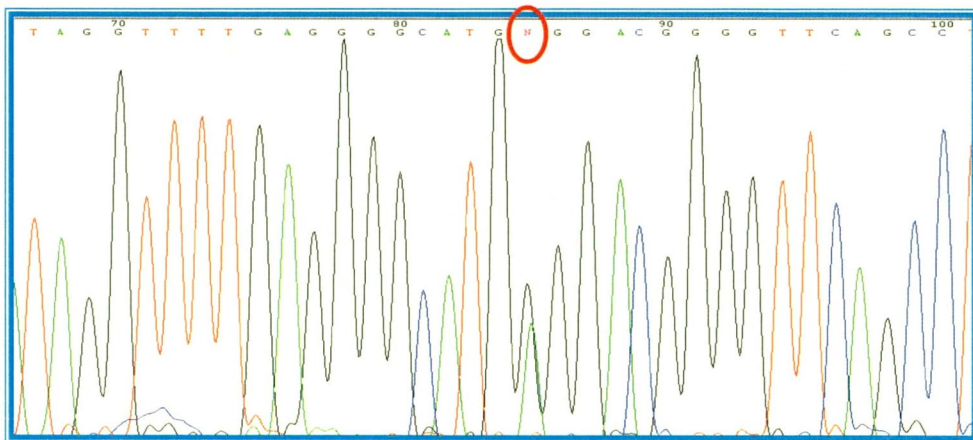
A) ELECTROFEROGRAMA
DE
TNF -238 HETEROCIGOTO G/A



B) ELECTROFEROGRAMA
DE
TNF -238 HOMOCIGOTO G/G



C) ELECTROFEROGRAMA
DE
TNF -308 HETEROCIGOTO T1/T2



D) ELECTROFEROGRAMA
DE
TNF -308 HOMOCIGOTO T1/T1

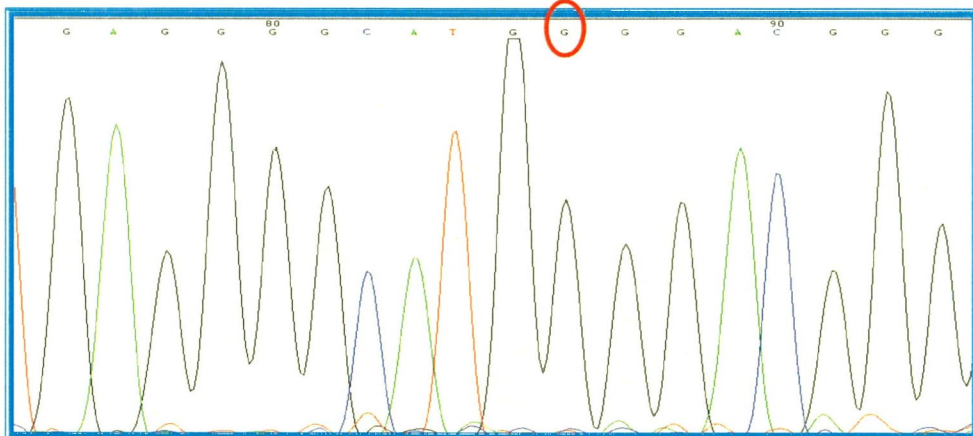


TABLA 4. Frecuencias alélicas (fa) y genotipos (fg) de TNF- α -238 en pacientes con infarto agudo del miocardio (IAM) y controles sanos.

TNF- α -238	IAM (n= 145)		CONTROLES (n=169)		pC	RM	(IC95%)
Alelos	n	fa	n	fa			
A	57	0.196 ^A	23	0.068	0.0000015	3.35	(1.95-5.78)
G	233	0.803	315	0.932 ^B	0.000003	0.30	(0.17-0.51)
Genotipos	n	fg	n	fg			
GG	94	0.648 ^C	147	0.870	0.000001	0.28	(0.15-0.50)
AG	45	0.310 ^D	21	0.124	0.00015	3.17	(1.72-5.89)
AA	6	0.041	1	0.006	NS	NS	NS

- A. Aumento en los pacientes al compararse con el grupo control
 B. Disminución en los pacientes al compararse con el grupo control
 C. Disminución en los pacientes al compararse con el grupo control
 D. Aumento en los pacientes al compararse con el grupo control
 NS. No significativo.

En la tabla 4 se muestra la distribución de los alelos del TNF en la posición -238 tanto en los pacientes como en los controles, observándose un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia del alelo A en los pacientes al compararse con los controles ($pC= 0.0000015$, $RM= 3.35$, $IC95\%= 1.95-5.78$). Por su parte, el alelo G mostró una disminución significativa en el grupo de pacientes al comparar con los controles ($pC= 0.000003$, $RM= 0.30$, $IC95\%= 0.08-0.68$). El análisis de los genotipos mostró incremento en la frecuencia del genotipo AG en los pacientes al comparar con los controles ($pC= 0.003$, $RM= 3.19$, $IC95\%= 1.44-7.27$), así como disminución del genotipo GG ($pC= 0.003$, $RM= 0.32$, $IC95\%= 0.09-0.61$).

TABLA 5. Frecuencias alélicas (fa) y frecuencias génicas (fg) de TNF- α -308 en pacientes con infarto agudo al miocardio (IAM) y controles sanos.

TNF- α -308	IAM (n= 145)		CONTROLES (n=162)		pC	RM	(IC95%)
Alelos	n	fa	n	fa			
T1	250	0.862 ^E	310	0.957	0.00006	0.28	(0.14-0.55)
T2	40	0.137 ^F	14	0.043	0.00006	3.54	(1.82-7.00)
Genotipos	n	fa	n	fa			
T1T1	119	0.820	148	0.914	NS	NS	NS
T1T2	12	0.082	14	0.086	NS	NS	NS
T2T2	14	0.096	0	0.000	NS	NS	NS

^E. Disminuido en los pacientes al compararse con el grupo control.

^F. Aumento en los pacientes al compararse con el grupo control.

^{NS}. No significativo.

En la tabla 5 se muestra la distribución de los alelos del TNF en la posición -308 tanto en los pacientes como en los controles. En este caso, se observa incremento en la frecuencia del alelo T2 en los pacientes al comparar con el grupo control ($pC=0.00006$, $RM=3.54$, $IC95\%=1.82-7.0$). Por su parte, la frecuencia del alelo T1 se encontró disminuida en los pacientes ($pC=0.00006$, $RM=0.28$, $IC95\%=0.14-0.55$). La distribución de los genotipos en esta posición fue similar en pacientes y controles sin ningún dato estadísticamente significativo.

CAPÍTULO XV

DISCUSIÓN

XV. DISCUSIÓN

Diversos estudios sugieren que el proceso inflamatorio juega un papel preponderante en el desarrollo de la aterosclerosis y por tanto en el IAM. Dado esto, el estudio de moléculas que participan en este proceso inflamatorio es de suma importancia para establecer la fisiopatogenia de estos padecimientos. Una de las moléculas más reconocidas a este respecto es el TNF- α , el cual es una de las principales citocinas proinflamatorias. Algunos estudios han reportado niveles incrementados de TNF- α en el suero de pacientes con enfermedades cardiovasculares.

El gen del TNF- α se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y presenta varios sitios polimórficos ubicados en la región promotora del gen. Dos de ellos son los más estudiados a la fecha (posiciones -238 y -308) debido a su papel en la regulación de la transcripción y a su frecuencia en las poblaciones analizadas. Estos polimorfismos han sido asociados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares incluyendo el IAM. En nuestro trabajo estudiamos la distribución de los polimorfismos -238 y -308 del TNF- α en un grupo de pacientes mexicanos con IAM y en un grupo de controles sanos.

Los hallazgos del presente estudio confirman lo reportado por Herrmann y cols (32) quienes encontraron asociación entre el polimorfismo -308 y el desarrollo de IAM en la población brasileña, pero difieren de lo reportado por Bernand y cols (35) quienes no encontraron relación entre este polimorfismo y el desarrollo de IAM en la población francesa. En los pacientes mexicanos el alelo T2 parece conferir riesgo para el desarrollo de IAM.

El polimorfismo en la posición -238 fue analizado por Herrmann y cols (32) en el grupo de pacientes franceses con IAM sin encontrar asociación significativa. Sin embargo, en nuestros pacientes encontramos asociación significativa con el alelo A y con el genotipo AG.

Los polimorfismos TNF- 238 y -308 son de los más estudiados debido a sus implicaciones a nivel biológico. El gen del TNF- α esta regulado por varios factores de transcripción como el NF- κ B y el AP-1. Estos factores son activados a través de vías de señalización intracelular modulando así, en la célula huésped, la expresión del gen. Algunos estudios han establecido que los

individuos que portan el genotipo homocigoto -308 T2, presentan incremento en la transcripción del gen y a nivel sérico niveles elevados de la citocina. Esto al compararlos con individuos que portan los otros genotipos (30). De forma importante, los estudios en modelos animales demuestran que la mayor expresión de TNF- α se relaciona con inflamación miocárdica, hipertrofia cardíaca, dilatación progresiva e incremento de apoptosis, lo cual conlleva a la falla cardíaca o muerte. Otros estudios realizados en ratones knockout, en los cuales el gen del TNF- α ha sido deletado muestran disminución del infiltrado de macrófagos en el miocardio infartado. Por el contrario, otro grupo de ratones con altos niveles de TNF- α presentaron importante daño cardíaco (38). Aunque la función biológica precisa para el estrés inducido por la expresión de TNF- α en el corazón todavía es desconocida, la observación de que TNF- α induce una respuesta hipertrófica y apoptosis en los miocitos cardíacos sugiere que este tiene un papel importante en la homeostasis miocárdica (39).

Las diferencias observadas entre nuestro estudio y los previamente publicados pueden deberse a las diferencias étnicas de los grupos estudiados. El grupo Mestizo Mexicano es un grupo bien caracterizado desde el punto de vista genético. Diversos estudios analizando marcadores de varios cromosomas establecen que este grupo étnico presenta una mezcla de aprox. 56% de genes indígenas, 40% de genes caucásicos y un 4% de genes negroides. Esto hace al mestizo mexicano un grupo único en el cual no pueden aplicarse estudios de marcadores genéticos previamente analizados en otras poblaciones. Estudios como el que reportamos son obligatorios si queremos definir marcadores genéticos asociados al desarrollo de enfermedades en nuestra población.

A pesar de que nosotros encontramos asociación importante entre los polimorfismos del TNF y el desarrollo de IAM, nuestros datos pueden ser corroborados en otras poblaciones principalmente latinas con el fin de que podamos considerarlos como marcadores de desarrollo de IAM. Por otro lado, hay que considerar que el IAM es un padecimiento multifactorial. Por esta razón creemos pertinente el estudiar otros genes que codifican para moléculas

inflamatorias que de una u otra forma podrían estar involucrados en los procesos que llevan al desarrollo del IAM.

Sería adecuado estudiar todo el perfil de genes de citocinas pro y antiinflamatorias con el fin de tener un panorama completo del proceso inflamatorio. Otros posibles genes de estudio son aquellos que participan en el proceso oxidativo y en el trombótico que junto con el inflamatorio llevan al desarrollo del IAM.

En resumen, el presente trabajo establece que los polimorfismos del promotor del TNF- α -238 y -308 participan en la susceptibilidad al desarrollo del IAM en la población mexicana.

CAPÍTULO XVI

CONCLUSIONES

XVI. CONCLUSIONES

1. En la posición -238 del gen del TNF- α , el alelo A y el genotipo AG están asociados con la susceptibilidad genética para el desarrollo del IAM en la población mexicana.
2. El alelo G y el genotipo GG están asociados con la protección genética en contra de este padecimiento en nuestra población.
3. En la posición -308 del gen TNF- α , el alelo T2 esta asociado con la susceptibilidad genética para desarrollar IAM en la población.
4. El alelo T1 esta asociado como alelo de protección genética para IAM en México.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1. Técnica de extracción de ADN genómico

1. Se extraen de 5 a 10 ml de sangre periférica recolectada en un tubo de tapa lila con EDTA como anticoagulante.
2. Se centrifuga la muestra de sangre a 3000 rpm durante 5 minutos y se elimina el plasma.
3. Transferir el paquete rojo a un tubo falcon y adicionar 5 ml de TKM1 más 125 μ l de tritón, mezclar perfectamente hasta que el tritón se homogenice.
4. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min, eliminar el sobrenadante y mantener el botón.
5. Si el botón esta muy rojo, realizar otro lavado con TKM1 sin agregar tritón y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. Repetir este paso hasta que el botón se vea blanco.
6. Adicionar 800 μ l de TKM2 y 50 μ l de SDS al 20%.
7. Mezclar hasta que ya no se vea el botón y entonces incubar a 55° C por 15 min.
8. Adicionar 300 μ l de NaCl = 6 M, mezclar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
9. Transferir el sobrenadante a dos tubos appendorf de 1.5 ml y adicionar 1000 μ l de etanol absoluto a temperatura ambiente, mezclar por inversión hasta que precipiten las hebras de DNA.
10. Centrifugar a 14 000 rpm durante 10 min y tirar el sobrenadante.
11. Lavar el botón de DNA con 1000 μ l de etanol al 70% frío, centrifugar a 14 000 rpm durante 5 min, tirar el sobrenadante.
12. Secar el botón de DNA durante 20 min, ya seco este se resuspende en 250 μ l de T.E., se mezcla e incuba durante 15 min a 55°C. (39)

Cuantificación y ajuste de DNA

- En un espectrofotómetro se lee el DNA a 260 nm y a 280 nm, y el cociente de estas absorbancias nos da el rango de pureza ideal para nuestra muestra que es 1.7.
- Para saber la concentración de DNA se aplica la siguiente fórmula.

$$[\text{DNA ng}/\mu\text{l}] = \text{absorbancia 260 nm} \times 50 \text{ ng} \times 100 \mu\text{l}$$

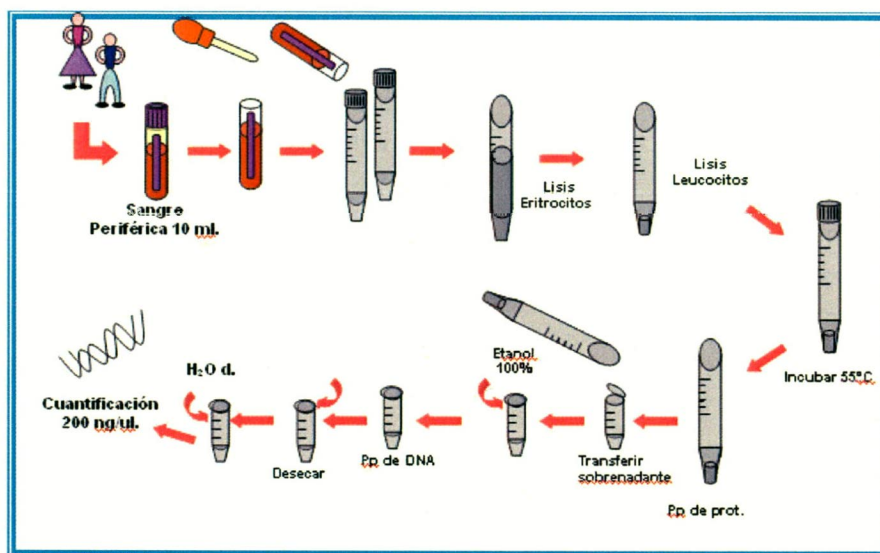
Donde: 50 ng es el equivalente a una unidad de densidad óptica.

100 es el factor de dilución.

- Todos nuestros DNA's los ajustamos a 200 ng/ μl

ng/ μl totales

200 μl



Anexo 2. Fórmulas para preparación de soluciones

1. Solución TKM1 para extracción de DNA.

		g/Lt
10 mM Tris-HCl	PM = 157	1.58
10 mM KCl	PM = 74.557	0.745
10 mM MgCl	PM = 203.30	2.03
2 mM EDTA	PM = 372.2	0.74

* Ajustar a un pH de 7.6

2. Solución TKM2 para extracción de DNA.

		g/Lt
10 mM Tris – HCl	PM = 157.64	1.57
10 mM KCl	PM = 74.55	0.74
10 mM MgCl	PM = 203.3	2.03
0.4 mM NaCl	PM = 58.44	23.38
2 mM EDTA	PM = 372.2	0.74

3. SDS 20%

20g en 100 ml de agua

4. NaCl 5M

Pesar 29.2 g y disolverlos en 80 ml de agua destilada, aforar a 100 ml con agua destilada.

5. Buffer para la electroforesis TBE 10 X

Tris-base 1 M	121.1 g
Ácido bórico 0.94 M	58.12 g
EDTA 0.01 M	3.72 g

* Disolver em 600 ml de água destilada, ajustar pH = 8.0 y aforar a 1000 ml com água destilada.

Anexo 3. Amplificación de los genes **TNF- α** posiciones -238 y -308.

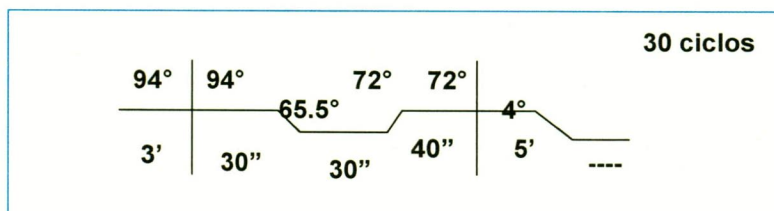
1. Preparación de la PCR (25 μ l)

	1 muestra
dNTP's	4.0 μ l
Buffer	2.5 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
Primer 1	2.5 μ l
Primer 2	2.5 μ l
H ₂ O	8.0 μ l
Taq	.125 μ l

2. Iniciadores utilizados para la PCR y su subsecuente secuenciación

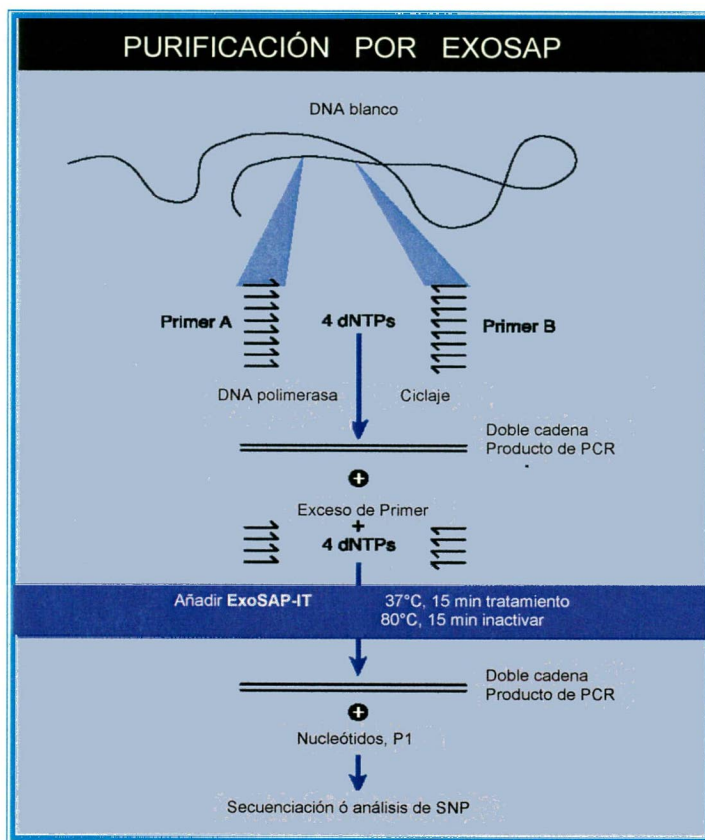
TNF-α		
-238, -308	5'-GCCCCTCCCAGTTCTAGTTC-3'	
	5'-TCATCTGGAGGAAGCGGTAG-3'	

3. Condiciones del termociclador



Anexo 4. Purificación de los productos amplificados

- 1.- A 2 μ l del producto amplificado por PCR se le agregan 1 μ l de ExoSAP (Roche Molecular Systems and F. Hoffman-La Roche Ltd, Cleveland Ohio).
- 2.- Se incuba a 37°C por 15 min para eliminar el exceso de primers.
- 3.- Se incuba a 80°C para inactivar la acción del ExoSAP.
- 4.- El producto de PCR ahora estará listo para secuenciarlo.



* Utiliza dos enzimas hidrolíticas

Anexo 5. Condiciones para PCR de secuenciación

1. Preparación de la PCR

	1 muestra
Big Dye	2 μ l
Buffer 5 X	3 μ l
Primer 3.2 mM	1 μ l
H ₂ O	7 μ l

* Se agregan los 13 μ l de esta mezcla más los 7 μ l de los amplificadores purificados con exosap.

* Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Applied Biosystems. Foster City, CA.

Anexo 6. Purificación de los productos de PCR de secuenciación

- La purificación de estos productos se hizo por medio de las columnas de Qiagen.
1. Se homogeniza el tubo de Qiagen que contiene la sustancia purificadora (sephadex).
 2. Se afloja la tapa del tubo para poder romper el otro extremo, se coloca el tubo en un recipiente recolector y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos, en el extremo roto sale el exceso de agua y es así como queda formada la columna de resina.
 3. Se le cambia el recolector de agua por un tubo eppendorf limpio y estéril.
 4. Se coloca ya en la columna el producto de la PCR de secuenciación y se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos.
 5. El producto ya purificado cae al tubo eppendorf recolector y este se seca durante 40 minutos sin exponerlo a la luz.
 6. Ya estando seco, entonces esta listo para secuenciarse.

Anexo 7. Secuenciación

1. Ya que esta el producto seco, este se resuspende en 15 μ l de formamida.
2. Posteriormente se calienta a 95° C durante 5 minutos y sin exponer a la luz.
3. Pasado este tiempo se coloca en hielo por un par de minutos y se pone entonces en la placa de 96 pozos ya para llevarlo al secuenciador.



Secuenciador Applied Biosystems

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 420: 868-874, 2002.
- 2.- Ross R, Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New England Journal of Medicine*. Jan 14; 340 (2): 115-126, 1999.
- 3.- Corti R, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenetic concepts of acute coronary syndrome. *Journal American College Cardiology*. 41: 7S-14S, 2003.
- 4.- García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*. 52: 990-1003, 1999.
- 5.- Luna Arias Juan Pedro, Orozco Orozco Esther. La frontera genética molecular de la enfermedad. Tomo II. Instituto Politécnico Nacional.
- 6.- Guyton Hall. Tratado de Fisiología Médica. Ed. McGraw Hill Interamericana. 9na. Edición. México D.F. 1997.
- 7.- William F. Ganong. Fisiología Médica. Ed. Manual Moderno. Edición. 2006. México D.F. p. 167-173.
- 8.- Secretaría de Salud. Estadísticas de mortalidad. México, D.F.: SSA, Dirección General de Epidemiología. Documento no publicado. 2005.
- 9.- Costos de atención médica INEGI/SSA. *Salud pública México*; vol 47 (6): 451-457, 2005.
- 10.- Antón E. Becker, Onno J. de Boer. The role of inflammation and infection in coronary artery disease. *Annual Reviews Medicine*. 52:289-97, 2001.

- 11.- Jianglin Fan, Teruo Watanabe. Inflammatory Reactions in the Patogénesis of Atherosclerosis. Journal of Atherosclerosis and Trombosis. 10: 63-71, 2003.
- 12.- Pérez Méndez O, Luc G, Posadas Romero C. Concentraciones bajas de lipoproteínas de alta densidad (HDL) em plasma y enfermedad arterial coronária. Arch Inst Cardiol Méx 2000; 70: 312-321.
- 13.- Parthasarathy S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg. Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a form recognized by the scavenger receptor. Atherosclerosis. 1986; 6: 505-510.
- 14.- Gavin J. Blake, Paul M. Ridker. Novel Clinical Markers of Vascular Wall Inflammation. Circulation Research. 89: 763-771, 2001.
- 15.- Peter Lobby. Inflamattion in atherosclerosis. Nature. 420: 868-874, 2002.
- 16.- Gandur S, Carlos B. Riesgos de Infarto (Enfermedades coronarias). Medicina 62: 535-543, 2002.
- 17.- Firman G. Joint European Society of Cardiology/ American College of Cardiology Committee. Miocardial infarction redefined. European Heart Journal. 21: 1502-1513, 2000.
- 18.- Owen Avril. Cardiac troponins: improved diagnosis and cost benefits. 2001. Clinical Laboratory International. Volume 25. No. 8. p. 14-15.
- 19.- Apple F, Presse L. Creatine Kinase-MB: Detection of Myocardial Infarction and Monitoring Reperfusion. Journal of Clinical Immunoassay 1994; 17 (1): 24-29.
- 20.- Adam JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical Markers of Myocardial Injury. Circulation 1993; 88 (2): 750-763.

- 21.- Xavier García Moll. Cardiopatía Isquémica: Marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. Rev Cubana Med 2000; 39 (2): 120-40.
- 22.- Min Nian, Paul Lee, Neelam Khaper, Meter Liu, Inflammatory cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. Circulation Research. 94:1543-1553, 2004.
- 23.- Soto S Lilian. Utilidad de determinar el polimorfismo de la región promotora -308 del gen del factor de necrosis tumoral alfa, en pacientes con artritis reumatoídea. Reumatología. 20 (3): 125-128, 2004.
- 24.- Min W. Irwin. Tissue Expression and Immunolocalization of Tumor Necrosis Factor- α in Postinfarction Dysfunctional Myocardium. Circulation. 99: 1492-1498, 1999.
- 25.- Mei Sun. Excessive Tumor Necrosis Factor Activation After Infarction Contributes to Susceptibility of Myocardial Rupture and Left Ventricular Dysfunction. Circulation. 110: 3221-3228, 2004.
- 26.- Wilson AG. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci 1997; 94: 3195-3199.
- 27.- Paula A. Correa, Juan Manuel Anaya, Bases moleculares para el estudio del TNF en artritis reumatoídea, Revista de reumatología. Medellín Colombia. 2005.
- 28.- Abul K. Abbas. Inmunología Celular y Molecular. McGraw-Hill Interamericana. 4ta edición, 2000; 251-253.

- 29.- Trejaut JA, Tsai ZU, Lee HL. Cytokine gene polymorphisms in Taiwan. *Tissue Antigens* 64 (4): 492-9, 2004.
- 30.- Bennet AM, van Maarle MC, Association of TNF-alpha serum levels and TNFA promoter polymorphisms with risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2005.
- 31.- Alle RA, Lee EM, Roberts DH, Park BK. Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF-receptor genes in patients with coronary artery disease. *European Journal Clinic Investigation*. Oct;31(10):843-51, 2001.
- 32.- Herrmann sm, Ricard S, Nicaud V. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *European Journal Clinic Investigation*. Jan;28(1):59-66, 1998.
- 33.- Padovani JN, Pazin Filho A, Simoes MV. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thrombosis Research*. Nov 15;100(4):263-9, 2000.
- 34.- Appoloni O, Dupont E, Vandercruys M. Association between the TNF-2 allele and a better survival in cardiogenic shock. *Chest*. Jun;125(6):2232-7, 2004.
- 35.- Bernard V, Pillois X, Dubus I. The -308 G/A tumor necrosis factor-alpha gene dimorphism: a risk factor for unstable angina. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Apr;41(4):511-6, 2003.
- 36.- Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19:251-253.
- 37.- Mei Sun. Excessive Tumor Necrosis Factor Activation After Infarction Contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2004;110:3221-3228.

38.- Min W. Irwin. Tissue Expresión and Immunolocalization of Tumor Necrosis Factor- α in Postinfarction Dysfunctional Myocardium. Circulation. 1999;99:1492-1498.

39.- Debomoy K. Lahiri and John I. Nurnberger. A rapid non-enzimatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 19. 1991.

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 9 de julio del 2007, en la Ciudad de México D.F. para optar al grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la Química Clínica Nonanzit Iracema Pérez Hernández.

Dra. Sara Frías Vázquez



Dr. Gilberto Vargas Alarcón



Dr. José Humberto Nicolini Sánchez





Tel. 5658 - 7100