



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

“PARTICIPACION DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES HLA,
TNF ALFA Y HSP70 EN LA SUSCEPTIBILIDAD AL
DESARROLLO A LA CARDIOMIOPATIA DILATADA EN LA
POBLACION MEXICANA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS

P R E S E N T A:

Q.C. JOSE MANUEL RODRIGUEZ PEREZ

TUTOR: DR. GILBERTO VARGAS ALARCON



MEXICO, D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. VICTORIA EUGENIA CHAGOYA HAZAS

SECRETARIO: DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN

VOCAL: DRA. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

VOCAL: DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ

VOCAL: DRA. MARTHA ESTHELA PÉREZ RODRÍGUEZ



EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE GENÓMICA DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”.

AGRADECIMIENTOS

A mi amada esposa Nonanzit, por todo el amor que me brindaste estos años durante mi formación académica. Gracias por entenderme y apoyarme en esta nueva profesión.

A mis Padres Paula y José Manuel, les agradezco todas sus oraciones, apoyo y confianza que me dieron, cuando decidí separarme de ustedes apenas a los 14 años por motivos académicos y así emprender una vida que el día de hoy culmina con este logro. A pesar de la distancia que casi siempre nos ha separado los quiero y cada día los extraño más.

Al Dr. Gilberto Vargas, gracias por darme la oportunidad de pertenecer a su selecto grupo de investigación, así como también por enseñarme el sentido de la responsabilidad.

Al Dr. Julio Granados, por haberme aceptado para la realización de mi servicio social en investigación y así encaminarme en este medio.

Al Dr. Jorge A. Ruiz, por su amistad y por su gran calidad humana.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado por las becas otorgadas durante el desarrollo del presente trabajo para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Biomédicas.

INDICE

Abreviaturas	1
Lista de Tablas	2
Lista de Figuras	3
Resumen	4
Abstract	6
I. Introducción	7
I.1 Cardiomiopatía dilatada idiopática	9
I.1.1 Anatomía patológica	10
I.1.2 Diagnóstico	13
I.1.2.1 Exploración física	13
I.1.2.2 Radiografía de tórax	14
I.1.2.3 Electrocardiograma	15
I.1.2.4 Ecocardiograma en modo M	15
I.1.2.5 Ecocardiografía bidimensional	16
I.1.2.6 Ecocardiografía doppler	16
I.1.2.7 Estudios isotópicos	16
I.1.2.8 Cateterismo cardiaco	17
I.1.2.9 Biopsia endomiocárdica	17
II. Antecedentes	18
II.1 Patogenia de la Cardiomiopatía dilatada	18
II.1.2 Hipótesis viral e inmunológica	18

II.1.3 Alteraciones por defectos moleculares	22
III. Complejo Mayor de Histocompatibilidad	23
III.1 Región de clase I	23
III.2 Región de clase II	24
III.3 Región de clase III	25
III.4 Inmunobiología de las moléculas HLA clase I y clase II	26
IV Marcadores HLA en la Cardiomiopatía dilatada	31
V Genes de clase III de relevancia en la Cardiomiopatía dilatada	32
VI Objetivo general	41
VI.1 Objetivos particulares	41
VII Justificación	42
VIII Hipótesis	43
IX Metodología	44
IX.1 Sujetos de estudio	44
IX.2 Criterios de inclusión	44
IX.3 Criterios de exclusión	45
IX.4 Diseño experimental	45
X Análisis estadístico	46
XI Resultados	47
XII Discusión	52
XIII Conclusiones	57
XIV Anexos	58
XIV.1 Técnica de extracción de ADN genómico	58

XIV.2 Fórmulas para la preparación de soluciones	60
XIV.3 Amplificación de los genes del TNF- α en las posiciones -238 y -308	61
XIV.4 Purificación de los productos amplificados	62
XIV.5 Condiciones de amplificación para la PCR de secuenciación	63
XIV.6 Purificación de los productos de PCR de secuenciación	64
XIV.7 Secuenciación	65
XIV.8 Amplificación y tipificación de los genes clase II por secuencia específica de oligonucleótidos (PCR-SSO)	66
XIV.9 Tipificación del polimorfismo del gen HSP70 hom	68
XV Bibliografía	70
XVI Glosario	88
XVII Artículo publicado	91

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA	American Heart Association
ARN	Ácido ribonucleico
CD	Cardiomiopatía dilatada
CDI	Cardiomiopatía dilatada idiopática
CLIP	Péptido de cadena invariable asociado a clase II
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CPA	Células presentadoras de antígeno
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
ISFC	Internacional Society and federation of Cardiology
LMP	Subunidad del proteosoma
MIIC	Compartimento de clase II del CMH
OMS	Organización Mundial de la Salud
REG	Retículo endoplásmico rugoso
TAP	Transportador asociado al procesamiento de antígenos
TCR	Receptor de células T

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones de cardiomiopatías: 1980 vs. 1995.

Tabla 2. Clasificación de cardiomiopatías: 1980 vs. 1995.

Tabla 3. Lista de defectos moleculares.

Tabla 4. Diferentes condiciones que inducen la expresión de Hsp.

Tabla 5. TNF- α en enfermedades cardiovasculares en diferentes poblaciones.

Tabla 6. Frecuencias alélicas (fa) de alelos HLA-DRB1 en pacientes con CDI y grupo control.

Tabla 7. Frecuencias alélicas (fa) de alelos HLA-DQB1 en pacientes con CDI y grupo control.

Tabla 8. Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) de TNF α -238 y -308 en pacientes con CDI y grupo control.

Tabla 9. Frecuencias alélicas (fa) y genotípicas (fg) de HSP-70 hom en pacientes con CDI y grupo control.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Corazón de un paciente con Cardiomiopatía dilatada.

Figura 2. Mecanismo autoinmune en el corazón debido a una infección viral.

Figura 3. Organización del Complejo principal de histocompatibilidad.

Figura 4. Moléculas de clase I y II.

Figura 5. Activación de respuestas inmunitarias.

Figura 6. Conformación génica del TNF- α

RESUMEN

La cardiomiopatía dilatada (CDI) puede ser considerada como un síndrome clínico y fisiopatológico caracterizado por disfunción miocárdica y dilatación del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos con hipertrofia inapropiada. A la fecha es controversial la etiología de esta patología, existen diferentes hipótesis que se han propuesto para explicar el daño del tejido cardíaco; dentro de éstas destacan la viral e inmunológica. La región de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), es la región que más se ha asociado con riesgo a desarrollar CDI, dentro de esta región el locus HLA-DRB1 es el más importante. Varios alelos del locus HLA-DRB1 se han asociado con riesgo para desarrollar CDI. Adicionalmente, el locus HLA-DQB1 (clase II) y los loci TNF- α y HSP-70 hom (clase III) se han asociado con CDI. En el presente trabajo, se investigó la asociación de los genes HLA-DRB1, DQB1, TNF- α (-238, -308) y HSP-70 hom con riesgo a desarrollar cardiomiopatía dilatada idiopática en la población mexicana.

Se incluyeron 55 pacientes mexicanos no relacionados con CDI y 99 controles sanos no relacionados. Se obtuvieron leucocitos de sangre periférica para la extracción de ADN. La tipificación genérica de los locus HLA-DRB1 y DQB1 se realizó por PCR-SSO. Para la tipificación de los polimorfismos en los genes TNF- α (-238 y -308), se utilizó secuenciación automática y para la determinación del polimorfismo de HSP-70 hom, se usó PCR-RFLP. El análisis de los datos se realizó con el software epiinfo versión 5.0.

En los resultados, en el caso de los pacientes se observó un incremento en la frecuencia del alelo HLA-DR4 al comparar con los controles (pC 0.02, RM= 1.87, IC95%= 1.08 – 3.23). Así como también presentaron disminución en la frecuencia del alelo HLA-DR11 (pC= 0.03, RM= 0.26, IC95%= 0.06 – 0.95). Cuando analizamos el locus DQB, se encontró un incremento en las frecuencias de los alelos HLA-DQB*0301 (pC= 0.02, RM= 1.92, IC95%=3.48) y HLA-DQB*0302 (pC= 0.02, RM= 1.87, IC95%= 3.23) en el grupo de los pacientes con CDI con respecto al grupo control. Los pacientes también mostraron una disminución en la frecuencia de los alelos HLA-DQB*0201 (pC= 0.04, RM=0.41, IC95%= 0.17 – 0.97). Con respecto al polimorfismo del TNF- α en la posición -238 y -308, presentaron frecuencias alélicas y genotípicas similares en el grupo de pacientes con CDI con respecto al grupo control.

Por último, en el polimorfismo del gen de hsp70 hom, se obtuvieron frecuencias alélicas y genotípicas similares en el grupo de pacientes con CDI cuando se compararon con el grupo control.

Por lo que se concluye que el alelo HLA-DR4 está asociado con la susceptibilidad al desarrollo de la CDI y el alelo HLA-DR11 podría ser un marcador de protección genética para la enfermedad. Los alelos HLA-DQB*0301 y *0302 se encuentran asociados como marcadores de susceptibilidad genética para la CDI. El alelo DQ*0201 podría ser un marcador de resistencia genética para la CDI. Los polimorfismos del TNF- α y de la HSp-70 hom sus frecuencias fueron similares al comparar los pacientes con el grupo control.

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the relationship between class II major histocompatibility complex (MHC) genes (HLA-DR and HLA-DQB) and class III region TNF-alpha gene -238, -308 and HSP70-hom gene and the genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) in Mexican patients. These polymorphisms were analyzed in 53 patients with IDC and 99 ethnically matched healthy controls. The HLA-DR and DQB alleles were determined using the polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) technique. A restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to genotype the HSP70-hom polymorphism whereas the TNF-alpha -238 and -308 polymorphisms were assessed by sequencing analysis. The observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium. IDC patients showed increased frequencies of HLA-DR4 (pC=0.02, OR=1.87), HLA-DQB1*0301 (pC=0.02, OR=1.92) and HLA-DQB1*0302 (pC=0.02, OR=1.87) when compared to healthy controls. On the other hand, IDC patients also showed decreased frequencies of HLA-DR11 allele (pC=0.03, OR=0.26) and HLA-DQB1*0201 (pC=0.04, OR=0.41). With respect to HSP70-hom and TNF-alpha -238 and -308, the allele and genotype distributions of the polymorphisms tested were similar among cases and controls.

These data suggest that variation in class II HLA alleles could be a genetic factor involved in the susceptibility to IDC in the Mexican Mestizo population.

I. INTRODUCCIÓN:

Las cardiomiopatías son enfermedades del miocardio asociadas con disfunción cardíaca (Fatkin D et al. 2002). La incidencia y prevalencia de las cardiomiopatías está en aumento y están siendo consideradas una causa importante de morbilidad y mortalidad. Sin embargo, diferentes definiciones y clasificaciones se han encontrado en la literatura, esto debido a los avances en el diagnóstico y en el conocimiento de los agentes causales de éstas.

Las cardiomiopatías según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1980, constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por la afección directa del miocardio de causa desconocida. Las distingue así de las disfunciones cardíacas secundarias a enfermedades como la Hipertensión Arterial, Cardiopatía Isquémica o Valvulopatías (Brandenburg RO et al. 1980).

En consecuencia con lo anterior, en el año 1995, la OMS con la International Society and Federation of Cardiology (ISFC) hizo extensivo el concepto e incluyó en la clasificación a todas las enfermedades que comprometen al miocardio y fueron definidas como “enfermedades del miocardio que causan disfunción cardíaca”. (Richardson P et al. 1995).

En el 2006, la American Heart Association (AHA) publicó la siguiente definición: “ Las cardiomiopatías son un conjunto heterogéneo de enfermedades del miocardio asociadas con disfunción mecánica y/o eléctrica, que presentan inapropiada hipertrofia o dilatación y que son debidas a una variedad de causas que son frecuentemente genéticas. Las cardiomiopatías pueden estar confinadas al corazón o ser parte de un desorden sistémico generalizado y a menudo conducen a muerte cardiovascular o insuficiencia cardiaca progresiva”. (Maron BJ et al. 2006).

Tabla 1. Definiciones de cardiomiopatías: 1980 vs. 1995

1980	1995
Cardiomiopatía: Enfermedad del músculo cardiaco de causa desconocida.	Cardiomiopatía: Enfermedad del miocardio asociada con disfunción cardiaca.
Enfermedades específicas del músculo cardiaco. Enfermedad del músculo cardiaco de causa conocida o asociada con trastornos de otros sistemas.	Cardiomiopatía específica: Enfermedad del músculo cardiaco asociado con trastornos sistémicos o cardiacos específicos.

Tomado de Thiene G et al. 2004.

Tabla 2. Clasificación de cardiomiopatías: 1980 vs. 1995

1980	1995
Dilatada	Dilatada
Hipertrófica	Hipertrófica
Restrictiva	Restrictiva
	Arritmogénica del ventrículo derecho

Tomado de Thiene G et al. 2004.

I.1 Cardiomiopatía Dilatada Idiopática (CDI).

La cardiomiopatía dilatada (CD) puede ser considerada como un síndrome clínico y fisiopatológico caracterizado por disfunción miocárdica y dilatación del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos con hipertrofia inapropiada (Ammash NM et al. 2000, Mann et al. 2005). Sin embargo en la práctica clínica continúa empleándose el término cardiomiopatía dilatada tanto para los casos idiopáticos (CDI) como para los secundarios, al tratarse del mismo concepto fisiopatológico en ambos (Felker GM et al. 2000, Mann DL et al. 2005).

I.1.1 Anatomía patológica

El examen necrópsico del corazón muestra aumento del tamaño con dilatación de las cuatro cámaras. En la figura 1 se muestra el corazón de un paciente con CDI. El espesor de la pared ventricular puede estar disminuido debido a la dilatación, aunque un incremento de peso del corazón suele reflejar que la hipertrofia ha ocurrido (Mann DL et al. 2005).

Las válvulas son anatómicamente normales, pero la mitral y la tricúspide pueden presentar dilatación de sus anillos, y elongación de los músculos papilares. Las arterias coronarias suelen ser también normales, aunque la CDI puede coexistir con enfermedad coronaria. Con frecuencia se encuentran trombos murales en aurículas o ventrículos (Hare JM et al. 1992).

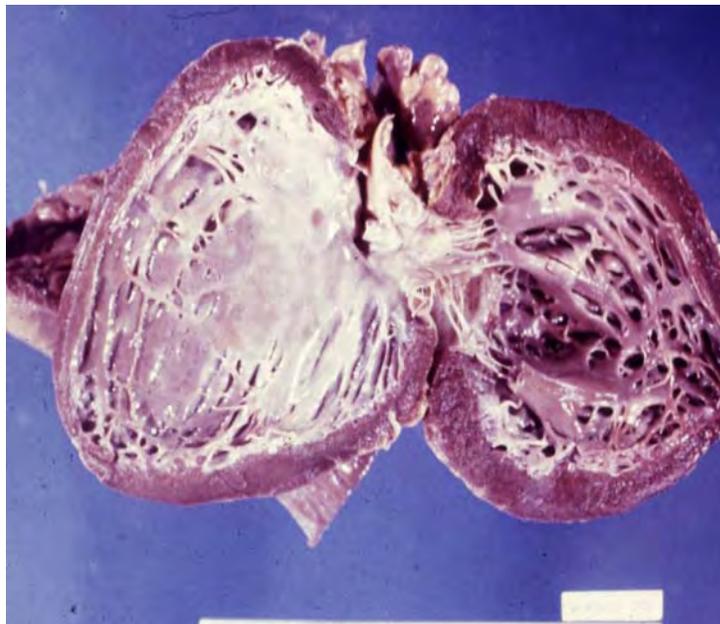


Figura 1. Corazón de un paciente con Cardiomiopatía Dilatada Idiopática (Tomada de un paciente en el departamento de patología del INCICH).

En el exámen histológico puede aparecer un miocardio básicamente normal, aunque es frecuente la existencia de áreas de degeneración de las células miocárdicas con fibrosis, necrosis de fibras musculares e infiltración celular (Hare JM et al. 1992).

A nivel molecular se observa disminución en la expresión del RNA mensajero para la cadena pesada de la miosina (Abraham WT et al. 2002).

Los síntomas y signos de la CDI son consecuencia de la disfunción sistólica presente en esta enfermedad. Los síntomas iniciales de la CDI suelen desencadenarse con el desarrollo de actividades físicas, siendo generalmente los síntomas más precoces el cansancio fácil y la disnea de esfuerzo.

La disnea, deriva de la congestión venosa pulmonar y constituye el síntoma principal de la insuficiencia cardíaca izquierda. Dependiendo del grado de aumento de la presión en la aurícula izquierda, la disnea puede presentarse con distintos grados de severidad, bien acompañado a las actividades físicas habituales, puede dar paso a disnea de mínimos esfuerzos o disnea de reposo, suponiendo ésta última la limitación absoluta de la actividad física por la sensación de falta de aire. La ortopnea, o aparición de sensación disneica al adoptar la posición horizontal, suele aparecer pocos minutos después del decúbito por el incremento brusco del retorno venoso. Sede al incorporarse, obligando al paciente a dormir con varias almohadas o en sillón. Los ataques agudos de disnea suelen aparecer durante la noche (disnea paroxística nocturna) y habitualmente sin un factor evidente que los desencadene. (Goodwin JF et al 1961).

Es frecuente la aparición de tos seca precediendo a la disnea nocturna. El edema agudo del pulmón supone la forma más grave de disnea.

Cursa con sensación de asfixia muy intensa, tos seca, esputo rosado o hemoptisis franca y ruidos respiratorios, pudiendo llegar a ser mortal en los casos más severos. Puede ser desencadenado por un factor agravante que se suma a la situación de insuficiencia cardiaca preexistente como puede ser un infarto agudo de miocardio, una arritmia o una crisis hipertensiva. Algunos pacientes pueden no presentar disnea o tolerar bien el decúbito a pesar del edema pulmonar, especialmente en los casos crónicos o cuando se asocia una insuficiencia ventricular derecha grave. Un síntoma poco frecuente es la disfagia, que se produce porque la vena pulmonar izquierda muy distendida, llega a comprimir y obstruir el esófago llegando a dificultar el paso de los alimentos (Jacobs RC et al. 1972).

Los síntomas derivados de la congestión venosa sistémica suelen comenzar como aumento del peso corporal y edemas de miembros inferiores. Los edemas afectan de forma simétrica a ambas piernas, predominantemente en pies y tobillos, empeorando durante el día y mejorando con el decúbito. Es frecuente también la presencia de dolor en hipocondrio derecho motivado por distensión de la cápsula hepática al aumentar el tamaño de hígado por la congestión.

De los síntomas derivados del bajo gasto cardiaco, el de más frecuente presentación es el cansancio o fatiga muscular, que imposibilita al paciente para la realización de actividades habituales. Un síntoma también frecuente son las palpitaciones. Estas pueden ser debidas a taquicardia sinusal que puede estar presente aún en reposo, o al desarrollo de otro tipo de arritmias tanto supraventriculares como ventriculares. Entre ellas la más frecuente es la fibrilación auricular que aparece en un 25% de los casos.

I.1.2 Diagnóstico

El diagnóstico de la CDI se basa en un grupo de signos y síntomas de fracaso cardiaco izquierdo y derecho, así como en la realización de una serie de pruebas diagnósticas complementarias. Es posible el diagnóstico en fases tempranas asintomáticas, pero nunca se realizará antes de que se haya producido la dilatación de las cámaras.

I.1.2.1 Exploración física

Puede aportar datos orientativos para el diagnóstico sobre todo en fases avanzadas, ya que en fases tempranas con sintomatología mínima o nula no suele ofrecer mucha información.

La detección de signos de congestión venosa sistémica pasa por venas del cuello en busca de hipertensión venosa yugular, la palpación del hígado para la detección de hepatomegalia.

La congestión venosa pulmonar se manifiesta fundamentalmente por disnea, taquipnea a la auscultación. Estos predominan en las regiones pulmonares declives, por lo que suelen aparecer de forma simétrica en ambos pulmones. El derrame pleural, sobre todo cuando es bilateral, puede ser signo de congestión venosa pulmonar ya que las venas pleurales drenan parcialmente en las venas pulmonares.

Los signos de bajo gasto cardiaco se manifiestan también en los casos evolucionados. Puede presentarse como cianosis periférica debida a incremento de la extracción tisular de oxígeno, pulsos arteriales débiles y filiformes o signos de venoconstricción y arterioconstricción periférica.

Es posible detectar un pulso alternante que es signo de disfunción ventricular izquierda. La palpación y auscultación del corazón puede aportar una serie de signos sugerentes de disfunción ventricular. Suele existir un desplazamiento lateral y caudal del impulso apical. A la auscultación pueden escucharse soplos de insuficiencia mitral o tricúspide. La presencia de un tercer ruido apical suele estar relacionado con dilatación de cámaras, aumento de la presión auricular izquierda y reducción del gasto cardiaco, mientras que un cuarto ruido apical está relacionado con el descenso de la distensibilidad ventricular y con una contracción auricular fuerte. La coexistencia de tercer y cuarto ruidos produce un ritmo cuádruple que en casos de taquicardia da lugar al ritmo de galope.

I.1.2.2 Radiografía de tórax

Se suele observar cardiomegalia con dilatación de las cuatro cámaras, así como signos de congestión venosa pulmonar. Así, puede encontrarse redistribución superior de la vasculatura pulmonar, aumento del tamaño de los hilos o una disminución generalizada de la vascularización (signo de insuficiencia derecha). Así mismo, signos de edema pulmonar intersticial o alveolar pueden estar presentes (Foseca C et al.2004).

I.1.2.3 Electrocardiograma

El electrocardiograma (ECG) muestra habitualmente cambios no específicos. Son frecuentes los signos de crecimiento auricular izquierdo o biauricular, así como cierto grado de hipertrofia ventricular izquierda. En un pequeño número de pacientes, pueden observarse ondas que simulan necrosis cardiaca y que son originadas en zonas de fibrosis ventriculares extensas que se comportan eléctricamente silentes. Las alteraciones electrocardiográficas más importantes en la CDI son las arritmias. De ellas, la más frecuente es la fibrilación auricular. La taquicardia ventricular suele darse en casos sintomáticos con disfunción ventricular, siendo una causa frecuente de muerte súbita en estos pacientes (Morgera T et al. 2004).

I.1.2.4 Ecocardiografía en modo M

Puede mostrar un aumento del tamaño de las cavidades, un espesor de las paredes frecuentemente normal y una disminución en la fracción de acortamiento.

I.1.2.5 Ecocardiografía bidimensional

Permite observar el corazón desde varios planos y en tiempo real, consiguiendo un cálculo más preciso del tamaño de las cámaras y el estudio de defectos segmentarios de contractilidad. Esto último consigue la detección de áreas infartadas, manteniendo buena correlación con estudios isotópicos y electrocardiográficos (Maione S et al.1983).

I.1.2.6 Ecocardiografía doppler

Permite comprobar en muchos casos las regurgitaciones valvulares mitral y tricúspide, incluso en ausencia de soplos. Pueden calcularse las presiones de ventrículo derecho y de arteria pulmonar. Para controlar la evolución de los enfermos, pueden realizarse mediciones de gasto cardiaco mediante Doppler, combinadas con el cálculo de la fracción de eyección y la dilatación de las cámaras obtenidos por eco bidimensional (Teske AJ et al.2007).

I.1.2.7 Estudios isotópicos

La ventriculografía isotópica permite calcular la fracción de eyección y el gasto cardiaco con muy buena reproducibilidad con los obtenidos con los estudios hemodinámicos, así como valorar alteraciones globales o segmentarias de la contractilidad. Puede utilizarse como medida no invasiva de la función sistólica en estudios seriados para valorar la evolución de la enfermedad (Bengel FM et al. 2000).

I.1.2.8 Cateterismo cardiaco

El cateterismo cardiaco podría estar indicado para valoración de la gravedad de alteraciones valvulares, comprobar la existencia de patología coronaria asociada, o valorar los efectos de intervenciones terapéuticas. Pueden encontrarse un aumento de las presiones de llenado ventriculares, reducción del gasto cardiaco o aumento de las presiones en arteria pulmonar (Hare JM et al. 1992).

Algunos de estos parámetros se han relacionado con la mortalidad de la CDI. La ventriculografía muestra un ventrículo izquierdo de tamaño aumentado que se contrae débilmente.

I.1.2.9 Biopsia endomiocárdica

Puede dar el diagnóstico de certeza en algunos casos concretos de CDI. Sin embargo no se recomienda su realización rutinaria ya que el hallazgo más frecuente es el de una fibrosis miocárdica inespecífica (Mills RM et al. 2004, Ardehali, H et al. 2004).

II. ANTECEDENTES:

II.1 Patogenia de la Cardiomiopatía dilatada:

Las bases patológicas de la cardiomiopatía dilatada han sido un tema de amplio debate en las últimas décadas, a la fecha se han propuesto los posibles mecanismos:

II.1.2 Hipótesis viral e inmunológica:

Uno de los mecanismos patológicos que se ha propuesto para explicar el daño al tejido cardíaco es el mecanismo viral. En esta hipótesis se ha postulado que la cardiomiopatía dilatada es una consecuencia directa de necrosis en miocitos causado por una infección viral (coxsakie B) debido a infiltración de células inflamatorias en el miocardio (Spotnitz MD et al. 2006).

También se ha propuesto una hipótesis, en donde la infección viral podría resultar en una enfermedad autoinmune (Caforio AL et al. 1997). En la Figura 2 se esquematiza esta hipótesis.

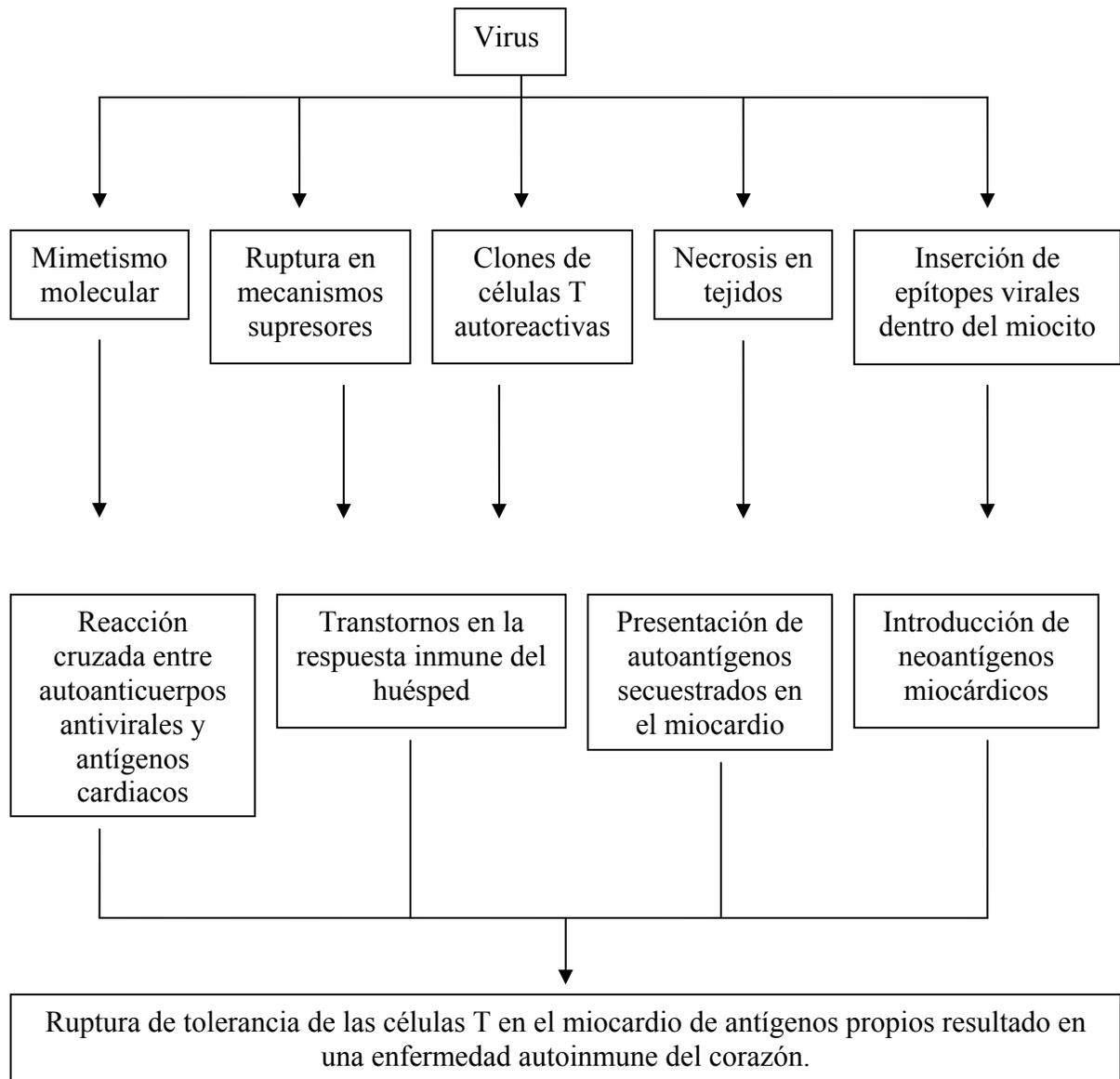


Figura 2. Mecanismo autoinmune en el corazón debido a una infección viral.

Tomado de Caforio AL et al. 1997.

Nota: Esta figura representa solo la hipótesis, por la cual se cree que así se origine la respuesta de tipo autoinmune; sin embargo, esto no ha sido demostrado a la fecha.

Lit et al en el año 2000 estudiaron necropsias de tejido cardiaco en 14 pacientes con enfermedad de Keshan (una forma endémica de cardiomiopatía dilatada) en población China, encontrando en 9 de los pacientes residuos de enterovirus (Li Y et al. 2000). También estos autores analizaron 19 biopsias de muestras de tejido miocárdico de pacientes con miocarditis y cardiomiopatía dilatada y estudiaron 11 controles quienes murieron accidentalmente o por causa diferente a enfermedad cardiovascular, encontrando antígenos virales que fueron detectados por inmunohistoquímica. En particular hubo presencia de antígenos virales en 9 de los 11 casos de miocarditis y para cardiomiopatía dilatada 6 casos de los 8 y en el grupo control no hubo evidencia alguna de antígenos virales (Li Y et al. 2000).

Por otro lado, en un estudio en biopsias en el ventrículo izquierdo de 19 pacientes asintomáticos con cardiomiopatía dilatada, realizaron ensayos de PCR para detectar la presencia de material genómico de adenovirus, enterovirus o citomegalovirus. Como grupo de controles positivos usaron tejidos miocárdicos de pacientes quienes murieron de miocarditis aguda. Dando como resultado solo en 2 casos la presencia de RNA viral, por lo cual, los autores sugieren que los virus no participan en el rol patogénico de la cardiomiopatía dilatada. Posteriormente, en un estudio realizado en el 2004, Fujioka reporta 30 pacientes Americanos y 47 pacientes Japoneses con CDI y encuentra la presencia de genomas virales en 7 de 30 pacientes Americanos y 15 de 47 pacientes Japoneses (Fujioka S et al 2004).

En el 2005 Kühl et al estudiaron biopsias endomiocrdicas de 245 pacientes con disfunción del ventrículo izquierdo. Hicieron uso de PCR y RT-PCR para determinar la presencia de material genómico de enterovirus, adenovirus, citomegalovirus humano, virus herpes simple, virus Epstein-Barr, virus herpes 6 humano, parvovirus B19 y virus de la influenza A y B. Encontrando el 67.4% del material viral genómico amplificado en el total de las muestras y con una distribución del 9.4% para enterovirus, 1.6% para adenovirus, 51.4% para parvovirus B19, 21.6% para virus herpes 6 humano, 2% para Epstein-Barr, 0.8% para citomegalovirus humano. Concluyendo, que las diferentes infecciones virales podrían ser consideradas como factores que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (Kühl U et al. 2005).

Por otro lado, se han detectado autoanticuerpos contra miosina, receptores beta-adrenérgicos en el suero de pacientes con CD (Cafalorio AL et al. 1996, Matsui S et al. 1995). También se ha demostrado por estudios la expresión de genes de las proteínas de choque térmico en biopsias de pacientes en el ventrículo izquierdo (Latif N et al. 1999).

Algo que hay que comentar es que durante una infección viral se puede inducir daño al miocardio, lo que conllevaría a la producción de anticuerpos y estos a la vez podrían perpetuar este daño. Por lo cual esta producción de anticuerpos podrían deberse como una respuesta secundaria al daño miocárdico debido a la isquemia por la alteración de autoantígenos que normalmente son secuestrados por el sistema inmune (Fu M and Matsui S. 2002).

II.1.3 Alteraciones por defectos moleculares

Estudios moleculares desarrollados en familias con CD han demostrado defectos genéticos que codifican para proteínas, las cuales, podrían ser causas primarias de CD, o podrían actuar como factores predisponentes de la enfermedad.

Tabla 3. Lista de defectos moleculares en CD

GEN	PROTEINA
DES	Desamina
SGCD	Sarcoglicano
MYH7	Miosina
TNNT2	Troponina T
TPM1	Tropomiosina
TTN	Titina
VCL	Metavinculina
ACTN	Actina

Tomada de Fatkin et al. 2002.

I.I.I COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad del humano (MHC, del inglés, Mayor de Histocompatibility Complex) abarca aproximadamente 4 Mb (Megabases) de ADN y se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 en la banda 6p21.3. Mas de 220 genes han sido localizados en la región del MHC y aproximadamente el 10 % de éstos están relacionados con la respuesta inmune (Campbell RD and Trowsdale J 1997, The MHC sequencing consortium, 1999, Beck S and Trowsdale J, 2000). El MHC se divide en tres regiones llamadas clase I, clase II y clase III (Figura 3).

I.I.I.1 Región de clase I. La región de clase I es telomérica y se extiende 2 Mb de ADN conteniendo 3 principales loci, los cuales son altamente polimórficos y codifican para las moléculas HLA-A, HLA-B y HLA-C que se expresan en la mayoría de las células nucleadas. En la misma región se localizan otros genes llamados no clásicos de clase I que codifican para las moléculas HLA-E, HLA-F y HLA-G.

Las moléculas HLA clase I están formadas por una cadena α y una cadena β . El gen de la cadena α está formado por 6 o 7 exones. El exón 1 contiene la región 5' no traducida (5'UTR) del ARNm y codifica para la secuencia del péptido líder. Los exones 2, 3 y 4 codifican para tres dominios llamados α_1 , α_2 y α_3 , respectivamente (Ways JP et al. 1985); los dominios α_1 y α_2 contienen los sitios polimórficos de unión a péptidos antigénicos, que son procesados y presentados por las células de antígenos (CPA) y son llamados sitios de unión al péptido. El dominio α_3 es conocido como dominio similar a la familia de las inmunoglobulinas. El exón 5 codifica para el péptido de conexión y para la región transmembranal. El exón 6 codifica para la región citoplasmática y el exón 7 contiene la región 3' no traducida (3'UTR).

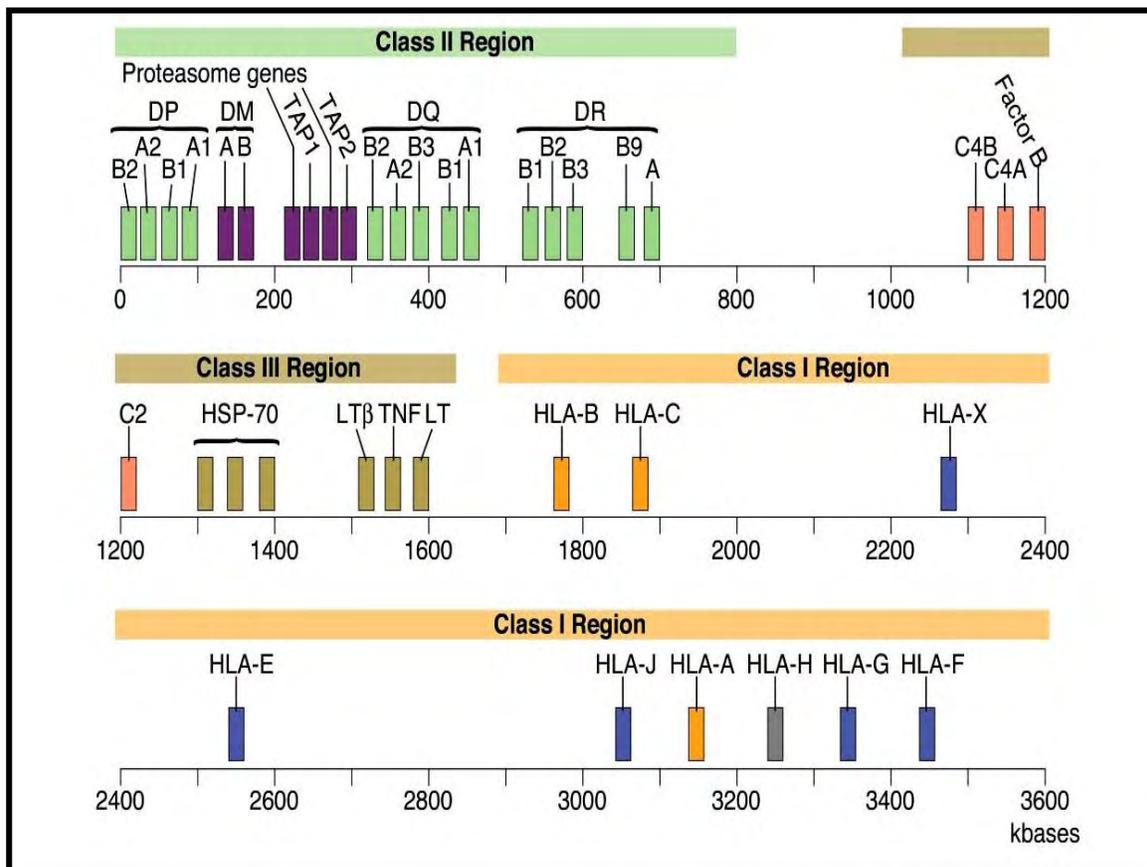


Figura 3. Organización del Complejo Mayor de Histocompatibilidad. (Tomada de Carrascal-Pérez M. 2005)

I.I.I.2 Región clase II. La región de clase II es centromérica y se extiende 0.8 Mb. En esta región se localizan 5 loci que codifican para las siguientes moléculas de HLA: HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DP, HLA-DM y HLA-DO, así como otros 4 loci de genes que participan en el procesamiento de antígenos que son presentados por moléculas de clase I; éstos son los genes LMP2 y LMP7 que codifican para las sub-unidades del proteosoma y los genes TAP1 y TAP2 que codifican para proteínas de la familia de los transportadores ABC.

Las moléculas de clase II están formadas por 2 cadenas polipeptídicas α y β que se expresan en las células presentadoras de antígenos, las cadenas polipeptídicas son codificadas por 2 genes diferentes HLA-DRB1 y HLA-DRA1, formados por 6 y 5 exones, respectivamente. El exón 1 de ambos genes contiene la región 5'UTR y codifica para el péptido señal; el exón 2 de cada gen codifica para el dominio α 1 y β 1, este último formando la región polimórfica de las moléculas HLA-DR. En el caso de las moléculas HLA-DQ ambos dominios contribuyen al amplio polimorfismo de estas moléculas. El exón 3 codifica para el dominio de las inmunoglobulinas en ambas cadenas y el resto de los exones codifican para las regiones transmembranal, péptidos de conexión, cola citoplasmática, y la región 3'UTR se localiza en el último exón (Ways JP et al. 1985). (Figura 4)

I.I.I.3 Región de clase III. La región de clase III o región central abarca un segmento de aproximadamente 700 kb (kilobases) localizada entre la región de clase I y II. A diferencia de las regiones clase I y clase II, los genes de clase III no participan en la degradación y presentación de antígenos, pero si contiene genes que participan en los procesos inflamatorios. Dentro de los genes de clase III se encuentran los que codifican para proteínas que están involucradas en la activación del complemento (C2, factor B [FB] y C4), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), linfotoxina β , proteínas de choque térmico de 70 Kd (HSP70-1, HSP70-2 y HSP70-hom), así como la enzima 21-hidroxilasa. (Vargas-Alarcón et al, 1993).

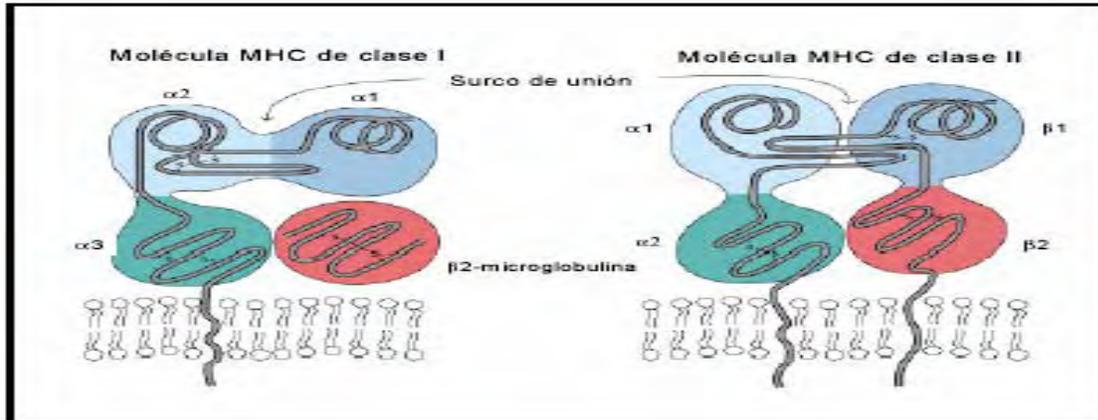


Figura 4. Moléculas de clase I y II. (Tomada de Carrascal-Pérez M. 2005)

I.I.I.4 Inmunobiología de las moléculas HLA clase I y clase II

Durante la respuesta inmune contra los patógenos, las moléculas HLA son importantes para distinguir si un antígeno durante su procesamiento viene del citosol (clase I) o de un compartimento vesicular (clase II).

HLA clase I. Las moléculas HLA clase I presentan antígenos originados en el citosol. Los antígenos virales son presentados por HLA clase I. Durante la infección viral, el virus es detectado por un receptor en las células presentadoras de antígenos y se introduce por endocitosis formándose la vesícula endocítica. Una vez que el virus está dentro del endosoma, el ADN viral es liberado de la cápside (cubierta proteica que protege el ADN viral) para ser liberado al citosol. Del citosol pasa al núcleo para integrarse al ADN huésped, dando lugar a la replicación viral. Una vez insertado el ADN viral, se inicia la transcripción y síntesis de las proteínas virales en el citosol.

Las proteínas virales del citosol son cortadas en péptidos por el complejo proteico llamado proteosoma del cual forman parte las moléculas de bajo peso molecular LMP2 y LMP7 (del inglés, Low Molecular Weight Proteins). Los péptidos originados en el proteosoma son transportados al retículo endoplásmico rugoso (RER) por las moléculas llamadas transportadores, asociados con el procesamiento de antígenos TAP (del inglés, Transporters associated with Antigen Processing). Dentro del RER, los péptidos se unen a las recién formadas HLA clase I.

Así, el péptido antigénico, unido a la molécula de HLA, sale de RER pasa a través del aparato de golgi, para finalmente expresarse en la superficie de la CPA. La CPA presenta el antígeno al receptor de células T (TCR) de los linfocitos CD8⁺, dicho reconocimiento desencadena una respuesta citotóxica contra las células blanco (Hughes EA et al. 1997, Belich MP and Trowsdale J, 1995).

HLA clase II. Las bacterias son el ejemplo de la clase de antígenos que son presentados por las moléculas de clase II. Los receptores extracelulares de las CPA reconocen las proteínas bacterianas y son interiorizadas, dando lugar a la formación del endosoma primario, el cual se fusiona con los lisosomas primarios del RER. Del lisosoma se liberan las enzimas líticas que degradan el péptido bacteriano, formándose el endosoma tardío. Las moléculas HLA clase II son sintetizadas en el RER, en el caso de HLA-DR, ésta se forma como un dímero formado por las cadenas α y β . A este dímero, dentro del RER, se le une otra cadena polipeptídica llamada cadena invariable, dando lugar a un trímero, el cual sale de RER y pasa al citoplasma a través del aparato de Golgi en un compartimiento especializado llamado MIIC (MIIC, del inglés MHC class II Compartment).

La unión del endosoma tardío con MIIC favorece la degradación de la cadena invariable, quedando sólo un pequeño péptido unido al surco de unión al péptido de la molécula HLA-DR y recibe el nombre de péptido de la cadena invariable asociado a clase II (CLIP, del inglés Class II-associated invariant chain péptide). En el RER se forma el dímero HLA-DM, el cual en el citoplasma se fusiona con MIIC; de esta forma, la molécula HLA-DM libera el CLIP de la molécula HLA-DR.

La ausencia del CLIP favorece la unión del péptido bacteriano al surco de unión al péptido de la molécula HLA-DR y posteriormente, el HLA-DR, con el péptido unido, es expresado por las células presentadoras de antígeno (Denzin LK et al. 1995, Nelson CA and Fremont DH 1999). Las moléculas de HLA clase II expresadas en la CPA presentan los antígenos al TCR de los linfocitos CD4⁺ para desencadenar una respuesta inmune contra los patógenos.

Selección de péptidos por el CMH. Este fenómeno está determinado principalmente por las características estructurales del surco de unión al péptido en la molécula HLA, lo que resalta la importancia de los polimorfismos en los genes HLA clase I y II, ya que las secuencias de los exones 2 y 3 de los genes HLA clase I determinan las características de los sitios de unión al péptido en las moléculas de HLA clase I, mientras que el exón 2 del gen HLA-DRB1 determina las características de los sitios de unión al péptido en las moléculas clase II. Los sitios de unión a los péptidos en las moléculas HLA son conocidos como “pockets” (P) (Collins EJ et al. 1994, Stern LJ et al. 1994).

Mecanismos de susceptibilidad a enfermedad y CMH

Moléculas HLA. Como ya se comentó, las moléculas de HLA clase I y II son altamente polimórficas, lo cual influye en el tipo de péptido que se une a una molécula de HLA en particular. Así por ejemplo, la diabetes mellitus tipo I se ha asociado con los alelos HLA-DQB1*0201 y *0302, estos alelos codifican para un polipéptido DQB1 que comparte una secuencia en un sitio de unión al péptido y que la distingue de otros alelos DQB1 que no se asocian con la diabetes mellitus tipo I (Kwok WW et al. 1995). La enfermedad de Goodpasture es otro ejemplo de cómo el polimorfismo influye en la susceptibilidad a la enfermedad; los alelos asociados con Goodpasture son DRB1*1501 y DRB1*0401, que comparten una secuencia que altera las características estructurales de la molécula HLA-DR a nivel de P4 en el surco de unión al péptido y, por lo tanto, el tipo de antígeno que se une. (Burns AP et al. 1995).

Se puede identificar una asociación HLA-enfermedad mediante una tipificación molecular de un locus del HLA, pero la asociación real puede ser con otros alelos ligados al alelo tipificado y que se heredan juntos. Este aspecto ha puesto de relieve el concepto de haplotipos de HLA extendidos, que hace referencia a grupos de genes ligados, tanto del HLA clásico como los genes adyacentes que no son del HLA, que tienden a heredarse juntos como una sola unidad.

Por otro lado en muchas enfermedades autoinmunitarias, las moléculas del HLA que no están relacionadas con la enfermedad sólo en sus hendiduras de unión al péptido.

Cabe mencionar que los residuos polimórficos de las moléculas del CMH se localizan en las hendiduras y en posición adyacente a ellas, y la estructura de las hendiduras es el determinante clave de las dos funciones de las moléculas del CMH, a saber, la presentación de antígenos y el reconocimiento por las células T. Por lo cual esto representa el principal concepto general de que las moléculas del CMH influyen en el desarrollo de autoinmunidad controlando la selección y la activación de células T.

Es importante mencionar que las secuencias del HLA asociadas a la enfermedad también se encuentran en individuos sanos. De hecho, si todos los sujetos portadores de un alelo del HLA asociado a una enfermedad específica se siguieran prospectivamente, se comprobaría que la inmensa mayoría nunca adquirirá la enfermedad. Por consiguiente, la expresión de un HLA determinado no es por sí misma la causa de una enfermedad autoinmunitaria, sino que puede ser uno de varios factores que contribuyen a la autoinmunidad (Abbas AK et al. 2002).

El mimetismo molecular es otro mecanismo que puede desencadenar una respuesta autoinmune, donde ciertas moléculas HLA presentan un antígeno extraño a las células T, desencadenando una respuesta inmune (reacción cruzada) en contra de proteínas propias del organismo. La reacción cruzada se desencadena debido a la similitud entre el antígeno y la proteína propia (mimetismo molecular) (Oldstone MB, 1998).

I.V MARCADORES HLA EN LA CARDIOMIOPATÍA DILATADA

Estudios previos han reportado el incremento en la frecuencia del antígeno HLA-DR4 en un grupo de pacientes con CD (Anderson JL et al. 1984). Posteriormente también se estableció un incremento en las frecuencias de los alelos HLA-Dr4, DRW6 y DQW4 en los pacientes con la enfermedad (Carlquist JF et al. 1991).

Otros estudios han reportado en pacientes caucásicos estableció, que los alelos que se asociaron con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad fueron el HLA-B15 y del HLA-DQ3 (Osa A et al. 1999). Un estudio en pacientes en población negroide demostró el incremento en la frecuencia de los antígenos de HLA-DR1 (Maharaj B et al. 1990). Otro estudio en pacientes de origen caucásico se ha asociado con el antígeno HLA-DR4, HLA-DR1 y HLA-DR5. Los subtipos de DR4 en estas poblaciones *0401, *0404 y *401. (Martinetti M et al. 1992). En la población China demostraron que el HLA-DA1*501 confirió susceptibilidad para la cardiomiopatía dilatada y el HLA-DQA1*201 confirió protección contra el padecimiento (Liu W et al. 2005).

V GENES DE CLASE III DE RELEVANCIA EN LA CARDIOMIOPATÍA DILATADA.

Hsp70. El gen de la proteína de choque térmico, codifica una proteína altamente inducible importante para la reparación, ensamblaje y transporte de proteínas a nivel intracelular (Beckman RP et al. 1990). Los genes estructurales están contenidos en el MHC entre el gen de C2 y los genes el TNF (Sargent CA et al. 1989).

Las proteínas de estrés fueron descritas por primera vez en 1962 por Ritossa en células de las glándulas salivares de *Drosófila*, después de ser expuestas a 37°C durante 30 minutos y a continuación a su temperatura normal de 25°C, lo que producía un incremento en la síntesis de proteínas con peso molecular de 70 y 26 kDa. Estas proteínas fueron llamadas heat shock proteins (Hsp) (Ritossa FM 1962).

Son proteínas presentes en todas las células que intervienen en la función de síntesis proteica, uniéndose a las proteínas nacientes para dirigir su plegamiento, lo que garantiza su estructura tridimensional y con ello su funcionamiento correcto. Además son capaces de unirse a péptidos y proteínas dañadas por diversos tipos de agresiones, facilitando su reparación o degradación. Cuando la célula se expone a circunstancias adversas se produce un rápido aumento en las concentraciones de Hsp. Son inducidas en respuesta a un amplio espectro de agresiones fisiológicas y ambientales: infección viral, inflamación, fiebre, exposición de las células a compuestos químicos, citocinas, anoxia, shock térmico, pH ácido, etc. Este es un mecanismo de defensa que permite a la célula adaptarse a condiciones anómalas y aumentar su capacidad de supervivencia (Moseley P 2000, Kiang JG, Tsokos GC 1998).

Los diferentes tipos de condiciones que dan lugar a una elevada expresión de genes de shock térmico se clasifican como aparecen en la tabla 4.

Tabla 4. Diferentes condiciones que inducen la expresión de Hsp.

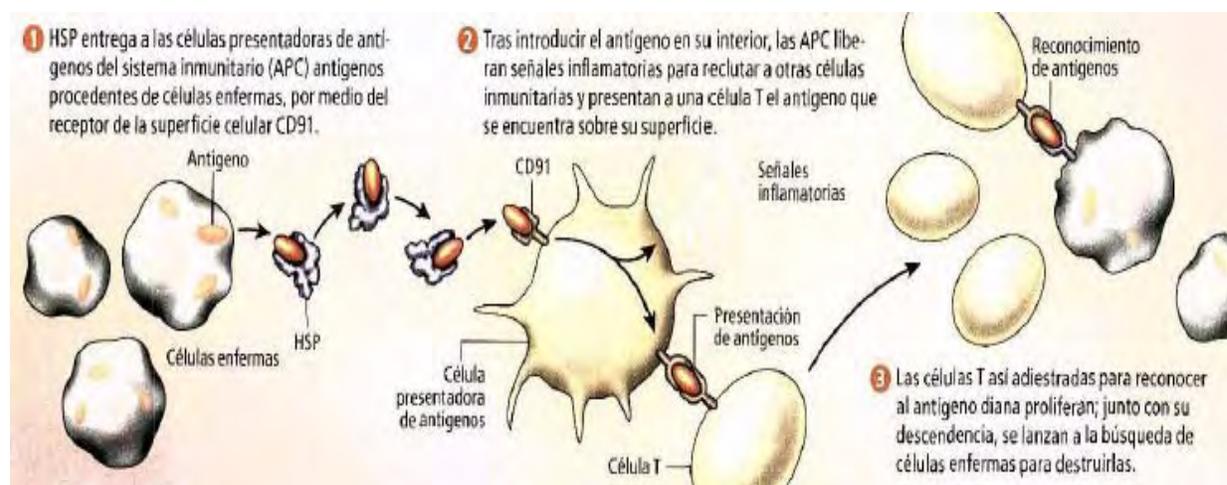
Condiciones fisiológicas	Condiciones patológicas	Condiciones ambientales
Ciclo celular	Infección producida por Virus, bacterias y parásitos	Shock térmico
Factores de crecimiento	Fiebre	Metales pesados
Diferenciación celular	Inflamación	Inhibidores metabólicos
Desarrollo tisular	Isquemia-reperfusión	Antibióticos
Estimulación hormonal	Autoinmunidad	Radiación

Tomada de Kiang JG, Tsokos GC 1998.

Estudios previos sugieren que las Hsp toman péptidos anómalos (antígenos) y directamente o a través de moléculas los trasladan al exterior de la superficie celular. Así los péptidos anómalos actúan como señales de alarma que alertan al sistema inmunológico que la célula está dañada. Por tanto, cuando se detectan fuera de la célula indican que esta ha sido agredida, o incluso que ha sido destruida, expulsando todo su contenido. Una vez que los complejos de Hsp y péptidos están fuera de la célula son detectados por el sistema autoinmune a través de macrófagos y células dendríticas, denominadas Células Presentadoras de Antígenos (CPA).

Después de ser detectado, el complejo de Hsp entrará dentro de estas células a través del receptor CD91, allí las CPA presentan en su superficie al péptido que forma parte del complejo de Hsp, que al ser antigénico pueden estimular una respuesta inmune (Srivastava PK 2008) (Figura 5)

Figura 5. Activación de respuestas inmunitarias



Tomada de Srivastava PK 2002.

Por otro lado también se cree que las Hsp originen una respuesta inmunitaria, ya que éstas proteínas podrían ser altamente conservadas entre patógenos y huésped, lo que favorece la producción de una reacción cruzada entre las proteínas del huésped y del patógeno, las primeras actúan como antígenos (autoantígenos) y provocan enfermedades autoinmunes, tales como diabetes mellitus insulino dependiente, artritis reumatoide, esclerosis múltiple (Raska M y Weigl E 2005).

ESTRUCTURA GENÉTICA

Los genes que codifican para las Hsp70 están ubicados en el brazo corto del cromosoma 6 en la región p21.3, dentro del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) clase III. Existen 3 genes que codifican para las Hsp. El gen de las Hsp70-1 tiene un tamaño de 2.4 Kd y está conformado por 3 exones; los cuales codifican para una proteína de 641 aminoácidos (Shimizu S et al. 1999). El polimorfismo de esta Hsp70-1 es una mutación sinónima, en donde el cambio de base no repercute en la substitución del aminoácido (Milner CM and Campbell RD 1992).

En el caso de Hsp70-2, también carece de intrones, codifica para una proteína de 641 aminoácidos, además Hsp70-1 y -2 contienen la misma secuencia la cual, solo difiere de 8 pb. El polimorfismo de esta Hsp70-2 también, es una mutación sinónima, en donde el cambio de base no repercute en la substitución del aminoácido. (Milner CM and Campbell RD 1992)

Por último las Hsp70-hom, presenta relevancia ya que la transición de T por C resulta en la substitución de metionina por treonina en la posición 493, la cual se encuentra ubicado en el sitio de unión del péptido. (Milner CM and Campbell RD 1992)

PROCESOS PATOLÓGICOS

En los pacientes con lesiones traumáticas se ha demostrado un aumento en la expresión de Hsp. En este caso realizaron un estudio comparando 2 grupos de personas, uno de voluntarios sanos y otro de personas, uno de personas que padecían algún traumatismo. Los resultados indican que los niveles de Hsp en los enfermos eran mucho más elevados que en los voluntarios sanos.

Se ha observado un aumento en la expresión de Hsp en tejidos neoplásicos del ovario, mama, endometrio y aparato digestivo (Hashiguchi N et al. 2001).

En varios estudios se ha propuesto la importancia de estos genes en la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades autoinmunes, en particular en lupus eritematoso sistémico (Villalobos-Hurtado R et al. 2003, Pablos JL et al. 1995).

En el caso de la aterosclerosis, es un proceso multifactorial iniciado por la acumulación de macrófagos en distintas áreas de daño celular o endotelial seguido por la incorporación de gran cantidad de lípidos. Son muchos los factores endógenos y exógenos que determinan su aparición. Estudios han revelado asociaciones entre niveles plasmáticos de anticuerpos anti-Hsp y enfermedades cardiovasculares. También se han mostrado estos niveles aumentados como factor de riesgo en la aterosclerosis grave. La expresión de Hsp60 en la placa de ateroma ha sido correlacionada con la gravedad de la aterosclerosis. Las proteínas Hsp60 y Hsp70 han sido las más estudiadas en relación con la aterosclerosis (Mehta TA et al. 2005). Se ha observado que las Hsp60 se localizan selectivamente en las lesiones ateroscleróticas y no en las regiones no ateroscleróticas. En lesiones ateroscleróticas avanzadas hay una sobreexpresión de Hsp70.

TNF- α . Es una citocina importante en la patogénesis en la CD. El gen que codifica el TNF- α está ubicado en el brazo corto del cromosoma 6 en la región p21.3, dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase III. Se ubica entre los loci del HLA-B (región MHC clase I) y HLA-DR (MHC clase II) (Wilson AJ et al. 1991). El gen TNF- α tiene un tamaño de 3.6 Kb y está conformado por cuatro exones; el primero se encarga de codificar una proteína precursora de 233 aminoácidos, mientras que los tres restantes codifican para cada uno de los monómeros que conforman la proteína activa. Además este gen posee tres intrones cuya función es desconocida (Figura 6) (Vilcek J et al. 1991).

El gen del TNF- α posee varios sitios polimórficos en la región codificante y en su vecindad. Los más frecuentes son los polimorfismos de un único nucleótido (SNP), que consisten en el cambio de un nucleótido que puede detectarse en cualquier lugar del DNA, ya sea en las secuencias reguladoras en el extremo 5' (promotor) en la secuencia codificante o después de la región codificante (región no transcrita del extremo 3' [UTR]). Uno de estos polimorfismos se encuentra en la posición -308 en la presencia de guanina define el alelo TNF1 o TNF308G y la presencia de adenina define el alelo TNF2 o TNF308 (Wilson AG et al. 1992). Se ha demostrado que el TNF2 tiene una mayor actividad transcripcional que el alelo TNF1. Otro polimorfismo se ubica en la posición -238, donde existe un cambio de una guanina por una adenina, definiendo los alelos TNFG y TNFA, respectivamente (Wilson AG et al 1997).

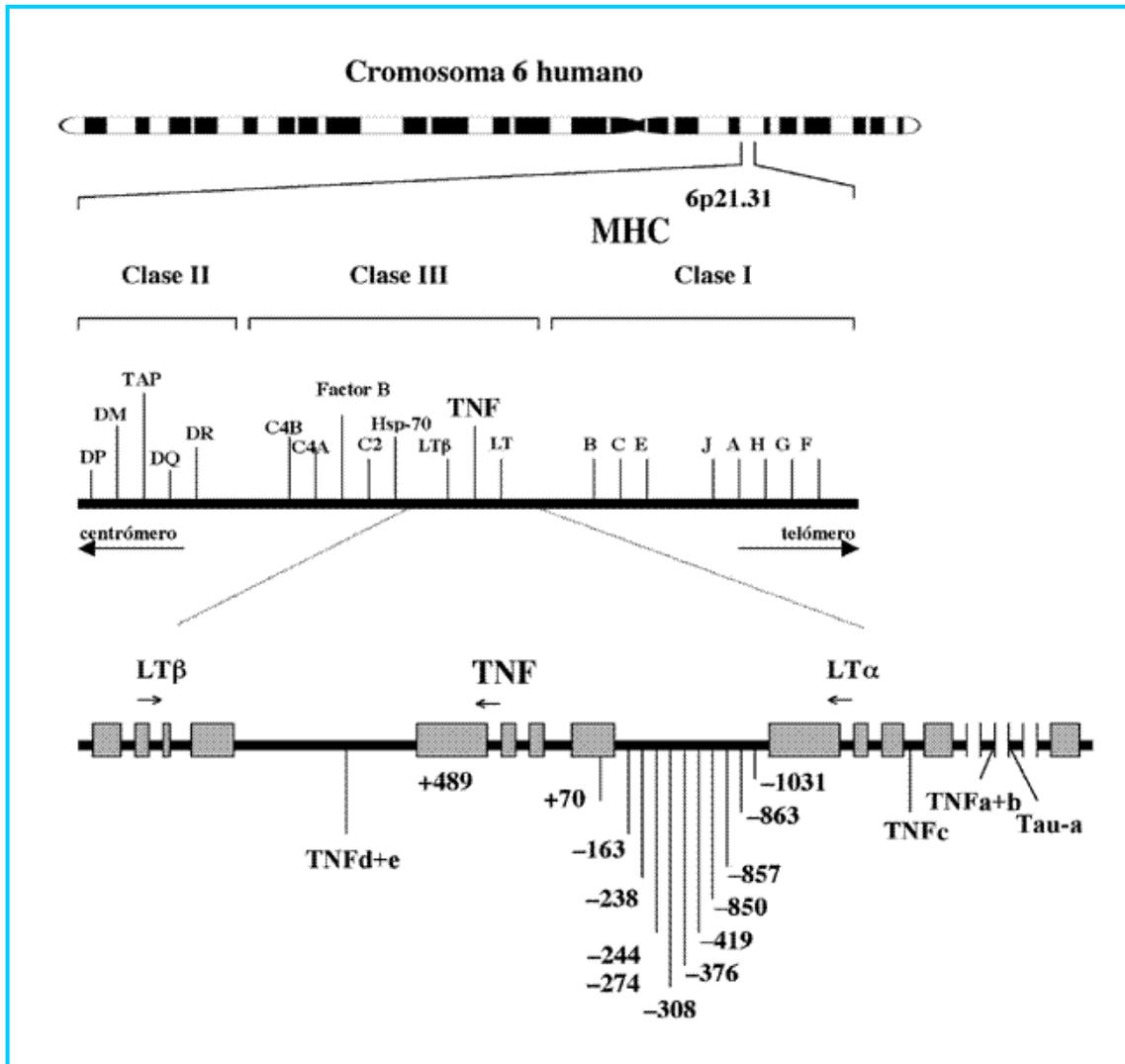


Figura 6. Conformación génica del TNF- α . El gen del TNF- α es representado en la parte superior, en el brazo corto del cromosoma 6, en la posición 6p21.3, formando parte del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase III. En esta región se encuentran genes que codifican para las moléculas TNF- α t TNF- β , además están los genes para la linfotoxina. Cada uno de estos genes es codificado en la dirección que indican las flechas y son regulados de forma independiente. Además, se indica la ubicación de las regiones polimórficas, hasta ahora identificadas para el gen TNF, las cuales comprenden 5 microsatélites (denominados con letras a, b, c, d, e) y 19 cambios de único nucleótido (SNP).

Los pacientes con insuficiencia cardiaca avanzada (estadio final de la CDI) tienen niveles elevados de TNF- α en circulación sin embargo, algo muy importante, es que el TNF- α puede producir remodelación ventricular izquierda y cardiomiopatía en humanos. Por lo anterior sugiere que el TNF- α puede contribuir en la patogénesis de la enfermedad. Experimentos en animales muestran que los mecanismos por los cuales el TNF- α induce contractilidad anormal es por la reducción del calcio intracelular y posiblemente la inducción de óxido nítrico, ambos mecanismos se sabe alteran la contractilidad. En ratones transgénicos que sobre expresan TNF- α en el miocardio, se ha observado que este TNF afecta directamente la función sistólica, lo que conlleva a muerte muy prematura en dichos ratones.

La explicación a este fenómeno es que periodos prolongados de exposición miocárdica al TNF- α resulta en cambios estructurales del miocardio llevando con el tiempo al desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. Los dos principales mecanismos que promueven daño cardiaco en humanos, son la hipertrofia y apoptosis. También se ha observado que estos ratones transgénicos padecen de hipertrofia ventricular, que es uno de los eventos principales en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. Por lo anterior sugiere que el TNF- α puede contribuir en la patogénesis de la enfermedad.

Existen pocos datos en la literatura acerca de la asociación de los polimorfismos del TNF- α y el desarrollo de la CD. Ito y cols en el 2000 reportaron en población japonesa, incremento del genotipo T2T2 del polimorfismo -308 en pacientes con CD con respecto al grupo control ($p=0.0084$) Sin embargo, este polimorfismo no resultó asociado con las características clínicas (Ito M et al. 2000).

Tabla 5. TNF- α en enfermedades cardiovasculares en diferentes poblaciones.

POLIMORFISMO	ENFERMEDAD	RESULTADO	REFERENCIA
-238	Enfermedad Arterial coronaria.	No asociado Ingleses.	Allen, R.A et al 2001.
	Enfermedad Arterial coronaria.	No asociado Franceses.	Herrmann, S.M et al 1998.
-308	Infarto agudo al miocardio.	Asociado Brasileños.	Padovani, J et al 2000
	Angina inestable.	No asociado Belgas.	Appoloni, O et al 2004.
	Infarto agudo al miocardio.	Asociado Franceses	Bernard, V et al 2003.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar con técnicas moleculares los polimorfismos de los HLA-DR, -DQ, TNF- α y hsp70 en un grupo de pacientes mexicanos con Cardiomiopatía dilatada, con el fin de definir si existe alguna relación entre dichos polimorfismos y la susceptibilidad genética a esta enfermedad.

VI.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar la frecuencia de los alelos de los genes HLA-DR, -DQ, TNF- α (-238 y -308) y HSP70-hom en un grupo de pacientes mexicanos con cardiomiopatía dilatada.
2. Determinar la frecuencia de estos alelos en un grupo control del mismo origen étnico.
3. Comparar las frecuencias entre los dos grupos de estudio para definir si algún alelo pudiera estar confiriendo susceptibilidad genética para el desarrollo de dicho padecimiento.

VII. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas para las cuales codifican los genes HLA-DR β 1, HLA-DQ β 1, TNF- α y HSP70-hom son importantes en la patogénesis de la CDI, lo que hace a estos genes candidatos para el estudio de susceptibilidad genética en CDI. Algunos alelos de estos genes ya han sido asociados con susceptibilidad al desarrollo de CDI, pero dada las características de la estructura genética de nuestra población, los alelos asociados con CDI en los pacientes mestizos mexicanos pueden ser diferentes a los de otros grupos étnicos estudiados.

VIII. HIPÓTESIS

Si el HLA participa en la selección del repertorio para la presentación antigénica, el TNF en el proceso inflamatorio y Hsp70 son chaperoninas con participación en la respuesta inmune, en particular en el procesamiento de antígenos y estos eventos participan en la CDI, entonces los polimorfismos de los genes que codifican para estas proteínas podrían ser marcadores de susceptibilidad o protección para este padecimiento en la población mexicana.

IX. METODOLOGÍA

Materiales y Métodos

IX.1 Sujetos de estudio:

Pacientes: El estudio incluyó a 52 pacientes con diagnóstico de cardiomiopatía dilatada idiopática (CDI), captados en la consulta externa del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” durante el periodo de enero de 2003 a enero de 2007. Como grupo de comparación se incluyeron a 99 controles sanos no relacionados. Para ser considerado sano, el individuo debió estar libre de síntomas y sin antecedentes de cualquier enfermedad, en particular enfermedades cardiovasculares y autoinmunes. Como requerimiento adicional para ambos grupos, se consideró que el individuo estudiado y dos generaciones previas a él hubieran nacido en México.

IX.2 Criterios de inclusión:

1. Que tanto pacientes como controles, así como sus dos últimas generaciones fueran nacidas en México.
2. Que los pacientes fueran diagnosticados de acuerdo a los criterios clínicos establecidos en el Departamento de Cardiología de adultos del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.
3. Que los individuos control no presentaran antecedentes de enfermedades cardiovasculares y/o autoinmunes.

IX.3 Criterios de exclusión

1. No ser mexicanos
2. Individuos de grupo control con antecedentes de enfermedades cardiovasculares y/o autoinmunes.
3. No estar de acuerdo en participar en el protocolo de investigación.

IX.4 Diseño experimental

Este estudio es transversal de casos y controles.

Requerimientos adicionales para ambos grupos (pacientes y controles).

1. A todos los individuos se les invito a participar en el presente estudio y se obtuvo consentimiento informado voluntario.
2. El estudio fue de riesgo mínimo ya que solo incluyo la venopunción antecubital para la obtención de 10 ml de sangre periférica.
3. El proyecto cumplió con los requisitos del comité institucional de ética e investigación del Instituto Nacional de Cardiología.

X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las frecuencias de alelos y genotipos se obtuvieron por conteo directo y en cada grupo de estudio se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg usando la prueba de chi-cuadrada. Las frecuencias de los alelos en los pacientes se compararon con las de los controles utilizando pruebas estadísticas no paramétricas como la chi-cuadrada y la exacta de fisher. El valor de p fue corregido por el método de bonferroni multiplicando por el número de comparaciones realizadas en cada caso y en cada comparación se obtuvo la razón de momios (RM) utilizando el método de Woolf (Woolf B, 1955).

XI. RESULTADOS

Las frecuencias alélicas de los alelos HLA-DR en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y controles son mostradas en la tabla 6. Al analizar las frecuencias de cada uno de los grupos de estudio de los genes se observaron que todos se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg. En los pacientes se observó un incremento en la frecuencia del alelo HLA-DR4 al comparar con los controles (pC= 0.02, RM= 1.87, IC95%= 1.08 – 3.23). Sin embargo, también en la tabla 6, los pacientes con CDI también presentaron disminución en la frecuencia del alelo HLA-DR11 (pC= 0.03, RM= 0.26, IC95%= 0.06 – 0.95). En la tabla 7, cuando analizamos el locus DQB, se encontró un incremento en las frecuencias de los alelos HLA-DQB*0301 (pC= 0.02, RM= 1.92, IC95%=3.48) y HLA-DQB*0302 (pC= 0.02, RM= 1.87, IC95%= 3.23) en el grupo de los pacientes con CDI con respecto al grupo control. Los pacientes también mostraron una disminución en la frecuencia de los alelos HLA-DQB*0201 (pC= 0.04, RM=0.41, IC95%= 0.17 – 0.97).

Con respecto al polimorfismo del TNF- α en la posición -238 y -308, presentaron frecuencias alélicas y genotípicas similares en el grupo de pacientes con CDI con respecto al grupo control (Tabla 8).

Por último, en el polimorfismo del gen de hsp70 hom, se obtuvieron frecuencias alélicas y genotípicas similares en el grupo de pacientes con CDI cuando se compararon con el grupo control (Tabla 9).

Tabla 6. Frecuencias génicas (fg) de alelos HLA-DR en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y grupo control.

HLA	Pacientes (n=53)		Controles (n=99)		pC	RM	IC95%
	n	fg	n	fg			
DR1	3	0.028	10	0.050			
DR3	2	0.018	11	0.055			
DR4	39	0.367	47	0.237	0.02	1.87	1.08 – 3.23
DR7	6	0.056	22	0.111			
DR8	16	0.150	33	0.166			
DR9	0	0.000	3	0.015			
DR10	0	0.000	1	0.005			
DR11	3	0.028	20	0.101	0.03	0.26	0.06 – 0.95
DR12	0	0.000	2	0.010			
DR13	6	0.056	10	0.050			
DR14	16	0.150	21	0.106			
DR15	9	0.084	13	0.065			
DR16	6	0.056	5	0.025			

Abreviaturas: fg = frecuencias génicas, HLA = Antígenos leucocitarios humanos, RM= Razón de momios, pC = P corregida, IC95% = Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 7. Frecuencias génicas (fg) de HLA-DQB1 en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y grupo control.

HLA	Pacientes (n=53)		Controles (n=99)		pC	RM	IC95%
	n	fg	n	fg			
0501	3	0.028	12	0.060			
0502	0	0.000	5	0.025			
0503	0	0.000	9	0.045			
0504	0	0.000	1	0.005			
0602	9	0.084	15	0.075			
0603	0	0.000	4	0.020			
0604	0	0.000	3	0.015			
0201	8	0.075	33	0.166	0.04	0.41	0.17 – 0.97
0301	31	0.292	35	0.176	0.02	1.92	1.06 – 3.48
0302	39	0.367	47	0.237	0.02	1.87	1.08 – 3.23
0304	0	0.000	1	0.005			
0402	16	0.151	33	0.166			

Abreviaturas: fg = frecuencia génica, HLA = Antígenos leucocitarios humanos, RM = Razón de momios, pC = P corregida, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 8. Frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) de TNF- α -238 y -308 en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y grupo control.

TNF- α -238	Pacientes (n= 45)		Controles (n=99)		pC	RM	IC
Alelo	n	fa	n	fa			
A	5	0.055	15	0.076	NS	---	
G	85	0.944	183	0.924	NS	---	
Genotipo	n	fg	n	fg			
GG	40	0.888	85	0.859	NS	---	
AG	5	0.111	13	0.131	NS	---	
AA	0	0.000	1	0.010	NS	---	
TNF- α -308	Pacientes (n= 45)		Controles (n=101)		pC	RM	IC
Alelo	n	fa	n	fa			
T1	88	0.997	199	0.957	NS	---	
T2	2	0.022	3	0.014	NS	---	
Genotipo	n	fg	n	fg			
T1T1	43	0.955	98	0.970	NS	---	
T1T2	2	0.044	3	0.029	NS	---	
T2T2	0	0.000	0	0.000	NS	---	

Abreviaturas: fg = frecuencia génica, TNF = Factor de Necrosis Tumoral, RM = Razón de momios, pC = P corregida, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%.

Tabla 9. Frecuencias alélicas (fa) y frecuencias genotípicas (fg) de hsp70 hom en pacientes con cardiomiopatía dilatada idiopática y grupo control.

hsp70 hom	Pacientes		Controles		pC	RM	IC
	(n= 50)		(n=99)				
Alelo	n	fa	n	fa			
A	95	0.950	190	0.950	NS	---	
B	5	0.050	8	0.040	NS	---	
Genotipo	n	fg	n	fg			
AA	41	0.820	88	0.888	NS	---	
AB	4	0.080	10	0.101	NS	---	
BB	0	0.000	1	0.010	NS	---	

Abreviaturas: fg = frecuencia génica, HSP70 hom = Proteína de choque térmico hom, RM = Razón de momios, pC = P corregida, IC 95% = Intervalo de confianza al 95%.

XII. DISCUSIÓN

Las respuestas inmunes son mediadas a través de genes localizados en la región del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad), cuyos productos tienen la función de presentar antígenos para su reconocimiento por las células T (Bender JR, 1991). Hay dos principales tipos, las moléculas clase I, las cuales presentan péptidos citosólicos a los linfocitos T CD8⁺ y las moléculas clase II, las cuales presentan péptidos extracelulares a los linfocitos CD4⁺. El HLA-DR es uno de las tres mayores subregiones dentro de la región clase II del MHC en el cromosoma 6 humano. Se ha documentado que los pacientes con CDI presentan niveles incrementados de células T helper positivas para HLA-DR y células supresoras citotóxicas, cosa que no se observa en pacientes con insuficiencia cardíaca e individuos sanos (Ronblom LE et al. 1991). La disminución de la actividad de las células asesinas naturales es un marcador de riesgo en el 50% de pacientes con CDI asociada con HLA-A3. Por otro lado, los pacientes con CDI presentan reactividad celular autoinmune contra miocitos además de anticuerpos con reactividad cruzada contra péptidos sintéticos del virus coxsackie B y contra una proteína transportadora ADP/ATP (Anderson JL et al. 1982, Kearney MT et al. 2001). Varios estudios sugieren que la cardiomiopatía dilatada ocurre como resultado de mutaciones en genes que codifican para una variedad de proteínas, incluidas proteínas del sarcómero y proteínas estructurales (Morita H et al. 2005).

Considerando la participación del sistema inmune en la etiología de la CDI, varios estudios sugieren que la susceptibilidad genética para la CDI esta asociada a los alelos de clase II del MHC. Sin embargo, los resultados son inconstantes y se han visto discrepancias entre los diferentes estudios poblacionales. Esto puede explicarse en parte por las diferencias étnicas en la distribución de los alelos HLA en diferentes poblaciones, o por las diferentes técnicas utilizadas en la determinación de los alelos HLA. En el presente estudio se detectó una asociación significativa de la CDI con el alelo HLA-DR4. Esta asociación ha sido previamente reportada en varias poblaciones caucásicas (Limas CJ 1996, Komajda M et al. 1987, Carlquist JF et al. 1994, Limas CJ and Limas C, 1989, McKenna CJ et al. 1997). Sin embargo, el análisis de subtipos no se realizó en estos estudios. En nuestro trabajo nosotros analizamos la distribución de los subtipos HLA-DRB*04 en los pacientes con CDI y controles para definir si un subtipo específico de HLA-DR4 podría estar asociado con la susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. A este respecto observamos una distribución similar de los subtipos HLA-DR4 en los pacientes con CDI y controles sugiriendo que secuencias presentes en todos los subtipos DR*04 podrían estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad. Cabe comentar que el HLA-DR4 es el alelo más frecuente en la población mestiza mexicana, así como en diversos grupos indígenas mexicanos estudiados a la fecha (Vargas-Alarcón G et al. 2000). El alelo HLA-DR4 esta asociado con varias enfermedades tales, como artritis reumatoide, prurigo actínico, diabetes mellitus tipo I en varias poblaciones incluyendo la mexicana (Grabczynska SA et al. 1999, Harfouch-Hammond EH et al 1996, Hawke S et al. 1999, Reohr PB et al. 1992, Wordworth BP et al. 1991, Ruíz-Morales JA et al. 2004).

Por otro lado, se detectó el incremento de las frecuencias de los alelos HLA-DQB1*0301 y -DQB1*0302 en los pacientes con CDI con respecto al grupo control. El incremento de la frecuencia de DQB1*0301 podría ser independiente de otros alelos, mientras el incremento de -DQB1*0302 podría deberse al conocido desequilibrio de unión entre HLA-DR4 y este alelo que se ha reportado en varias poblaciones. También se encontraron dos alelos con frecuencias disminuidas en nuestro grupo de pacientes (HLA-DR11 y HLA-DQB1*0201), estos alelos podrían considerarse como alelos protectores en el desarrollo la CDI. El mecanismo por el cual los genes del HLA podrían determinar susceptibilidad para la cardiomiopatía dilatada idiopática no es completamente claro. Los genes del MHC regulan la respuesta inmune en contra de infecciones, unen y presentan antígenos hacia la célula T y tienen una participación importante en la selección del repertorio de la célula T. La frecuente detección de un genoma viral en la cardiomiopatía dilatada sugiere que las infecciones virales participan en la patogénesis de la enfermedad (Poller W et al. 2005).

Por otro lado, diversos estudios sugieren que el proceso inflamatorio juega un papel preponderante en el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada. Dado esto, el estudio de moléculas que participan en este proceso inflamatorio es de suma importancia para establecer la fisiopatogenia de este padecimiento. Una de las moléculas más reconocidas a este respecto es el TNF- α , el cual es una de las principales citocinas proinflamatorias. Algunos estudios han reportado niveles incrementados de TNF- α en el suero de pacientes con CD.

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

Los polimorfismos TNF- 238 y -308 son de los más estudiados debido a sus implicaciones a nivel biológico. El gen del TNF- α esta regulado por varios factores de transcripción como el NF- κ B y el AP-1. Estos factores son activados a través de vías de señalización intracelular modulando así, en la célula huésped, la expresión del gen. Algunos estudios han establecido que los individuos que portan el genotipo homocigoto -308 T2, presentan incremento en la transcripción del gen y a nivel sérico, niveles elevados de la citocina. Esto al compararlos con individuos que portan los otros genotipos (Wilson AG et al. 1997). De forma importante, los estudios en modelos animales demuestran que la mayor expresión de TNF- α se relaciona con inflamación miocárdica, hipertrofia cardiaca, dilatación progresiva e incremento de apoptosis, lo cual conlleva a la insuficiencia cardiaca o muerte. Otros estudios realizados en ratones knockout, en los cuales el gen del TNF- α ha sido deletado muestran disminución del infiltrado de macrófagos en el miocardio infartado. Por el contrario, otro grupo de ratones con altos niveles de TNF- α presentaron importante daño cardiaco.

Aunque la función biológica precisa para el estrés inducido por la expresión de TNF- α en el corazón todavía es desconocida, la observación de que TNF- α induce una respuesta hipertrófica y apoptosis en los miocitos cardiacos sugiere que este tiene un papel importante en la homeostasis miocárdica.

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

Estudios como el que reportamos son obligatorios si queremos definir marcadores genéticos asociados al desarrollo de enfermedades en nuestra población.

A pesar de que nosotros no encontramos asociación entre los polimorfismos del TNF y HSP70 hom en el desarrollo de CDI, hay que considerar que la CDI es un padecimiento multifactorial. Por esta razón creemos pertinente el estudiar otros genes que codifican para moléculas inflamatorias que de una u otra forma podrían estar involucrados en los procesos que llevan al desarrollo de CDI.

XIII. CONCLUSIONES

1. El alelo HLA-DR4 está asociado con la susceptibilidad al desarrollo de la CDI.
2. El alelo HLA-DR11 podría ser un marcador de protección genética para esta enfermedad.
3. Los alelos HLA-DQB*0301 y *0302 se encuentran asociados como marcadores de susceptibilidad genética para la CDI.
4. El alelo DQ*0201 podría ser un marcador de resistencia genética para la CDI.
5. Con respecto al TNF- α , no se encontraron diferencias estadísticamente significativas por lo cual consideramos que los polimorfismos de este gen no están asociados al desarrollo de la CDI.
6. Por último en las hsp70 hom, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas, entonces este polimorfismo no está asociado al desarrollo de la CDI.

XIV. ANEXOS

XIV.1 TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

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

Cuantificación y ajuste de DNA

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

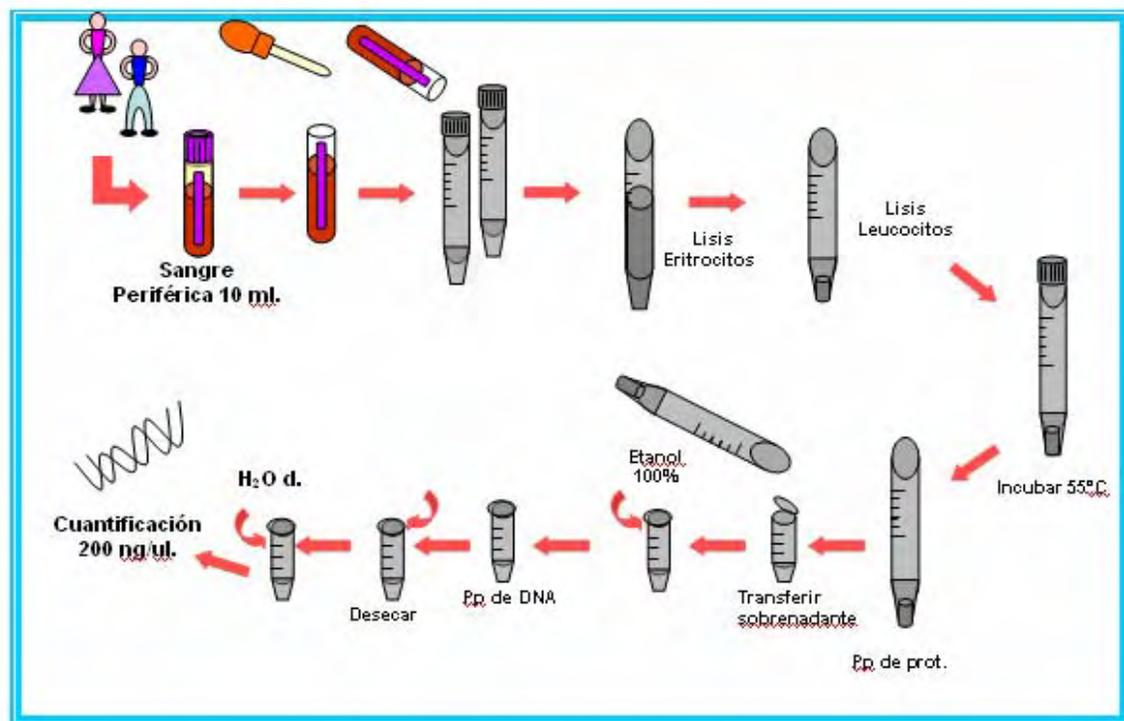
$$[\text{DNA ng}/\mu\text{l}] = \text{absorbancia } 260 \text{ nm} \times 50 \text{ ng} \times 100 \mu\text{l}$$

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

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

ng/ μl totales

200 μl



XIV.2 Fórmulas para preparación de soluciones

1. Solución TKM1 para extracción de DNA.

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

* Ajustar a un pH de 7.6

2. Solución TKM2 para extracción de DNA.

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

3. SDS 20%

20g en 100 ml de agua

4. NaCl 5M

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

5. Buffer para la electroforesis TBE 10 X

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

* Disolver en 600 ml de agua destilada, ajustar pH = 8.0 y aforar a 1000 ml con agua destilada.

XIV.3 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES TNF- α POSICIONES -238 Y -308.

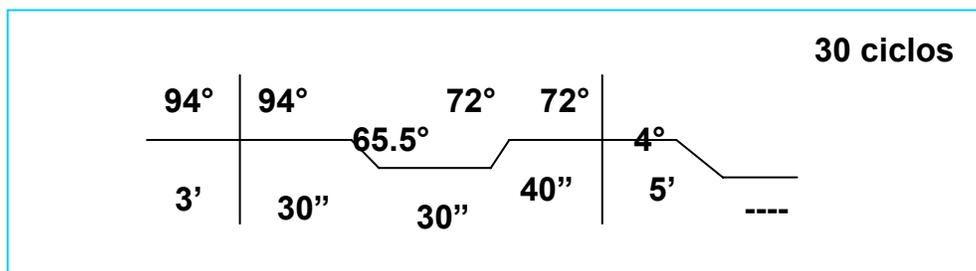
1. Preparación de la PCR (25 μ l)

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

2. Iniciadores utilizados para la PCR y su subsecuente secuenciación

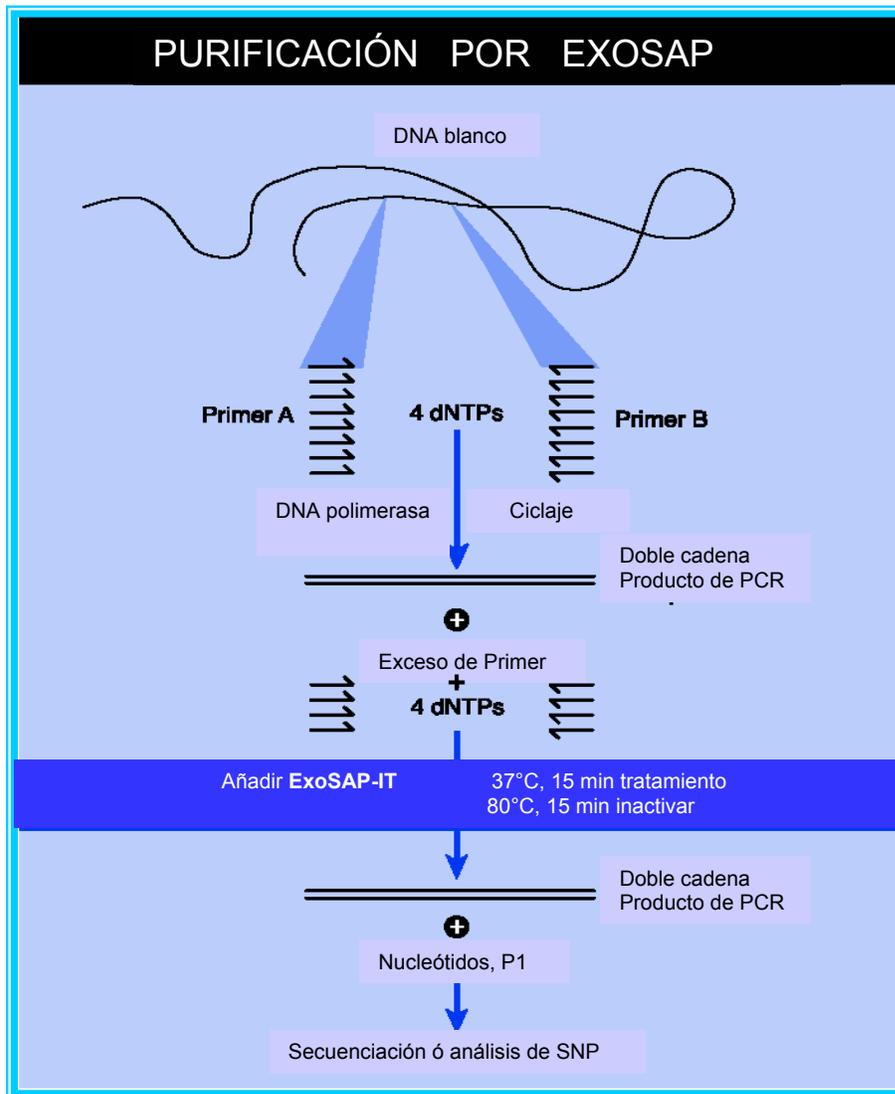
TNF-α
-238, -308
5'-GCCCCTCCCAGTTCTAGTTC-3'
5'-TCATCTGGAGGAAGCGGTAG-3'

3. Condiciones del termociclador



XIV.4 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

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



* Utiliza dos enzimas hidrolíticas

XIV.5 CONDICIONES PARA PCR DE SECUENCIACIÓN

1. Preparación de la PCR

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

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

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

XIV.6 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR DE SECUENCIACIÓN

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

XIV.7 SECUENCIACIÓN

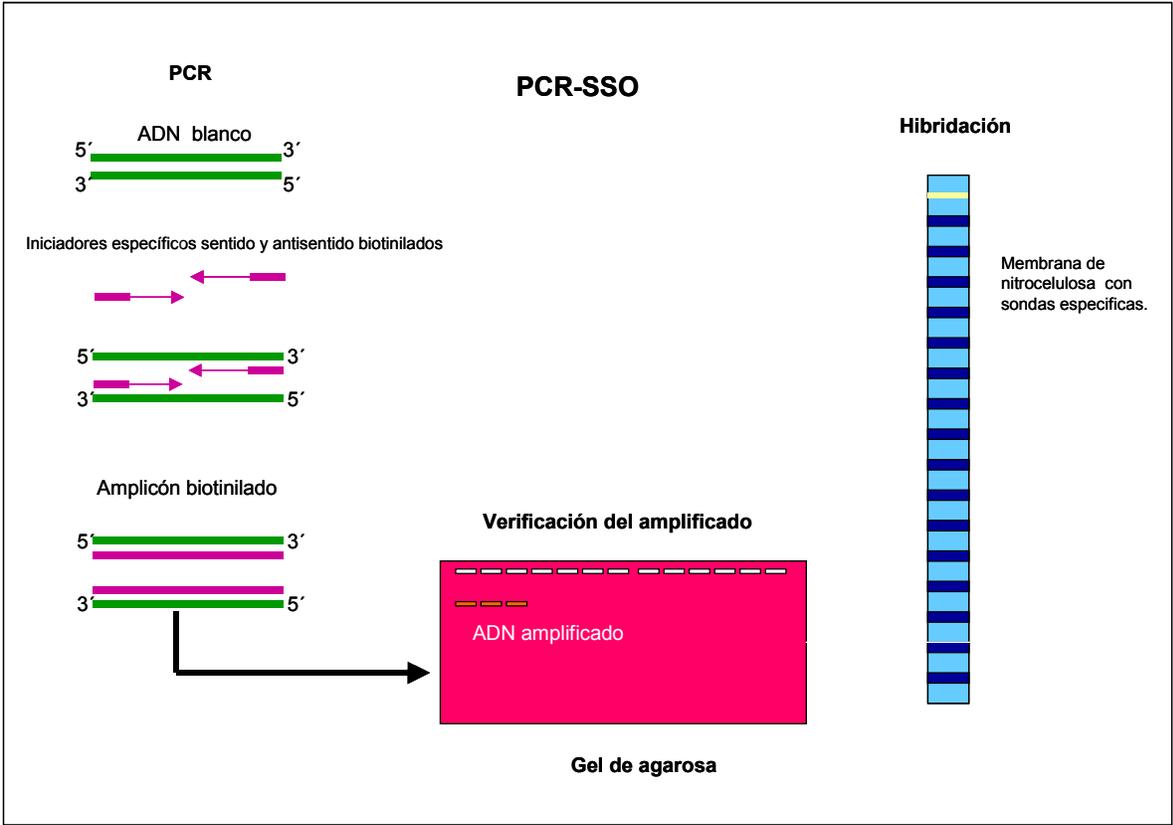
1. Ya que esta el producto seco, este se resuspende en 15 μl de formamida.
2. Posteriormente se calienta a 95° C durante 5 minutos y sin exponer a la luz.
3. Pasado este tiempo se coloca en hielo por un par de minutos y se pone entonces en la placa de 96 pozos ya para llevarlo al secuenciador.



Secuenciador Applied Biosystems 3130

XIV.8 AMPLIFICACIÓN Y TIPIFICACIÓN DE LOS GENES CLASE II POR SECUENCIA ESPECÍFICA DE OLIGONUCLEOTIDOS (PCR-SSO) UTILIZANDO EL KIT COMERCIAL DYNAL RELI SSO Y EMPLEANDO EL METODO DE DOT BLOT REVERSO.

La tipificación de los loci HLA-DR β 1 y HLA-DQ β 1 se realizó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa e hibridación con sondas específicas del alelo. Se utilizó el kit comercial Dynal RELI SSO (DR β 1 y DQ β 1). La metodología consiste en la amplificación del exón 2 de los genes HLA-DR β 1 y DQ β 1 usando iniciadores biotinilados. Una vez que se obtiene el amplicon biotinilado, este es desnaturalizado por alcalinidad para obtener cadenas simples de ADN que son hibridadas con las sondas específicas ancladas a una membrana de nitrocelulosa. La detección de los sitios de hibridación positivos (ADN y sonda) se lleva a cabo por medio de un sistema de revelado que consiste de estreptavidina-peroxidasa, peróxido de hidrógeno y TMB (tetrametilbencidina).



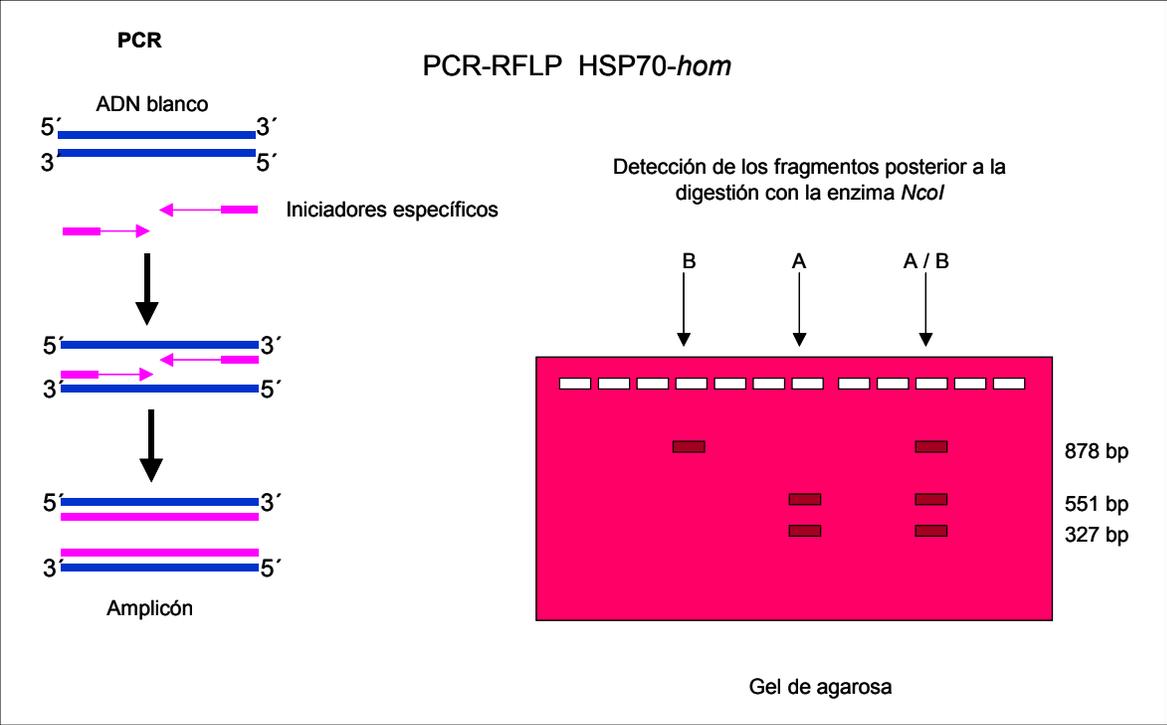
XIV.9 TIPIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO DEL GEN HSP70-hom. PCR-RFLP

El polimorfismo del gen HSP70-hom se detectó por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes iniciadores específicos que flanquean el sitio polimórfico en la posición 2437:

Sentido 5' – GGACAAGTCTGGAGAAGGTACAG – 3'

Antisentido 5' – GTAACCTAGATTCAGGTCTGG – 3'

Una vez terminada la PCR el amplicon se digirió toda la noche con la endonucleasa de restricción (RFLP) *NcoI*. Los alelos fueron designados como sigue: alelo B fragmento de 878 pb (no digestión); alelo A dos fragmentos 551 pb y 327 pb (digestión).



XV. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober, J.S., 2002. *Immunología Celular y Molecular*. Cuarta edición. McGraw-Hill-Interamericana.

Abraham, W.T., Gilbert, E.M., Lowes, B.D., Minobe, W.A., Larrabee, P., Roden, R.L., Dutcher, D., Sederberg, J., Lindenfeld, J.A., Wolfel, E.E., Sacar, S.F., Ferguson, D., Volkman, K., Linseman, J.V., Quaipe, R.A., Robertson, A.D., Bristol, M.R., 2002. Coordinate changes in Myosin heavy chain isoform gene expression are selectively associated with alterations in dilated cardiomyopathy phenotype. *Mol Med* 8, 750-760.

Allen, R.A., Lee, E.M., Roberts, D.H., Park, B.K., Pirmohamed, M., 2001 Polymorphisms in the TNF-alpha and TNF- receptor genes in patients with coronary artery disease. *Eur J Clinic Invest* 31, 843-51.

Ammash, N.M., Seward, J.B., Bailey, K.R., Edwards, W.D., Tajik, A.J., 2000. Clinical profile and outcome of idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Circulation* 101, 2490-2496.

Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Hammond, E.H., 1982. Deficient natural killer cell activity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2, 1124-1127.

Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Lutz, J.R., DeWitt, C.W., Hammond, E.H., 1984. HLA-A, B and DR typing in idiopathic dilated cardiomyopathy: A search for immune response factors. *Am J Cardiol* 53, 1326-1330.

Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., von Boehmer, H., 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol* 3: 756-763.

Appoloni, O., Dupont, E., Vandercruys, M., Andrien, M., Duchateau, J., Vincent, J.L., 2004. Association between the TNF-2 allele and a better survival in cardiogenic shock. *Chest* 125, 2232-2237.

Ardehali, H., Qasim, A., Cappola, T., Howard, D., Hruban, R., Hare, J.M., Baughman, K.L., Kasper, E.K., 2004. Endomyocardial biopsy plays a role in diagnosing patients with unexplained cardiomyopathy. *Am Heart J* 147, 919-923.

Beck, S., Trowsdale, J., 2000. The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1, 117-137.

Beckman, R.P., Mizzen, L.A., Welch, M.J., 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein holding and assembly. *Science* 248, 850-854.

Belich, M.P., Trowsdale, J., 1995. Proteasome and class I antigen processing and presentation. *Mol Biol Rep* 21; 53-56.

Bender, J.R., 1991. Idiopathic dilated cardiomyopathy. An immunologic, genetic or infectious disease, or all of above?. *Circulation* 83, 704-706.

Bengel, F.M., Permanetter, B., Ungerer, M., Nekolla, S., Schwaiger, M., 2000. Non-invasive estimation of myocardial efficiency using positron emission tomography and carbon-acetate-comparison between the normal and failing human heart. *Eur J Nucl Med* 27, 319-326.

Bernard, V., Pillois, X., Dubus, I., Benchimol, D., Labouyrie, J.P., Couffinhal, T., Coste, P., Bonnet, J., 2003. The -308 G/A tumor necrosis factor-alpha gene dimorphism: a risk factor for unstable angina. *Clin Chem Lab Med* 41, 511-516.

Bouneaud, C., Kourilsky, P., Bousso, P., 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13, 829-840.

Brandenburg, R.O., Chazov, E., Cherian, G., 1980. Report of the WHO/IFSC Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J* 44, 672-673.

Burns, A.P., Fisher, M., Li, P., Pusey, C.D., Rees, A.J., 1995. Molecular analysis of HLA class II genes in Goodpasture's disease. *QJM* 88, 93-100.

Cafalorio, A.L., Goldman, J.H., Haven, A.J., Baig, K.M., McKenna, W.J., 1996. Evidence for autoimmunity to myosin and other heart-specific autoantigens in patients with dilated cardiomyopathy and their relatives. *Int J Cardiol* 54, 157-163.

Caforio, A.L., Baboonian, C., McKenna, W.J., 1997. Postviral autoimmune heart disease: fact or fiction?. *Eur Heart J* 18, 1051-1055.

Campbell, R.D., Trowsdale, J., 1997. Map of the human MHC. *Immunol Today* 14, 349-352.

Carlquist, J.F., Menlove, R.L., Murray, M.B., O'Connell, J.B., Anderson, J.L., 1991. HLA class II (DR and DQ) antigen associations in idiopathic dilated cardiomyopathy. Validation study and meta-analysis of published HLA association studies. *Circulation* 83, 515-522.

Carlquist, J.F., Ward, R.H., Husebye, D., Feolo, M., Anderson, J.L., 1994. Major Histocompatibility complex class II gene frequencies by serologic and deoxyribonucleic acid genomic typing in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 74, 918-920.

Collins, E.J., Garboczi, D.N., Wiley, D.C., 1994. Three-dimensional structure of a peptide extending from one end of a class I MHC binding site. *Nature* 371, 626-629.

Carrascal-Pérez, M., 2005. Estudio de la vía de presentación de péptidos por moléculas de MHC de clase II mediante estrategias proteómicas. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.

Denzin, L.K., Hammond, C., Cresswell, P., 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II dimmers and facilitates peptide loading. *Cell* 82, 155-165.

Fatkin, D., Graham, R.M., 2002. Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev* 82, 945-980.

Felker, G.M., Thompson, R.E., Hare, J.M., Hare, J.M., Hruban, R.H., Clemetson, D.E., Howard, D.E., Baughman, K.L., Kasper, E.K., 2000. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med* 342, 1077-1084.

Fonseca, C., Mota, T., Morais, H., Matias, F., Costa, C., Oliveira, A.G., Ceia, F., Epica Investigators., 2004. The value of the electrocardiogram and chest X-ray for confirming or refuting a suspected diagnosis of heart failure in the community. *Eur J Heart Fail* 6, 807-812.

Fu, M., Matsui, S., 2002. Is cardiomyopathy an autoimmune disease?. *Keio J Med* 51, 208-212.

Fujioka, S., Kitaura, Y., Deguchi, H., Shimizu, A., Isomura, T., Suma, T., Sabbah, H.N., 2004. Evidence of viral infection in the myocardium of American and Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 94, 602-605.

Goodwin, J.F., Gordon, H., Hollman, A., Bishop, M.B., 1969. Clinical aspects of cardiomyopathy. *Br Med J* 1, 69-79.

Grabczynska, S.A., McGregor, J.M., Kondeatis, E., Vaughan, R.H., Hawk, J.L., 1999. Actinic prurigo and polymorphic light eruption: common pathogenesis and the importance of HLA-DR4/DRB1*0407. *Br J Dermatol* 140, 232-236.

Hashiguchi, N., Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Aoki, M., Shiozaki, T., Matsuoka, T., Shimazu, T., Sugimoto, H., 2001. Enhanced expression of heat shock proteins in leukocytes from trauma patients. *J Trauma* 50, 102-107.

Hare, J.M., Walford, G.D., Hruban, R.H., Hutchins, G.M., Deckers, J.W., Baughman, K.L., 1992. Ischemic Cardiomyopathy endomyocardial biopsy and ventriculographic evaluation of patients with congestive-heart-failure, dilated cardiomyopathy and coronary-artery disease. *J Am Coll Cardiol* 20, 1318-1325.

Harfouch-Hammond, E.H., Timsit, J., Boitard, C., Bach, J.F., Caillat-Zucman, S., 1996. Contribution of DRB1*04 variants to predisposition to or protection from insulin dependent diabetes mellitus is independent from DQ. *J Autoimmun* 9, 411-414.

Hawke, S., Matsuo, H., Nicolle, M., Wordsworth, P., Corlett, L., Spack, E., 1999. Deshpande S, Driscoll PC, Willcox N. Cross-restriction of a T cell clone to HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis. Clues to arthritogenic peptide motifs. *Arthritis Rheum* 42, 1040-1050.

Herrmann, S.M., Ricard, S., Nicaud, V., Mallet, C., Arveiler, D., Evans, A., Ruidavest, J.B., Luc, G., Bara, L., Parra, H.J., Poirier, O., Cambien, F., 1998. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest* 28, 59-66.

Hühl, U., Pauschinger, M., Noutsias, M., Seeberg, B., Bock, T., Lassner, D., Poller, W., Kandolf, R., Schultheiss, H.P., 2005. High prevalence of viral genomes and multiple infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction. *Circulation* 111, 887-93.

Hughes, E.A., Hammond, C., Cresswell, P., 1997. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci* 94, 1896-1901.

Irwin, M.W., Mack, S., Mann, D.L., Qu, R., Penninger, J.M., Yan, A., Dawood, F., Wen, W.H., Shou, Z., Liu, P., 1999. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor- α in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 99, 1492-1498.

Jacobs, R.C., Gershengorn, K., Chait, A., 1972. Dysphagia associated with a distended pulmonary vein. *Br J Radiol* 45, 225-228.

Ito, M., Takahashi, H., Fuse, K., Hirono, S., Washizuka, T., Kato, K., Yamazaki, F., Inano, K., Furukawa, T., Komada, M., Aizawa, Y., 2000. Polymorphisms of tumor necrosis factor- α and interleukin-10 genes in Japanese patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Jpn Heart J* 41, 183-191.

Kearney, M.T., Cotton, J.M., Richardson, P.J., Shah, A.M., 2001. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy; mechanism, manifestations, and management. *Postgrad Med J* 77, 4-10.

Kiang, J.G., Tsokos, G.C., 1998. Heat shock proteína 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80, 183-201.

Komajda, M., Raffoux, C., Salame, E., Colobani, J., Grogogeat, Y., Cabrol, C., Dausset, J., 1987. HLA A-B and DR in dilated cardiomyopathy. *Arch Mal Coeur Vaiss* 80, 1233-1237.

Kwok, W.W., Nepom, G.T., Raymond, F.C., 1995. HLA-DQ polymorphisms are highly selective for peptide binding interactions. *J Immunol* 155, 2468-2476.

Latif, N., Taylor, P.M., Khan, M.A., Yacoub, M.H., Duna, M.J., 1999. The expresión of heat shock protein 60 in patient with dilated cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 94, 112-119.

Li, Y., Bourlet, T., Andreoletti, L., Mosnier, J.F., Peng, T., Yang, Y., Archard, L.C., Pozzetto, B., Zhang, H., 2000. Enteroviral capsid protein VP1 is present in myocardial tissues from some patients with myocarditis or dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101, 231-234.

Li, Y., Peng, T., Yang, Y., Niu, C., Archard, L.C., Zhang, H., 2000. High prevalence of enteroviral genomic sequences in myocardium from cases of endemic cardiomyopathy (Keshan disease) in China. *Heart* 83, 696-701.

Limas, C.J., Limas, C., 1989. HLA antigens in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Br Heart* 62, 379-383.

Limas, C.J., 1996. Autoimmunity in dilated cardiomyopathy and the major histocompatibility complex. *Int J Cardiol* 54, 113-116.

Liu, W., Li, W.M., Sun, N.L., 2005. Polymorphism of the second exon of human leukocyte antigen-DQA1, DQB1 gene and genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy in people of the Han nationality in northern China. *Chin Med J* 118, 238-241.

Maharaj, B., Hammond, M.G., 1990. HLA-A, B, DR, and DQ antigens in black patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1; 1402-1403.

Mahon, N.G., Maddden, B.P., Caforio, A.L., Elliott, P.M., Haven, A.J., Keogh, B.E., Davies, M.J., McKenna, W.J., 2002. Immunohistologic evidence of myocardial disease in apparently healthy relatives of patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 39, 455-462.

Maione, S., Giunta, A., Betocchi, S., Ferro, G., Vigorito, C., Chiariello, M., 1983. Two-dimensional echocardiography in idiopathic enlargement of the right atrium. Reliability and limitations. *Cardiology* 70, 216-222.

Mann, D.L., Bristow, M.R., 2005. Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation* 111,2837-2849.

Maron, B.J., Towbin, J.A., Thiene, G., Antzelevith, C., Corrado, D., Arnett, D., Moss, A.J., Seidman, C.E., Young, J.B., 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation* 113, 1807-1816.

Martinetti M., Salvaneschi, L., Graziano, G., Arbustini, E., Diegoli, M., Dondi, E., Pizzochero, C., Gavazzi, A., 1992. HLA polymorphism in the susceptibility or resistance to dilated cardiomyopathy. *G Ital Cardiol* 22, 73-83.

Matsui, S., Fu, M.L., Shimizu, M., Fukuoka, T., Takeokoshi, N., Murakami, E., Hjalmarson, A., 1995. Dilated cardiomyopathy defines serum autoantibodies against G-protein-coupled cardiovascular receptors. *Autoimmunity* 21, 85-88.

Mehta, T.A., Greenman, J., Ettelaie, C., Venkatasubramaniam, A., Chetter, IC., McCollum, P.T., 2005. Heat shock proteins in vascular disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 29, 395-402.

Mills, R.M., Lauer, M.S., 2004. Endomyocardial biopsy: A procedure in search of an indication. *Am Heart J* 47,759-760.

Milner, C.M., Campbell, R.D., 1992. Polymorphic analysis of the three MHC-linked HSP70 genes. *Immunogenetics* 36, 357-362.

McKenna, C.J., Codd, M.B., McCann, H.A., Sugrue, D.D., 1997. Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution. *Heart* 77, 549-52.

Morgera, T., Di Lenarda, A., Sabbadini, G., Rakar, S., Carniel, E., Driussi, M., Sinagra, G., 2004. Idiopathic dilated cardiomyopathy: prognostic significance of electrocardiographic and electrophysiologic findings in the nineties. *Ital Heart J* 5, 593-603.

Morita, H., Seidman, J., Seidman, C.E., 2005. Genetic causes of human heart failure. *J Clin Invest* 115, 518-526.

Moseley, P., 2000. Stress proteins and the immune response. *Immunopharmacology* 48, 299-302.

Nelson, C.A., Fremont, D.H., 1999. Structural principles of MHC class II antigen presentation. *Rev Immunogenet* 1, 47-59.

Oldstone, M.B., 1998. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 12, 1255-1265.

Osa, A., Almenar, L., Palencia, M., Puig, N., Chirivella, M., Montoro, J., 1999. Antigens of the mayor histocompatibility system in ischemic heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 22, 292-296.

Pablos, J.L., Carreira, P.E., Martín-Villa, J.M., Montalvo, G., Arnaiz-Villena, A., Gómez-Reino, J.J., 1995. Polymorphism of the heat-shock protein gene HSP70-2 in systemic lupus erythematosus. *Br J Rheumatol* 34, 721-723.

Padovani, J.C., Pazin-Filbo, A., Simoes, M.V., Marin-Neto, J.A., Zago, M.A., Franco, R.F., 2000. Gene polymorphisms in the TNF locus and the risk of myocardial infarction. *Thromb Res* 100, 263-269.

Poller, W., Kuhl, U., Tschoepe, C., Pauschinger, M., Fechner, H., Schultheiss, H.P., 2005. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated of cardiomyopathy. *J Mol Med* 83, 579-586.

Raska, M., Weigl, E., 2005. Heat shock proteins in autoimmune diseases. *Biomed Pap* 149, 243-249.

Reohr, P.B., Mangklabruks, A., Janiga, A.M., DeGroot, L.J., Benjasuratwong, Y., Soltani, K., 1992. Pemphigus vulgaris in siblings: HLA-DR4 and HLA-DQw3 and susceptibility to pemphigus. *J Am Acad Derm* 27, 189-193.

Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Godwin, J., Gvarfas, I., Martin, I., Nordet, P., 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842.

Ritossa, F.M., 1962. A new pattern induced by a temperature shock and DNT in *Drosophila*. *Experientia* 18, 571-573.

Ronnlom, L.E., Forsberg, H., Evrin, P., 1991. Increased level of HLA-DR-expressing T lymphocytes in peripheral blood from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiology* 78, 161-167.

Ruiz-Morales, J.A., Vargas-Alarcón G., Flores-Villanueva, P.O., Villareal-Garza, C., Hernandez-Pacheco, G., Yamamoto-Furusho, J.K., Rodríguez-Pérez, J.M., Pérez-Hernández, N., Rull, M., Cardiel, M.H., Granados, J., 2004. HLA-DRB1 alleles encoding the “shared epitope” are associated with susceptibility to developing

rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the beta-chain are protective in Mexican Mestizos. *Hum Immunol* 65, 262-269.

Santori, F.R., Arsov, I., Lilić, M., Vukmanovic, S., 2002. Editing autoreactive TCR enables efficient positive selection. *J Immunol* 169, 1729-1734.

Sarantopoulos, S., Lu, S., Cantor, H., 2004. Qa-1 restriction of CD8⁺ suppressor T cells. *J Clin Invest* 114, 1218-1221.

Sargent, C.A., Dunham, I., Trowsdale, J., 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc Natl Aca Sci* 86, 1968-1972.

Shimizu, S., Nomura, K., Ujihara, M., Demura, H., 1999. An additional exon of stress-inducible heat shock protein 70 gene (HSP70-1). *Biochem Biophys Res Commun* 257, 193-198.

Spotnitz, M.D., Lesch, M., 2006. Idiopathic dilated cardiomyopathy as a late complication of healed viral (Coxsackie B virus) myocarditis: historical analysis, review of the literature, and a postulated unifying hypothesis. *Prog Cardiovasc Dis* 49, 42-57.

Srivastava, P.K., 2002. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive. *Nature Reviews Immunology* 2, 185-194.

Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C., 1994. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368, 215-221.

Sun, M., Dawood, F., Wen, W.H., Chen, M., Dixon, I., Kirshenbaum, L.A., Liu, P.P., 2004. Excessive Tumor Necrosis Factor Activation After Infarction Contributes to Susceptibility of Myocardial Rupture and Left Ventricular Dysfunction. *Circulation* 110, 3221-28.

Teske, A.J., De Boeck, B.W., Melman, P.G., Sieswerda, G.T., Doevendans, P.A., Cramer, M.J., 2007. Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc Ultrasound* 5, 27.

The MHC sequencing consortium., 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401, 921-923.

Thiene, G., Corrado, D., Basso, C., 2004. Cardiomyopathies: is it time for a molecular classification?. *Eur Heart J* 25, 1772-1775.

Urdahl, K.B., Sun, J.C., Beavan, M.J., 2002. Positive selection of MHC class Ib-restricted CD8(+) T cells on hematopoietic cells. *Nat Immunol* 3, 772-779.

Vargas-Alarcón, G., Gamboa, R., Zuñiga, J., Hernandez-Pacheco, G., Ramos-Kuri, M., Castillo, E., Gomez-Casado, E., Martinez-Laso, J., Arnaiz-Villena, A., Granados, J., 2000. HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. *Hum Immunol* 61, 341-344.

Vargas-Alarcón, G., Granados, J., 1993. El Sistema principal de histocompatibilidad. *Rev Mex Reuma* 8, 251-256.

Vilcek, J., Lee, T.H., 1991 Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem* 266, 7313-7316.

Villalobos-Hurtado, R., Sánchez-Rodríguez, S.H., Avalos-Díaz, E., Herrera-Esparza, H., 2003. Possible role of Hsp70 in autoantigen shuttling to the dermo-epidermal junction in systemic lupus erythematosus. *Reumatismo* 55, 155-158.

Ways, J.P., Coppin, H.L., Parham, P., 1985. The complete primary structure of HLA-Bw58. *J Biol Chem* 260, 11924-11933.

Wilson, A.G., di Giovine, F.S., Blakemore, A.I., Duff, G.W., 1992. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Hum Mol Genet* 1, 353.

Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O., Duff, G.H., 1997. Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci* 94, 3195-3199.

Wood, K.J., Sakagushi, S., 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3, 199-210.

Woolf, B., 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann Hum Genetic* 19, 251-253.

Wordsworth, B.P., Stedeford, J., Rosenberg, W.M, Bell, J.I., 1991. Limited heterogeneity of the HLA class II contribution to susceptibility to rheumatoid arthritis is suggested by positive associations with HLA-DR4, DR1 and DRw10. *Br J Rheumatol* 30, 178-180.

XVI. GLOSARIO

Ortopnea: Es la dificultad para respirar al estar acostado. Es un síntoma común en las personas que sufren patologías cardíacas o pulmonares.

Disnea: Es la dificultad para respirar o falta de aire.

Hemoptisis: Incluye la expectoración de esputo hemoptico o de sangre fresca procedente del aparato respiratorio, más concretamente de la zona subglótica.

Decúbito: Posición del cuerpo en estado de reposo sobre un plano más o menos horizontal.

Disfagia: Síntoma consistente en dificultad para la deglución.

Fibrilación auricular: Es una arritmia cardíaca que se origina en la aurícula en la que la musculatura de las mismas no se contrae al unísono y de forma uniforme, siendo estas ineficaces para bombear la sangre a los ventrículos.

Taquipnea: Consiste en un aumento de la frecuencia respiratoria por encima de los valores normales.

Hepatomegalia: Es el aumento patológico del tamaño del hígado.

Cianosis: Es la coloración azulada de la piel o de las membranas mucosas, causada por una falta de oxígeno en la sangre.

Taquicardia: Es el incremento del ritmo cardiaco, en particular cuando la frecuencia cardiaca supera los 100 latidos por minuto en situación de reposo.

Cardiomegalia: Es el agrandamiento anormal del corazón o hipertrofia cardiaca.

Hilios: Anatómicamente son el conjunto de vasos, bronquios, nervios que desde el mediastino penetran al pulmón.

Gasto cardiaco: Es el volumen de sangre impulsado por el corazón cada minuto por el ventrículo izquierdo hacia la arteria aorta.

Fracción de eyección: Es la medida más importante del funcionamiento cardiaco. Este valor expresado en porcentaje, mide la disminución del volumen del ventrículo izquierdo del corazón en sístole, con respecto, a la diástole, por lo que una fracción de eyección del 50% significa que el corazón, al contraerse, reduce el volumen de su ventrículo izquierdo a la mitad, con respecto a su posición relajada.

Miosina: Es una proteína que esta implica en la contracción muscular.

Receptores beta adrenérgicos: Son receptores asociados a la proteína G, en particular el Receptor β_1 es el predominante en el corazón y ayudan al aumento del gasto cardiaco.

Telómero: Son estructuras cromatínicas especializadas que se encuentran localizadas en los extremos de los cromosomas eucariontes.

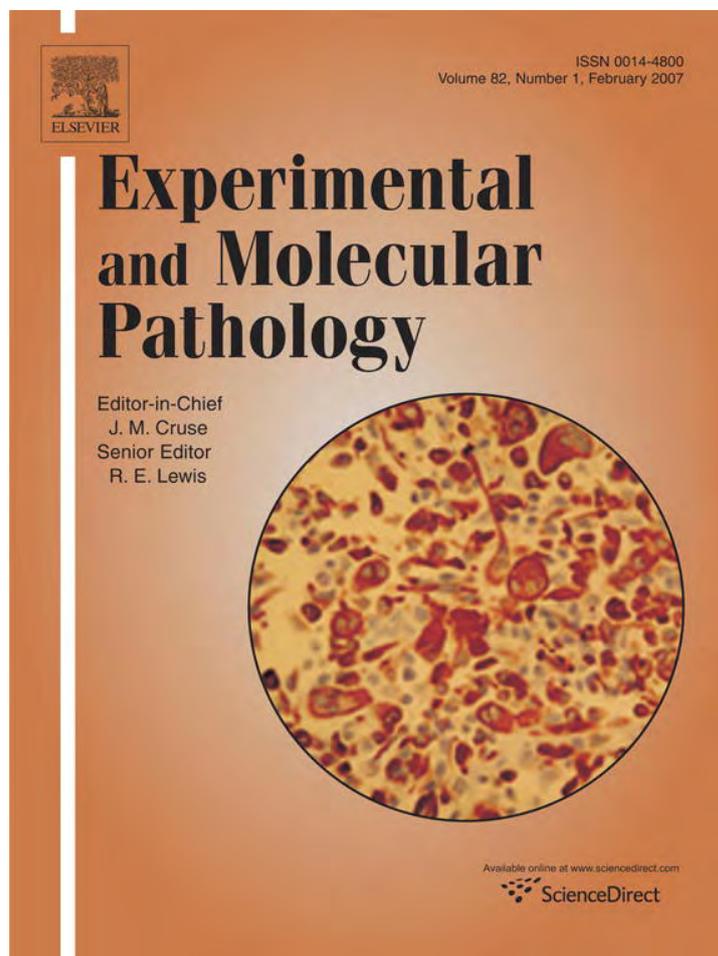
Polimorfismo: Un polimorfismo genético son los múltiples alelos de un gen entre una población.

Exón: Son las regiones de un gen que codifican proteína.

Centrómero: Región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátides. Es la región de unión a las fibras del huso acromático durante la división celular.

Anoxia: Es la falta casi total del oxígeno en un tejido. Esta puede ser debida a patología pulmonar.

Provided for non-commercial research and educational use only.
Not for reproduction or distribution or commercial use.



This article was originally published in a journal published by Elsevier, and the attached copy is provided by Elsevier for the author's benefit and for the benefit of the author's institution, for non-commercial research and educational use including without limitation use in instruction at your institution, sending it to specific colleagues that you know, and providing a copy to your institution's administrator.

All other uses, reproduction and distribution, including without limitation commercial reprints, selling or licensing copies or access, or posting on open internet sites, your personal or institution's website or repository, are prohibited. For exceptions, permission may be sought for such use through Elsevier's permissions site at:

<http://www.elsevier.com/locate/permissionusematerial>

MHC class II genes in Mexican patients with idiopathic dilated cardiomyopathy

José Manuel Rodríguez-Pérez^a, José Manuel Fragoso^a, Edith Alvarez-León^b,
Nancy Martínez-Rodríguez^a, Guillermo J. Gallardo^a, Selene Inés-Real^a,
Julio Granados^c, Pedro A. Reyes^b, Gilberto Vargas-Alarcón^{a,*}

^a Department of Physiology, Cardiovascular Disease's Genomic and Proteomic Study Group, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez",
Juan Badiano No. 1, Tlalpan 14080, Mexico City, Mexico

^b Department of Immunology, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico City, Mexico

^c Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico

Received 24 July 2006, and in revised form 17 October 2006
Available online 28 November 2006

Abstract

The purpose of the present study was to evaluate the relationship between class II major histocompatibility complex (MHC) genes (HLA-DR and HLA-DQB) and the genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) in Mexican patients. The HLA-DR and DQB alleles were analyzed in 53 patients with IDC and 99 ethnically matched healthy controls using the polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) technique. IDC patients showed increased frequencies of HLA-DR4 (pC=0.02, OR=1.87), HLA-DQB1*0301 (pC=0.02, OR=1.92) and HLA-DQB1*0302 (pC=0.02, OR=1.87) when compared to healthy controls. On the other hand, IDC patients also showed decreased frequencies of HLA-DR11 allele (pC=0.03, OR=0.26) and HLA-DQB1*0201 (pC=0.04, OR=0.41). These data suggest that variation in class II HLA alleles could be a genetic factor involved in the susceptibility to IDC of the Mexican Mestizo population.
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Idiopathic dilated cardiomyopathy; Genetic susceptibility; HLA alleles

Introduction

Dilated cardiomyopathy (DC) is a syndrome characterized by cardiac enlargement and contractile systolic dysfunction of one or both ventricles, which may or may not progress to congestive heart failure (Zipes et al., 2005). The term idiopathic dilated cardiomyopathy (IDC) is used when even after a thorough evaluation no apparent etiologic factor can be distinguished. The pathogenesis of heart damage in IDC is still controversial. Some hypothesis suggest a viral origin of the disease (Bender, 1991) as initiators of an autoimmune acute myocarditis (Caforio et al., 2002) that could then progress to IDC. Other theories involve the participation of inflammatory

cytokines such as TNF-alpha (Sigusch et al., 2000; Torre-Amione et al., 2000), IL-2 and IL-10 (Marriot et al., 1996). Nowadays there is growing evidence of an important immunologic/autoimmune component to the disease, with abnormalities in both humoral (Osa et al., 1999) and cellular response (Rönnblom et al., 1991; Anderson et al., 1982), that is becoming the major pathogenic hypothesis for myocardial damage. Due to the important participation of the immune system in the development of the disease, genetic factors implied on its onset could include genes located on the major histocompatibility complex (MHC). There has been an especially significant correlation observed with MHC class II antigens, particularly HLA-DR4 (McKenna et al., 1997). Other studies have shown strong correlation between HLA-DQw4 with a relative risk of 2.8 (Carlquist et al., 1991), which increases with the combination DR4/DQw4. The HLA-DQA1*0501 allele has also been associated with IDC in some populations. Other alleles implied

* Corresponding author. Fax: +52 525 5573 09 26.

E-mail address: gvargas63@yahoo.com (G. Vargas-Alarcón).

Table 1
Gene frequencies (gf) of HLA-DR alleles in IDC patients and healthy controls

HLA	Patients (n=53)		Controls (n=99)		pC	OR	95%CI
	n	gf	n	gf			
DR1	3	0.028	10	0.050			
DR3	2	0.018	11	0.055			
DR4	39	0.367	47	0.237	0.02	1.87	1.08–3.23
DR7	6	0.056	22	0.111			
DR8	16	0.150	33	0.166			
DR9	0	0.000	3	0.015			
DR10	0	0.000	1	0.005			
DR11	3	0.028	20	0.101	0.03	0.26	0.06–0.95
DR12	0	0.000	2	0.010			
DR13	6	0.056	10	0.050			
DR14	16	0.150	21	0.106			
DR15	9	0.084	13	0.065			
DR16	6	0.056	5	0.025			

Abbreviations: gf=gene frequencies; HLA=human leukocyte antigen; OR=odds ratio; pC=corrected *p* value; 95%CI=95% confidence intervals.

as susceptibility markers have been HLA-DQ3, HLA-DR1 (Wang et al., 2000), HLA-DR5, and HLA-DRw10 (Harcombe et al., 1999; Anderson et al., 1984; Carlquist et al., 1994; Maharaj and Hammond, 1990), whereas the HLA-DRw6 and the HLA-DQA1*0201 alleles (Liu et al., 2004) have been found to be probably protective against IDC. These results have not been consistent, and significant genetic heterogeneity has been reported among populations, perhaps due to ethnic differences among the studied groups. Thus, the aim of the present study was to investigate the relationship between HLA class II alleles and genetic susceptibility to IDC in Mexican patients.

Materials and methods

Subjects

We studied 53 Mexican Mestizo patients with idiopathic dilated cardiomyopathy, all of them were diagnosed based on the clinical history, physical examination with electrocardiography, chest radiography, echocardiography, left ventriculography and coronary angiography. The diagnosis of IDC was made according to the World Health Organization and the National Heart, Lung, and Blood Institute (Richardson et al., 1996; Manolio et al., 1992). A group of 99 healthy unrelated individuals with neither symptoms nor previous diagnosis of cardiovascular problems or systemic disease was studied as control group. All included subjects (patients and controls) were ethnically matched, and the individuals who for three generations, including their own, were born in Mexico were considered as Mexican Mestizos. A Mexican Mestizo is defined as someone born in Mexico who is a descendant of the original autochthonous inhabitants of the region and of individuals, mainly Spaniards of Caucasian and/or Black origin, who came to America during the sixteenth century. The Institutional Ethics and Research Committees approved the study and all subjects signed and informed consent.

HLA-DR and -DQ typing

Genomic DNA was extracted from peripheral blood containing EDTA by a rapid non-enzymatic method (Lahiri and Nurnberger, 1991) and used as a template to amplify, by means of a polymerase chain reaction (PCR) the second exon of the HLA-DR and HLA-DQ genes. The PCR products were hybridized with sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) by reverse dot-blot (Amplicor kit; Hoffmann La Roche, Basel, Switzerland) that provided low to medium resolution for HLA-DR and HLA-DQ alleles. The subtypes of HLA-DR*04 were done by direct sequencing using standard protocols.

Statistical analysis

Gene frequencies of HLA-DR and -DQ on patients were obtained by direct counting and were compared with those in healthy unrelated controls. The significance of the differences between groups was determined using Mantel–Haenzel chi-square analysis, which was combined with the 2×2 contingency tables using the EPISTAT statistical program (Version 5.0; USD Incorporated 1990, Stone Mountain, Georgia). Fisher's exact test was used if the number of any cell was <5. *P* values were corrected (pC) according to Yates, and they were considered statistically significant if their value were <0.05. Relative risk with 95% confidence intervals (CI) was calculated as the odds ratio, according to Woolf's method (Woolf, 1955).

Results

HLA-DR allele frequencies in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and healthy controls are shown in Table 1. Patients showed increased frequency of HLA-DR4 allele when compared to healthy controls (pC=0.02, OR=1.87, 95%CI=1.08–3.23). On the other hand, IDC patients also showed a decreased frequency of the HLA-DR11 allele (pC=0.03, OR=0.26, 95%CI=0.06–0.95). When the HLA-DQB locus was analyzed, increased frequencies of HLA-DQB*0301 (pC=0.02, OR=1.92, 95%CI=3.48) and HLA-DQB1*0302 (pC=0.02, OR=1.87, 95%CI=3.23) alleles were observed in the patient group when compared to healthy controls (Table 2). Patients also showed decreased frequency of the HLA-DQB1*0201 allele (pC=0.04, OR=0.41, 95%CI=0.17–0.97). When the HLA-DR*04 subtypes were analyzed in IDC patients and healthy controls, their distribution was similar in both groups. HLA-DR*0407 was the most frequent HLA-DR*04 subtype in patients (gene frequency=0.122) and healthy controls (gene frequency=0.106) (data not shown).

Discussion

Immune responses are mediated through molecular products of genes located in the MHC (major histocompatibility

Table 2
Gene frequencies (gf) of HLA-DQB1 in IDC patients and healthy controls

HLA-DQB	Patients (n=53)		Controls (n=99)		pC	OR	95%CI
	n	gf	n	gf			
0501	3	0.028	12	0.060			
0502	0	0.000	5	0.025			
0503	0	0.000	9	0.045			
0504	0	0.000	1	0.005			
0602	9	0.084	15	0.075			
0603	0	0.000	4	0.020			
0604	0	0.000	3	0.015			
0201	8	0.075	33	0.166	0.04	0.41	0.17–0.97
0301	31	0.292	35	0.176	0.02	1.92	1.06–3.48
0302	39	0.367	47	0.237	0.02	1.87	1.08–3.23
0304	0	0.000	1	0.005			
0402	16	0.151	33	0.166			

Abbreviations: gf=gene frequencies; HLA=human leukocyte antigen; OR=odds ratio; pC=corrected *p* value; 95%CI=95% confidence intervals.

complex) region, which have the task of presenting cell-associated antigens for the recognition by T cells (Bender, 1991). There are two main types, class I MHC which samples cytosolic peptides, and class II MHC which samples extra-cellular antigens that have been endocytosed. HLA-DR is one of the 3 major subregions within the human class II MHC region on chromosome 6. Apparently, patients with IDC have demonstrated statistically significant increased levels of HLA-DR positive T helper cells and T cytotoxic/suppressor cells when compared against patients with heart failure and controls (Rönnblom et al., 1991). These findings then give strength to the cell-mediated immune response theory as the myocardial inflammatory pathway, at least in some IDC patients (Penninger et al., 1997). Decreased natural killer cell activity (an independent risk marker in 50% of patients with IDC associated with HLA-A3), cellular autoimmune reactivities against myocytes, and antibodies with cross-reactivity with synthetic peptides of coxsackie B virus specific for an ADP/ATP transport protein, as well as antibodies capable of inhibiting ligand binding to cardiac β -receptors have also been reported (Anderson et al., 1982; Osa et al., 1999). On the other hand, several studies suggest that dilated cardiomyopathy occurs as a result of mutations in genes encoding a variety of proteins, including sarcomeric and structural proteins (Morita et al., 2005), and may result from activation of several different independent mechanisms. However, clinical evaluations of families with dilated cardiomyopathy gene mutations often reveal the absence of disease in individuals carrying disease-causing mutations. These data suggest that more knowledge of the cellular and molecular events triggered by dilated cardiomyopathy mutations is needed to understand the pathways by which the human heart remodels and ultimately fails.

Considering the participation of the immune system in the etiology of IDC, several studies have suggested that genetic susceptibility to IDC is linked to HLA class II alleles. However, the results have been inconsistent and there has been a discrepancy among the different studied populations. This may have been partly because of the ethnic differences in the distribution of HLA alleles in different populations as well as the use of serological techniques for HLA typing. In the present study we detected a significant association of IDC with the HLA-DR4 allele. This association has been previously reported in several Caucasian populations (Anderson et al., 1984; Carlquist et al., 1991, 1994; Limas and Limas, 1989; McKenna et al., 1997). However, subtyping analysis was not done in these studies. In addition, we analyzed the distribution of HLA-DRB*04 subtypes in IDC patients and healthy controls in order to define if a specific HLA-DR4 subtype could be associated with susceptibility to the disease. We observed a similar distribution of HLA-DR*04 subtypes in IDC patients and healthy controls suggesting that sequences shared by all DR*04 subtypes could be involved in the development of the disease. The HLA-DR4 is the most frequent allele in Mexican Mestizo population as well as in Mexican Amerindians (Vargas-Alarcón et al., 2000). In addition, HLA-DR4 is known to be positively associated with several diseases such as rheumatoid arthritis, actinic prurigo, diabetes mellitus type I and pemphigus vulgaris in several populations including the

Mexicans (Grabczynska et al., 1999; Harfouch-Hammond et al., 1996; Hawke et al., 1999; Reohr et al., 1992; Wordsworth et al., 1991; Hojyo-Tomoka et al., 1997; Ruiz-Morales et al., 2004). On the other hand, increased frequencies of HLA-DQB1*0301 and -DQB1*0302 alleles were observed in IDC patients as compared to healthy controls. The increased frequency of DQB1*0301 could be independent of other alleles, whereas the increased frequency of -DQB1*0302 could be due to the known linkage disequilibrium between HLA-DR4 and this allele observed in several populations. Two alleles with decreased frequencies in our group of patients (HLA-DR11 and HLA-DQB1*0201) could be considered as protective alleles in the development of IDC. The mechanism by which HLA genes could determine susceptibility to dilated cardiomyopathy is not completely understood. The MHC genes regulate the immune response to infections, bind and present antigens to T cells, and have an important role in T-cell repertoire selection. In dilated cardiomyopathy the frequent detection of viral genome suggests that viral infections play a major role in the pathogenesis of the disease (Poller et al., 2005). Some studies report cellular autoimmune reactivities against myocytes, and antibodies with cross-reactivity with synthetic peptides of coxsackie B virus in dilated cardiomyopathy (Anderson et al., 1982; Osa et al., 1999), suggesting molecular mimicry as a potential mechanism for the disease. Thus, individuals with susceptible HLA alleles could present cross-reactive peptides and develop the disease, whereas individuals with protective HLA alleles failed to present these cross-reactive peptides.

In conclusion, our data suggests that genetic variation in class II HLA alleles could be a genetic factor related with the susceptibility to IDC in the Mexican Mestizo population. The HLA-DR4 allele could be a susceptibility marker whereas the HLA-DR11 and DQB1*0201 alleles could be associated with protection to developing the disease. Additional studies in a larger number of patients could help to establish the true significance of these associations.

Acknowledgments

This work was submitted in partial fulfillment of the requirements for the DSc Degree for J.M.R.P. at Universidad Nacional Autónoma de México.

J.M.R.P. was supported by a fellowship from Dirección General de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México.

This work was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología, Mexico D.F., México. The authors are grateful to study participants. Institutional Review Board approval was obtained for all sample collections.

References

- Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Hammond, E.H., 1982. Deficient natural killer cell activity in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 2, 1124–1127.
- Anderson, J.L., Carlquist, J.F., Lutz, J.R., DeWitt, C.W., Hammond, E.H., 1984. HLA-A, B and DR typing in idiopathic dilated cardiomyopathy: a search for immune response factors. *Am. J. Cardiol.* 53, 1326–1330.

- Bender, J.R., 1991. Idiopathic dilated cardiomyopathy. An immunologic, genetic or infectious disease, or all of above? *Circulation* 83, 704–706.
- Caforio, A.L., Mahon, N.J., Tona, F., McKenna, W.J., 2002. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenic and clinical significance. *Eur. J. Heart Fail.* 4, 411–417.
- Carlquist, J.F., Menlove, R.L., Murray, M.B., O'Connell, J.B., Anderson, J.L., 1991. HLA class II (DR and DQ) antigen associations in idiopathic dilated cardiomyopathy. Validation study and meta-analysis of published HLA association studies. *Circulation* 83, 515–522.
- Carlquist, J.F., Ward, R.H., Husebye, D., Feolo, M., Anderson, J.L., 1994. Major histocompatibility complex class II gene frequencies by serologic and deoxyribonucleic acid genomic typing in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 74, 918–920.
- Grabczynska, S.A., McGregor, J.M., Kondeatis, E., Vaughan, R.W., Hawk, J.L., 1999. Actinic prurigo and polymorphic light eruption: common pathogenesis and the importance of HLA-DR4/DRB1*0407. *Br. J. Dermatol.* 140, 232–236.
- Harcombe, A.A., Sharples, L., Large, S.R., Wallwork, J., Weissberg, P.L., Joysey, V., 1999. HLA antigen frequencies in end-stage idiopathic and ischaemic cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 68, 31–37.
- Harfouch-Hammond, E.H., Timsit, J., Boitard, C., Bach, J.F., Caillat-Zucman, S., 1996. Contribution of DRB1*04 variants to predisposition to or protection from insulin dependent diabetes mellitus is independent from DQ. *J. Autoimmun.* 9, 411–414.
- Hawke, S., Matsuo, H., Nicolle, M., Wordworth, P., Corlett, L., Spack, E., Deshpande, S., Driscoll, P.C., Willcox, N., 1999. Cross-restriction of a T cell clone to HLA-DR alleles associated with rheumatoid arthritis. clues to arthritogenic peptide motifs. *Arthritis Rheum.* 42, 1040–1050.
- Hojyo-Tomoka, T., Granados, J., Vargas-Alarcon, G., Yamamoto-Furusho, J.K., Vega-Memije, E., Cortes-Franco, R., Flores, O., Teixeira, F., Dominguez-Soto, L., 1997. Further evidence of the role of HLA-DR4 in the genetic susceptibility to actinic prurigo. *J. Am. Acad. Dermatol.* 36, 935–937.
- Lahiri, D.K., Nurnberger Jr., J.I., 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19, 5444.
- Limas, C.J., Limas, C., 1989. HLA antigens in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Br. Heart J.* 62, 379–383.
- Liu, W., Li, W.M., Sun, N.L., 2004. Relationship between HLA-DQA1 polymorphism and genetic susceptibility to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Chin. Med. J.* 117, 1449–1452.
- Maharaj, B., Hammond, M.G., 1990. HLA-A, B, DR and DQ Antigens in black patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am. J. Cardiol.* 65, 1402–1403.
- Manolio, T.A., Baughman, K.L., Rodeheffer, R., Pearson, T.A., Bristow, J.D., Michels, V.V., Abelmann, W.H., Harlan, W.R., 1992. Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung and Blood Institute workshop). *Am. J. Cardiol.* 69, 1458–1466.
- Marriot, J.B., Goldman, J.H., Keeling, P.J., Baig, M.K., Dalgleish, A.G., McKenna, W.J., 1996. Abnormal cytokine profiles in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy and their asymptomatic relatives. *Heart* 75, 287–290.
- McKenna, C.J., Codd, M.B., McCann, H.A., Sugrue, D.D., 1997. Idiopathic dilated cardiomyopathy: familial prevalence and HLA distribution. *Heart* 77, 549–552.
- Morita, H., Seidman, J., Seidman, C.E., 2005. Genetic causes of human heart failure. *J. Clin. Invest.* 115, 518–526.
- Osa, A., Almenar, L., Palencia, M., Puig, N., Chirivella, M., Montoro, J., 1999. Antigens of the major histocompatibility system in ischemia heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin. Cardiol.* 22, 292–296.
- Penninger, J.M., Pummerer, C., Liu, P., Neu, N., Bachmaier, K., 1997. Cellular and molecular mechanisms of murine autoimmune myocarditis. *APMIS* 105, 1–13.
- Poller, W., Kuhl, U., Tschöpe, C., Pauschinger, M., Fechner, H., Schultheiss, H.P., 2005. Genome-environment interactions in the molecular pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* 83, 579–586.
- Reohr, P.B., Manglabruks, A., Janiga, A.M., DeGroot, L.J., Benjasuratwong, Y., Soltani, K., 1992. Pemphigus vulgaris in siblings: HLA-DR4 and HLA-DQw3 and susceptibility to pemphigus. *J. Am. Acad. Dermatol.* 27, 189–193.
- Richardson, P., McKenna, W., Bristow, M., Maisch, B., Mautner, B., O'Connell, J., Olsen, E., Thiene, G., Goodwin, J., Gyarfás, I., Martin, I., Nordet, P., 1996. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841–842.
- Rönnblom, L.E., Forsberg, H., Evrin, P., 1991. Increased level of HLA-DR-expressing T lymphocytes in peripheral blood from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiology* 78, 161–167.
- Ruiz-Morales, J.A., Vargas-Alarcon, G., Flores-Villanueva, P.O., Villarreal-Garza, C., Hernandez-Pacheco, G., Yamamoto-Furusho, J.K., Rodriguez-Perez, J.M., Perez-Hernandez, N., Rull, M., Cardiel, M.H., Granados, J., 2004. HLA-DRB1 alleles encoding the “shared epitope” are associated with susceptibility to developing rheumatoid arthritis whereas HLA-DRB1 alleles encoding an aspartic acid at position 70 of the beta-chain are protective in Mexican Mestizos. *Hum. Immunol.* 65, 262–269.
- Sigusch, H.H., Lehmann, M.H., Schnittler, U., Reinhardt, D., Figulla, H.R., 2000. Tumor necrosis factor-alpha expression in idiopathic dilated cardiomyopathy: correlation to myocardial inflammatory activity. *Cytokine* 12, 1261–1266.
- Torre-Amione, G., Vooletich, M.T., Farmer, J.A., 2000. Role of tumour necrosis factor-alpha in the progression of heart failure: therapeutic implications. *Drugs* 59, 745–751.
- Vargas-Alarcón, G., Gamboa, R., Zuñiga, J., Hernández-Pacheco, G., Ramos-Kuri, M., Castillo, E., Gómez-Casado, E., Martínez-Laso, J., Armaiz-Villena, A., Granados, J., 2000. HLA-DR4 allele frequencies on Indian and Mestizo population from Mexico. *Hum. Immunol.* 61, 341–344.
- Wang, Q., Liao, Y., Gong, F., Mao, H., Zhang, J., 2000. HLA-DRB1 Gene Polymorphism in Patients with Dilated Cardiomyopathy, vol. 20. *J. Tongji Med. Univ.*, pp. 141–142.
- Wolf, B., 1955. On estimating the relation between blood group and disease. *Ann. Hum. Genet.* 19, 251–253.
- Wordworth, B.P., Stedeford, J., Rosenberg, W.M.C., Bell, J.I., 1991. Limited heterogeneity of the HLA class II contribution to susceptibility to rheumatoid arthritis is suggested by positive associations with HLA-DR4, DR1 and DRw10. *Br. J. Rheumatol.* 30, 178–180.
- Zipes, D.P., Libby, P., Bonow, R.O., Braunwald, E., 2005. *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 7th Edition. Elsevier Saunders, USA, pp. 1659–1692.