

Cardiopatía isquémica y su asociación con los genes de susceptibilidad, en pacientes con síndrome coronario agudo menores de 55 años

Dra. Susana Blanco Sobrino

RESUMEN

Fundamentación: El “Global Burden Disease (GBD) con respecto a las enfermedades cardiovasculares (ECV), la prevalencia de casos se duplicó de 271 millones en 1990 a 523 millones en 2019, y el número de muertes causadas por estas enfermedades aumentó de 12,1 millones en 1990, alcanzando 18,6 millones en 2019. Venezuela es el país más rezagado en el cumplimiento de las metas de reducción de la mortalidad prematura por enfermedad cardiovascular. El infarto agudo de miocardio (IAM), es la causa número uno de la mortalidad cardiovascular, siendo responsable del 25 % de la mortalidad en la población adulta venezolana. **Objetivo:** Determinar la asociación entre la cardiopatía isquémica y la variabilidad de los genes de receptores tipo Toll (*TLR2*)

DOI: <https://doi.org/10.59542/CRANM.2024. XXXI.6>

*Trabajo de Investigación que se presenta para la incorporación como Miembro
Correspondiente puesto 42 de la Academia Nacional de Medicina
Enero 2024*

y *TLR4*) en pacientes con síndrome coronario agudo. **Métodos:** Estudio descriptivo, de prevalencia, de asociación y correlacional, que incluyó 209 individuos venezolanos, no relacionados, clasificados en dos grupos. Pacientes con diagnóstico de IAM (n=75) e individuos aparentemente sanos (n=134). con o sin factores de riesgo cardiovascular (FRCV). A cada uno de los individuos se les extrajo 5 mL de sangre, a partir de la cual se extrajo el ADN genómico. La determinación de los polimorfismos Pro631His (rs5743704) y Arg753Gln (rs5743708) del gen *TLR2*, Arg299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (4986791) del gen *TLR4*, se realizó utilizando la técnica PCR-SSP. Las frecuencias de los polimorfismos, el equilibrio de Hardy-Weinberg y el modelo de herencia se determinaron con el programa SNPStats. Las diferencias de frecuencias entre los grupos fueron estimadas por la prueba de Chi-cuadrado y la fuerza de asociación se determinó como Odds Ratio. El análisis de correlación entre los polimorfismos, FRCV y severidad se determinó a través del coeficiente de correlación de Pearson. **Resultados:** En los individuos que sufrieron IAM temprano (≤ 55 años), los principales FRCV fueron el sexo (masculino), la hipertensión y el sedentarismo. Los pacientes con genotipos con por lo menos un alelo mutado (C/T + T/T) del polimorfismo *TLR4* rs4986791 (Thr399Ile) son más propensos a sufrir IAM. El análisis de correlación sugiere que la asociación del polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen *TLR4* es independiente de FRCV, explicando el desarrollo de IAM temprano. **Conclusión:** Los factores de riesgo cardiovascular y la variabilidad genética juegan un papel relevante en el desarrollo de la CI.

Palabras clave: TLR, polimorfismo, cardiopatía isquémica, infarto agudo de miocardio, factores de riesgo cardiovascular.

INTRODUCCIÓN

El Global Burden Disease (GBD) es un estudio multinacional para proporcionar estimaciones comparables y consistentes de la salud de la población a lo largo del tiempo, utilizando fuentes de datos

disponibles sobre incidencia, prevalencia, letalidad, mortalidad y riesgos para la salud a nivel poblacional, proporcionando las estimaciones para 204 países y territorios desde 1990 hasta 2019 (1).

Con respecto a las enfermedades cardiovasculares (ECV), la prevalencia de casos se duplicó de 271 millones en 1990 a 523 millones en 2019, y el número de muertes causadas por estas enfermedades aumentó de 12,1 millones en 1990, alcanzando 18,6 millones en 2019. Las tendencias mundiales de los años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) y los años de vida perdidos se duplicaron de 17,7 millones a 34,4 millones. Conjuntamente, el número total de años de vida perdidos por cardiopatía isquémica se ha incrementado desde 1990, alcanzando 182 millones de años de vida perdidos por discapacidad, 9,14 millones de muertes en el año 2019, y 197 millones de casos prevalentes de cardiopatía isquémica en 2019. Las enfermedades cardiovasculares continúan siendo la primera causa de enfermedad y mortalidad en el mundo. La carga de ECV mantiene su aumento de décadas para casi todos los países fuera de los países de altos ingresos y, de manera alarmante, ha comenzado a aumentar en algunos lugares donde anteriormente estaba disminuyendo (1).

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte a nivel mundial. En el año 2015, el Instituto de Métricas y Evaluación de la Salud (IHMS por sus siglas en inglés), de la Universidad de Washington, notificó que la cardiopatía isquémica (CI) era la primera causa de mortalidad en Venezuela, siendo responsable de 31 338 defunciones. Cifra que supone el 18 % de la carga de mortalidad total y el 59 % de la mortalidad cardiovascular (2).

Un estudio de la Organización Panamericana de la Salud, señala que Venezuela pertenece al grupo de las naciones más rezagada de América en el cumplimiento de las metas mundiales de reducción de la mortalidad prematura por enfermedad cardiovascular, que de acuerdo a esta organización se define como los decesos por enfermedad cardíaca antes de los 65 años (3). Un acelerado proceso de transición demográfica y epidemiológica está conduciendo a Venezuela a una epidemia de enfermedades cardiovasculares de grandes proporciones; en que las

afecciones del corazón y los vasos sanguíneos son la principal causa de muerte y representan una creciente carga sanitaria, social y económica para el país. Por otra parte, el 43 % de las defunciones cardiovasculares (21 000 muertes) ocurridas en Venezuela son prematuras, es decir, se producen antes de los 65 años, durante la etapa de mayor productividad de las personas. Suponiendo una tasa nacional de mortalidad cardiovascular que supera la tasa promedio en América (2).

La elevada carga de morbimortalidad en Venezuela aumenta constantemente y, de continuar la tendencia actual, se estima que en el 2030 las afecciones cardiovasculares producirán 66 000 muertes, representando el 33 % de la mortalidad total del país y una tasa de mortalidad de 185 x100 000 habitantes (2).

La cardiopatía isquémica, particularmente el infarto agudo de miocardio (IAM), es la causa número uno de la mortalidad cardiovascular en la población adulta venezolana, siendo responsable del 25 % de la mortalidad por enfermedad no transmisible (2).

Estudios epidemiológicos han demostrado que, además, de los factores de riesgo convencionales de enfermedad arterial coronaria (EAC), incluyendo la edad, sexo masculino, hipertensión, diabetes mellitus, obesidad, hipercolesterolemia, tabaquismo e historia familiar, los factores ambientales y el estilo de vida incrementan la susceptibilidad. Adicionalmente, a estos factores, se piensa que la predisposición genética juega un papel importante en la patogénesis de la EAC, demostrado en estudios de gemelos y familias.

Aunque los estudios poblacionales han descrito que múltiples variaciones genéticas contribuyen a heredar el riesgo de EAC, la identidad exacta de los genes candidatos y su efecto en la patogénesis de la enfermedad no es bien conocido (Revisado en 4).

En conjunto, los estudios epidemiológicos, familiares, entre otros, sugieren que aproximadamente el 50 % de la susceptibilidad a EAC es debido a riesgo genético (5).

PLANTEAMIENTO Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA DE ESTUDIO

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte en muchos países latinoamericanos, con tasas similares a la de los países desarrollados. En efecto, en la población venezolana, las afecciones del corazón y los vasos sanguíneos son la principal causa de muerte y representan una creciente carga sanitaria, social y económica para el país. Asimismo, Venezuela exhibe una de las tasas de mortalidad prematura por infarto de miocardio más altas de la región de las Américas (2). Sin embargo, durante la década 2000-2010, en las Américas se notificó una reducción de la tasa de mortalidad prematura causada por las enfermedades cardiovasculares, coincidiendo con un período de desarrollo económico en la mayoría de los países latinoamericanos, acompañado por una reducción moderada de la pobreza y mayor énfasis en los servicios sociales. No obstante, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reconoce que todavía el acceso a los servicios de salud es desigual y la distribución de los gastos de salud pública es pobre o insuficiente, con un alto costo para la población (3).

JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Datos de registros emitidos en el 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) colocan a las enfermedades no transmisibles como la primera causa de muerte en el mundo, causando 38 millones (68 %) de los 56 millones de defunciones registradas en 2012. En este grupo, las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de defunción y fueron responsables de 17,5 millones de fallecimientos (46 % de las muertes por enfermedades no trasmisibles). De estas muertes, se estima que 7,4 millones se debieron a cardiopatía isquémica y 6,7 millones a accidentes cerebro-vasculares (6).

En el año 2016, en Venezuela se estimó una mortalidad por enfermedad cardiovascular: 38 048 y, en ese mismo año, de acuerdo a los anuarios de mortalidad emitidos por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), el infarto agudo del miocardio causó 25 313

defunciones, estimándose una letalidad extra-hospitalaria de 55 %, siendo la tasa de mortalidad más alta entre los países Suramericanos. Además, se conoce que la cardiopatía isquémica representa la segunda causa específica más importante que produce pérdida de años de vida por muerte prematura y discapacidad en la población general venezolana, tanto en hombres como en mujeres, resaltando que el 40 % de los eventos ocurren en el grupo etario de mayor productividad, generando un fuerte impacto social y económico en el entorno familiar y en los sistemas de salud (7).

Desde hace años existe la evidencia de que los genes influyen en el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares (8). Asimismo, se ha descrito la existencia de variantes genómicas que actúan independientemente de los factores de riesgo para enfermedad arterial coronaria. Por lo tanto, el identificar marcadores genéticos de riesgo en la población venezolana podría tener un impacto relevante en la prevención y el tratamiento de esta enfermedad. Por ende, trabajos de investigación conducentes a la identificación de variantes genómica asociadas con el infarto agudo del miocardio y la enfermedad cardiovascular en todas sus expresiones, constituyen un importante aporte a la resolución de estas enfermedades en estadios precoces de la misma.

Se ha aceptado ampliamente que la inflamación juega un papel importante en los mecanismos fisiológicos y patológicos de la función y disfunción cardíaca. Además, se ha demostrado en la insuficiencia cardíaca la participación de la respuesta inmunitaria innata mediada por los receptores tipo toll (TLR). Estos receptores se expresan en varios tipos de células cardíacas, incluidas las células endoteliales, las células del músculo liso y los cardiomiocitos. En el corazón humano, los niveles de expresión relativa de los ARN mensajeros de TLR varían y muestran el siguiente orden: TLR4> TLR2> TLR3> TLR5> TLR1> TLR6> TLR7> TLR8> TLR9> TLR10. Sin embargo, estos TLR no solo presentan diferencias en la expresión, sino que realizan diferentes funciones en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (Revisado en (9)).

En consecuencia, el determinar la distribución de las frecuencias de los polimorfismos Pro631His (rs5743704) y Arg753Gln (rs5743708)

del gen *TLR2* y de los polimorfismos Arg299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (rs4986791) del gen *TLR4* en la población venezolana sana y con enfermedad arterial coronaria, permitirá determinar si constituyen un factor de riesgo a desarrollar esta patología y si están correlacionados con la presencia de factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria.

MARCO TEÓRICO

En los últimos dos siglos la revolución tecnológica e industrial, así como los cambios económicos y los consecuentes cambios sociales, han ocasionado un dramático cambio en el patrón de las enfermedades y causas de muerte. Al comienzo del siglo XX, las enfermedades cardiovasculares constituían menos del 10 % de todas las causales de muerte en la población mundial, representando para el año 1900, las enfermedades infecciosas y nutricionales las que mayor mortalidad ocasionaban a nivel mundial. Al comienzo del siglo XXI, las enfermedades cardiovasculares han sido las responsables de la mitad de las muertes a nivel mundial y se predice, que para el año 2021 sean las responsables de aproximadamente 25 millones de decesos anuales, siendo el 44 % de los mismos por enfermedad coronaria (10,11). Estos cambios en los patrones de morbilidad y mortalidad se conocen como transiciones epidemiológicas, que no son otra cosa que cambios en el *status* personal o colectivo, estructura social y cambios demográficos, siendo estas las causas mediante las cuales existen tantas diferencias alrededor del mundo, las cuales son muy marcadas entre países cuyas economías están establecidas, son emergentes o están en vías de desarrollo (Figura 1) (12,13).

Es importante resaltar que en países industrializados o de economías establecidas, las campañas costosas y reiterativas dirigidas a atacar aquellos factores de riesgo, como el tabaquismo, han obtenido un éxito relativo en cuanto a retardar, a leve escala, el ascenso de la enfermedad cardiovascular, esta a su vez experimenta un preocupante ascenso en la población joven, debido a la presencia, cada día mayor, de

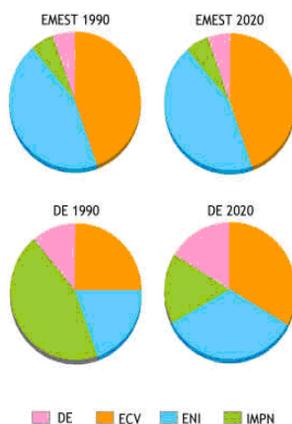


Figura 1. Cambios en los patrones de mortalidad desde 1990 hasta el 2020. EMEST: Economías de mercado establecidas. DE: Economías en desarrollo; ECV: Enfermedad cardiovascular; ENI: Enfermedades no infecciosas; IMPN: Infecciones maternas, perinatales y nutricionales. *World Health Organization*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41864>.

obesidad y sedentarismo infantil (era cibernética), con la consecuente aparición de diabetes mellitus e hipertensión (14).

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo una grave amenaza en todas las regiones de las Américas y, de hecho, es la principal causa de muerte en las subregiones Andina, Cono Sur, Caribe y América Central (16). En el año 2019, las enfermedades cardiovasculares (ECV) ocasionaron aproximadamente 18,6 millones muertes, constituyendo la principal causa de muerte a nivel mundial (17).

Es indudable que la enfermedad cardiovascular es de origen multifactorial, por lo cual se ha considerado abordar este problema a través de tres estrategias bien definidas: a) mejorar y poner al alcance de la mayoría las medidas de prevención que se enfoquen en el control de los factores de riesgo, a través de una política de salud pública. b)

identificar subgrupos de alto riesgo que manifiesten esta patología, mediante la búsqueda de variantes genéticas o perfiles bioquímicos que permitan aplicar una terapia preventiva, y c) perfeccionamiento de las herramientas utilizadas en la prevención secundaria, a objeto de mejorar la calidad de vida (18).

Los factores de riesgo identificados para EAC son similares entre países desarrollados y en países en vía de desarrollo. Para la población latinoamericana en orden de frecuencia son: tabaquismo (30 %), obesidad (23 %), síndrome metabólico, (20 %), hipertensión arterial (18 %), hipercolesterolemia (14 %), diabetes mellitus (7 %) y presencia de placa carotídea (8 %) (19). Es relevante considerar que la edad como factor de riesgo ha experimentado grandes cambios y en la actualidad se encuentran eventos más precoces debido a acumulación de factores de riesgo a edades más tempranas.

La mortalidad y morbilidad causada por la EAC difiere entre los diferentes continentes, países e incluso en las mismas poblaciones, proponiendo que los factores que influyen con más fuerza en el pronóstico de dicha patología son la severidad de la EAC, el manejo terapéutico y la condición socioeconómica local.

Epidemiología

Datos de registros emitidos en el 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) colocan a las enfermedades no transmisibles como la primera causa de muerte en el mundo, causando 38 millones (68 %) de los 56 millones de defunciones registradas en 2012. En este grupo, las enfermedades cardiovasculares son la causa principal de defunción y fueron responsables de 17,5 millones de fallecimientos (46 % de las muertes por enfermedades no trasmisibles). De estas muertes, se estima que 7,4 millones se debieron a cardiopatía isquémica y 6,7 millones a accidentes cerebro-vasculares (6).

Registros de la OMS indican que más del 40 % (16 millones) de las defunciones eran muertes prematuras (ocurridas antes de los 70 años) y el 82 % de estas ocurrieron en países con ingresos bajos y medios, lo cual evidencia la importancia de las políticas de salud pública

y el acceso a los sistemas de salud oportunos en las poblaciones más vulnerables (6).

Enfermedad Arterial Coronaria (EAC)

Dentro de las enfermedades cardiovasculares la cardiopatía isquémica, o también llamada enfermedad arterial coronaria (EAC), ha sido definida como una isquemia tisular caracterizada por la obstrucción de las arterias epicárdicas que irrigan el músculo cardíaco (Figura 2).

La enfermedad arterial coronaria es una epidemia a nivel mundial y es el tipo más común de enfermedad cardíaca, responsable de haber ocasionado 365 914 fallecimientos en el año 2017. Aproximadamente 2 de cada 10 muertes por EAC ocurren en adultos menores de 65 años (20).

En relación con la isquemia miocárdica, esta se produce cuando la perfusión coronaria resulta insuficiente para cubrir las necesidades de oxígeno y de sustrato metabólico de la célula miocárdica para

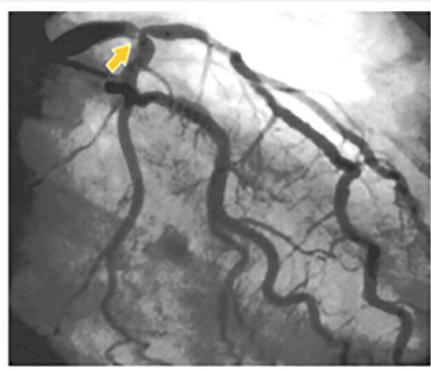


Figura 2. Estenosis severa del tercio distal del tronco de la coronaria izquierda. En proyección oblicua anterior, con angulación caudal, se demuestra una lesión estenótica severamente ulcerada en la porción distal del tronco de la coronaria izquierda (flecha anaranjada) (Laboratorio de Hemodinamia del Hospital “Dr. Miguel Pérez Carreño”).

mantener una función adecuada. La isquemia miocárdica puede ser consecuencia de: 1) un aumento del trabajo miocárdico y, por tanto, de la demanda de oxígeno en presencia de una estenosis arterial coronaria que limita el flujo, o 2) una reducción de la perfusión coronaria causada por una constricción coronaria epicárdica o microvascular o por una trombosis aguda (6). Estos mecanismos pueden actuar en combinación, en algunos pacientes, así como en distintos episodios isquémicos en el mismo paciente (Figura 3). En la práctica clínica, las estenosis coronarias se consideran muchas veces la causa única o principal de la isquemia miocárdica porque son las más evidentes y fácilmente demostrables. La trombosis aguda puede reconocerse hasta que los trombos han sido lisados o quedan incorporados en las placas ateroscleróticas. La detección de espasmo coronario y de la estenosis dinámica es incluso más difícil porque son transitorios y, por lo general, precisan la repetición de la angiografía tras la administración de nitratos o pruebas de provocación. Por último, la constricción microvascular puede deducirse solo indirectamente por la progresión distal lenta del flujo de un colorante en la angiografía o mediante estudios diagnósticos especiales (17).

La reducción del flujo sanguíneo por estenosis y posterior trombosis de los vasos de la circulación coronaria se asocia con la presentación de síndromes coronarios agudos, de los cuales el más grave es el IAM, caracterizado fundamentalmente por la necrosis de la célula miocárdica, iniciando en las regiones más profundas o sub-endocardio, siendo esta la región más susceptible a la isquemia y necrosis, comenzando la misma en los primeros 20 a 30 minutos posteriores a la oclusión del vaso sanguíneo, progresando hasta las capas más superficiales, originando un frente de onda cuya velocidad tendrá una relación directamente proporcional con la severidad de la obstrucción coronaria (Figura 4) (21).

Tipos de Síndrome Coronario Agudo (SCA)

La formación de un trombo dentro de una arteria coronaria, con obstrucción del flujo sanguíneo coronario y reducción del aporte de

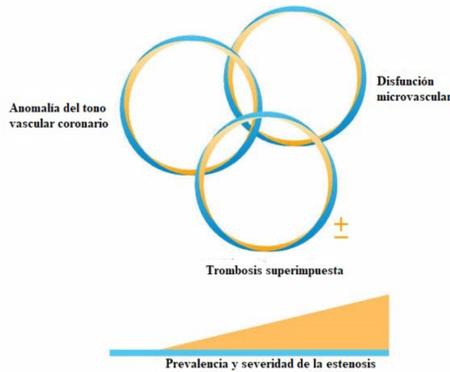


Figura 3. Componentes fisiopatológicos de la isquemia miocárdica. Diferentes síndromes isquémicos son el resultado de una obstrucción fija del flujo sanguíneo a través de las arterias coronarias, causado por protrusión y la fisura de placas ateroscleróticas, trombosis subsecuente o vasoconstricción de la red microvascular. Estos eventos pueden ocurrir juntos o de forma separada. (Tomado de: OPS. *Las enfermedades cardiovasculares en las Américas: Hoja informativa*. 2009).

oxígeno al miocardio, produce varios tipos de síndrome coronario agudo (SCA). Estos episodios trombóticos aparecen, en gran medida, en respuesta a lesiones ateroscleróticas que han evolucionado a una fase inflamatoria/protrombótica de alto riesgo. Aunque son diferentes unos de otros, los procesos ateroscleróticos y trombóticos parecen estar íntimamente interrelacionados, produciendo un SCA a través de un proceso multifactorial, complejo, denominado aterotrombosis. Los SCA representan un espectro de episodios miocárdicos isquémicos que comparten una fisiopatología similar y comprenden la angina inestable, el infarto agudo del miocardio con onda Q (IAM Q), el infarto agudo del miocardio sin onda Q (IAM no Q) y la muerte súbita (Figura 5) (21).

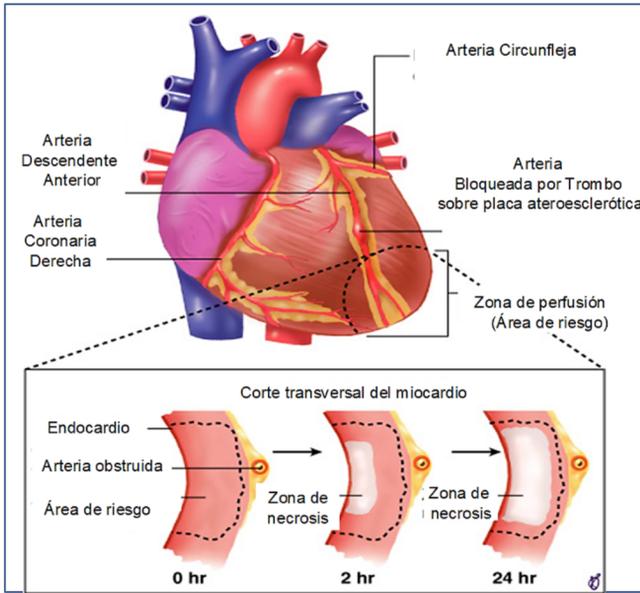


Figura 4. Representación esquemática de la progresión de la necrosis miocárdica posterior a la oclusión coronaria. La necrosis comienza en pequeñas zonas del miocardio en su porción endocárdica en el centro de la región isquémica. La correspondiente región del miocardio se señala por la línea discontinua, su irrigación depende del vaso ocluido y constituye la región en riesgo. (Tomado de Estudio CARMELA y de los subestudios. *Revista Argentina de Cardiología* 2011;79(4):377-382).

Angina Inestable

Suele ser secundaria a una reducción de la perfusión miocárdica debida a la aterotrombosis de una arteria coronaria. En este episodio, sin embargo, el trombo no oclusivo, desarrollado sobre una placa aterosclerótica desorganizada, no produce ningún signo bioquímico de necrosis miocárdica. Debido a la falta de datos objetivos asociados



Figura 5. Síndromes Coronarios agudos. Episodios miocárdicos isquémicos que comparten una fisiopatología similar: la angina inestable, el infarto agudo del miocardio y la muerte súbita. (Tomado de: OPS. *Las enfermedades cardiovasculares en las Américas: Hoja informativa*. 2009).

a la enfermedad, la angina inestable, también conocida como angina pre-infarto, síndrome coronario intermedio o insuficiencia coronaria aguda, se debe diagnosticar a través de una anamnesis. Hay 3 formas de presentación principales de angina inestable: 1) Angina de reposo o angina de mínimos esfuerzos que dura, habitualmente al menos 20 minutos, 2) angina grave de inicio reciente, habitualmente en el último mes, y 3) angina progresiva definida como una angina anteriormente diagnosticada, que de forma característica se ha vuelto más frecuente, de mayor duración o de mayor gravedad. En este grupo de pacientes alrededor del 50 % tienen signos de necrosis miocárdica con elevación de los marcadores cardíacos, como la isoenzima MB de la creatina quinasa (CK). El tamaño del infarto es un marcador pronóstico importante bien establecido después de un infarto de miocardio con elevación del segmento ST. El tamaño del infarto puede medirse de forma no invasiva mediante el empleo de criterios electrocardiográficos o mediante el uso de técnicas más avanzadas, pero menos disponibles, como la de radionucleidos. Como alternativa y debido a la disponibilidad limitada

y los altos costos de las imágenes técnicas, las pruebas serológicas son utilizadas con frecuencia para medir enzimas citoplasmáticas, como creatinina quinasa (CK) CK-MB, lactato deshidrogenasa (LDH) o hidroxibutirato dehidrogenasa (HBDH). Sin embargo, estos marcadores no son cardiospecíficos y su medición se ve obstaculizado por la necesidad de recolectar sangre repetidamente para no perder el pico de liberación del marcador. Por el contrario, la troponina T cardíaca (cTnT) es una proteína estructural del miofilamento, que se expresa exclusivamente en los cardiomiocitos. Tras una lesión irreversible, las concentraciones séricas de cTnT muestra una curva bifásica con un pico temprano dentro de las 24 h, como resultado de la liberación de una pequeña reserva citoplasmática, y una “fase de meseta” de 72 a 96 h después del inicio de los síntomas, como resultado de la degradación proteolítica continua del aparato contráctil. Un solo valor de cTnT a las 96 horas proporciona una estimación precisa de la masa absoluta de infarto en el infarto de miocardio. Aunque, los tamaños de infarto para los pacientes con SCASEST son significativamente más pequeños y, en algunos casos, podrían estar por debajo del umbral de detección de la resonancia magnética cardíaca para infartos de miocardio, es tentador especular que estos pacientes tienen diferentes curvas de tiempo de liberación de cTnT que pacientes con infarto de miocardio grande. Por lo tanto, no se puede excluir que, en pacientes con SCASEST, un punto de tiempo de muestreo de cTnT más temprano resultaría en una mejor correlación con el tamaño del infarto o la función ventricular izquierda. Por ende, la capacidad de cuantificar y el potencial para distinguir los efectos de los nuevos regímenes de drogas en el tamaño del infarto hace que la cTnT sea atractiva para la práctica de rutina clínica (112).

Correlación de la Troponina con la severidad de la enfermedad arterial

En una cohorte de pacientes con EAC sospechada o confirmada, se demostró que las concentraciones elevadas de Troponina I de alta sensibilidad (hsTnI) circulantes están asociadas con la gravedad y progresión de la EAC angiográfica y sus resultados adversos. Las

concentraciones de la hsTnI son más altas en pacientes con una EAC más grave, confirmado por el número de arterias coronarias obstruidas o la carga aterosclerótica angiográfica, independientemente de los factores de riesgo cardiovascular. Asimismo, se ha establecido una fuerte asociación entre la hsTnI y la progresión de la EAC. Por otra parte, la hsTnI es un fuerte predictor de mortalidad y morbilidad, independiente y adicional a la gravedad de la EAC. Las concentraciones elevadas de hsTnI circulante no implican necesariamente la muerte de las células miocárdicas. El aumento de la demanda metabólica del corazón puede conducir a la escisión y liberación de hsTnI cardíaca. Es importante señalar que los valores séricos de troponina pueden permanecer elevados 7 a 10 días o más después de una necrosis miocárdica, por lo cual hay que ser extremadamente cautelosos en atribuir los resultados a un evento clínico reciente. Además, las micro lesiones causadas por el desprendimiento de trombos en vasos coronarios pequeños podrían ser una causa potencial de concentraciones elevadas de hsTnI y pueden explicar la observación de que una EAC más grave está asociada con una concentración más alta de hsTnI. En definitiva, la hsTnI es un marcador de la presencia, progresión y resultados de la EAC (22,113).

Infarto Agudo de Miocardio no Q (IAM no Q) o síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST (SCASEST)

Representa una enfermedad clínica que se manifiesta de forma muy similar a la angina inestable, pero, con signos de necrosis miocárdica y sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma. Los pacientes con IAM no Q o SCASEST tienen un riesgo intermedio de complicaciones agudas, siempre y cuando se implementen estrategias tempranas de tratamiento. Puesto que el diagnóstico de IAM no Q implica una isquemia bastante importante, como para causar una lesión miocárdica suficiente para liberar cantidades detectables de un marcador de lesión miocárdica, es importante resaltar que las troponinas cardíacas representan un cambio clínico importante en el diagnóstico de IAM no Q. Se ha propuesto también un enfoque etiológico y son cinco los procesos fisiopatológicos que pueden contribuir al desarrollo de un IAM

no Q: 1) la erosión de una placa con un trombo sub-oclusivo interpuesto (esta causa es la más frecuente), 2) la obstrucción dinámica, es decir, un espasmo coronario o de una arteria epicárdica, como sucede en la angina de Prinzmetal, o una constricción de las arterias coronarias musculares de pequeño calibre, 3) una obstrucción mecánica progresiva, 4) la inflamación y 5) la angina inestable secundaria a incremento de la demanda o disminución del aporte de oxígeno al miocardio, por ejemplo la anemia. La importancia esencial de la trombosis arterial coronaria en la patogenia del IAM no Q se apoya en un conjunto de observaciones: 1) en la autopsia, los trombos suelen encontrarse en el lugar de una placa coronaria rota o erosionada; 2) la incidencia de lesiones trombóticas en las piezas de aterectomía coronaria es mayor que en la piezas obtenidas de pacientes con angina estable; 3) es frecuente que en la angioscopia coronaria de los pacientes con IAM no Q se visualicen trombos; 4) en muchos pacientes, la angiografía coronaria muestra ulceraciones o irregularidades que indican la rotura de una placa, la formación de un trombo o ambas (Figura 6) (22).

Infarto Agudo de Miocardio Q (IAM Q) o con elevación del segmento ST (SCACEST)

Representa la forma más letal de SCA, en donde un trombo completamente oclusivo provoca el cese total del flujo sanguíneo coronario en el territorio de la arteria ocluida y la consiguiente elevación del segmento ST en el electrocardiograma (21). Los estudios actuales con resonancia magnética cardíaca indican que el desarrollo de una onda Q en el ECG depende más del tamaño del infarto que de la profundidad de la afectación parietal. Una definición más apropiada que sitúa al IAM Q o SCACEST en perspectiva, en relación con el IAM no Q o SCASEST, basada en la fisiopatología, es el término “Síndromes Coronarios Agudos” (SCA) (Figura 7). El diagnóstico exacto de IAM Q o SCACEST es de suma importancia debido al pronóstico de la patología que obliga a considerar de forma inmediata el tratamiento de reperfusión, ya sea mediante trombolíticos o en forma mecánica.

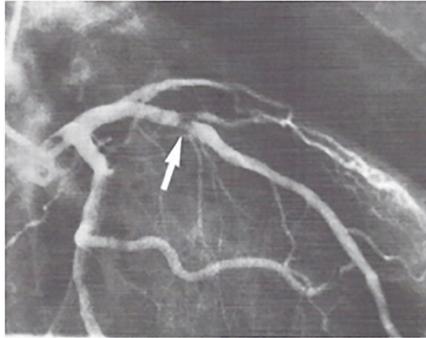


Figura 6. Trombo en la arteria coronaria de un paciente con angina inestable. Paciente masculino de 60 años con un dolor prolongado en reposo y elevaciones transitorias de ST. La angiografía coronaria muestra un defecto de relleno poco definido e irregular en la arteria coronaria descendente anterior izquierda a la altura de la segunda rama diagonal (flecha). El medio de contraste rodea al trombo globuloso, que se extiende a la rama diagonal. (Laboratorio de Hemodinamia del Hospital “Dr. Miguel Pérez Carreño”).

Estos pacientes poseen un riesgo elevado de complicaciones a corto y a largo plazo (22).

El tamaño del infarto es un marcador pronóstico importante bien establecido después de un infarto de miocardio con elevación del segmento ST. El tamaño del infarto puede medirse de forma no invasiva mediante el empleo de criterios electrocardiográficos o mediante el uso de técnicas más avanzadas, pero menos disponibles, como la de radionucleidos. Como alternativa y debido a la disponibilidad limitada y los altos costos de las imágenes técnicas, las pruebas serológicas son utilizadas con frecuencia para medir enzimas citoplasmáticas, como creatinina quinasa (CK) CK-MB, lactato deshidrogenasa (LDH) o hidroxibutirato dehidrogenasa (HBDH). Sin embargo, estos marcadores no son cardio específicos y su medición se ve obstaculizado por la

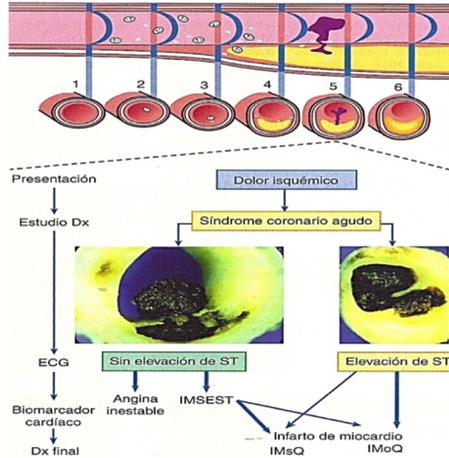


Figura 7. Representación esquemática de los síndromes coronarios agudos (SCA). La sección longitudinal de una arteria muestra la línea temporal de la aterosclerosis desde: 1) una arteria normal a 2) una lesión inicial con acumulación de lípidos intracelulares en la íntima, 3) la evolución de la fase fibro-adiposa y 4) la progresión de la lesión con expresión de pro-coagulante y debilitamiento del revestimiento fibroso. El síndrome coronario agudo se desarrolla cuando se rompe el recubrimiento fibroso de una placa vulnerable o de alto riesgo (5), la rotura de la placa es el estímulo para la trombogénesis. La reabsorción del trombo puede ir seguida de la acumulación de colágeno y del crecimiento de las células musculares lisas (6). Tras la rotura de una placa vulnerable o de alto riesgo los pacientes sufren dolor isquémico debido a la reducción de flujo a través de la arteria coronaria afectada. La reducción del flujo puede deberse a un trombo que provoca una oclusión total (imagen derecha) o a un trombo con oclusión subtotal (imagen izquierda). Los pacientes con dolor isquémico pueden mostrar o no una elevación del segmento ST en el electrocardiograma (ECG). La mayoría de los que tienen elevación del segmento ST acaban desarrollando un IAM con onda Q (IAM Q), mientras que algunos desarrollan un IAM sin onda Q (IAM no Q). Los pacientes que no tienen elevación del segmento ST tienen una angina inestable o un SCA sin elevación del segmento ST (SCASEST) (Tomado de: *Estimates of the burden of cardiovascular disease by 2015. Avances Cardiol. 2016;36(4):191-194*).

necesidad de recolectar sangre repetidamente para no perder el pico de liberación del marcador. Por el contrario, la troponina T cardíaca (cTnT) es una proteína estructural del miofilamento, que se expresa exclusivamente en los cardiomiocitos. Tras una lesión irreversible, las concentraciones séricas de cTnT muestra una curva bifásica con un pico temprano dentro de las 24 h, como resultado de la liberación de una pequeña reserva citoplasmática, y una “fase de meseta” de 72 a 96 h después del inicio de los síntomas, como resultado de la degradación proteolítica continua del aparato contráctil. Un solo valor de cTnT a las 96 horas proporciona una estimación precisa de la masa absoluta de infarto en el infarto de miocardio. Aunque, los tamaños de infarto para los pacientes con SCASEST son significativamente más pequeños y, en algunos casos, podrían estar por debajo del umbral de detección de la resonancia magnética cardíaca para infartos de miocardio, es tentador especular que estos pacientes tienen diferentes curvas de tiempo de liberación de cTnT que pacientes con infarto de miocardio grande. Por lo tanto, no se puede excluir que, en pacientes con SCASEST, un punto de tiempo de muestreo de cTnT más temprano resultaría en una mejor correlación con el tamaño del infarto o la función ventricular izquierda. Por ende, la capacidad de cuantificar y el potencial para distinguir los efectos de los nuevos regímenes de drogas en el tamaño del infarto hace que la cTnT sea atractiva para la práctica clínica (Revisado en (112)).

Factores de Riesgo de EAC

Desde la perspectiva epidemiológica, un “factor de riesgo” es una característica individual de la población, que está presente en etapas tempranas de la vida y que se asocia con un riesgo incrementado a padecer la patología. Por lo tanto, un factor de riesgo puede ser adquirido o ambiental (tabaquismo), hereditario (dislipidemia familiar) o un parámetro bioquímico (Proteína C reactiva) (22).

Por lo tanto, un factor de riesgo debe tener un carácter causal en relación a la patología en estudio y el marcador de interés que lo define pudiese predecir la existencia, progresión o severidad de la patología y, como propiedad más relevante, debe ser reproducible (22).

La identificación y control de los factores de riesgo son medidas esenciales para prevenir la cardiopatía isquémica en individuos asintomáticos (prevención primaria) y para prevenir su recidiva en pacientes con enfermedad establecida (prevención secundaria). El control de los factores de riesgo debe concebirse como la prevención de la aterosclerosis coronaria propiamente dicha y, como tal, debe incluirse como parte integral de cualquier plan de tratamiento de las múltiples manifestaciones agudas o crónicas de la enfermedad (22) . Para simplificar, el riesgo absoluto puede dividirse en tres categorías: riesgo alto, intermedio y bajo. Los pacientes con riesgo alto requieren un tratamiento agresivo de reducción de riesgo y aquellos con riesgo intermedio también son candidatos para intervenciones médicas, siempre que el tratamiento sea efectivo en relación con su costo, además, de ser inocuo (Cuadro 1) (23).

El conocimiento actual sobre los factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular data, sin mayores modificaciones, desde 1960, gracias a los datos aportado en el estudio de Framingham, indicando como los factores de riesgo más relevantes: la hipertensión arterial, la dislipidemia, el tabaquismo y la obesidad (22).

Cuadro 1. Categoría de riesgo absoluto para sufrir un evento coronario. Se muestran las tres categorías de riesgo absoluto: Alto, Intermedio y Bajo, así como los intervalos porcentuales correspondientes. (Tomado de: Braunwalds Heart Disease A Test book of Cardiovascular Medicine 2004;44:1103-1110).

Categoría de riesgo	Riesgo absoluto de infarto del miocardio a 10 años (%) (no mortal + mortal)
Alto	> 20%
Intermedio	10-20%
Bajo	< 10%

Es por lo anteriormente expuesto que surge la necesidad de identificar nuevos factores de riesgo para enfermedad cardiovascular, los cuales han sido denominados en la actualidad como “Factores de riesgo emergentes” (24,25).

Inflamación Miocárdica: Receptores de reconocimiento de patrones (PRR)

La arteriosclerosis se manifiesta en tres modos fundamentales, síndrome coronario agudo, accidente cerebro-vascular o enfermedad vascular periférica. Es una patología inflamatoria crónica progresiva, caracterizada por la acumulación de elementos fibrosos y lipídicos en la pared arterial, la cual es dirigida por respuestas de la inmunidad innata y adaptativa (26).

La inflamación miocárdica juega un papel fundamental en la función cardíaca, así como en su disfunción. Cuando la inflamación del miocardio es inducida por fuentes microbianas o no microbianas, el propósito principal de la respuesta inflamatoria es resolver la fuente de la alteración, lo que permite que el corazón se adapte a las condiciones anormales a corto plazo y, en última instancia, restablezca la homeostasis y la función cardiovascular a largo plazo. Si se mantienen las condiciones anormales, entonces persiste un estado inflamatorio continuo en el tejido y conduce a un estado de inflamación crónica de bajo grado, que puede contribuir a una mayor progresión de la enfermedad en virtud de los efectos deletéreos de la inflamación sostenida. Aunque es especulativo, es probable que la expresión crónica de citoquinas proinflamatorias y la inflamación continua, que se ha demostrado en la insuficiencia cardíaca, representen la incapacidad del miocardio para restaurar la homeostasis, lo que lleva a un estado de inflamación crónica en curso que es intermedio entre el estado basal y la inflamación aguda. Este estado intermedio se ha denominado parainflamación y no requiere que se sostenga una lesión o infección tisular manifiesta, sino que representa una respuesta inflamatoria sostenida graduada que permanece activada en el tejido disfuncional en un intento por restaurar la homeostasis y la funcionalidad del tejido (Figura 8). También cabe señalar que

la activación de los sistemas neuro-hormonales en la insuficiencia cardíaca, como el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema nervioso adrenérgico, son capaces de desencadenar una inflamación en el corazón, lo que conduce a un estado de inflamación de bajo grado (Revisado en (27)).

La respuesta inmunitaria innata cardíaca, esencial en las respuestas homeostáticas y reparación tisular, es iniciada por los receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que incluyen los

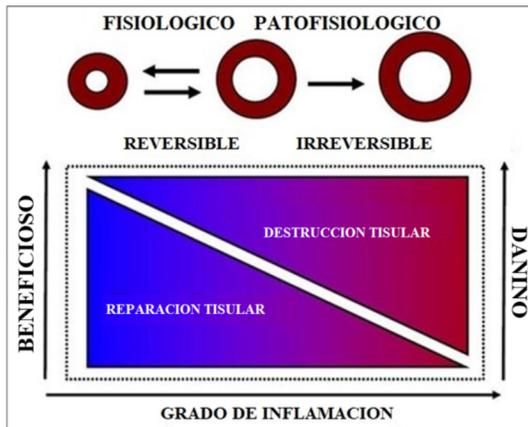


Figura 8. Parainflamación. El objetivo principal de la respuesta inflamatoria en el corazón es resolver la lesión tisular, lo que permite que el corazón se adapte a las condiciones anormales a corto plazo y, en última instancia, restablezca la homeostasis y la función cardiovascular a largo plazo. Si la condición anormal se mantiene, entonces persiste un estado inflamatorio crónico en un tejido, lo que se conoce como parainflamación. La parainflamación es una respuesta graduada que puede restaurar la homeostasis del tejido o, si se mantiene, puede contribuir a una mayor progresión de la enfermedad, en virtud de los efectos deletéreos de la inflamación sostenida en los miocitos cardíacos y la matriz extracelular. (Tomado de: *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes*. *N Engl J Med*. 1992;326(4):242-250).

receptores tipo toll (*Toll-like receptors*; TLR), receptores similares a RIG-I (receptores similares al gen I inducibles por ácido retinoico), *receptores* similares al *dominio* de *oligomerización* de unión a *nucleótidos* o *receptores* similares a NOD (*NLR*), receptores lectina tipo C (CLR) y *receptor* de AIM2 (*ausente en melanoma 2*). Estos receptores detectan patrones moleculares conservados asociados a patógenos (PAMP), que incluyen carbohidratos bacterianos, ácidos nucleicos, péptidos bacterianos, peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, N-formilmietionina, lipoproteínas, glucanos fúngicos y quitina. Además, pueden reconocer señales de estrés endógeno llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMP), incluidos el ácido úrico, ATP extracelular y otros compuestos (9).

Por otra parte, los PRR cardíacos también reconocen patrones moleculares de material endógeno liberado por células miocárdicas muertas o lesionadas del hospedero. Las células que mueren por necrosis accidental, necrosis regulada (necroptosis) o apoptosis secundaria liberan su contenido citosólico en el espacio extracelular, iniciando así una respuesta inflamatoria enérgica mediante la participación de un conjunto de PRR extracelulares o intracelulares. El curso temporal de la respuesta inflamatoria que sobreviene después de la lesión tisular es notablemente constante, independientemente de la causa específica de la lesión celular, y se asocia con el rápido influjo de neutrófilos y posteriormente de monocitos en el área de la lesión tisular. Esta respuesta inflamatoria se ha denominado inflamación estéril, porque se produce en ausencia de una infección patógena conocida. Por lo tanto, el sistema inmunológico innato evolucionó no solo para detectar moléculas que no eran propias (por Ej., PAMP) sino también para detectar un subconjunto de moléculas intracelulares (por Ej., DAMP) que están ocultas en la membrana plasmática y que normalmente no se encuentran en los fluidos extracelulares, en ausencia de muerte celular. Esta última observación ha proporcionado un vínculo potencialmente importante entre la lesión tisular, la activación de mediadores proinflamatorios y la respuesta miocárdica resultante al estrés (Figura 9) (27).

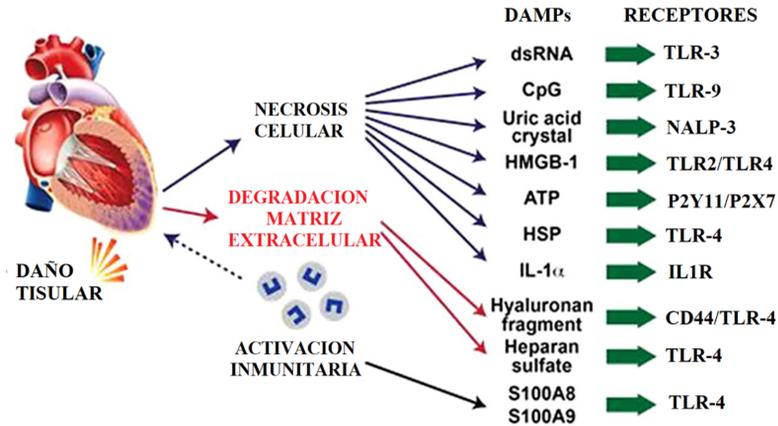


Figura 9. Reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMP) por PRR. Los DAMP derivan de células muertas que liberan su contenido citosólico después de una lesión miocárdica, de la degradación de la matriz extracelular, así como de las células inmunitarias que se activan después de la lesión tisular. HMGB1: proteína de alta movilidad del grupo 1; HSP: proteína de choque térmico; IL: interleuquina; proteína 3 que posee dominios NALP, NACHT, LRR y PYD (criopirina); RAGE: receptor para productos finales de glicación avanzada; TLR: receptor tipo toll (*Tomado de: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. N Engl J Med 1992;326(4):242-250*).

Vía de señalización de los TLRs

Los receptores tipo toll o toll-like receptors (TLRs) son receptores de reconocimiento de patrones (PRR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) de microorganismos o patrones moleculares asociados a peligro (DAMP) de tejido dañado (28).

Hasta la fecha, se han identificado trece TLRs en mamíferos, 10 en humanos y 12 en ratones. Los TLR se expresan en células

inmunitarias innatas, como células dendríticas (DC) y macrófagos, así como en células no inmunitarias, como células de fibroblastos y células epiteliales. Los TLR se clasifican en gran medida en dos subfamilias según su localización, los TLR de la superficie celular y los TLR intracelulares. Los TLR de superficie celular incluyen los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10, mientras que los TLR intracelulares, se localizan en endosomas, lisosomas o endolisosomas, e incluyen los TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 y TLR13 (29). Los TLR de la superficie celular reconocen principalmente componentes de la membrana microbiana, como lípidos, lipoproteínas y proteínas. Mientras que los TLR intracelulares reconocen los ácidos nucleicos derivados de bacterias y virus, así como ácidos nucleicos propios en enfermedades como la autoinmunidad (30).

Los TLRs son glicoproteínas transmembrana tipo I, que comprenden un dominio extracelular, uno transmembrana y uno intracelular. El dominio extracelular, amino terminal, caracterizado por la presencia de motivos de 24 aminoácidos, denominados repeticiones ricas en leucina (LRR, por sus siglas en inglés Leucine-Rich Repeat), tiene la capacidad de unir al ligando, siendo el responsable del reconocimiento de los diferentes PAMP o DAMP (31). El dominio transmembrana, está formado por un alfa-hélice única, rica en aminoácidos glicina y alanina, y el dominio intracelular, carboxilo-terminal, contiene un dominio citoplasmático globular denominado TIR (receptor Toll/IL-1), el cual originalmente se identificó como parte del receptor IL-1 (Figura 10). Estos dominios TIR, son los encargados de formar un andamiaje de proteínas citoplasmáticas involucradas en la transducción de la señal, que finalmente desencadena los efectos fisiológicos de la respuesta celular (32).

Los TLR suelen funcionar como dímeros para la detección de los patrones moleculares, formando complejos mixtos (heterodímeros) u homodímeros (33). Por otra parte, los TLR individuales reclutan de forma diferencial a miembros de un conjunto de adaptadores que contienen dominios Toll / IL-1 (TIR). Se han identificado cinco adaptadores que contienen dominios TIR: el factor de diferenciación

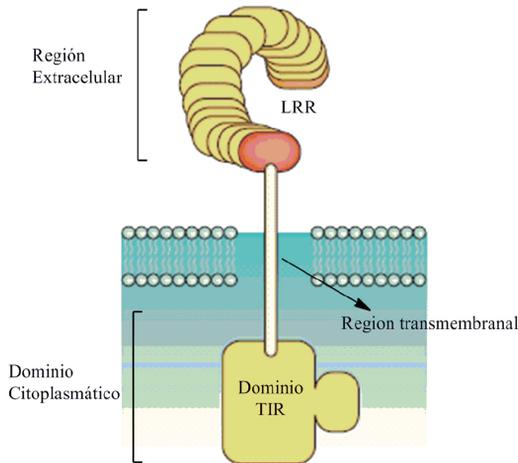


Figura 10. Representación esquemática del receptor tipo Toll. Se muestra los tres dominios del TLR: extracelular (ectodominio), transmembrana y citoplasmático (Tomado de: *Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. JAMA. 2003;290(7):898-904*).

mieloide 88 (Myd88), la proteína adaptadora igual a Myd88, la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR inductor de interferón- β (TRIF), la proteína adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) y la proteína que contiene el motivo estéril alfa y armadillo. Basado en los adaptadores específicos reclutados por TLR, la señalización TLR se puede dividir en dos vías generales, a saber, las vías dependientes de Myd88 e independientes de Myd88. A excepción de TLR3, todos los TLR interactúan con la proteína adaptadora Myd88. TLR3 usa TRIF como proteína adaptadora, que pertenece a las vías independientes de Myd88, mientras que TLR4 desencadena tanto las vías dependientes de Myd88 como las independientes de Myd88. Estas vías de señalización activan numerosos factores de transcripción, como el factor nuclear- κ B

(NF- κ B) y factores reguladores de interferón (IRF) y posteriormente inducir la producción de citoquinas proinflamatorias e interferón (IFN), respectivamente (9)

La vía dependiente de Myd88 se inicia a través de Myd88 después de la activación de TLR. Posteriormente, el dominio de muerte de Myd88 recluta la quinasa 4 asociada al receptor de IL-1 (IRAK4) y activa a uno de los otros miembros de la familia IRAK, es decir, IRAK1 o IRAK2. Luego, los IRAK se disocian del complejo Myd88- IRAK y activan el factor 6 asociado al receptor (TRAF6), que interactúa con la quinasa 1 activada por el factor de crecimiento transformante β (TAK1). TAK1 luego activa el complejo inhibidor de κ B (I κ B) quinasa α (IKK α)/IKK β /IKK γ e induce la fosforilación de I κ B. I κ B fosforilado se disocia del complejo y activa el factor de transcripción NF- κ B. El NF- κ B activado se traslada al núcleo e induce la expresión de diversas citoquinas proinflamatorias. Además, de la activación del complejo IKK, TAK1 puede activar la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), incluida la vía de la quinasa regulada por señal extracelular, la vía quinasa N-terminal c-Jun y la vía p38. La vía de señalización MAPK puede activar la proteína activadora del factor de transcripción-1 (AP-1). La activación de NF- κ B y AP-1 contribuye a la expresión de citoquinas proinflamatorias, como IL-6, IL-1 y TNF α (Figura 11) (9).

Señalización TLR en insuficiencia cardíaca

La activación de la señalización de TLR en el corazón confiere beneficios a corto plazo cuando se activa de forma aguda, pero los efectos beneficiosos de la señalización de TLR se pierden en el entorno crónico, donde el daño tisular continuo puede conducir a una señalización de TLR sostenida que es suficiente para provocar un fenotipo de insuficiencia cardíaca (34). Los TLR se expresan en varios tipos de células cardíacas, incluidas las células endoteliales, las células del músculo liso y los cardiomiocitos. Los niveles de expresión relativa de los ARNm de TLR en el corazón humano siguen el orden TLR4> TLR2>TLR3> TLR5> TLR1> TLR6> TLR7> TLR8> TLR9> TLR10 (35). Estos TLR no solo

TLR en insuficiencia cardíaca

A continuación, se presentan los trabajos más relevantes que muestran el papel que juegan los receptores TLR2 y TLR4 en la inflamación del miocardio. Sin embargo, es importante resaltar que las vías de señalización que involucran a TLR3 y TLR9 median efectos inflamatorios que pueden exacerbar el daño cardíaco e influir en la progresión de la insuficiencia cardíaca (9).

TLR2

El TLR2 localizado en la superficie celular y junto con TLR1 o TLR6 reconoce una amplia variedad de PAMP, incluyendo las lipoproteínas, que poseen un papel inmunológico en la insuficiencia cardíaca crónica. TLR2 juega un papel central en la patogénesis de diversos trastornos cardíacos, encontrándose sobre regulado en pacientes con insuficiencia cardíaca y en modelos experimentales de hipertensión y disfunción cardíaca inducida por doxorubicina reducida (36). Asimismo, en un modelo experimental, se demostró que el TLR2 expresado en miocitos cardíacos participaba en la respuesta de estas células al estrés oxidativo, que es un contribuyente importante en la patogénesis de la disfunción cardíaca (37). Adicionalmente, las células endoteliales vasculares expresan altas concentraciones de TLR2 y TLR4 tras la estimulación con citoquinas inflamatorias, lo que sugiere que estos receptores también podrían contribuir con la inflamación relacionada con las células endoteliales en insuficiencia cardíaca. Consecuentemente, una mayor expresión y señalización por TLR2 y TLR4 contribuye a la activación de la inmunidad innata en el miocardio lesionado, lo que indica que estos receptores podrían promover no sólo inflamación sistémica sino también del miocardio en la insuficiencia cardíaca. Finalmente, es importante subrayar que los TLR no solo responden a microorganismos, sino también a las moléculas liberadas, como proteínas de choque térmico y ROS, y células estresadas (Revisado en (38)).

La evaluación de la remodelación ventricular, después de un infarto de miocardio, en ratones knockout para el gen *tlr2* (TLR-2-KO), mostró

que los ratones TLR-2-KO tenían una mayor tasa de supervivencia y menos remodelado ventricular, asociado con menos cambios patológicos y una menor expresión de TGF- β 1 y mRNA de colágeno tipo 1. Estos resultados proporcionaron la evidencia directa de la participación de la vía de señalización mediada por TLR2 en la remodelación ventricular después de un infarto de miocardio. Asimismo, después del infarto de miocardio, los exámenes histológicos de los ratones TLR-2-KO demostraron que la fibrosis miocárdica estaba significativamente disminuida en el área sin infarto y las expresiones génicas de TGF- β 1 y colágeno tipo 1, responsables de la fibrosis cardíaca, eran menores en estos ratones con respecto a los ratones silvestres. Estos datos apoyan el concepto de que la modulación de la fibrosis miocárdica en el área sin infarto es uno de los posibles mecanismos de atenuación de la remodelación ventricular en ratones TLR-2-KO. Finalmente, en los ratones TLR-2-KO se observó la preservación de la función cardíaca, el aumento de la tasa de supervivencia y la atenuación de la fibrosis de miocardio después de un infarto de miocardio. En conclusión, este estudio demuestra la primera evidencia de que el remodelado ventricular, después de un infarto de miocardio, ocurre, al menos en parte, a través de la vía mediada por TLR2 (39).

Finalmente, un estudio realizado en pacientes con insuficiencia cardíaca, después de un infarto de miocardio complicado, mostró que las concentraciones séricas de TLR2 soluble (sTLR2) estaban marcadamente reducidas en comparación con los controles sanos. Aunque las concentraciones de sTLR2 aumentaron durante el seguimiento, no alcanzaron concentraciones comparables a las observadas en individuos sanos. Por el contrario, en este mismo estudio, las concentraciones séricas de MBL (lectina unidora de manosa) estaban inicialmente normales en pacientes con insuficiencia cardíaca post infarto de miocardio, pero, disminuyeron durante el seguimiento y las concentraciones bajas, medidas en la fase subaguda, se asociaron con una mayor incidencia de reinfarcto. Estos hallazgos sugieren que las concentraciones circulantes de MBL y sTLR2 pueden reflejar diferentes

aspectos de la respuesta de la inmunidad innata en la insuficiencia cardíaca después de un infarto de miocardio (40).

TLR4

Todos los TLR humanos conocidos se han detectado en el corazón, sin embargo, los niveles de TLR4 son los más altos en comparación con otros TLR en el corazón. TLR4 juega un papel crítico en la inflamación del miocardio, incluida la miocarditis, infarto de miocardio, daño miocárdico por isquemia / reperfusión, insuficiencia cardíaca, enfermedades de la válvula aórtica, aterosclerosis e hipertensión. TLR4 se encuentra en la membrana plasmática, donde responde a sus ligandos y desencadena una serie de vías de señalización inflamatoria (9).

TLR4 es activado por lipopolisacáridos (LPS), con los cofactores, como el clúster de diferenciación 14 (CD14), el factor de diferenciación mieloide 2 (MD2) y la proteína de unión a lipopolisacáridos (LBP). Se ha descrito que la endotoxemia, es decir, altas concentraciones de endotoxinas o LPS en la sangre, contribuye al menos parcialmente en las manifestaciones inflamatorias de varias patologías heterogéneas, incluyendo la insuficiencia cardíaca y aterosclerosis. La endotoxina es un lipopolisacárido (LPS) constituyente de la membrana externa de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Esta endotoxina se une al complejo TLR4-MD2-CD14 en varios tejidos, incluyendo las células del sistema inmunitario innato, el músculo liso y las células endoteliales de los vasos sanguíneos, incluidas las arterias coronarias. La entrada de LPS en la circulación sistémica conduce a la transcripción intracelular de varios mediadores inflamatorios y la inflamación subsiguiente se ha implicado en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y la consiguiente enfermedad de las arterias coronarias e insuficiencia cardíaca (41).

Ligandos endógenos, como la proteína de choque térmico (HSP), proteínas de alta movilidad (HMGB1), especies reactivas de oxígeno (ROS) y componentes de la matriz extracelular, pueden ser reconocidos por TLR4 y algunos de ellos están asociados con insuficiencia cardíaca. Las concentraciones de HSP60 se duplican

en la insuficiencia cardíaca en etapa terminal y su tráfico anormal a la superficie celular puede ser un desencadenante temprano de la pérdida de miocitos y la progresión de la insuficiencia cardíaca (42). Mientras que HMGB1 se ha establecido como un importante mediador de la inflamación del miocardio, asociado con la progresión de la insuficiencia cardíaca. Volz y colaboradores demostraron que la concentración plasmática de HMGB1 es incrementada en la insuficiencia cardíaca, correlacionándose con la gravedad de la enfermedad (43). Por otra parte, las especies reactiva de oxígeno (ROS) pueden modificar los componentes de la membrana plasmática y causar la liberación de factores que van a interactuar y activar TLR4, induciendo la apoptosis de los cardiomiocitos e insuficiencia cardíaca (9). Por último, están las tenascinas, que representan una familia de cuatro glucoproteínas multiméricas de matriz extracelular. En condiciones patológicas asociadas con inflamación y remodelado tisular extenso, tales como el infarto de miocardio, miocarditis y cardiomiopatía dilatada, la tenascina C (TNC) es sobre regulada. Además, la evidencia sugiere que la TNC puede promover la cicatrización de heridas al reclutar miofibroblastos cardíacos durante la reparación de tejidos. Sin embargo, también puede contribuir a la remodelación ventricular adversa, ya que puede sobre regular la producción de metaloproteinasas de matriz (MMP) y provocar una degradación excesiva de la matriz extracelular. Esto, a su vez, podría debilitar la adhesión de los cardiomiocitos a la matriz extracelular, lo que provocaría el deslizamiento de los cardiomiocitos, la dilatación del ventrículo izquierdo y la reducción de la función contráctil. Finalmente, la TNC sobre regula la expresión de IL-6 en miofibroblastos cardíaco humano *vía* TLR4, contribuyendo al empeoramiento y progresión de la insuficiencia cardíaca (44).

A largo plazo, la expresión, la capacidad de unión al ligando y la función proinflamatoria de TLR4 se encuentran reguladas positivamente en los cardiomiocitos aislados del infarto de miocardio, promoviendo la inflamación y exacerbando la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, TLR4 no solo se expresa en cardiomiocitos, también es expresado en monocitos activados y su expresión aumenta sustancialmente en respuesta a los

DAMP. Similar a TLR2, TLR4 se expresa a concentraciones elevadas en células endoteliales vasculares sugiriendo que estos receptores podrían contribuir con la inflamación relacionada con las células endoteliales en insuficiencia cardíaca (Revisado en (45)).

Dado que la monocitosis periférica puede afectar el desarrollo de insuficiencia cardíaca después de un infarto agudo de miocardio, Satoh y colaboradores analizaron la expresión de TLR4 en monocitos aislados de pacientes con infarto (día 1 y 14 después del inicio del mismo). El análisis mostró: altas concentraciones de TLR4 basal en monocitos, las cuales se mantuvieron en el tiempo, y una expresión incrementada de TLR4 en los pacientes infartados con insuficiencia cardíaca con respecto aquellos pacientes infartados sin insuficiencia cardíaca, sugiriendo que la activación de la señalización vía TLR4 pudiese desempeñar un papel importante en la progresión de la insuficiencia cardíaca después de un infarto agudo de miocardio, al relacionarse con la secreción de citoquinas proinflamatorias (46). Otro estudio mostró que los pacientes que requirieron soporte de implantación de un dispositivo de asistencia ventricular izquierda manifestaron evidencia de activación del sistema inmunológico innato, indicado por un aumento en la molécula efectora clave TLR4 asociada con un patrón específico de expresión de citoquinas en el miocardio (47).

Considerando que la isquemia miocárdica y la lesión tisular inducida por reperfusión implican una fuerte respuesta inflamatoria y que TLR4 se expresa en el corazón y la vasculatura, Oyama y colaboradores evaluaron el papel de TLR4 en el infarto de miocardio y la inflamación en un modelo múrdo de lesión por isquemia-reperfusión. El análisis mostró que los ratones deficientes en TLR4 sufrían infartos más pequeños y presentaban una menor inflamación después de la lesión por isquemia-reperfusión del miocardio, sugiriendo que, además, de su papel en la respuesta inmunitaria innata, TLR4 cumple un papel proinflamatorio en la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica múrda (48).

Por otra parte, en un modelo múrdo se demostró que la inhibición de TLR4 *in situ* reducía significativamente la lesión por isquemia-reperfusión y los marcadores de inflamación (49).

Los hallazgos muestran que los TLR2 y TLR4 están asociados con efectos inflamatorios deletéreos que exacerbaban el daño cardíaco. Teniendo en cuenta el papel patológico de los TLR, los inhibidores dirigidos a la señalización de TLR podrían ser beneficiosos en el tratamiento y reduciría la progresión de la insuficiencia cardíaca. En general, la inhibición de los TLR se puede lograr mediante dos estrategias principales: 1) bloquear la unión de los ligandos al receptor; 2) interfiriendo las vías de señalización intracelular para detener la transducción de la señal. Por consiguiente, se han desarrollado varios agentes terapéuticos para inhibir la señalización de TLR para controlar la inflamación excesiva. Por ejemplo, se han diseñado anticuerpos para inhibir la señalización mediada por TLR2, siendo T2.5 uno de los anticuerpos anti-TLR2 con potencial terapéutico. Además, se encontró que T2.5 previene la fibrosis cardíaca inducida por angiotensina II mediante la supresión del reclutamiento de macrófagos e inflamación en el corazón. Otro avance prometedor es OPN-305, que es el primer anticuerpo monoclonal IgG4 específico de TLR2 completamente humanizado. Los estudios preclínicos han demostrado la potencia de este compuesto para bloquear la producción de citocinas proinflamatorias mediada por TLR2 *in vitro* y en modelos animales de lesión por isquemia-reperfusión (50).

El bloqueo farmacológico de TLR4 por diferentes moléculas ha sido demostrado experimentalmente. Los bloqueadores de los receptores de angiotensina II y las estatinas se encuentran entre los fármacos desarrollados inicialmente con actividad inhibidora sobre la señalización de TLR2 y TLR4. Por ejemplo, el valsartán puede disminuir la liberación de citoquinas proinflamatorias y el tamaño del infarto al inhibir la señalización de TLR4, mientras que candesartán puede suprimir la activación de TLR2 y TLR4 inducida por Pam3CSK4 y LPS, respectivamente. Las estatinas, también conocidas como inhibidores de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, son una clase de fármacos reductores de lípidos. Entre la familia de las estatinas, fluvastatina, simvastatina, y atorvastatina, han mostrado una potente actividad inhibidora sobre TLR4 y las vías

inflamatorias subsiguientes para reducir la inflamación en los sistemas vasculares (50).

Un grupo especial de antagonistas de TLR es el análogo del lípido A, que se dirige específicamente a TLR4. El lípido A es un componente lipídico de LPS que contribuye a la toxicidad de la molécula de endotoxina. Debido a que la estructura del lípido A está altamente conservada en endotoxinas, se convierte en una diana terapéutica atractiva para regular la señalización de TLR4 (51). La inhibición de TLR4 con el lípido sintético, eritoran, puede atenuar la lesión por isquemia-reperfusión miocárdica y el desarrollo de hipertrofia (9).

Aunque se han realizado esfuerzos importantes para desarrollar diferentes tipos de nuevos inhibidores / antagonistas de TLR, solo un número limitado de ellos se ha sometido a ensayos clínicos y ninguno ha sido aprobado para usos clínicos hasta la fecha. Sin embargo, estos hallazgos y los estudios continuos de la inhibición de TLR destacan la regulación farmacológica de la señalización de TLR, especialmente en múltiples vías de TLR, como una estrategia terapéutica, prometedora en el futuro, para diversas enfermedades inflamatorias y autoinmunes (50).

Polimorfismos genéticos asociados a los TLR

Los genes son las unidades de almacenamiento de la información genética, son segmentos o secuencias de ADN (ácido desoxirribonucleico) que codifican un producto específico (proteína). Las secuencias de ADN pueden sufrir alteraciones, que pueden abarcar grandes reorganizaciones cromosómicas, así como duplicaciones o deleciones de fragmentos y hasta de cromosomas enteros. Sin embargo, las modificaciones más frecuentes son llevadas a cabo en uno o en pocos nucleótidos. Los cambios en el ADN son llamados mutaciones, que pueden tener efectos deletéreos y causar enfermedades, o dar lugar a lo que se conoce como polimorfismos, los cuales proveen variación alélica entre individuos y diversidad de la misma especie. Un polimorfismo es considerado como tal cuando la frecuencia de uno de sus alelos en la población es superior al 1 %. Hay varios tipos de polimorfismos (inserciones, deleciones, cambios en el número de secuencias repetidas),

pero los más frecuentes son los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido). Los SNP son causados por la sustitución de una base por otra y dan lugar a dos variantes o alelos. Estos alelos se clasifican en alelo principal o “silvestre” y alelo raro o “mutado”, clasificación basada en la frecuencia observada en las poblaciones. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto, u homocigoto para el alelo menos frecuente. Los SNP pueden estar presentes en regiones codificantes y provocar un cambio en un aminoácido, este tipo de SNP se conoce como “no sinónimos” y en vista de que este tipo de SNP afecta directamente la función de la proteína, muchos investigadores han centrado su atención en estudios de asociación genética en este tipo de variaciones. De igual manera, existen variaciones funcionales que están localizadas en la región promotora del gen, influenciando la actividad transcripcional del gen (modulando la unión de factores de transcripción), en intrones (modulando la estabilidad de la proteína), en sitios de “*splicing*” (sitios donde ocurre la eliminación de intrones y unión de exones) o en regiones intragénicas. Otro tipo de SNP son los llamados “sinónimos” (o silenciosos), los cuales no alteran la proteína codificada por el gen, sin embargo, se ha descrito que algunos de estos polimorfismos pueden tener consecuencias funcionales por algún tipo de mecanismo aún desconocido (52).

El gen *TLR2* humano está ubicado en el cromosoma 4q31.3 y está constituido por dos exones no codificantes, seguidos de un tercer exón codificante. Un total de 342 polimorfismos han sido identificados en el gen humano *TLR2* los cuales permanecen disponibles en todos los bancos genómicos desde el 2011. Uno de los SNP más estudiados en el gen *TLR2* es 2258G> A (rs5743708). Este SNP provoca la sustitución del aminoácido arginina (Arg) por glutamina (Gln) en el extremo C-terminal del *TLR2* en la posición 753. Otra variante, en este gen es la 2112C>A (rs5743704). Este SNP provoca la sustitución del aminoácido prolina (Pro) por histidina (His) en la posición 631.

En el Cuadro 2 se muestran los principales estudios de asociación entre los polimorfismos del gen *TLR2* y enfermedad coronaria.

Cuadro 2. Principales estudios de asociación entre los polimorfismos del gen TLR2 y enfermedad coronaria

Polimorfismo TLR2	Población. Tamaño de la muestra	Asociación	Referencia
Arg753Gln Arg677Trp	Turca 300 pacientes con EAC	El genotipo Arg/Arg de la variante TLR2-Arg753Gln confiere protección al desarrollo de EAC	Guven M, et al. 2014. (53)
Arg753Gln	Hunan Han 180 individuos sanos 167 pacientes con EAC	No asociado	Li S, et al. 2017. (54)
rs3804099	Rusa 292 pacientes con EAC	Genotipo C/C asociado con aterosclerosis coronaria severa	Kutikhin AG, et al. 2016. (55)
Arg677Trp Arg753Gln	China Han	No asociación con EAC	Liu F, et al. 2012. (56)
Arg677Trp Arg753Gln	Palermo (Italia) 136 pacientes con IAM	No asociación con IAM	Balistreri CR, et al; 2008. (57)
SNP1350T/C	Croatas 120 pacientes con IAM 120 controles	Asociación entre el polimorfismo 1350T/C y protección a desarrollar IAM e hipertensión arterial	Džumhur A, et al; 2012. (58)

EAC: Enfermedad arterial coronaria, IAM: infarto agudo de miocardio.

El gen que codifica para el receptor TLR4 se encuentra localizado en el cromosoma 9 (9q32-q33). Este gen está compuesto por 3 exones y dos intrones. En el tercer exón se han hallado dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) no sinónimos, Asp299Gly (+896 A/G; rs4986790) y Thr399Ile (+1196 C/T; rs4986791), que pueden ser cosegregados. En el Cuadro 3 se muestran los principales estudios de asociación entre los polimorfismos del gen *TLR4* y enfermedad coronaria.

HIPÓTESIS

Sí los TLR2 y TLR4 expresados en el corazón humano participan en la respuesta inflamatoria en dicho órgano y los polimorfismos en los genes codificantes de estos receptores afectan su estructura y/o función, entonces algunas variantes polimórficas funcionales en los genes *TLR2* y *TLR4* pudiesen ocasionar una respuesta inflamatoria exacerbada y deletérea en los pacientes que sufren síndrome coronario agudo y constituir marcadores de susceptibilidad y/o severidad de la cardiopatía isquémica. Considerando que la enfermedad arterial coronaria es un desorden cardiovascular complejo y multifactorial, causado por la interacción de factores de riesgo, factores genéticos y ambientales, y que Venezuela exhibe una de las tasas de mortalidad prematura por infarto de miocardio más altas de la región, plantemos las siguientes interrogantes:

¿Los polimorfismos de los genes *TLR2* y *TLR4* conferirán susceptibilidad y/o protección a desarrollar cardiopatía isquémica?

¿Los polimorfismos de los genes *TLR2* y *TLR4* estarán correlacionados con los factores de riesgo cardiovasculares (FRCV)?

¿Los polimorfismos de los genes *TLR2* y *TLR4* estarán correlacionados con la severidad de la enfermedad arterial coronaria?

OBJETIVO GENERAL

Determinar la asociación entre la cardiopatía isquémica y la variabilidad de los genes de receptores tipo Toll (*TLR2* y *TLR4*) en pacientes con síndrome coronario agudo.

Cuadro 3. Principales estudios de asociación entre los polimorfismos del gen TLR4 y enfermedad coronaria

Polimorfismo TLR4	Población. Tamaño de la muestra	Asociación	Referencia
Asp299Gly Thr399Ile	Hunan Han 180 controles 167 casos de EAC	Asociación entre el Thr399Ile y EAC	Li S, et al. 2017 (54).
Asp299Gly Thr399Ile	China Han	No asociación con EAC	Liu F, et al. 2012 (56).
Asp299Gly	Croatas 120 casos de IAM 120 controles	No asociación con IAM	Džumhur A, et al; 2012 (58).
Asp299Gly	Metaanálisis 8 299 casos de IAM 6 849 controles	No asociado con IM	Yin YW, et al; 2014 (59).
Asp299Gly	Estadounidenses 695 casos de IM o ACV 695 controles	Asociación con el riesgo de IM	Zee RY, et al; 2005.60
Asp299Gly	Metaanálisis 1 178 casos de EAC	Asociación con menor riesgo de IM	Holloway JW, et al. 2005.61
Asp299Gly	Estadounidense 1 894 casos sin IAM con angiografía	Asociación con menor riesgo de EAC angiográfica	Kolek MJ, et al. 2004. 62

Continuación en pág. 81...

...continuación del Cuadro 3. Principales estudios de asociación entre los polimorfismos del gen TLR4 y enfermedad coronaria

Polimorfismo TLR4	Población. Tamaño de la muestra	Asociación	Referencia
Asp299Gly Thr399Ile	Alemana 3 657 casos de IM 1 211 controles	No asociación	Koch W, et al. 2006. 63
Asp299Gly	Finlandesa 657 hombres	Menor riesgo de estenosis coronaria pero no con IM	Hernesniemi J, et al. 2006 (64).
Asp299Gly	Metaanálisis: 10 258 casos de EAC 5 891 controles	No asociación	Chen R, et al; 2015 (65).
Asp299Gly	Alemana 2 679 casos de EAC	Asociación con HTA en pacientes con EAC	Schneider S, et al. 2015 (66).
Asp299Gly Thr399Ile	13 927 casos de EAC	Asociación de Thr399Ile con menor riesgo de EAC	Sheng J, Xu J.; 2019 (67)-

EAC: Enfermedad arterial coronaria, IAM/IM: infarto de miocardio, HTA: hipertensión arterial, ACV: Accidente cerebrovascular.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Determinar la distribución de frecuencias de los polimorfismos Pro631His (rs5743704) y Arg753Gln (rs5743708) del gen *TLR2* en individuos aparentemente sanos y pacientes con cardiopatía isquémica.
2. Determinar la distribución de frecuencias de los polimorfismos Arg299Gly (rs4986790) y Thr399Ile (4986791) del gen *TLR4* en individuos aparentemente sanos y pacientes con cardiopatía isquémica.
3. Establecer la asociación entre los alelos, genotipos y/o haplotipos de los polimorfismos del gen *TLR2* y del gen *TLR4* con cardiopatía isquémica.
4. Correlacionar los polimorfismos del gen *TLR2* y *TLR4* con la presencia de factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria.

METODOLOGÍA

Tipo de estudio

Estudio descriptivo, de tipo transversal o de prevalencia, de asociación (casos-controles) y correlacional, para determinar el grado de relación que pueda existir entre dos o más variables.

Población de estudio

El estudio incluyó 209 individuos venezolanos, no relacionados, clasificados en dos grupos.

Pacientes (n=75). Individuos con diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM), determinado por hallazgos clínicos, paraclínicos y electrocardiográfico, quienes acudieron a la Unidad de Cuidados Coronarios/Consulta externa del Hospital Central del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales “Dr. Miguel Pérez Carreño”. El diagnóstico de IAM estuvo enmarcado dentro del documento consenso de la Sociedad Europea de Cardiología y el Colegio Americano de Cardiología (68).

Controles (n=134). Individuos aparentemente sanos con o sin factores de riesgo cardiovascular (FRCV).

En ambos grupos se excluyeron aquellos individuos con antecedentes de enfermedades hepáticas, autoinmunitarias, neoplásicas o IAM secundario a otras causas. Todos los individuos participantes firmaron un consentimiento aprobado por el Comité de Bioética del Hospital Central de Instituto Venezolano de los Seguros Sociales “Dr. Miguel Pérez Carreño”

Cabe destacar que no se incluye en este trabajo registro sobre la evolución clínica a mediano y largo plazo de los pacientes participantes en el mismo.

Determinación de presencia y severidad de enfermedad arterial coronaria

En la Unidad de Cuidados Coronarios/Consulta Externa del Hospital Central del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales “Dr. Miguel Pérez Carreño”, a los 75 pacientes se les realizó la angiografía coronaria diagnóstica, mediante un abordaje femoral o radial. La técnica está determinada por la accesibilidad vascular del paciente y preferencia del operador. Todas las angiografías se filmaron a 15 cuadros/syCine, se almacenaron en el momento de la adquisición en formato DICOM.

Para la evaluación de la severidad de la enfermedad arterial coronaria (EAC), se utilizó la definición establecida por American College of Cardiology (ACC), donde la severidad de la lesión, según la obstrucción visual del lumen, se clasificó como Leve: < 50 %, Moderada: 50 %-69 % y Severa: ≥ 70 %, considerándose enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa lesiones mayores o iguales a 70 %. Las lesiones significativas se categorizaron en lesiones tipo A, B y C. Esta definición se utilizó para el circuito izquierdo (arteria descendiente anterior, arteria circunfleja) y derecho (arteria coronaria derecha), con excepción del tronco principal izquierdo, para el cual, la enfermedad está presente cuando hay un compromiso de ≥ 50 % del diámetro del vaso (69).

Clasificación clínica de los pacientes

Basado en el electrocardiograma (ECG) de ingreso, los pacientes con SCA se clasificaron clínicamente en pacientes:

1. Sin elevación del segmento ST (SCA-SEST)
2. Con elevación del segmento ST (SCA-CEST).

Con los resultados de la angiografía coronaria los pacientes fueron clasificados en dos grupos:

1. Con enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa (EACOS). Pacientes con lesiones significativas de arterias coronarias epicárdicas y estenosis coronaria $\geq 50\%$
2. Con enfermedad arterial coronaria obstructiva no significativa (EACONS). Pacientes sin estenosis de la arteria coronaria en cualquier arteria relacionada con el infarto. Esto incluye tanto a pacientes con arterias coronarias normales (sin estenosis $> 30\%$) o ateromatosis coronaria leve (estenosis $> 30\%$, pero $< 50\%$)

Recolección y procesamiento de las muestras.

Se extrajo por punción venosa 5 mL de sangre total a los individuos participantes, utilizando EDTA- Na^2 como anti-coagulante. Las muestras fueron almacenadas en condiciones apropiadas en el Hospital Central del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales “Dr. Miguel Pérez Carreño” y posteriormente trasladadas al Centro de Medicina Experimental, del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) para la extracción del ADN genómico.

Extracción de ADN genómico por el método de Bunce

El ADN genómico fue extraído de las células blancas de sangre venosa utilizando el protocolo de Bunce (70).

El procedimiento de extracción se describe a continuación: la muestra de sangre periférica con anticoagulante se centrifugó por 10 minutos a 1 000 g para obtener los leucocitos (capa blanca), estos fueron lavados con 10 mL de buffer de lisis de células rojas (RCLB: Red Cell Lysing Buffer). Posteriormente, se centrifugó por 10 minutos

a 1 000 g, se descartó el sobrenadante y se repitió el lavado con RCLB hasta que el precipitado de leucocitos quedó blanco. Luego se añadió al precipitado de leucocitos 3 mL de buffer de lisis nuclear (NLB: Nuclear Lysing Buffer) y se dejó incubando en baño a 56°C por dos horas o hasta que se disolvió el precipitado. Una vez disuelto, se añadió 1 mL de cloruro de sodio (NaCl 5,25 M), se agitó en vórtex y añadió 2 mL de cloroformo, se agitó nuevamente hasta formar una solución lechosa. Posteriormente, se centrifugó por 20 minutos a 1 000 g. Luego con una pipeta de polipropileno se aspiró la fase acuosa, que contiene el ADN, y se transfirió a un tubo de polipropileno de 50 mL. A la fase acuosa se le añadió 2 volúmenes de etanol 95 % frío y se incubó hasta que el ADN precipitó. Finalmente, se capturó la malla de ADN con una pipeta de polipropileno y se transfirió a un tubo de 1,5 mL estéril. El ADN se lavó con etanol 70 % y, finalmente, se resuspendió en buffer TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA-Na²).

Ajuste de concentración del ADN genómico

La concentración de ADN se determinó por lectura de la densidad óptica (DO), midiendo la absorbancia a 260 nm y a 280 nm de cada muestra (2 µL). Para ello, se utilizó un espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop™ 2000). La concentración del ADN (µg/mL) se determinó a través de la siguiente fórmula:

$$[\text{ADN}] \text{ doble cadena} = 50 \text{ mg/mL (Factor constante)} \times \text{DO } 260 \text{ nm} \\ 1 \text{ DO } 260 \text{ nm} = 50 \text{ mg de ADN/mL}$$

Se calculó el índice = DO260 nm/DO280 nm (este debe ser mayor de 1,7), para determinar el grado de pureza del ADN extraído.

Evaluación de la calidad e integridad del ADN

La calidad del ADN genómico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % en TBE 1X (0,5 M Tris-HCL, 0,6 M ácido bórico, 10 mM EDTA-Na², pH=8,2) utilizando bromuro de etidio como colorante, a una concentración de 0,5 µg/mL, para su posterior visualización en un sistema de foto documentación (Bio-Rad. ChemiDoc® XRS). En cada pozo del gel se colocó 5 µL de ADN

con 2 μL de buffer de carga y se utilizó como control 5 μL del ADN del Fago Lambda (λ) sin digerir, a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Promega). Las corridas electroforéticas se realizaron a 100 voltios durante 30 minutos.

Análisis del polimorfismo

Para el análisis del polimorfismo genético se utilizó la técnica PCR-SSP (Reacción en Cadena de la Polimerasa-Iniciadores de Secuencias Específicas), que permite identificar el polimorfismo directamente, utilizando iniciadores específicos durante el proceso de PCR ⁽⁷¹⁾. Después del proceso de PCR, los fragmentos de ADN amplificados se separan mediante electroforesis en geles de agarosa, previamente teñidos con bromuro de etidio. La interpretación de los resultados de la PCR-SSP se basa en la presencia o ausencia de un fragmento específico de ADN. Dado que la amplificación durante la reacción de PCR puede ser adversamente afectada por diversos factores (errores de pipeteo, calidad deficiente del ADN, presencia de inhibidores, etc.), es incluido un par de iniciadores que amplifican un control interno. Este par de iniciadores amplifican una región conservada de un gen constitutivo, que está presente en todas las muestras de ADN humano y se utiliza para verificar la integridad de la reacción de PCR. En presencia de una banda positiva de tipificación (amplificación específica de un alelo), el producto del par de iniciadores del control interno puede estar débil o ausente debido a las diferencias en concentración y a las temperaturas de fusión entre los pares de iniciadores específicos y el par de iniciadores del control interno.

Determinación del polimorfismo rs5743704 (Pro631His) del gen *TLR2*

La variante Pro631His (rs5743704) del gen *TLR2* se determinó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Smit LAM y col., 2007 ⁽⁷²⁾ (Cuadro 4).

Se prepararon dos mezclas de reacción, una con los iniciadores para el alelo G y la otra con los iniciadores para el alelo T. Cada

mezcla de reacción, de 10 μL cada una, se preparó con los siguientes reactivos: 5,82 μL de agua destilada, 1 μL de PCR buffer (1X), 0,4 μL de los iniciadores *TLR2* (0,4 pmol/ μL), 0,1 μL de los iniciadores internos *ABO* (0,1 pmol/ μL), 0,2 μL de Tris-HCl-NH₄ (0,4 mM), 0,5 μL de KCl (2,5 mM), 0,2 μL de dNTPs (0,2 mM), 0,2 μL MgCl (1

Cuadro 4. Secuencias de los iniciadores utilizados para determinar el polimorfismo rs5743704 del gen *TLR2*

Variante Polimórfica	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño
rs5743704 (Pro631His)	Alelo G (Pro631)	CTGCTGGGAGCTTTCCCTGG	267 pb
	Alelo T (His631)	CTGCTGGGAGCTTTCCCTGT	
ABO	Iniciador común	AGCAAGCACTGGCCAAAGTCT	419 pb
	Sentido	GCTGGAGGTGGGGCCTAC	
	Antisentido	ACGAATTCTACTGTTCAGGTGGCTCTCGTC	

mM), 0,08 μL de enzima Taq polimerasa (0,02 U/ μL), 1 μL de ADN genómico (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 96°C por 1 minuto, seguido por 4 ciclos: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación a 70°C por 45 segundos y 75°C por 25 segundos, seguido por 20 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación 65°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, seguido por 3 ciclos: desnaturalización 6°C por 30 segundos, hibridación 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos. Culminado el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72 °C por 10 minutos. El producto de PCR se verificó en geles de agarosa al 1,5 % (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La corrida se realizó a 100 voltios por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Determinación del polimorfismo rs5743708 (Arg753Gln) del gen *TLR2*

La variante Arg753Gln (rs5743708) del *TLR2* se determinó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Smit LAM y col., 2007 ⁽⁷²⁾ (Cuadro 5).

Se prepararon dos mezclas de reacción, una con los iniciadores para el alelo T y la otra con los iniciadores para el alelo C. Cada mezcla de reacción, de 10 μL cada una, se preparó con los siguientes reactivos: 5,82 μL de agua destilada, 1 μL de PCR buffer (1X), 0,4 μL de los iniciadores *TLR2* (0,4 pmol/ μL), 0,1 μL de los iniciadores internos *HLA-DR* (0,1 pmol/ μL), 0,2 μL de Tris-HCl-NH₄ (0,4 mM), 0,5 μL de KCl (2,5 mM), 0,2 μL de dNTPs (0,2 mM), 0,2 μL MgCl (1 mM), 0,08 μL de enzima Taq polimerasa (0,02 U/ μL), 1 μL de ADN genómico (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 96°C por 1 minuto, seguido por 4 ciclos: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación

Cuadro 5. Secuencias de los iniciadores utilizados para determinar los polimorfismos rs5743708 del gen TLR2

<i>Variante Polimórfica</i>	<i>Iniciadores</i>	<i>Secuencia (5' -3')</i>	<i>Tamaño</i>
rs5743708 (Arg753Gln)	Alelo T (Arg753) Alelo C (Gln753) Iniciador común	AGGTC TTGGTGTTCATTATCTTCT GGTCTTGGTGTTCATTATCTTCC ATGATGTGGGCCCTGGCTC	423 pb
HLA-DR	Sentido Antisentido	TGCCAAGTGGAGCACCCAA GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	785 pb

a 70°C por 45 segundos y 75°C por 25 segundos, seguido por 20 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación 65°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, seguido por 3 ciclos: desnaturalización 96°C por 30 segundos, hibridación 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos. Culminado el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR se verificó en geles de agarosa al 1.5 % (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida se realizó a 100 voltios por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Determinación del polimorfismo Arg299Gly (rs4986790) del gen *TLR4*

El polimorfismo Arg299Gly (rs4986790) del gen *TLR4* se determinó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Tajik et al, 2010 (73) (Cuadro 6).

Se prepararon dos mezclas de reacción, una con los iniciadores para el alelo A y la otra con los iniciadores para el alelo G, esta mezcla consistió en: 1 µL de PCR buffer con amonio (1X), 0,4 µL de los iniciadores *TLR4* (0,4 µM c/u), 0,1 µL de los iniciadores *ABO* (0,1 µM c/u), 0,2 µL de Tris-HCl (0,4 mM), 0,5 µL de KCl (2,5 mM), 0,2 µL de dNTPs (0,2 mM), 0,5 µL MgCl₂ (2,5 mM), 0,1 µL de enzima Taq polimerasa (0,05 U/µL), 1 µL de ADN genómico (50-100 ng) y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de reacción final de 10 µL. Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación.

Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación, 94°C por 2 minutos, seguido por 10 ciclos: desnaturalización 94°C por 10 segundos, hibridación a 65°C por 60 segundos, seguido por 20 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 94°C por 10 segundos, hibridación 61°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos. El producto de la PCR se verificó en geles de agarosa al 1,5 % (Sigma) teñido con bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida

Cuadro 6. Secuencias de los iniciadores utilizados para determinar el polimorfismo rs4986790 del gen TLR4

Variante Polimórfica	Iniciadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño
rs4986790 (Arg299Gly)	Alelo A (Asp299) Alelo G (Gly299) Iniciador común	TTAGACTACTACCCCGATGA CACTTTGAGAACAGCAACC TTAGACTACTACCCCGATGG	307 pb
ABO	Sentido Antisentido	GCTGGAGGTGCGGCCCTAC ACGAATTCTACTTGTTTCAGGTGGCTCTCGTC	419 pb

se realizó a 100 voltios por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Determinación del polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) del gen *TLR4*

El polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) del gen *TLR4* se determinó utilizando los iniciadores y el protocolo descrito por Smit LAM y col., 2007 (72) (Cuadro 7).

Se prepararon dos mezclas de reacción, una con los iniciadores para el alelo C y la otra con los iniciadores para el alelo T, esta mezcla consistió en: 1 μ L de PCR buffer (1X), 0,4 μ L de los iniciadores *TLR4* (0,4 μ M c/u), 0,1 μ L de los iniciadores *HLA-DR* (0,1 μ M c/u), 0,2 μ L de Tris-HCl-NH₄ (0,4 mM), 0,5 μ L de KCl (2,5 mM), 0,2 μ L de dNTPs (0,2 mM), 0,2 μ L MgCl₂ (1 mM), 0,08 μ L de enzima Taq polimerasa (0,02 U/ μ L), 1 μ L de ADN genómico (50-100 ng) y se completó con agua bidestilada hasta un volumen de reacción final de 10 μ L. Se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) para descartar contaminación.

Las siguientes condiciones fueron utilizadas para la amplificación, 96°C por 1 minuto, seguido por 4 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación a 70°C por 45 segundos y 75°C por 25 segundos, seguido por 20 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 96°C por 25 segundos, hibridación 65°C por 50 segundos y extensión a 72°C por 30 segundos, seguido por 3 ciclos con las siguientes características: desnaturalización 96°C por 30 segundos, hibridación 55°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos.

Luego de realizar el número de ciclos señalados, la etapa de extensión final se realizó a 72°C por 10 minutos. El producto de PCR de la variante Thr399Ile de *TLR4* se verificó en geles de agarosa al 1,5 % (Sigma) teñidos con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL). La corrida se realizó a 100 voltios por 30 minutos, utilizando como referencia un marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases (Axygen).

Cuadro 7. Secuencias de los iniciadores utilizados para determinar el polimorfismo Thr399Ile (rs4986791) del gen TLR4

Variante Polimórfica	Iniciadores	Secuencia (5' -3')	Tamaño
rs4986791 (Thr399Ile)	Alelo C (Thr399)	TCTCAAAGTGATTTTGGGACAAC	406 pb
	Alelo T (Ile399)	TTCTCAAAGTGATTTGGGACAAT	
	Iniciador común	GAGAGAGGTCCAGGAAGGTC	
HLA-DR	Sentido	TGCCAAAGTGGAGCACCCAA	785 pb
	Antisentido	GCATCTTGCTCTGTGCAGAT	

Análisis Estadístico

Las frecuencias alélicas y genotípicas fueron calculadas por conteo directo. Para determinar la posible susceptibilidad conferida por los polimorfismos *TLR* a desarrollar IAM, se calculó la fuerza de asociación mediante el *Odds Ratio* (OR), con el correspondiente intervalo de confianza (IC 95 %). La significancia estadística de las diferencias de frecuencias, entre el grupo de pacientes y controles, fueron consideradas cuando el valor de *p* fue menor a 0.05. El equilibrio de Hardy-Weinberg, los modelos de herencia fueron determinados utilizando la herramienta SNPStats (74). Las correlaciones entre la variabilidad de los polimorfismos estudiados, factores de riesgo cardiovascular tradicionales, ocurrencia, tipo y severidad del IAM y la severidad de la EAC se realizaron utilizando el paquete estadístico SPSS Statistic versión 20 (75).

RESULTADOS

Características demográficas y clínicas de los pacientes con IAM e individuos aparentemente sanos

Las características demográficas de los pacientes e individuos aparentemente sanos (controles) se muestran en el Cuadro 8. De los 75 pacientes incluidos, 17,3 % eran mujeres y 82,7 % hombres, con un rango de edad comprendido entre 24 y 55 años y un promedio de 45,08 ± 7,03 años. Con respecto a los 134 controles, 56,0 % eran mujeres y 44,0 % hombres, con un rango de edad comprendido entre 30 y 83 años y un promedio de 51,92 ± 10,89 años. Cabe destacar que cuando se sometieron al análisis estadístico de asociación entre pacientes y controles se realizó los correspondientes ajustes para las variables edad y sexo entre pacientes y controles utilizando el correspondiente análisis de regresión logística.

Al establecer comparaciones de las frecuencias de los factores de riesgo cardiovascular (FRCV) entre ambos grupos, observamos una frecuencia significativamente incrementada de individuos masculinos (OR: 6,1; IC 95 %: 3,05-12,07; *p*: <0,00001), casos de hipertensión

Cuadro 8. Características demográficas y clínicas de los pacientes con IAM e individuos aparentemente sanos (controles)

Características	Pacientes con IAM (n=75)	Características	Controles (n=134)
Sexo		Sexo	
Femenino	17,3 (13)	Femenino	56,0 (75)
Masculino	82,7 (62)	Masculino	44,0 (59)
Rango de edad (años)	24-55	Rango de edad (años)	30-83
Edad promedio	45,08 ± 7,03	Edad promedio	51,92 ± 10,89
FRCV presentes		FRCV presentes	
HTA	57,3 (43)	HTA	27,6 (37)
DM	20,0 (15)	DM	14,9 (20)
Tabaquismo	53,3 (40)	Tabaquismo	41,0 (55)
Obesidad	16,0 (12)	Obesidad	26,9 (36)
Dislipidemia	14,7 (11)	Dislipidemia	25,4 (34)
Sedentarismo	82,7 (62)	Sedentarismo	24,6 (33)
Presentación clínica			
SCASEST	44,0 (33)		
SCACEST	54,7 (41)		

(OR: 3,1; IC 95 %: 1,72-5,68; p : 0,000078) y sedentarismo (OR: 12,6; IC 95 %: 6,12-25,82; p : <0,00001) así como tabaquismo el cual se encontró en el 53,3 % (n:40), en el grupo de pacientes versus los individuos aparentemente sanos. Con respecto a la presentación clínica del infarto, el 44,0 % (33) de los pacientes se clasificaron clínicamente en pacientes con SCASEST y 54,7 % (41) en pacientes con SCACEST.

Las frecuencias están expresadas en porcentajes y entre paréntesis se indica el número de individuos. DM: Diabetes mellitus, HTA: Hipertensión arterial, FRCV: Factores de riesgo cardiovascular, SCA: Síndrome coronario agudo, SEST: Sin elevación del segmento ST, CEST: Con elevación del segmento ST.

Características angiográficas de las arterias epicárdicas de los pacientes con IAM

Entre las características ecocardiográficas de los pacientes incluidos, se investigó la función sistólica del ventrículo izquierdo al momento del ingreso, estimándose levemente disminuida ($40,67 \% \pm 9,08$). Basados en la angiografía coronaria diagnóstica, se evidenció que el 96 % de los pacientes poseían enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa de arterias epicárdicas (EACOS) y sólo 4 % de los pacientes presentaron enfermedad arterial coronaria obstructiva no significativa (EACONS).

El análisis de severidad de la EAC, definida de acuerdo al número de arterias coronarias involucradas, mostró que el 64 % de los pacientes tenían un vaso coronario principal afectado, 32 % dos vasos principales afectados y el 4 % tres vasos principales. La arteria afectada con mayor frecuencia, fue la arteria descendente anterior (ADA), seguida por la arteria coronaria derecha (ACD), la arteria circunfleja (ACx) y el tronco coronario izquierdo o tronco principal (TCI/TP) (Cuadro 9).

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos. EACOS: Enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa de arterias epicárdicas; EACONS: Enfermedad arterial coronaria obstructiva no significativa. ADA: Arteria descendente anterior; ACD: Arteria coronaria derecha, ACx: Arteria circunfleja; TCI/TP: tronco coronario izquierdo o tronco principal.

Prevalencia de arteria afectada según sexo.

La arteria más afectada en ambos sexos fue la arteria descendente anterior (DA), sin diferencias significativas entre ambos sexos. Sin embargo, se observó que la arteria circunfleja (Cx) fue la arteria culpable significativamente más prevalente en pacientes masculinos. En ninguna de las mujeres se observó compromiso del tronco coronario izquierdo siendo mayor el porcentaje de hombres con compromiso de este vaso (8 %) (Cuadro 10).

Cuadro 9. Características angiográficas de las arterias epicárdicas de los pacientes con IAM

Características angiográficas	Frecuencia (n= 75)
Enfermedad arterial coronaria	
EACOS	96 (72)
EACONS	4 (3)
Número de arterias coronarias involucradas	
Uno	64 (48)
Dos	34 (24)
Tres	4 (3)
Arteria afectada	
ADA	66,7 (50)
ACD	41,3 (31)
ACx	30,7 (23)
TCI/TP	6,7 (5)

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos. EACOS: Enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa de arterias epicárdicas; EACONS: Enfermedad arterial coronaria obstructiva no significativa. ADA: Arteria descendente anterior; ACD: Arteria coronaria derecha, ACx: Arteria circunfleja; TCI/TP: tronco coronario izquierdo o tronco principal.

Cuadro 10. Prevalencia de arteria afectada según el sexo

Arteria afectada	Frecuencia (n= 75)	Femenino (n=13)	Masculino (n=62)	P
ADA	66,7 (50)	76,9 (10)	64,5 (40)	0,19
ACD	41,3 (31)	16,1 (5)	41,9 (26)	0,40
ACx	30,7 (23)	7,7 (1)	35,5 (22)	0,02
TCI/TP	6,7 (5)	0	8,1 (5)	0.23

ADA: Arteria descendente anterior; ACD: Arteria coronaria derecha, ACx: Arteria circunfleja; TCI/TP: tronco coronario izquierdo o tronco principal.

Clasificación Killip-Kimball

Dado que la clasificación de Killip-Kimball (76) en el momento de la admisión del paciente sigue siendo un importante factor pronóstico, la misma fue realizada en el 57 % de los pacientes, de los cuales el 97,6 % fueron clasificados como Killip I (Infarto no complicado) y solo 2,4 % como Killip II (Insuficiencia cardíaca moderada: estertores en bases pulmonares, galope por S3, taquicardia).

Además, se observó en el grupo de pacientes con información de la localización del infarto en el ventrículo izquierdo, que el 52 % de los pacientes lo presentaba en la cara anterior y el 48 % en la cara inferior.

Compromiso de la función sistólica del ventrículo izquierdo

Al evaluar el compromiso de la función sistólica del ventrículo izquierdo midiendo el porcentaje de fracción de eyección (FEVI), a través del ecocardiograma transtorácico, se determinó el porcentaje promedio de fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) para los pacientes con infarto, el cual fue de 40,7 % con una desviación estándar de 9 (40,7 \pm 9,08). El máximo valor obtenido de FEVI fue de 60 % y el mínimo de 19 %.

Evaluación de la calidad del ADN genómico

Para verificar la calidad del ADN genómico se procedió a visualizarlos en geles de agarosa al 0,75 % en TBE 1X, utilizando bromuro de etidio como colorante. Esto permitió evidenciar que el ADN genómico obtenido de las muestras de sangre periférica no estaba degradado (Figura 12).

Polimorfismo rs5743708 (Arg753Gln) del gen *TLR2*

El polimorfismo rs5743708 (Arg753Gln) del gen *TLR2* se determinó a través de la técnica PCR-SSP. En la Figura 13 se muestra el producto amplificado correspondiente al alelo T o C (423 pb). La banda de 785 pb corresponde al control interno de la reacción (*HLA-DR*).

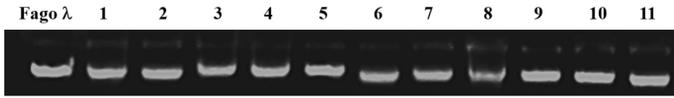


Figura 12. Visualización de los ADN genómicos, mediante electroforesis en gel de agarosa (0,75 %) en buffer TBE 1X. Los carriles 1 al 9 corresponden a las muestras de ADN de algunos de los individuos incluidos en el estudio. El carril Fago λ corresponde al ADN del fago lambda ajustado a 200 $\mu\text{g/mL}$ (marcador de referencia).

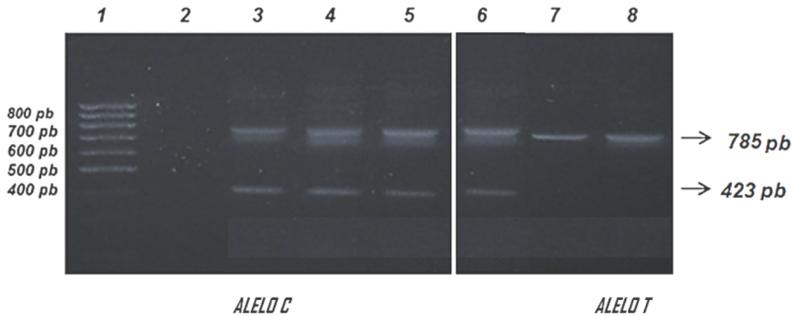


Figura 13. Visualización de los productos amplificados por PCR del polimorfismo rs5743708 (Arg753Gln) del gen *TLR2* en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Los carriles 3 al 5 corresponden a la amplificación del alelo C (423 pb) y los carriles 6 al 8 a la amplificación del alelo T (785 pb). El carril 1 corresponde al marcador de tamaño molecular y el carril 2 el control negativo (sin ADN). En todos los carriles se observa la presencia del control interno HLA-DR (785 pb).

Polimorfismo rs5743704 (Pro631His) del gen *TLR2* (Figura 14)

El polimorfismo rs5743704 (Pro631His) del gen *TLR2* se determinó a través de la técnica PCR-SSP. En la Figura 14 se muestra el producto amplificado correspondiente al alelo G o T (267 pb). La banda de 419 pb corresponde al control interno de la reacción (ABO).

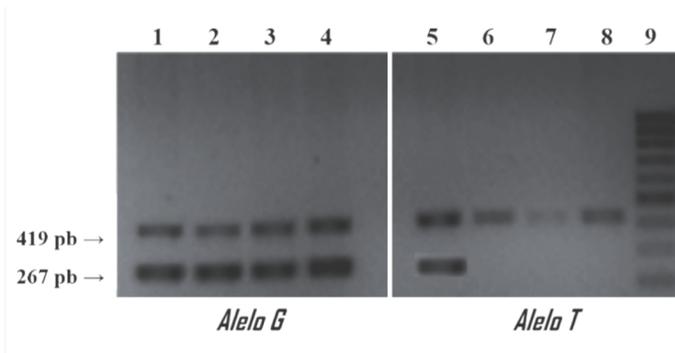


Figura 14. Visualización de los productos amplificados por PCR del polimorfismo rs5743704 (Pro631His) del gen *TLR2* en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Los carriles 1 a 4 corresponden a la amplificación del alelo G (267 pb) y los carriles 5 a 8 a la amplificación del alelo T (267 pb). El carril 9 corresponde al marcador de tamaño molecular. En todos los carriles se observa la presencia del control interno *ABO* (419 pb).

Polimorfismo rs4986790 (Arg299Gly) del gen *TLR4*

El polimorfismo rs4986790 (Arg299Gly) del gen *TLR4* se determinó a través de la técnica PCR-SSP. En la Figura 15 se muestra el producto amplificado correspondiente al alelo A o G (307 pb). La banda de 409 pb corresponde al control interno de la reacción (*ABO*).

Polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen *TLR4*

El polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen *TLR4* se determinó a través de la técnica PCR-SSP. En la Figura 16 se muestra el producto amplificado correspondiente al alelo T o C (406 pb). La banda de 785 pb corresponde al control interno de la reacción (*HLA-DR*).

Determinación del equilibrio de H-W y modelo de herencia de los polimorfismos de los genes *TLR2* y *TLR4*

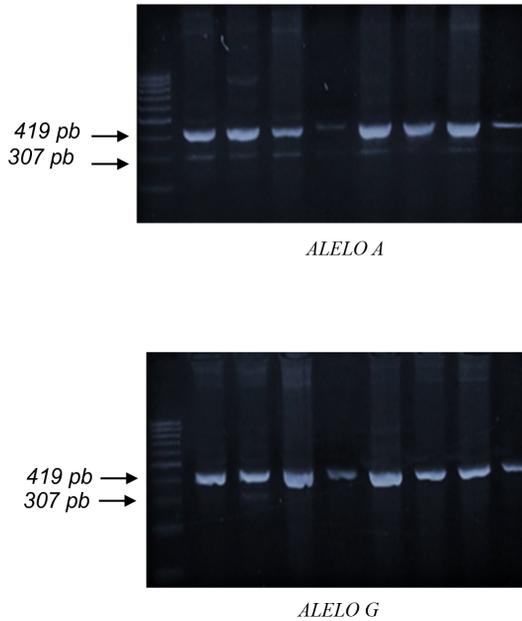


Figura 15. Visualización de los productos amplificados por PCR del polimorfismo rs4986790 (Arg299Gly) del gen *TLR4* en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. El gel superior corresponde a la amplificación del alelo A silvestre (307 pb) y el gel inferior a la amplificación del alelo G mutado (307 pb). La presencia de la banda de 307 pb indica que el individuo posee el alelo correspondiente. En todos los carriles se observa la presencia del control interno ABO (419 pb). El primer carril de ambos geles es el marcador de tamaño molecular.

Utilizando el programa SNPstats, se confirmó, en los individuos aparentemente sanos, la existencia del equilibrio de H-W para la distribución genotípica de los polimorfismos rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen *TLR2* y del polimorfismo rs4986791

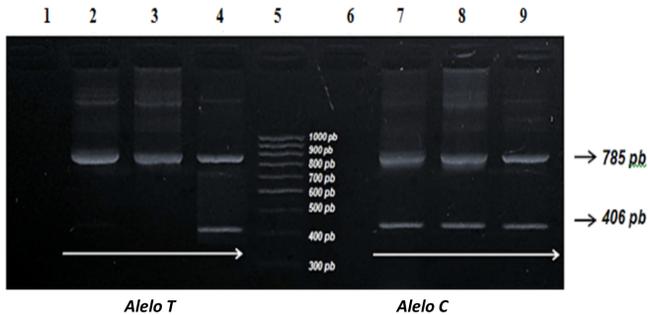


Figura 16. Visualización de los productos amplificados por PCR del polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen TLR4 en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Los carriles 2 al 4 corresponden al alelo T mutado (406 pb) y los carriles 7 al 9 corresponden al alelo C silvestre (406 pb). En todos los carriles se observa la presencia del control interno HLA-DR (785 pb). El carril 1 y 6 corresponden al control negativo. El carril 5 es el marcador de tamaño molecular.

(Thr299Ile) del gen TLR4 (Cuadro 11). No obstante, la distribución genotípica del polimorfismo rs4986790 (Arg299Gly) del gen TLR4 no se ajustó al equilibrio de H-W, por ende, este polimorfismo no se incluyó en los análisis de asociación ya que se establece que la población tendrá las frecuencias genotípicas especificadas (llamadas proporciones d Hardy-Weinberg) tras una generación de apareamiento aleatorio dentro de la población. Cuando esto no sucede puede deberse a Endogamia, la cual provoca un aumento de la homocigosis. Puede deberse a emparejamiento selectivo que también causa este fenómeno de homocigosis y la más frecuente que es lo más probable que esté pasando en nuestro trabajo, que es el tamaño reducido de la muestra que causa un cambio aleatorio de la frecuencias genotípicas, especialmente si la población es muy pequeña. Esto es debido al efecto de muestreo y se llama Deriva Genética.

Cuadro 11. TLR2 y TLR4 en individuos venezolanos aparentemente sanos y pacientes con IAM

	Genotipo TLR2 rs5743708 (Arg753Gln)	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	Valor de p
Controles (n=134)	C/C	131	131	1
	C/T	3	3	
Casos (n=73)	C/C	72	72	1
	C/T	1	1	
	Genotipo TLR2 rs5743704 (Pro631His)	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	
Controles (n=132)	G/G	131	131	1
	G/T	1	1	
Casos (n=73)	G/G	72	72	1
	G/T	1	1	
	Genotipo TLR4 rs4986790 (Arg299Gly)	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	
Controles (n=126)	A/A	116	113,3	0,0016
	A/G	7	12,3	
	G/G	3	0,3	
Casos (n=70)	A/A	61	60,4	0,29
	A/G	8	9,3	
	G/G	1	0,4	
	Genotipo TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)	Frecuencia Observada	Frecuencia Esperada	
Controles (n=134)	C/C	127	126,1	0,1
	C/T	6	7,8	
	T/T	1	0,1	
Casos (n=74)	C/C	66	65,3	0,23
	C/T	7	8,5	
	T/T	1	0,3	

p: probabilidad; valores de $p \geq 1$: no significativo; valores de $p \leq 0,05$: significativo.

Distribución de frecuencia genotípica y alélica de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 en individuos venezolanos aparentemente sanos y pacientes con IAM

Al analizar los polimorfismos rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen TLR2 en los individuos aparentemente sanos (controles) y pacientes con IAM, se observó la presencia de dos de los tres genotipos posibles en ambos polimorfismos. Presentando los genotipos homocigotos silvestre (C/C y G/G) la mayor frecuencia, seguido por el genotipo heterocigoto (C/T, G/T). Asimismo, en los dos grupos estudiados, se observó una mayor frecuencia de los alelos silvestre (C y G) y una menor frecuencia de los alelos mutado (T). Con respecto a los polimorfismos TLR4 rs4986790 (Arg299Gly) y rs4986791 (Thr399Ile), se observó en los controles y pacientes los tres genotipos posibles. Presentando los genotipos homocigotos silvestre la mayor frecuencia (A/A, C/C), seguido por el genotipo heterocigoto (A/G, C/T) y el genotipo homocigoto mutado (G/G, T/T). En ambos grupos se observó una mayor frecuencia de los alelos silvestre (A y C) y una menor frecuencia de los alelos mutado (G y T) (Cuadro 12).

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado.

Modelos de herencia de las variantes rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen TLR2

El modelo de herencia de las variantes rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen TLR2 no se pudo establecer debido a la ausencia del genotipo homocigoto mutado en ambos polimorfismos.

Modelos de herencia de las variantes rs4986790 (Arg299Gly) y rs4986791 (Thr399Ile) del gen TLR4

Al analizar el modelo de herencia del genotipo homocigoto mutado de la variante rs4986791 del gen TLR4, ajustado para los factores de riesgo cardiovascular (Sexo, Edad, Hipertensión, Tabaquismo, Obesidad,

Cuadro 12. Distribución de las frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos del gen TLR2 y TLR4 en individuos aparentemente sanos y pacientes con IAM

TLR2 rs5743708 (Arg753Gln)	IAM n= 73	CONTROLES n=134	TLR2 rs5743704 (Pro631His)	IAM n= 74	CONTROLES n=132
Genotipos			Genotipos		
C/C	99 (72)	97.8 (131)	G/G	99 (72)	99,2 (131)
C/T	1 (1)	2.2 (3)	G/T	1 (1)	0,8 (1)
Alélos			Alélos		
C	99 (145)	98.9 (265)	G	99 (145)	99.6 (263)
T	1 (1)	1.1 (3)	T	1 (1)	0,4 (1)
TLR4 rs4986790 (Arg299Gly) <th>IAM n= 70</th> <th>CONTROLES n=126</th> <th>TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)</th> <th>IAM n= 74</th> <th>CONTROLES n=134</th>	IAM n= 70	CONTROLES n=126	TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)	IAM n= 74	CONTROLES n=134
Genotipos			Genotipos		
AA	87 (61)	96 (116)	CC	89,2 (66)	95 (127)
AG	11 (8)	6 (7)	CT	9,5 (7)	4 (6)
GG	1 (1)	2 (3)	TT	1,3 (1)	1 (1)
Alélos			Alélos		
A	93 (130)	95 (239)	C	94 (139)	97 (260)
G	7 (10)	5 (13)	T	6 (9)	3 (8)

La frecuencia está expresada en porcentaje. Los valores mostrados entre paréntesis representan el número de individuos portadores del genotipo o el número de veces que se repite el alelo para el sitio polimórfico estudiado.

Dislipidemia, Diabetes y Sedentarismo), se estableció el modelo de herencia dominante aditivo para dicho polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile), al presentar el valor de probabilidad (p) más bajo. El modelo aditivo indica que cada copia del alelo mutado modifica el riesgo en una forma aditiva, es decir, el genotipo homocigótico mutado confiere un riesgo doble con respecto al genotipo heterocigoto.

Asociación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con susceptibilidad a desarrollar IAM

Al establecer la comparación de frecuencias genotípicas, entre pacientes y controles, considerando el modelo de herencia de cada variante y mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico, obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, no se observaron diferencias significativas para las variantes TLR2 rs5743708 (Arg753Gln) y TLR2 rs5743704 (Pro631His).

Con respecto a la variante TLR4 rs4986791 (Thr399Ile), se observó una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos que poseen por los menos un alelo mutado (C/T + T/T) en los pacientes con respecto a los individuos aparentemente sanos (OR= 3; IC 95 %: 0,90-10,39, p=0,03) (Cuadro 13).

Asociación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con el tipo de síndrome coronario

Al establecer la comparación de frecuencias genotípicas, entre pacientes con infarto agudo de miocardio con y sin elevación del segmento ST con controles, considerando el modelo de herencia de cada variante y mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico, obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, no se observaron diferencias significativas para las variantes TLR2 rs5743708 (Arg753Gln) y TLR2 rs5743704 (Pro631His). Con respecto a la variante TLR4 rs4986791 (Thr399Ile), se observó una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos que poseen por los menos un alelo mutado (C/T +

Cuadro 13. Asociación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con el desarrollo de IAM

TLR2 rs5743708 (Arg753Gln)				
Genotipo	IAM (n=73)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	P
C/C vs. C/T	72 vs. 1	93 vs. 1	0,77 (0,05-12,68)	0,42
TLR2 rs5743704 (Pro631His)				
Genotipo	IAM (n=73)	Controles (n=92)	OR (IC 95 %)	P
G/G vs. G/T	72 vs. 1	91 vs. 1	0,79 (0,05-12,86)	0,43
TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)				
Genotipo	IAM (n=74)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	P
2T/T + C/T vs. C/C	2 (1) + 7 vs. 66	2 (0) + 4 vs. 90	3,0 (0,90-10,39)	0,03

Los valores mostrados representan el número de individuos portadores del genotipo. OR: Odds ratio (razón de probabilidades), IC: intervalo de confianza, p: valor de probabilidad.

T/T) en los pacientes con elevación del segmento ST con respecto a los individuos aparentemente sanos (OR= 3.75; IC 95 %: 0,990-14,07, p=0,01) (Cuadro 14).

Los valores mostrados representan el número de individuos portadores del genotipo. OR: Odds ratio (razón de probabilidades), IC: intervalo de confianza, p: valor de probabilidad. SCA: Síndrome coronario agudo, SEST: Sin elevación del segmento ST, CEST: Con elevación del segmento ST.

Cuadro 14. Asociación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con el tipo de síndrome coronario

SCACEST				
TLR2 rs5743708 (Arg753Gln)	SCACEST (n=40)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	p
C/C vs. C/T	39 vs. 1	93 vs. 1	0,42 (0,02-6,87)	0,26
TLR2 rs5743704 (Pro631His)	SCACEST (n=39)	Controles (n=92)	OR (IC 95 %)	p
G/G vs. G/T	38 vs. 1	91 vs. 1	0,41 (0,02-6,84)	0,26
TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)	SCACEST (n=41)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	p
2T/T + C/T vs. C/C	2 (1) + 4 vs. 36	2 (0) + 4 vs. 90	3,75 (0,99-14,07)	0,01
SCASEST				
TLR2 rs5743708 (Arg753Gln)	SCASEST (n=32)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	p
C/C vs. C/T	32 vs. 0	93 vs. 1	1 (0,04-26,23)	0,48
TLR2 rs5743704 (Pro631His)	SCASEST (n=33)	Controles (n=92)	OR (IC 95 %)	p
G/G vs. G/T	33 vs. 0	91 vs. 1	1 (0,04-27,62)	0,46
TLR4 rs4986791 (Thr399Ile)	SCASEST (n=32)	Controles (n=94)	OR (IC 95 %)	p
2T/T + C/T vs. C/C	2 (0) + 3 vs. 29	2 (0) + 4 vs. 90	2,32 (0,49-11,01)	0,13

Los valores mostrados representan el número de individuos portadores del genotipo. OR: Odds ratio (razón de probabilidades), IC: intervalo de confianza, p: valor de probabilidad. SCA: Síndrome coronario agudo, SEST: Sin elevación del segmento ST, CEST: Con elevación del segmento ST.

Análisis de Desequilibrio de Ligamiento

Al analizar dos polimorfismos, para cada gen TLR estudiado, se determinó el desequilibrio de ligamiento y se analizó el haplotipo formado por ellos. El análisis del desequilibrio de ligamiento incluyó los estadísticos: D, D', coeficiente de correlación de Pearson r y los valores de probabilidad p asociados. En el Cuadro 15 se muestra el análisis de desequilibrio de ligamiento de los genes TLR2 y TLR4 que incluye dos SNP. Considerando que: a medida que el valor de D' se aproxima a 1,0 el desequilibrio de ligamiento es más fuerte y la correlación (r) entre ellos puede ser positiva o negativa, se observó que los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 del gen TLR4 se encuentran en desequilibrio de ligamiento, con una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Cuadro 15. Desequilibrio de ligamiento de los polimorfismos rs5743708 / rs5743704 del gen TLR2 y los polimorfismos rs4986790/ rs4986791 del gen TLR4

SNP	D'	r	P
TLR2 rs5743708 / rs5743704	0,0033	0,0023	0,96
TLR4 rs4986790/rs4986791	0,5753	0,4756	0,05

D': desequilibrio de ligamiento, r: correlación de Pearson, p: probabilidad asociada.

Asociación de los haplotipos formados por los polimorfismos rs5743708 / rs5743704 del gen TLR2 con el desarrollo de IAM

Al estimar los haplotipos formados por los polimorfismos rs5743708 / rs5743704 del gen TLR2, mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico,

obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, en individuos con IAM y controles, se observaron tres haplotipos posibles, presentando el haplotipo 1 la mayor frecuencia en ambos grupos. Al establecer la comparación de frecuencias de haplotipos entre pacientes y controles no se observaron diferencias significativas ($p: 0,44$) (Cuadro 16).

Cuadro 16. Frecuencia estimada de los haplotipos rs5743708 / rs5743704 del gen TLR2 en pacientes con IAM e individuos controles

Haplotipo	rs5743708 (Arg753Gln)	rs5743704 (Pro631His)	IAM	CONTROLES
1	C	G	0,9863	0,985
2	T	G	0,0069	0,0112
3	C	T	0,0069	0,0038

Alelos silvestres: C y G; Alelos mutados: T y T

Asociación de los haplotipos formados por los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 del gen TLR4 con el desarrollo de IAM

Al estimar los haplotipos formados por los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 del gen TLR4, mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico, obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, en individuos con IAM y controles, se observaron cuatro haplotipos posibles: 4 en los pacientes y 3 en los controles (Cuadro 17).

Correlación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con la presencia de factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria

Al establecer las correlaciones entre los distintos FRCV (HTA, DM, tabaquismo, obesidad, dislipidemia y sedentarismo), clasificación

Cuadro 17. Frecuencia estimada de los haplotipos rs4986790 y rs4986791 del gen TLR4 en pacientes con IAM e individuos controles

Haplotipos	rs4986790	rs4986791	IAM	CONTROLES
1	A	C	0,8882	0,9462
2	G	C	0,0496	0,0239
3	A	T	0,0417	0,0038
4	G	T	0,0206	0,0261

Alelos silvestres: A y C; Alelos mutados: G y T.

Killip-Kimball, tipo de SCA (CEST, SEST) y severidad de enfermedad arterial (número de arterias coronarias involucradas) se hallaron correlaciones positivas (Cuadro 18) y negativas (Cuadro 19) entre los distintos parámetros evaluados. Sin embargo, no se observaron

Cuadro 18. Correlaciones positivas entre los distintos parámetros en los pacientes con síndrome coronario agudo

Parámetros de la correlación	r	Valor de p	Correlación
Tipo de SCA y clasificación Killip-Kimball	0,9204	< 0,0001	Muy alta
Tipo de SCA y localización del infarto (cara)	0,8269	< 0,0001	Alta
Tipo de SCA y troponina	0,5449	< 0,0001	Moderada
Tipo de SCA y severidad de enfermedad arterial	0,3143	0,003	Baja
Severidad de enfermedad arterial y troponina	0,3194	0,0026	Baja
Severidad de enfermedad arterial y clasificación Killip-Kimball	0,3352	0,0016	Baja

Cuadro 19. Correlaciones negativas entre los distintos parámetros en los pacientes con síndrome coronario agudo

Parámetros de la correlación	r	Valor de p	Correlación
HTA y tipo de SCA	-0,2534	0,0141	Baja
HTA y localización del infarto (cara)	-0,3506	0,001	Baja

correlaciones entre los polimorfismos rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen TLR2 y el polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen TLR4 con los factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria.

DISCUSIÓN

La enfermedad vascular aterosclerótica es un proceso crónico, con un curso progresivo durante muchos años, pero que puede causar eventos clínicos agudos, incluidos los síndromes coronarios agudos (SCA), infarto de miocardio (IM) y accidente cerebrovascular. Además, de una serie de factores de riesgo típicos de la aterosclerosis, como la hiperlipidemia, la hipertensión, el tabaquismo y la obesidad, la evidencia emergente sugiere que la infección crónica juega un papel importante en la misma (77).

Los mecanismos inmunitarios innatos son fundamentales para la aterogénesis e implican la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) e inducción de procesos inflamatorios. En un tejido complejo, como la lesión aterosclerótica, las señales innatas pueden originarse a partir de varias fuentes y promover aterogénesis a través de la interacción de los PRR con sus ligandos (Revisado en 78). Los TLR son los miembros más característicos de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) y juegan un papel vital en los

mecanismos de inmunidad innata (79). Los TLR reconocen diversas estructuras moleculares llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), que van desde lípidos y proteínas a ácidos nucleicos, que son comunes entre muchos microorganismos. Aparte de los patógenos, los TLR también reconocen ligandos endógenos que se pueden encontrar en los sitios de inflamación. Estos son principalmente productos del estrés tisular que son liberados durante la muerte celular necrótica o derivan de la degradación de la matriz extracelular. Los ligandos endógenos de TLR se han denominado patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y sirven como señales de peligro para alertar al sistema inmunitario innato de lesiones tisulares en ausencia de infecciones (Revisado en 78).

En las lesiones ateroscleróticas se incrementa la expresión de varios TLR, principalmente en los macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas. Asimismo, los TLR2 y TLR4 poseen la mayor expresión, tanto en condiciones sanas y en lesiones, lo que sugiere que pueden jugar un papel clave en el control de la inflamación de los vasos (80,81). Por otra parte, los TLR4 se encuentran incrementados en monocitos circulantes de pacientes con enfermedad arterial coronaria con respecto a controles sanos, posiblemente como consecuencia de una inflamación en curso o como un signo de un estado de alerta incrementado (82-84).

La expresión de los TLR también se ha estudiado en dos modelos de ratones ateroscleróticos: 1. ratones que carecen de apolipoproteína E (apoe)-/-, que desarrollan espontáneamente hipercolesterolemia, y 2. ratones deficientes en receptores LDL (ldlr)-/-, que solo desarrollan lesiones cuando se alimentan con una dieta alta en colesterol. En ratones apoe-/- se ha evidenciado la expresión incrementada de TLR4 en las lesiones y en ratones ldlr-/- los TLR2 se detectan principalmente en los sitios de flujo sanguíneo alterado (85,86), incrementando su expresión con la progresión de la enfermedad, contribuyendo así con los procesos ateroscleróticos tempranos (86). La presencia de TLR en vasos sanos y lesiones ateroscleróticas sugiere que pueden modular procesos claves antes y durante la progresión de la enfermedad, pudiendo

ejercer un gran impacto en los eventos aterogénico (85,86). Como los TLR juegan un papel clave en la recepción de señales, se especula que los polimorfismos en los TLR pueden alterar y modificar la respuesta celular y la producción de citoquinas, que pueden asociarse con la susceptibilidad a un amplio espectro de enfermedades infecciosas y no infecciosas (87). Basados en las evidencias expuestas planteamos determinar la asociación entre la cardiopatía isquémica y la variabilidad de los genes de receptores tipo Toll (TLR2 y TLR4) en pacientes con síndrome coronario agudo.

Factores de riesgo, tipo de infarto, características angiográficas de las arterias epicárdicas y disfunción (FEVI) cardíaca de los pacientes con IAM

En el presente estudio, en congruencia con la mayor parte de los datos notificados en la literatura, se observó en el grupo de pacientes con IAM una frecuencia significativamente incrementada de individuos masculinos, casos de hipertensión y sedentarismo. El estudio INTERHEART, estableció un estudio estandarizado de controles (14820) y casos de infarto agudo de miocardio (15152) en 52 países, representando a todos los continentes habitados, para evaluar la relación entre los factores de riesgo y el infarto de miocardio agudo. Este estudio mostró que la proporción de casos masculinos, casos de sedentarismo e hipertensión fue mayor entre los adultos más jóvenes (≤ 55 años) en comparación con los adultos mayores (88). Asimismo, el Registro Global de Eventos Coronarios Agudos (GRACE) evaluó a 24 165 personas de 14 países que presentaban síndrome coronario agudo (incluyendo infarto de miocardio y angina inestable) y establecieron la prevalencia de factores de riesgo en diferentes grupos etarios. El análisis mostró que en los grupos de edad más jóvenes había una mayor proporción de hombres, mayor prevalencia de tabaquismo, pero menor prevalencia de hipertensión (89).

Como es bien sabido, los hallazgos angiográficos coronarios ayudan a diseñar estrategias terapéuticas para mejorar los resultados clínicos en los pacientes con infarto miocárdico. La Electrocardiografía

(ECG) sigue siendo la herramienta principal para identificar el infarto de miocardio agudo, y el inicio de una estrategia de reperfusión emergente va depender de la presencia de la elevación del segmento ST en un ECG de superficie de 12 derivaciones. Sin embargo, la sensibilidad del ECG en la detección de obstrucción total de la arteria relacionada con el infarto es subóptima, particularmente para la circulación posterolateral. Por lo tanto, la incidencia y el resultado clínico de la obstrucción total van a diferir dependiendo de la arteria coronaria involucrada. Por el contrario, los hallazgos electrocardiográficos o la presentación clínica al ingreso pueden ser más predictivo del resultado que la presencia o ausencia de la obstrucción total, demostrándose que la cuantía y severidad del área infartada se correlacionan en forma más directa con los hallazgos Electrocardiográficos y con la cuantía de la elevación de los marcadores de necrosis miocárdica como la troponina I cuantitativa. De igual manera cabe destacar que una elevación de la troponina cuantitativa en plasma, en ausencia de correlación clínica y electrocardiográfica de infarto, nos impulsa a investigar otras etiología que expliquen el incremento de la misma, como Disección aórtica, embolismo pulmonar, insuficiencia cardíaca o renal crónica. En el presente estudio, el análisis electrocardiográfico mostró que el 54,7 % de los pacientes sufrieron SCA con elevación del segmento ST. Estos pacientes, independientemente del estado de obstrucción, muestran un mayor tamaño del infarto, que es evaluado por las concentraciones séricas de la isoenzima MB de la creatina quinasa, con respecto a los pacientes que sufrieron SCA sin elevación del segmento ST. Basados en la angiografía coronaria el 96 % de los pacientes poseían enfermedad arterial coronaria obstructiva significativa de arterias epicárdicas (EACOS) y se observó una prevalencia de SCA sin lesiones coronarias significativas (EACONS) del 4 %, en concordancia con la descrita en estudios previos (90-94).

El análisis de severidad de la EAC, definida de acuerdo al número de arterias coronarias involucradas, mostró que el 66,7 % de los pacientes tenían un vaso coronario principal afectado. Resultados similares se han sido descrito en pacientes con infarto agudo de

miocardio de Colombia (95), Argentina (96) y Cuba (97). El definir la arteria responsable o culpable, así como el tamaño del infarto, para lo cual resulta de extrema sensibilidad de acuerdo a los últimos consensos emitidos en los 5 años precedentes, la determinación de los trastornos de la motricidad miocárdica mediante las diferentes técnicas de ecocardiografía bi y tridimensional, Resulta de gran importancia para determinar el pronóstico del paciente que ha sufrido este episodio cardíaco. Cuando se obstruye el segmento proximal de la arteria descendente anterior, arteria con un gran lecho vascular que irriga la mayor parte de la pared anterior y lateral del ventrículo izquierdo, se desarrollará un infarto anterolateral extenso con mayor riesgo de complicaciones y peor pronóstico; y si se obstruye un segmento distal de la arteria coronaria derecha, con poco lecho vascular y del que depende una pequeña porción de la cara inferior del ventrículo izquierdo, se desarrollará un pequeño infarto inferior con escaso riesgo de complicaciones y buen pronóstico (98). En el presente estudio el vaso que más se encontró afectado fue la arteria descendente anterior, seguido por la arteria coronaria derecha, sin diferencias entre pacientes femeninos y masculinos, en concordancia con lo descrito en la literatura (95-97). Asimismo, la enfermedad de tronco de la coronaria izquierda se observó predominantemente en pacientes masculinos en concordancia con lo descrito en la literatura (97,99). Finalmente, la arteria circunfleja (Cx), como arteria culpable, se observó significativamente más prevalente en pacientes masculinos (97). Cabe destacar, que el 97,6 % de los pacientes con infarto agudo incluidos en la presente investigación, tenían un leve compromiso clínico, es decir, no presentaban cambios de repercusión hemodinámica (Killip I) al momento del ingreso. Los pacientes que presentaban insuficiencia ventricular izquierda entre leve y moderada (Killip II) correspondían al 2,4 %. El infarto de la cara anterior del ventrículo izquierdo fue el más frecuente (52 %), seguido por el infarto de la cara inferior (48 %) (95).

Otro de los parámetros analizados en los pacientes IAM fue la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), que es la medida central de la función sistólica del ventrículo izquierdo. La clasificación

más simple, según el Colegio Americano de Cardiología (ACC), es usada clínicamente de la siguiente manera: Hiperdinámica (FEVI superior al 70 %); Normal (FEVI 50 % a 70 %; punto medio 60 %); Disfunción leve (FEVI 40 % a 49 %; punto medio 45 %); Disfunción moderada (FEVI 30 % a 39 %; punto medio 35 %); Disfunción grave (FEVI inferior al 30 %). La FEVI juega un papel importante en la evaluación de la gravedad de una disminución en la función sistólica del corazón y, por lo tanto, es útil para dirigir el tratamiento de diversas enfermedades cardiovasculares. Además, la medición precisa del porcentaje de fracción de eyección, tiene un valor pronóstico al predecir resultados adversos en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, después de un infarto de miocardio y después de una revascularización (100). Al evaluar el compromiso de la función sistólica del ventrículo izquierdo de los pacientes incluidos en el presente trabajo, el porcentaje promedio de fracción de eyección del ventrículo izquierdo (VI) para los pacientes con infarto fue de $40,7 \pm 9,08$, correspondiente a una disfunción ventricular izquierda leve. Las FEVI más altas se han asociado con una disminución lineal de la mortalidad hasta una FEVI del 45 % entre los pacientes con insuficiencia cardíaca. Sin embargo, los aumentos por encima del 45 % no se han asociado con mayores reducciones en la mortalidad. Aunque la FEVI es un fuerte predictor independiente de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca, el valor pronóstico de la FEVI debe interpretarse en el contexto de otros factores de riesgo establecidos. Las pautas actuales del American College of Cardiology/American Heart Association recomiendan la evaluación de rutina de la FEVI en pacientes con insuficiencia cardíaca para guiar el tratamiento, pero no llegan a definir una relación entre la FEVI y el pronóstico (Revisado en 100).

Asociación de los polimorfismos del gen TLR2 y del gen TLR4 con cardiopatía isquémica.

La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria crónica, en la que la infección crónica juega un papel importante en el desarrollo de la misma (77). En la inmunidad innata frente a agentes infecciosos

los receptores Toll juegan un papel clave, debido a su versatilidad para reconocer diferentes patrones moleculares (PAMP, DAMP). En el presente estudio, al establecer la comparación de frecuencias genotípicas, entre pacientes con IAM y controles, considerando el modelo de herencia de cada variante y mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico, obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, no se observaron diferencias significativas para las variantes TLR2 rs5743708 (Arg753Gln) y TLR2 rs5743704 (Pro631His). Estos resultados son similares a los descritos en la literatura (54,56,57), sin embargo, contrasta con el estudio realizado en una población turca, en el cual se observó que el genotipo TLR2-Arg753Arg parecía tener un efecto protector contra el desarrollo de enfermedad arterial coronaria (OR = 0,17), sugiriendo que el polimorfismo TLR2-Arg753Gln está asociado con la susceptibilidad a la EAC en pacientes turcos (53).

Con respecto a los polimorfismos de TLR, específicamente la variante TLR4 rs4986791 (Thr399Ile), se observó una frecuencia significativamente incrementada de los genotipos que poseen por los menos un alelo mutado (C/T + T/T) en los pacientes con respecto a los individuos aparentemente sanos, discrepando con algunos estudios descritos en la literatura, en los cuales no se encontró ningún tipo de asociación (56,63,67). O como el realizado Martines Rios y colaboradores en la población mexicana (2013) cuyo objetivo fue establecer el papel de los polimorfismos del gen TLR-4 en individuos en riesgo de desarrollar síndrome coronario agudo (SCA). Los resultados obtenidos mostraron que las frecuencias de los 2 polimorfismos (TLR4 Asp299Gly y TLR-4 Thr399Ile) estudiados fueron similares entre pacientes con SCA e individuos control (56,63,67). No obstante, en un metaanálisis reciente, en el que se incluyó datos de estudios de casos y controles para evaluar la relación entre las variantes rs4986790 y rs4986791 en el gen TLR4 y riesgo de EAC, demostró que la variante rs4986791 protege contra EAC en poblaciones asiáticas, pero no en caucásicos. En dicho estudio, sugieren que el polimorfismo rs4986791, en las áreas cercanas al mismo, provoca cambios conformacionales,

disminuye el nivel de expresión de TLR4, reduce la eficiencia de unión de TLR4 con sus ligandos y afecta las interacciones de TLR4 con las proteínas de señalización aguas abajo, lo que conduce a una disminución del riesgo a desarrollar EAC (67). Sin embargo, en el presente estudio, observamos todo lo contrario, encontramos que los genotipos que poseen por los menos un alelo mutado (C/T + T/T) son más frecuentes en los pacientes con respecto a los individuos aparentemente sanos (OR= 3; IC 95 %: 0,90-10,39, p=0,03), confirmando la presencia de los mismos un mayor riesgo de desarrollar cardiopatía isquémica. Considerando, que Figueroa y colaboradores, plantearon que los polimorfismos rs4986790 (Asp299Gly) y rs4986791 (Thr399Ile) no afectan la expresión del receptor, la unión de LPS al complejo TLR4/MD2/CD14, ni las interacciones TLR4-MD2, pero, que el polimorfismo rs4986790 (Asp299Gly) conduce a un reclutamiento deficiente de MyD88 y TRIF a TLR4, lo que sugiere que esto interfiere con la dimerización de TLR4, el ensamblaje de plataformas de acoplamiento intracelulares para el reclutamiento de adaptadores y la expresión de genes de citoquinas dependientes de MyD88 y TRIF (101), se estimó la frecuencia de los haplotipos formados por los polimorfismos rs4986790 y rs4986791 del gen TLR4, mediante el análisis de regresión logística ajustado por sexo, edad, hipertensión arterial, hábito tabáquico, obesidad, dislipidemia, diabetes y sedentarismo, en individuos con IAM y controles, observándose una frecuencia incrementada de los haplotipos 2 (299/silvestre) y 3 (silvestre/399) en los pacientes con respecto a controles, confirmando susceptibilidad al desarrollo de IAM. Sin embargo, aunque se observó esta diferencia entre casos y controles, la misma es espuria porque la distribución genotípica del polimorfismo rs4986790 (Arg299Gly) del gen TLR4 no se ajustó al equilibrio de H-W.

Si bien se ha descrito que los polimorfismos TLR4 alteran la funcionalidad del receptor o interfieren con las vías de señalización, conduciendo a una posible disminución de la respuesta proinflamatoria, la cual sería insuficiente para eliminar el patógeno, también es posible que pueda exacerbar las respuestas proinflamatorias con efectos nocivos para el organismo.

Los cambios estructurales producidos por los rs4986790 y rs4986791 en el dominio extracelular de TLR4 podría variar la carga total de la proteína, aumentando la libertad de rotación y el impedimento estérico, complicando la interacción o ensamblaje con otras proteínas, que es vital para la vía de señalización del complejo TLR4 (101). En base a ello se han realizado ensayos de estimulación con LPS para determinar el efecto de los polimorfismos de TLR4 en el perfil de citoquinas, con resultados controversiales. En el estudio realizado por Huan Liu y colaboradores en ratones, se buscó aclarar el papel fundamental de TLR4 en las lesiones cardiovasculares relacionadas con el envejecimiento. Encontramos que la expresión de TLR4 aumentó de manera dependiente de la edad tanto en el corazón como en la aorta. La deficiencia de TLR4 mejoró la sensibilidad a la insulina y previno el desarrollo de disfunción cardiovascular y senescencia en ratones de edad avanzada. Además, encontramos que la eliminación de TLR4 regulaba negativamente la expresión de citocinas proinflamatorias séricas y reducía el estrés oxidativo en el sistema cardiovascular en ratones de edad avanzada. Hasta donde sabemos, este estudio es el primero en informar el papel de TLR4 en la disfunción cardiovascular inducida por la edad. En resumen, estos hallazgos proporcionan evidencia directa de que TLR4 desempeñan un papel crucial en la patología del envejecimiento cardiovascular y que la inhibición de TLR4 es un objetivo terapéutico potencial para las enfermedades cardiovasculares relacionadas con la edad (102-106,121).

Recientemente, Sánchez y colaboradores, a través de los ensayos de estimulación de sangre completa *ex vivo* determinaron las posibles diferencias en la producción de citoquinas en individuos sanos con diferentes haplotipos TLR4. En dicho estudio observaron una disminución significativa en las concentraciones de TNF- α , IFN- γ e IL-10 en individuos con el haplotipo 4 (299/399), en comparación con los haplotipos 1 (silvestre/silvestre) y 2 (299/silvestre). Asimismo, en este estudio observaron un aumento no significativo de las concentraciones de TNF α e IL-12 en individuos con el haplotipo 299/silvestre con respecto a los individuos con el haplotipo silvestre/silvestre (107).

Estos resultados indican que la disminución en la concentración de citoquinas evaluada entre los diferentes grupos de haplotipos podría deberse a la interrupción o disminución de la respuesta mediada por las dos vías independientes de señalización del TLR, como lo describen Figueroa y colaboradores, quienes demostraron que la presencia de la variante Asp299Gly compromete el reclutamiento, mediado por LPS, de los adaptadores MyD88 y TRIF que siguen a la activación de TLR4 y disminuyendo la señalización posterior de las vías que conducen a la secreción de citoquinas (101). Además, las diferencias entre los haplotipos 299/silvestre y el 299/399 sugieren que el polimorfismo rs4986791 ejerce un efecto con una consecuencia funcional, sugiriendo que los efectos producidos por los dos polimorfismos pudiesen ser aditivos (107).

Las células de inmunidad innata identifican señales de peligro mediante la participación de receptores tipo Toll (TLR), una familia de receptores transmembrana que activa cascadas proinflamatorias posteriores 208. Los TLR son una clase importante de moléculas proteicas involucradas en la inmunidad no específica que sirven como puente entre la inmunidad específica y la no específica, además de reconocer la invasión y activar la respuesta inmune 209. Hasta la fecha se han identificado más de 10 TLR. TLR4 ha sido el TLR más estudiado y está ampliamente presente en la superficie de una variedad de células, como macrófagos 210, células dendríticas 211, células endoteliales 212 y células epiteliales 213. Los análisis de enriquecimiento funcional de 134 genes (ómnibus de expresión genética, base de datos GEO) de pacientes con diferentes fases de IM identificaron varios genes centrales (IL1R1, TLR2 y TLR4) asociados con la progresión del IM, que pueden usarse como nuevas moléculas de diagnóstico para MI 214. . Estudios cardíacos anteriores han demostrado que la activación de TLR4 provoca una mayor expresión de citocinas proinflamatorias, lo que provoca respuestas inflamatorias y daño adicional al miocardio ya lesionado. En particular, las vías de señalización de TLR4 se correlacionan con la gravedad del infarto pero no con el grado de inflamación. Los receptores TLR4 y los perfiles de expresión génica en la cadena de señalización

están regulados positivamente tanto en el miocardio infartado como en el miocardio remoto después de IM. Además, los miocitos cardíacos necróticos liberan una amplia gama de señales endógenas debido al IM (S100A1, S100A8/A9, HMGB1, galectina-3, S100 β , IL-1 α , etc.), asociadas con una inducción significativa de TLR. En un estudio clínico se descubrió que el receptor del factor activador de plaquetas (PTAFR), TLR4, miR-149-5p, miR-6778-3p y miR-520a-3p estaban implicados en la progresión de la enfermedad arterial coronaria estable hacia el IM. Por el contrario, un estudio reciente demostró que los pacientes con IM con elevación del segmento ST tienen una mayor expresión de una serie de genes que implican la actividad de NF- κ B, incluidos HIF-1 α , NF- κ B1 α , IL 18R1/2, MMP9 e IL-8, pero expresión reducida de TLR4-inducido.

La perspectiva clínica de la inhibición de TLR4/MyD88/NF-Kb alterando la activación de TLR4 puede provocar daños miocárdicos inflamación; por lo tanto, los estudios han explorado varios enfoques con respecto a la regulación negativa de TLR4. Muchos estudios preclínicos centrados en la inhibición de la señalización TLR4/MyD88/NF- κ B han demostrado efectos beneficiosos en la prevención del infarto y en el tamaño de la lesión después de un infarto de miocardio. El antagonista de TLR4, ApTOLL238, puede ser eficaz en un modelo porcino in vivo de IAM al disminuir la inflamación. La producción de IL-1 β e IL-6 y aumento de la producción de IL-10. Además, el radioprotector 105 (RP105), un homólogo de TLR4 que inhibe competitivamente la señalización de TLR4, confiere efectos protectores sobre función cardíaca después del IM. Además, la señalización mediada por nanopartículas mediante la administración de TAK, un inhibidor químico de TLR4, atenúa la lesión por IAM mediante la regulación de la inflamación mediada por monocitos/macrófagos dependientes de TLR4 en un modelo de ratón. Los fármacos clínicos metformina y metotrexato actúan como inhibidores de TLR4 y NF-Kb para reducir el tamaño del IM y mejorar la función cardíaca en modelos animales pos-IM. Además, las investigaciones centradas en la terapia génica muestra que la inyección de shRNA de lentivirus contra TLR4 en el

corazón infartado reduce significativamente el tamaño del infarto y mejora la función cardíaca *in vivo*. Sin embargo, la prevención o tratamiento de enfermedades cardíacas utilizando inhibidores de TLR4 o los antagonistas no se han lanzado actualmente en la clínica humana. ensayos. Aún se requieren más estudios para diseñar métodos para proteger el miocardio de daños adicionales (108).

Se ha establecido un vínculo epidemiológico emergente entre la infección y la enfermedad vascular aterosclerótica. Durante mucho tiempo se ha implicado a las infecciones en el inicio, la progresión y la ruptura (inestabilidad de la placa y trombosis) de la placa aterosclerótica. La hipótesis de la "respuesta a la lesión" conceptualiza la aterosclerosis como una vía de inflamación crónica y acumulación de lípidos en respuesta a la lesión endotelial. Aunque los estudios epidemiológicos que demuestran una asociación entre los agentes infecciosos y la aterosclerosis clínica son conflictivos, uno de los argumentos más fuertes en apoyar la 'hipótesis de la infección' se basa en el sustrato común de la inflamación crónica. Muchos estudios proponen los mecanismos 'directos' (invasión de células que provocan un crecimiento acelerado de la placa a través de efectos locales) e 'indirectos' (expresión sistémica de citoquinas inflamatorias que catalizan el desarrollo de placa), por la cual los agentes infecciosos contribuyen a la aterogénesis (77).

Las infecciones crónicas y la aterosclerosis tienen una variedad de mecanismos biológicos, y existe suficiente evidencia experimental para respaldar las propiedades aterogénicas de varias infecciones bacterianas y virales. La evidencia más convincente es que los agentes infecciosos se detectan en la placa aterosclerótica. Estos patógenos incluyen *Chlamydia pneumoniae*, patógenos periodontales que incluyen *P. gingivalis*, *Helicobacter pylori*, citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr (EBV), virus de inmunodeficiencia humana (HIV), virus del herpes simple-1 (HSV-1), virus del herpes simple-2 (HSV-2) y virus de hepatitis C (HCV). Estos patógenos pueden albergarse en estado latente o replicarse en células como los macrófagos creando un ambiente inflamatorio crónico. La mayoría de los organismos implicados son microbios intracelulares que ejercen sus efectos desde el interior de la

célula, evadiendo los mecanismos inmunitarios del cuerpo. Los efectos patogénicos locales de distintos microorganismos pueden participar en distintas fases de la aterogénesis (formación de la lesión, progresión de la lesión e inestabilidad de la lesión) (77).

Independientemente de los patógenos que se encuentren *in situ* en la placa, las infecciones inducen inflamación sistémica a través de la liberación de citoquinas y activan el sistema inmunitario, tanto innato (TLR, HSP y señalización del inflammasoma) como adaptativo (activación Th1, Th17). Cada vez hay más pruebas del papel del mimetismo molecular en la modulación de las respuestas inmunitarias a los agentes infecciosos en la aterosclerosis. Los componentes proteicos de los agentes microbianos “imitan” las proteínas del hospedador y generan una respuesta inmunitaria dirigida contra las proteínas del hospedador que son homólogas a los antígenos de los patógenos. Las proteínas de choque térmico (HSP) también se han implicado en este proceso. Las proteínas de choque térmico son proteínas altamente conservadas en especies de mamíferos y bacterias, y la homología compartida conduce a una reactividad cruzada inmunológica extensa. La expresión aumentada de las HSP se produce en la superficie celular en momentos de estrés, incluidas infecciones e inflamaciones. Las placas ateroscleróticas humanas expresan una variedad de citoquinas inflamatorias, la mayoría de las cuales pueden aumentar la expresión de HSP. Por lo tanto, los anticuerpos contra la HSP bacteriana pueden inducir y exacerbar el medio inflamatorio establecido, promoviendo así la progresión y la inestabilidad de la placa. Las concentraciones plasmáticas de anticuerpos anti-HSP60 se han correlacionado con la carga de aterosclerosis y la aparición de síndromes coronarios agudos. Así, diversas infecciones crónicas han sido implicadas en la aterosclerosis, tanto por asociación epidemiológica como fisiopatológica. Por lo tanto, los efectos locales y sistémicos de las infecciones imitan y contribuyen en varios pasos del proceso aterosclerótico. Sin embargo, a pesar de la correlación fisiopatológica y el vínculo potencial entre la infección y la enfermedad aterosclerótica, se necesita más investigación para determinar el papel exacto de las infecciones microbianas en la aterosclerosis (77).

Por otra parte, se ha descrito el posible papel de los TLR en el desarrollo de la aterosclerosis. Las células vasculares residentes expresan múltiples TLR en el inicio y la progresión del aterosclerosis, lo que sugiere que estos receptores y sus ligandos son actores clave en la aterosclerosis. Muchos experimentos han demostrado que los TLR están involucrados en vías de señales que afectan la progresión de la aterosclerosis después de una infección microbiana, sugiriendo que la activación de TLR2 y TLR4 puede proporcionar un nuevo mecanismo para la aterosclerosis relacionada con infecciones.

El papel de los TLR en la aterosclerosis ha llevado a los investigadores a explorar el potencial terapéutico de los TLR en la aterosclerosis y enfermedades relacionadas. Durante las últimas décadas, se han realizado nuevos intentos para identificar agonistas y antagonistas específicos de los TLR. Los modelos animales de aterosclerosis sugieren que la inhibición de las señales dependientes de TLR o la limitación de la exposición arterial a PAMPS pueden proporcionar una terapia para el tratamiento o la prevención de la aterosclerosis (Revisado en 77). Las estatinas, como los fármacos más recetados para la hipercolesterolemia, al parecer tiene efectos pleiotrópicos, incluida la atenuación de la inflamación crónica de bajo grado y la modulación de la actividad de TLR. Las estatinas al inhibir la expresión de TLR4 y regular la vía de señalización de TLR4/Myd88/NF- κ B pueden retrasar la progresión de la aterosclerosis y otras enfermedades inflamatorias (109). Se ha descrito que los fármacos que inhiben de forma competitiva la unión del LPS bacteriano intestinal a los complejos TLR4/MD2, como el lípido IVa (compuesto 406) y Eritoran, inhiben eficazmente la señalización de TLR4 in vitro e in vivo. Dado que los PAMP de la flora intestinal contribuyen a la tensión inflamatoria sistémica, también se está intentando un tratamiento para modificar la flora intestinal. Se ha demostrado que la inulina prebiótica reduce la concentración de LPS en el lumen y reduce la aterosclerosis en ratones ApoE^{-/-} en aproximadamente un 35 % (110). Por tanto, no debe excluirse la posibilidad de regular la aterosclerosis mediante la regulación de la flora intestinal. En un estudio reciente, el antagonista de TLR4, el

lipopolisacárido *Rhodobacter globosa* (RS-LPS), redujo la formación de lesiones en ratones diabéticos ApoE^{-/-}. Un nuevo inhibidor peptídico, Viper, inhibe la transducción de señales dependiente de TLR4 al bloquear las interacciones de los dominios TIR-TIR. Además, el bloqueo de la vía de señalización de TLR2 puede reducir la vía que promueve la inflamación en la aterosclerosis humana. Opn301, un anticuerpo contra TLR2, puede bloquear la señalización de citoquinas proinflamatorias inducida por TLR2, mejora la función cardíaca y reduce el tamaño del infarto en ratones con lesión por isquemia/reperfusión (I/R) (Revisado en 77). Dado que los TLR juegan un papel esencial en la defensa del hospedero contra los patógenos, y el bloqueo de las señales de TLR puede aumentar el riesgo de infección en los pacientes, es necesario evaluar una relación riesgo/beneficio adecuado. Otra forma de evitar los TLR y sus mediadores de señales es dirigirse selectivamente a los patrones moleculares relacionados con la aterosclerosis identificados por los TLR, eliminando el riesgo de defensa del hospedero (77).

Correlación de los polimorfismos de los genes TLR2 y TLR4 con la presencia de factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria

Al establecer las correlaciones no se observaron correlaciones entre los polimorfismos rs5743708 (Arg753Gln) y rs5743704 (Pro631His) del gen TLR2 y el polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen TLR4 con los factores de riesgos asociados a cardiopatía isquémica y severidad de enfermedad arterial coronaria. Esto sugiere que posiblemente la asociación del polimorfismo rs4986791 (Thr299Ile) del gen TLR4 es independiente de factores de riesgo cardiovascular "clásicos", como dislipidemia, hipertensión, diabetes u obesidad, lo que pudiese explicar el desarrollo de infarto agudo de miocardio temprana (≤ 55 años).

Sin embargo, se confirmaron correlaciones positivas ya descritas en la literatura, que se describen a continuación:

La clasificación Killip-Kimball con el tipo de SCA y severidad de la enfermedad arterial

La clasificación o índice de gravedad de la insuficiencia cardíaca en pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) fue propuesta por Killip y Kimball con el objetivo de evaluar el riesgo de muerte intrahospitalaria y el beneficio potencial del manejo específico de la atención brindada en Unidades de Cuidados Coronarios (UCC) durante la década del 60. Aunque se describió originalmente en la era anterior a la reperfusión, el uso de esta clasificación en el infarto de miocardio con elevación del segmento ST se siguió estudiando en la era posterior a la reperfusión. Por el contrario, el valor pronóstico de esta clasificación en el infarto de miocardio sin elevación del segmento ST (NSTEMI) no está bien establecido, principalmente porque aún no ha sido validado en pacientes que no fueron seleccionados de bases de datos de ensayos clínicos aleatorizados y considerando la escasez de datos de seguimiento tardío tras IAM (Revisado en 111). Sin embargo, en una cohorte brasileña de pacientes hospitalizados con IAM y con seguimiento clínico a largo plazo pos-IAM, mostró que la presencia y gravedad de la falla cardíaca al ingreso mediante la clasificación de Killip-Kimball es un factor pronóstico independiente de mortalidad, con un impacto similar y significativo en pacientes con SCASEST y SCACEST. Los pacientes Killip clase I poseen un excelente pronóstico, tanto a corto como a largo plazo, mientras que aquellos en la clase III o IV tienen mayores áreas de necrosis, remodelación ventricular izquierda y disfunción sistólica, y probablemente una mayor medida de EAC. Por lo tanto, pacientes con SCACEST con severidad cardíaca severa sobreviven a la etapa inicial, posiblemente por la reperfusión de la arteria relacionada con IAM, además, pueden haber tenido un menor riesgo de nuevos eventos debido a EAC, en su mayoría unilateral, o edades más jóvenes. Por otro lado, los pacientes con SCASEST con EAC más extensa, probablemente no tan jóvenes y que sobreviven a la etapa inicial pueden ser más susceptibles a nuevos eventos trombóticos recurrentes, incluidos IAM y miocardiopatía isquémica, explicando el mayor riesgo de muerte en este grupo (111).

Tipo de SCA y localización del infarto (cara)

La principal alteración del electrocardiograma durante una oclusión coronaria es la elevación del segmento ST en más de dos derivaciones contiguas. Esta elevación del ST se observará en las derivaciones más cercanas a la región del miocardio afectado, lo que permite clasificar el SCACEST según su localización.

La elevación del segmento ST se observa:

- Si el infarto es del tabique interventricular (infarto septal).
- Si el infarto es de la cara anterior del ventrículo izquierdo (infarto anterior).
- Si el infarto es de la cara lateral del ventrículo izquierdo (infarto lateral).
- Si el infarto es de la cara inferior del ventrículo izquierdo (infarto inferior).

Por otra parte, dependiendo de cual derivación presente elevación del ST se puede determinar la arteria coronaria que está ocluida. Generalmente, la correlación entre las paredes del corazón y las arterias coronarias es la siguiente:

- Cara anterior: irrigada por la descendente anterior (DA) en toda su extensión.
- Cara septal: irrigada por las ramas septales de la arteria descendente anterior.
- Cara lateral: está irrigada por dos grupos de arterias, las arterias diagonales provenientes de la DA y las obtusas marginales provenientes de la arteria circunfleja.
- Cara inferior: irrigada por la descendente posterior, rama de la coronaria derecha en el 80 % de las personas o de la circunfleja en el 20 % (114).

Con respecto a las correlaciones negativas, se observaron correlaciones muy bajas, indicando una baja relación entre las variables. Estas correlaciones son las siguientes:

Hipertensión arterial con el tipo de evento coronario y con la localización del mismo.

Múltiples estudios observacionales han demostrado una relación continua y gradual entre la presión arterial y el riesgo de enfermedad coronaria. En un metaanálisis de nueve estudios que incluía a más de 400 000 individuos describió una relación lineal entre los valores de presión arterial, tanto sistólica como diastólica y la incidencia de cardiopatía isquémica. En efecto, el 60 % de los pacientes que padecen infarto agudo de miocardio transmural son hipertensos. La incidencia de infarto subclínico según el estudio de Framingham es del 35 % en la población hipertensa, mientras que en la normotensa es sólo del 18 %. Una vez establecida la enfermedad coronaria, la HTA tiene una influencia adversa en el pronóstico de aquélla, agrava las manifestaciones clínicas del paciente anginoso y constituye un factor de mal pronóstico en el paciente con infarto agudo de miocardio. Si, además, existe hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI), el pronóstico es aún peor (115). En un estudio reciente, se revisó los datos año 2018 de un registro nacional de SCA con elevación del segmento ST, que incluyó 3 800 pacientes. Entre esos 3 800 pacientes analizados, 2 708 (70,9 %) tenían diagnóstico de hipertensión antes de STEMI. Los pacientes hipertensos con SCACEST tenían afectación coronaria extensa (31,6 vs. 11,6 %, $p < 0,005$ enfermedad multivaso). Sin embargo, el cuadro clínico al ingreso en la cohorte de hipertensos fue menos grave, con menor insuficiencia cardíaca aguda y menor tasa de mortalidad, evolucionando mejor probablemente debido al tratamiento antihipertensivo previo (116).

Los resultados obtenidos muestran que los factores de riesgo cardiovascular, así como la variabilidad genética juega un papel importante en el desarrollo de la cardiopatía isquémica. En la última década, los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) han identificado con éxito cientos de loci genéticos, que están sólidamente asociados con EAC o rasgos relacionados con la misma, como concentraciones de lípidos en sangre, presión arterial, diabetes tipo 2 e índice de masa corporal (117).

La necesidad clave de la salud pública es identificar a las personas con alto riesgo de desarrollar una determinada enfermedad para permitir una mejor detección o aplicar terapias preventivas. Debido a que la mayoría de las enfermedades comunes tienen un componente genético, un enfoque importante es estratificar a los individuos según la variación del ADN heredado. Aunque la mayor parte del riesgo de desarrollar una enfermedad es de naturaleza poligénica, aún no ha sido posible utilizar predictores poligénicos para identificar individuos con un riesgo comparable al de las mutaciones monogénicas (118). Sin embargo, se han establecido puntajes de riesgo poligénico (PRP), que representan un método para agregar la información genética de un individuo, ponderada por asociaciones entre variantes genéticas y enfermedades, a partir de estudios de asociación de genoma completo (GWAS), en puntajes simplificados que pueden usarse para la predicción de riesgos relativos de una enfermedad (119). Los pesos de cada variante genética, generalmente, se asignan de acuerdo con la fuerza de su asociación con el riesgo de enfermedad (estimación del efecto).

Recientemente, se han desarrollado y validado puntajes poligénicos de todo el genoma para cinco enfermedades comunes. Este enfoque identificó al 8,0 %, 6,1 %, 3,5 %, 3,2 % y 1,5 % de la población con un riesgo tres veces mayor de desarrollar enfermedad arterial coronaria (EAC), fibrilación auricular, diabetes tipo 2, enfermedad inflamatoria intestinal y cáncer de mama, respectivamente. Para EAC, esta prevalencia es 20 veces mayor que la frecuencia de portadores de mutaciones monogénicas raras que confieren un riesgo comparable (118).

Por lo tanto, las puntuaciones poligénicas proporcionan una métrica cuantitativa del riesgo heredado de un individuo en función del impacto acumulativo de muchos polimorfismos comunes. Si bien es cierto que la trayectoria de la enfermedad arterial coronaria está significativamente influenciada por factores de riesgo modificables, como hipertensión arterial, hipercolesterolemia, tabaquismo, etc. Estos puntajes de riesgo pudieran ser de valor en la evaluación del riesgo de enfermedad aterosclerótica en los pacientes jóvenes a objeto de

ayudar a los clínicos a iniciar tratamientos e intervenciones tempranas para reducir el riesgo de enfermedad coronaria, así como motivar a los pacientes a implementar cambios en el estilo de vida tempranamente. Sin embargo, estos puntajes de riesgo poligénico hasta ahora no se utilizan en forma rutinaria, pero sin lugar a dudas son el futuro de la medicina de prevención.

Basados en el PRP, aquellos individuos a los cuales se les informa un puntaje de riesgo poligénico de alto riesgo relativo, obtienen tres grandes beneficios:

- 1) La detección del riesgo potencial de la enfermedad.
- 2) Intervención terapéutica de la enfermedad.
- 3) Planificación de los hábitos para prevenir la enfermedad.

Por ejemplo, en el caso de la enfermedad de las arterias coronarias, las personas con un alto riesgo genético tienen la capacidad de compensar gran parte de este riesgo manteniendo hábitos óptimos de estilo de vida, lo que reduce su riesgo general de enfermedad a casi la mitad.

Finalmente, la identificación de loci involucrados en la susceptibilidad, progresión como en la resolución de la enfermedad cardiovascular, sugiere una nueva línea de enfoques terapéuticos potenciales basados en la manipulación de las moléculas codificados por los mismos. Las modernas plataformas in silico, como las herramientas de predicción de genes candidatos, permiten un análisis sistemático de los datos de GWAS para identificar genes candidatos para enfermedades complejas, como la EAC. La integración posterior, de los datos de dianas de fármacos con los genes candidatos predichos, puede potencialmente identificar terapias novedosas adecuadas o que los fármacos disponibles pueden potencialmente reposicionarse como terapias novedosas para el tratamiento de la EAC. El reposicionamiento de medicamentos puede ahorrar dinero y tiempo en estudios preclínicos y estudios clínicos de fase I (120).

CONCLUSIONES

- En los individuos que sufrieron infarto agudo de miocardio temprano, los principales factores de riesgo cardiovascular son: el sexo (masculino), la hipertensión, el sedentarismo y el tabaquismo.
- Los pacientes con genotipos que poseen por los menos un alelo mutado (C/T + T/T) del polimorfismo TLR4 rs4986791 (Thr399Ile) son más propensos a sufrir IAM.
- El análisis de correlación sugiere que la asociación del polimorfismo rs4986791 (Thr399Ile) del gen TLR4 es independiente de factores de riesgo cardiovascular "clásicos", como dislipidemia, hipertensión, diabetes u obesidad, explicando el desarrollo de infarto agudo de miocardio temprano (≤ 55 años).
- Los factores de riesgo cardiovascular y la variabilidad genética juegan un papel importante en el desarrollo de la cardiopatía isquémica.

Fortalezas del estudio

- Desde el punto de vista metodológico del estudio se pudieron realizar todos los experimentos en genética molecular humana pertinentes para llegar a los resultados descritos en el trabajo.
- Si bien es cierto que la muestra se considera pequeña, esta es sumamente valiosa ya que existen pocos trabajos en la literatura que incluyan pacientes con infarto agudo de miocardio, menores de 55 años y con el estudio de coronariografía selectiva realizado, esto no es común verlo en la literatura.
- Cabe destacar que este estudio sigue, como línea de investigación del autor y su Tutor la Dra. Mercedes Fernandez, en los centros y unidades coronarias de nuestros hospitales (Miguel Pérez Carreño y próximamente Hospital Clínico Universitario de Caracas) a objeto de ampliar la corte de pacientes y validar nuestros resultados.

Limitaciones del estudio

- El presente estudio está restringido debido a la investigación de dos SNP de cada gen estudiado. Un análisis basado en haplotipos

puede revelar mejor la base genética de la cardiopatía isquémica en la población de Venezuela. Por otro lado, es un estudio de una población local; sin embargo, la población de Venezuela se compone de varios grupos étnicos (europeos, africanos y amerindios). Así, los hallazgos del estudio podrían explicarse por la mezcla étnica existente en la población venezolana, la cual es altamente mestiza debido a las continuas migraciones de población de otros continentes y dentro del continente.

REFERENCIAS

1. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019. *J Am Cardiol.* 2020;76(25):1-40.
2. Núñez Medina T. Myocardial infarction in Venezuela: S.O.S. The impact of the pandemic of ischemic heart disease in Venezuela. Estimates of the burden of cardiovascular disease by 2015. *Avances Cardiol.* 2016;36(4):191-194.
3. Ordunez P, Prieto-Lara E, Pinheiro Gawryszewski V, Hennis AJM, Cooper RS. Premature Mortality from Cardiovascular Disease in the Americas – Will the Goal of a Decline of “25 % by 2025” be Met? *PLoS ONE.* 2015;10(10): e0141685.
4. Çakmak HA, Bayoğlu B, Durmaz E, Can G, Karadağ B, Cengiz M, et al. Evaluation of association between common genetic variants on chromosome 9p21 and coronary artery disease in Turkish population. *Anatol J Cardiol.* 2015;15:196-203.
5. Roberts R, Stewart AF. 9p21 and the Genetic Revolution for Coronary Artery Disease. *Clin Chem.* 2012;58(1):1104-112.
6. Informe sobre la situación mundial de las enfermedades transmisibles 2014. Organización Mundial de la Salud" <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/FS/317/ES>
7. Dirección general de Epidemiología, Dirección de información y estadística de salud. Anuario de Mortalidad del Ministerio del Poder Popular para

- la Salud año 2010. Caracas. República Bolivariana de Venezuela. MINSASUD. <http://www.mppps.gob.ve>
8. White PD. The genes, the heart and destiny. *N Engl J Med.* 1957;256:265-269.
 9. Yu L, Feng Z. The Role of Toll-Like Receptor Signaling in the Progression of Heart Failure. *Mediators of Inflammation.* 2018:1-11.
 10. Russell LB, Gold MR, Siegel JE, Daniels SM; Weinstein MC. The role of cost-effectiveness analysis in health and medicine. Panel on Cost – Effectiveness in Health and Medicine. *JAMA.* 1996;276(14):1172-1177.
 11. Weinstein MC, Siegel JE, Gold MR, Kamlet MS, Russell LB. Recommendations of the Panel on Cost-effectiveness in Health and Medicine. *JAMA.* 1996;16:276(15):1253-1258.
 12. Siegel JE, Weinstein MC, Russell LB, Gold MR. Recommendations for repating cost effectiveness analysis. Panel on Cost-Effectiveness in Health and Medicine. *JAMA.* 1996;23-10:276(16):1339-1341.
 13. Mc Grath PD, Weinberg DE, Dickens JD, Siewers AE, Lucas FL, Malenka DJ. Relation between operator and hospital volume and outcomes following percutaneous coronary interventions in the era of the coronary stent. *JAMA.* 2000;284(24):3139-3149.
 14. Tu JV, Austin PC, Chan BT. Relationship between annual volume of patients treated by admitting physician and mortality after acute myocardial infarction. *JAMA.* 2001;285(24):3116-3122.
 15. Murray, Christopher J. L, Lopez, Alan D, World Health Organization, World Bank & Harvard School of Public Health (1996). *The Global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020: summary / edited by Christopher J. L. Murray, Alan D. Lopez.* World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/41864>.
 16. OPS. *Las enfermedades cardiovasculares en las Américas: Hoja informativa.* 2009.
 17. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al; on behalf of the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics

- Subcommittee. Heart disease and stroke statistics—2021 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*; 2021.
18. Morton J. Coronary blood flow and myocardial ischemia. *Braunwalds Heart Disease A Test book of Cardiovascular Medicine*. 2004;44:1103-1110.
 19. Pramparo P, Boissonnet C, Schargrotsky H. Evaluación del riesgo cardiovascular en siete ciudades de Latinoamérica: las principales conclusiones del estudio CARMELA y de los subestudios. *Rev Arg Cardiol*. 2011;79(4):377-382.
 20. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, et al. Heart disease and stroke statistics—2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*. 2019;139(10): e56–528.
 21. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326(4):242-250.
 22. Ridker PM, Libby P, Factores de riesgo de la enfermedad aterotrombótica. *Tratado de Cardiología*. Braunwald. 8ª edición. 2009;1(39):1003-1026.
 23. Mahmood SS, Levy D, Vason RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the epidemiology of cardiovascular disease: A historical perspective. *Lancet* 2014; 383 (9021): 999-1008.
 24. Khot UN, Khot MB, Bajzer CT, Sapp SK, Ohman EM, Ohman EM. Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease. *JAMA* 2003;290(7):898-904.
 25. Hackan DG, Anand SS. Emerging risk factors for the atherosclerotic vascular disease: A critical review of the evidence. *JAMA*. 2003;290(7):932-940.
 26. Hansson GK, Mechanisms of disease: Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-1695.
 27. Mann DL. Innate immunity and the failing heart: The cytokine hypothesis revisited. *Circulation Res*. 2015;116(7):1254-1268.
 28. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453-460.

29. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010;11(5):373-384.
30. Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol.* 2014.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>
31. Gay N, Gangloff M, Weber A. Toll-like receptors as molecular switches. *Nature Rev Immunol.* 2006;6(9):693-698.
32. Dominguez A, Zentellez A, Velasquez J. Contropapel molecular de las inflamaciones: Regulación de los receptores tipo Toll. *REB.* 2009;28(4):160-131.
33. Kawai T, Akira S, Toll-like receptor and the crosstalk with other innate receptor. *Infection and immunity.* 2011;34(5):637-6502.
34. Topkara VK, Evans S, Zhang W et al., Therapeutic targeting of innate immunity in the failing heart. *J Molec Cell Cardiol.* 2011;51(4):594-599.
35. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human toll-like receptors and related genes. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:886-892.
36. Ma Y, Zhang X, Bao H et al. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 differentially regulate doxorubicin induced cardiomyopathy in mice. *PLoS One.* 2012;7(10), article e40763.
37. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5197-5203.
38. Yndestad A, Damas JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Current Cardiol Reports.* 2007;9(3):236-241.
39. Shishido T, Nozaki N, Yamaguchi S et al. Toll-like receptor-2 modulates ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation.* 2003;108(23):2905-2910.
40. Orland T, Espevik T, Kjekswos J. Mannose binding lectin and soluble toll-like receptor 2 in heart failure following acute myocardial infarction. *J Card Fail.* 2006;12:659-663.

41. Horseman MA, Surani S, Bowman JD. Endotoxin, toll-like receptor-4, and atherosclerotic heart disease. *Current Cardiol Rev.* 2017;13(2):86-93.
42. Lin L, Kim SC, Wang Y, et al. HSP60 in heart failure: Abnormal distribution and role in cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol. Heart Circul Physiol.* 2007;293(4):H2238–H2247.
43. Volz H, Laohachewin D, Schellberg D, et al. HMGB1 is an independent predictor of death and heart transplantation in heart failure. *Clin Res Cardiol.* 2012;101(6):427-435.
44. Maqboo A, Spary EJ, Manfield IW, et al. Tenascin C upregulates interleukin-6 expression in human cardiac myofibroblasts via toll-like receptor 4. *World J Cardiol.* 2016;8(5):340-350.
45. Yndestad A, Damas JK, Oie E, Ueland T, Gullestad L, Aukrust P. Role of inflammation in the progression of heart failure. *Current Cardiol Reports.* 2007;9(3):236-241.
46. Satoh M, Shimoda Y, Maesawa C, et al. Activated toll-like receptor 4 in monocytes is associated with heart failure after acute myocardial infarction. *Intern J Cardiol.* 2006;109(2):226-234.
47. Birks EJ, Felkin LE, Banner NR, Khaghani A, Barton PJ, Yacoub MH. Increased toll-like receptor 4 in the myocardium of patients requiring left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23(2):228-235.
48. Oyama J, Blais Jr C, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation.* 2004;109(6):784-789.
49. Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, et al. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(7):665-672.
50. Gao W, Xiong Y, Li Q, Yang H. Inhibition of toll-like receptor signaling as a promising therapy for inflammatory diseases: A journey from molecular to nano therapeutics. *Front Physiol.* 2017;8:508.
51. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, et al. Bacterial endotoxin: Molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994;8:217-225.

52. Checa MA. Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 2007;20:213-221.
53. Guven M, Ismailoglu Z, Batar B, Unal S, Onaran I, Karadag B, et al. The effect of genetic polymorphisms of TLR2 and TLR4 in Turkish patients with coronary artery disease. *Gene.* 2014;558 (1):99-102.
54. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban. Association of Toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms with risk of coronary atherosclerotic artery disease in Hunan Han population. 2017;42(3):246-250.
55. Kutikhin AG, Ponasenkov AV, Khutornaya MV, Yuzhalin AE, et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with atherosclerosis severity in a Russian population. *Meta Gene.* 2016;9:76-89.
56. Liu F, Lu W, Qian Q, Qi W, Hu J, Feng B. Frequency of TLR 2, 4, and 9 gene polymorphisms in Chinese population and their susceptibility to type 2 diabetes and coronary artery disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:373945.
57. Balistreri CR, Candore G, Mirabile M, Lio D, Caimi G, Incalcaterra E, et al. TLR2 and age-related diseases: potential effects of Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms in acute myocardial infarction. *Rejuvenation Res.* 2008;11(2):293-296.
58. Džumhur A, Zibar L, Wagner J, Simundić T, Dembić Z, Barbić J. Association studies of gene polymorphisms in toll-like receptors 2 and 4 in Croatian patients with acute myocardial infarction. *Scand J Immunol.* 2012;75(5):517-523.
59. Yin YW, Sun QQ, Hu AM, Liu HL, Wang Q, Zhang BB. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in myocardial infarction: A meta-analysis of 15,148 subjects. *Hum Immunol.* 2014;75(2):163-169.
60. Zee RY, Hegener HH, Gould J, Ridker PM. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke.* 2005;36(1):154-157.
61. Holloway JW, Yang IA, Ye S Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet Genomics.* 2005;15(1):15-21.

62. Kolek MJ, Carlquist JF, Muhlestein JB, Whiting BM, Horne BD, Bair TL, et al. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Am Heart J.* 2004;148(6):1034-1040.
63. Koch W, Hoppmann P, Pfeufer A, Schömig A, Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: No association in a Caucasian population. *Eur Heart J.* 2006;27(21):2524-2529.
64. Hernesniemi J, Lehtimäki T, Rontu R, Islam MS, Eklund C, Mikkelsen J, et al. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scand J Clin Lab Invest.* 2006;66(8):667-675.
65. Chen R, Gu N, Gao Y, Cen W. TLR4 Asp299Gly (rs4986790) polymorphism and coronary artery disease: A meta-analysis. *PeerJ.* 2015;3: e1412.
66. Schneider S, Koch W, Hoppmann P, Ubrich R, Kemmner S, Steinlechner E, et al. Association of Toll-like receptor 4 polymorphism with age-dependent systolic blood pressure increase in patients with coronary artery disease. *Immun Ageing.* 2015;12:4.
67. Martinez-Rios MA, et al. Association of toll-like receptor 2 and 4 gene polymorphisms with risk of coronary atherosclerotic artery disease in human Han population. *Cardiol Mex.* 2013;83(4).
68. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, et al. Consenso ESC 2018 sobre la cuarta definición universal del infarto de miocardio. *Rev Esp Cardiol.* 2019;72(1):72. e1-e27.
69. Weintraub WS, Karlsberg RP, Tchong JE, Boris JR, Buxton AE, Dove JT, et al. ACCF/AHA 2011 key data elements and definitions of a base cardiovascular vocabulary for electronic health records: A report of the American College of Cardiology Foundation/AHA Task Force on Clinical Data Standards. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(2):202-222.
70. Bunce M. PCR-SSP typing in histocompatibility testing. Bidwell and Navarrette C. London: Imperial Collage Press; 2000.p.149-186.
71. Shyamala V, Ames GFL. Single specific primer-polymerase chain reaction (SSP-PCR) and genome walking. *Methods in Molecular Biology. PCR Protocols.* Totowa NJ: Humana Press Inc.; 1993.p.339-348.

72. Smit LA, Bongers SI, Ruven HJ, Rijkers GT, Wouters IM, Heederik D, et al. Atopy and new-onset asthma in young Danish farmers and CD14, TLR2, and TLR4 genetic polymorphisms: A nested case-control study. *Clinical & Experimental Allergy*. 2007;37(11):1602-1608.
73. Tajik N, Nasiri MR, Jafari M, Mousavi T, Farnia P, Salekmoghaddam AR, et al. Association between Toll-like Receptor 4 (TLR4) Genetic Polymorphisms and Susceptibility to Pulmonary Tuberculosis. *Razi J Med Scien (RJMS)*. 2010;16(68):19-26.
74. Solé X, Guino E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: A web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22(15):1928-1929.
75. Nie N, Hull C, Bent D. IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Version 20). Computer Software. Chicago. 2011.
76. Killip T 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol*. 1967;20(4):457-464.
77. Li B, Xia Y, Hu B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways. *Cell Mol Life Sci*. 2020;77(14):2751-2769.
78. Lundberg AM, Hansson G.K. Innate immune signals in atherosclerosis. *Clin Immunol*. 2010;134:5-24.
79. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449: 819-826.
80. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: A possible pathway for plaque activation. *Circulation*. 2002;105(10):1158-1161.
81. Pryshchep O, Ma-Krupa W, Younge BR, Goronzy JJ, Weyand CM. Vessel-specific Toll-like receptor profiles in human medium and large arteries. *Circulation*. 2008;118(12):1276-1284.
82. Methe H, Kim JO, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2005;111(20):2654-2661.

83. Shiraki R, Inoue N, Kobayashi S, Ejiri J, Otsui K, Honjo T, et al. Toll-like receptor 4 expressions on peripheral blood monocytes were enhanced in coronary artery disease even in patients with low C-reactive protein. *Life Sci.* 2006;80(1):59-66.
84. Geng HL, Lu HQ, Zhang LZ, Zhang H, Zhou L, Wang H, et al. Increased expression of Toll like receptor 4 on peripheral blood mononuclear cells in patients with coronary arteriosclerosis disease. *Clin Exp Immunol.* 2006;143(2):269-273.
85. Xu XH, Shah PK, Faure E, Equils O, Thomas L, Fishbein MC, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL. *Circulation.* 2001;104(25):3103-3108.
86. Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med.* 2008;205(6):373-383.
87. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond).* 2008;114(5):347-360.
88. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* 2004;364:937-952.
89. Avezum A, Makdisse M, Spencer F, et al. Impact of age on management and outcome of acute coronary syndrome: Observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Am Heart J.* 2005;149:67-73.
90. Gehrie ER, Reynolds HR, Chen AY, Neelon BH, Roe MT, Gibler WB, et al. Characterization and outcomes of women and men with non-ST-segment elevation myocardial infarction and nonobstructive coronary artery disease: results from the Can Rapid Risk Stratification of Unstable Angina Patients Suppress Adverse Outcomes with Early Implementation of the ACC/AHA Guidelines (CRUSADE) quality improvement initiative. *Am Heart J.* 2009;158:688-694.

91. Bugiardini R, Bairey Merz CN. Angina with "normal" coronary arteries: A changing philosophy. *JAMA*. 2005;293(4):477-484.
92. Crea F, Camici PG, De Caterina A, Lanza GA. Chronic ischaemic heart disease. In: Camm AJ, Lu`scher TF, Serruys P, editors. *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*. New York, NY: Oxford University Press; 2009.p.657-660.
93. Niccoli G, Scalone G, Crea F. Acute myocardial infarction with no obstructive coronary atherosclerosis: Mechanisms and management. *Eur Heart J*. 2015;36:475-481.
94. Poyer M, Fernández-Mestre M, Márquez IL. Caracterización clínica de pacientes con infarto del miocardio sin obstrucción coronaria aterosclerótica significativa (IMSOCAS) del Hospital General del Este "Dr. Domingo Luciani" 2012-2015. *Avances Cardiol*. 2017;37(4):202-207.
95. Marín F, Ospina LF. Infarto agudo del miocardio en adultos jóvenes menores de 45 años. *Rev Colomb Cardiol*. 2004;11(4):93-204.
96. Astesiano A, Renna NF, Torres MJ, García RD, Grucci M, et al. Infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST: Prevalencia de arteria según el sexo; Publicaciones Latinoamericanas S.R.L; Conarec. 2018;33(147):314-316.
97. Sánchez Torres N, Pérez del Todo JM, Del Pino Sánchez E, Martínez García G, Suárez Rivero A, Guevara Mirabal G. Caracterización por sexo de los pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST sometidos a intervencionismo coronario. *Rev Cuba Cardiol Cir Cardiovasc* 2011;17(3):225-233.
98. Fernández-Ortiz A. Qué es el infarto agudo de miocardio. Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA. 2009:259-268.
99. Hurtado J, Pinar Bermúdez JE, Redondo B, Lacunza Ruiz J, Gimeno Blanes JR, García de Lara J, et al. Intervencionismo percutáneo urgente sobre el tronco coronario izquierdo no protegido. Factores predictores de mortalidad y análisis del shock cardiogénico *Rev Esp Cardiol*. 2009;62(10):1118-1124.

100. Kosaraju A, Goyal A, Grigorova Y, Makaryus AN. Left Ventricular Ejection Fraction. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
101. Figueroa L, Xiong Y, Song C, Piao W, Vogel SN, Medvedev AE. The Asp299Gly Polymorphism Alters TLR4 Signaling by Interfering with Recruitment of MyD88 and TIR domaincontaining adapter inducing IFN- β 1. *J Immunol.* 2012;188(9):4506-4515.
102. Balistreri CR, Caruso C, Lstì F, Colonna-Romano G, Lio D, Candore G. LPS-mediated production of pro/anti-inflammatory cytokines and eicosanoids in whole blood samples: Biological effects of +896A/G TLR4 polymorphism in a Sicilian population of healthy subjects. *Mechan Ageing Develop.* 2011;132(3):86-92.
103. von Aulock S, Schröder NW, Gueinzus K, Traub S, Hoffmann S, Graf K, et al. Heterozygous toll-like receptor 4 polymorphism does not influence lipopolysaccharide-induced cytokine release in human whole blood. *J Infect Dis.* 2003;188(6):938-943.
104. Heesen M, Bloemeke B, Kunz D. The cytokine synthesis by heterozygous carriers of the Toll-like receptor 4 Asp299Gly polymorphism does not differ from that of wild type homozygotes. *Eur Cytokine Network.* 2003;14(4):234-237.
105. Tulic MK, Hurrelbrink RJ, Prêle CM, Laing IA, Upham JW, Le Souef P, et al. TLR4 Polymorphisms Mediate Impaired Responses to Respiratory Syncytial Virus and Lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2007;179(1):132-140.
106. Ferwerda B, McCall MBB, Alonso S, Giamarellos-Bourboulise EJ, Mouktaroudi M, Izagirre N, et al. TLR4 polymorphisms, infectious diseases, and evolutionary pressure during migration of modern humans. *PNAS.* 2007;104(42):16645-16650.
107. Sánchez G, Salazar-Alcalá E, Hernández F, Deglesne PA, Bello ZD, de Noya BA, et al. Polymorphisms of the TLR4 gene: Risk factor for chronicity and severity in oral vectorial Chagas disease. *Exp Parasitol.* 2022;9:108243.

108. Qing Zhang, Lu Wang, Shigi Wang, Hongin Cheng, Lin Xu, Gaiqin Pei. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction. *Nature*. 2022;7:78
109. Bahrami A, Parsamanesh N, Atkin SL, Banach M, Sahebkar A Effect of statins on toll-like receptors: A new insight to pleiotropic effects. *Pharmacol Res*. 2018;135:230-238.
110. Rault-Nania MH, et al. Inulin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Nutr*. 2006;96(5):840-844.
111. Gallindo de Mello BH, Oliveira GBF, Ramos RF, Lopes BBC, Barros CBS, de Oliveira Carvalho E, Teixeira FBP, et al. Validation of the Killip-Kimball Classification and Late Mortality after Acute Myocardial Infarction. *Arq Bras Cardiol*. 2014;103(2):107-117.
112. Steen H, Giannitsis E, Futterer S, Merten C, Juenger C, Katus HA. Cardiac troponin T at 96 hours after acute myocardial infarction correlates with infarct size and cardiac function. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(11):2192-2194.
113. Samman Tahhan A, Sandesara P, Hayek SS, Hammadah M, Alkhoder A, Kelli HM, et al. High-Sensitivity Troponin I Levels and Coronary Artery Disease Severity, Progression, and Long-Term Outcomes. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(5): e007914.
114. Bayés de Luna A, Fiol-Sala M. *La Electrocardiografía de la Cardiopatía Isquémica*. Barcelona: Publicaciones Permanyer; 2012.
115. Sobrino Martínez J, Doménech Fericarot M, Coca Payeras A. El paciente hipertenso con cardiopatía isquémica. *Med Integ* 2000;36(4):146-151.
116. Vintila VD, Vintila A, Juravle Lungeanu L, Stuparu C, Vinerteanu D. Does Hypertension Associated to ST Elevation Myocardial Infarction Population Modify the Expected Evolution? *J Hypert*. 2019;37: e115.
117. Buniello A, MacArthur JAL, Cerezo M, Harris LW, Hayhurst J, Malangone C, et al. The NHGRI-EBI GWAS Catalog of published genome-wide association studies, targeted arrays and summary statistics 2019. *Nucleic Acid Res*. 2019;47: D1005–D1012

118. Khera AV, Chaffin M, Aragam KG, Haas ME, Roselli C, Choi SH. Genome-wide polygenic scores for common diseases identify individuals with risk equivalent to monogenic mutations. *Nat Genet.* 2018;50(9):1219-1224.
119. Levin MG, Rader DJ. Polygenic Risk Scores and Coronary Artery Disease: Ready for Prime Time? *Circulation.* 2020;141(8):637-640.
120. Grover MP, Ballouz S, Mohanasundaram KA, George RA, Goscinski A, Crowley TM, et al. Novel therapeutics for coronary artery disease from genome-wide association study data. *BMC Med Genomics.* 2015;(Suppl 2):S1.
121. Huan L, Zhilin W. Loss of toll-like receptor 4 ameliorates cardiovascular dysfunction in aged mice. *Immun Ageing.* 2021;5(1):18-42.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

CONSENTIMIENTO PREVIA INFORMACIÓN

Título del Estudio: POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASOCIADOS A ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Objetivos de la investigación:

Usted está invitado a participar, donando una muestra de su sangre, en un estudio donde mediante análisis genéticos y bioquímicos se detectará la presencia de alteraciones que pudieran estar afectando la coagulación de su sangre y en consecuencia promover la formación de coágulos o trombos en arterias y/o venas ocasionando las enfermedades conocidas como trombosis arterial y venosa, respectivamente.

Procedimientos

El estudio tendrá una duración de tres años. Si usted acepta participar necesitaremos:

1. De una muestra de sangre (5 mL).
2. Que le suministre al médico tratante la información requerida para rellenar la historia médica.
3. Que podamos contactarlo en caso de requerir una segunda muestra o datos adicionales que complementen dicho estudio.

Con su muestra de sangre se procederá única y exclusivamente al análisis genético y bioquímico que permitan determinar si usted posee algunas de las alteraciones genéticas conocidas que causan las enfermedades antes mencionadas. Los análisis genéticos serán realizados mediante técnicas de biología molecular que permitan identificar las alteraciones en aquellos genes relacionados con la coagulación y los bioquímicos mediante ensayos que permitan determinar la funcionalidad y niveles de las diferentes proteínas involucradas en dicho proceso.

Las muestras serán almacenadas en Laboratorio de Fisiopatología, Centro de Medicina Experimental, IVIC, bajo la responsabilidad de la Dra. Susana Blanco y Dra. Mercedes Fernández Mestre.

Importancia y beneficios de su participación

Mediante este estudio, que podrá realizarse gracias a su valiosa colaboración con sólo proporcionar una muestra de su sangre, se podrá avanzar en el entendimiento de las causas de la trombosis arterial o venosa lo cual permitirá la aplicación, por parte del médico responsable, de tratamientos más efectivos para su mejoría. Además, permitirá aplicar los correctivos necesarios para evitar que sufra complicaciones en un futuro. Conjuntamente con los beneficios mencionados anteriormente que podrá proporcionarle a corto plazo este estudio, los resultados obtenidos con su muestra a su vez permitirán obtener datos que serán utilizados para establecer una estadística de las causas de la enfermedad vascular en nuestro país. Los resultados obtenidos una vez finalizado este estudio serán publicados en revistas científicas especializadas.

Riesgos

Su participación no implica riesgo ni inconveniente para su salud ni la de sus familiares.

Confidencialidad

Todos los datos obtenidos de la investigación serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será solo accesible a los investigadores y médicos involucrados en el estudio. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones que se realicen en eventos científicos.

Derecho a negarse a participar

La participación en este estudio es voluntaria. Usted puede negarse a participar en el estudio o interrumpir su participación en cualquier momento. Si usted se niega a participar en el estudio, esto no afectará el tipo de atención que recibirá por parte de su médico.

Preguntas

Debido a que se utilizaron algunos términos técnicos en este formulario de consentimiento, si existe algo que usted no entienda, por favor pregunte sobre esto sin dudarlo.

Por favor tome su decisión de participar en este estudio sólo después de haber examinado detenidamente el contenido de este formulario.

En caso de emergencia o que tenga cualquier pregunta, en cualquier momento sobre el estudio por favor contacte al investigador principal:

Investigadores Principales:

Dra. Susana Blanco.

0412-3331425

Dra. Mercedes Fernández

0212-5041909

Centro de Investigación:

Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño

IVSS

Instituto de Investigaciones Científicas

IVIC