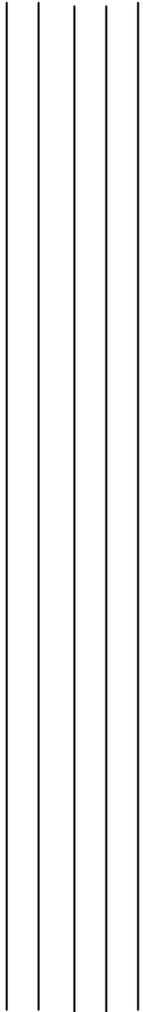




UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO



# Universidad Nacional Autónoma de México

## Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Determinación de polimorfismos en los exones del  
Gen *NPPB* en niños mexicanos con Coartación

**Aórtica**

Tesis que para obtener el título de

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**Juan René García Sánchez**

Dr. Normand García Hernández

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez

Dr. Sergio Vaca Pacheco

M. en C. Irma Elena Dueñas García

M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes

Los Reyes Iztacala, Edo de México 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>III</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>V</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Corazón	1
1.1.1 Morfología y Fisiología	1
1.2 Sistema venoso	1
1.2.1 Sistema de la Arteria Aorta	2
1.3 Insuficiencia cardiaca	3
1.3.1 Clasificación	4
1.3.2 Insuficiencia cardiaca en población pediátrica.	4
1.4 Cardiopatías congénitas	5
1.4.1 Clasificación	6
1.4.2 Incidencia	8
1.5 Coartación de la Aorta	9
1.5.1 Características generales	9
1.5.2 Incidencia	11
1.6 Marcadores Biológicos utilizados en Insuficiencias Cardiacas.	11
1.7 Péptidos Natriuréticos	12
1.7.1 Síntesis y liberación de los Péptidos Natriuréticos.	13
1.7.2 Aspectos fisiológicos de los Péptidos Natriuréticos	14
1.7.3 Acciones de los Péptidos Natriuréticos a nivel renal	16
1.7.4 ANP (A-type Natriuretic Peptide o Atrial Natriuretic Peptide)	16
1.7.5 CNP (C-type o C- Natriuretic Peptide)	18
1.7.6 DNP (D-type o D- Natriuretic Peptide )	18
1.8 BNP (B-type Natriuretic Peptide o Brain Natriuretic Peptide)	19
1.9 Gen <i>NPPB</i>	22
<b>2 Antecedentes</b>	<b>24</b>
<b>3 Justificación</b>	<b>26</b>

<b>4</b>	<b>Hipótesis</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Objetivos</b>	<b>28</b>
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos particulares	28
<b>6</b>	<b>Materiales y métodos</b>	<b>29</b>
6.1	Obtención del Material Biológico	29
6.2	Extracción y prueba de integridad de DNA genómico	29
6.3	Cuantificación de DNA	29
6.4	Diseño de primes	30
6.5	Amplificación del gen <i>NPPB</i>	31
6.6	Secuenciación del Gen <i>NPPB</i> .	32
6.7	Determinación de polimorfismos en la secuencia del gen <i>NPPB</i>	33
<b>7</b>	<b>Resultados:</b>	<b>34</b>
7.1	Obtención del Material Biológico	34
7.2	Extracción de DNA genómico	34
7.3	Cuantificación de DNA	35
7.4	Diseño de cebadores	36
7.5	Amplificación de los exones	37
7.6	Secuenciación del Gen <i>NPPB</i> .	38
7.7	Determinación de polimorfismos en la secuencia del gen <i>NPPB</i> .	40
<b>8</b>	<b>Discusión</b>	<b>45</b>
<b>9</b>	<b>Conclusión</b>	<b>45</b>
<b>10</b>	<b>Referencias</b>	<b>49</b>
<b>11</b>	<b>Anexos</b>	<b>52</b>
11.1	Anexo 1 Protocolo "DNeasy 96	52
11.2	Anexo 2 Condiciones de electroforesis	54
11.3	Anexo 3 Ley de Beer Lambert	55
11.4	Anexo 4 Fundamento de la secuenciación Sanger	56
11.5	Anexo 5 Formato Fasta	57
11.6	Anexo 6 Alineamiento mediante Clustal W	58

## Índice de Figuras

FIGURA 1 ESQUEMA COMPARATIVO ARCO AÓRTICO SANO VS. ARCO AÓRTICO CON COARTACIÓN AÓRTICA.	9
FIGURA 2 DUCTUS ARTERIOSO (DA) ABIERTO, CERRADO Y CON COARTACIÓN AÓRTICA	10
FIGURA 3 FORMAS PRINCIPALES DE COARTACIÓN AÓRTICA.	10
FIGURA 4 ESTRUCTURA DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS.	13
FIGURA 5 ESQUEMA DE LOS RECEPTORES DE LOS PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS	14
FIGURA 6 UBICACIÓN DEL GEN <i>NPPB</i> .	19
FIGURA 7 ESTÍMULO PARA LA LIBERACIÓN DEL BNP.	20
FIGURA 8 INTRONES Y EXONES DEL <i>NPPB</i> .	22
FIGURA 9 DNA GENÓMICO VISTO EN UN GEL DE AGAROSA AL 1.5%	34
FIGURA 10 EJEMPLIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 1 DEL GEN <i>NPPB</i>	37
FIGURA 11 EJEMPLIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 2 DEL GEN <i>NPPB</i>	38
FIGURA 12 EJEMPLIFICACIÓN DE LA AMPLIFICACIÓN DEL EXÓN 3 DEL GEN <i>NPPB</i>	38
FIGURA 13 ELECTROFEROGRAMA RESULTADO DE UNA SECUENCIACIÓN POR EL METODO DE SANGER AUTOMATIZADO	39
FIGURA 14 ALINEAMIENTO EXÓN 1	40
FIGURA 15 ALINEAMIENTO EXÓN 2	41
FIGURA 16 ELECTROFEROGRAMAS DE LOS CAMBIOS EN LA SECUENCIA EXÓN 2	42
FIGURA 17 ELECTROFEROGRAMAS DE LOS CAMBIOS EN LA SECUENCIA EXÓN 2	43
FIGURA 18 ALINEAMIENTO EXÓN 3	44
FIGURA 19 SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA DE DNA POR EL MÉTODO DE SANGER	56

## Índice de Tablas

TABLA 1 CLASIFICACIÓN DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS .....	7
TABLA 2 CROMOSOMOPATÍAS MÁS COMUNES CON AFECTACIÓN CARDIACA. ....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
TABLA 3. VARIACIONES DE NUCLEÓTIDOS REPORTADAS DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>NPPB</i> .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
TABLA 4 CONDICIONES DE LAS REACCIONES DE PCR (MIX) .....	31
TABLA 5 CONDICIONES DE TEMPERATURAS Y CICLAJE DEL TERMOCICLADOR .....	31
TABLA 6 CUANTIFICACIÓN DE DNA. ....	35
TABLA 7 CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES DE LOS TRES EXONES DEL GEN <i>NPPB</i> .....	36

## Resumen

La Coartación Aórtica es una enfermedad cardíaca en la cual la luz aórtica se estrecha, impidiendo el flujo normal de la sangre. El hecho de que el corazón sea capaz de segregar hormonas, permite su implementación para el diagnóstico, tratamiento y monitoreo de algunas cardiopatías; el Sistema de los Péptidos Natriuréticos: Atrial “ANP”, Cerebral “BNP”, Tipo C “CNP”, Tipo D “DNP se activa principalmente por la dilatación ventricular y tiene como consecuencia efectos hemodinámicos y miocárdicos favorables que retardan la progresión a falla cardíaca y contrarresta los efectos de otros sistemas.

El BNP es utilizado para el diagnóstico oportuno de afecciones cardíacas, ésta proteína cuenta con 134 residuos de aminoácidos es transcrito por el gen *NPPB* el cual cuenta con tres exones y tres intrones, teniendo una secuencia codificante de 694 nucleótidos. Hasta el momento se han reportado en múltiples investigaciones 53 variantes en la secuencia codificante de BNP, generando diferentes alteraciones en la proteína resultante (2 codones de paro, 2 desplazamientos del marco de lectura, 38 variantes sin sentido y 11 variantes sinónimas), la mayoría descritas en población europea y en afecciones cardíacas crónicas.

A falta de un estudio que relacione a la población latina, (en específico a la población mexicana) y el *NPPB* con el desarrollo de una enfermedad congénita como lo es la Coartación Aórtica se realizó en el Centro Médico Siglo XXI un estudio en niños mexicanos con Coartación Aórtica analizando la secuencia de gen *NPPB* donde no se encontraron cambios en la secuencia, lo cual indica que el desarrollo de la enfermedad no se puede relacionar con cambios en la secuencia específica del gen *NPPB*.

# 1 Introducción

## 1.1 Corazón

Es una bomba muscular que al generar presión desplaza la sangre oxigenada a los tejidos del organismo, la recupera desoxigenada y la envía a oxigenarse a los pulmones, situado en la parte central del tórax (mediastino), se apoya sobre el músculo diafragma (sobre la parte central fibrosa) en su parte inferior está ligeramente inclinado hacia el lado izquierdo (cerca de un cuarto a la derecha y tres cuartos a la izquierda de la línea medial).

### 1.1.1 Morfología y Fisiología

El corazón se encuentra dividido en mitades derecha e izquierda por una pared de tejido, o tabique, que recorre toda su longitud. Cada mitad se subdivide en dos cámaras; las superiores de ambos lados reciben el nombre de aurículas y las inferiores se llaman ventrículos, éstas a su vez están parcialmente separadas por válvulas que controlan el paso de la sangre, la válvula tricúspide controla el flujo sanguíneo entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho, la válvula pulmonar controla el flujo sanguíneo del ventrículo derecho a las arterias pulmonares, la válvula mitral permite que la sangre rica en oxígeno proveniente de los pulmones pase de la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo, la válvula aórtica permite que la sangre rica en oxígeno pase del ventrículo izquierdo a la Aorta.

## 1.2 Sistema venoso

La función principal del sistema venoso es facilitar el retorno de la sangre contenida en los capilares hacia el corazón. En las venas, la presión y la velocidad sanguínea son menores

que en el sistema arterial y a diferencia de éste las paredes venosas son más delgadas y fácilmente distensibles, por lo que poseen una gran capacidad para almacenar y liberar una importante fracción de sangre hacia la circulación sistémica, por tanto, el segundo papel del sistema venoso es la distribución del volumen sanguíneo y la regulación circulatoria.

Las paredes de las vénulas son ligeramente más gruesas que la de las arterias, contienen músculo liso relativamente escaso y son mucho más finas y distensibles que la de las arterias. En las venas muy largas especialmente en las de las extremidades, las células endoteliales se proyectan a intervalos hacia el interior de la luz del vaso formando las válvulas venosas las cuales juegan un papel decisivo impidiendo el retroceso de sangre.

### 1.2.1 Sistema de la Arteria Aorta

La Aorta emerge de la porción superior del ventrículo izquierdo, se dirige oblicua adelante, arriba y a la derecha, luego es francamente vertical, para dirigirse arqueada y horizontal (cayado o arco aórtico) hacia la izquierda y atrás, conjunta a la cara de la tráquea y el esófago, hasta alcanzar el flanco de la columna vertebral a la altura de la 4° vértebra torácica. A partir de este punto desciende verticalmente en el tórax para situarse delante de las vértebras torácicas inferiores. Atraviesa el diafragma y desciende en el abdomen delante de la columna lumbar; se encuentra en el retroperitoneo. Termina a la altura de la 4ta vértebra lumbar o en el disco entre la 4° y la 5° lumbar, originando las dos arterias ilíacas comunes y la arteria sacra media, que debe considerarse como una colateral muy reducida, que sigue la dirección de la Aorta.

### 1.3 Insuficiencia cardiaca

La definición de Insuficiencia Cardiaca ha evolucionado a través de los años, intentando englobar los aspectos fundamentales de la aparición, evolución y consecuencias de la enfermedad.

No se trata de una enfermedad concreta, sino de un amplio síndrome, y de aquí surge la dificultad para establecer una única definición universalmente aceptada. Una de las más habituales establece que la Insuficiencia Cardiaca es la incapacidad del corazón para bombear la sangre necesaria para proporcionar los requerimientos metabólicos del organismo, o bien cuando esto sólo es posible a expensas de una elevación de la presión de llenado ventricular<sup>1</sup>.

M. Packer propone una definición especialmente útil para comprender su fisiopatología y sus manifestaciones clínicas, afirma que la Insuficiencia Cardiaca es un síndrome clínico complejo que se caracteriza por anomalías de la función ventricular izquierda y de la regulación neurohormonal, que conlleva intolerancia al ejercicio, retención de líquidos y disminución de la longevidad.<sup>2</sup>

Desde un punto de vista clínico, se entiende por el conjunto de síntomas y signos semiológicos que aparecen como consecuencia de la disfunción ventricular, de la afectación valvular o del aumento de la carga ventricular.

La definición actual hace hincapié en el mecanismo fisiopatológico subyacente; siendo así *el estado fisiopatológico en el que el corazón (como consecuencia de una anomalía detectable o no en la función cardiaca) no es capaz de bombear la sangre necesaria para*

*mantener un metabolismo tisular adecuado sin necesidad de tener que recurrir a una elevación anormal de las presiones de llenado.*<sup>1</sup>

La Insuficiencia Cardíaca siempre provoca fracaso circulatorio, por el contrario el fracaso circulatorio no siempre va asociado con alguna Insuficiencia Cardíaca; por ejemplo en el shock hipovolémico o el shock séptico se puede producir una Insuficiencia Cardíaca en presencia de una función cardíaca normal o supranormal.<sup>3, 4</sup>

### 1.3.1 Clasificación

Dependiendo del aspecto diferencial en el que se esté hablando, se pueden encontrar múltiples tipos y clasificaciones de Insuficiencias Cardíacas; estas suelen resultar muy útiles para el manejo y seguimiento del paciente en las primeras fases de la Insuficiencia Cardíaca pero conforme ocurre el desarrollo de la enfermedad y se acerca a las fases más tardías las diferencias entre los distintos tipos van disminuyendo, apareciendo características clínicas y fisiopatológicas de muchos diferentes tipos de Insuficiencias Cardíacas en el mismo paciente.<sup>5</sup>

En general podemos diferenciar la Insuficiencia Cardíaca sistólica y diastólica, la Insuficiencia cardíaca con gasto cardíaco bajo, Insuficiencia Cardíaca con gasto elevado, la Insuficiencia Cardíaca Derecha e Izquierda, la Insuficiencia Cardíaca Aguda y Crónica y la Insuficiencia Cardíaca Retrógrada y Anterógrada.<sup>6-8</sup>

### 1.3.2 Insuficiencia cardíaca en población pediátrica.

Aunque las insuficiencias cardíacas son enfermedades típicamente diagnosticadas en edad adulta, también existen múltiples casos diagnosticados en edad pediátrica ya que en el

corazón en desarrollo se producen múltiples cambios que hacen que la fisiopatología de las cardiopatías sea muy diferente a la de la edad adulta.<sup>9</sup>

Diversos hechos hacen que los factores implicados en la Insuficiencia Cardíaca Infantil así como sus principales agentes etiológicos sean muy diferentes a los que prevalecen en los adultos, además, éstos últimos varían significativamente en función de la edad del paciente<sup>9</sup>.

En general podemos clasificar las principales causas de Insuficiencia Cardíaca Infantil en cinco grupos: Cardiopatías Adquiridas, Arritmias, Causas Iatrogénicas, Causas Extracardíacas y Cardiopatías Congénitas.

De igual manera los agentes etiológicos de las Insuficiencias Cardíacas Infantiles se pueden agrupar en tres grandes grupos si se clasifican de acuerdo a la edad de aparición, siendo así en el feto (Anemia hemolítica secundaria a isoimmunización anti-D, Transfusión feto-materna o feto-fetal, Arritmias graves, bloqueo auriculoventricular) en el neonato y lactante pequeño (Cardiopatías congénitas, Malformaciones arteriovenosas, Enfermedad de Kawasaki, Arritmias severas, Disfunción miocárdica secundaria a sepsis, Alteraciones metabólicas, Miocarditis, Enfermedades de depósito) y en el niño mayor/adolescente (Fiebre reumática, Miocarditis, Endocarditis, Pericarditis, Arritmias crónicas, Crisis hipertensiva, Enfermedades neuromusculares, Enfermedad pulmonar aguda o crónica grave, Hipertiroidismo, Consumo de drogas).

#### 1.4 Cardiopatías congénitas

Son alteraciones del corazón que se originan antes del nacimiento, la mayoría se debe a un desarrollo defectuoso del embrión durante el embarazo, durante la formación de las

estructuras cardiovasculares principales. Las alteraciones más graves pueden ser incompatibles con la vida intrauterina, pero hay muchas que se hacen evidentes solo después del nacimiento.

Los niños están generalmente más afectados que las niñas, sobre todo para la transposición de los grandes vasos y las malformaciones aórticas valvulares. Por el contrario, el número de niñas es mayor para los canales auriculoventriculares (CAV) y las Comunicaciones Intraauriculares<sup>10</sup>.

#### 1.4.1 Clasificación

Aunque existen múltiples clasificaciones y teniendo en cuenta que algunas de la Cardiopatías Congénitas podrían englobarse en varios subgrupos, la mayoría de los autores las agrupa en tres grupos principales: Cardiopatías en las que predomina fundamentalmente la cianosis, cardiopatías con hipoperfusión sistémica y cardiopatías con aumento del flujo pulmonar (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)<sup>11,12</sup>.

- Cardiopatías Congénitas Cianóticas.

Habitualmente aparecen el periodo neonatal inmediato con cianosis severa (coloración azulada de la piel y/o uñas), polipnea (aumento de la frecuencia y la profundidad respiratorias) y saturación de oxígeno menor al 75%, con escasa respuesta al test de la hiperoxia (exceso de oxígeno en pulmones o tejidos corporales).<sup>12-14</sup>

- Cardiopatías Congénitas con hipoperfusión sistémica.

Los pacientes en éste grupo presentan signos y síntomas severos: palidez, dificultad respiratoria, pulsos débiles o no palpables, extremidades frías, oligoanuria y acidosis metabólica <sup>11,12</sup>

- Cardiopatías Congénitas con aumento de flujo pulmonar.

Se presentan clínicamente con dificultad respiratoria moderada-severa pudiéndose observar frecuentemente en la radiografía de tórax signos compatibles con un aumento significativo de la vascularización pulmonar acompañada habitualmente de cardiomegalia (agrandamiento anormal del corazón). Su situación clínica no suele alcanzar la misma gravedad que la de los grupos previos y suele ser difícil diferenciarlas clínicamente de los problemas puramente pulmonares <sup>11</sup>.

Tabla 1 Clasificación de las Cardiopatías Congénitas

### PRINCIPALES SUBGRUPOS DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS

<b>Cianóticas</b>	Aumento del flujo pulmonar (tetralogía de Fallot, Anomalía de Ebstein, atresia pulmonar) Flujo pulmonar normal o disminuido (transposición de grandes vasos simple)
<b>Hipoperfusión Sistémica</b>	Perfusión sistémica dependiente del Ductus (Corazón izquierdo hipoplásico, coartación aórtica, estenosis aórtica crítica, interrupción de arco aórtico) Perfusión sistémica no dependiente del Ductus (miocardiopatía congénita, bloqueo auriculoventricular completo)
<b>Aumento Flujo Pulmonar</b>	Aumento puro del flujo pulmonar (comunicación interventricular, ductus arterioso persistente, canal auriculoventricular completo, ventana aortopulmonar) Aumento del flujo pulmonar y mezcla intracardiaca (ventrículo derecho de doble salida y ventrículo único sin estenosis pulmonar, truncus arterioso, drenaje venoso pulmonar anómalo total)

## 1.4.2 Incidencia

Se ha observado que la incidencia en el desarrollo de Cardiopatías Congénitas en los recién nacidos vivos es del 8% al año, variando con la edad, siendo de 12.5% a los 16 años, existiendo un ligero predominio del sexo masculino <sup>10,15</sup>

La incidencia en los prematuros y neonatos con bajo peso es mucho mayor que en los neonatos a término<sup>16,17</sup> no encontrándose diferencias regionales ni temporales en la incidencia <sup>17</sup>.

Las malformaciones cardiacas constituyen la causa principal de mortalidad por anomalías congénitas en lactantes, provocando 1 de cada 3 muertes por anomalías congénitas y alrededor de 1 de cada 10 de todas las muertes en ese periodo de vida.<sup>17</sup>

Alrededor del 25-30% de las Cardiopatías Congénitas se presentan en el contexto de síndromes malformativos o cromosomopatías (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

**Tabla 2 Cromosomopatías más comunes con afectación cardiaca.**

*Cromosomopatías más comunes con afectación cardiaca*

Cromosomopatías	Incidencia	Lesiones más comunes
Trisomía 21 (síndrome de Down)	50%	CA-VC, CIV,CIA
Trisomía 13 (síndrome de Pattau)	>90%	CIV, DAP, vulvulopatías
Trisomía 18 (síndrome de Edwards)	>90%	CIV, DAP, vulvulopatías
Trisomía 9	>65%	CIV, DPA, TF
Tetrasomía 22p	50%	DVPA
45 X0 (síndrome de Turner )	25%	CoAo, EP, EA
47 XXY (síndrome de Kinefelter)	50%	CIA, DAP, PVM
4p- (síndrome de Wolff)	40%	CIV, CIA, DAP
5p- (síndrome de maullido de gato )	25%	DAP
13q-	50%	CIV
18q-	50%	CIV,CIA
22q11(CATCH-22)	75%	Malformaciones troncoconales
12q22(Noonan)	>50%	EP Miocardiopatía hipertrófica
7q11,23(Williams-Beuren)	75%	EA supra., EP periférica.
12q (Holt-Oram)	75%	CIA, CIV, trastornos conducción
20p12(Alagille)	85%	EP, TF

CA-CV canal atrioventricular común; CIA: comunicación interauricular; CIV: comunicación intraventricular; CoAo: Coartación Aórtica; DAP: Ductus Arterioso Permeable; DVPA: Drenaje Venoso Pulmonar Anómalo; EA Estenosis Aórtica; EP: Estenosis Pulmonar; PVM: Prolapso V Mitral

## 1.5 Coartación de la Aorta

### 1.5.1 Características generales

El término *Coartación de Aorta* se refiere a un estrechamiento de la arteria Aorta que causa una obstrucción al flujo aórtico (Morris 1998). Típicamente se localiza en la Aorta torácica descendente distal al origen de la arteria subclavia izquierda<sup>18</sup> en la pared posterior de la Aorta, de forma opuesta a la inserción del ductus arterioso<sup>19</sup> (Figura 1).

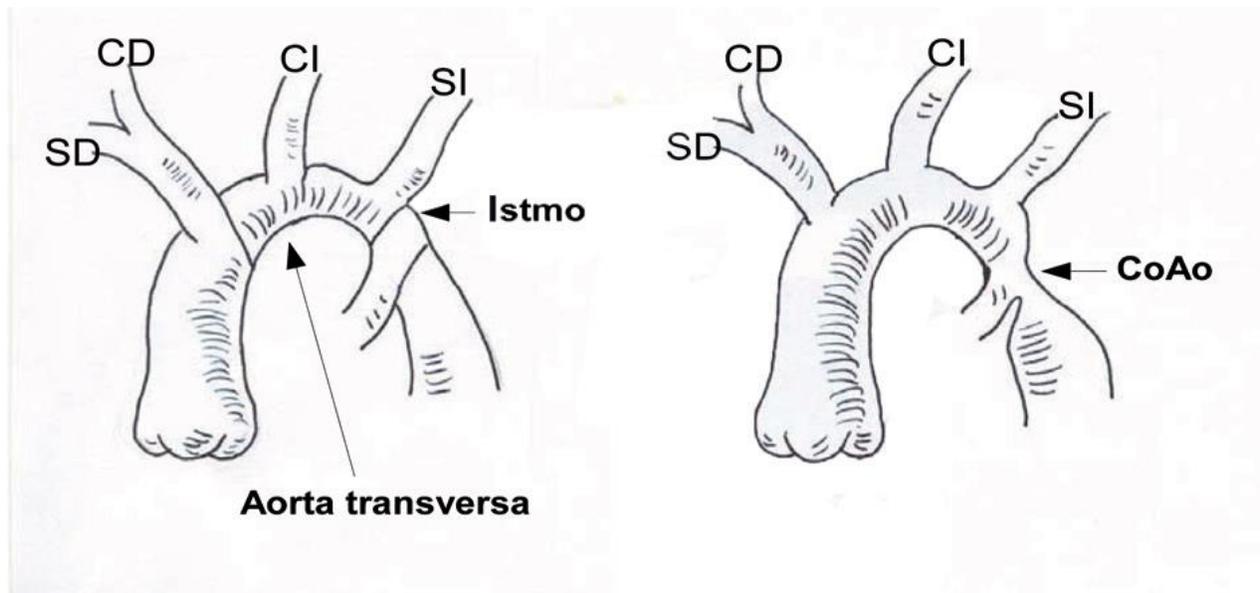
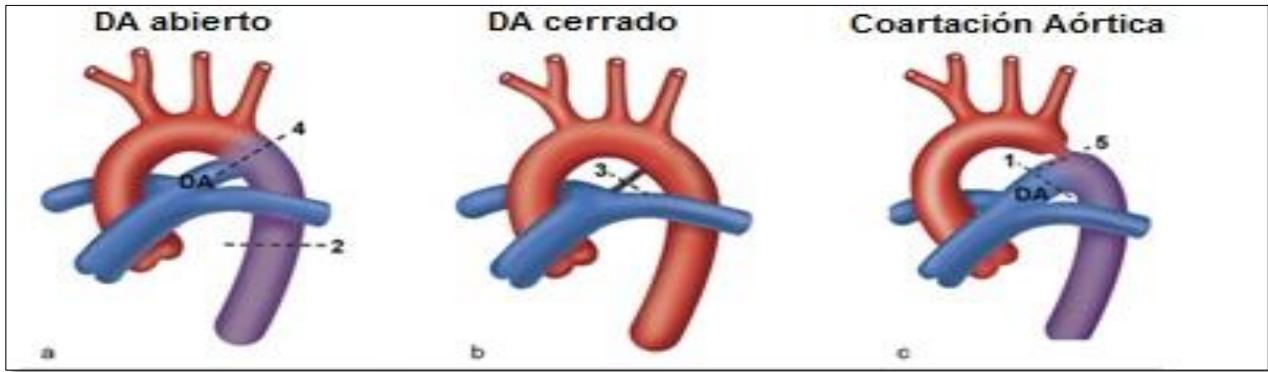


Figura 1 Esquema comparativo arco aórtico sano vs. Arco aórtico con coartación aórtica.

Arteria Subclava derecha (SD), Arteria Carótida Derecha (CD), Arteria Carótida Izquierda (CI), Arteria Subclava Izquierda (SI)

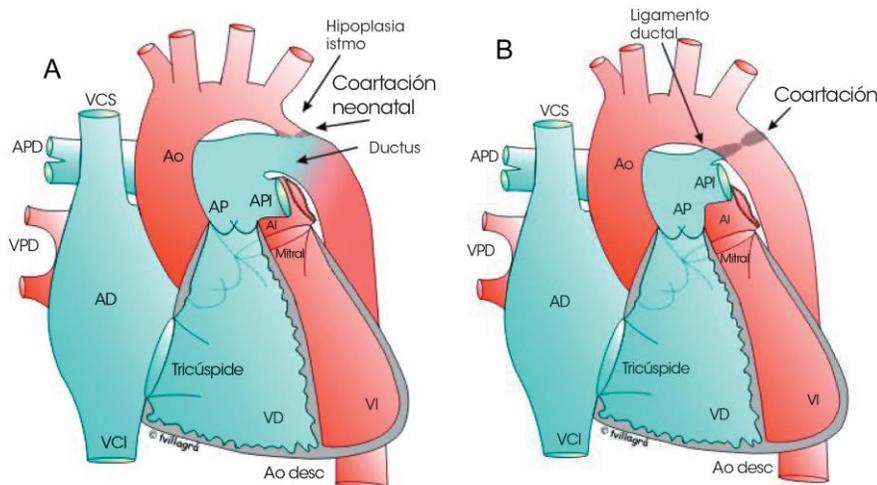
El ductus arterioso conecta el tronco de la arteria pulmonar (cerca del origen de su rama izquierda) con la Aorta descendente y se cierra de manera espontánea en el periodo neonatal. Por la fisiología de la circulación fetal, el ductus maneja gran cantidad de volumen sanguíneo con cortocircuito derecha-izquierda hacia la Aorta descendente y en el istmo aórtico el flujo queda restringido (Figura 2).



**Figura 2 Ductus arterioso (DA) abierto, cerrado y con coartación Aórtica**

(a) DA en el feto antes de que comience la respiración. La sangre oxigenada de la placentera (en rojo) pasa a la Aorta. La sangre fetal pobre en oxígeno (en azul) pasa a través del DA hacia la Aorta descendente (en púrpura). (b) DA involuciona para formar ligamentum arteriosum. Se desconectan la circulación aórtica y pulmonar. c) Coartación aórtica, una malformación del lado izquierdo del corazón, el DA se mantiene abierto.

Los diferentes tipos de Coartación Aórtica se suelen denominar yuxtaductales (Figura 3) (habiéndose abandonado los términos de coartación preductal y posductal). La obstrucción se produce por una hipertrofia de la capa media de la porción posterior del vaso que se extiende hacia el interior y reduce su luz, sin embargo, se ha comprobado que en las zonas adyacentes a la coartación existe tejido ductal el cual tiende a fibrosarse.



**Figura 3 Formas principales de coartación aórtica.**

A: Coartación neonatal: estenosis muy severa en la zona opuesta al ductus arterioso, acompañada frecuentemente de hipoplasia a nivel del istmo y cortocircuito derecha-izquierda a nivel ductal .B: Coartación diagnosticada fuera del periodo neonatal: con estrechamiento circunscrito por debajo de la salida de la subclavia izquierda. AD: aurícula derecha AI: aurícula izquierda Ao: Aorta; Ao des: Aorta descendente AP: arteria pulmonar APD: arteria pulmonar derecha API: arteria pulmonar izquierda VCI: vena cava inferior VCS: vena cava superior VPD: venas pulmonares derechas.

### 1.5.2 Incidencia

La coartación de Aorta supone aproximadamente el 5,1% de las cardiopatías congénitas y constituye la octava malformación cardíaca por orden de frecuencia. Su prevalencia se estima en 2,09 por cada 10.000 recién nacidos vivos. Su incidencia es mayor en varones (relación 2:1)<sup>20</sup>

La mayoría de los casos aparecen de forma aislada, pero también se han descrito casos familiares con herencia mendeliana<sup>21</sup>. Con un hijo afecto existe un riesgo de recurrencia en los siguientes embarazos del 2%, si hay 2 familiares con coartación, sube al 6%. Si la madre tiene esta patología, el riesgo de que el feto también la desarrolle es del 4% y en el caso de que sea el padre quien la padezca, es del 2%.

### 1.6 Marcadores Biológicos utilizados en Insuficiencias Cardíacas.

La función del corazón como bomba frecuentemente se define en función con el gasto cardíaco (cantidad de sangre que el corazón bombea por unidad de tiempo). Las variables por las que el gasto cardíaco puede llegar a estar disminuido son múltiples y todas están relacionadas entre sí, por lo que la alteración aguda o crónica de alguna de ellas pondrá en marcha una serie de mecanismos compensadores y de adaptación para mantener el gasto cardíaco adecuado.

Entre estos mecanismos destacan fundamentalmente tres tipos de adaptaciones: Aumento de precarga, Hipertrofia del Músculo Cardíaco y Activación de diversos Sistemas Neurohormonales como son el Sistema Nervioso Simpático (SNS) o el Sistema Renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

Estos mecanismos adaptativos, aunque pueden resultar útiles para mantener el gasto cardiaco adecuado en episodios agudos o en las primeras fases de la Insuficiencia Cardiaca, generan severos efectos mortíferos si se mantienen durante largo tiempo. Por ejemplo: a mediano plazo, la activación del SRAA conllevará a una retención persistente de agua y sal que aumentará la precarga pero también los requerimientos energéticos del miocardio.

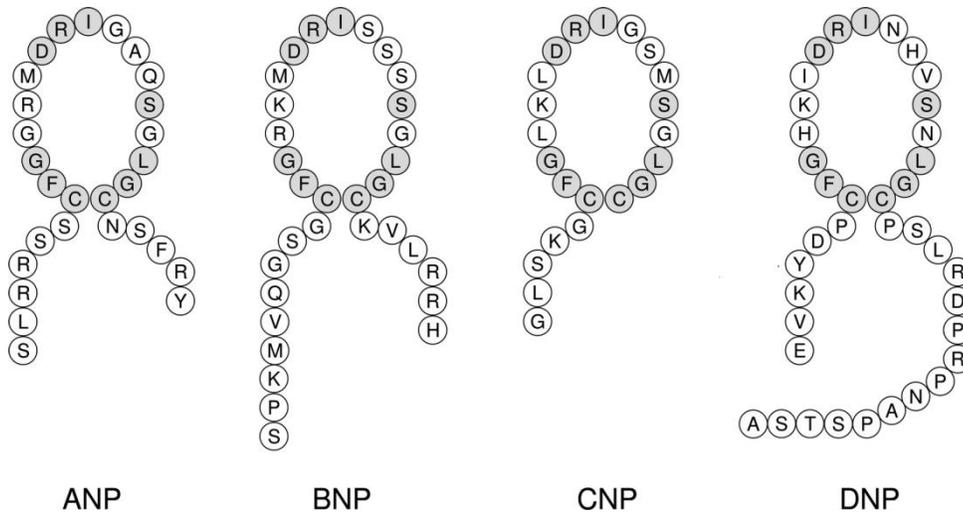
Con el objeto de contrarrestar la excesiva vasoconstricción resultante y la retención progresiva de agua y sal secundaria a la activación adrenérgica y del SRAA se producirá la activación de un grupo de moléculas vasodilatadoras como las prostaglandinas, el óxido nítrico, el sistema de bradiquininas y el Sistema de los Péptidos Natriuréticos.

## 1.7 Péptidos Natriuréticos

Los Péptidos Natriuréticos son un grupo de sustancias de estructura similar (Figura 4) pero genéticamente distintas que tienen importante participación en la regulación de funciones renales, humorales y cardiovasculares.

Las funciones precisas de los Péptidos Natriuréticos individuales dependen de su distribución y abundancia dentro del sistema cardiovascular, así como el estímulo específico para su liberación <sup>22</sup>.

Hasta el momento se han identificado 4 tipos de Péptidos Natriuréticos: auricular (ANP) y cerebral (BNP) que son de origen cardiaco, el péptido tipo C (CNP) de origen endotelial y el péptido tipo D que se ha aislado recientemente en serpientes (Figura 4)<sup>23</sup>



**Figura 4 Estructura de los Péptidos Natriuréticos.**

Anillo de 17 aminoácidos unidos por un puente disulfuro característico de los Péptidos Natriuréticos

### 1.7.1 Síntesis y liberación de los Péptidos Natriuréticos.

ANP y BNP son sintetizados principalmente en la aurícula y en los ventrículos, participan en el control de la presión arterial y el equilibrio hidroelectrolítico, protegiendo al sistema cardiovascular de la sobrecarga de volumen. El CNP se expresa en el cerebro pero es producido fundamentalmente por las células endoteliales y otros tejidos, tiene escasa acción natriurética, pero si vasodilatadora e inhibidora del crecimiento de las células musculares lisas <sup>24</sup>.

El estímulo primario para la liberación de los Péptido Natriuréticos es un aumento en el volumen intravascular o cardiaco, que causa un incremento del estiramiento auricular, el estrés de la pared ventricular, la tensión de cizallamiento vascular, volumen intravascular, y la concentración de sodio intravascular<sup>22,25,26</sup>

### 1.7.2 Aspectos fisiológicos de los Péptidos Natriuréticos

Los Péptidos Natriuréticos estimulan la producción de Guanosín Monofosfato Cíclico (GMPc) a partir del Guanosín Trifosfato (GTP), el cual puede intervenir en la regulación del remodelado vascular (13). Actúan a través de las Guanilato Ciclasas Particuladas (GCp), un subtipo de las proteínas Guanilato Ciclasas (GC), éstas se encuentran asociadas a la membrana plasmática, se han identificado siete isoformas distintas distribuidas en el organismo de mamíferos ( de la GCp-A a la GCp-G), únicamente las tres primeras tienen ligandos conocidos, siendo de importancia para los Péptidos Natriuréticos la GCp-A (NPR-A O ANPR-1) y la GCp-B (NPR-B O NPR-2) (Figura 5) localizadas fundamentalmente en endotelio vascular, corazón y riñón, siendo sus principales agonistas los Péptidos Natriuréticos tipo A y B (ANP y BNP) y el Péptido Natriurético tipo C (CNP), respectivamente.

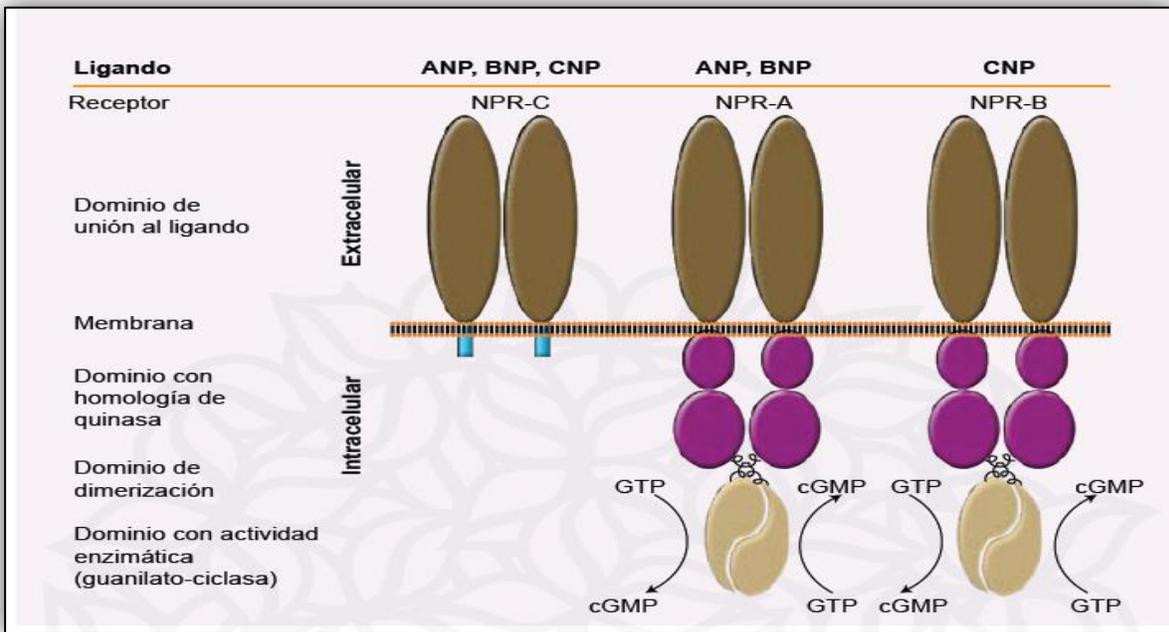


Figura 5 Esquema de los receptores de los Péptidos Natriuréticos

(NPR-C, NPR-A, NPR-B), Dominios extracelulares e intracelulares, transformación de GTP en GMP cíclico

Como ya se menciono, las GCp están asociadas a la membrana, presentando un dominio amino terminal extracelular que actúa como receptor, una región reguladora y una región carboxilo terminal intracelular con función ciclasa que es la encargada de formar GMPc. En la región reguladora existe una zona de homología con proteínas del tipo de las tirosinas-kinasas Tipo G, (PKG). La GCp puede parecer como monómero o como homodímero de cada una de las isoformas antes mencionadas, pero la forma activa es siempre un homodímero <sup>27</sup>.

Una vez en la circulación, ANP y BNP migran a los tejidos donde actúan, como el riñón, la glándula adrenal y la vasculatura periférica, la unión de éstos agonistas a su receptor produce un incremento de GMPc (Figura 5) que resulta en la excreción de agua y sodio a nivel renal, disminución de la producción de aldosterona y relajación de la musculatura lisa, lo cual resulta globalmente en una disminución de la presión sanguínea.

El papel fisiológico del CNP forma parte de un Sistema Natriurético vascular de acción paracrina, expresándose el ligando y el receptor en endotelio y células musculares lisas (CML) respectivamente. El efecto sería una vasorrelajación e inhibición de la proliferación de las CML, además de participa en la regulación del crecimiento en los huesos largos.

Estos tres Péptidos Natriuréticos (ANP, BNP y CNP) interaccionan también con un receptor específico sin actividad guanilato ciclasa conocido como NPR-C o receptor de aclaramiento que se internaliza en la célula tras unirse al Péptido Natriurético, degradándose junto con el péptido. (Figura 5), También existe un importante mecanismo de degradación de Péptidos Natriuréticos por endopeptidasas en los túbulos renales y en el endotelio vascular. La

proporción de degradación de Péptidos Natriuréticos correspondiente a cada una de estas vías no es bien conocida, así como su importancia fisiológica en humanos.

### 1.7.3 Acciones de los Péptidos Natriuréticos a nivel renal

Los Péptidos Natriuréticos presentan importantes acciones fisiológicas a nivel cardiovascular, sistema nervioso central y renal.

El ANP, por ejemplo, aumenta la filtración glomerular incrementando la presión en los capilares al dilatar las arteriolas aferentes renal y constreñir las eferentes. Además, ésta acción se complementa con el aumento en la superficie de filtración al relajarse las células mesangiales. La Urodilatina (pro-ANP) es sintetizada localmente e induce natriuresis por acción tubular directa, ya que es más resistente a la inactivación por endopeptidasas, lo que puede explicar su mayor potencia. Tanto el ANP como el CNP inhiben el sistema renina-angiotensina-aldosterona, pero los efectos renales directos del CNP no parecen muy relevantes<sup>28</sup>

### 1.7.4 ANP (A-type Natriuretic Peptide o Atrial Natriuretic Peptide)

El ANP (A-type Natriuretic Peptide o Atrial Natriuretic Peptide), descubierto en 1981 por Adolpho de Bold <sup>29</sup> Es codificado por el gen NPPA (Natriuretic Peptide Precursor A) el cual esta posicionado en el brazo corto del cromosoma 1 humano en la región 36.21 <sup>30</sup>.

Es un polipéptido de 28 aminoácidos que forman un anillo de 17 aminoácidos unidos por una ligadura disulfídica entre dos residuos de cisteína (Figura 4); producido en los miocitos y deriva de un precursor de 151 aminoácidos, el pre-proANP, el cual se almacena en los gránulos de las aurículas como una pro-hormona, el proANP (Urodilatina) de 126

aminoácidos, que al ser liberado es fraccionado por una proteasa de serina, la corina, produciendo fragmentos N-terminal y el C-terminal (Péptido Natriurético atrial o ANP), que es el biológicamente activo.<sup>31</sup>.

La prohormona del ANP consta de 126 aminoácidos y contiene diversos Péptidos, numerados por sus secuencias de aminoácidos:

1. proANP con los aminoácidos 1-30 que es el Péptido Natriurético de larga acción
2. proANP con los aminoácidos 31-67 que es el dilatador vascular
3. proANP con los aminoácidos 79-98 que es el Péptido kaliurético
4. ANP con los aminoácidos 99-126

El Péptido Natriurético atrial se expresa y almacena principalmente en gránulos en las Aurículas; sin embargo además del corazón otros órganos contienen ANP, tales como el cerebro, el lóbulo anterior de la hipófisis, el pulmón y el riñón. El proANP terminal-amino (proANP t-a) es depurado en el riñón siendo su vida media considerablemente más larga que el ANP.<sup>32</sup>

El principal estímulo para la liberación del Péptido Natriurético Atrial es el estiramiento que se da como resultado del aumento del volumen intravascular. Después de ser secretado, se difunde al seno coronario para ser distribuido a los órganos blancos.

La activación de NPR-A conduce a la elevación de los niveles de guanósín monofosfato cíclico (GMPc) el cual es importante en la modulación de la activación plaquetaria y la regulación de la contracción del músculo liso, las cuales median efectos biológicos tales como: lipólisis, natriuresis, diuresis, inhibición de la síntesis de aldosterona y vasodilatación.

### 1.7.5 CNP (C-type o C- Natriuretic Peptide)

El CNP es producido por el endotelio, y presenta dos sub-tipos: C-53 y C-22 (de acuerdo al número de aminoácidos de cada uno), se expresa en el sistema nervioso central, tejido vascular y óseo<sup>33</sup>, formando como en el caso de los anteriores un anillo de 17 aminoácidos (Figura 4), pero carece del carboxilo terminal; los subtipos de CNP también están presentes en el corazón, pero en cantidades muy bajas<sup>31</sup>.

Es codificado por el gen conocido como NPPC (Natriuretic Peptide Precursor C) esta posicionado en el brazo largo del cromosoma 2 humano en la región 37.1.

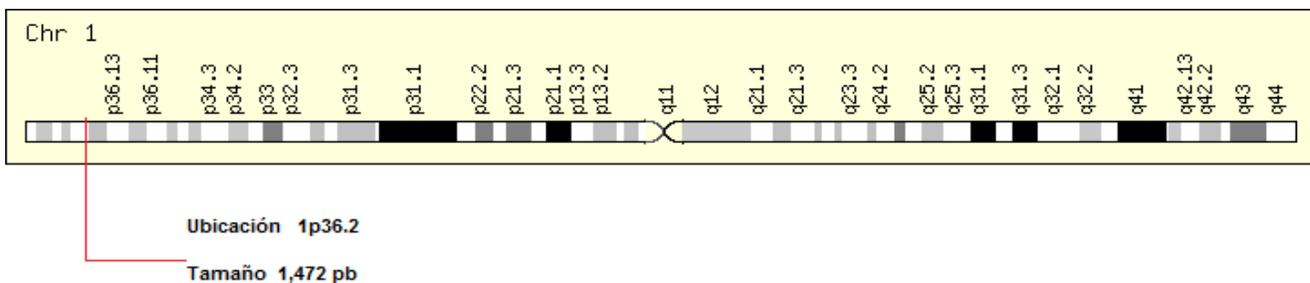
### 1.7.6 DNP (D-type o D- Natriuretic Peptide)

El DNP es el último de los Péptidos Natriuréticos conocidos, aislado inicialmente en el veneno de la serpiente “Mamba Verde” *Dendroaspsis Angusticeps* por lo que también se llama Péptido Natriurético Dendroaspsis, está formado por 38 aminoácidos (Figura 4) y aunque aún no se ha logrado la purificación desde el plasma humano, se ha investigado la inmunoreactividad al DNP en diversas muestras de carótida y riñón<sup>34</sup>. Aun no se conocen con exactitud las acciones de éste péptido pero también se ha visto relacionado con la vasorrelajación y la regulación de la proliferación celular del músculo liso vascular.

## 1.8 BNP (B-type Natriuretic Peptide o Brain Natriuretic Peptide)

Es codificado por el gen conocido como *NPPB* (Natriuretic Peptide Precursor B) el cual esta posicionado en el brazo corto del cromosoma 1 humano en la región 36.2. (Figura 6).

El gen *NPPB* está formado por 3 exones y 2 intrones; el exón 1 codifica la primera parte, el exón 2 codifica los aminoácidos que van del 45 al 129 y el exón 3 la zona 5´aminoterminal que corresponde a los aminoácidos 130-134<sup>35,36</sup>



**Figura 6 Ubicación del gen *NPPB*.**

El gen *NPPB* se encuentra en el cromosoma 1p en la región 36.2 cuenta con un tamaño de 1,472 nucleótidos

Después de la traducción del gen *NPPB* se sintetiza un péptido inicial de 134 aminoácidos llamado preproBNP, el cual se escinde durante la traducción para formar la prohormona proBNP eliminándose 26 aminoácidos dando como resultado un péptido de 108 aminoácidos llamado proBNP. Posteriormente el proBNP, no se almacena, ya que es producido de Novo en respuesta a episodios de sobrecarga de presión y volumen ventricular, sus niveles plasmáticos son mucho más estables ya que no se libera de forma pulsátil siendo su vida media mucho mayor (21 minutos)<sup>37</sup>.

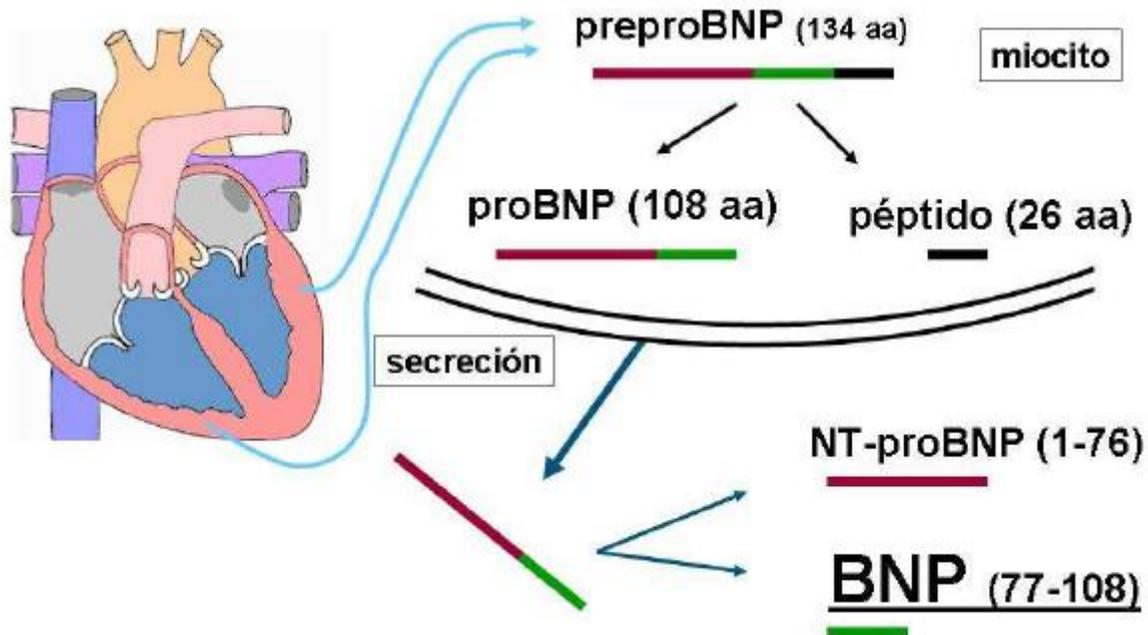


Figura 7 Estímulo para la liberación del BNP.

Trasformación del Pre-Pro BNP en pro BNP. Acción de la Furina para convertir pro BNP en NT-BNP y BNP

Cuando el pro BNP es secretado, las endopeptidasas plasmáticas lo dividirán en dos porciones peptídicas; una región amino terminal de 6 aminoácidos biológicamente inerte (NT-pro BNP) y un segundo péptido, el BNP la parte biológicamente activa de 32 aminoácidos el cual incluye el anillo de 17 aminoácidos característico de los péptidos Natriuréticos.

La secreción y liberación del BNP tendrá efectos diuréticos, Natriuréticos, vasodilatadores y reductores de las resistencias vasculares periféricas, disminuyendo la respuesta simpática, la actividad del SRAA y la secreción de endotelinas; limitando el efecto vasoconstrictor y de retención de sodio que se da como respuesta en los pacientes con Insuficiencia Crónica.

El BNP, a comparación con ANP se encuentra en sujetos sanos en un 20% menos de concentración, el BNP prácticamente no existe, ya que no se almacena y se sintetiza de novo ante los episodios de sobrecarga de volumen y de presión, además, se libera de forma

continua, a diferencia de la liberación pulsátil del ANP, por lo tanto en situaciones de Insuficiencia Cardíaca podemos encontrar concentraciones de BNP mucho mayores que las de ANP, esto hace de este péptido un miembro de mayor especificidad ante los cambios en la homeostasis del corazón y sea más socorrido en la práctica médica como biomarcador para la evaluación de pacientes con algún tipo de Insuficiencia Cardíaca<sup>38</sup>.

En general los niveles de BNP y NT-BNP suelen estar correlacionados y pueden ser utilizados de forma similar en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes con Insuficiencia Cardíaca, sin embargo, existen diferencias entre ellos que proporcionan un amplio panorama de aplicaciones en las cuales, la implementación de uno u otro dependerá de sus características particulares, por ejemplo, se sabe que el BNP tiene una vida media de aproximadamente 20 minutos y es eliminado rápidamente del plasma mediante mecanismos antes descritos; en NT-BNP en cambio, tiene una vida media de aproximadamente 1 a 2 horas, como consecuencia de esto, los niveles de NT-BNP son más constantes y tardan más en eliminarse que los de BNP en periodos de mejoría o empeoramiento del paciente, por lo que en situaciones agudas, el BNP es el mejor indicador de la evolución clínica y terapéutica del paciente en comparación con el NT-BNP; además, parece que la función renal tiene mayor influencia sobre el NT-BNP por lo que puede ser de mayor confiabilidad la utilización de BNP en pacientes con insuficiencia renal significativa.

## 1.9 Gen *NPPB*

El gen *NPPB* está posicionado en el brazo corto del cromosoma 1 su locus comienza en las 11, 917,521 pb, terminando en las 11, 918,992 pb, con una longitud de 1472 pb ubicado en la región 1p36.22 con un peso molecular de 14726 Da. Está formado por 3 exones y 2 intrones; la secuencia de nucleótidos descrita tanto para exones como para intrones es: (ensamble >chromosome:GRCh37:1:11916921:11919588:1) el exón 1 codifica la primera parte, el exón 2 los aminoácidos que van del 45 al 129 y el exón 3 la zona 5´aminoterminal que corresponde a los aminoácidos 130-134<sup>35,36</sup> [ENREF 36](#), al retirarse lo intrones y solo quedarse con lo intrones codificantes de la proteína, el gen tiene una longitud de 694 pb. (Figura 8)<sup>36</sup>

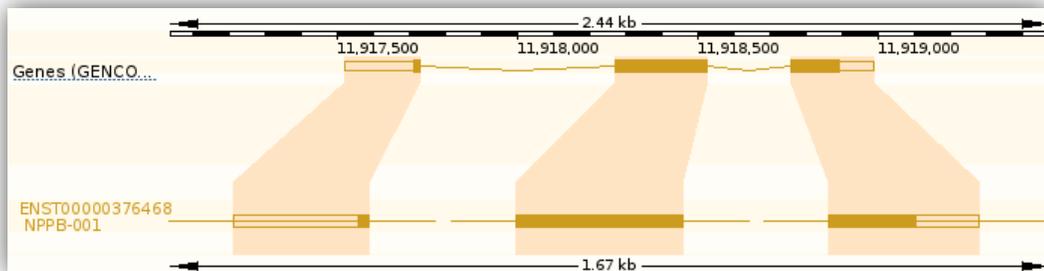


Figura 8 Intrones y exones del *NPPB*.

EL Gen *NPPB* codifica para una proteína de 134 residuos de aminoácidos, con un peso promedio de residuos de 109.895 g/mol, Carga: 10.5, Punto Isoeléctrico: 11.0102 Peso Molecular: 14,725.94 g/mol hasta el momento se han descrito 52 variaciones en la secuencia del Gen que provoca cambios en los residuos de aminoácidos transcritos (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabla 3 Variaciones de nucleótidos reportadas de la secuencia del gen NPPB

Tipo	No Nucleótido	Alelo	Código	Residuo	Codón
Codón de paro	96	G/T	K	Y, *	TAC, TAA
Codón de paro	60	C/A	M	E, *	GAG, TAG
Variación del marco de lectura Variación en la elongación	27	-/G	-	-	-
Variación del Marco de Lectura Variación de splicing Variación en la elongación	44	-/TG	-	-	-
Variación sin sentido	2	C/T	Y	D, N	GAT, AAT
Variación sin sentido	88	G/A	R	R, C	CGT, TGT
Variación sin sentido	80	C/T	Y	R, Q	CGG, CAG
Variación sin sentido	62	G/A	R	T, I	ACA, ATA
Variación sin sentido	31	C/A	M	S, I	AGC, ATC
Variación sin sentido	47	G/A	R	R, C	CGC, TGC
Variación sin sentido	91	G/A	R	R, C	CGC, TGC
Variación sin sentido	73	G/A	R	P, L	CCC, CTC
Variación sin sentido	134	G/A	R	H, Y	CAT, TAT
Variación sin sentido	72	C/T	Y	R, H	CGT, CAT
Variación sin sentido	91	C/T	Y	R, H	CGC, CAC
Variación sin sentido	74	G/A	R	T, I	ACA, ATA
Variación sin sentido	95	G/T	K	L, I	CTC, ATC
Variación sin sentido	125	C/A	M	G, V	GGC, GTC
Variación sin sentido	91	C/T	Y	R, H	CGC, CAC
Variación sin sentido	10	G/T	K	A, E	GCG, GAG
Variación sin sentido	122	G/A	R	S, F	TCC, TTC
Variación sin sentido	9	G/A	R	R, W	CGG, TGG
Variación sin sentido	133	G/A	R	R, W	CGG, TGG
Variación sin sentido	33	C/G	S	G, R	GGT, CGT
Variación sin sentido	80	G/A	R	R, W	CGG, TGG
Variación sin sentido	119	C/T	Y	R, Q	CGG, CAG
Variación sin sentido	94	C/A	M	V, F	GTC, TTC
Variación sin sentido	101	G/A	R	P, L	CCA, CTA
Variación sin sentido	109	C/G	S	G, A	GGG, GCG
Variación sin sentido	91	G/A	R	R, C	CGC, TGC
Variación sin sentido	25	C/A	M	R, L	CGT, CTT
Variación sin sentido	47	C/T	Y	R, H	CGC, CAC
Variación sin sentido	93	T/A	W	M, L	ATG, TTG
Variación sin sentido	72	C/T	Y	R, H	CGT, CAT
Variación sin sentido	26	G/A	R	S, F	TCC, TTC
Variación sin sentido	69	C/G	S	E, D	GAG, GAC
Variación sin sentido	80	C/T	Y	R, Q	CGG, CAG
Variación Sinónima	84	G/A	R	T	ACC, ACT
Variación Sinónima	40	C/T	Y	T	ACG, ACA
Variación Sinónima	29	C/A	M	L	CTG, CTT

Tipo	No Nucleótido	Alelo	Código	Residuo	Codón
Variación Sinónima	41	G/A	R	S	TCC, TCT
Variación Sinónima	72	A/G	R	R	CGT, CGC
Variación Sinónima	40	C/T	Y	T	ACG, ACA
Variación Sinónima	127	G/T	K	G	GGC, GGA
Variación Sinónima	25	A/G	R	R	CGT, CGC
Variación Sinónima	38	C/T	Y	L	TTG, TTA
Variación Sinónima	18	A/G	R	H	CAT, CAC
Variación Sinónima	79	G/A	R	S	TCC, TCT

## 2 Antecedentes

El registro más antiguo con el que se cuenta acerca de la investigación de los Péptidos que los gránulos similares a las de las glándulas endocrinas se encontraban en las células de las aurículas; al mismo tiempo la Vasopresina y el Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona eran conocidos como los reguladores de la natriuresis, pero se pensaba que había otro factor (“el tercer factor”) que participaría en la natriuresis; desde un punto de vista clínico se conocía que la natriuresis ocurría seguido de ataques supraventriculares, lo cual sugería que este “tercer factor” estaba ligado al corazón.

Fue hasta 1981 cuando De Bold realizó un descubrimiento que significó un gran avance en la identificación del primer Péptido Natriurético, demostró que inyecciones intravenosas de extractos de miocardio atrial causaba una potente respuesta natriurética en ratas; la hipótesis para este trabajo fue el hecho de que el número de gránulos atriales (o auriculares) fluctuaban con el volumen intravascular, y así se pensaba que estos gránulos atriales eran un regulador del volumen intravascular.

El siguiente avance lo realizó Currie quien mostró que la fracción con actividad natriurética co-migrar con la fracción que tenía actividad de relajación intestinal. Esto fue un muy importante descubrimiento, ya que a la postre permitió el fraccionamiento y la identificación del Péptido Natriurético Atrial.

La subsecuente purificación y caracterización del factor por varios grupos a lo largo del mundo llevo al descubrimiento del factor Natriurético atrial, el primero de los factores Natriuréticos, en 1983 y 1984 (Flynn 1983, Kangawa 1984)

Posteriormente los estudios fueron enfocados en el descubrimiento de los miembros de la familia de factores Natriuréticos, los cuales resultaron en el aislamiento de otros dos factores, que fueron nombrados Péptido Natriurético Cerebral (BNP por sus siglas en inglés) y Péptido Natriurético tipo C (CNP por sus siglas en inglés) ambos descubiertos por Sudo y colaboradores en 1988 y 1991, respectivamente.

Arden en 1995 localizó el gen *NPPB* (B-type natriuretic peptide precursor) en el cromosoma 1p36, lo que dio paso a una serie de estudios enfocados al estudio molecular de éste y de todos los Péptidos Natriuréticos

### 3 Justificación

En la actualidad la implementación del BNP y el NT-BNP han ayudado a diagnosticar no solo la Coartación Aórtica sino múltiples cardiopatías relacionadas con la sobrecarga cardiaca. La falta de estudios que relacionen el desarrollo de la Coartación Aórtica con errores en la secuencia del gen *NPPB* y la reciente revolución de la medicina genética hace factible pensar en la implementación de una terapia génica con el gen *NPPB*, para poder llevar a cabo dicha terapia es necesario principalmente el análisis de la secuencia del gen *NPPB* en pacientes diagnosticados con Coartación Aórtica, compararla con las secuencias reportadas previamente para buscar cambios, en caso de encontrarlos, relacionarlos con la producción errónea de la proteína BNP que conlleve al desarrollo de la enfermedad.

## 4 Hipótesis

La proteína BNP se expresa en mayor cantidad cuando ocurre una anomalía cardíaca como medida preventiva del desarrollo a una cardiopatía, si el desarrollo de la Coartación Aórtica está relacionada con fallas en la transcripción de la proteína BNP entonces se encontrarán polimorfismos en la secuencia codificante de la proteína BNP en pacientes pediátricos con Coartación Aórtica

## 5 Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Determinar los polimorfismos en los exones del Gen *NPPB* mediante secuenciación en niños mexicanos con Coartación Aórtica

### 5.2 Objetivos particulares

- Determinar la secuencia del gen *NPPB* en las 60 muestras pertenecientes a 20 pacientes con Coartación Aórtica mediante el método de Sanger y revalidar su identidad mediante un análisis informático
- Realizar un estudio bioinformático para determinar los posibles cambios en las secuencias de las 60 muestras
- Relacionar los posibles polimorfismos encontrados en la secuencia del gen *NPPB* con el desarrollo de la Coartación Aórtica

## 6 Materiales y métodos

### 6.1 Obtención del Material Biológico

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron de pacientes pediátricos diagnosticados con Coartación Aórtica provenientes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, con el consentimiento de sus padres de acuerdo de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación Clave: 2810-009-013.

### 6.2 Extracción y prueba de integridad de DNA genómico

La Extracción de DNA genómico se realizó por medio de el paquete comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) conforme a lo establecido en el protocolo “DNeasy 96 ”(Anexo 1)

Posteriormente se comprobó la integridad del DNA genómico obtenido de la extracción, al realizar una electroforesis en gel de agarosa 1.5 % 60 Volts durante 60 minutos. La agarosa fue disuelta en TBE (Tris Borato EDTA) a una concentración 1x y el gel fue sumergido en TBE a1x. Las condiciones en las cuales fueron cargadas las muestras y el marcador de pares de bases se especifican en Anexo 2

### 6.3 Cuantificación de DNA

Se cuantificó el material genético extraído utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000, el cual cuenta con un software especializado que calcula, a partir de 1  $\mu$ l de muestra, la concentración de DNA contenida en una dilución, basándose en la Ley de Beer Lambert (Anexo 3 Ley de Beer Lambert)

Se evaluó la pureza de la muestra mediante el coeficiente 260/280, que es el resultado de la división entre los valores obtenidos a 260 y 280 nm de absorbancia, ya que las proteínas absorben luz a 280nm.

Generalmente un coeficiente de  $\sim 1.8$  es generalmente aceptado como una muestra pura. Si la relación es sensiblemente inferior, esto puede indicar la presencia de la proteína, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente en o cerca de 280 nm.

#### 6.4 Diseño de primes

Se diseñaron 3 juegos de cebadores mediante el programa libre Primer3 que permite especificar un gran número de variables y obtener cebadores según las indicaciones solicitadas. Además permite agregar el número de acceso de la secuencia que se desea amplificar, la cual se halla en las bases de datos internacionales. También permite discriminar las regiones de la secuencia que se deben incluir, las que se deben excluir y el rango de tamaños del producto. Por otra parte, el programa incluye la posibilidad de especificar las características mínimas de los cebadores deseados, como  $T_m$ , porcentaje de GC, máxima auto complementariedad, entre otros parámetros más específicos. Cuáles son más específicos.

Posteriormente se comprobó la especificidad de los cebadores, la posibilidad de formación de Homodímeros y Heterodímeros a través del programa de libre acceso por internet llamado Oligo Analyzer

## 6.5 Amplificación del gen *NPPB*

Para cada uno de los pacientes se llevo a cabo tres reacciones de PCR (para amplificar un los tres exones que componen el gen *NPPB*), dando como total 60 reacciones de PCR punto final para la estandarización y homogenización de las reacciones de PCR, se realizó una mezcla de reactivos a concentraciones y volúmenes específicos e iguales para todas las reacciones (Tabla 4) teniendo variaciones únicamente en el volumen de agua y DNA, llegando a una concentración de 50 ng/ $\mu$ L y un volumen final de 25  $\mu$ L.

Tabla 4 Condiciones de las reacciones de PCR (Mix)

REACTIVO	CONCENTRACIÓN [ ]	VOLUMEN $\mu$ L.
Buffer	1x	2.5 $\mu$ L.
Mg Cl <sub>2</sub>	1.5 Mm	1.5 $\mu$ L.
Cebador Forward	5pMol	0.5 $\mu$ L.
Cebador Reverse	5pMol	0.5 $\mu$ L.
dNTPs	0.2 pMol	0.2 $\mu$ L.
Taq Polimerasa	1 Unidad	0.25 $\mu$ L.
Volumen Total Mix		5.45 $\mu$ L.

Se manejaron condiciones específicas de ciclaje de temperatura en la amplificación de cada exón (Tabla 5)

Tabla 5 Condiciones de temperaturas y ciclaje del termociclador

EXÓN	TEMPERATURA INICIAL	TEMPERATURA DE DESNATURALIZACIÓN DEL DNA	TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO	TEMPERATURA DE ELONGACIÓN	TEMPERATURA FINAL
1	96° C (2 MIN)	96° C (30 SEG)	54 °C (30 SEG)	72° (30 SEG)	4 °C ( $\infty$ )
2	96° C (2 MIN)	96° C (30 SEG)	56.7 °C (30 SEG)	72° (30 SEG)	4 °C ( $\infty$ )
3	96° C (2 MIN)	96° C (30 SEG)	54 °C (30 SEG)	72° (30 SEG)	4 °C ( $\infty$ )
35 CICLOS					

Se comprobó la existencia de amplicones en las muestras resultantes de PCR, la calidad y peso molecular mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% 70 Volts durante 60 minutos. La agarosa fue disuelta en TBE (Tris Borato EDTA) a una concentración 1x y el gel fue sumergido en TBE a1x. . Las condiciones en las cuales fueron cargadas las muestras y el marcador de pares de bases se especifican en Anexo 2

Posterior a la migración de las muestras se procedió a observar el gel en un transluminador BioRad con la presencia de luz ultravioleta (entre los 400 nm y los 15 nm), las imágenes son captadas por una cámara, la cual las transmite a una computadora, donde por medio de un programa compatible con el equipo se pueden registrar y documentar.

## 6.6 Secuenciación del Gen *NPPB*.

Los productos de PCR fueron enviados al laboratorio de Secuenciación de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM donde fueron secuenciados por el método de Sanger automatizado (Anexo 4 Fundamento de la secuenciación Sanger).

Los resultados de la secuenciación se obtuvieron en formato FASTA y en electroferograma, obteniendo 1 secuencia FASTA y un electroferogramas por cada uno de los productos de PCR de los tres exones.

Las curvas de electroferogramas se forman de acuerdo a la frecuencia con la que se registra la presencia de un nucleótido marcado con un flouorforo en determnada posición, estableciéndose previamente un código de colores (Adenina: verde; Citocina: azul, Guanina:

negro y Timina: Rojo). Se forman curvas de diferentes tamaños y colores que indican las veces que se encontró un nucleótido y su posición respecto a la secuencia.

El formato FASTA es un formato de fichero informático basado en texto, utilizado para representar secuencias de ácidos nucleicos, péptido, y en el que los pares de bases o los aminoácidos se representan usando códigos de una única letra. El formato también permite incluir nombres de secuencias y comentarios que preceden a las secuencias en sí (Anexo 5 Formato Fasta)

Para hacer más accesible el manejo de las secuencias y los electroferogramas, se utilizó el programa Finch Tv, el cual representa el electroferograma y la secuencia de manera conjunta, además de proporcionar una escala en la cual se pueden ubicar las posiciones de los nucleótidos y su concentración.

## 6.7 Determinación de polimorfismos en la secuencia del gen *NPPB*

Los resultados de las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron mediante programas bioinformáticos como FINCH TV, Clustal W, BioEdit y para la determinación de los cambios en las secuencias, así como de la frecuencia de estos cambios en todas las secuencias analizadas

El programa Clustal W lleva a cabo una estrategia denominada “progresiva” para realizar el alineamiento múltiple (Anexo 6 Alineamiento mediante Clustal W).

Por otro lado BioEdit es un programa gratuito para edición de alineamientos y análisis de secuencias que funciona únicamente sobre ambiente MS/Windows cuenta con varias herramientas que van desde la creación de alineamientos hasta la anotación de plásmidos

Para descartar que los cambios encontrados en las secuencias fueran parte de un error en la lectura del sistema operativo del secuenciador, se analizaron particularmente los cambios directamente de los electroferogramas

## 7 Resultados:

### 7.1 Obtención del Material Biológico

Se obtuvo un volumen de 5 ml de sangre de 20 pacientes menores de 18 años previamente diagnosticados con Coartación Aórtica provenientes del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, con el consentimiento de sus padres de acuerdo de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación Clave: 2810-009-013. Cada muestra fue colocada en un tubo con anticoagulante EDTA y refrigerada a 4°C hasta la posterior extracción de DNA.

### 7.2 Extracción de DNA genómico

Se obtuvieron 200µL de una solución H<sub>2</sub>O/DNA para cada muestra. Se comprobó su integridad con una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. En la **¡Error! No se encuentra el rigen de la referencia.** Se observa una ejemplificación de las muestras cargadas en el gel de agarosa.

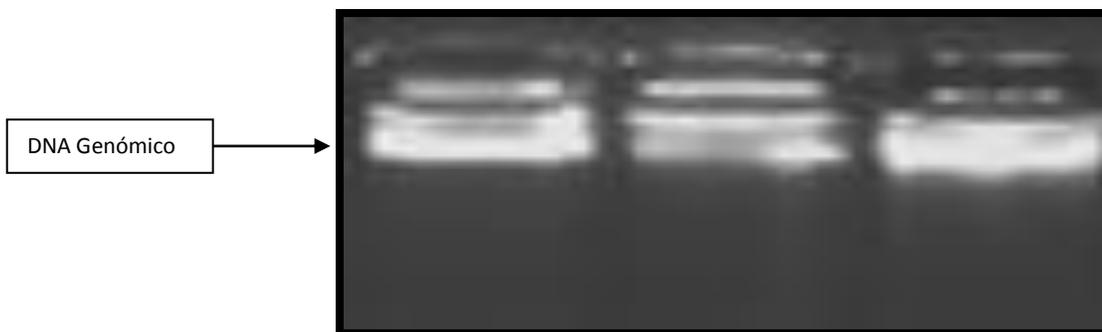


Figura 9 DNA Genómico visto en un gel de Agarosa al 1.5%  
DNA visto en un gel de agarosa con una integridad óptima

### 7.3 Cuantificación de DNA

Se obtuvieron concentraciones variadas de DNA que van de los 100ng/ $\mu$ L a los 211.2 ng/ $\mu$ L, con un coeficiente 260/280 de 1.17 a 1.76. La Tabla 6 nos muestra en su primera columna la clave con la que se identifica al paciente, en la segunda la concentración de DNA obtenida de la extracción realizada de sangre y en la tercera columna el resultado del coeficiente 260/280 que indica la pureza de las muestras.

**Tabla 6 Cuantificación de DNA.**

<b>Paciente</b>	<b>[ ] ng/<math>\mu</math>L</b>	<b>260/280</b>
<b>CoAo 1</b>	211.2	1.58
<b>CaAo 2</b>	195	1.5
<b>CoAo 3</b>	268.3	1.69
<b>CoAo 4</b>	234.9	1.54
<b>CoAo 5</b>	280	1.76
<b>CoAo 6</b>	208	1.63
<b>CoAo 7</b>	307.3	1.64
<b>CoAo 8</b>	136.8	1.64
<b>CoAo 9</b>	176	1.43
<b>CoAo 10</b>	169.4	1.18
<b>CoAo 11</b>	121.1	1.46
<b>CaAo 12</b>	195.8	1.26
<b>CoAo 13</b>	209.8	1.67
<b>CoAo 14</b>	100.8	1.77
<b>CoAo 20</b>	260.6	1.71

Clave del paciente (derecha), Cuantificación Total de DNA (centro), Coeficiente de pureza (izquierda)

## 7.4 Diseño de cebadores

Los cebadores diseñados cuentan con un porcentaje de CG de 35% a 55.56%, con una longitud de 18 a 20 nucleótidos con una temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de 51.1°C a 55.8°C (Tabla 7).

El cebador forward del exón 1 inicia en las 492 bases y termina en las 511 bases de la secuencia a amplificar, contando así con un tamaño de 20 bases, con una temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de 52.9 °C.

El cebador reverse del exón 1 inicia en el nucleótido 858 y termina en el 993 del gen *NPPB*, con una longitud de 20 nucleótidos y una  $T_m$  de 53.7°C

Para los primer correspondientes al exón 2, ambos oligos, *forward* y *reverse* tuvieron una longitud de 18 nucleótidos, el forward iniciando en el nucleótido 976 y terminando en el 993, mientras que el reverse comenzó en los 1346 nucleótidos y termino en los 1363. Ambos presentando una temperatura de alineamiento de 55.5°C.

Por último los cebadores utilizados para amplificar el exón 3 presentaron una longitud de 20 nucleótidos, iniciando en el 1838 y terminando en 1857 (Forward) y en 2083 y 2102 (reverse). Con una  $T_m$  de 55.8°C y 51.1°C forward y reverse respectivamente.

**Tabla 7 Características principales de los tres exones del gen *NPPB***

EXÓN	FORWARD	INICIO	FINAL	$T_m$	REVERSE	$T_m$	INICIO	FINAL
<i>NPPB 1</i>	CCGGAATGTGGCTGATAAAT	492	511	52.9°C	CTTTCATTGCTGCTGTCC AA	53.7°C	858	993
<i>NPPB 2</i>	CAAGGCAGTCGGTTCCTACT	976	993	55.5°C	ACACTGGAATGGGGGAA G	55.5°C	1346	1363
<i>NPPB 3</i>	CACCCTCTCTCTTCCCTGA	1838	1857	55.8°C	TTTTAATGCGCCAAGACA AA	51.1 C	2083	2102

El análisis del diseño de los cebadores mediante el programa libre Oligo Analyzer reveló que existía la posibilidad de formación natural de homodímeros y heterodímeros para la totalidad de los cebadores por complementariedad de bases a temperaturas que oscilaban de los 25°C a los 35.6 °C

## 7.5 Amplificación de los exones

La amplificación del exón 1 visto con luz ultravioleta en el transluminador presentó una banda ubicada entre las 300 y 400 pb con respecto al marcador de pares de bases, la Figura 10 presenta un grupo de siete muestras, ejemplificando la banda obtenida en cada una de las muestras: primer carril de izquierda a derecha corresponde al marcador de 100 pares de bases en donde se observa una banda gruesa que corresponde a el peso molecular de 500 pares de bases, las bandas inferiores corresponden a las bandas de 400 y 300 pares de bases.

- EXÓN 1



Figura 10 Ejemplificación de la amplificación del Exón 1 del gen *NPPB*

De manera similar, que en el exón 1, en los productos de la amplificación de él exón 2 se observó una banda en todas las muestras que se ubicaba entre los 300 y 400 pb, en la Figura 11 se representa la electroforesis realizada a cinco muestras del exón 2: Marcador de 100 pares de bases ubicado en el carril del extremo izquierdo en el cual se observa una banda gruesa marcando los 500 pares de bases, seguido de las bandas de 400 y 300 pares

de bases, las muestras de la amplificación del exón 2 ubicadas en los carriles restantes del gel.

- EXÓN 2

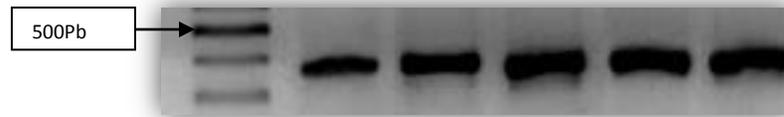


Figura 11 Ejemplificación de la amplificación del Exón 2 del gen *NPPB*

En el caso particular de los productos de PCR del exón 3 se observó una banda por debajo de los 300 pb en el gel de electroforesis expuesto a luz ultravioleta, la electroforesis representada en la Figura 12 muestra seis pozos cargados con productos de la amplificación del exón 3 ( de derecha a izquierda) y en el carril del extremo izquierdo se observa el marcador de 100 pares de bases con una banda gruesa marcando los 500 pares de bases, las bandas inferiores corresponden a las bandas de 400, 300, y 200 pares de bases

- EXÓN 3

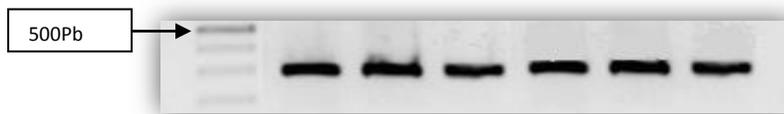


Figura 12 Ejemplificación de la amplificación del Exón 3 del gen *NPPB*

## 7.6 Secuenciación del Gen *NPPB*.

Se obtuvieron sesenta secuencias de productos de PCR punto final de el laboratorio de Secuenciación de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de

Estudios Superiores Iztacala, UNAM, la secuenciación fue realizada únicamente en el sentido Reverse.

Por parte del Laboratorio de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez se obtuvieron 20 secuencias en el sentido Reverse.

Las secuencias obtenidas para los exones 1 y 3 contaron con la totalidad de nucleótidos esperados, más ~10 nucleótidos al inicio y final de la secuencia, que son considerados como ruido de fondo. En algunas secuencias del exón 2, tanto las procedentes del laboratorio de Secuenciación de la UBIPRO en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM como las originarias de Laboratorio de Nefrología del Hospital Infantil de México Federico Gómez obtuvimos secuencias incompletas, que tenían de un 20% a un 85 % de la totalidad esperada.

Todas las secuencias vistas en FinchTv contaban con una secuencia escrita en la parte superior, una barra que indicaba la concentración de un nucleótido en específico, y un electroferograma en la parte inferior como se muestra en el ejemplo de la Figura 13.

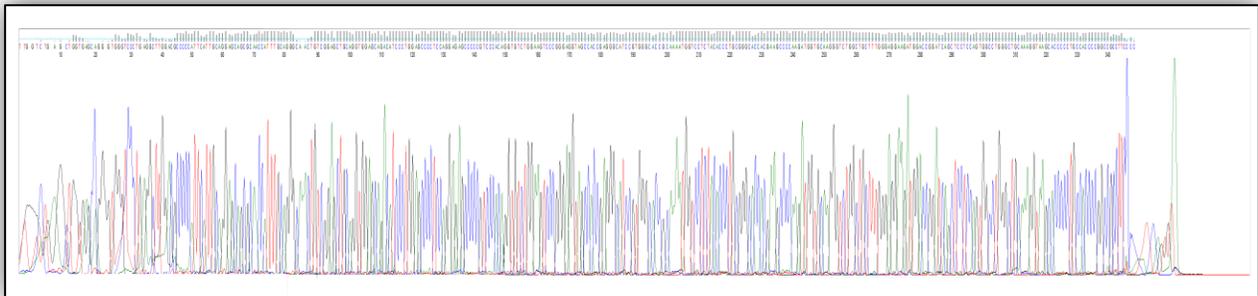


Figura 13 Electroferograma resultado de una secuenciación por el método de Sanger Automatizado

## 7.7 Determinación de polimorfismos en la secuencia del gen *NPPB*.

Para determinar la existencia de cambios en las secuencias de los exónes del gen *NPPB* se alinearon las secuencias (en formato Fasta)

La secuencias correspondientes al exón 1 (en formato FASTA) fueron alineadas con el programa BioEdit, y posteriormente se le asignó un código de colores preestablecido por el software para facilitar gráficamente la identificación de los cambios de nucleótido en una posición en específico (Figura 14).

Contando con la totalidad de longitud de las secuencias para el alineamiento, no se encontraron alteraciones en dicho alineamiento,

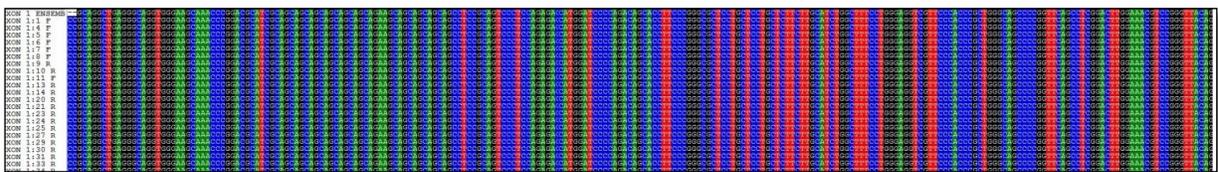


Figura 14 Alineamiento exón 1

Se realizó el alineamiento de las secuencias correspondientes al exón 2 (en formato FASTA), 10 de la secuencias contaban con la totalidad de la longitud esperada, la 10 secuencias restantes no contaban con la totalidad de la longitud.

En este alineamiento se presentaron cambios de diferentes características, por ejemplo, cambios en un paciente en particular, que no se encontraban en las otras secuencias de otros pacientes con respecto a su posición en el alineamiento; espacios o “gaps” en el

alineamiento provocados por falta de concordancia entre la secuencia patrón y la secuencia del paciente y que se presentaron con mayor frecuencia (en más de un paciente).

Para los cambios en el exón 2 que se presentaban repetidamente en más de dos secuencias, se realizó un análisis más detallado, recurriendo a los electroferogramas correspondientes a la totalidad de las secuencias obtenidas para el exón, comparándolas entre sí para poder confirmar o descartar un verdadero en las secuencias.

En particular se analizaron 2 fragmentos de secuencias “CAGGAGCAGCGCAACCCATTTGCAGGGC” (Figura 16) y “GTGGAGCAGACATCCC”, (Figura 17) dichos fragmentos presentaban un par de cambios cada uno que modifican dos codones: 48(**AAC**),49 (**CAT**) y 61(**CAG**) y 62 (**ACA**).

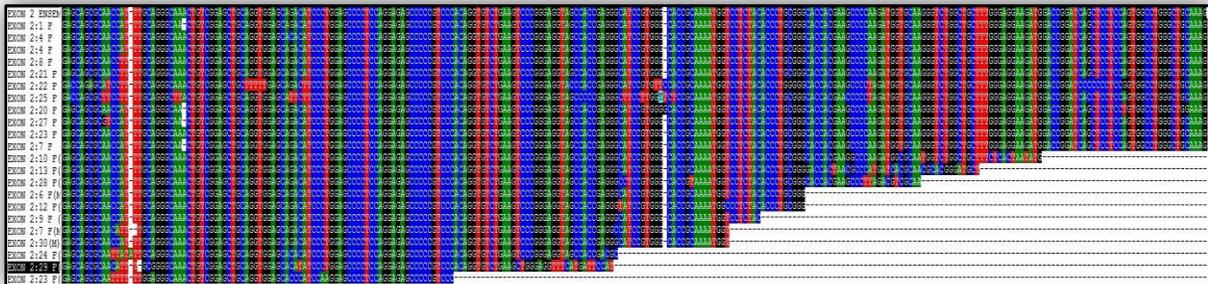


Figura 15 Alineamiento exón 2

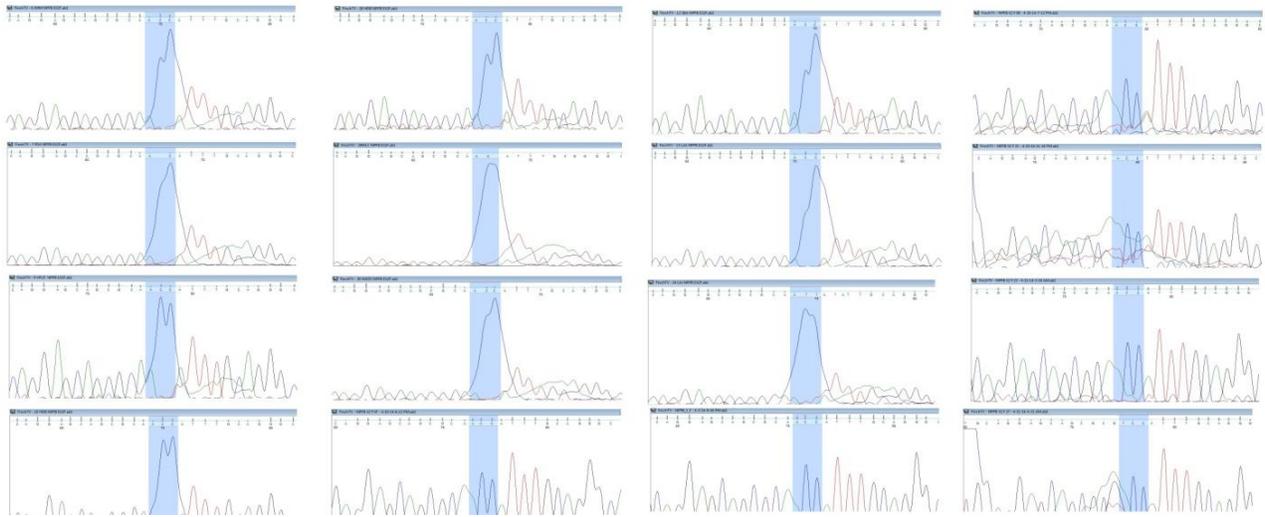


Figura 16 Electroferogramas de los cambios en la secuencia exón 2



El alineamiento de las secuencias correspondientes al exón 3 las cuales contaron con la totalidad de la longitud esperada, presentaron cambios con respecto a la secuencia reportada. Estableciéndose estos cambios en un conjunto de 10 secuencias, formando, junto con las secuencias coordinantes con la reportada, dos grupos de secuencias, apreciándose el cambio al ser ordenadas en dicho grupos un desplazamiento en la secuencia(Figura 18)



Figura 18 Alineamiento exón 3

## 8 Discusión

Después de haber secuenciado y analizado por medios bioinformáticos las secuencias pertenecientes a los tres exones que componen el gen *NPPB* en muestras de sangre de niños con Coartación Aórtica no se encontraron cambios prevalentes que pudiesen considerarse como polimorfismos.

Los errores metodológicos pueden ser descartados ya que el volumen de sangre obtenido (5ml) de los veinte pacientes con Coartación Aórtica para realizar la extracción de DNA fue muy apropiado, ya que el protocolo de extracción de DNA establecido por el paquete de Qiagen requiere solo 100  $\mu$ L de sangre, lo cual abría la posibilidad de repetir la extracción en caso de obtener una mala calidad o una baja concentración de DNA, estando bajo los índices recomendados para trabajos de investigación molecular.

La integridad del DNA vista a través de la electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% es excelente, ya que no se muestra un barrido o bandas múltiples, lo cual indicaría un degradado del DNA, además, la única banda presente se encontró al principio del pozo, lo que indica una muy ligera migración, esto ocasionado por su alto peso molecular, si se le compara con el marcador de peso molecular, el DNA se contuvo por arriba de la banda con mayor peso molecular, que en éste caso era de 1000 pares de base, siendo muy inferior al peso molecular del DNA genómico que oscila de los 20 a los 25 Kb; los porcentajes de CG (de 5% a 55.5%) con los que se diseñaron los cebadores, la longitud (de 18 a 29 nucleótidos) y las Temperaturas de alineamiento 51.1°C a 55.8°C (Tabla 7) son los adecuados para que una reacción de PCR punto final se lleve a cabo, estando dentro de los valores recomendados por el Instituto de Biotecnología de la UNAM, (IBT,UNAM, 2014).

La amplificación por medio de PCR punto final de cada uno de los exones que conforman el gen *NPPB* se realizó sin contratiempo, logrando obtener los fragmentos deseados ( vistos en una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%) coincidiendo con el tamaño de fragmentos reportados en las bases de datos, (Ensembl 2014; NCBI 2014); las secuencias correspondientes al exón 1 y 3 provenientes del laboratorio de Secuenciación de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM presentaban una calidad aceptable, tanto en la composición nucleotídica (longitud de la secuencia en el formato FASTA) como en la apariencia de electroferograma.

Por otra parte se encontraron cambios en la secuencias de manera aislada, los cuales pueden ser relacionados a una falla en la lectura del equipo de secuenciación denominada “Primer N-1” que ocurre cuando el cebador que comúnmente está compuesto por cadenas completas (N), tiene proporción con una base menos (N-1), que presenta picos superpuestos y desfasados, percibiéndose como una secuencia sombra de menor altura donde cada pico sombra es igual que el pico siguiente de las altura y/o intensidad de señal.

Para tener mayor seguridad que los cambios encontrados en las secuencias (particularmente del exón 2) fuesen producto de un error en el equipo de secuenciación, se llevó a cabo la secuenciación del exón 2 por duplicado con dos equipos de secuenciación distintos, se analizaron los cambios que se presentaban repetidamente en la misma posición específica, comparando los resultados obtenidos en ambos equipos (Figura 17), se tuvo como resultado que en un grupo de secuencia obtenidas con un equipo en se obtenían señales consideradas como cambios en la secuencia reportada que no se obtenían en otro grupo de secuencias elaboradas con otro equipo; del mismo modo ocurría con los cambios presentados en las secuencias del segundo equipo que no se encontraban en el primer

equipo, por lo anterior se pudo descartar que los cambios encontrados se debiesen realmente a un cambio en la secuencia que compone al gen.

La incidencia de la enfermedad es de 2.09 de cada 10,000 recién nacidos<sup>20</sup> lo cual es una limitante importante, ya que debido a esto solo se contó con un total de 20 pacientes, lo cual reduce la posibilidad de encontrar diferencias en la secuencias de dichos pacientes.

De la misma manera en la que se ha encontrado relación en el desarrollo de la Coartación Aórtica con la presencia de Síndromes Cromosómicos<sup>15-17</sup>, en particular del síndrome 45 X0 (Síndrome de Turner) y se ha reportado un comportamiento de herencia en la enfermedad de tipo mendeliana<sup>21</sup> se podría suponer que entre los factores que se involucran en la adquisición de la enfermedad el genético es de importancia preponderante, no solo siendo en gen *NPPB* el único causante, sino por el contrario, este sea uno de los muchos genes involucrados, y que los posibles cambios en estos genes, ya sea individual o colectivamente conduzcan al desarrollo de Cardiopatías Congénitas, como lo es la Coartación Aórtica

Ya que no se encontraron cambios en las secuencias de los exones que pudiesen ser catalogados como polimorfismos, estos no pudieron ser relacionados con el desarrollo de la enfermedad, así como del estado clínico de los pacientes.

## 9 Conclusión

Dado que las secuencias correspondientes a las amplificaciones de los 3 exones codificantes del gen *NPPB* no presentaron modificaciones, no sé puede establecer una relación entre polimorfismos en la secuencia de dicho gen con el desarrollo de la Coartación Aórtica en niños mexicanos

## 10 Referencias

- (1) Swedberg, K.; Cleland, J.; Dargie, H.; Drexler, H.; Follath, F.; Komajda, M.; Tavazzi, L.; Smiseth, O. A.; Gavazzi, A.; Haverich, A.; Hoes, A.; Jaarsma, T.; Korewicki, J.; Levy, S.; Linde, C.; Lopez-Sendon, J. L.; Nieminen, M. S.; Pierard, L.; Remme, W. J.: Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *European heart journal* **2005**, *26*, 1115-40.
- (2) Packer, M.; Carson, P.; Elkayam, U.; Konstam, M. A.; Moe, G.; O'Connor, C.; Rouleau, J. L.; Schocken, D.; Anderson, S. A.; DeMets, D. L.: Effect of amlodipine on the survival of patients with severe chronic heart failure due to a nonischemic cardiomyopathy: results of the PRAISE-2 study (prospective randomized amlodipine survival evaluation 2). *JACC. Heart failure* **2013**, *1*, 308-14.
- (3) De Luca, L.; Fonarow, G. C.; Adams, K. F., Jr.; Mebazaa, A.; Tavazzi, L.; Swedberg, K.; Gheorghiade, M.: Acute heart failure syndromes: clinical scenarios and pathophysiologic targets for therapy. *Heart failure reviews* **2007**, *12*, 97-104.
- (4) Struthers, A. D.: The diagnosis of heart failure. *Heart* **2000**, *84*, 334-8.
- (5) Felker, G. M.; Adams, K. F., Jr.; Konstam, M. A.; O'Connor, C. M.; Gheorghiade, M.: The problem of decompensated heart failure: nomenclature, classification, and risk stratification. *American heart journal* **2003**, *145*, S18-25.
- (6) Filippatos, G.; Zannad, F.: An introduction to acute heart failure syndromes: definition and classification. *Heart failure reviews* **2007**, *12*, 87-90.
- (7) Go, A. S.; Mozaffarian, D.; Roger, V. L.; Benjamin, E. J.; Berry, J. D.; Borden, W. B.; Bravata, D. M.; Dai, S.; Ford, E. S.; Fox, C. S.; Franco, S.; Fullerton, H. J.; Gillespie, C.; Hailpern, S. M.; Heit, J. A.; Howard, V. J.; Huffman, M. D.; Kissela, B. M.; Kittner, S. J.; Lackland, D. T.; Lichtman, J. H.; Lisabeth, L. D.; Magid, D.; Marcus, G. M.; Marelli, A.; Matchar, D. B.; McGuire, D. K.; Mohler, E. R.; Moy, C. S.; Mussolino, M. E.; Nichol, G.; Paynter, N. P.; Schreiner, P. J.; Sorlie, P. D.; Stein, J.; Turan, T. N.; Virani, S. S.; Wong, N. D.; Woo, D.; Turner, M. B.: Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **2013**, *127*, e6-e245.
- (8) De Keulenaer, G. W.; Brutsaert, D. L.: Systolic and diastolic heart failure: different phenotypes of the same disease? *European journal of heart failure* **2007**, *9*, 136-43.
- (9) Burch, M.: Heart failure in the young. *Heart* **2002**, *88*, 198-202.
- (10) Samanek, M.; Slavik, Z.: [Differences in the incidence of congenital heart defects in boys and girls]. *Ceskoslovenska pediatrie* **1990**, *45*, 214-6.
- (11) Marino, B. S.; Bird, G. L.; Wernovsky, G.: Diagnosis and management of the newborn with suspected congenital heart disease. *Clinics in perinatology* **2001**, *28*, 91-136.
- (12) Murphy, D. J., Jr.; Meyer, R. A.; Kaplan, S.: Noninvasive evaluation of newborns with suspected congenital heart disease. *Am J Dis Child* **1985**, *139*, 589-94.
- (13) Wenger, W. C.; Murphy, M. P.; Kindig, O. R.; Capen, C. C.; Brierley, G. P.; Altschuld, R. A.: Mitochondrial enzyme retention by irreversibly damaged rectangular isolated adult rat heart myocytes. *Life sciences* **1985**, *37*, 1697-704.
- (14) Waldman, J. D.; Wernly, J. A.: Cyanotic congenital heart disease with decreased pulmonary blood flow in children. *Pediatric clinics of North America* **1999**, *46*, 385-404.
- (15) Samanek, M.; Voriskova, M.: Congenital heart disease among 815,569 children born between 1980 and 1990 and their 15-year survival: a prospective Bohemia survival study. *Pediatric cardiology* **1999**, *20*, 411-7.
- (16) Tanner, K.; Sabrine, N.; Wren, C.: Cardiovascular malformations among preterm infants. *Pediatrics* **2005**, *116*, e833-8.

- (17) Hoffman, J. I.; Kaplan, S.: The incidence of congenital heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* **2002**, *39*, 1890-900.
- (18) Rudolph, A.: *Congenital Diseases of the Heart: Clinical-Physiological Considerations*; third ed., 2009.
- (19) Alejandro Álvarez J., V. C. R., Eugenio Sanhueza H., Rodrigo Nazal L. : Cierre transcatéter de ductus arterioso persistente. *Revista Chilena de Pedriatria* **2012**, *83*, 577-581.
- (20) McBride, K. L.; Marengo, L.; Canfield, M.; Langlois, P.; Fixler, D.; Belmont, J. W.: Epidemiology of noncomplex left ventricular outflow tract obstruction malformations (aortic valve stenosis, coarctation of the aorta, hypoplastic left heart syndrome) in Texas, 1999-2001. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology* **2005**, *73*, 555-61.
- (21) Stoll, C.; Alembik, Y.; Dott, B.: Familial coarctation of the aorta in three generations. *Annales de genetique* **1999**, *42*, 174-6.
- (22) Ellis R. Levin, D. G. G. a. W. K. S.: Natriuretic Peptides. *The New England Journal of Medicine* **1998**, *Volume 339*, 321-328.
- (23) Luis Almenar Bonet, L. M.-D.: Péptidos Natriuréticos en insuficiencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología* **2006**, *Volumen 6*, 15-26.
- (24) Martinez-Rumayor, A.; Richards, A. M.; Burnett, J. C.; Januzzi, J. L., Jr.: Biology of the natriuretic peptides. *The American journal of cardiology* **2008**, *101*, 3-8.
- (25) Hama, N.; Itoh, H.; Shirakami, G.; Suga, S.; Komatsu, Y.; Yoshimasa, T.; Tanaka, I.; Mori, K.; Nakao, K.: Detection of C-type natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP level in septic shock patients. *Biochemical and biophysical research communications* **1994**, *198*, 1177-82.
- (26) Suga, S.; Itoh, H.; Komatsu, Y.; Ogawa, Y.; Hama, N.; Yoshimasa, T.; Nakao, K.: Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology* **1993**, *133*, 3038-41.
- (27) Ahluwalia, A.; MacAllister, R. J.; Hobbs, A. J.: Vascular actions of natriuretic peptides. Cyclic GMP-dependent and -independent mechanisms. *Basic research in cardiology* **2004**, *99*, 83-9.
- (28) Schulz-Knappe, P.; Forssmann, K.; Herbst, F.; Hock, D.; Pipkorn, R.; Forssmann, W. G.: Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klinische Wochenschrift* **1988**, *66*, 752-9.
- (29) Adolpho .J. de Bold, H. B. B., A.T. Veressa, H. Sonnenberg: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sciences* **1981**, *Volume 28*, 89-94.
- (30) GeneCards: **Natriuretic Peptide B**. 2014; Vol. 2014.
- (31) Serna, F. d. I.: PÉPTIDOS NATRIURÉTICOS. ADRENOMEDULINA. VASOPRESINA. In *Insuficiencia Cardíaca Crónica*; 3ra Edición ed.; Cardiología, F. A. d., Ed.: Argentina, 2010; pp 76-110.
- (32) Mir, T. S.; Laux, R.; Hellwege, H. H.; Liedke, B.; Heinze, C.; von Buelow, H.; Laer, S.; Weil, J.: Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked and rapid increase after birth. *Pediatrics* **2003**, *112*, 896-9.
- (33) Sudoh Tetsuji, N. M., Kenji Kangawa, Hisayuki Matsuo C-Type natriuretic peptide (CNP): A new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1990**, *Volume 168*, 863-870.
- (34) Schweitz, H.; Vigne, P.; Moinier, D.; Frelin, C.; Lazdunski, M.: A new member of the natriuretic peptide family is present in the venom of the green mamba (*Dendroaspis angusticeps*). *The Journal of biological chemistry* **1992**, *267*, 13928-32.
- (35) LaPointe, M. C.: Molecular regulation of the brain natriuretic peptide gene. *Peptides* **2005**, *26*, 944-56.
- (36) Sudoh, T.; Maekawa, K.; Kojima, M.; Minamino, N.; Kangawa, K.; Matsuo, H.: Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human brain natriuretic peptide. *Biochemical and biophysical research communications* **1989**, *159*, 1427-34.

(37) Mukoyama, M.; Nakao, K.; Saito, Y.; Ogawa, Y.; Hosoda, K.; Suga, S.; Shirakami, G.; Jougasaki, M.; Imura, H.: Human brain natriuretic peptide, a novel cardiac hormone. *Lancet* **1990**, 335, 801-2.

(38) de Bold, A. J.; Borenstein, H. B.; Veress, A. T.; Sonnenberg, H.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Reprinted from *Life Sci.* 28:89-94, 1981. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* **2001**, 12, 403-9; discussion 403-8, 408-9.

## 11 Anexos

### 11.1 Anexo 1 Protocolo "DNeasy 96"

1. Añadir 10  $\mu\text{L}$  de proteínasa K para una muestra de 50 a 100  $\mu\text{L}$  de sangre a un tubo colector (incluido en el kit), se ajusta el volumen a 220  $\mu\text{L}$  con PBS.
2. Agregar 200  $\mu\text{L}$  de buffer AL
3. Sellar el tubo con la tapa provista, agitar durante 15 segundos y centrifugar a 3000 rpm durante el tiempo que sea necesario para evitar residuos de solución en las tapas
4. Incubar a 56 °C durante 10 minutos
5. Remover la tapas con cuidado y agregar 200  $\mu\text{L}$  de etanol 96% a cada muestra
6. Sellar las tapas de los tubos y agitar (de arriba abajo) durante 15 segundos centrifugar a 3000 rpm durante el tiempo que sea necesario para evitar residuos de solución en las tapas
7. Remover las tapas de los tubos colectores y se transfiere la mezcla de lisis (máximo 900 $\mu\text{L}$ ) a tubos DNeasy 96 (incluidos en el kit)
8. Sellar los tubos DNeasy 96 con tapas "AirPore Tape Sheet" (incluidas en el kit). Centrifugar 4 minutos a 6000 rpm
9. Remover la tapa, cuidadosamente agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1 a cada muestra
10. Sellar cada tubo DNeasy 96 con tapas "AirPore Tape Sheet" y centrifugar 2 minutos a 6000 rpm.
11. Remover la tapa, cuidadosamente agregar 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2
12. Centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos.
13. Colocar cada tubo DNeasy 96 en la correcta orientación en un tubo Elution Microtubes RS (incluidos en el kit).

14. Para eluir el DNA, agregar 200  $\mu$ L de Buffer AE para cada muestra y sellar el DNeasy 96 con tapas AirPore Tape Sheet. Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente (15-25  $^{\circ}$ C). Centrifugar por 4 minutos a 6000 rpm.
15. Recomendación: para el máximo rendimiento de DNA, repetir el paso 14 con otros 200  $\mu$ L de Buffer AE.

## 11.2 Anexo 2 Condiciones de electroforesis

Las muestras fueron cargadas en el gel de la siguiente forma

- 1  $\mu$ L de Buffer de carga a una concentración 5x
- 1  $\mu$ L de Sybr Gold a una concentración 5x
- 3  $\mu$ L de Muestra

El marcador de pares de bases fue cargado de la siguiente forma:

- 1  $\mu$ L de Buffer de carga a una concentración 5x
- 1  $\mu$ L de Sybr Gold a una concentración 5x
- 2.5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O inyectable
- 0.5  $\mu$ L de Marcador de 100 pb.

### 11.3 Anexo 3 Ley de Beer Lambert

Explica que hay una relación exponencial entre la transmisión de luz a través de una sustancia y la concentración de la sustancia, así como también entre la transmisión y la longitud del cuerpo que la luz atraviesa y depende además de “ $\epsilon$ ”, una constante de proporcionalidad denominada coeficiente de extinción que es específica de cada cromóforo. Por lo tanto, si conocemos longitud atravesada por la luz y el coeficiente de extinción (cantidad de luz absorbida en una determinada longitud de onda), la concentración de la sustancia puede ser deducida a partir de la cantidad de luz transmitida que absorbe.

El coeficiente de extinción promedio para el DNA de doble cadena en una longitud de onda de 260 nm es  $-1.020 \text{ cm}^{-1}$ , por lo tanto, una densidad óptica de 1 corresponde a una concentración de 50 g/ml de ADN de doble cadena.

### 11.4 Anexo 4 Fundamento de la secuenciación Sanger

En el cual se hacen cuatro reacciones diferentes de síntesis de DNA utilizando un ddNTP distinto en cada tubo (ddGTP, ddATP, ddCTP y ddTTP) . Se realiza una mezcla del nucleótido normal (dNTP) y su terminador (ddNTP), con la cual se pueden generar fragmentos complementarios de diferentes tamaños que terminan en el mismo nucleótido; éstos fragmentos serán percibidos por un lector óptico y organizado por un programa diseñado para establecer la secuencia conforme al peso molecular de los fragmentos detectados y la terminación de dichos fragmentos ( Figura 19)

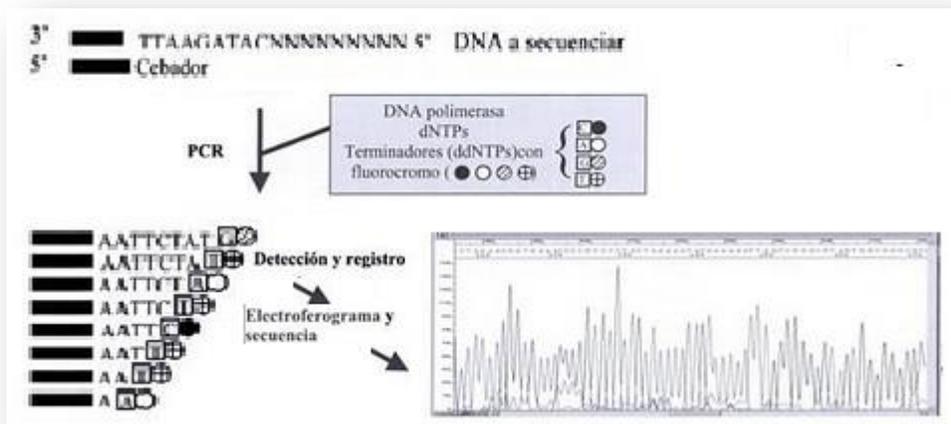


Figura 19 Secuenciación Automática de DNA por el Método de Sanger

## 11.5 Anexo 5 Formato Fasta

Una secuencia bajo formato FASTA comienza con una descripción en una única línea (línea de cabecera), seguida por líneas de datos de secuencia. La línea de descripción se distingue de los datos de secuencia por un símbolo '>' (mayor que) en la primera columna. La palabra siguiente a este símbolo es el identificador de la secuencia, y el resto de la línea es la descripción (ambos son opcionales). No debería existir espacio entre el '>' y la primera letra del identificador. La secuencia termina si aparece otra línea comenzando con el símbolo '>'; esto indica el inicio de otra secuencia.

## 11.6 Anexo 6 Alineamiento mediante Clustal W

Se puede dividir en 3 pasos.

Primer paso: Alineamientos Globales pareados (mediante el algoritmo Needleman-Wunsch) de cada una de las secuencias incluidas en el alineamiento, de tal manera que para un alineamiento de 5 secuencias, el número de alineamientos a realizar será de 10.

Segundo paso: Cálculo del árbol guía a partir del puntaje (o distancia) de los alineamientos pareados realizados en el primer paso. Este árbol puede ser calculado ya sea por cualquiera de los siguientes métodos: UPGMA o neighbor-joining. El árbol describe entonces la relación existente entre las secuencias que van a ser alineadas. No se debe considerar este como un árbol filogenético, sino como guía para ir añadiendo las secuencias al alineamiento múltiple.

Tercer paso: Creación del alineamiento múltiple. El alineamiento de las secuencias se lleva a cabo en el orden determinado por el árbol guía. El algoritmo selecciona primero las dos secuencias más relacionadas y crea un alineamiento pareado de estas, y de manera progresiva va sumando una secuencia al resultado de dicho alineamiento.

