



Universidad Nacional Autónoma de México



División de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Título: "Participación de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4 en pacientes con síndrome coronario agudo"

Tesis de Posgrado para obtener el Título de Especialista en Cardiología

Presenta.

Dr. Jesús Erick Cruz Martínez

Director de Enseñanza

Dr. José Fernando Guadalajara Boo.

Tutores

Dr. Gilberto Vargas Alarcón

Dr. José Manuel Frago Lona

México, Distrito Federal, julio 2011.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**Dr. José Fernando Guadalajara Boo.
Director de Enseñanza.
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

**Dr. Gilberto Vargas Alarcón
Subdirector de Investigación Básica y Tecnológica
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

**Dr. José Manuel Fragoso Lona
Departamento de Biología Molecular
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”**

DEDICATORIA

Dedicado a Reyna, Florencio, Jovita, Citlali y Marbella, a todos ellos por su amor, comprensión y apoyo incondicional. Todos, herederos de una cultura de esfuerzos, sabedores de que la educación es nuestra principal arma para la transformación de nuestro país.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por mi preparación como Cardiólogo siempre con un enfoque humanista. A todo el apoyo proporcionado por mis tutores el Dr. Gilberto Vargas Alarcón y Dr. José Manuel Fragoso Lona y al laboratorio de Biología Molecular, quienes de forma importante contribuyeron para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

Contenido	Páginas
Introducción	6
Marco Teórico	8
Justificación	21
Pregunta de Investigación	22
Hipótesis	22
Objetivos	22
Material y Métodos	23
Análisis Estadístico	26
Resultados	27
Discusión	33
Conclusiones	36
Bibliografía	37
Anexo	41

PARTICIPACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) DEL GEN TLR4 EN PACIENTES CON SÍNDROME CORONARIO AGUDO.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares, dentro de las cuales se incluyen el síndrome coronario agudo (infarto agudo del miocardio y angina inestable), son la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en el año 2004 murieron por esta causa 17,1 millones de personas, lo cual representa un 29% de todas las muertes registradas en el mundo; 7,2 millones de esas muertes se debieron a cardiopatía coronaria¹.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en México en el año 2004 las enfermedades de origen cardiovascular fueron la principal causa de mortalidad, desglosado por género, en las mujeres correspondía al 28.5% (cardiopatía isquémica 14.4%) y en los hombres el 23.4% (cardiopatía isquémica el 13.4%). Se calcula que en el año 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por cardiopatía isquémica, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte¹.

La Secretaria de Salud reporto en el año 2008, que la principal causa de mortalidad en México, tanto en hombres como mujeres fue la cardiopatía isquémica².

El síndrome coronario agudo es una enfermedad de las arterias coronarias que irrigan al corazón, la oclusión abrupta de las arterias coronarias resulta en un daño al músculo cardíaco³. La ruptura de la placa ateromatosa con trombosis es el factor crítico bien establecido en la patogénesis del infarto del miocardio⁴. Aunque los detalles de los mecanismos de la ruptura de la placa son desconocidos, se piensa que la inflamación juega un papel importante en esta patogénesis. Los mediadores inflamatorios intervienen en la formación del ateroma, progresión y en la ruptura de la placa, dando como consecuencia la trombosis intraluminal^{5 6 7 8}.

Los desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis incluyen los factores de riesgo clásicos, como son; la hipercolesterolemia, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, obesidad, hiperhomocisteinemia, tabaquismo y las infecciones. Estos estímulos aterogénicos provocan un daño en la pared vascular, de acuerdo con la teoría de respuesta al daño propuesta por Ross, la aterosclerosis es el resultado de una respuesta exagerada de tipo inflamatorio-fibroproliferativa⁶.

Los factores de riesgo antes mencionados tienen un componente genético. Debido a que los rasgos genéticos contribuyen significativamente al riesgo global de la cardiopatía isquémica, un número importante de estudios se han enfocado en la hipótesis de que la variación en la genética del sistema inflamatorio podría incrementar el riesgo a desarrollar la enfermedad⁷⁻⁹. Varios estudios han demostrado la existencia de sitios polimórficos en las regiones promotoras de los genes que codifican para las citocinas pro y anti-inflamatorias que de una u otra forma podrían estar regulando su producción¹⁰⁻¹⁴. Algunos de estos sitios polimórficos han sido asociados con el desarrollo del síndrome coronario agudo¹⁵⁻³².

Uno de los genes candidatos involucrado es el gen TLR 4 (por sus siglas en inglés *Toll-like receptor tipo 4*) y sus polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791). En diversos estudios se ha demostrado que estos polimorfismos, juegan un papel importante en el estrés oxidativo, inflamación y enfermedad aterosclerosa. La señalización pro-inflamatoria dependiente de TLR4 ha sido implicada en las etapas de desarrollo de la aterosclerosis, como son; el inicio, progresión e inestabilidad de la placa aterosclerosa. Se ha demostrado su participación en la isquemia miocárdica, lesión por reperfusión, agregación plaquetaria, insuficiencia cardíaca, etc. Su participación en el infarto del miocardio se ha estudiado en población africana, asiática y caucásica, hasta el momento con resultados controversiales³³⁻⁶⁸. La revelación de bases genéticas en el síndrome coronario agudo y la investigación de variantes genéticas comunes en estos padecimientos pueden ser de gran utilidad en el futuro, ya que permitirá la identificación de individuos susceptibles y a su vez el uso de mejores tratamientos y más dirigidos³³⁻³⁴.

MARCO TEÓRICO

En los últimos años cambió el paradigma que explicó por mucho tiempo la aterosclerosis como resultado de una compleja interacción de factores no accesibles a intervención médica y de factores de riesgo modificables. En ese paradigma las alteraciones del metabolismo de los lípidos fueron el pivote del concepto de la aterosclerosis como enfermedad crónico degenerativa⁵. 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 inflamatoria⁶⁻⁸. El fenómeno inflamatorio se inicia cuando las lipoproteínas circulantes quedan atrapadas en la matriz extracelular subendotelial y se oxidan, adquiriendo así propiedades pro-inflamatorias que dan lugar a una cadena de eventos que van desde el depósito de monocitos circulantes que exacerban 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 cardíaco⁹⁻¹³. Sin lugar a dudas el fenómeno inflamatorio desempeña un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria y probablemente constituye el factor de transformación de un síndrome coronario estable a uno inestable¹⁴⁻¹⁶. La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento del ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos^{6,8}.

Los desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis incluyen los factores de riesgo clásicos, como son; la hipercolesterolemia, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, obesidad, hiperhomocisteinemia, tabaquismo y las infecciones. Estos estímulos aterogénicos provocan un daño en la pared vascular y, de acuerdo con la teoría de respuesta al daño propuesta por Ross, la aterosclerosis es el resultado de una respuesta exagerada de tipo inflamatorio-fibroproliferativa^{6,17}.

Los datos acumulados demuestran que la concentración elevada de marcadores circulantes de inflamación predice una respuesta cardiovascular desfavorable en individuos asintomáticos, en pacientes con cardiopatía isquémica estable y en pacientes con síndromes coronarios agudos¹⁸⁻¹⁹. Varios estudios “*in vitro*” y en animales experimentales son apoyados por hallazgos clínicos de incremento de marcadores inflamatorios en pacientes con angina estable crónica, angina inestable, e infarto agudo del miocardio (IAM)²⁰⁻²¹.

Debido a que los rasgos genéticos contribuyen significativamente al riesgo global de la cardiopatía isquémica, un número importante de estudios se han enfocado en la hipótesis de que la variación en la genética del sistema inflamatorio podría incrementar el riesgo a desarrollar la enfermedad. Varios estudios han demostrado la existencia de sitios polimórficos en las regiones promotoras de los genes que codifican para citocinas pro y anti-inflamatorias que de una u otra forma podrían estar regulando su producción²⁰⁻³³.

Algunos de estos sitios polimórficos han sido asociados con el desarrollo del síndrome isquémico coronario agudo. De los estudios reportados a la fecha destacan, los polimorfismos del receptor tipo Toll 4 (TLR4), perteneciente a una familia de moléculas de reconocimiento que es conocido principalmente por su papel como un importante mediador de la inmunidad innata y adaptativa³⁴⁻³⁵.

Es importante señalar, que el sistema inmune innato ha sido considerado por mucho tiempo como la primera línea de defensa contra patógenos extraños. Sin embargo, recientemente, se reconoce que la participación de componentes no patógenos de los tejidos necróticos o dañados puede activar la inmunidad innata. Así, en lugar de responder simplemente a material "extraño", el sistema inmune innato responde a señales de "peligro" que pueden ser de origen microbiano o endógeno. Los receptores tipo Toll (TLRs) son receptores codificados de la línea germinal, que reconocen un conjunto de patrones moleculares asociados a patógenos. Los TLRs inducen una rápida respuesta inmune innata y sirve como un puente a largo plazo de la respuesta inmune adaptativa³⁵.

El TLR4 es una proteína transmembranal, inicialmente descubierta como una proteína Toll con importante papel en el desarrollo embrionario dorso-ventral del insecto *Drosophila*. Se evidencio en *Drosophila* que una mutación y pérdida de la función de la proteína TLR, les condicionaba una alta susceptibilidad a la infección por hongos, demostrando la importancia de Toll en la respuesta antifúngica en el insecto. Después de este descubrimiento, los trabajos de Rock y col. y Medzhitov y col., de forma independiente condujeron al descubrimiento de varios genes homólogos para Toll, en humanos llamados TLRs (Toll-like receptors)^{34,56-59}.

El análisis de la estructura de TLR4, reveló que el receptor se compone de tres dominios: un dominio extracelular rico en leucina (LRR), un dominio transmembranal, y un dominio intracelular o TIR (dominio denominado receptor Toll-interleucina). La parte LRR extracelular del receptor está implicado en la unión del lipopolisacarido (LPS). El descubrimiento de que el LPS es un ligando de TLR4 vino de estudios en ratones. Los ratones a quienes se les proporcionaban dosis altas de LPS normalmente desarrollaban un estado similar al choque séptico causado por Gram-negativos. Hace más de 30 años se descubrió que dos cepas de ratón (C3H/HeJ y C57Bl/10ScCr) eran resistentes a LPS. Este fenotipo, se cree que es causado por una mutación en un gen hipotético *Ips*, pero la ubicación y la función de este por mucho tiempo fue desconocida. Los estudios pioneros de Poltorak y colaboradores en 1998, identificaron al TLR4 como el gen *Ips* y demostraron que el TLR4 es el sensor de LPS tanto en ratones como en seres humanos³⁴.

En general, el reconocimiento de LPS y la iniciación de la señalización de TLR4 es un proceso complejo, que involucra a varias proteínas de señalización. El LPS, es la primera proteína circulante que se une a la proteína fijadora de lipopolisacáridos (LBP), que funciona como una opsonina para CD14. El CD14 actúa como un catalizador para la unión de los LPS a MD-2. Después de que el LPS se transfiere a MD-2, la interacción compleja LPS/MD-2 con TLR4. Estudios recientes de cristalografía han dilucidado las estructuras de este complejo. Formación del complejo LPS/MD-2/TLR4 resulta en la dimerización de el dominio TIR (Toll/interleukin-1 receptor) de TLR4, iniciando transducción de señales³⁴.

La señalización del receptor TLR4 en el interior de la célula, implica varios dominios intracelulares (TIR) que contienen proteínas adaptadoras mediadoras en la expresión de genes pro-inflamatorios. Dos vías que inician la señalización intracelular del TLR4 son las dependientes de MyD88 y las vías TRIF (receptor Toll/IL-1-dominio que contiene una proteína adaptadora que induce al IFN- β). Una vía es mediada por el factor de diferenciación mieloide 88 (MyD88) y la proteína adaptadora que contiene al dominio TIR, también llamada MyD88 proteína adaptadora similar (TIRAP). La iniciación de la activación a través de la vía dependiente de MyD88 conduce a la activación del factor nuclear kB (NF-kB) y la transcripción de genes pro-inflamatorios. Una segunda vía está mediada por la vía que contiene la proteína TIR, también llamada molécula adaptadora relacionada a TRIF (TIRP / TRAM), induciendo al interferón- β (TRIF). La iniciación de la vía dependiente de TRIF conduce a la activación del factor regulador de interferón 3 (IRF3), y la expresión de genes inducibles de interferón β (IFN- β). Otras vías que conducen a la activación de los TLR 4 involucran a la *Jun cinasa terminal-N* (JNK) y a las *proteínas cinasas activadoras de mitógenos* (MAPKs), aunque aún es incierto su completo entendimiento^{34,64}.

Muchas investigaciones se han realizado para comprender las vías de señalización y respuesta inmune innata contra las infecciones por gramnegativos mediadas por TLR4, uno de los más entendidos es el relacionado a los TLRs. Debido a esto, el TLR4 también proporciona un modelo ideal para estudiar las consecuencias de la variación genética y su relación con la función del receptor, así como su participación en la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares³⁵.

A la fecha hay descritos 10 TLRs en humanos y 13 TLRs murinos. Cada uno reconoce diferentes ligandos que producen respuestas distintas en función del contexto, tales como la naturaleza de la señal de "peligro" y el tipo específico de célula activada. Además de las células inmunes clásicas como los macrófagos y los monocitos, otras células no derivadas de la médula ósea, participan activamente en la cascada inflamatoria a través de la señalización vía TLRs. Los TLRs, se expresan en casi todas las células del corazón, el TLR 4 se encuentran en los cardiomiocitos, en el músculo liso y en las células endoteliales de los vasos. Por lo tanto, no es de extrañar que el TLR 4 este involucrado en el desarrollo de la aterosclerosis, trombosis, el remodelado miocárdico, isquemia / lesión por reperfusión e incluso la enfermedad valvular³⁵⁻⁴².

La aterosclerosis, es una enfermedad inflamatoria crónica de los vasos arteriales, en gran parte debido a la interacción entre las lipoproteínas modificadas y las citocinas, el cual resulta en la iniciación de la placa y progresión de la misma. Hay pruebas de que los TLRs, especialmente el TLR4, esta involucrado en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica^{34-39,43}.

Se ha demostrado que la expresión del TLR4 es mayor en células endoteliales localizadas, en las regiones con el flujo sanguíneo alterado, en ratones con aterosclerosis. Por otra parte, la hiperlipidemia inducida por la dieta aumenta la expresión de TLR4 en estos sitios. La inactivación de TLRs en ratones conduce a una reducción de la acumulación de lípidos en la ApoE, así como una reducción en la producción de citocinas, específicamente de MCP-1. Estos hallazgos sugieren que los TLRs son importantes en la aterosclerosis independiente del colesterol de la dieta^{35,39}.

La señalización pro-inflamatoria dependiente de TLR4, ha sido implicada en las etapas de la aterosclerosis, como son; inicio, progresión e inestabilidad de la misma. A su vez el TLR4 es expresado en los macrófagos, en las lesiones ateroscleróticas y en el sitio de la ruptura de la placa, en pacientes con infarto agudo del miocardio³⁹. Se ha establecido que las LDL oxidadas y sus componentes sirven como ligandos endógenos de los TLR4. La expresión de la proteína TLR4 también está demostrado estar aumentada en células musculares lisas vasculares (CMLV) de arterias ateroscleróticas. La señalización a través de TLR4 en CMLV, da lugar a un fenotipo pro-inflamatorio y aumento en el acumulo de matriz extracelular y LDL, que contribuye a la aceleración de las lesiones ateroscleróticas^{35-41,44,46}.

Los estudios también han demostrado que los ligandos exógenos, como el lipopolisacárido (LPS) en la sepsis o componentes de *Porphyromonas gingivalis* en las infecciones periodontales, aceleran la aterosclerosis vía activación de TLRs. Además, el IFN- α (interferón α) producido por las células dendríticas plasmáticas en las placas ateroscleróticas, se observó mejoraba la señalización TLR4 mediante la sensibilización de estas células al ligando TLR4, el LPS. El IFN- α aumenta la expresión de TLR4. El TNF- α (factor de necrosis tumoral α), IL-12 (interleucina-12) y MMP-9, son algunas de las moléculas clave en la inestabilidad de la placa, activadas vía señalización de TLR4. Estos datos sugieren que los TLRs pueden ser el vínculo entre la inflamación y la enfermedad aterosclerótica, en presencia o ausencia de infección^{47, 60}.

No está claro si el TLR4 de forma independiente o en conjunto contribuye a la aterosclerosis. La transfección de DNA que codifica en humanos para TLR4, a las paredes de la arteria carótida de conejos aceleraba la aterosclerosis, sin embargo tuvo un efecto menos significativo que con la transfección de cualquiera de los receptores de forma individual^{47,61}.

La evidencia acumulada por la investigación básica sugiere que los polimorfismos del TLR4 juegan un papel crítico en la aterosclerosis y la enfermedad de las arterias coronarias, lo que ha llevado a muchos grupos a examinar su significado clínico. El grupo de investigadores de Misoguchi, encontró que la expresión de TLR4 se correlaciona con la extensión y severidad de la enfermedad arterial coronaria en pacientes con angina estable^{40,48-54}.

Como es sabido, las plaquetas son componentes clave de la trombosis, un proceso en el que el daño vascular termina en la formación del coágulo, llevando eventualmente a la isquemia y/o infarto de la zona dañada. Estudios recientes han demostrado que las plaquetas humanas expresan TLRs. La funcionalidad de los TLRs en las plaquetas se ha demostrado en varios estudios, por ejemplo, el tratamiento con *PAM3CSK4*, un ligando sintético del heterodímero TLRs, resulta en la agregación plaquetaria, adhesión, secreción de gránulos, la interacción con los leucocitos, y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos efectos son mediados por señalización PI3-K/Akt^{35,55}.

Basándose en estos hallazgos, es probable que la activación del sistema inmune innato, ya sea por patógenos o por lesión de los tejidos, puede conducir a la progresión de la placa aterosclerótica, trombosis y como resultado final la aparición de síndromes coronarios agudos. Estos mecanismos podrían explicar la relación entre la inflamación y la trombosis, como se describe en varios estudios⁵⁶⁻⁶².

La isquemia del miocardio y la lesión por reperfusión (IM / LR), es causada por la restauración del flujo sanguíneo del corazón después de un evento isquémico. Irónicamente, este proceso conduce a una respuesta inflamatoria que causa un mayor daño a los tejidos viables alrededor del infarto, probablemente a través de la apoptosis acelerada. Los TLR4 están implicados en la isquemia miocárdica y la lesión por reperfusión, sugerida por el hecho de que el uso de un antagonista de TLR4 denominado "*Eritoran*" en ratones, protege contra este proceso perjudicial. Este mecanismo de protección puede ser atribuido a la inflamación atenuada, como

disminución de la actividad mieloperoxidasa, lo que conduce a pequeños infartos en comparación con los controles. Otros estudios han sugerido que la proteína de choque térmico extracelular 70 (HSC70), liberada por el miocardio durante IM / lesión por reperfusión, juega un papel clave en la respuesta inflamatoria postisquémica a través de la señalización vía TLR-4. A medida que más datos surgen y apoyan el papel que tiene los TLR en diversas enfermedades cardiovasculares, hay un creciente interés en terapias dirigidas a los TLR y los componentes de la cascada de señalización pro-inflamatoria. Desde que se sabe que los TLRs contribuyen significativamente a la patogénesis de la aterosclerosis y otras enfermedades cardiovasculares, los investigadores han impulsado estudios de los efectos antiinflamatorios de los medicamentos cardiovasculares disponibles y su actividad sobre TLRs. Por ejemplo, las estatinas han demostrado inhiben la respuesta inflamatoria mediada por TLR4 en algunos individuos con un genotipo TLR4 específico, que explica el beneficio adicional de las estatinas sobre el riesgo cardiovascular de un subgrupo específico de la población^{35,54}.

Un estudio demostró que en los monocitos, la fluvastatina regula negativamente la señalización vía TLR4, en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, lo que sugiere un posible efecto beneficioso de las estatinas sobre el remodelado cardíaco. Además, la lipasa endotelial ha demostrado ser aumentada por LPS a través de TLR4, lo que conduce a la captación de LDL por los macrófagos. Este incremento se ha demostrado es bloqueado por simvastatina. Por lo tanto, las estatinas podrían proporcionar un nivel adicional de cardioprotección por la actividad regulatoria del TLR4⁵⁴.

Los antagonistas de los receptores de angiotensina II (ARA II) han demostrado tener actividad antagonista de los TLRs, un estudio basado en el argumento de que la angiotensina II está implicada en la respuesta inflamatoria vascular. La estimulación con TNF- α (factor de necrosis tumoral-alfa) y la angiotensina II, aumentó los niveles de RNAm de TLR4 en cultivos de CMLV humanas. Por lo tanto, los ARA II, además de sus efectos antihipertensivos y remodelación cardíaca, tienen un potencial benéfico

adicional en el tratamiento de otros tipos de enfermedades cardiovasculares mediante la modulación de TLR y la respuesta inflamatoria. De acuerdo con propiedades perjudiciales atribuidos a TLR4, la deficiencia de TLR4 confiere protección contra la formación de neoíntima y el remodelado arterial^{35,47}.

Algunos medicamentos en estudio, han demostrado tener actividad antagonista del TLR4, desarrollados para varios pasos diferentes de la señalización del TLR4: (1) la interacción entre el ligando y del receptor, (2) la interacción entre el receptor y los adaptadores de la vía de señalización, y (3) actividad enzimática de los factores intermedios. Los anticuerpos neutralizantes del TLR4 suprimen la actividad de NFκB, consecuencia de ello, se ha observado atenúa la inflamación mediada por TLR4.

La variación genética entre los TLR4 de diferentes mamíferos, se encuentra principalmente en la región del dominio extracelular, el cual es rico en repeticiones de leucina (LRR). La variación en esta región, que está implicada en el reconocimiento de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), es probablemente el resultado de la evolución de la presión de patógenos al hospedero⁶³.

La secuenciación del TLR4 en humanos reveló que la mayor parte de la variación de este gen esta localizada en el tercer exón, que codifica para el dominio LRR. A pesar de esta gran variación en el dominio LRR del TLR4, la frecuencia de la mayoría de los polimorfismos es baja en las poblaciones humanas (<1%). Las excepciones, son dos polimorfismos que se han descrito en la población con frecuencias > 5%. Estos son Asp/Gly (A/G), causando una sustitución del aminoácido aspartato por glicina en la posición 399(rs4986790), y un cambio de Thr/Ile (C/T) causando una sustitución del aminoácido treonina por una isoleucina en la posición 399 (rs4986791). Arbour, et al., fueron los primeros en reportar que los polimorfismos Asp299Gly(rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), tenían un efecto en la respuesta que tienen algunos individuos a los LPS inhalados (hiporespuesta)^{38,43-49}.

El hallazgo de que los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4 tuvieran una respuesta a la endotoxina bacteriana, dio paso a la realización de varios estudios de asociación genética. Los resultados de estos estudios llevo a conclusiones contradictorias sobre el papel de los polimorfismos y su efecto en la susceptibilidad a infecciones bacterianas por gramnegativos y enfermedades cardiovasculares, específicamente su asociación con el síndrome coronario agudo. Ello plantea el cuestionamiento de la fuente de estas discrepancias, una posible explicación puede ser que en estos estudios los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), se examinaron por separado. La mayoría de los estudios se enfocan a los polimorfismos de Asp299Gly o de Thr399Ile, pero descuidan el hecho de que también existen a manera de co-segregación (Asp299Gly/Thr399Ile).

Los resultados en los perfiles de citocinas con el estímulo de LPS en cultivos celulares, demostraron que sólo el haplotipo Asp299Gly (rs4986790) difiere en fenotipo, este genotipo representa un aumento de respuesta y expresión de citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Es interesante que la respuesta de citocinas inducidas por LPS en el haplotipo Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791), no difiere de la respuesta de citocinas de tipo salvaje^{34,64-65}.

En la mayor parte de la literatura describen que el genotipo Thr399Ile (rs4986791) aislado no es frecuente, por lo que su fenotipo es todavía desconocido. El genotipo del TLR4 que altera la respuesta de citocinas tras su estimulación por LPS, esta en el polimorfismo Asp299Gly (rs4986790) del gen TLR4^{34,65}. Estudios poblacionales, revelan distribuciones geográficas específicas de los haplotipos TLR4. Hoy día, las poblaciones humanas de África tienen 10 a 20 veces mayor frecuencia de los genotipos Asp299Gly (rs4986790), que los otros continentes. En contraste, la población blanca muestra una ausencia casi total de los genotipos Asp299Gly (rs4986790), pero tienen una mayor frecuencia de los haplotipos Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791). Las poblaciones de Asia carecen de los genotipos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), así como de los haplotipos Asp299Gly/Thr399Ile^{65,66}. En México, aún no se esta descrito en la literatura.

Como consecuencia de esta distribución geográfica específica, la mayoría de estudios realizados y publicados han sido en poblaciones con un fondo genético Europeo, han analizado el haplotipo Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791), en lugar de el genotipo Asp299Gly (rs4986790). Hasta cierto punto, los antecedentes genéticos de las poblaciones estudiadas pueden explicar la falta de acuerdo entre los estudios publicados de polimorfismos TLR4.

Términos que se utilizan para una búsqueda en PubMed, los polimorfismos del TLR4 Asp299Gly (rs4986790), dio lugar a 164 artículos después de la exclusión de todos los de revisión. Estos artículos estudiaron la relación entre los polimorfismos TLR4 y la susceptibilidad a la enfermedad arterial coronaria (EAC) y otras enfermedades como infecciones. La fuerte asociación hasta la fecha descrita, entre los polimorfismos de TLR4 y la susceptibilidad a la enfermedad ha sido reportada en parte, para infecciones por virus sincitial respiratorio (VSR). Esto dio lugar a 157 artículos de investigación sobre el efecto de los polimorfismos TLR 4 Asp299Gly (rs4986790) y los haplotipos Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791). De estos artículos, el 62% informó que no hubo asociación entre los polimorfismos del gen deTLR4 y la susceptibilidad a las enfermedades cardiovasculares.

La mayoría de los artículos incluyen a poblaciones europeas (90%), y el resto de Asia (6%) o África (4%). La consecuencia de los estudios con la población europea, es que en éstos estudios no se valoraba el polimorfismo Asp299Gly (rs4986790). Además de la población de origen, el estudio metodología también pudo haber influido en los resultados^{34,66}.

Aunque estudios de asociación genética no encuentran correlación entre los haplotipos y la enfermedad, no dan una idea de las consecuencias funcionales directas de los polimorfismos del TLR4. Varios estudios han investigado el papel funcional de los del TLR4. Los estudios de Arbour y Schwartz muestran que las células transfectadas con cualquiera de los haplotipos TLR4 tienen una disminución de la actividad de NF-kB en comparación con TLR4 normal. Esto sugiere que el haplotipo Asp299Gly

(rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791) debe tener un efecto sobre el fenotipo, lo que redujo la producción de citoquinas de la respuesta inmune innata. Estudios *in vivo* han investigado los efectos de LPS en voluntarios humanos, inyectaron 2 ng / kg de LPS, se encontraron disminución de los niveles de IL-6 después de 6 h en voluntarios con polimorfismos de TLR4, también informó disminución de la IL-1 β después de 24 h de estimulación, lo que sugiere un efecto tardío dependiente de la vía TRIF⁶⁵⁻⁶⁷.

Los estudios que incluyen el polimorfismo Asp299Gly (rs4986790) son escasos. Los mejores estudios sobre el polimorfismo Asp299Gly (rs4986790), son los que se han realizado en África. Hasta ahora, sólo un estudio informó la producción de citocinas por los individuos con el polimorfismo Asp299Gly (rs4986790), encontrando una asociación con la producción de citocinas TNF- α ⁶⁵.

Estudios recientes, por medio de cristalografía del complejo TLR4-LPS/MD-2 revelan que hay dos regiones de TLR4 que participan en la unión del complejo LPS/MD-2. Estos dominios conservados se encuentran en el dominio N-terminal y central del receptor. La cristalografía muestra que la Asp299Gly (rs4986790) no está directamente implicada en la unión de los MD-2, pero el polimorfismo se encuentra cerca de la zona TLR4-MD-2^{34,66}.

Mizoquchi y col., estudiaron a pacientes con angina crónica estable y demostraron una correlación entre la expresión de los receptores TLR 2 y 4 en monocitos y la extensión así como la severidad de la enfermedad arterial coronaria valorada por coronariografía y citometría de flujo⁴⁰. Edfelt y colaboradores, en Estocolmo determinaron la prevalencia de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4 en una población de pacientes con infarto del miocardio comparándolo con el grupo control, encontrando una mayor asociación de la presencia de dichos polimorfismos en los pacientes con infarto del miocardio, en la subpoblación de hombres, lo que sugirió una mayor susceptibilidad de infarto del miocardio en las personas con polimorfismos del TLR4⁴³.

Wernes, et al., realizaron un estudio en población caucásica (Alemana) para ver la relación de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del TLR4, en infarto del miocardio, este estudio no reporta asociación con dichos polimorfismos⁴⁵. En un estudio publicado por Enquobahrie y colaboradores, encontraron una asociación entre los haplotipos Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR 4 y la disminución del riesgo de infarto del miocardio no fatal⁶⁸.

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad arterial coronaria y su expresión clínica como síndromes coronarios agudos, son la principal causa de muerte a nivel mundial. Este padecimiento es de origen multifactorial, es decir en su desencadenamiento participan tanto factores genéticos como ambientales. Dada la fisiopatogenia de este padecimiento, se sugiere que ciertos receptores transmembrana y genes candidatos codifican para citocinas pro y antiinflamatorias, mismos que podrían ser importantes para su estudio. Resultados previos han detectado algunas asociaciones de polimorfismos de citocinas inflamatorias con el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria, tal es el caso de la participación de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4. Estas moléculas tienen una importante participación en el proceso inflamatorio vascular, y con ello, en el inicio, desarrollo y estabilidad de la placa aterosclerótica, estrés oxidativo, proliferación de la neointima, agregación plaquetaria, remodelación cardíaca, etc. Algunos estudios han demostrado asociación de algunos polimorfismos de estos genes con el desarrollo de los síndromes coronarios agudos. También se han reportado asociaciones con la extensión y severidad de la enfermedad arterial coronaria oclusiva en pacientes con angina crónica estable, pero otros no han encontrado dicha asociación. Cabe destacar que los estudios realizados son pocos, sólo de Asp299Gly (rs4986790) y llevados a cabo en poblaciones caucásicas, africanas y asiáticas por lo cual no son aplicables a nuestra población, dado que presenta características genéticas distintas a las poblaciones mencionadas. Todo esto hace meritorio el realizar el presente estudio con el fin de determinar la participación de estos polimorfismos en población Mexicana y así detectar marcadores genéticos de susceptibilidad para el desarrollo de la enfermedad arterial coronaria en nuestra población. Estos estudios permitirán en un futuro cercano definir tratamientos preventivos y mejor dirigidos considerando las características genéticas individuales.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Están los polimorfismos genéticos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen del TLR4 asociados con el desarrollo de síndrome coronario agudo?

HIPÓTESIS ALTERNA

Existe asociación entre los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen del TLR4 con el desarrollo de síndrome coronario agudo.

HIPÓTESIS NULA

No existe asociación entre los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen del TLR4 con el desarrollo de síndrome coronario agudo.

OBJETIVOS

Objetivo Primario

Establecer si los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen del TLR4 se asocian con el desarrollo del síndrome coronario agudo en la población mexicana.

Objetivo secundario

Establecer la distribución de los polimorfismos de TLR4 (Asp299Gly/Thr399Ile), en la población estudiada.

MATERIAL Y METODOS

El estudio fue realizado en conjunto con los departamentos de Unidad de Cuidados Coronarios y Biología Molecular, del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo comprendido de marzo del 2009 a junio del 2011.

Diseño del estudio: descriptivo, analítico, retrospectivo del tipo casos y controles.

Población de estudio:

Como grupo de casos se incluyeron 476 pacientes, pertenecientes a la población Mexicana, que se definen como aquellos con historia de tres generaciones previas nacidas en territorio mexicano, no relacionados entre sí, que ingresaron al Instituto Nacional de Cardiología con diagnóstico de síndrome coronario agudo. Diagnóstico establecido de acuerdo a la definición universal, en un periodo comprendido de marzo de 2009 a mayo del 2011 y que se haya demostrado por angiografía la oclusión de la arteria responsable en los casos de infarto del miocardio y/o enfermedad aterosclerosa en los casos de angina inestable.

Como grupo control se incluyeron a 283 individuos sanos, pertenecientes a la población Mexicana, que se definen como aquellos con historia de tres generaciones previas nacidas en territorio mexicano, no relacionados entre sí. Se define como personas sanas a individuos sin antecedentes familiares y/o clínicos de enfermedad cardiovascular, asintomáticos, con estudio de AngioTAC de arterias coronarias con Score de calcio de 0 y sin evidencia de lesiones de las arterias coronarias. Todos los individuos incluidos en el estudio formaron una carta de consentimiento informado.

Criterios de inclusión:

- Pacientes mayores de edad (≥ 18 años), mexicanos.
- Diagnóstico de síndrome coronario agudo, establecido en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", de acuerdo a la definición universal.
- Se les haya realizado coronariografía que demuestre enfermedad aterosclerosa.
- Expediente clínico completo y de los estudios angiográficos.
- Firma de consentimiento informado por parte del paciente.

Criterios de exclusión:

- Pacientes extranjeros.
- Muestreo incompleto
- Infarto agudo del miocardio de etiología diferente a la aterosclerosa.
- No contar con estudio de anatomía coronaria no invasivo en el caso de grupo de controles.

Criterios de eliminación:

- Pacientes en los cuales no haya sido posible obtener los datos en forma confiable.
- Muestra sanguínea para estudio de polimorfismo insuficiente o inadecuada.
- Calidad o cantidad de DNA extraído inadecuada.

Maniobra

Se realizó veno-punción antecubital, con las medidas de protección universal para la obtención de 15 ml de sangre periférica tanto a los pacientes como al grupo control para su procesamiento genético.

Extracción de ADN

A partir de la muestra, se extrajo el DNA genómico por medio de técnicas convencionales, descritas a continuación⁶⁹:

- 1.- Se recolectó 15ml de muestra de sangre en tubo Vacutainer (tapa violeta), conteniendo 100 ul de EDTA al 15%.
- 2.- Se transfirió 5 ml de sangre a un tubo de 15 ml para centrifugar y agregar 5 ml de sal "buffer" que contiene 10mM Tris.HCL, 10mM de KCl, 10 mM MgCl₂ y 2 mM EDTA (TKMI).
- 3.- Se agrego 125 uL de Nonidet P-40 (NP-40, sigma) a las células.
- 4.- Se centrifugo a 2200 revoluciones por minuto (RPM), por 10 minutos a temperatura ambiente (RT) en una cámara de Beckman (modelo TJ-6).
- 5.- Se extrajo el sobrenadante, excepto el aditamento principal. Se lavo el aditamento en 5 ml de buffer TKMI y se centrifugo como el anterior.
- 6.- Se suspendió el aditamento en 0.8 ml de sal "buffer" que contenía 10 mM Tris HCl pH de 7.6, 10mM KCL, 10 mM MgCl₂, 0.4 M NaCl y 2mM EDTA (TKM2).
7. Se agrego 50 ul de SDS al 10% a través de una pipeta y se incubo por 10 minutos a 55° C.
- 8.- Se agregó 0.30 ml de 6 M NaCl en el tubo.
- 9.- Centrifugando a 12000 RPM por 5 minutos, en microcentrifugadora.
- 10.- Se conservó el sobrenadante que contiene DNA y se descartó la proteína precipitada.
- 11.- Se agregó 2 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente hasta precipitar el DNA.
- 12.- Retirando el precipitado de DNA en un tubo de microcentrifugación que contenía 1ml de etanol al 70% a muy baja temperatura (frío).
- 13.- Microcentrifugando por 5 minutos a 12000 RPMN a 4° C.
- 14.- Se extrajo el precipitado en una Speed-vac, suspendiendo el DNA en 0.5 ml de 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 a 65° C por 15 minutos.
- 15.- Se midió la concentración de DNA tomando A260 y A280, y se checo la calidad del DNA a través de electroforesis en gel de agarosa.

Sitios polimórficos que fueron analizados.

De acuerdo a los reportes previamente publicados de asociación entre polimorfismos del receptor de TLR 4 y síndrome coronario agudo, en otras poblaciones, nosotros decidimos estudiar los siguientes 2 polimorfismos:

- Localizados en el exón 3 del TLR4; Asp299Gly y Thr399Ile.

Determinación de los polimorfismos.

De acuerdo a la experiencia del departamento de Biología Molecular, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real para la determinación de los distintos polimorfismos. Los alelos fueron asignados con un programa de discriminación alelica. Los ensayos TaqMan para la PCR en tiempo real fueron diseñados por la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA. USA). Los ensayos fueron corridos en un equipo 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA).

Análisis estadístico

Las frecuencias alelicas y genotípicas de los polimorfismos del gen del receptor TLR4 analizadas se obtuvieron por conteo directo. En cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada (X^2). Las diferencias entre grupos se determinarán usando la prueba de X^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 sea menor a 5, se utilizó la prueba Exacta de Fisher. El valor de p fue corregido (pC) multiplicando su valor por el número de comparaciones realizadas en cada locus, con un nivel de significancia estadística establecido como $pC < 0.05$. El análisis de haplotipos y desequilibrio de ligamiento se realizó utilizando el programa Haploview 4.1 (Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University, Cambridge, MA, USA).

RESULTADOS

Del periodo comprendido de marzo del 2009 a junio del 2011, la población estudiada con síndrome coronario agudo estuvo constituido por 476 pacientes (hombres 381 y mujeres 95, edad promedio 59.76 años \pm 11.01) y el grupo de población sana fue 283 (hombres 202 y mujeres 81, promedio de edad 55.4 años \pm 7.23). *Ver tabla 1.*

Los síndromes coronarios agudos se distribuyeron de la siguiente manera: Infarto agudo del miocardio 350 pacientes y de angina inestable 126 pacientes (*ver tabla 2*).

Los datos obtenidos del sitio polimórfico Asp299G (rs4986790), muestran una distribución muy similar entre pacientes y controles, el alelo Asp (A); en SICA y controles fue de 96% y 97% respectivamente, el alelo Gly (G); en SICA y controles, tuvo una distribución de 5% y 2% respectivamente. Los genotipos AspAsp (AA); en SICA y controles se encontró en 93% y 94% respectivamente, el AspGly (AG); se encontró en 6% y 5%, respectivamente. El GlyGly (GG) con distribución nula (0%). Los datos obtenidos del sitio polimórfico TLR4 Thr399Ile (rs4986791) muestran una distribución en casos y controles, de la siguiente manera, el alelo Thr (C); se encontró en 96% y 97% respectivamente, el alelo Ile (T); en 3% y 2% respectivamente. Los genotipos del alelo ThrThr (CC); con una distribución de 93% y 94% respectivamente, IleThr (TC) en 6% y 5% respectivamente, el genotipo IleIle (TT) con nula distribución (todas ellas con una $p \geq 0.4$, sin significancia estadística). *Ver tabla 3 y gráficas 1-4.*

Tabla 1. Características basales de los grupos de casos con SICA y controles sanos.

	SICA (n: 476)	Controles (n:283)
Edad	59.7 \pm 7.23	55.6 \pm 7.23
Mujeres	95	81
Hombres	381	202

Abreviaturas: SICA; síndrome coronario agudo.

Tabla 2. Distribución de los síndromes coronarios agudos

SICA	No de pacientes (n: 476)	%
Infarto agudo del miocardio	350	73.5
Angina inestable	126	26.5

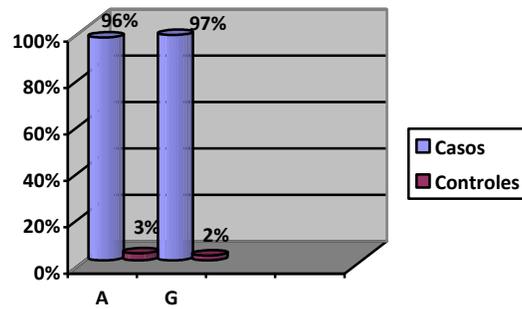
Abreviaturas: SICA; síndrome coronario agudo.

Tabla 3. Frecuencia de alelos y genotipos de los polimorfismos del TLR4 (TLR4 Asp299 y TLR4 399Ile) en síndrome coronario agudo y controles sanos, en población Mexicana.

	SICA		Controles		P
TLR4 Asp299	(n: 476)		(n:283)		
Alelo	N	af	N	af	
A(Asp)	919	0.965	550	0.971	NS
G(Gly)	33	0.034	16	0.028	NS
Genotipos	N	gf	N	gf	
AA (AspAsp)	443	0.930	267	0.943	NS
AG(AspGly)	33	0.069	16	0.056	NS
GG(GlyGly)	0	0	0	0	NS
TLR4 399Ile	(n:476)		(n:283)		
Alelo	N	af	N	af	
C(Thr)	919	0.965	550	0.971	NS
T(Ile)	33	0.034	16	0.028	NS
Genotipos	N	gf	N	gf	
CC(ThrThr)	443	0.930	267	0.943	NS
TC(IleThr)	33	0.069	16	0.056	NS
TT(IleIle)	0	0	0	0	NS

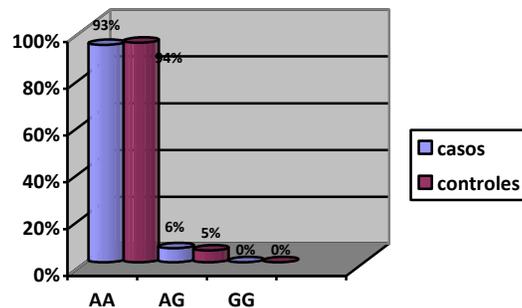
En las dos poblaciones de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg por medio de la prueba de chi-cuadrada (χ^2). Abreviaturas: SICA; síndrome coronario agudo, p: valor de p, NS; no significativa. Asp; aspartato, Gly; glicina, Thr; treonina, Ile; isoleucina.

Gráfica 1. Distribución de los alelos A/G del polimorfismo Asp299Gly (rs4986790) en síndrome coronario agudo y controles sanos, en población Mexicana.



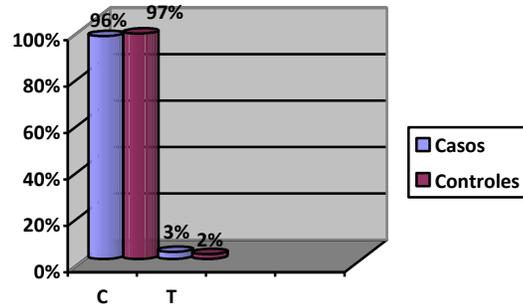
Se puede observar la distribución muy similar de los alelos A/G en ambos grupos de casos y controles.

Gráfica 2. Distribución de los genotipos AA/AG/GG del polimorfismo Asp299Gly (rs4986790) en síndrome coronario agudo y controles sanos, en población Mexicana.



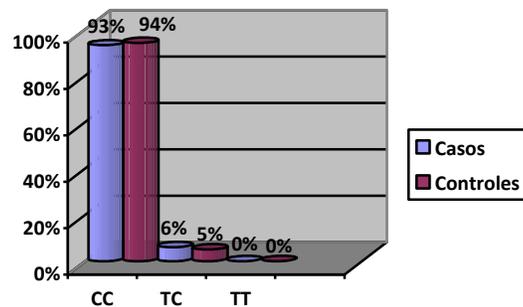
Se puede observar la distribución muy similar de los genotipos AA/AG en ambos grupos de casos y controles. Y la nula distribución de los genotipos GG en ambos grupos.

Gráfica 3. Distribución de los alelos C/T del polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) en síndrome coronario agudo y controles sanos, en población Mexicana.



Se puede observar la distribución muy similar de los alelos C/T en ambos grupos de casos y controles.

Gráfica 4. Distribución de los genotipos CC/TC/TT del polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) en síndrome coronario agudo y controles sanos, en población Mexicana.



Se puede observar la distribución muy similar de los genotipos CC/TC en ambos grupos de casos y controles. Y la nula distribución de los genotipos TT en ambos grupos.

En el análisis de los haplotipos la distribución fue de la siguiente manera, el haplotipo AC estuvo en el 95% de los casos y en el 96% de los controles, el haplotipo GT en el 2% de los casos y en el 2% de los controles (con una p , sin significancia estadística). Se observó existencia de co-segregación de AC y GT pero sin significancia estadística para su participación en SICA (ver tabla 4, figura 1 y gráfica 5).

Tabla 4. Distribución de haplotipos de los polimorfismos del TLR4 Asp299G (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) en pacientes con SICA y controles.

Haplotipo	Frecuencia de casos	Frecuencia de controles	X^2	Valor de P
AC (Asp/Thr)	0.958	0.968	1.008	0.3155
GT (Gly/Ile)	0.027	0.025	0.092	0.7621

Existe co-segregación de AC y GT pero sin significancia estadística para su participación en SICA. Abreviaturas: SICA; síndrome coronario agudo. X^2 : chi-cuadrada.

Figura 1.

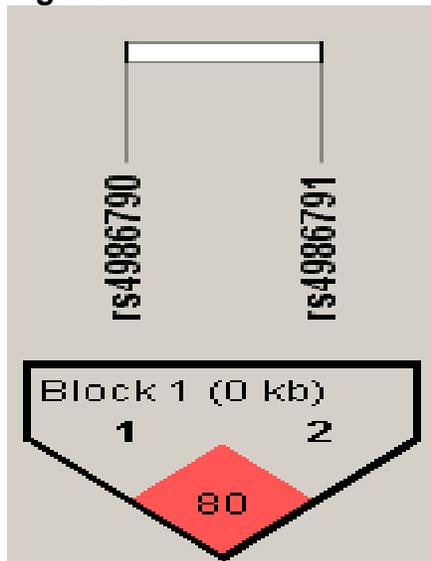
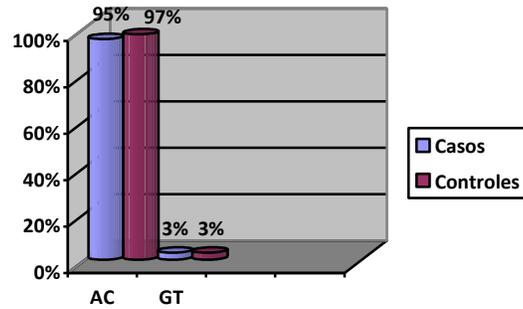


Figura 1. La figura representa el desequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos Asp299G (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) con delta prima (D') igual a 8.0, mostrando que ambos polimorfismos segregan juntos.

Gráfica 5. Distribución de haplotipos de los polimorfismos del TLR4 Asp299G (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) en pacientes con síndrome coronario agudo y controles.



Existe co-segregación de AC y GT en ambos grupos de casos y controles.

DISCUSIÓN

En los últimos años, un número creciente de observaciones han demostrado que la inflamación juega un papel muy importante en la patogenia de la aterosclerosis y de sus complicaciones⁶⁻⁸. El fenómeno inflamatorio se inicia cuando las lipoproteínas circulantes quedan atrapadas en la matriz extracelular subendotelial y se oxidan, adquiriendo así propiedades pro-inflamatorias, 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. 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 cardíaco⁹⁻¹³. Sin lugar a dudas el fenómeno inflamatorio desempeña un importante papel en el desarrollo de la aterosclerosis coronaria y probablemente constituye el factor de transformación de un síndrome coronario estable a uno inestable¹⁴⁻¹⁶. La respuesta inflamatoria no sólo promueve el inicio de un proceso aterosclerótico, sino que también contribuye al posterior crecimiento del ateroma y a la precipitación de sucesos trombóticos agudos^{6,8, 17}. Los desencadenantes de la inflamación en la aterogénesis incluyen los factores de riesgo clásicos, como; la hipercolesterolemia, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, obesidad, hiperhomocisteinemia, tabaquismo y las infecciones. Los factores de riesgo antes mencionados tienen un componente genético. Debido a que los rasgos genéticos contribuyen significativamente al riesgo global del síndrome coronario agudo, un número importante de estudios se han enfocado en la hipótesis de que la variación en la genética del sistema inflamatorio podría incrementar el riesgo a desarrollar la enfermedad⁹.

Uno de los genes candidatos involucrado es el gen TLR 4 (de sus siglas en inglés Toll-like receptor tipo 4) y sus polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), ya que se ha demostrado en diversos estudios, que juegan un papel importante en el estrés oxidativo, inflamación y enfermedad aterosclerosa. La señalización pro-inflamatoria dependiente de TLR4, ha sido implicada en las etapas de

la aterosclerosis como son; inicio, progresión e inestabilidad de la placa aterosclerótica^{34,35}. Diversos estudios principalmente en poblaciones caucásicas, africanas y asiáticas han sugerido la participación de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791) en la susceptibilidad al desarrollo del síndrome coronario agudo. Los resultados reportados hasta ahora han sido contradictorios, con asociaciones positivas y negativas. Mizoquchi y colaboradores, estudiaron a pacientes con angina crónica estable, en donde demostraron una correlación entre la expresión de los receptores TLR 4 en monocitos, y la extensión y severidad de la enfermedad arterial coronaria valorada por coronariografía y citometría de flujo⁴⁰. Edfelt y colaboradores, en Estocolmo determinaron la frecuencia de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del TLR4 en una población de pacientes con infarto del miocardio comparándolo con el grupo control, encontrando asociación de los polimorfismos estudiados con infarto del miocardio, en la subpoblación de hombres, lo que sugirió una mayor susceptibilidad de infarto del miocardio en las personas con alelos de polimorfismos del TLR4⁴³. Wernes y col., realizaron un estudio en población caucásica (Alemana) para ver la relación de los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen del TLR4 con infarto del miocardio, en este trabajo no se reportó asociación de estos polimorfismos con el desarrollo de IM⁴⁵. En un estudio publicado por Enquobahrie y colaboradores, encontraron una asociación entre los haplotipos Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791) del TLR 4 y la disminución del riesgo de infarto del miocardio no fatal⁶⁸.

Por las funciones antes descritas del TLR4 y sus polimorfismos, aunado a que no se han realizados estudios de su participación en población Mexicana, en este estudio se decidió estudiar la participación de los polimorfismos de los alelos Asp299Gly (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791) y los haplotipos Asp299Gly (rs4986790)/Thr399Ile (rs4986791) en el síndrome coronario agudo. Se estudiaron 476 pacientes con SICA (hombres 381 y mujeres 95, edad promedio 59.76 años \pm 11.01) y el grupo de población sana fue 283 (hombres 202 y mujeres 81, promedio de edad 55.4 años \pm 7.23). Los síndromes coronarios agudos se distribuyeron de la siguiente manera: infarto agudo del miocardio (IAM) 350 pacientes y de angina inestable 126 pacientes.

Nosotros, no encontramos asociación entre los polimorfismos Asp299G (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), y el desarrollo del síndrome coronario agudo. No hubo asociación relacionada con los alelos, genotipos y haplotipos, tanto en mujeres como en hombres Mexicanos, acorde a los reportado por algunos estudios como el de Wernes. Los resultados negativos, pueden ser consecuencia de la estratificación de la población, en relación a la distribución de las áreas geográficas y a la heterogeneidad genética en nuestro país. La distribución de los polimorfismos de los alelos Asp299G (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791), así como de los haplotipos fue similar tanto en casos como en los controles ($p \geq 0.47$ OR .78 IC0.3-1.5), el análisis de desequilibrio de ligamientos muestra que ambos polimorfismos segregan juntos, sin embargo no se encontró asociación de los haplotipos con la susceptibilidad al desarrollo de SICA. Existe una baja distribución del alelo G en el polimorfismo TLR4 Asp299 y una nula distribución del genotipo GG. Existe una baja distribución del alelo T en el polimorfismo TLR4 399Ile y una nula distribución del genotipo TT en este mismo polimorfismo.

En resumen el presente estudio sugiere que los polimorfismos del TLR4 Asp299G (rs4986790), Thr399Ile (rs4986791) no tienen un papel importante en la susceptibilidad al desarrollo del síndrome coronario agudo en la población mexicana. Este resultado corrobora resultados previos publicados en otras poblaciones^{40,43,68}. Se requieren estudios adicionales con un mayor número de pacientes y en otras poblaciones, para definir el verdadero papel de estos polimorfismos y su participación en el síndrome coronario agudo.

CONCLUSIONES

Los datos obtenidos en este estudio de casos y controles, sugieren que no hay una asociación genética directa entre los polimorfismos Asp299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4 y la susceptibilidad al desarrollo de los síndromes coronarios agudos. Sin embargo, el análisis de desequilibrio de ligamientos muestra que ambos polimorfismos segregan juntos, no obstante la construcción de los haplotipos no se asocian con la susceptibilidad al desarrollo del síndrome coronario agudo. Sabemos de la importancia de la aterosclerosis en el síndrome coronario agudo, como resultado de un proceso inflamatorio, si bien se sabe de los factores de riesgo clínicos clásicos hasta ahora descritos, se debe hacer énfasis en el análisis de los factores genéticos que contribuyen a la patogénesis del mismo, los resultados hasta ahora obtenidos en la literatura, sugieren la existencia de otros factores que intervienen en la presencia del SICA. Por lo que se requiere de la búsqueda de otros sitios polimórficos de TLR4 que probablemente pudieran estar involucrados en conjunto con los hasta ahora estudiados. La investigación de variantes genéticas comunes en estos padecimientos puede ser de gran utilidad en el futuro ya que permitirá la identificación de individuos susceptibles y permitirá el uso de mejores tratamientos y más dirigidos.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Organización Mundial de la Salud (OMS).
- 2 Fuente: INEGI/Secretaría De Salud. DGIS, 2008. Elaborado a partir de la base de datos de defunciones y CONAPO, 2006. Proyecciones de Población en México 2005-2050.
- 3 Eugene Braunwald, et al. Tratado de Cardiología. Ed. Elsevier Saunders. 7ª Edición. Vol 2, pag 1141-1142.
- 4 Falk E, Shah PK, Fuster V (1995). Coronary plaque disruptions. *Circulation* 92: 657-671.
- 5 Rioufol G, Finnet G, Ginon I, et al. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome. *Circulation* 2002; 106: 84-88.
- 6 Ross R, Atherosclerosis-an inflammatory disease *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- 7 Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes *Circulation* 2001; 104: 365-372.
- 8 Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874.
- 9 Woods A, Brull DJ, Humphries SE, et al. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21:1574–1583.
- 10 Koch W, Kastrati A, Bottiger C, Mehilli J, von Beckerath N, Schomig A. Interleukin-10 and tumor necrosis factor gene polymorphisms and risk of coronary artery disease and myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 159: 137-144.
- 11 Keso T, Perola M, Laippala P, et al. Polymorphisms within the tumor necrosis factor locus and prevalence of coronary artery disease in middle-aged men. *Atherosclerosis* 2001; 154: 691-697.
- 12 Padovani JC, Pazin-Filho A, Simoes MV, et al. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thromb Res* 2000; 100: 263-269.
- 13 Tanaka C, Mannami T, Kamide K, et al. Single nucleotide polymorphisms in the interleukin-6 gene associated with blood pressure and atherosclerosis in a Japanese general population. *Hypertens Res* 2005; 28: 35-41.
- 14 Corti R, Fuster V, Badimon JJ Pathogenetic concepts of acute coronary syndrome *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 7S-14S.
- 15 Lopes N, Vasudevan S, Alvarez R, Binkley P Goldschmidt P. Pathophysiology of plaque instability insights at genomic level. *Prog in Cardiovascular Dis* 2002; 44: 323-338.
- 16 García-Moll X, Kaski JC. Cardiopatía isquémica: marcadores de inflamación y riesgo cardiovascular. *Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 990-1003.
- 17 Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*. 2001; 103:1718-1720.
- 18 Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet* 1998; 351: 88-92.
- 19 Ridker PM. Novel risk factors and markers for coronary disease. *Adv Intern Med*. 2000; 45:391-418.

- 20 Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, et al. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 1999;100:793–798.
- 21 Woods A, Brull DJ, Humphries SE, et al. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: the central role of interleukin-6. *Eur Heart J* 2000; 21:1574–1583.
- 22 Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation*. 1999; 100:1148-1150.
- 23 Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003; 107: 398-404.
- 24 Willerson JT. Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002; 44:469-478.
- 25 Lacoviello L, Di Castelnuovo A, Gattone M, et al. Polymorphisms of the interleukin-1beta gene affect the risk of myocardial infarction and ischemic stroke at young age and the response of mononuclear cells to stimulation in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25:222-227.
- 26 Latkovskis G, Licis N, Kalnins U. C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet*. 2004; 31:207-213.
- 27 Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G, Eber B. Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. *Am J Pharmacogenomics*. 2003; 3:317-328.
- 28 Domínguez-Rodríguez A, Abreu-González P, De la Rosa A, Vargas M, Ferrer J, García M. Role of endogenous interleukin-10 production and lipid peroxidation in patients with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Int J Cardiol*. 2005;99:77-81.
- 29 Stemme S, Faber B, Holm J, Winklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92:3893-3897.
- 30 Geng Y, Hansson GK. Interferon-g inhibits scavenger receptor expression and foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest*. 1992;89:1322-1330.
- 31 Momiyama Y, Ohmori R, Ohsuzu F. Association between IL-1beta gene polymorphism and myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 222-227.
- 32 Miller A. A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 1998; 16:1215-1217.
- 33 Woolf B. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genet* 1955; 19:251-253.
- 34 Bart Ferwerda, Matthew McCall, et al. Funcional Consequences of Toll-like Receptor 4 Polymorphisms. *Mol Med* 14(5-6) 346-352, May-June 2008.
- 35 Elaine Lin, Jane E., et al. Innate Immunity and Toll-like Receptor Antagonists: A Potential Role in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Cardiovasc Ther*.2009; 27(2): 117-123.

- 36 Frantz S, Ertl G, et al. Mechanism of disease: Toll-like receptor in cardiovascular disease. *Nat Clin Prac Cardiovasc Med* 2007;4:444-454.
- 37 Foo Y, Liew, Damo Xu, et al. Toll-like Receptor- Mediated Immune Responses. *Nat* 2005; 5: 446-458.
- 38 Toshihiro Tanaka, Kouichi Ozaki. Inflammation as a risk factor for myocardial infarction. *J Hum Genet* (2006) 51: 595-604.
- 39 Ishikawa Y, Sanoth M, et al. Local expression of toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction. *Clin Sci* 2008;115:133-140.
- 40 Mizoguchi E, Orihara K, et al. Association between toll-like receptors and the extent and severity of coronary artery disease in patients with stable angina. *Coron Artery Dis* 2007;17:31-38.
- 41 Outsui K, Inoue N, et al. Enhanced expression of TLR4 in smooth muscle cells in human atherosclerotic coronary arteries. *Heart Vessels* 2007;22:416-422.
- 42 G. D. Norata, K. Garlaschelli, et al. Effect of the Toll-like receptor (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *Journal Of Internal Medicine* 2005; 258: 21-27.
- 43 Edfeldt Kristina, Bennet Anna, et al. Association of hypo-response toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Euro Heart J* 2004;25:1447-1453.
- 44 Jussi A, Olli T, et al. Toll-like receptor 4 gene (Asp299Gly) polymorphism associates with carotid artery elasticity, the cardiovascular risk in young Finns study. *Atherosclerosis* 198 (2008) 152-159.
- 45 Werner Koch, Petra Hoppmann, et al. Toll-like receptor 4 gene polymorphism and myocardial infarction; no association in a Caucasian population. *Eur Heart J* 2006;27: 2524-2529.
- 46 Bjorkbacka H, Halmen K, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways. *Nat Med* 2004; 10: 416-421.
- 47 Vink A, Schoneveld AH, et al. In vivo evidence for a role of toll like receptor 4 in the development of intimal lesions. *Circulation* 2001; 106:1985-1990.
- 48 Ameziane N, Beillat T, et al. Association of the toll-like receptor 4 gene Asp299Gly with acute coronary events. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:e61-e64.
- 49 Zee R, Hegener H, et al. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke* 2005;36: 154-157.
- 50 Balistreri CR, Candore G, et al. Role of toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA* 2004; 292:2339-2340.
- 51 Morange PE, Tiret L, et al. TLR4/Asp299Gly CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: the PRIME study. *Eur J Hum Genet* 2004; 12:1041-1049.
- 52 Boekholdt SM, Agema W, et al. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation* 2003; 107:2416-2421.
- 53 Kielch S, Lorenz E, et al. Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N Engl J Med* 2002; 347:185-192.
- 54 Yang IA, Holloway J, et al. TLR4 Asp299Gly polymorphisms is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis* 2003;170:187-190

- 55 Ye Z, Liu E, et al. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: metaanalysis of 66155 cases and 91307 controls. *Lancet* 2006;367:651-658.
- 56 Hashimoto C, Hudson KL, et al. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988; 52:269-279.
- 57 Hoffman JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003;426:33-8.
- 58 Rock FL, Hardiman G, et al. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-593.
- 59 Medzhitov R, Preston P, et al. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7
- 60 Niessner A, Shin M. Synergic proinflammatory effects of the antiviral cytokine interferon-alpha and toll-like receptor 4 ligands in the atherosclerotic plaque. *Circulation* 2007;116:2043-2052.
- 61 Shinohara M, Hirata K, et al. Local expression of toll-like receptors at the vessel wall induces atherosclerotic lesion formation; Synergism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:2384-2391.
- 62 Brunn G, Miller R, et al. In vivo effects of lipopolysaccharide and TLR4 on platelet production and activity. Implications for thrombotic risk. *J Appl Physiol* 2007;102:429-433.
- 63 Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B. (2000). Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). *Genome Biol.* 1: RESEARCH002.
- 64 Foo Y, Damo Xu, Elizabeth K, et al. Negative Regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses. *Nature* 2005; 5: 446-458.
- 65 Ferwerda B, et al. (2007) TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 104:16645-50.
- 66 Smirnova I, Hamblin MT, McBride C, et al. (2001) Excess of rare amino acid polymorphisms in the Toll-like receptor 4 in humans. *Genetics* 158:1657-64.
- 67 Arbour NC, et al (2000) TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet.* 25:187-91.
- 68 Enquobahrie D, et al. Cholesterol Ester Transfer Protein, Interleukin , Peroxisome Proliferator Activator Receptor Alpha and Toll-Like Receptor 4 Genetic Variations and Risk of Incident Non-Fatal Myocardial Infarction and Ischemic Stroke. *Am J Cardiol.* 2008 June 15; 101(12):1683-1688.
- 69 Miller A. 1988. A single salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid Res* 16: 1215-1217.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTE (Investigación genética)

TITULO: “Genética de la Enfermedad Arterial Coronaria”

Investigadores principales: Dr. José Manuel Fragoso Lona, Dr. Gilberto Vargas Alarcón,
Dr. Jesús Erick Cruz Martínez.

Propósito y Descripción:

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

El objetivo de este estudio genético incluye:

- Identificar las razones genéticas del porque, personas como usted, padecen enfermedad de las arterias del corazón, y otras se encuentran clínicamente sanos.

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

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

Procedimientos

El ADN será separado y analizado de su muestra de sangre. El ADN podrá ser almacenado o utilizado por el Departamento de Biología Molecular. Su muestra será codificada de acuerdo al número que se le asigne en el estudio. Cualquiera que tenga acceso a su muestra de ADN, sus resultados o su análisis, no tendrá acceso a su nombre.

Iniciales del paciente _____

Número del paciente _____

Riesgos Físicos

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

Riesgos de la Información

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

Beneficios

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

Confidencialidad

El material genético obtenido de su sangre, será almacenado bajo la dirección del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” en un lugar seguro. El uso de su material genético, datos e información relacionada al protocolo será limitado a los investigadores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”. El uso de su material estará limitado a los propósitos mencionados anteriormente.

Iniciales del paciente _____

Número del paciente _____

Declaración Voluntaria

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

PACIENTE	<input type="text"/>		
	Nombre del paciente		
	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Firma del paciente o de su representante legal	<i>d d</i>	<i>m m m a a</i> Fecha
INVESTIGADOR	<input type="text"/>		
	Firma de la persona que obtiene el Consentimiento Informado		
	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Firma de la persona que obtiene el Consentimiento Informado	<i>d d</i>	<i>m m m a a</i> Fecha
TESTIGO 1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	Nombre	Dirección	
	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Relación con el paciente	Firma	<i>d d</i> <i>m m m a a</i> Fecha
TESTIGO 2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	Nombre	Dirección	
	<input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/>	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
	Relación con el paciente	Firma	<i>d d</i> <i>m m m a a</i> Fecha