



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

**Expresión del Receptor Adenovirus-Coxsackievirus
(CAR) identificado por RT-PCR en tiempo real en tejido
endomiocárdico de pacientes con miocarditis**

**TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN CARDIOLOGÍA**

PRESENTA:
DR. ANIBAL EDUARDO CRUZ MONTALVO

TUTOR:
DR. EDUARDO GARCÍA BECERRIL



MÉXICO, D. F.

NOVIEMBRE 2015



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.

INDICE DE CONTENIDOS

Resumen.	3
Marco teórico.	4
Pronóstico de la miocarditis.	7
Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR).	8
Justificación.	15
Planteamiento del problema.	17
Objetivos.	19
Hipótesis de trabajo.	20
Material y métodos.	21
1. Lugar donde se realizó el estudio.	21
2. Diseño de la Investigación.	21
3. Diseño de la muestra.	21
4. Tamaño de muestra.	26
5. Definición y clasificación de las variables.	27
6. Métodos.	34
7. Análisis estadístico de los datos.	39
Aspectos Éticos.	40
Aspectos de bioseguridad.	41
Resultados.	44
Discusión.	48
Conclusiones.	52
Referencias bibliográficas.	53
Anexos.	59

Resumen.

La miocarditis es una patología con gran espectro clínico, que va desde cursar asintomática hasta cursar con falla cardíaca fulminante. La miocarditis se encuentra subdiagnosticada debido a su amplio espectro clínico, se estima una prevalencia de 1-9 % y una incidencia de 0.46-0.72 por 100,000 personas al año. Su principal causa etiológica es viral, siendo Adenovirus, Enterovirus (incluyendo Coxsackievirus), Parvovirus B-19 y Virus Herpes Humano 6 los más comúnmente identificados (dependiendo la población estudiada y los tiempos en que fueron llevados a cabo dichos estudios). Afecta principalmente a pacientes jóvenes, por lo que su progresión a un grado más severo: miocardiopatía dilatada (MCD) y/o la muerte representa un gran impacto. Hasta el 21% de los pacientes evolucionan a MCD, lo cual traduce deterioro de la calidad de vida e incapacidad física a una edad económicamente activa. El Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) es un receptor común para el tipo de virus Coxsackie B y adenovirus. El gen de CAR se ha localizado en el cromosoma 21q11.2. El receptor CAR es una proteína transmembrana de la superfamilia de Ig que se localiza en los complejos de unión que se producen entre las células endoteliales y células epiteliales. Se requiere la expresión de CAR para la entrada del virus en las células, además ha sido recientemente implicada en la remodelación cardíaca y la conducción eléctrica auriculoventricular. La expresión de CAR es muy baja en el corazón normal, sin embargo estudios en humanos han encontrado sobreexpresión de CAR en pacientes con MCD.

A nivel mundial solo hay cuatro estudios realizados, todos en pacientes con MCD, no se incluyen pacientes con miocarditis activa, en estos se han documentado niveles de sobreexpresión de CAR en comparación con sujetos sanos. De igual manera, pacientes con miocardiopatía isquémica presentan sobre-expresión de CAR, no existiendo diferencia respecto a la edad o género, ni mutaciones de CAR entre los grupos de estudio. Además se ha sugerido la realización de estudios para correlacionar el grado de positividad de CAR con severidad de la enfermedad.

El objetivo de este estudio fue determinar si hay diferencia en los niveles de Expresión del Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) en muestras de tejido endomiocárdico de pacientes con diferentes espectros de miocarditis y evaluar la relación entre los niveles de expresión y la severidad de la enfermedad.

Se estudiaron un total de 26 individuos, 16 con miocarditis activa y 10 con miocarditis limítrofe, así como 10 individuos normales y sin factores de riesgo para miocarditis. De todos los pacientes se cuenta con su historia clínica y con una muestra de biopsia endomiocárdica, las cuales se encuentran embebidas en parafina y que fueron obtenidas con fines de diagnóstico. De estas muestras de tejido endomiocárdico se extrajo el RNA para determinar el grado de expresión de CAR por la técnica de RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR). La expresión relativa de CAR fue calculada utilizando la expresión de CAR y el nivel de gen *GAPDH* determinado para cada muestra. Para la cuantificación relativa se usó el análisis avanzado (cuantificación relativa avanzada), por eficiencia.

Marco teórico.

La miocarditis es la inflamación del músculo cardíaco que puede ser identificada por criterios clínicos o histopatológicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define miocarditis en 1995 como la enfermedad inflamatoria del músculo cardíaco, diagnosticada en biopsia endomiocárdica (EMB) por criterios histológicos, inmunológicos e inmunohistoquímicos establecidos.

Las manifestaciones clínicas varían ampliamente desde cambios asintomáticos en el electrocardiograma hasta falla cardíaca fulminante; arritmias, bloqueos cardíacos y síndromes que asemejan al infarto agudo del miocardio pueden estar presentes. Una variedad afortunadamente poco frecuente es la “*fulminante*”, de etiología viral, presenta infiltrado linfocítico y tiene una rápida progresión clínica hasta el choque cardiogénico, presenta una mortalidad superior al 80% (1).

La miocarditis se encuentra subdiagnosticada debido a su amplio espectro clínico, por lo que es difícil estimar su incidencia; sin embargo se estima que en México se presenta un caso por cada 1000 ingresos/año (2). En población europea tiene una incidencia del 0.12 al 12% en autopsias de población general (3); además se ha identificado en 8.6 a 12% de los casos de muerte súbita en adultos jóvenes (4), incluso alcanzando hasta el 20% en casos de muerte súbita en atletas jóvenes (5). De forma general se estima una prevalencia de 1-9 % y una incidencia de 0.46-0.72 por 100,000 personas al año.

El mayor porcentaje de pacientes permanece asintomático y/o con síntomas leves, lo cual favorece el subdiagnóstico. Las manifestaciones más frecuentes son: disnea 72%, dolor torácico 32% y arritmias 18% (6).

La miocarditis puede ser causada por una variedad de enfermedades infecciosas y no infecciosas, siendo las de origen infeccioso viral las más frecuentes (7). Puede existir coinfección (25% casos), lo cual se sabe modifica aún más la respuesta inmunológica del paciente favoreciendo así mayor remodelación cardíaca (8). En la Tabla 1 se resumen los virus más frecuentemente aislados en estudios realizados contemporáneamente.

Tabla 1. Principales agentes etiológicos en la miocarditis viral.

Estudio	País	Genoma viral / Muestra *	Distribución de genoma viral (%)
2001-2003 Kühl, Circulation. 2005; 111: 887-893 (9).	Alemania	165 / 245	PVB19: 126 (51.4%) HHV-6: 53 (21.6%) EV: 23 (9.4%) ADV: 4 (1.6%) EBV: 5 (2.0%) CMV: 2 (0.8%)
1988-2000 Bowles, J Am Coll Cardiol 2003; 42: 466-72 (10).	Estados Unidos	239 / 624	ADV: 142 (23%) EV: 85 (14%) CMV: 18 (3%) PVB19: 6 (<1%) IAV: 5 (<1%) HSV: 5 (<1%) EBV: 3 (<1%) RSV: 1 (<1%)
1994-2007 Kindermann, Circulation. 2008; 118: 639-648 (11).	Alemania	79 / 181	PVB19: 52 (28.7%) HHV-6: 20 (11.0%) EV: 11 (6.1%) EBV: 6 (3.3%) ADV: 4(2.2%)
2002-2005 Breinholt, J Heart Lung Transplant 2010; 29: 739-746 (12).	Estados Unidos	121 / 700	ADV: 1 (0.8%) CMV: 3 (2.5%) PVB19: 100 (82.6%) EBV: 24 (19.8%)
<p>* La tercera columna resume el número de muestras en las cuales fue posible el aislamiento de un agente viral con respecto al número total de muestras procesadas</p> <p>PVB19: Parvovirus B19, EV: Enterovirus, ADV: Adenovirus, CMV: Citomegalovirus, HHV-6: Virus Herpes 6, EBV: Virus Epstein-Barr , IAV: Virus Influenza A, HSV: Virus Herpes Simple, RSV: Virus Sincitial Respiratorio</p>			

Un punto importante de señalar en cuanto a la etiología viral es que dependiendo de la población, geografía, idiosincrasia, e incluso el periodo de estudio, se tiene distinta prevalencia. La prevalencia de Coxsackievirus en pacientes con miocarditis activa varía de 14-32.6%, Adenovirus de 8.1-23%, Parvovirus B19 de <1-36.6% y Virus Herpes Humano 6 de 10.5% (8). En América del Norte y Europa Occidental, los virus más frecuentemente identificados fueron enterovirus (incluyendo el virus Coxsackie) hasta la década de 1990. En estudios publicados recientemente el Parvovirus B-19 y Virus Herpes Humano 6 son los virus que se encuentran con mayor frecuencia. En población mexicana dicha prevalencia no ha sido abordada de forma sistemática, por lo que no podríamos aseverar una mayor asociación con Parvovirus B19. En este sentido y para una correcta tipificación viral, técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la hibridación *in situ*, permiten la detección directa de los genomas virales en los corazones de los pacientes con miocarditis aguda y miocardiopatía dilatada.

Fisiopatológicamente la miocarditis viral se suele dividir en 4 fases: Fase 0 o Preinfección (Factores que determinan susceptibilidad a infección viral), Fase 1 o Aguda (3-4 días, caracterizada por replicación activa del virus vivo dentro del miocardio), Fase 2 o Subaguda (5-15 días, caracterizada por respuesta inmunológica del huésped con persistencia del genoma viral en ausencia de replicación viral detectable) y Fase 3 o Crónica (más de 1 mes; caracterizado por remodelación miocárdica en ausencia de replicación viral o genoma viral) (13).

Los factores que determinan susceptibilidad para infección viral del corazón y el desarrollo de cardiomiopatía no son completamente conocidos, sin embargo se han identificado algunos factores predisponentes, dentro de los que destacan: el

género masculino, la inmunosupresión, ya sea humoral o celular, así como la desnutrición, el embarazo y la deficiencia de selenio. Estudios genéticos en humanos con miocarditis son escasos, sin embargo, en dos reportes se ha demostrado una asociación entre miocarditis y factores genéticos tales como locus HLA-DQ y polimorfismos CD45.

La biopsia endomiocárdica es el “estándar de oro” de las pruebas diagnósticas en la miocarditis, al permitir cuantificar células inflamatorias y el grado de necrosis que se ha producido. Ambas condiciones deben estar presentes de acuerdo a los Criterios de Dallas para considerarse miocarditis concluyente, pues cuando sólo está presente una se cataloga como miocarditis limítrofe (miocarditis borderline). Debido a que las zonas de miocarditis pueden ser heterogéneas en la pared miocárdica, se deben tomar varias biopsias (se recomiendan 18 muestras como mínimo) para poder tener una sensibilidad del 80% (14). El riesgo de perforación miocárdica, al igual que la muerte es <1% (15).

Pronóstico de la miocarditis.

Esta patología tiene un buen pronóstico en el 76% de los casos a 6 meses; pero en seguimientos a 3 años, el 21% desarrollará miocardiopatía dilatada con insuficiencia cardíaca. En la Tabla 2 se enumeran factores predictores de mortalidad (16-18).

Tabla 2. Factores predictores de mortalidad en Miocarditis aguda.

1. Síncope no demostrable por otra causa.
2. Disfunción ventricular derecha.
3. Hipertensión arterial o venosa pulmonar (mPAP >25 o PCWP >15)
4. Clase funcional de la NYHA avanzada (III-IV).
5. Hipotensión sistólica, diastólica y PAM baja.
6. Taquicardia.
7. QRS \geq 120 ms.
8. Niveles elevados de Fas, Fas ligando, TNF, IL-10.
9. Signos inmunohistológicos de inflamación (CD3 y/o CD68).
10. Tratamiento sin beta-bloqueadores.

NYHA: New York Heart Association, PAM: presión arterial media, TNF: factor de necrosis tumoral, mPAP: Presión arterial pulmonar media, PCWP: Presión de enclavamiento capilar pulmonar

Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR).

La comprensión de la patogenia de la miocarditis viral se ha dado a partir de modelos experimentales de infección aguda por virus Coxsackie B. El cambio inicial es el daño de los miocitos en ausencia de una respuesta inmune celular (19). La entrada viral al miocito está mediada por receptores de superficie celular. El Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) es un receptor común para el tipo de virus Coxsackie B y para los subgrupos de adenovirus A, C, D, E, y F. El gen de CAR se ha localizado en el cromosoma 21q11.2 (20) y se designa como CXADR. Siete exones han sido reportados para el gen en humanos (21). Con raras excepciones, se requiere la expresión de CAR para la entrada del virus en las

células. Co-receptores, incluyendo el factor acelerador de degradación (DAF, CD55) para algunas cepas de virus Coxsackie B y las integrinas, ayudan a determinar la eficacia de la infección.

El receptor CAR es una proteína transmembrana de la superfamilia de Ig que se localiza en los complejos de unión que se producen entre las células endoteliales y células epiteliales (principalmente en las uniones intercelulares de las células epiteliales).

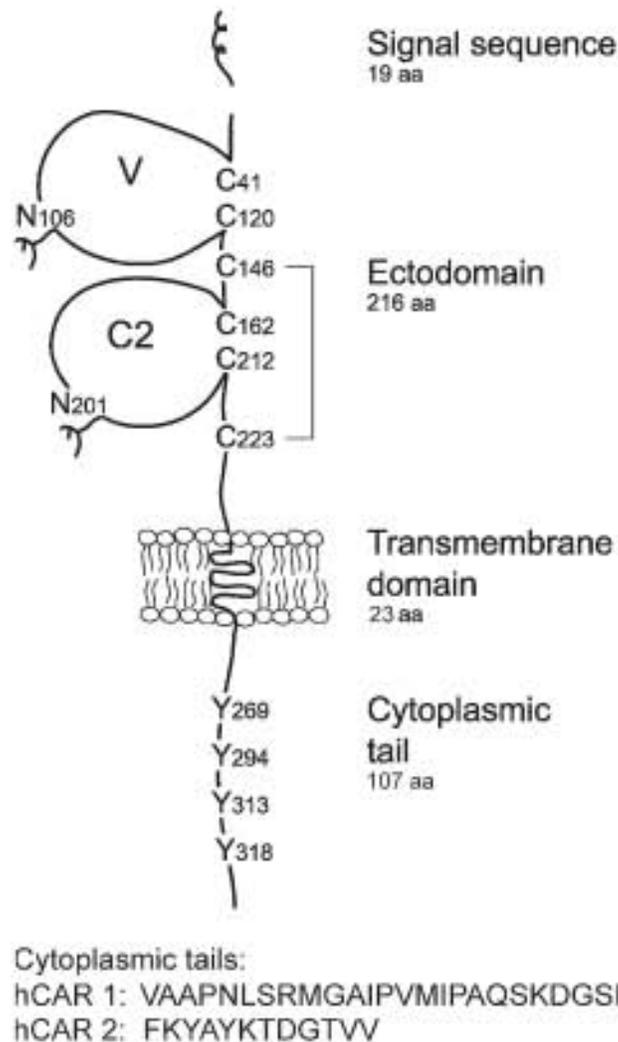
El mRNA completo de CAR codifica una estructura de 365 aminoácidos con una secuencia guía corta (19 residuos), un dominio extracelular de 216 residuos, un dominio transmembrana de 23 aminoácidos, y dependiendo del empalme alternativo, una cola citoplasmática de 94 a 107 residuos. Por lo menos dos proteínas CAR carboxilo-terminal diferentes han sido identificadas y se refieren como hCAR1 y hCAR2 para los humanos. La proteína madura tiene una masa molecular de aproximadamente 38 kDa (hCAR1). Es una proteína con dos dominios extracelulares similares a Ig localizados en la mitad N-terminal de la proteína, una única hélice que abarca la membrana, y una cola citoplasmática C-terminal (22,23) (Figura 1).

El receptor CAR, como una proteína de unión estrecha de los discos intercalados, ha sido recientemente implicada en la remodelación cardíaca y la conducción eléctrica entre aurículas y ventrículos (24,25); su expresión aberrante ha sido objeto de estudio en enfermedades cardíacas (26) y no cardíacas, en estas últimas se ha atribuido un papel importante como regulador de cáncer, funcionando como promotor o supresor de tumores, dependiendo de la estirpe tumoral en cuestión

(27). Este es expresado a niveles altos en el cerebro y el corazón con un pico perinatal, de modo que después del nacimiento los niveles de CAR disminuyen con la edad. La deficiencia de CAR resulta en letalidad embrionaria a la mitad del desarrollo, con edema pericárdico que se relaciona con la organización alterada de miofibrillas e incremento en la proliferación de cardiomiocitos (28-30). En los humanos, esta proteína es expresada en el corazón, así como en el músculo, páncreas, testículos y próstata, y en algunos grados, en muchos otros tejidos (23). CAR interactúa con proteínas implicadas en la formación de comunicaciones celulares, endocitosis y transducción de señales (31) (Figura 2). Forma homodímeros y heterodímeros a través de los dominios Ig extracelulares y, recientemente, se demostró que forma un complejo proteínico con β -catenina, ZO-1 (zona occludens 1) y la proteína de unión gap Cx45.

Desde que se identificó CAR, múltiples han sido los estudios realizados encaminados a conocer sus características e implicaciones fisiológicas, la gran mayoría de ellos llevados a cabo en animales. Su estudio en humanos es menor, probablemente atribuido a las implicaciones éticas del mismo. La expresión de CAR es muy baja en el corazón normal, sin embargo se ha observado sobreexpresión en corazón de pacientes con miocardiopatía dilatada, así como en casos de cardiopatía isquémica. No hay estudios acerca de la expresión de CAR en pacientes con miocarditis, solo algunos casos forman parte de la muestra final de protocolos en miocardiopatía dilatada (MCD). En los siguientes párrafos resumimos cuatro protocolos destinados a conocer la expresión de CAR.

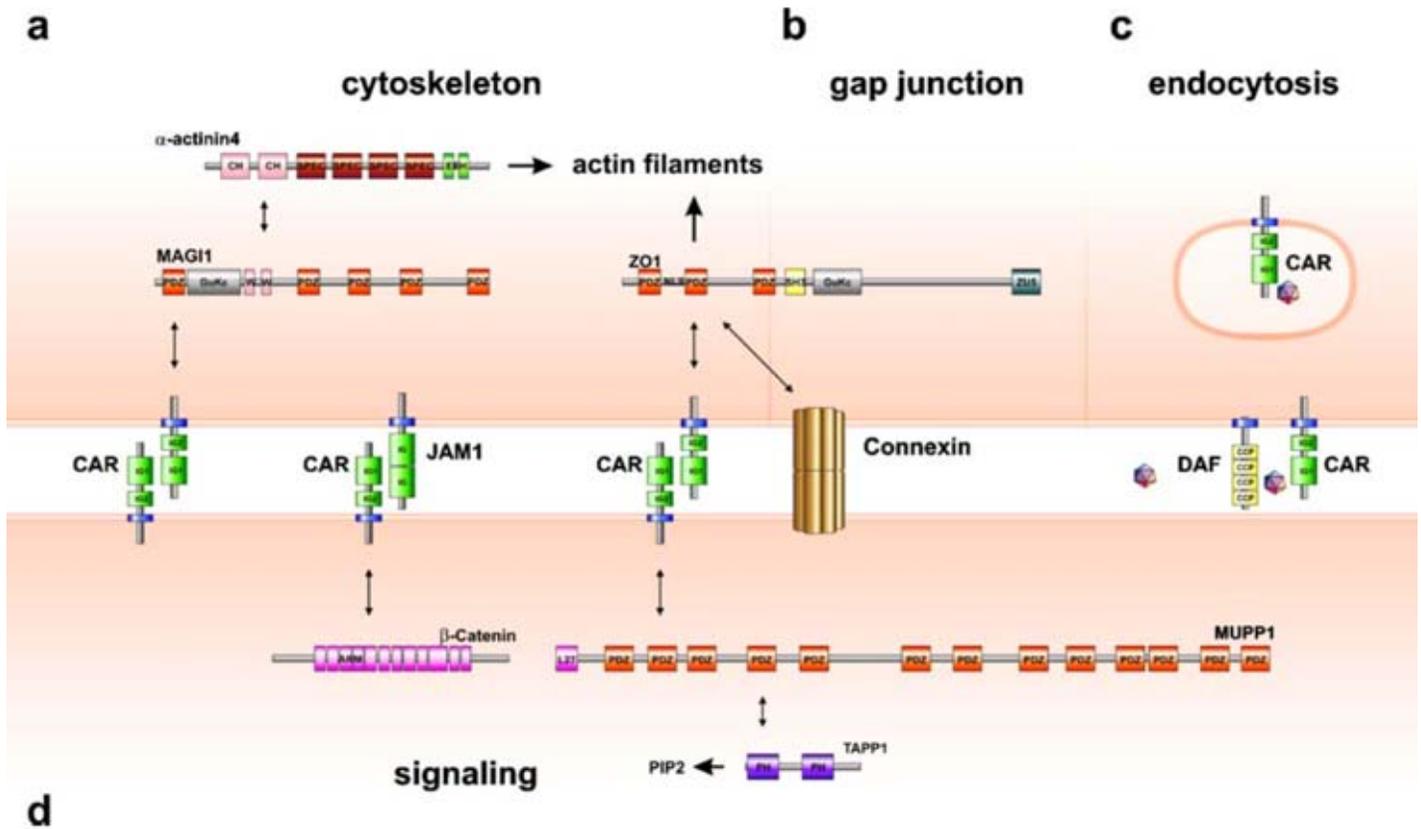
Figura 1. Estructura esquemática de la proteína hCAR1.



El dominio extracelular consiste en dos bucles Ig (D1 y D2), uno de tipo variable (V, formado entre Cys41 y Cys120) y uno de tipo constante (C2, abarcando de Cys162 a Cys212). El dominio D2 contiene un puente disulfuro extra formado entre Cys146 y Cys223 no típico de un dominio Ig similar a C2. La numeración se refiere a todo el marco de lectura abierto. Empalmes alternativos resultan en diferentes secuencias C-terminal para hCAR1 and hCAR2.

Qiang Liu y cols (32) realizaron un estudio del año 2009 al 2011 cuyo objetivo fue investigar la correlación entre infección viral persistente y función cardiaca en pacientes con MCD. Reclutaron un total de 80 pacientes (50 con MCD y 30 controles), determinaron niveles de expresión de CAR y RNA de Coxsackievirus

Figura 2. Funciones atribuidas a CAR.



a. CAR puede heterodimerizarse u homodimerizarse a través de los dominios Ig extracelulares. La cola citoplásmica interactúa con diversas proteínas del dominio PDZ, entre ellos ZO-1 y guanilato quinasa asociada a la membrana, WW, y MAGI1 que se une al conjunto de filamentos de actina. La interacción con ZO-1 implica el segundo dominio PDZ. **b.** Este dominio también media la interacción entre la cola citoplásmica de CAR y conexasinas para modular la actividad de las uniones gap. **c.** CAR puede mediar la unión y captación de Adenovirus y Coxsackievirus. Este proceso requiere la interacción con la maquinaria endocítica (no mostrado) y correceptores. Para Coxsackievirus, este correceptor es el DAF / CD55. **d.** Enlaces para transducción de señales incluyen la interacción de CAR con β -catenina y MUPP1. Este último se relaciona a la señalización de PIP2 a través de TAPP-1. Las interacciones se muestran con flechas de doble punta.

en la superficie de leucocitos usando citometría de flujo y RT-PCR, respectivamente. En los pacientes con MCD 44% fueron positivos para RNA de Coxsackievirus y en 20% para los controles; los niveles de expresión de CAR en pacientes con RNA viral positivo fue mayor respecto a pacientes con RNA negativo. Dicho estudio tiene como desventajas el haber medido expresión de

CAR en la superficie celular de los componentes de la fórmula blanca y no en tejido miocárdico, además de haber utilizado un método cualitativo para su análisis.

Eniko Tatrai, et al (21) reunió 45 casos (16 con MCD, 2 con miocardiopatía inflamatoria, 17 con miocardiopatía isquémica y 10 controles) en un periodo de 2005-2008, valoró la expresión de mRNA CAR y buscó posibles mutaciones del gen *CAR*. Los pacientes con MCD y miocardiopatía isquémica presentaron sobreexpresión de CAR con respecto a los controles; así mismo los pacientes con miocardiopatía no inflamatoria mostraron mayor nivel de mRNA que controles pero menor que los otros dos grupos; no encontró diferencia en la expresión de CAR relacionado a la edad o género, ni mutaciones de *CAR* entre sus grupos de estudio. Este trabajo tiene como desventaja que las muestras de miocardio fueron obtenidas de pacientes sometidos a transplante cardiaco por lo que traduce un estadio tardío de la enfermedad basal, con solo 2 muestras de pacientes con inflamación activa; a su favor el hecho de analizar la expresión de CAR por medio de PCR en tiempo real.

Kaur Tripta y cols (33) determinaron la expresión de CAR en tejido miocárdico de pacientes con MCD y su localización celular, para ello reunieron 26 muestras histológicas de miocardiopatía dilatada y 20 controles. Para determinar la localización celular de CAR utilizaron anticuerpos policlonales de conejo específicos para CAR utilizando como controles tejido de adenocarcinoma prostático. Para cuantificar el nivel de expresión de CAR se realizó RT-PCR. Concluyen que el nivel de expresión de mRNA CAR fue mayor en pacientes con MCD comparado con el grupo control, además sugieren la realización de estudios

para correlacionar el grado de positividad de CAR con severidad de la enfermedad. En general tiene como desventaja la medición de CAR a través de un método cualitativo, aunado a solo contar con 3 casos de miocarditis activa.

Y, finalmente, Volker Ruppert, et al (34) analizaron la expresión de CAR en biopsias de pacientes con MCD (42 muestras) respecto a controles (24 muestras) utilizando qRT-PCR. Sus datos obtenidos confirmaron una sobre-expresión de CAR miocárdico en pacientes con MCD pero generalmente ausente en sujetos controles con función ventricular izquierda conservada; no encontraron asociación entre títulos de anticuerpos séricos contra virus y la expresión CAR. Dentro de los puntos a favor de dicho protocolo es la utilización de un método cuantitativo para medir la expresión de CAR, desafortunadamente no se realizó una extrapolación de dichos resultados a la expresión clínica de la enfermedad.

Como ya se analizó ampliamente, los estudios en relación a la expresión de CAR realizados en humanos se han llevado a cabo en el contexto de miocardiopatía dilatada, la cual es la fase final de cardiopatías de origen isquémico o inflamatorio, por lo tanto puede ser considerada, en algunos casos, como la etapa final de la evolución del espectro clínico de la enfermedad. El número de casos de miocarditis en los cuales se ha analizado el nivel de expresión de CAR asciende a 11 a nivel mundial, además no se ha analizado en los diversos espectros de la enfermedad desde el punto de vista histológico (miocarditis activa y miocarditis limítrofe) e incluso clínico tomando en cuenta el tiempo de evolución; esto aunado al hecho de que en ninguno de los estudios previos se ha intentado hacer una traducción clínica de dichos hallazgos, solo en uno se ha sugerido la posible asociación del grado de expresión de CAR con la severidad de la enfermedad.

Justificación.

La miocarditis es una patología con gran espectro clínico, que va desde cursar asintomática hasta cursar con falla cardíaca fulminante. Su incidencia estimada en México es de 1/1,000 ingresos/año (2) (INCICH). Afecta principalmente a pacientes jóvenes, económicamente activos, por lo que su progresión a miocardiopatía dilatada y/o la muerte representa un gran impacto.

En México no hay estudios encaminados a determinar características moleculares que pudieran tener implicación en el curso de la enfermedad. Como precedente, en el Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez se realizó un estudio que comprendió el periodo de 1992 a 2003 cuyo objetivo fue revisar la incidencia y el enfoque de estudio de la miocarditis (2). Este ha sido hasta el momento el único intento por caracterizar a pacientes con dicha patología.

El Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) es una proteína transmembrana de la superfamilia de Ig que recientemente ha sido implicada en funciones de unión al citoesqueleto, regulación de uniones gap, fijación y endocitosis viral, así como en transducción de señales; teniendo efecto clínico en la remodelación cardíaca y la conducción eléctrica entre aurículas y ventrículos. La expresión de CAR es muy baja en el corazón normal, sin embargo su expresión aberrante ha sido objeto de estudio en enfermedades cardíacas, se ha observado una sobre-expresión en el corazón de pacientes con miocardiopatía dilatada, así como en casos de cardiopatía isquémica; en miocarditis viral se desconoce su comportamiento. Estudiar la expresión de CAR es de relevancia y de potencial valor clínico, su

expresión en miocarditis puede tener implicación en la susceptibilidad a padecer la enfermedad y posteriormente en la expresión clínica y evolución de la misma.

A nivel mundial, la mayoría de los estudios respecto a CAR se han realizado en pacientes con MCD (21,32-34). Además, solo en uno de ellos se ha sugerido que la expresión de CAR podría implicarse con el grado de severidad de la enfermedad (33). Sin embargo hasta el momento no hay estudios de la expresión de CAR en humanos con miocarditis activa; por lo que en este estudio se intentó determinar si hay diferencias en el grado de expresión y si esto se asocia con la severidad de la enfermedad.

Planteamiento del problema.

La miocarditis es una patología con gran espectro clínico, que va desde cursar asintomática hasta cursar con falla cardiaca fulminante. Afecta principalmente a pacientes jóvenes, económicamente activos, por lo que su progresión a miocardiopatía dilatada y/o la muerte representa un gran impacto.

El Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR), una proteína transmembrana de la superfamilia de Ig, ha sido implicada en la remodelación cardiaca y la conducción eléctrica aurículo-ventricular. La expresión de CAR es muy baja en el corazón normal, sin embargo se ha observado una sobre-expresión en miocardiopatía dilatada, así como en cardiopatía isquémica; aunque se desconoce con exactitud su comportamiento en miocarditis activa.

Por otra parte, de los estudios realizados en relación a la expresión de CAR en humanos, solo suman 11 casos de pacientes con miocardiopatía inflamatoria/ miocarditis a nivel mundial (21,33,34). En México no se han hecho protocolos al respecto. El propósito del presente estudio fue buscar posibles diferencias en la expresión del receptor CAR lo cual pudiese tener implicación en la susceptibilidad a padecer la enfermedad y posteriormente en la expresión clínica y evolución de la misma, e incluso en su respuesta terapéutica.

Con base a lo anterior, el presente estudio se centró en contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Hay diferencia en la expresión de CAR en muestras de tejido endomiocárdico procedentes de pacientes con diagnóstico de miocarditis de acuerdo a los criterios de Dallas, en comparación con grupos controles?
2. ¿Existe relación entre los niveles de expresión de CAR y la severidad de la enfermedad?

Objetivos.

Determinar si hay diferencia en los niveles de Expresión del Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) en muestras de tejido endomiocárdico de pacientes con diferentes espectros de la miocarditis y evaluar la relación entre los niveles de expresión y la severidad de la enfermedad.

Objetivos específicos.

1. Evaluar los niveles de expresión de CAR por qRT-PCR en muestras de biopsia endomiocárdica preservadas en parafina procedentes de pacientes con diagnóstico histopatológico de miocarditis definitiva y en pacientes con miocarditis limítrofe, así como en pacientes con miocardio histológicamente normal
2. Comparar el grado de expresión de CAR en tejido miocárdico sano *versus* miocardio con hallazgos histológicos de miocarditis
3. Evaluar si los niveles de expresión de CAR en pacientes con miocarditis se relacionan a un grado más severo de la enfermedad
4. Describir las características clínicas de los pacientes con miocarditis así como su comportamiento clínico al momento del diagnóstico y en su seguimiento

Hipótesis de trabajo.

H0: No hay diferencia en la expresión de CAR en pacientes con miocarditis en comparación con grupos controles

H1: Existe una mayor expresión de CAR en pacientes con miocarditis comparado con grupos controles

H0: No existe relación entre los niveles de expresión de CAR y la severidad de la enfermedad

H1: Mayores niveles de CAR se relacionan con el desarrollo de miocarditis y niveles aún más altos con severidad de la enfermedad

Material y métodos.

1. Lugar donde se realizó el estudio.

El estudio se llevó a cabo en el Hospital de Cardiología del Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN-SXXI con muestras de tejido endomiocárdico disponibles en el Departamento de Patología. Para su procesamiento recibimos el apoyo de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Instituto Mexicano del Seguro Social, CMN-SXXI.

2. Diseño de la Investigación.

2.1 Tipo de estudio

- a) Por el control de la maniobra: Observacional
- b) Por la captación de la información: Retrolectivo
- c) Por la medición del fenómeno en el tiempo: Transversal
- d) Por la presencia de un grupo control: Comparativo.
- e) Por la dirección del análisis: Efecto a causa.

2.2 Diseño

Estudio básico de casos y controles.

3. Diseño de la muestra.

3.1 Poblaciones de estudio. La población en estudio se constituye por pacientes de cualquier género, con edad mayor de 18 años, los cuales son

derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social y fueron valorados y diagnosticados con Miocarditis en el Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI de acuerdo a los hallazgos histológicos de biopsias endomiocárdicas. A su vez estos fueron clasificados en subgrupos: 1) pacientes con miocarditis activa (de acuerdo a criterios de Dallas), 2) pacientes con miocarditis limítrofe, o también considerada borderline (de acuerdo a criterios de Dallas), y 3) grupo control, muestras de tejido endomiocárdico considerados normales desde el punto de vista histológico, sin datos histológicos de cardiopatía inflamatoria o isquémica. De todos los pacientes se cuenta con sus historias clínicas y resultados de laboratorio y gabinete. Además se encuentran en vigilancia y seguimiento por la consulta externa de nuestro hospital.

En el Departamento de Patología de nuestro hospital existe registro físico del análisis de biopsias endomiocárdicas realizadas, así como el banco de muestras incluidas en parafina de dichas biopsias. Cabe mencionar que dichas biopsias se realizaron en el contexto clínico para lograr un diagnóstico definitivo, por lo que previamente se firmó un consentimiento informado por dichos pacientes, y en el contexto de nuestra investigación se firmó un nuevo consentimiento para su utilización.

Posteriormente se revisaron los expedientes clínicos correspondientes a los pacientes de las muestras seleccionadas de acuerdo a los criterios de inclusión, con el objetivo de obtener datos correspondientes al grado de severidad de la presentación clínica.

Todos nuestros pacientes se encuentran en seguimiento en la consulta externa de nuestro hospital, la cual es encabezada por el grupo de médicos adscritos a la Clínica de Insuficiencia Cardíaca. A todos se les realiza una valoración clínica integral al mes y posteriormente cada 3-4 meses, incluyendo la realización de ecocardiograma de control a intervalos de 4-6 meses.

3.2 Muestra. Las muestras de biopsia endomiocárdica de los pacientes se encontraban disponibles en el Departamento de Patología del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, incluidas en parafina para su preservación. De todos los pacientes se tomaron biopsias que se utilizaron para el diagnóstico clínico de la entidad. La presencia de miocarditis fue diagnosticada por criterios morfológicos histológicos a través de microscopía óptica y electrónica de acuerdo a los Criterios de Dallas, así como determinación de marcadores inmunohistoquímicos.

3.3 Grupos de estudio. Para su análisis las muestras se clasificaron en tres grupos:

- a) **Grupo con miocarditis activa:** muestras de pacientes que fueron clasificados como hallazgos compatibles con miocarditis activa.
- b) **Grupo con miocarditis limítrofe:** muestras de pacientes que fueron clasificados como hallazgos compatibles con miocarditis limítrofe.

- c) **Grupo control:** muestras de miocardio de pacientes que fueron sometidos a biopsia endomiocárdica por cualquier motivo y en quienes el estudio histopatológico no es compatible con miocarditis, o bien, muestras de miocardio procedentes de autopsias en cuya conclusión histopatológica fue considerado como normal.

3.4 Criterios de selección

3.4.1 Criterios de inclusión para la muestra.

1. Hombres y mujeres de edad mayor o igual a 18 años con diagnóstico de miocarditis por criterios histológicos e inmunohistoquímicos en muestras de biopsia endomiocárdica
2. La toma de muestra se realizó durante el inicio del horizonte clínico de la enfermedad.
3. Derechohabiente al Instituto Mexicano del Seguro Social.
4. Pacientes con expediente clínico completo de acuerdo a los datos necesarios para el análisis de nuestro estudio

3.4.2 Criterios de inclusión para los pacientes con miocarditis activa

1. Iguales que los criterios de inclusión para la muestra en los incisos 1 a 4.
2. Haber sido clasificado **con** miocarditis activa.

3.4.3 Criterios de inclusión para los pacientes con miocarditis limítrofe

1. Iguales que los criterios de inclusión para la muestra en los incisos 1 a 4.
2. Haber sido clasificados **con** miocarditis limítrofe.

3.4.4 Criterios de inclusión para los controles

1. Hombres y mujeres de edad mayor a 18 años con muestras de miocardio realizadas por biopsia o autopsia en los cuales se concluyó histología del miocardio normal
2. Iguales que los criterios de inclusión para la muestra en los incisos 3 y 4.

3.4.5 Criterios de exclusión y eliminación.

Los criterios de exclusión y eliminación considerados fueron los siguientes (estos criterios aplican para el objetivo planteado en el presente estudio):

1. Pacientes cuyo diagnóstico histopatológico fue incierto.
2. Muestras de pacientes con tratamiento a base de fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores por cualquier motivo.
3. Pacientes con historia cardiovascular de cardiopatía isquémica.
4. Pacientes portadores de infecciones virales sistémicas (Hepatitis B, Hepatitis C, Infección por VIH, etc).
5. Pacientes con enfermedades inmunológicas e inmunodeficiencias congénitas o adquiridas.
6. Pacientes con enfermedades oncológicas activas
7. No haber obtenido en forma completa la información clínica y los resultados de laboratorio e histopatológicos necesarios para el análisis del estudio.

3.4.6 Criterios de severidad de la enfermedad

En un intento por identificar a pacientes con mal pronóstico a mediano o largo plazo, en una patología con amplio espectro clínico, abarcando desde

el paciente asintomático hasta el que cursa con presentación fulminante, considerando como punto final primario muerte cardíaca o trasplante cardíaco, se han realizado múltiples ensayos clínicos en los cuales se han podido identificar características clínicas las cuales traducen mala evolución. Dentro de estas destacan: FEVI <45%, valor elevado de troponinas, clase funcional NYHA avanzado (III-IV), QRS \geq 120 mseg, presencia de síncope, disfunción ventricular derecha, hipertensión arterial pulmonar (mPAP >25 mmHg) o hipertensión venosa pulmonar (PCWP >15 mmHg), e hipotensión arterial.

Para objetivo de nuestro estudio consideramos variables cuya obtención no requirió de estudios invasivos, y se catalogó como mayor severidad de la enfermedad de acuerdo al número de características previas presentes en los pacientes.

4. Tamaño de muestra.

Dado el carácter exploratorio del estudio, no se contaba con información previa en la literatura para efectuar una estimación precisa de las diferencias que se esperaría encontrar en los títulos de CAR en la población con miocarditis. Por lo que para contestar nuestras preguntas se programó evaluar:

10 muestras de pacientes con miocarditis activa, 10 con miocarditis limítrofe y 10 controles.

5. Definición y clasificación de las variables.

5.1 Variables independientes

5.1.1 Miocarditis

Definición conceptual. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) / Sociedad y Federación Internacional de Cardiología (SFIC) la definición de miocarditis incluye criterios histológicos (Dallas) así como criterios inmunológicos e inmunohistoquímicos (35).

La Sociedad Europea de Cardiología (ESC) definió criterios inmunohistoquímicos como un infiltrado inflamatorio anormal definido como ≥ 14 leucocitos/mm² incluyendo por lo menos 4 monocitos/mm² con la presencia de linfocitos T CD3+ ≥ 7 células/mm².

Los criterios de Dallas clasifican la miocarditis en los siguientes espectros:

- Miocarditis activa: Definida como un infiltrado inflamatorio del miocardio con necrosis y/o degeneración de miocitos adyacentes no típicos de daño isquémico asociado a enfermedad arterial coronaria. Los infiltrados son usualmente mononucleares, pero pueden ser neutrófilos y, ocasionalmente, eosinófilos.
- Miocarditis limítrofe: Término utilizado cuando el infiltrado inflamatorio es escaso o el daño de los miocitos no es demostrado.

Definición operativa: Clasificación de las muestras de acuerdo a la conclusión obtenida por el patólogo certificado que analizó la muestra.

Tipo de variable: Nominal.

5.1.2 Miocardio normal

Definición conceptual: El tejido miocárdico es normal histológicamente.

Definición operacional: Muestra clasificada por el patólogo como normal.

Tipo de variable: Nominal.

5.2 Variables dependientes

5.2.1 Fracción de Expulsión del Ventrículo Izquierdo (FEVI)

Definición conceptual: La función sistólica del ventrículo izquierdo es usualmente valorada por la FEVI en reposo. La FEVI es expresada como la proporción del volumen latido del ventrículo izquierdo (volumen diastólico final menos volumen sistólico final) dividido por el volumen diastólico final, el valor final se refiere en porcentaje. Su medición es generalmente realizada usando métodos no invasivos, tales como ecocardiograma bidimensional o tridimensional, ventriculografía con radionúclidos, resonancia magnética, etc. Entre los pacientes con disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, el pronóstico varía inversamente con la FEVI (36).

Definición operacional: FEVI obtenida por ecocardiograma transtorácico de acuerdo a la conclusión del ecocardiografista que realizó el estudio. Para su análisis dividimos a pacientes con FEVI <45% y pacientes con FEVI >45%, tomando dichos puntos de corte de acuerdo a resultados referidos en estudios previos (16).

Tipo de variable: Dicotómica nominal.

5.2.2 Troponinas

Definición conceptual: Las troponinas cardíacas I (cTnI) y T (cTnT) son proteínas cardíacas reguladoras que controlan la interacción mediada por el calcio de la actina y la miosina (37). Ambos tienen grupos citosólicos (liberables primeramente) y estructurales, con la mayor concentración de troponina en el grupo estructural. Tanto cTnI y cTnT son marcadores específicos de daño miocárdico. El grupo de trabajo de la definición universal de infarto 2012 (38) afirma que los laboratorios deben utilizar un valor de corte del percentil 99 de una población normal de referencia para definir la presencia de lesión cardíaca. Dado que los niveles de cTnT y cTnI son indetectables en la mayoría de los sujetos normales, el percentil 99 es muy bajo (por ejemplo, 0.01 a 0.5 mcg/L).

Definición operacional: Se graduó mediante las unidades reportadas por el laboratorio, tomando como valores normales los determinados por el mismo. Tomamos en cuenta dicho parámetro por resultados obtenidos en estudios previos (39).

Tipo de variable: Numérica cuantitativa continua.

5.2.3 Clase funcional

Definición conceptual: El sistema de clasificación que se utiliza con mayor frecuencia para cuantificar el grado de limitación funcional impuesta por falla cardíaca es el desarrollado por la New York Heart Association (NYHA) (40). Este sistema asigna a los pacientes a una de las cuatro clases

funcionales, dependiendo del grado de esfuerzo necesario para provocar síntomas:

- Clase I - Pacientes con enfermedad cardíaca sin limitación de la actividad física. La actividad física habitual no causa síntomas de insuficiencia cardíaca tales como fatiga o disnea.
- Clase II - Pacientes con enfermedad cardíaca con ligera limitación de la actividad física. Los síntomas de insuficiencia cardíaca se presentan con la actividad normal, pero no hay síntomas en reposo.
- Clase III - Pacientes con enfermedad cardíaca con una marcada limitación de la actividad física. Los síntomas de insuficiencia cardíaca se presentan con menos que la actividad física normal, pero no hay síntomas en reposo.
- Clase IV - Pacientes con enfermedad cardíaca con incapacidad para llevar a cabo cualquier actividad física sin molestias. Los síntomas de falla cardíaca pueden ocurrir incluso en reposo.

Definición operacional: Se graduó con la escala desarrollada por la NYHA. Para su análisis dividimos a pacientes con clase funcional I-II y pacientes con clase funcional III-IV, tomando dichos grupos de acuerdo a resultados referidos en estudios previos (11).

Tipo de variable: Dicotómica nominal.

5.2.4 Duración del QRS

Definición conceptual: La duración del QRS mayor o igual a 120 mseg es considerado como prolongado (41).

Definición operacional: Se analizó el registro electrocardiográfico de superficie de 12 derivaciones obtenido del expediente clínico de acuerdo a las recomendaciones para la estandarización e interpretación del electrocardiograma de AHA/ACCF/HRS. Para su análisis se clasificó a pacientes con QRS prolongado (≥ 120 mseg) o QRS normal.

Tipo de variable: Dicotómica nominal (Presente o ausente).

5.2.5 Síncope

Definición conceptual: El síncope es la pérdida brusca y transitoria de la conciencia asociada con la ausencia de tono postural, seguida de una recuperación espontánea completa y usualmente rápida (42).

Definición operacional: Se determinó su presencia o ausencia como manifestación clínica de miocarditis de acuerdo a lo referido en expediente clínico, tomando como referencia los resultados obtenidos en estudios previos (43,44).

Tipo de variable: Dicotómica nominal (Presente o ausente).

5.2.6 Disfunción ventricular derecha

Definición conceptual: El movimiento predominante del ventrículo derecho (VD) es el acortamiento longitudinal, visible como descenso sistólico de la pared libre basal hacia el ápice. Un movimiento secundario es el engrosamiento radial, visible (aunque menos fácilmente) como engrosamiento sistólico del miocardio. Los parámetros ecocardiográficos cuantitativos utilizados para medir la función sistólica del VD (45) son:

- Excursión sistólica del plano anular tricuspídeo (TAPSE): Refleja el acortamiento longitudinal del VD, se mide en el plano apical de cuatro cámaras mediante la colocación del cursor en modo M en el anillo tricuspídeo lateral y midiendo la distancia pico recorrida por este punto de referencia durante la sístole. Una mayor distancia recorrida durante la sístole implica una mayor función sistólica, el límite de referencia normal es ≥ 1.6 cm.
- Velocidad tricuspídea anular (S'): Refleja el desplazamiento longitudinal del VD. S' refleja la velocidad longitudinal del anillo tricuspídeo durante la sístole, se mide en la vista apical de cuatro cámaras mediante la colocación de un cursor Doppler tisular en el anillo tricuspídeo lateral y la medición de la velocidad pico de este punto de referencia durante la sístole. Una mayor velocidad durante la sístole implica una mayor función sistólica del VD, el límite de referencia normal es ≥ 10 cm/s.
- Cambio de área fraccional (FAC): Es el porcentaje de cambio en el área del VD de la diástole a la sístole, un sustituto de dos dimensiones para la fracción de eyección. FAC toma en cuenta el acortamiento longitudinal, así como el engrosamiento radial y la contribución del tabique interventricular. Se mide en la vista de cuatro cámaras apical trazando manualmente el contorno del VD al final de la diástole y al final de la sístole. La FAC se calcula restando el área telesistólica del VD al área telediastólica del VD y su resultado dividiéndole entre el área telediastólica del VD, expresado en porcentaje. El límite normal de referencia es $\geq 35\%$.

Definición operacional: Cualquiera de los parámetros de función ventricular derecha previamente descritos obtenidos por ecocardiograma transtorácico de acuerdo a la conclusión del ecocardiografista que realizó el estudio. Para su análisis dividimos a pacientes con presencia o ausencia de disfunción ventricular derecha (de acuerdo a límites normales de referencia). Dicha clasificación enfocada al cumplimiento de los objetivos de nuestro estudio al igual que en protocolos previos (46).

Tipo de variable: Dicotómica nominal.

5.2.7 Hipotensión arterial

Definición conceptual: La hipotensión arterial es considerada con valores de presión arterial sistólica (PAS) menores a 90 mmHg y/o presión arterial media (PAM) menor a 70 mmHg; o una disminución de la PAS >40 mmHg en adultos o menor de dos desviaciones estándar por debajo de lo normal para la edad (47).

Definición operacional: Se tomó en cuenta el valor de TAS o TAM registrada al ingreso. Para su análisis se clasificó a pacientes con presencia o ausencia de hipotensión arterial, de acuerdo a los resultados obtenidos en estudios previos (48).

Tipo de variable: Dicotómica nominal.

5.2.8 Expresión de CAR

Definición conceptual: Nivel de expresión del gen CAR en las muestras de tejido endomiocárdico de pacientes con miocarditis y sujetos controles.

Definición operacional: La expresión relativa de CAR fue calculada de la división de la expresión del gen *CAR* y el nivel de gen *GAPDH* determinado para cada muestra, ambos determinados por qRT-PCR.

Tipo de variable: Numérica cuantitativa continua.

6. Métodos.

6.1 Desparafinación

De las muestras embebidas en parafina se cortaron 5 secciones de 10 micrómetros. Entre cada corte se limpió la cuchilla del microtomo para remover ribonucleasas. Se eliminó el exceso de parafina alrededor del corte con una navaja de bisturí. Los primeros dos cortes se eliminaron. Los cortes recientes se colocaron inmediatamente en un microtubo y se cerraron. Las muestras se procesaron inmediatamente debido a que la humedad y el aire pueden degradar parte del RNA. Al bloque recién cortado se le colocó una capa de parafina para que el tejido no esté en contacto con el aire o se cubrió con papel parafilm.

Al microtubo con los 5 cortes se agregó 1 ml de xilol. Posteriormente se incubó dos veces 3 minutos a 42 °C con agitación. Entre cada ocasión se centrifugó por 5 min y se eliminó el sobrenadante. El tejido se lavó con 1 ml de etanol absoluto 3 veces por 3 min a temperatura ambiente con agitación. Se centrifugó en cada ocasión a máxima velocidad (14000 rpm). El etanol residual se dejó evaporar por 5 minutos a temperatura ambiente o hasta que el tejido estuvo completamente seco.

6.2 Digestión de los tejidos

Al tejido se agregó 350 µl de búfer de digestión (Tabla 3) por muestra y se incubó a 42 °C hasta que el corte se digirió y se observó sin tejido (el tiempo varió de acuerdo al tiempo de fijación y edad del bloque).

Tabla 3. Búfer de digestión

Reactivo o solución	Concentración Solución Stock	Concentración final por muestra	Volumen por muestra
Tris_HCl pH 7.8	1 M	20mM	7 µl
EDTA	0.5 M	10 mM	7 µl
Proteinasa K	20 mg/ml	500 µg/ml	11 µl
SDS	10 %	1 %	35 µl
H ₂ O DEPC			290 µl
Volumen total			350 µl

Si después de las primeras 24 horas todavía existía mucho tejido se agregó 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml). También se puede facilitar la disgregación de los tejidos mediante métodos físicos como maceración dentro del mismo tubo con un pistilo. En promedio la incubación fue de 48 horas.

6.3 Extracción de RNA total

De los tejidos degradados se procedió a extraer el RNA total usando el método de fenol ácido. Brevemente, a la solución lisada se agregó 500 µl de fenol-ácido pre-calentado a 65°C (fase no orgánica inferior). Se agitó en

vortex e incubó 5 min a 65°C. Nuevamente se agitó en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente. La fase acuosa se pasó a un microtubo limpio donde se agregó 1 ml de etanol absoluto frío. Nuevamente se agitó en vortex y se incubó mínimo 30 min a -70°C para precipitar el RNA. Se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C y se decantó. Al precipitado obtenido se añadió 1 ml de etanol al 70% frío y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min a 4°C. Nuevamente se decantó y se resuspendió la pastilla en 400 µl de solución A (Tabla 4). Se agitó en vortex y se repitió la extracción con etanol absoluto. La pastilla se secó en el secador Speedvac (15-20 minutos aproximadamente, hasta que estuvo completamente seco). La pastilla se resuspendió en 30 µl de agua DEPC.

Tabla 4. Solución A (Solución de lisis)

Reactivos o solución	Volumen (µl)	Concentración final
Agua DEPC	910	0.5 %
SDS 10%	50	20 mM
Acetato de Sodio 1M	20	10 mM
EDTA 0.5 M	20	
Volumen final	1000 µl	

6.4 Tratamiento con DNasa turbo para qRT-PCR

Se procedió a usar el paquete comercial de eliminación de DNA celular, para evitar contaminación en la reacción de PCR, usando el paquete comercial DNasa Turbo (Ambión catalogo AM1907), siguiendo las indicaciones del fabricante. Se determinó la concentración en un equipo Nanodrop y la pureza mediante una electroforesis en gel de agarosa. El RNA se guardó hasta su análisis a -70°C

6.5 Expresión de CAR por RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR)

Para determinar la expresión de los genes de CAR en las muestras, se realizaron ensayos de RT-PCR en tiempo real. El RNA obtenido por cada muestra sirvió como templado para la reacción de transcriptasa reversa usando un paquete comercial de fermentas (Paquete comercial cDNA Synthesis, catalogo K1612). El cDNA generado fue usado para la reacción de PCR en tiempo real usando un termociclador LightCycler® 480 de Roche y los siguientes pares de iniciadores (34):

Para el gen *CAR*:

5'-GCCCACTTCATGGTTAGCAG-3' y 5'-TACGGCTCTTTGGAGGTGGC-3'

Y para el gen constitutivo *GAPDH*:

5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' y 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

Para la amplificación, se empleó el paquete comercial para PCR en tiempo real LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl, conteniendo 1.5 µl de agua estéril grado molecular incluida en el paquete comercial, 0.5 µl de cada uno

de los iniciadores correspondientes a una concentración de 20 μM , 2.5 μl de cDNA a la dilución correspondiente y 5.0 μl de la mezcla de SYBR Green I Master 2X el cual contiene FastStart Taq DNA Polimerasa, amortiguador de reacción, mezcla de dNTP's, fluorocromo SYBR Green I y MgCl_2 . Cada muestra se evaluó por duplicado. Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa, se selló con una lámina plástica adherente y se colocó en el equipo LightCycler® 480 (Roche). La expresión relativa de CAR fue calculada entre la expresión de CAR y el nivel de gen *GAPDH* determinado para cada muestra.

Para la cuantificación relativa se usó el análisis avanzado (cuantificación relativa avanzada), por eficiencia; de acuerdo al modelo matemático de Pfaffl (49), donde se determina la cuantificación relativa de un gen de interés en diferentes condiciones (en este caso la expresión del gen de CAR en cada muestra de Miocarditis activa comparada con la expresión de este mismo gen en el grupo control sin miocarditis ó en el grupo Miocarditis limítrofe); la relación entre la expresión relativa (R) del gen de interés es calculada en base a la eficiencia (E) de la reacción (la cual se obtiene al someter tres diluciones seriadas base 10 del cDNA) y la diferencia de los puntos de cruce (ΔCP , del inglés *crossing points*) de una muestra de Miocarditis activa *versus* una muestra control ó una muestra del grupo miocarditis limítrofe. El gen GAPDH se utilizó como normalizador de la expresión genética. El equipo LightCycler® 480 cuenta con los programas matemáticos para llevar a cabo automáticamente el cálculo de la cuantificación relativa avanzada.

7. Análisis estadístico de los datos.

El análisis de los datos consistió de las siguientes etapas:

7.1 Análisis inicial.

Se procedió a analizar la distribución de las frecuencias de las diferentes variables consideradas en el estudio, utilizando para ello las medidas de resumen apropiadas a cada variable de acuerdo al nivel de medición y tipo de distribución. La consistencia en la medición de los ensayos se realizará mediante el coeficiente de variación.

7.2 Análisis de las variables estudiadas.

Las diferencias en la expresión de CAR de los tres grupos se compararán con ANOVA de una vía y prueba a posteriori con el método de Scheffé o Tukey (porque son pareadas), en caso de no mostrar los datos una distribución normal se utilizara el ANOVA no paramétrico de Kruskal-Wallis y como prueba posteriori la U de Mann-Whitney. La relación entre la producción y severidad por el coeficiente de correlación de Pearson.

Durante este último proceso e independientemente de la significancia estadística se determinará el poder del estudio.

El nivel de significancia estadística en todos los casos fue una $p < 0.05$ bimarginal para una hipótesis nula.

Aspectos Éticos.

Como el estudio no contempló toma de muestras, ya que las muestras se tenían en bloques de parafina, sin ninguna otra intervención, previo consentimiento informado, no presentó conflictos éticos. Por tal motivo nuestro protocolo fue considerado como *investigación sin riesgo*, de acuerdo a la clasificación del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título segundo De los Aspectos éticos de la investigación en seres humanos, Artículo 17.

Si durante la realización del estudio o como parte de los resultados se encontraron datos que pudiesen tener implicación en el tratamiento o evolución de la enfermedad, inmediatamente se hicieron del conocimiento de la persona en estudio. Todo el tiempo se mantuvieron en anonimato los datos personales de los sujetos implicados; a las muestras obtenidas se les asignó un número de folio consecutivo, mientras que los datos personales así como los datos clínicos de los sujetos en estudio se mantuvieron en archivos individuales los cuales fueron resguardados por el investigador responsable, de tal forma que durante los procesos de análisis de muestras y resultados no hubo posibilidad de hacer coincidir dicha información. Para poder participar en este protocolo se tuvo que firmar previamente un consentimiento informado, documento que fue leído por la persona potencialmente elegible, despejando todas las dudas existentes al momento de la firma; dicha autorización fue obtenida por cualquiera de los investigadores asociados.

Los aspectos de bioética se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos dictados por el Código de Bioética para el personal de salud 2002, Capítulo VII, Bioética en la investigación en salud; del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Título segundo De los Aspectos éticos de la investigación en seres humanos; así como a la Declaración de Helsinki vigente.

Aspectos de bioseguridad.

En la UIMEIP (Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias) se cuenta con la infraestructura para el procesamiento de las muestras. Los aspectos de bioseguridad en el laboratorio se llevaron a cabo de acuerdo a los lineamientos dictados por la Ley General de Salud (2012) Título quinto en investigación para la salud, artículo 96-103 y al Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la Salud. También manifiesto que existe evidencia documental auditable de que: a) Se cuenta con los permisos y/o licencias oficiales que se requirieron para llevar a cabo el trabajo propuesto; b) Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y fueron adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto; c) El equipo utilizado se encuentra en estado satisfactorio de operación; d) Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación; e) Los involucrados en el proyecto, recibieron la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente; f) Se

mantuvieron las condiciones adecuadas de instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del proyecto.

Al trabajar con muestras de tejido cardiaco que previamente fueron sometidas a procesamiento para incluirlas en parafina para su preservación, no se requirió de un manejo especial de bioseguridad para dichas muestras. Sin embargo en el procesamiento desde la muestra en parafina hasta la obtención de CAR por qRT-PCR se requirió de la utilización de sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas, tales como xilol, etanol absoluto, EDTA, fenol-acido, etanol al 70%, etc., por lo que su manejo se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-007-SSA3-2011, Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos; así como a Norma Oficial Mexicana NOM-005-STPS-1998, Relativa a las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas. En el Anexo 1 se resumen las principales sustancias peligrosas, su propiedades físicas, daños a la salud así como las medidas de precaución para su manejo.

El hospital de Pediatría, al contar con instalaciones para el funcionamiento de laboratorios clínicos y de investigación, cuenta con protocolos bien establecidos para lograr el manejo adecuado de los Residuos Peligrosos Químicos (CRETIs), tomando como marco legal la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005, Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos; así como Norma Oficial Mexicana NOM-010-SCT2/2003, Disposiciones de compatibilidad y segregación, para el almacenamiento y transporte de sustancias, materiales y

residuos peligrosos. La recolección y transporte interno de CRETIs, hacia el área de almacenamiento temporal, se encuentra a cargo de personal previamente capacitado que cuenta con el equipo de seguridad necesario para el desarrollo de dicha actividad; se cuenta con horarios, días y rutas bien diseñadas para su realización. Los residuos recolectados son depositados en el almacén temporal de residuos peligrosos, acondicionado según la normatividad vigente y posteriormente entregados a empresas de recolección y transporte externo, especializadas y autorizadas tanto por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), como por la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), para realizar estas actividades.

Resultados.

Se analizaron un total de 26 casos que fueron diagnosticados con la enfermedad a estudiar en un periodo comprendido entre el año 2009 y 2015, de los cuales 16 corresponden a pacientes clasificados con miocarditis activa y 10 con miocarditis limítrofe; la Tabla 5 resume las características principales de ambos grupos.

El grupo de pacientes con miocarditis activa esta conformado por 50% de género masculino y 50% de género femenino con un promedio de edad de 35.3 años (rango de 17-57 años) y el grupo de miocarditis limítrofe por nueve hombres y una mujer con un promedio de edad de 33.2 años (rango de 17-58 años).

En el grupo de miocarditis activa un solo caso tenía dislipidemia (6.2%), tabaquismo activo en seis casos (37.5%), un ex-fumador (6.2%) y obesidad en dos casos (12.4%), con una mediana de un factor de riesgo cardiovascular por paciente (rango de 0-2); mientras que en el grupo de miocarditis limítrofe un caso con diabetes mellitus (10%), tres con hipertensión arterial sistémica (30%), cuatro con dislipidemia (40%), cinco con tabaquismo activo (50%) y dos con obesidad (20%), con una mediana de un factor de riesgo cardiovascular por paciente (rango de 0-4).

De la población estudiada 53.9% tenían antecedente de infección reciente, de los cuales 85.7% eran de origen respiratorio y el restante de origen gastrointestinal; con similar porcentaje de casos en cada grupo (56.2% en miocarditis activa y 50% en miocarditis limítrofe).

El cuadro clínico de presentación al momento en que se realizó el diagnóstico comprendió la presencia de los siguientes síntomas principales: disnea (57.7%),

dolor torácico (61.5%), palpitaciones (26.9%) y síncope (26.9%), los cuales se presentaron aislados o en combinación de hasta 3 de ellos. El síntoma principal en el grupo de miocarditis activa fue el dolor torácico (62.5% de los casos), mientras que en miocarditis limítrofe fue la disnea (80% de los casos). Solo tres casos presentaron hipotensión al momento de su ingreso, y hasta el 26.9% de la población tenía a la exploración física datos compatibles con falla cardiaca.

Respecto a los estudios de laboratorio, el 43.7% de los casos con miocarditis activa presentaron elevación de Troponina tomando como límites de referencia los establecidos por el laboratorio de nuestro hospital, así como el 40% del grupo de miocarditis limítrofe; observándose mayores niveles de dicho biomarcador en el primer grupo, del mismo modo que lo hace la enzima CPK-MB.

Del total de la población objetivo de estudio el 38.5% presentó QRS prolongado en el electrocardiograma con rangos de duración de QRS desde 120 mseg hasta 170 mseg. El 23% presentó algún grado de bloqueo auriculoventricular siendo la principal manifestación el bloqueo AV completo (83.3%), de los cuales cinco casos requirieron la colocación de marcapasos definitivo en el seguimiento. Hasta el 38.5% debutó con taquiarritmias siendo el grupo de taquicardia ventricular no sostenida/extrasistolia ventricular la más frecuente (60%), las cuales se presentaron principalmente en el grupo de miocarditis activa (80%).

Ecocardiográficamente el 50% de la población de ambos grupos presentaron FEVI <45%, observándose valores de FEVI discretamente menores en el grupo de miocarditis activa. Por otro lado solo el 15.4% de la población tenía datos de disfunción ventricular derecha, presentándose principalmente en el grupo de miocarditis limítrofe (75%).

Los pacientes con miocarditis activa presentaron una mediana de dos indicadores de severidad de la enfermedad, con rangos que van desde cero hasta cuatro; del mismo modo el grupo de miocarditis limítrofe presentó una mediana de dos factores de mal pronóstico pero con rangos de cero a cinco factores, en diferentes combinaciones.

El tratamiento que recibieron nuestros pacientes se basa principalmente en una combinación de medidas generales, fármacos destinados al manejo sintomático dictado por la presencia o no de falla cardiaca, fármacos inmunosupresores, algunos medicamentos antiarrítmicos e incluso inotrópicos y vasopresores. Los medicamentos más utilizados fueron IECA (Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina) o ARA II (Antagonistas del Receptor de Angiotensina II) en el 65% de los pacientes, diuréticos de asa en el 50%, β -bloqueadores 73%, antagonistas de aldosterona 54%, esteroides intravenosos 69%, esteroides orales 85% y azatioprina 80%.

La mediana para el tiempo de seguimiento de los pacientes es de 12 meses, con un rango de 1-72 meses, mismo que esta principalmente determinado por el momento en el que se realizó el diagnóstico.

Respecto a los niveles de CAR, aún se encuentra en etapa de estandarización para la obtención de dicha variable.

Tabla 5. Características generales de la población estudiada

Características	Miocarditis activa	Miocarditis limítrofe
Número de casos	16	10
Género		
- Masculino	8	9
- Femenino	8	1
Edad promedio (años)	35.3 (17 - 57)	36.9 (17 - 58)
Factores de riesgo cardiovascular		
- Diabetes mellitus	0	1
- Hipertensión arterial sistémica	0	3
- Dislipidemia	1	4
- Tabaquismo	7	6
- Índice de masa corporal promedio (kg/m ²)	26.67 (18.82 - 39.41)	27.53 (23.42 - 33.96)
Antecedente de infección reciente		
- Vías respiratorias	7	5
- Gastrointestinal	2	0
Cuadro clínico de presentación		
- Disnea	7	8
- Dolor torácico	10	6
- Palpitaciones	6	1
- Síncope	5	2
Clase funcional (NYHA) al ingreso		
- CF I-II	12	7
- CF III-IV	4	3
Hallazgos físicos a la exploración		
- Frecuencia cardiaca promedio (lpm)	84.3 (30 - 130)	76.4 (40 - 117)
- Hipotensión	1	2
- Datos compatibles con falla cardiaca	4	3
Laboratorios		
- Troponina máxima promedio (ng/ml)	5.3 (0.05 - 30)	3.03 (0.01 - 15.7)
- CPK total máxima promedio (U/L)	653 (56 - 2444)	797.2 (57 - 1966)
- CPK-MB total máxima promedio (U/L)	216 (4 - 391)	50.37 (1 - 138)
Hallazgos electrocardiográficos		
- QRS prolongado (>120 mseg)	6	4
- Bloqueos AV	4	2
- Taquiarritmias	8	2
Hallazgos ecocardiográficos		
- FEVI promedio (%)	40.3 (13 - 63)	42 (15 - 70)
- FEVI <45%	8	5
- Disfunción ventricular derecha	1	3

Discusión.

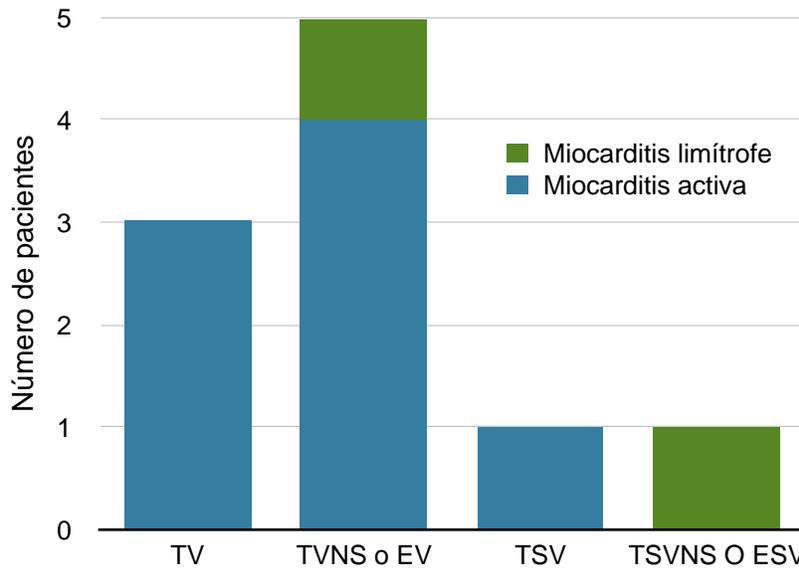
La miocarditis es una entidad clínica con formas de presentación muy variables, en un espectro que incluye a pacientes asintomáticos no diagnosticados hasta personas que debutan con muerte súbita cuyo diagnóstico se realiza post-mortem, pasando por cuadros clínicos compatibles con síndrome isquémico coronario agudo o falla cardiaca en diferentes grados. De forma similar a lo reportado en otras series (6), nosotros documentamos que las principales manifestaciones clínicas en pacientes sintomáticos son dolor torácico, disnea, palpitaciones y síncope, en dicho orden de frecuencia.

En la literatura mundial se reporta el antecedente de infección reciente como uno de los principales factores predisponentes para el desarrollo de miocarditis; en más de la mitad de nuestra población se pudo identificar la presencia dicho factor, principalmente de vías respiratorias, cifra muy similar a la obtenida por Guillén y colaboradores (2).

De forma contraria al tratamiento habitual establecido para la miocarditis en otros centros hospitalarios, más del 80% de nuestros pacientes recibieron alguna terapia con inmunosupresores aunado al tratamiento sintromático. Observamos que con dicho manejo el total de la población estudiada se encuentran libres de resultados tales como mortalidad o transplante cardiaco en el seguimiento. El tratamiento de los pacientes con miocarditis es muy discutido, ya que el uso de inmunosupresión y/o inmunomodulación no es generalmente aceptado. Desde luego por las limitación de este estudio, dado que no fue planeado para evaluar el tratamiento y nuestra intención es únicamente describir el manejo que recibieron

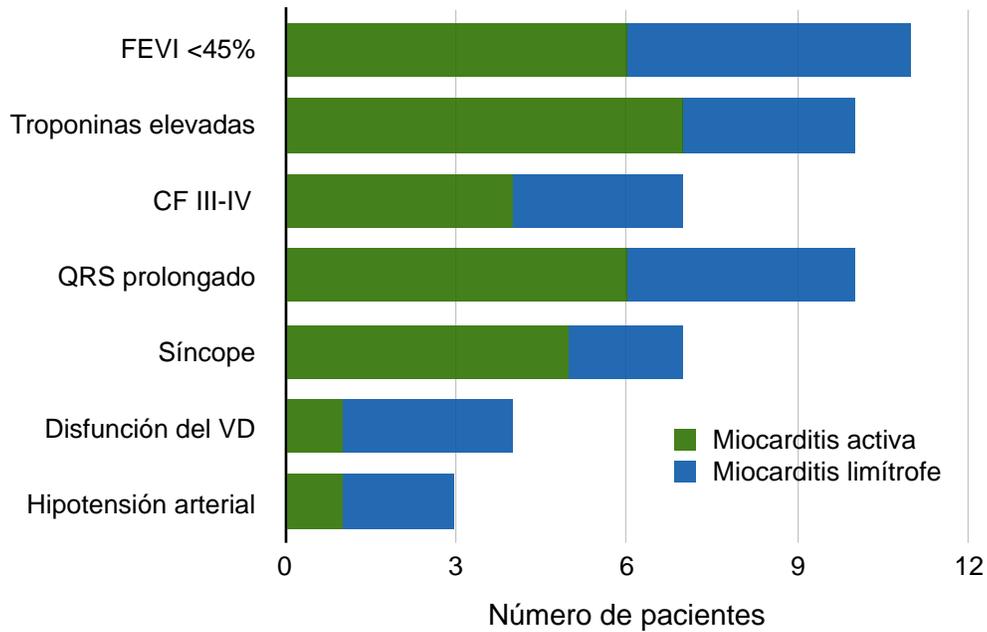
nuestros pacientes, no es posible establecer la eficacia y seguridad del mismo. Se requiere un estudio sistemático apropiado para determinar el desempeño del manejo inmunomodulador como tratamiento de la miocarditis.

Gráfica 1. Arritmias presentes por grupo de estudio



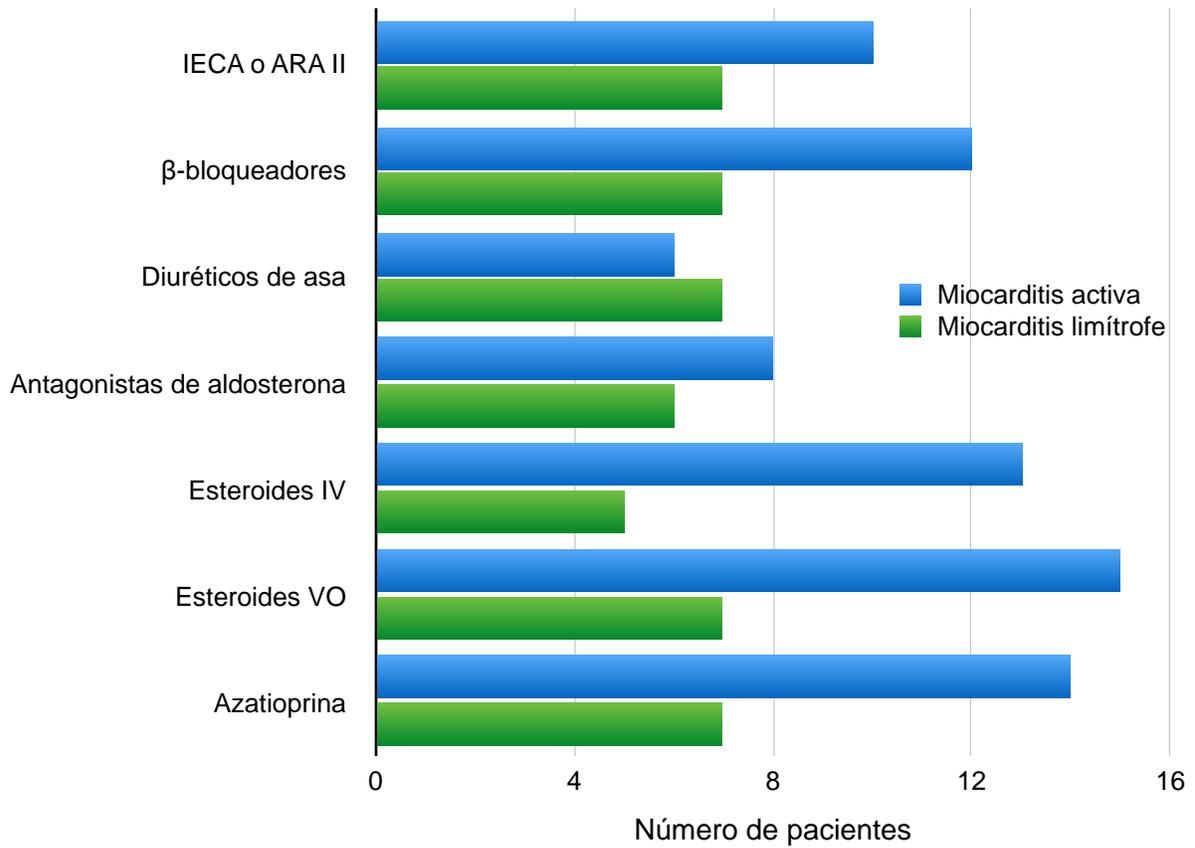
TV: Taquicardia ventricular. TVNS o EV: Taquicardia ventricular no sostenida/Extrasistolia ventricular. TSV: Taquicardia supra ventricular. TSVNS o ESV: Taquicardia supraventricular no sostenida/Extrasistolia supraventricular.

Gráfica 2. Criterios de severidad presentes por grupo de estudio



FEVI: Fracción de expulsión del ventrículo izquierdo. CF: Clase funcional. VD: Ventrículo derecho.

Gráfica 3. Medicamentos más utilizados por grupo de estudio



IECA: Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina. ARA II: Antagonistas del Receptor de Angiotensina II. IV: Intravenoso. VO: Vía oral.

Conclusiones.

- La miocarditis es una entidad clínica poco frecuente, con amplio espectro clínico lo cual hace difícil su diagnóstico y serias repercusiones en el estado funcional de los pacientes a largo plazo, aunado al impacto económico y social que esto representa.
- Nuestro estudio es de gran valor clínico pues toda nuestra población tiene biopsia endomiocárdica con diagnóstico histopatológico de miocarditis, estándar de oro actual para su diagnóstico.
- El tratamiento que se otorga a los pacientes con miocarditis en nuestro hospital tiene buen resultado a largo plazo, sin embargo es necesario realizar estudios encaminados a valorar su eficacia y seguridad.

Referencias bibliográficas.

1. Guía de Práctica Clínica. Diagnóstico y Tratamiento de Miocarditis Aguda para el 1, 2 y 3 Nivel de Atención Médica. México: Secretaría de Salud, 2010.
2. Guillén OF, Soto ME, Reyes PA. Miocarditis aguda primaria. Experiencia de diez años en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Arch Cardiol Mex 2005; 75(suppl 3): 81-88.
3. Blauwet LA, Cooper LT. Myocarditis. Prog Cardiovasc Dis 2010;52:274-288.
4. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. Heart 2006;92:316-320.
5. Drory Y, Turetz Y, Hiss Y, et al. Sudden unexpected death in persons less than 40 years of age. Am J Cardiol 1991;68:1388-1392.
6. Hufnagel G, Sabine P, Richtes A, et al. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID): First epidemiological results. Herz 2000;25:279-285.
7. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, et al. Update on Myocarditis. J Am Coll Cardiol 2012;59:779-792.
8. Andréoletti L, Lévêque N, Boulagnon C, et al. Viral causes of human myocarditis. Arch Cardiovasc Dis 2009;102:559-568.
9. Kühl U, Pauschinger M, Noutsias M, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. Circulation 2005;111:887-893.

10. Bowles NE, Ni J, Kearney DL, et al. Detection of viruses in myocardial tissues by polymerase chain reaction: Evidence of Adenovirus as a common cause of myocarditis in children and adults. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:466-72.
11. Kindermann I, Kindermann M, Kandolf R, et al. Predictores of outcome in patients with suspected myocarditis. *Circulation* 2008;118:639-648.
12. Breinholt J, Moulik M, Dreyer WJ, et al. Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: The increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:739-746.
13. Mendes LA, Michael H, Picard MH, et al. Ventricular remodeling in active myocarditis. *Am Heart J* 1999;138:303-308.
14. Ramírez M, De Mora M. Etiología y biopatogenia de la miocarditis. *Cardiocre* 2012;47:135-138.
15. Liu P, Mason J. Advances in the Understanding of Myocarditis. *Circulation* 2001;104:1076-1082.
16. Mason JW, O'Connell JB, Herskowitz A, et al. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med* 1995;333:269-275.
17. Lee CH, Tsai WC, Hsu CH, , et al. Predictive factors of a fulminant course in acute myocarditis. *Int J Cardiol* 2006;109:142-145.
18. Kyto V, Saukko P, Lignitz E, et al. Diagnosis and presentation of fatal myocarditis. *Hum Pathol* 2005;36:1003-1007.

19. Esfandiarei M, McManus BM. Molecular biology and pathogenesis of viral myocarditis. *Annu Rev Pathol* 2008;3:127-155.
20. Bowles KR, Gibson J, Wu J, et al. Genomic organization and chromosomal localization of the human Coxsackievirus B - adenovirus receptor gene. *Hum Genet* 1999;105:354-359.
21. Tatrai E, Bedi K, Kovalszky I, et al. No mutation but high mRNA expression of Coxsackie-Adenovirus Receptor was observed in both dilated and ischemic cardiomyopathy. *Forensic Sci Int* 2011;212:47-50.
22. Freimuth P, Philipson L, Carson D. The Coxsackievirus and Adenovirus Receptor. In: Tracy S, Oberste M, Drescher K, editors. *Current topics in Microbiology and immunology: Group B Coxsackievirus*. Alemania: Springer; 2008. p. 67-87
23. Tomko RP, Xu R, Philipson L. HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3352-3356.
24. Lisewski U, Shi Y, Wrackmeyer U, et al. The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. *J Exp Med* 2008;205:s2369–79.
25. Lim BK, Xiong D, Dorner A, et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J Clin Invest* 2008;118:2758-2770.
26. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptative immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 2015;15:117-129.

27. Reeh M, Bockhorn M, Görgens D, et al. Presence of the Coxsackievirus and Adenovirus Receptor (CAR) in human neoplasms: a multitumour array analysis. *Br J Cancer* 2013;109:1848-1858.
28. Asher DR, Cerny AM, Weiler SR, et al. Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* 2005;42:77-85.
29. Dorner AA, Wegmann F, Butz S, et al. Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J Cell Sci* 2005;118:3509–3521.
30. Chen JW, Zhou B, Yu QC, et al. Cardiomyocyte-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor results in hyperplasia of the embryonic left ventricle and abnormalities of sinuatrial valves. *Circ Res* 2006;98:923–930.
31. Fischer R, Polen W, Schultheiss HP, et al. CAR-diology - A virus receptor in the healthy and diseased heart. *J Mol Med* 2009;87:879-884.
32. Qiang L, Xiai-jia S, Yan Y, et al. Correlation between virus persistent infection and cardiac function in patients with dilated cardiomyopathy. *J Zhejiang Univ Sci B* 2013;14:749-753.
33. Tripta K, Baijayantimala M, Uma NS, et al. Expression of coxsackievirus and adenovirus receptor and its cellular localization in myocardial tissues of dilated cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol* 2012;17:183-186.
34. Rupper V, Meyer T, Pankuweit S, et al. Activation of STAT1 transcription Factor precedes up-regulation of Coxsackievirus-Adenovirus Receptor during viral myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2008;17:81-92.

35. Richardson P, McKenna W, Brilow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841-842.
36. Basilico FC, Folland ED, Karaffa S, et al. Non-invasive measurement of left ventricular function in coronary artery disease. Comparison of first pass radionuclide ventriculography, M-mode echocardiography, and systolic time intervals. *Br Heart J* 1981;45:369-375.
37. Adams JE, Abendschein DR, Jaffe AS. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?. *Circulation* 1993;88:750-763.
38. Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2525-2538.
39. Ginsberg F, Parrillo J. Fulminant Myocarditis. *Crit Care Clin* 2013;29:465-483.
40. The Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and Criteria for Diagnosis of Diseases of the Heart and Great Vessels. 9th ed. Boston: Little, Brown & Co; 1994. p.253-256.
41. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann I, et al. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis. *Eur J Heart Fail* 2011;13:398-405.
42. Moya A, Sutton R, Ammirati F, et al. Guidelines for the diagnosis and management of syncope. *Eur Heart J* 2009;30:2631-2671.

43. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation* 2006;113:876-890.
44. Magnani JW, Danik HJ, Dec GW Jr, et al. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J* 2006;151:463-470.
45. Rudski LG, Lai WW, Afilalo J, et al. Guidelines for the echocardiographic assessment of the right heart in adults: a report from the American Society of Echocardiography endorsed by the European Association of Echocardiography, a registered branch of the European Society of Cardiology, and the Canadian Society of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 2010;23:685-713.
46. Mendes LA, Dec GW, Picard MH, et al. Right ventricular dysfunction: an independent predictor of adverse outcome in patients with myocarditis. *Am Heart J* 1994;128:301-307.
47. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 2013;41:580-637.
48. Mahfoud F, Ukena C, Kandolf R, et al. Blood pressure and heart rate predict outcome in patients acutely admitted with suspected myocarditis without previous heart failure. *J Hypertens* 2012;30:1217-1224.
49. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;9:2002-2007.

Anexos.

Anexo 1. Sustancias tóxicas, peligrosas o explosivas.

SUSTANCIA	PROPIEDADES FÍSICAS	PELIGROS PARA LA SALUD	PELIGRO DE INCENDIO	PRECAUCIONES DE SEGURIDAD	SUSTANCIAS QUÍMICAS INCOMPATIBLES
Etanol CH₃CH₂OH	Líquido volátil incoloro con un ligero olor característico. Punto de fusión: -117 °C. Punto de ebullición: 79 °C. Miscible con el agua.	Nocivo en caso de ingestión. Irritante ocular. Puede afectar al sistema nervioso central.	Muy inflamable. Temperatura de inflamación: 12 °C Intervalo de inflamabilidad: 3–19%.	Mantener el recipiente bien cerrado y alejado de las fuentes de ignición.	Reacciona violentamente con oxidantes fuertes.
<p>El etanol (alcohol etílico, C₂H₅OH) y el 2-propanol (alcohol isopropílico, (CH₃)₂CHOH) tienen propiedades desinfectantes similares. Son activos contra las formas vegetativas de las bacterias, los hongos y los virus con envoltura lipídica, pero no contra las esporas. Su acción sobre los virus sin envoltura lipídica es variable. Para conseguir la máxima eficacia deben utilizarse en concentraciones acuosas de aproximadamente un 70% (v/v): las concentraciones más altas o más bajas pueden no tener tanto poder germicida. Una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan residuo alguno en los objetos tratados. Las mezclas con otros agentes son más eficaces que el alcohol por sí solo; por ejemplo, el alcohol al 70% (v/v) con 100 g/l de formaldehído, o el alcohol con 2 g/l de cloro libre. Las soluciones acuosas de etanol al 70% (v/v) pueden utilizarse en la piel, las superficies de trabajo de las mesas de laboratorio y las CSB, así como para sumergir pequeñas piezas de instrumental quirúrgico. Dado que el etanol puede secar la piel, a menudo se mezcla con emolientes. Las frías de alcohol se recomiendan para descontaminar manos ligeramente sucias en situaciones en las que no es posible o práctico lavarlas. Sin embargo, hay que recordar que el etanol no tiene actividad contra las esporas y quizá no mate todos los tipos de virus sin envoltura lipídica. Los alcoholes son volátiles e inflamables y no deben utilizarse en las proximidades de llamas desnudas. Las soluciones de trabajo deben almacenarse en recipientes apropiados para evitar la evaporación. Los alcoholes pueden endurecer el caucho y disolver ciertos tipos de cola. El inventario y el almacenamiento apropiados del etanol en el laboratorio son sumamente importantes con el fin de evitar que se use para aplicaciones distintas de la desinfección. Los frascos que contengan soluciones con alcohol deben rotularse con claridad para evitar que sean tratados en la autoclave.</p>					
Fenol C₆H₅OH	Cristales incoloros o de color rosa pálido de olor característico. Punto de fusión: 41 °C. Punto de ebullición: 182 °C. Soluble en agua.	La sustancia y sus vapores son cáusticos para los ojos, la piel y las vías respiratorias y provocan quemaduras graves. Es absorbido por la piel. Trastornos del sistema nervioso central y coma. Lesiones hepáticas y renales. Síntomas: dolor abdominal, vómitos, diarrea, irritación de la piel, dolor ocular. El contacto prolongado con soluciones diluidas puede causar dermatitis.	Temperatura de inflamación: 80 °C. Intervalo de inflamabilidad: 1,7–6%.	No respirar los vapores; utilizar protección respiratoria. Evitar el contacto con los ojos y la piel. Trabajar bajo campana extractora de vapores. Usar guantes de nitrilo y protección ocular. En caso de contacto con los ojos, lavar de inmediato con agua y acudir al médico. En caso de contacto con la piel, quitar la ropa contaminada y extender sobre la zona afectada glicerol, polietilenglicol 300 o una mezcla de polietilenglicol (70%) y alcohol desnaturalizado (30%), y después enjuagar con agua.	Reacciona con oxidantes, con peligro de incendio y explosión.
Xileno (mezcla de isómeros) C₆H₄(CH₃)₂ Dimetilbenceno	Líquido incoloro de olor fuerte. Punto de fusión: -95 a -13 °C. Punto de ebullición: 136–145 °C. Insoluble en agua.	Puede afectar al sistema nervioso central, produciendo cefaleas, mareos, fatiga y náuseas. El líquido y los vapores irritan los ojos, piel, mucosas y vías respiratorias. Nocivo en caso de ingestión. El contacto prolongado puede producir lipólisis cutánea. Trastornos neurológicos inespecíficos. La exposición puede agravar las lesiones auditivas provocadas por la exposición al ruido. Las pruebas en animales indican que es tóxico para la reproducción o el desarrollo humanos.	Líquido inflamable. Temperatura de inflamación: 27–32 °C.	Evitar el contacto con los ojos. Usar guantes de nitrilo y protección ocular. Mantener el envase bien cerrado y alejado de fuentes de ignición.	Puede contener etilbenceno como impureza. El etilbenceno es un posible carcinógeno para el ser humano.

SUSTANCIA	PROPIEDADES FÍSICAS	PELIGROS PARA LA SALUD	PELIGRO DE INCENDIO	PRECAUCIONES DE SEGURIDAD	SUSTANCIAS QUÍMICAS INCOMPATIBLES
Acetato de sodio C₂H₃NaO₂ / CH₃COONa	Polvo cristalino higroscópico, blanco. Punto de fusión: 328°C. Densidad: 1,5 g/cm ³ . Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C: 46,5	Enrojecimiento de piel y ojos.	Combustible	Evitar las llamas. Utilizar guantes protectores, gafas ajustadas de seguridad. No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo.	Se descompone al calentarla intensamente y en contacto con ácidos fuertes produciendo vapores de ácido acético. Reacciona violentamente con oxidantes fuertes. La disolución en agua es una base débil.
EDTA. Acido Tetracético Etilen Diamina ((HOCOCH₂)₂NCH₂)₂	Polvo blanco, cristalino, sin olor. Punto de fusión: 220°C. Punto de ebullición: 247°C. Solubilidad en agua: 0.5 g/L a 25°C	Puede causar irritación en el tracto digestivo, puede causar reacción alérgica. Puede provocar Irritación en los ojos, piel y vías respiratorias.	Este material no se enciende	Utilizar Guantes de Látex, Lentes de seguridad, Pechera, camisa manga larga, Mascarillas con cartuchos para vapores ácidos y polvos aprobados por OSHA en 29 CFR 1010.134	Agentes oxidantes fuertes, Bases fuertes, Cobre y Aluminio

Anexo 2. Carta de consentimiento informado para pacientes con miocarditis.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud
UMAE Hospital de Cardiología/ UMAE Hospital de Pediatría



Clínica de Insuficiencia Cardíaca/UIIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

México, Distrito Federal a ____ de _____ de 201__

Proyecto: *Expresión del Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) identificado por RT-PCR en tiempo real en tejido endomiocárdico de pacientes con miocarditis.*

Lo estamos invitando a participar en un proyecto de investigación que tiene como propósito evaluar si la presencia y niveles de una proteína (proteína CAR) en las muestras de tejido cardíaco de personas que tienen Miocarditis (inflamación del corazón causada generalmente por un virus) es distinta a la de personas con corazón normal. También queremos evaluar si la cantidad de proteína varía de acuerdo a la gravedad de la miocarditis. Se le hace esta invitación porque a usted se le detectó Miocarditis. Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, por favor lea la información que se encuentra a continuación, haga las preguntas que usted considere antes de tomar una decisión.

Su participación en el estudio consistirá en autorizar que una fracción de la biopsia (toma de tejido cardíaco) que le fue realizada como parte del estudio para detectar la Miocarditis sea utilizada por nosotros, le aclaramos que esta fracción será "sobrante", esto es, la muestra que nos sea proporcionada por el servicio que las conserva, no interfiere con su diagnóstico o tratamiento. También contestará en una sola ocasión a unas preguntas relacionadas a su enfermedad y algunos antecedentes ambientales y familiares; responder estas preguntas tomará un tiempo no mayor a cinco minutos.

No existe ningún riesgo por su participación en el estudio ya que no le haremos ningún procedimiento, ni toma de muestras adicionales y el cuestionario no contiene preguntas que lo pudieran hacer sentir incómodo.

Si bien usted no recibirá un beneficio directo al participar en el estudio, los resultados permitirán conocer si la proteína CAR se asocia con la miocarditis y con la forma en que la enfermedad se presenta, lo que pudiera ser de utilidad en el futuro para otros pacientes con Miocarditis.

Su participación en este proyecto es voluntaria y su deseo de participar o no hacerlo, no tendrán ninguna implicación en la atención médica que usted recibe por parte de nuestra institución.

Para asegurar que sus datos permanecerán confidenciales en este proyecto, le informamos que sus muestras se marcarán con códigos (un número consecutivo), separados de sus datos personales y clínicos, por lo que quién las maneje no tendrá posibilidad de identificarlo, lo que garantiza que sus datos y los resultados siempre serán confidenciales y no se darán a conocer a otras personas, ni se mencionarán en cualquier publicación de los resultados.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con el Dr. Gustavo Eduardo García Becerril Tel. 56 27 69 40 Extensión 22209. En un horario de Lunes a Viernes de 7:00 a 13:30 H.

En caso de dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación puede comunicarse al 56276900 ext. 21230 de 8 a 16 horas, o al correo electrónico: comite.eticainv@imss.gob.mx

Declaración de consentimiento informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre, firma y dirección del Testigo 1

Parentesco con participante

Fecha

Nombre, firma y dirección del Testigo 2

Parentesco con participante

Fecha

IMSS SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx

Anexo 3. Carta de consentimiento informado para pacientes controles.



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud
UMAE Hospital de Cardiología/ UMAE Hospital de Pediatría



Clinica de Insuficiencia Cardiaca/UIM en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

México, Distrito Federal a _____ de _____ de 201_____

Proyecto: *Expresión del Receptor Adenovirus-Coxsackievirus (CAR) identificado por RT-PCR en tiempo real en tejido endomiocárdico de pacientes con miocarditis.*

Lo estamos invitando a participar en un proyecto de investigación que tiene como propósito evaluar si la presencia y niveles de una proteína (proteína CAR) en las muestras de tejido cardíaco de individuos que tienen Miocarditis (inflamación del corazón causada generalmente por un virus) es distinta a la de personas con corazón normal. También queremos evaluar si la cantidad de proteína varía de acuerdo a la gravedad de la miocarditis. Se le hace esta invitación porque en usted se sospechó que pudiera tener Miocarditis, lo cual fue descartado mediante la biopsia que se le realizó. Usted formará parte del grupo control (sin miocarditis). Su participación en el protocolo es totalmente voluntaria, por favor lea la información que se encuentra a continuación, haga las preguntas que usted considere antes de tomar una decisión.

Su participación en el estudio consistirá en autorizar que una fracción de la biopsia (toma de tejido cardíaco) que le fue realizada como parte del estudio por sospecha de Miocarditis sea utilizada por nosotros, le aclaramos que esta fracción será "sobrante", esto es, la muestra que nos sea proporcionada por el servicio que las conserva, no interfiere con su diagnóstico o tratamiento. También contestará en una sola ocasión a unas preguntas relacionadas a sus enfermedades y algunos antecedentes ambientales y familiares; responder estas preguntas tomará un tiempo no mayor a cinco minutos.

No existe ningún riesgo por su participación en el estudio ya que no le haremos ningún procedimiento, ni toma de muestras adicionales y el cuestionario no contiene preguntas que lo pudieran hacer sentir incómodo.

Si bien usted no recibirá un beneficio directo al participar en el estudio, los resultados permitirán conocer si la proteína CAR se asocia con la miocarditis y con la forma en que la enfermedad se presenta, lo que pudiera ser de utilidad en el futuro para pacientes con Miocarditis.

Su participación en este proyecto es voluntaria y su deseo de participar o no hacerlo, no tendrán ninguna implicación en la atención médica que usted recibe por parte de nuestra institución.

Para asegurar que sus datos permanecerán confidenciales en este proyecto, le informamos que sus muestras se marcarán con códigos (un número consecutivo), separados de sus datos personales y clínicos, por lo que quién las maneje no tendrá posibilidad de identificarlo, lo que garantiza que sus datos y los resultados siempre serán confidenciales y no se darán a conocer a otras personas, ni se mencionarán en cualquier publicación de los resultados.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podrá dirigirse con el Dr. Gustavo Eduardo García Becerril Tel. 56 27 69 40 Extensión 22209. En un horario de Lunes a Viernes de 7:00 a 13:30 H.

En caso de dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación puede comunicarse al 56276900 ext. 21230 de 8 a 16 horas, o al correo electrónico: comite.eticainv@imss.gob.mx

Declaración de consentimiento informado:

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me ha dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre y firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre, firma y dirección del Testigo 1

Parentesco con participante

Fecha

Nombre, firma y dirección del Testigo 2

Parentesco con participante

Fecha

IMSS SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comision.etica@imss.gob.mx