



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Análisis de los exones 3 al 26 del gen *myh7*, en pacientes con miocardiopatía hipertrófica familiar.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br. David G. Guerrero P. Como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutoras: Rosalva Rodríguez (IVIC)

Palmira Guevara (UCV)

**CARACAS, VENEZUELA
Agosto 2011**

DEDICATORIA.

A mi tía Betty, ejemplo de ser un ser humano completo, y a la que Dios le dio una nueva oportunidad de vivir y poder estar mucho años más con nosotros. Tu atención llena de amor fue pilar para concluir con esta gran meta.

A mis Padres y Hermanos, por su gran apoyo y amor.

A mi Dios, UCV y a todas las personas que hicieron posible este logro.

AGRADECIMIENTOS.

Muchas veces, decimos gracias a Dios por todo lo bueno pero Yo también le doy gracias por esos momentos de dificultad en los cuales sirvieron de prueba para continuar con mi fe hacia El, esos momentos en los cuales tropecé y a veces caí, pero donde siempre estuvo Dios para darme ánimos y levantarme, “mil veces se cae el justo y mil veces Dios lo levanta”, y considero la culminación de mi carrera un acto justo, ya que a mi conciencia respecta hice lo mejor de mí para afrontar cada faena con, integridad y dedicación, gracias por todo papá Dios y por tu incansable dedicación para llevarme por un buen camino. GRACIAS!!

Gracias a mi Madre querida Alides y gracias mi Tía Betty por siempre darme su amor, animo y comprensión, siempre protegiéndome afrontándose con muchos y siendo mi escudo en muchos casos, nunca les faltó confianza y fe en lo que hacía y nunca dudaron en que lo iba a lograr, gracias mi Tía por aceptarme como tu hijo y de soportarme con cariño durante estos años, nunca tuvistes fallas! En resumen gracias por este amor verdadero.

Gracias a mi Papá Germán Guerrero, siempre queriendo en bien para mi, en que algunos casos la preocupación lo agobiaba pero el transcurrir del tiempo veía como mis estudios iban tomando buena forma, dándome a medida su apoyo, respeto y aconsejándome de la mejor manera posible.

A mis Hermanos, Germancito, Leo Leo, y la nena Karla, siempre sentí su amor, cariño y sus buenos deseos para que me fuera bien en mi vida, carrera y mi tesis, cada llegada en vacaciones se convertía en una alegría y cada ida se convertía en una esperanza,

ahora, hecha realidad, también gracias por cuidarme y protegerme en los momentos en que los necesitaba y en los cuales pude continuar con el desarrollo de mi tesis.

A la ilustre y espléndida Universidad Central de Venezuela, a la cual traté con respeto y la cual me brindó la oportunidad de formarme como profesional y persona integral, hechos que ocurrieron en su mayoría en la prestigiosa y admirada escuela de Biólogos del mundo, “La escuela de Biología de la facultad de ciencias”, la cual me preparó para afrontar con eficiencia las dificultades en el ámbito profesional, siempre me sentiré orgulloso de decir que soy biólogo de la central.

A mi Pechocha y hermosa novia Milagros, dicen que no se debe colocar el nombre de la novia o el novio en los agradecimientos, yo hago caso omiso a ese mito, para siempre te doy las gracias, eres mi apoyo y te doy la gracias por estar presente en todos estos cinco años y contando. También gracias a su generosa familia.

A tantos amigos y amigas, cada uno en su ámbito y cada uno juntos en mi corazón, Ricardo le puedo decir hermanito pero es sin duda mi mejor amigo, Eduardo gracias por tanta cosas, eres un gran ser humano. Considero que no se necesita ser hijo de los mismos padres para ser hermanos ya que hermano es aquel que está contigo en las malas y en las buenas por eso, Rubén te admito como un hermano más en mi vida. A mi gran querida amiga arlethcita, por sus buenos consejos y apoyo, a Ximena y Grace que dúo! Infinitas gracias por estar presente en mi vida, quisiera decir tantas anécdotas pero son muchas, en fin gracias por permitirme crecer con ustedes durante toda la carrera. También a mis amigas Giselle, FB (Jennire), Maryant, Vanesita, Jamileth y Andrea estupendas mujeres que día a

día fueron llenado mi corazón con júbilo y con las que conté para alcanzar diversas metas. También a sus familiares por aceptarme con amabilidad en sus hogares.

Gracias al resto de mis amigos y amigas tantos viejos como recientes que han colaborado en que este logro se haya consumado: Miguel “Leis”, Manuel Tovar, Freddy, KC, Rous, Wilber, Carlitos Méndez, Cristian, Dennis, Delimar, Gustavo, Esther, Silvia, Mónica, Annamil, Antonio, Rosana, Dennis, Arnelly. Oriana.

A toda mi familia que colaboraron durante mi carrera con gratitud a mi Tío Gordo siempre tendré presente muchos de sus consejos a su hijo Rafael Barrios, Rosalva, mi tío Carlos, Gustavo, mis dos maravillosas abuelas Blanca y Carmen, Gustavito, Blanca Gabriela, Lorena, Alex, Chune, tía Laura, Nohelia, Rosa, Deixis.

Al IVIC, una gran institución con enorme prestigio, que me permitió desarrollar mi tesis y el cual me brindo con apremio el apoyo socio-económico y humano. Considerado como otro hogar en mi vida, donde pude conocer personas valiosas tanto en el ámbito profesional como personal, siempre le estaré agradecido.

Al centro de Biología estructural y su personal que siempre estuvieron dispuesto a ayudarme y colaborar en el día a día de mi trabajo, un grupo muy unido donde prácticamente es el reflejo de una familia, especialmente agradezco a Alex Sánchez técnico y amigo el cuál colaboro puntualmente y con dedicación a todas las peticiones lo que convirtió el trabajo en el laboratorio como ejemplo de eficiencia. Al señor Lorenzo excelente e incansable profesional gracias por todo el apoyo para realizar el modelaje molecular. Al doctor Padrón, por aceptarme en el centro y poder realizar mi tesis, es usted un ejemplo de investigador con excelencia. Al resto del personal: Gustavo Márquez (Súper

S), Yamira, Carmen Delia, Evelyn, Franklin, Guiden, Karina, Odalis, Pinto, Yoyna, Miguel, José, Laguado, Eva, Milagros, Mónica, Verónica.

A mis Tutoras, por su gran esfuerzo y dedicación, Rosalva gracias por tus consejos tanto en el ámbito educativo como en personal, los cuales me sirvieron de mucho para seguir adelante y superar momentos de dificultad en mi vida, gracias por convertirte en una madre mas, gracias por soportar mis terquedades y también por aceptarlas, es notable tu esfuerzo ya que con dos hijos pequeños lograstes atendernos y siempre distes lo mejor al alcance de tus manos y espíritu para que nos fuera muy bien. A mi profe Palmira, por ser ejemplo de trabajo incansable siempre luchando por los derechos de su tutelado, gracias por abrazarme con sus buenos deseos y consideraciones además de estar siempre presta a atenderme.

A todos aquellos que hicieron posible esta meta.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

	Pág.
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
INDICE DE CONTENIDO.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE TABLAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xv
I. INTRODUCCIÓN.....	17
II. MARCO TEÓRICO.....	21
II.1. Sistema cardiovascular.....	21
II.2. Estructura y Funcionamiento del Corazón.....	22
II.3. Tipos de miocardiopatías.....	25
II.3.1. Miocardiopatía dilatada (MD).....	25
II.3.2. Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MAVD).....	26
II.3.3. Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF).....	27
II.3.3.1 Sintomatología de la MHF.....	29
II.4. Diagnóstico clínico de la MHF.....	30
II.5. Tratamiento para MHF.....	32
II.6. Causas de MHF: Mutaciones en Genes que Codifican para las Proteínas del sarcómero.....	34
II.7. Correlación genotipo-fenotipo y diversidad fenotípica de la MHF.....	35
II.8. Importancia del gen <i>myh7</i>	37
II.9. Importancia de la proteína cadena pesada β -miosina cardiaca en la contracción del músculo cardiaco.....	38
III.JUSTIFICACIÓN.....	44
IV. ANTECEDENTES.....	47
V. OBJETIVOS.....	58
VI. METODOLOGÍA.....	59
VI.1 Selección de pacientes.....	59

VI.2. Obtención de las muestras.....	59
VI.3. Aislamiento de ADN genómico.....	60
VI.4. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen <i>myh7</i>	62
VI.5. Diseño de cebadores.....	64
VI.6. Análisis de ADN extraído de sangre total y amplificación por PCR: purificación y cuantificación.....	68
VI.7. Búsqueda de mutaciones en el gen <i>myh7</i>	70
VI.8 .Electroforesis en geles de poliacrilamida. SSCP.....	72
VI.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones no desnaturizantes.....	72
VI.8.2. Preparación de muestras para secuenciación automatizada.....	74
VI.8.3. Análisis por SSCP y comparación de secuencias nucleotídicas.....	74
VI.8.3.1. Evaluación de pacientes por SSCP.....	74
VI.8.3.2. Análisis comparativo de secuencias.....	75
VI.9. Modelado Molecular.....	76
VI.10. Análisis estadístico.....	77
VI.11. Financiamiento.....	78
VII. RESULTADOS.....	79
VII. 1. Análisis descriptivo de la población de estudio.....	79
VII. 2. Análisis molecular.....	79
VII.2.1. Aislamiento de ADN genómico (ADNg).....	79
VII.2.2. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen <i>myh7</i> utilizando la técnica de PCR.....	81
VII. 3. Análisis de la movilidad electroforética de los exones del gen <i>myh7</i> en pacientes con sospecha clínica de MHF mediante el uso de la técnica SSCP.....	85
VII. 4. Análisis de secuencias de pacientes con sospecha de MHF.....	89
VII.4.1. Evaluación in silico de las secuencias de los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen <i>myh7</i>	89
VII. 5. Traducción a proteína de secuencias nucleotídicas con modificación.....	99
VII. 6. Modelado molecular.....	101
VIII. DISCUSIÓN.....	105

VIII.1. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen <i>myh7</i>	106
VIII.2. Diagnostico Molecular.....	109
VIII.2.1. Búsqueda de mutaciones en los exones 3 al 26 del gen <i>myh7</i>	109
VIII.2.2. Análisis Molecular para las muestras de pacientes con sospecha clínica de MHF.....	109
VIII.2.2.1. Mutación en el exón 16 del paciente 001.....	111
VIII.3. Ventajas y desventajas de la técnica SSCP en comparación con otras técnicas moleculares para la búsqueda de mutaciones asociadas a MHF.....	114
VIII.4. Funcionamiento de la proteína cadena pesada de β -miosina cardiaca a través de los cambios estructurales que se producen a partir de la mutación R403Q.....	115
IX. CONCLUSIONES.....	122
X. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.....	123
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	125
XII. ANEXOS.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS.

	Pág.
Figura 1. Circulación de la sangre a través del sistema cardiovascular.....	22
Figura 2. Corte transversal del corazón.....	23
Figura 3. Secuencia de acontecimientos en un ciclo cardíaco.....	25
Figura 4. Organización de los miocitos.....	30
Figura 5. Gen <i>myh7</i> y cadena pesada β de la miosina.....	38
Figura 6. Distribución de algunas mutaciones encontradas en la proteína de β miosina cardiaca asociadas a MHF.....	39
Figura 7. Proteínas del sarcómero.....	40
Figura 8. Esquema estructural de la cadena pesada de la miosina.....	41
Figura 9. Reacciones bioquímicas durante la contracción muscular.....	42
Figura 10. Ciclo bioquímico de contracción muscular.....	42
Figura 11. Esquema estructural de la miosina interaccionando con la actina.....	43
Figura 12. Modelo proteico estructural de la región S1 (cabeza globular) y parte de la región S2 (cuello o palanca) de la proteína β -MyHC.....	44
Figura 13. Diagrama de plan de trabajo.....	61
Figura. 14. Esquema de diseño de cebadores.....	65
Figura 15. Esquema de trabajo para la realización de los modelos moleculares de la región S1 de la cadena pesada β -miosina cardiaca.....	78
Figura 16. Análisis cualitativo del ADNg extraído de sangre periférica por el método de Lahiri y Nurberger 1991.....	81
Figura 17. Análisis cualitativo del ADNg extraído de sangre periférica por el estuche comercial.....	81
Figura.18. Amplificación de los exones 3 al 15 del gen <i>myh7</i>	84
Figura 19. Amplificación de los exones 16 al 26 del gen <i>myh7</i>	84
Figura 20. Alineamiento de secuencias del exon 13 para cada muestra control.....	85
Figura 21. Análisis SSCP del exón 14 del gen <i>myh7</i>	87
Figura 22. Análisis SSCP del exón 16 del gen <i>myh7</i>	88

Figura 23. Análisis SSCP del exón 19 del gen <i>myh7</i>	88
Figura 24. Análisis SSCP del exón 20 del gen <i>myh7</i>	89
Figura 25. Análisis SSCP del exón 21 del gen <i>myh7</i>	89
Figura 26. Alineamiento de secuencias de amplimero 13 del paciente 021.....	91
Figura 27. Alineamiento de secuencias de amplimero 14 del paciente 002.....	92
Figura 28. Alineamiento de secuencias de amplimero 15 del paciente 013.....	93
Figura 29. Alineamiento de secuencias de amplimero 19 del paciente 002.....	94
Figura 30. Alineamiento de secuencias del amplimero 20 del paciente 003.....	95
Figura 31. Alineamiento de secuencias del amplimero 21 del paciente 010.....	96
Figura 32. Alineamiento de secuencia para el exón 16 del paciente 001.....	97
Figura 33. Traducción proteica del exón 16 del paciente 001.....	100
Figura 34. Alineamiento del exón 16 traducido a proteína.....	101
Figura 35. Modelo estructural de la región S1 de la cadena pesada β -miosina cardiaca...	103
Figura 36. Lazo cardiomiopático y en región mutada.....	104
Figura 37. Representación de los aminoácidos por átomos en la posición 403 de la cadena pesada β -miosina cardiaca de humano.....	105
Figura 38. Esquema lineal estructural de la cadena pesada β -miosina cardiaca región S1.....	118
Figura 39. Representación atómica de la posición 403 en el modelo S1 de miosina cardiaca.....	120
Figura 40. Complejo actina-miosina y sitios en S1 implicados en la interacción y regulación de la actividad contráctil.....	121
Figura 41. Interacciones electrostáticas entre los lazos de la miosina con la actina.....	122

ÍNDICE DE TABLAS.

	Pág.
Tabla 1. Características principales de los dos tipos de músculo estriado.....	24
Tabla 2. Características de las principales sintomatología clínica y morfológica de la tres principales miocardiopatías.....	31
Tabla 3. Genes del sarcómero asociados a MHF.....	36
Tabla 4. Secuencias de los cebadores sentidos (5´- 3´) y cebadores antisentidos (3´-5´) para la amplificación de los exones 3 al 26 del gen <i>myh7</i>	63
Tabla 5. Tamaño y ubicación de las regiones amplificadas del gen <i>myh7</i>	65
Tabla 6. Temperaturas sugeridas para la amplificación de los amplimeros que contienen las regiones de los exones de interés.....	68
Tabla 7. Programa usado para llevar a cabo las reacciones de PCRs.....	69
Tabla 8. Número de mutaciones por exon reportadas en la base de datos de cardiogenomics.....	71
Tabla 9. Técnicas aplicadas a cada paciente para la búsqueda de mutaciones en los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23.....	72
Tabla 10. Parámetros de la población.....	80
Tabla 11. Valores comparativos de los métodos de extracción de ADNg proveniente de sangre periférica.....	82
Tabla 12. Parámetros y condiciones para realiza los SSCP de los amplimeros 14, 16, 19, 20 y 21 del gen <i>myh7</i>	86
Tabla 12. Trabajo y resultados encontrados en los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen <i>myh7</i> para las muestras pacientes y controles.....	99
Tabla 13. Características de la mutación reportada Arg403Gln.	102

LISTA DE ABREVIATURA.

- ECV: enfermedades cardiovasculares.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- ACV: Accidentes cardiovasculares.
- MPPS: Ministerio popular para la salud.
- LDL: Lipoproteínas de baja densidad.
- LDLR: Receptores de lipoproteínas de baja densidad.
- ARH: Proteína adaptadora.
- MHF: Miocardiopatía hipertrófica familiar.
- MD: Miocardiopatía dilatada.
- MAVD: Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho.
- TV: Taquiarritmias ventricular o taquicardia ventricular.
- MCS: Muerte cardiaca súbita.
- PA: Potencial de acción.
- FV: Fibrilación ventricular.
- HVI: Hipertrofia del ventrículo izquierdo.
- ASA: Ablación Septal por Alcohol.
- CLR: Cadena ligera reguladora.
- dHPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.
- SSCP: Análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla.
- AM: complejo actina-miosina.
- PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
- DCP: Análisis de polimorfismo por conformación de ADN.
- SNP: Polimorfismo de simple nucleótido.
- HRM: análisis de alta resolución por temperatura de hibridación.

DGGE: electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización.

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida.

DDD: Dual Chamber Pacing

IDC: implantes de desfibriladores cardiaco.

AMP: Adenosin monofosto.

ATP: Adenosin trifosfato.

TGF β 1: factor de transformación de crecimiento.

IGF2: factor de crecimiento de insulina

IVIC: instituto venezolano de investigaciones científicas



RESUMEN:

Búsqueda de mutaciones en los exones 3 al 26 del gen *myh7*, en pacientes con miocardiopatía hipertrófica familiar en Venezuela (MHF).

Guerrero, David.^{1 2} y Rodríguez, Rosalva².

1. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela

2. Centro de Biología Estructural. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

La miocardiomiopatía hipertrófica familiar (MHF) es una enfermedad autosómica dominante con características fisiopatológicas únicas y una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas. Es una enfermedad cardíaca primaria, en la que la característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI). La prevalencia en la población general es de aproximadamente 0.2% (1 en 500). La mortalidad anual para pacientes con MHF es de 3-4%. El curso clínico varía desde pacientes totalmente asintomáticos hasta aquellos con fallas cardíacas graves cuya consecuencia más importante es la muerte súbita.

La MHF se asocia con mutaciones en los genes que codifican proteínas del sarcómero de miocitos. Se han identificado mutaciones en 12 genes sarcoméricos, aunque el gen de la cadena pesada de la β -miosina cardíaca *myh7* es donde se han reportado el mayor número de mutaciones, siendo las mutaciones en el subfragmento S1 de la proteína codificado por los exones 3 al 26 del gen *myh7*, las que producen mayor hipertrofia y

muerte súbita. Es por esto que la estrategia de identificación de mutaciones asociadas a MHF se enfocó mayormente en el estudio de este gen. Ya que existen diversas complicaciones para detectar la MHF, se han desarrollado variedades de técnicas, basadas en criterios moleculares que facilitan el diagnóstico de la enfermedad en su fase preclínica y la estratificación del riesgo. Una de estas técnicas es SSCP-PCR (polimorfismo de conformación de cadena sencilla de ADN) que se ha usado para detectar cambios puntuales en los genes del sarcómero, esta técnica junto con la secuenciación automatizada se implemento en este trabajo para estudiar la naturaleza de los cambios ocurridos en las secuencias codificantes del gen *MYH7*. El estudio se delimito a 9 exones de los 40 exones totales del gen *MYH7* los cuales poseen alta incidencia de mutaciones. Se realizaron SSCP para los exones 14, 16, 19, 20 y 21 analizando las secuencias del restos de los exones perteneciente a cada paciente. Mediante SSCP no se observó diferencias en la movilidad electroforética de las muestras de paciente con respecto a los controles. El análisis directo de secuencias, mostró un cambio en el exon 16 del paciente 001, el cual genera la traducción del mismo aminoácido que los controles y la base de datos. Adicionalmente, se realizo un modelo molecular de la proteína cadena pesada de beta-miosina cardiaca donde se evaluó una mutación previamente reportada. Según los análisis realizados se puede inferir que la mutación interfiere degenerativamente en la interacción actina-miosina.

I. INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV), definidas principalmente como aquellas que afectan al corazón y los vasos sanguíneos, son la principal causa de muerte en el mundo. Para el 2004 las muertes por este tipo de enfermedades se contabilizaban en 17.1 millones de personas lo cual representaba el 29% de todas las muertes a nivel mundial. Según la organización mundial de la salud (OMS) se calcula que para el 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por ECV, específicamente por miocardiopatías y accidentes cardiovasculares (ACV), además, se estima que sigan siendo la principal causa de muerte, sobre todo en países subdesarrollados. (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>).

En Venezuela las muertes por ECV representan el 31% de todas las defunciones según cifras aportadas en el año 2008 por el ministerio popular para la salud (<http://www.mpps.gob.ve/>)

Entre las principales enfermedades cardiovasculares se encuentran: Las enfermedades monogénicas, caracterizadas por elevar los niveles en plasma de lipoproteínas de baja densidad (LDL), como ejemplo de este tipo de enfermedad tenemos: hipercolesterolemia familiar, que produce un aumento en la presión de las arterias coronarias. La principal causa de la hipercolesterolemia son mutaciones en los receptores de proteínas de baja densidad (LDLR). Otro tipo de hipercolesterolemia es la enfermedad de unión defectuosa del ligando apolipoproteína B-100, de carácter familiar autosómico recesivo, siendo la causa una interrupción en el funcionamiento de los receptores LDLR por mutaciones en la

proteína adaptadora ARH. La sitosterolemia que aumenta los niveles de colesterol en sangre debido a mutaciones en los factores ABCG5 y ABCG8 (Bruno y Matthew, 2009).

La hipertensión es otro ejemplo de un tipo de enfermedad cardiovascular, con una prevalencia de 20% en la población general cuya principal causa son mutaciones en genes involucrados en la regulación renal de los iones Cl^- , Na^+ , K^+ . La trombosis y hemostasia, también se ubican dentro del grupo de ECV y están caracterizadas porque el paciente presenta una falla en el sistema de coagulación. Una de sus principales causas es la variante común en el gen del factor V que codifica para la proteína proacelerina (factor lábil de la coagulación), con una sustitución de glutamina por arginina en la posición 506 (Arg506Gln), que impide la degradación del factor V y promueve la formación de coágulos. Las arritmias presentan, como consecuencias clínicas la repolarización anormal de las células cardíacas durante la generación de potenciales de acción, causada por mutaciones en canales de calcio y potasio (Alan E. 2003; Rogers K, 2011).

Una de las más importantes y complejas ECV son las diferentes tipos de miocardiopatías donde encontramos: Hipertrófica familiar (MHF), miocardiopatía dilatada (MD) y miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho. (MAVD)

La miocardiopatía hipertrófica familiar (MHF) es una enfermedad autosómica dominante, cuya causa principal son mutaciones en los genes que codifican proteínas del sarcómero, afectando la contracción muscular y provocando un engrosamiento en el ventrículo izquierdo del corazón, reflejándose en síntomas que incluyen: disnea, síncope y angina, pudiendo conducir a muerte súbita debido a taquiarritmias ventricular o taquicardia ventricular (TV) (Alan E. 2003; Judge y Johnson, 2008).

La MD se caracteriza por dilatación ventricular y discapacidad para la contracción muscular, con una incidencia es de 5-8 casos por cada 100000 personas, y por último MAVD, que afecta principalmente el ventrículo derecho, ocasionando arritmia ventricular sostenida, que puede llevar a la muerte cardíaca súbita (MCS) (Judge y Johnson, 2008; Bruno y Matthew, 2009).

Según la organización panamericana de la salud, las enfermedades cardiovasculares causan una elevada mortalidad y morbilidad a nivel mundial especialmente en países de Latinoamérica y el Caribe como Venezuela (<http://www.paho.org/hia/home.html>). Siendo la MHF la que posee las tasas más altas de muerte súbita en jóvenes y alta morbilidad en ancianos. Esta enfermedad presenta una fisiopatología única y una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas, con prevalencia en la población general de 0,2% (Ramírez y Padrón, 2004; Alcalai y col, 2007). EL diagnóstico clínico de esta patología se hace difícil porque se presenta con diversos niveles de expresividad, e inclusive en cualquier etapa de la vida del paciente, con etiología no definida teniendo alta variabilidad intra e intergenética (Rodríguez y col, 2009), por ende muchos países se han dado a la tarea de estudiar esta enfermedad con la finalidad de poder realizar un diagnóstico utilizando herramientas de biología molecular por ser sensibles, rápidas y no invasivas para descartar o no la presencia de MHF (Richard y col, 2000; Lowey S, 2002; Kawaguchi, 2003; Nanni y col, 2003; Doolan y col 2004; Song y col, 2005; Piva e Mattos y col, 2008; Hussain y col, 2009; Marian A, 2010; Wordsworth y col, 2010).

En este trabajo el principal objetivo es analizar los exones 3 al 26 del gen *myh7* ya que es uno de los principales genes asociados a la MHF, donde se ha reportado hasta un 40 % de los casos (Ramírez y Padrón, 2004). Con este estudio se espera poder contribuir a definir

si los pacientes poseen mutaciones asociadas a MHF, identificar la mutación e inferir cuáles son sus implicaciones en la estructura-función de la proteína, lo que podría servir para estratificar riesgos y ofrecer bases moleculares para el tipo de tratamiento.

II. MARCO TEÓRICO.

El sistema cardiovascular humano está constituido por vasos sanguíneos y el corazón, este último es el órgano motor que permite disgregar sangre en todo el cuerpo llevando oxígeno y nutrientes a las células, e intercambiando CO_2 al medio ambiente, contribuyendo de esta manera a la homeostasis fisiológica.

II.1. Sistema cardiovascular.

El sistema cardiovascular en humano es una estructura anatómica cerrada que conduce y hace circular la sangre. Está conformado por arterias, arteriolas, capilares, venas, vénulas y por supuesto el corazón. Este sistema, se divide en dos circuitos de circulación (figura 1), que son: El circuito pulmonar donde ocurre la difusión de CO_2 al medio ambiente y la entrada de oxígeno a la sangre que se dirige al corazón, y el circuito sistémico donde ocurre la difusión bidireccional de oxígeno y CO_2 en el resto del cuerpo.

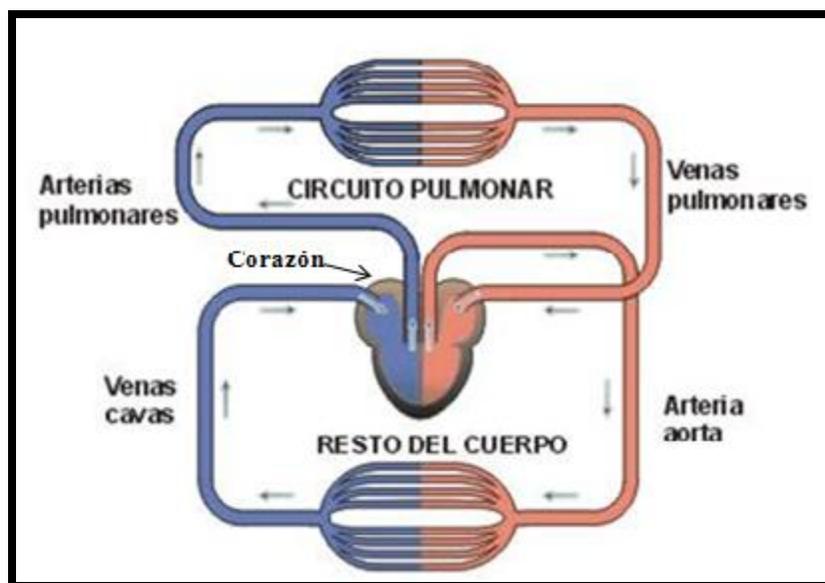


Figura 1. Circulación de la sangre a través del sistema cardiovascular. Las flechas negras indican la dirección del flujo sanguíneo. (Modificado de blognutricionyalimentacion.blogspot.com/2009/02/sistema-circulatorio.html, 2011)

El recorrido de la sangre ocurre a través de las arterias que llevan la sangre oxigenada del corazón hacia los capilares, y las venas que retornan la sangre desoxigenada de las células del cuerpo, al pulmón, siendo en los capilares donde ocurre el intercambio bidireccional entre la sangre y los demás tejidos, transportando principalmente oxígeno (O₂), metabolitos y algunas hormonas, así como intercambiando dióxido de carbono (CO₂) y productos de desecho (www.texasheartinstitute.org/HIC/Anatomy/).

II.2. Estructura y funcionamiento del corazón.

El corazón es una bomba muscular con válvulas que impulsan la sangre por todo el cuerpo. El corazón del humano está constituido por cuatro cámaras, dos aurículas y dos ventrículos (figura 2).

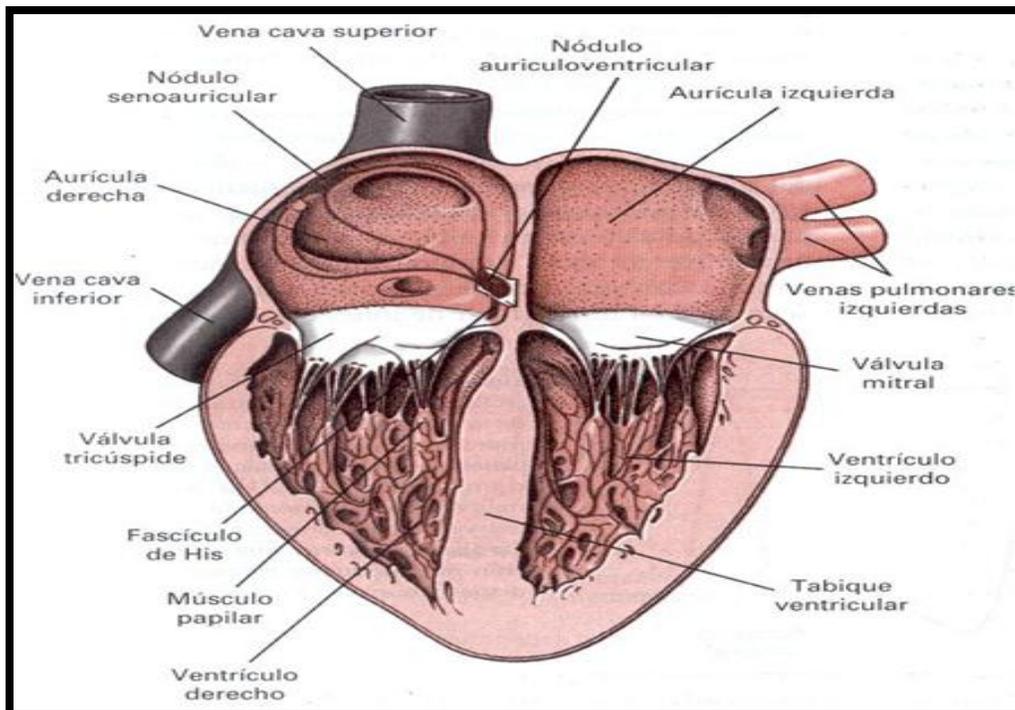


Figura 2. Corte transversal del corazón. Se señala el nódulo senoauricular donde se encuentra la región marcapasos y comienza el PA, se indican las cuatro cámaras y las válvulas que intervienen en la contracción muscular. Tomado de Randall y col, 2002.

El músculo cardíaco es un tipo de músculo estriado, funcional y estructuralmente similar al musculo esquelético (tabla 1). El latido cardíaco consiste en una contracción (sístole) y relajación (diástoles) rítmicas de la totalidad de la masa muscular. La actividad eléctrica comienza en la región marcapasos del corazón y se propaga hacia todos los miocardiocitos (células cardíacas) iniciando un potencial de acción (PA) en cada una de ellos, generando así una contracción rítmica debido a la propiedad de acoplamiento celular a través de las uniones de membranas de los miocardiocitos (Randall y col, 2002; Rogers K, 2011).

Tabla 1. Características principales de los dos tipos de músculo estriado.

Propiedad/componente	Músculo estriado	
	Esquelético	Cardíaco
patrón de bandeo visible	Si	Si
filamentos gruesos de miosina y filamentos delgados de actina	Si	Si
Tropomiosina y troponina	Si	Si
Túbulos transversos	Si	Si
Retículo sarcoplasmático	Bien desarrollado	Bien desarrollado
Mecanismo de contracción	Deslizamiento de filamentos gruesos y finos sobre ellos.	Deslizamiento de filamentos gruesos y finos sobre ellos
Inervación	Nervios somáticos	Nervios autónomos
Iniciación de la contracción	Neurogénico	Miogénico
Papel del ion calcio para la activación	RS	LEC y RS
Uniones hendidas entre fibras	No	Si
Velocidad de contracción	Rápida o lenta dependiendo del tipo de fibra.	Lenta

RS: retículo sarcoplasmático. LEC: líquido extracelular. Tomado de Randall y col, 2002; Rogers K, 2011.

Cuando el corazón se contrae, se producen una serie de acontecimientos secuenciales que involucran cambios de presión y flujo (figura 3) que comprenden los siguientes pasos: 1ro) durante la diástole o período de relajación, las válvulas aórticas

cerradas mantienen grandes diferencias de presión entre los ventrículos relajados y las arterias aorta y pulmonar. Las válvulas auriculoventriculares están abiertas y la sangre fluye directamente desde el sistema venoso a los ventrículos. 2do) Cuando se contraen las aurículas, las presiones aumentan en su interior y la sangre es impulsada a los ventrículos. 3ro) conforme los ventrículos inician su contracción, aumentan las presiones en los ventrículos y superan las del interior de las aurículas. En este momento, las válvulas auriculoventriculares se cierran, evitando así el reflujos de la sangre hacia las aurículas y continúa la contracción ventricular. 4to) La presión interventricular aumenta rápidamente y finalmente supera la presión de las arterias aorta y pulmonar. Las válvulas aórtica y pulmonar se abren y la sangre es expulsada a las arterias, causando un descenso en el volumen ventricular. 5to) Conforme los ventrículos comienzan a relajarse, las presiones interventriculares descienden por debajo de la presión de las arterias, las válvulas aórticas se cierran y se produce una relajación isométrica del ventrículo. Una vez que las presiones ventriculares disminuyen por debajo de las aurículas, las válvulas auriculoventriculares se abren, y se inicia de nuevo el llenado ventricular y se repite el ciclo.

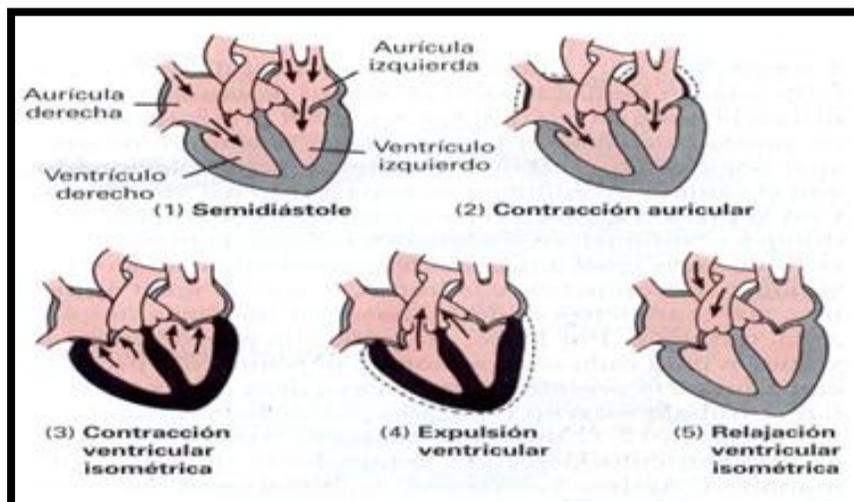


Figura 3. Secuencia de acontecimientos en un ciclo cardíaco. Las flechas indican el movimiento de sangre, en gris se muestra el músculo relajado y en negro el músculo contraído. Modificado de Randall y col, 2002.

Es importante destacar que la presión más alta durante el ciclo cardiaco, se alcanza en el ventrículo izquierdo del corazón cercano a los 120 mm Hg, mientras que en el ventrículo derecho alcanza una presión de 40 mm Hg, teniendo ambos ventrículos en mismo volumen de llenado sanguíneo (Randall y col, 2002).

Los diferentes tipos de miocardiopatías afectan el correcto funcionamiento del ciclo cardíaco (Rogers K, 2011) ya que generan disfunción sistólica o diastólica, donde las principales anomalías se encuentran en el propio miocardio (Dzau y Choong-Chin Liew, 2007).

II.3. Tipos de miocardiopatías.

Entre las miocardiopatías más comunes se encuentran la miocardiopatía dilatada (MD), la miocardiomiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MAVD) y la miocardiopatía hipertrófica familiar (MHF).

II.3.1. Miocardiopatía dilatada (MD).

Es una enfermedad cardíaca primaria, sin causa específica conocida, aunque se ha asociado con factores genéticos de carácter familiar como miocarditis viral ó anomalías del sistema inmunitario, entre otras, en cuanto a los factores genéticos se han descrito genes involucrados en la patología con carácter dominante y recesivo e incluso ligado al cromosoma X. Clínicamente se observa una predominante dilatación ventricular izquierda o incluso de ambos ventrículos con discapacidad contráctil del miocardio. Histológicamente se observan cicatrices en la válvula mitral y tricúspide. Las características fisiopatológicas de MD incluyen un aumento en el volumen ventricular con adelgazamiento de la pared ventricular teniendo de moderada a severa reducción de la función contráctil.

Los principales síntomas clínicos incluyen fatiga, intolerancia a la actividad física y angina (Keller, 2002; Dzau y Choong-Chin Liew, 2007; Peter y Matthew, 2009; McBride y Garg, 2010). Posee una prevalencia en la población de 300-400 pacientes por cada millón de personas, sin embargo otros autores indican que dependiendo del método de diagnóstico los casos varían entre 5 y 8 casos por cada 100000 personas. La complicación diagnóstica se debe a factores como: mutaciones de novo, evaluación incompleta de las genealogías, fenotipos que dependen de la edad, y penetrancia incompleta, siendo responsable de hasta un 30% de mortalidad por muerte súbita (Judge y Johnson, 2008; Peter y Matthew, 2009).

II.3.2. Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (MAVD).

Las manifestaciones clínicas de MAVD a menudo comprenden arritmias que causa muerte súbita principalmente en adolescentes y atletas. Es de carácter autosómico dominante con variante autosómico recesiva, involucrando hasta 7 genes, cinco de las cuales son proteínas de desmosomas. Su etiología es desconocida, la prevalencia en la población varía de 1/5000 a 1/10000 personas, afectando más hombres que a mujeres en una relación 3:1, siendo responsable de hasta un 20% de casos de muerte súbita, de éste total un 15-50% corresponde a casos familiares. La presentación clínica consiste en arritmias de ventrículo derecho con patrones de bloqueo de la parte izquierda del corazón. Patofisiológicamente se caracteriza por una progresiva degeneración presentándose un reemplazo de fibras musculares por ácidos grasos en las paredes del ventrículo derecho quedando aplanado y provocando un adelgazamiento lo que produce inestabilidad eléctrica provocando taquicardia ventricular (VT) o fibrilación ventricular (FV) (Dzau y Choong-Chin Liew, 2007; Judge y Johnson, 2008; Peter y Matthew, 2009).

II.3.3. Miocardiopatía hipertrófica familiar (MHF).

La Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF) es una enfermedad autosómica dominante, con una fisiopatología única y una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas (Ramírez y Padrón, 2004). Es una enfermedad cardíaca primaria, en la que la característica diagnóstica principal es la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) sin dilatación ventricular (figura 4), en ausencia de cualquier otra enfermedad del corazón o sistémica, como desorden de miocitos y fibrosis cardíaca, que tienda a la hipertrofia del miocardio, siendo la principal consecuencia la muerte súbita (Elliott y McKenna, 2004; Ramírez y Padrón, 2004; Alcalai y col, 2007).

La prevalencia en la población general es de aproximadamente 0,2% (1 en 500), cuya mortalidad anual para pacientes es de 3-4%, y alrededor de 6% en niños. Aproximadamente, 60% de los casos indican un historial genético positivo, (Mörner y col 2003; Song y col, 2005; Alcalai y col, 2007) sin embargo, Carneiro y col, 2009 indican que hasta un 90% de los casos son de origen genético y en los casos restantes, no se tiene aún una etiología definida (Ramírez y Padrón, 2004).

La MHF se ha asociado a mutaciones en proteínas del sarcómero cardíaco, mutaciones en proteínas del sistema de regulación del ión calcio en el sarcoplasma y mutaciones de proteínas implicadas en el metabolismo mitocondrial y del procesamiento de glucógeno (Peter y Matthew, 2009). Otras mutaciones se han asociado a genes que se denominan modificadores, involucrados en el arreglo del sarcómero como, por ejemplo, el gen de la enzima convertidora de angiotensina que es el principal componente del sistema renina-angiotensina (Rodríguez y col 2009).

Su principal característica morfológica es la hipertrofia típicamente asimétrica mostrándose difusa o localizada en el ventrículo izquierdo o el tabique ventricular. Aunque la MHF se puede manifestar sin mostrar estas características morfológicas, se puede observar un fenotipo donde se manifiesta un desarreglo de miocardiocitos y miofibrillas provocando desorientación entre células adyacentes (Tanigawa y col 1990, Peter y Matthew, 2009; Rodríguez y col 2009). Uno de los principales problemas al estudiar esta patología es que existe una marcada variación fenotípica, que viene definida por la magnitud y extensión de la hipertrofia del miocardio. En todo caso los cambios que ocurren en la arquitectura de los miocardiocitos traen consecuencias graves como rigidez ventricular y reducción de la distensibilidad ventricular lo que puede conducir a una relajación prolongada llevando al menoscabo del llenado y salida diastólica. El incremento en el grosor de la pared ventricular lleva a su vez a un incremento en la demanda de oxígeno, produciendo muerte celular, fallas eléctricas, aumento de la acidez y fibrosis (Mörner y col 2003; Peter y Matthew, 2009). También puede ocurrir reducción de los vasos coronarios producto de una hipertrofia general del ventrículo (Elliott y McKenna, 2004).

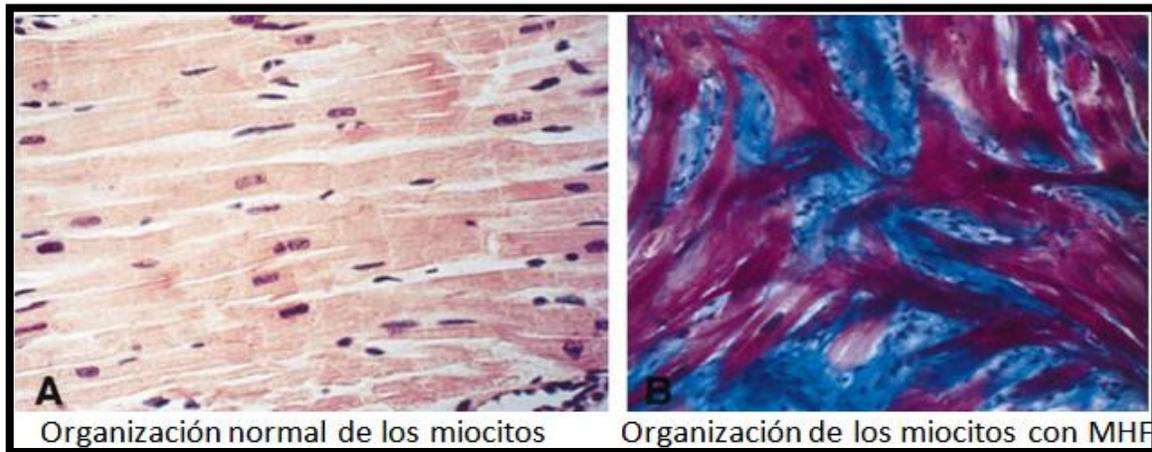


Figura 4. Organización de los miocitos. En un corazón normal (A) y en un corazón con MHF (B) (Tomado de Seidman y Seidman, 2001).

II.3.3.1. Sintomatología de la MHF.

Los síntomas típicos más comunes de MHF incluyen: Dolor de pecho, disnea, palpitaciones, y con menos frecuencia, síncope, siendo las arritmias cardíacas las que predominan en este tipo de paciente, en especial la fibrilación auricular y la taquicardia ventricular no sostenida (Alcalai y col, 2007; Carneiro y col, 2009).

La MHF es una enfermedad que puede aparecer en cualquier etapa de la vida, pero sobre todo después de la pubertad (Elliott y McKenna, 2004), afectando tanto a hombre como a mujeres por igual, sin embargo, los síntomas son más pronunciados en hombre que en mujeres, aunque no se conoce todavía los mecanismos que expliquen esta tendencia (Luczak y Leinwand, 2009). La MHF posee gran variabilidad clínica que va desde personas totalmente asintomáticas, hasta aquellas con síntomas de falla cardíaca y eventualmente muerte súbita, siendo los casos asintomáticos, los de mayor incidencia. La MHF se ha descrito entre adultos jóvenes en edades menores a los 35 años y es una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los ancianos (Ramírez y Padrón, 2004; Tardiff J, 2005; Alcalai y col, 2007; Castro y col, 2009; Rodríguez y col 2009). El porcentaje de pacientes con síntomas severos aumenta con la edad y cuando la enfermedad se presenta en niños y adolescentes, las fallas de corazón son más severas resultando en pronósticos más desfavorables de sobrevivencia (Castro y col, 2009).

Tabla 2. Características de las principales sintomatología clínica y morfológica de la tres principales miocardiopatías.

Miocardiopatías:	MHF	MD	MAVD
Ventriculo	Izquierdo sobre todo la pared ventricular	Izquierdo con dilatación de la cámara ventricular	Derecho con infiltración del ventriculo izq. Sustitución de miocitos por ácidos grasos.
Aurícula	Dilatación de la aurícula Izq.	Dilatación de la aurícula Izq. O dilatación Biauricular.	Dilación aurícula derecha
Hemodinámica	Reducción diastólica	Reducción diastólica y sistólica	A veces reducción sistólica y diastólica.
Electrofisiología	Arritmias ventricular	Arritmias ventricular y deficiencia conducción eléctrica	TV y deficiencia conducción eléctrica
Histología	Hipertrofia y desarreglo miofibrillar	Apoptosis, fibrosis, hipertrofia y atrofia de las miofibras	Infiltración de ácidos grasos por miofibras e inflamación
Síntomas	Disneas, síncope, angina, palpitaciones, embolia y FCH	Fatiga, intolerancia al ejercicio, Angina y FCH.	Síncope y palpitaciones.
Prevalencia	1:500	1:2500	1:5000
Modo de herencia	Autosómica dominante	Autosómica dominante, recesiva y ligado a X	autosómica dominante
Casos familiar	50%	30%	15-50%
Modo de muerte	Muerte súbita	muerte súbita y FCH	Muerte súbita

FCH: falla del corazón por congestión.

Tomado de Randall y col, 2002.

II.4. Diagnóstico clínico de la MHF.

Un diagnóstico primario de miocardiopatía lo constituye el diagnóstico físico clínico y los antecedentes familiares, pero estos criterios sólo pueden ser considerados entre las personas que presenten la sintomatología, además estos criterios suelen ser pocos certeros para discriminar entre los diferentes tipos de miocardiopatías, ya que estas presentan manifestaciones fisiopatológicas similares (tabla 2) (Piva e Mattos y Col, 2008).

El principal criterio fenotípico para el diagnóstico clínico de MHF es la observación de una hipertrofia predominante del tabique interventricular izquierdo la cual se detecta por una evaluación ecocardiográfica, donde se han registrado valores de engrosamiento de la pared, de hasta 20 mm o más, e incluso menores, (entre 13 y 15 mm, siendo el engrosamiento normal para una persona adulta 12 mm de espesor (Louie y col 1986; Ramírez y Padrón, 2004). En general, el 0,2% de las personas con la enfermedad, tienen un grosor de la pared mayor o igual a 15 mm (Castro y col, 2009). Por otra parte, no todo desarreglo miofibrillar, que generalmente se extiende entre un 5 y 30% del tejido del miocardio, tiene una correlación con el grado de hipertrofia, la correlación que existe es baja (Ramírez y Padrón, 2004). Por tanto, en algunos estudios consideran el uso simultáneo del electrocardiograma como técnica complementaria para el diagnóstico de MHF (Castro y col, 2009).

El diagnóstico de las formas genéticas se puede ver afectado por al menos tres factores que son: 1) La evaluación de familias pequeñas con un reducido número de afectados, 2) La adopción de criterios ecocardiográficos muy rígidos y 3) La presencia de mutaciones con penetrancia incompleta. Se discute que este último factor, es el causante de la gran variabilidad estadística en referencia al porcentaje de detección de la MHF (Ramírez y Padrón, 2004; Castro y col, 2009) también se sugiere que puede deberse a mutaciones *de novo* (Alcalai y col, 2007).

Como se ha mencionado, es posible que no se observe una hipertrofia del ventrículo izquierdo, especialmente cuando se estudian casos de niños y adolescentes, por lo cual se recomienda efectuar un electrocardiograma como técnica más adecuada para detectar estos pacientes. Cerca del 50% de adultos portadores del fenotipo, exhiben un grosor de la pared,

normal al ecocardiograma, sin embargo, presentan alteraciones electrocardiográficas, lo que trae como resultado que el fenotipo esté representado por un espectro continuo, que va desde macroscópicamente normal hasta las formas severas que muestran una masiva hipertrofia del miocardio (Ramírez y Padrón, 2004; Borchert y col, 2010).

II.5. Tratamiento para MHF.

Durante los últimos 20 años se ha estudiado la miocardiopatía hipertrófica desde el punto de vista clínico, fisiopatológico y genético, con el propósito de determinar las causas y el desarrollo de la enfermedad así como también, determinar los factores de riesgo que causen muerte entre las personas afectadas, y al mismo tiempo, con las diversas investigaciones se han desarrollado tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes con MHF (Hagège y Desnos, 2009; Wheeler y Pavlovic, 2009).

Entre los tratamientos más comunes se encuentran tanto los procedimientos invasivos como los que no requieren intervención quirúrgica. Entre los primeros destacan: Terapias Eléctricas como por ejemplo: Instalación de un marcapaso bicameral, por su nombre en inglés Dual Chamber Pacing (DDD) e implantes de desfibriladores cardiacos (IDCs). La implementación de estos sistemas es efectiva para evitar muerte súbita así como reanimación y control de la contracción muscular del corazón, sin embargo, la intervención puede resultar complicada por riesgos de infección que implica, además de penetrar áreas con grandes vasos sanguíneos, considerando además la remoción y remplazo cada 5 o 7 años (Sherrid M, 2006). Por otra parte, la Ablación Septal por Alcohol, por su siglas en inglés (ASA), se ha convertido en los últimos años en una importante opción terapéutica para pacientes con síntomas más severos de la enfermedad (Hagège y Desnos, 2009). Y no

es un procedimiento tan invasivo como los anteriormente mencionados. Este último tratamiento consiste en la perforación con una aguja, mediante la oclusión con etanol 96%, de una rama septal con lo cual se persigue reducir el grosor del tabique interventricular hipertrofiado. Con el uso de este tratamiento se ha observado una aguda reducción de la hipertrofia en el 90% de los pacientes tratados. Sin embargo estas intervenciones resultan insuficientes, debido a los múltiples factores etiológicos y no conocidos que intervienen en el desarrollo de la enfermedad, por lo tanto es necesario desarrollar nuevos tratamientos que contemplen el uso de drogas (Seggewiss y Rigopoulos, 2003; Sherrid M, 2006). Como los bloqueadores tipos II de angiotensina en humanos, donde se ha observado una reducción de la masa ventricular (Yamazaki y col, 2007). Como se mencionó anteriormente este sistema participa en el transporte y arreglo estructural de las proteínas del sarcómero. Otras drogas usada en el tratamiento farmacológico actual de pacientes con MHF incluyen el uso de β -bloqueadores (sin actividad simpática intrínseca), bloqueadores de los canales de calcio (sin actividad vasodilatadora) como disopiramida y diltiazan. Los β -bloqueadores son el pilar de la terapia y la primera opción en todos los pacientes, a menos que exista una contraindicación, sus efectos beneficiosos se deben en parte a que previenen el aumento de los niveles de catecolaminas, las cuales aumentan la frecuencia cardíaca, la contractilidad ventricular y la rigidez. Los efectos colectivos de los β -bloqueadores conducen a la relajación ventricular, mejorando y aumentando el tiempo de llenado diastólico y, por lo tanto, a la mejora de la presión diastólica. Además, el tratamiento con β -bloqueadores reducen las arritmias ventriculares y supraventriculares. Sin embargo, aún no se han establecido los efectos del tratamiento con bloqueadores beta en la muerte del tejido cardiovascular y el riesgo de muerte súbita cardíaca. Los Bloqueadores de los canales de calcio como disopiramida y diltiazan también son beneficiosos, en parte, a través de sus

efectos negativos inotrópico (reducción de la fuerza de contracción) y cronotrópico (reducción de la frecuencia de contracción) (Marian A, 2009).

II.6. Causas de MHF: mutaciones en genes que codifican para las proteínas del sarcómero.

Se ha relacionado la MHF con mutaciones en más de 12 genes (Castro y col, 2009). Siendo los genes del sarcómero los mayormente afectados (Ahmad y col, 2005) con un reporte más de 630 mutaciones diferentes (Xu y col, 2010), y la frecuencia en la incidencia de las mutaciones varía para cada gen de acuerdo a las poblaciones estudiadas. Hasta ahora los genes *MYH7* y *MYBPC3* han sido los que poseen los más altos reporte de mutaciones relacionadas con MHF (Keller y col 2009) (ver tabla 3). También se ha encontrado que aproximadamente un 5% de pacientes con hipertrofia cardiaca, poseen mutaciones en genes que no codifican para proteínas del sarcómero (Alcalai y col, 2007). Algunos de éstos genes son: *KCNQ4* que codifica para un canal de potasio dependiente de voltaje (Ramírez y Padrón, 2004). *PRKAG2* que codifica una proteína quinasa activada por una subunidad de AMP (adenosin monofosfato), gen *GLA* que codifica para la α -galactosidasa y *LAMP2* gen que codifica para la proteína 2 de unión de membrana de lisosoma (Hershberger y col, 2009).

Tabla 3. Genes del sarcómero asociados a MHF.

Locus	Símbolo	Gen	Número de mutaciones	Porcentaje de acuerdo al N° de mutaciones
1q32	<i>TNNT2</i>	troponina cardiaca T2	39	7,10%
2q31	<i>TTN</i>	Titina	<5	1%
3p21	<i>MYL3</i>	cadena ligera esencial de la miosina	7	1,30%
3p21-p14	<i>TNNNC1</i>	troponina C cardiaca	7	1,30%
11p11.2	<i>MYBPC3</i>	proteína C de unión a miosina	187	33,90%
12q23-q24	<i>MYL2</i>	cadena ligera reguladora de la miosina	7	1,30%
14q12	<i>MYH7</i>	cadena pesada β -miosina cardiaca	233	42,30%
14q12	<i>MYH6</i>	cadena pesada α -miosina cardiaca	<5	1%
15q14	<i>ACTC</i>	actina cardiaca	7	1,30%
15q22	<i>TPM1</i>	α -Tropomiosina	15	2,70%
19p13.2	<i>TNNI3</i>	troponina I cardiaca	37	6,70%

Tomado y modificado de Xu y Col, 2010.

II.7. Correlación genotipo-fenotipo y diversidad fenotípica de la MHF.

La diversidad clínica de la MHF se refleja por el amplio espectro de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del sarcómero, además de una diversidad genéticamente heterogénea, donde se incluyen otros genes que no codifican proteínas del sarcómero y que influyen directa o parcialmente en el desarrollo de la enfermedad, y por tanto en su manifestación clínica, además de genes ambientales y estilo de vida de la persona, que pueden contribuir a agravar la enfermedad (Alcalai y col, 2007). Tomando en cuenta esta información se ha creado una clasificación de mutaciones según su efecto fenotípico y antecedentes familiares en dos grupos: leves-benignas y moderadas-malignas, las mutaciones leves-benignas son aquellas que se encuentran ligadas a pacientes con o sin historia familiar positiva, y de baja a moderada penetrancia, síntomas leves y no asociadas a

muerte súbita cardíaca o a otros eventos cardíacos severos como trasplante de corazón, miectomia y fallas graves del corazón, este tipo de mutaciones se encuentran principalmente en las proteínas α -actina cardíaca, CLR (cadena ligera reguladora), cMyBPC y con más baja incidencia en α -Tm, por otro lado las mutaciones moderadas-malignas, están asociadas a pacientes con o sin historial positivo, pero la sintomatología aparece a edades más temprana, porque se registra una alta penetrancia que involucran o no la muerte súbita, con síntomas que van de moderados a severos, donde mucho de los pacientes muestran fibrilación atrial, lo que conlleva en algunos casos a requerir implantes de desbriladores o miectomia. Los genes más afectados son *CTNT*, *MYH7* y *MYBPC3* (Xu y col, 2010). Sin embargo, la etiología de la enfermedad aún no está totalmente definida y por lo tanto el mecanismo por el cual las mutaciones afectan la estructura y funcionamiento del corazón, no se ha explicado con exactitud, de hecho, estudios realizados en familias con MHF indican variabilidad clínica en la expresión de la enfermedad en individuos con mutaciones idénticas (Arad y col, 2002). La diversidad genética puede verse influenciada además por diversos genes que están involucrados en el crecimiento y remodelaje del músculo cardíaco, (sistema renina-angiotensina-aldosterona), factor de transformación de crecimiento ($TGF\beta 1$), factor de crecimiento de insulina (IGF2) y otras enzimas que aparecen en grandes cantidades cuando el genotipo del individuo es homocigoto, como es el caso de la enzima convertidora de angiotensina. Otros factores que contribuyen a la variabilidad del fenotipo en la MHF son las influencias ambientales como por ejemplo, la dieta, el estilo de vida, y el ejercicio. En este último caso a pesar de que se recomienda la práctica de ejercicio para evitar infartos y enfermedades al

corazón, se ha descrito en modelos de ratones con MHF, que cierta carga de trabajo, deriva en muerte súbita (Alcalai y col, 2007).

II.8. Importancia del gen *MYH7*.

El gen *MYH7* codifica para la proteína β -miosina cardiaca (β -MyHC), y es la principal isoforma del ventrículo humano. La cadena pesada de la miosina es por su masa, el principal componente del filamento grueso del sarcómero y proporciona la función motora de la contracción del músculo cardíaco. Se ha observado que la mayoría de los pacientes con MHF presentan mutaciones en este gen. El gen *MYH7* está ubicado en el cromosoma 14q11.2q13, compuesto por 40 exones y codifica un ARNm de 6 Kb y una proteína de 220 kDa, con 1935 aminoácidos (ver figura 5). Donde la mayoría de las mutaciones encontradas en este gen se localizan en los primeros 23 exones (Nanni y Col, 2003; Ramírez y Padrón, 2004; Castro y col, 2009).

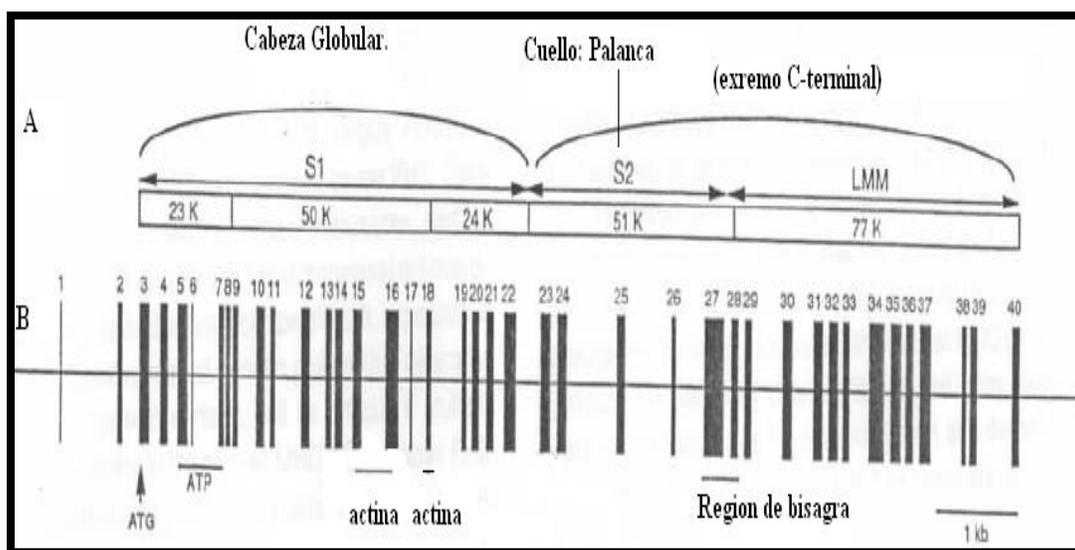


Figura 5. Gen *MYH7* y cadena pesada β de la miosina. (A). Representación esquemática de la proteína β -MyHC codificada por el gen *myh7*, con sus dominios y masa molecular (B). Organización intrón-exón del gen *myh7*, debajo se muestra los sitios de importancia metabólica y los sitios de unión con la actina en la contracción muscular (Modificado de Anja y col, 1990).

Esta región es de gran importancia ya que los primero 23 exones codifican para el dominio motor y el dominio regulador de la cabeza de miosina (Houdusse, 1999). También se han encontrado mutaciones en la cola de la proteína pero sin asociación con hipertrofia (Ramírez y Padrón, 2004).

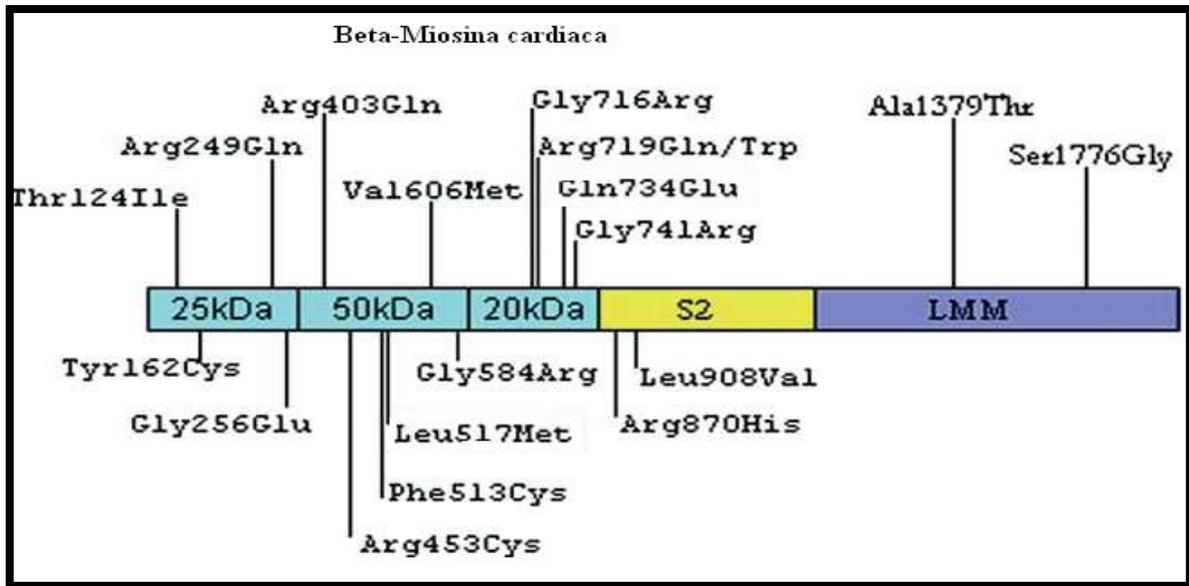


Figura 6. Distribución de algunas mutaciones encontradas en la proteína de β miosina cardiaca asociadas a MHF. Según el reporte realizado por Nanni y col, 2003.

II.9. Importancia de la proteína cadena pesada β -miosina cardiaca en la contracción del musculo cardiaco.

El sarcómero es la unidad contráctil elemental que constituye el músculo, y se encuentra integrado por al menos 28 proteínas diferentes (Ramírez y Padrón, 2004). En la figura 1 se muestran las principales proteínas del sarcómero (Arad y col, 2002; Ramírez y Padrón, 2004).

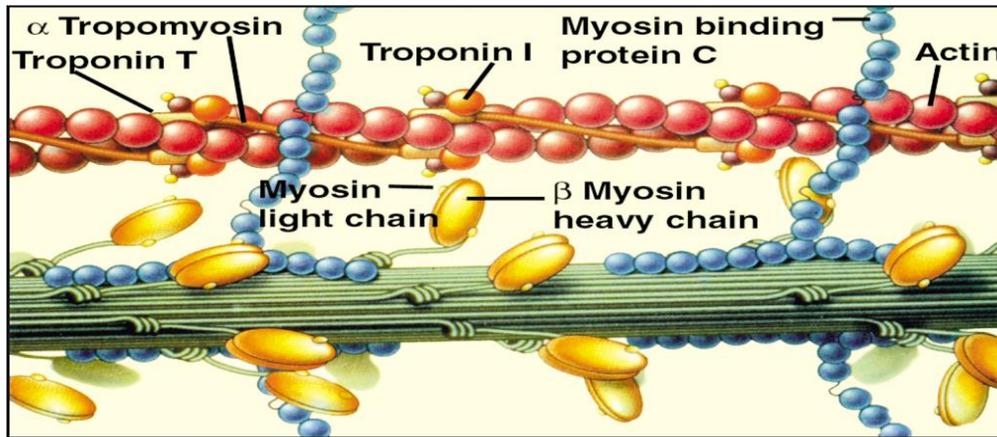


Figura 7. Proteínas del sarcómero. Se muestran los filamentos delgados y gruesos representados por la actina y la miosina respectivamente, también se muestran algunas proteínas reguladoras. En la figura se representa las proteínas α -Tropomiosina (α -tropomyosin), Troponina T (Troponin T), Troponina I (troponin I), proteína C de unión a miosina (Myosin binding protein C). Actina (actin), cadena ligera de la miosina (myosin light chain) y la cadena pesada β -miosina cardíaca (β -myosin heavy chain). Modificado de Arad y col, 2002.

Cada proteína se ha denominado según su funcionamiento, dentro del sarcómero. Así, se agrupan como proteínas contráctiles, la miosina y la actina, las cuales forman filamentos poliméricos que se ensamblan entre sí para generar fuerza y acortamiento del sarcómero, también están las proteínas reguladoras, como la troponina y la tropomiosina, encargadas de controlar la contracción del sarcómero en respuesta a la concentración de Ca^{2+} y por último, las proteínas estructurales que estabilizan y mantienen la estructura del sarcómero, entre ellas la proteína enlazadora de miosina, la titina y la nebulina (Ramírez y Padrón, 2004).

En cuanto al papel de la miosina, es una proteína hexamérica formada por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras no idénticas, las cadenas pesadas están formadas por dos dominios separados: Una cabeza globular unida a una cola α -hélice por una región de bisagra. Las cabezas, localizadas en el extremo amino-terminal de la proteína, contienen la región catalítica de la ATPasa, y un lugar de unión para la actina. Además, las cadenas ligeras están unidas a cada cabeza por la región de unión cabeza-cola, también llamada “cuello” o “sub-fragmento-1” (S1) (Figura 8) (Ramírez y Padrón, 2004)

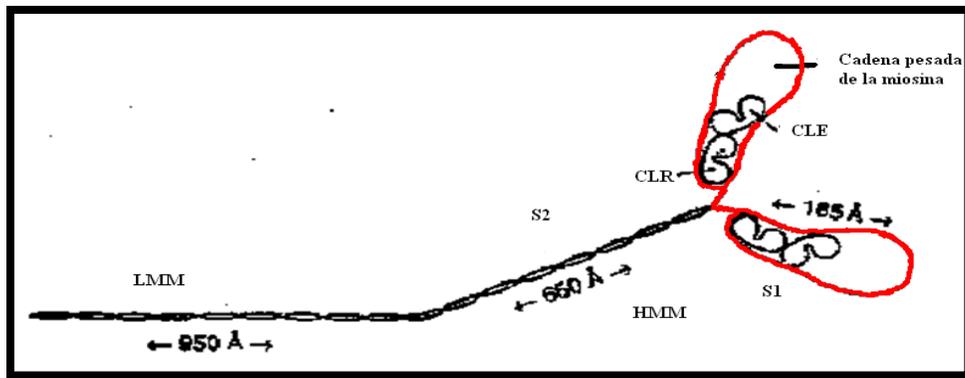


Figura 8. Esquema estructural de la cadena pesada de la miosina. Se muestra la región S1 o cabeza globular unida a la región cuello S2, en color rojo se resalta las cabezas globulares de la miosina. LMM: meromiosina ligera y HMM: meromiosina pesada. Modificado de Lowey y col, 1969.

Para explicar la contracción muscular, la teoría de los filamentos deslizantes es la más aceptada, esta teoría establece que durante la contracción muscular los sarcómeros se acortan debido a que los filamentos delgados de actina se deslizan activamente entre los filamentos gruesos de miosina (Holmes y Col, 2003; Himmel, 2002). El proceso tira a los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero, y como los filamentos delgados están anclados en los discos Z, los sarcómero se acortan, cuando el musculo se relaja o es estirado, se reduce el solapamiento entre los filamentos gruesos y delgados y el sarcómero se alarga (Gourinath, 2003).

Desde el punto de vista bioquímico, ocurre una serie de reacciones, tomando como punto de partida la formación de complejo actina-miosina (AM), que en presencia de ATP, causa una rápida disociación del complejo formando actina y miosina unida a ATP, cuando el ATP se une a la miosina se hidroliza rápidamente formando ADP y Pi (fosfato), los cuales se separan de la miosina muy lentamente (Yengo y Sweeney, 2004). Por tanto, la tasa de hidrólisis de ATP por la miosina es muy lenta y el paso limitante de la velocidad de contracción es la liberación de ADP y Pi por la miosina (Yengo y Sweeney, 2004). Sin embargo, cuando la actina se une a la miosina, la liberación de ADP y Pi se acelera

enormemente, debido a que se produce un cambio alostérico en la conformación de la miosina. Este efecto inducido por la actina incrementa enormemente la velocidad a la que la miosina puede hidrolizar ATP:

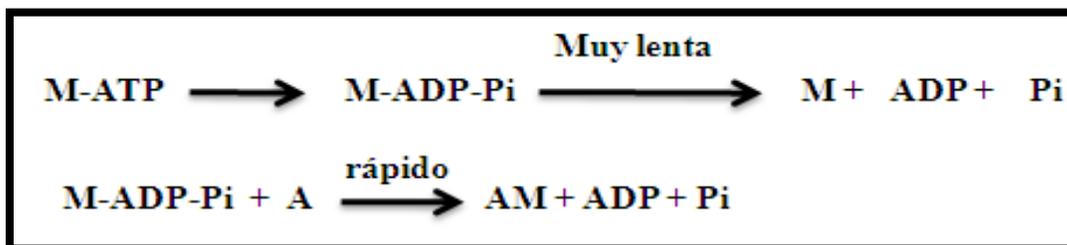


Figura 9. Reacciones bioquímicas durante la contracción muscular. M (miosina), A (Actina). Modificado de Randall y col, 2002; Coureux y col, 2004.

Debido a que la unión de la actina al complejo miosina-ADP-Pi libera energía, la formación de actomiosina (AM) está favorecida cinéticamente. La combinación de estas reacciones produce un ciclo de unión y separación (Figura 10). El efecto neto de una vuelta de este ciclo, es la hidrólisis de una molécula de ATP en ADP + Pi liberando energía (Coureux y col, 2004; Yengo y Sweeney, 2004).

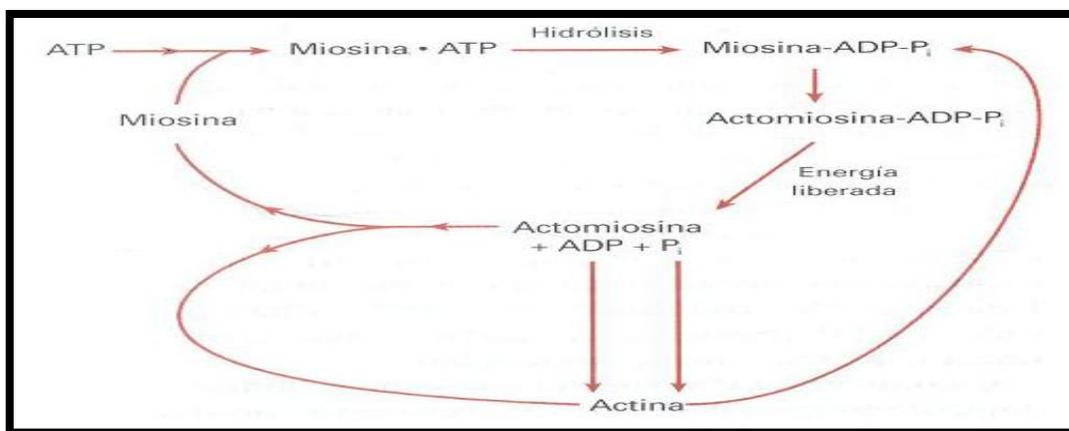


Figura 10. Ciclo bioquímico de contracción muscular. Modificado del Randall y col, 2002.

Durante la contracción muscular la unión de ATP a la actomiosina, divide la molécula en actina y miosina. La miosina actúa luego como una ATPasa, hidrolizando ATP, pero la liberación de los productos ADP y Pi es lenta salvo que la actina vuelva a

unirse a la miosina, incrementando la tasa de liberación (figura 10) (Van Dijk y col, 1998). Desde el punto de vista estructural, la hipótesis más aceptada es la rotación de miosina respecto al filamento de actina, y así el brazo resulta estirado elásticamente, almacenando energía mecánica en el cuello de la molécula de miosina (Jon Kull y Endow, 2004). De acuerdo a esta hipótesis, la rotación se produce en puntos específicos de unión de la cabeza de miosina interaccionando secuencialmente con puntos de unión sobre el filamento de actina. Algunos de estos puntos de unión están ubicados en la cabeza globular de la miosina, en los dominios denominados Lazo-C (loopC) y Lazo miocardiopático (loop miocardiopático) (Ajtai y col, 2003) (figura 11).

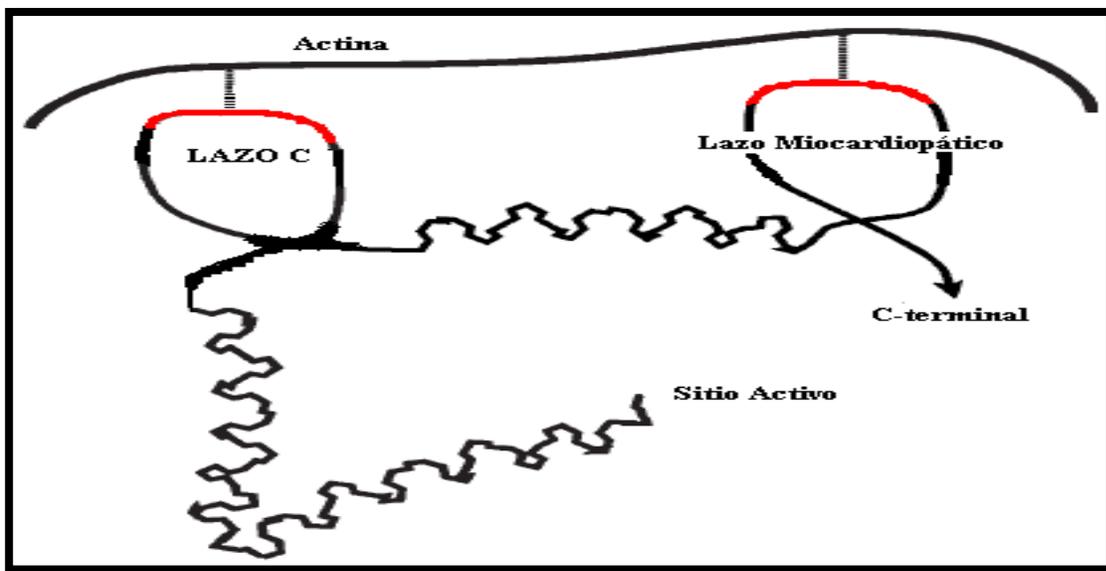


Figura 11. Esquema estructural de la miosina interaccionando con la actina. En rojo se enmarca las regiones de contacto con la actina perteneciente a los dominios denominado lazo C y lazo cardiomiopático. Se muestra el lugar de la región catalítica en dirección N-terminar (Ajtai y col, 2003).

Esta interacción secuencial produce un giro, o una rotación, de la cabeza de miosina, causando un tirón sobre el brazo del puente cruzado que conecta la cabeza de miosina con el filamento grueso. La tensión en el brazo se trasmite al filamento de miosina, cuando se ha completado la rotación de la cabeza de miosina, ésta se disocia del filamento de actina y

gira hacia atrás a su posición relajada. La separación de la cabeza de miosina depende del enlace de Mg^{+2} -ATP al lugar con actividad ATPasa de la región de la cabeza (Lorenz y Holmes, 2010)

La interacción actina-miosina en la contracción muscular comprende los aminoácidos 204-216 ubicados lazo 1, 400-418 del el lazo cardiaco y 627-646 para el lazo miocardiopático de la miosina. En la figura 12 se muestran los lazos involucrados en la contracción muscular, y el sitio activo donde se produce la hidrólisis de ATP. Posteriormente produce un cambio conformacional que genera el desplazamiento de los lazos a través de la actina (Bobkov y col, 1996). Mutaciones en estas regiones son relevantes ya que interfieren con la unión actina-miosina, así como en la velocidad de desplazamiento y sobre la actividad ATPasa de la proteína, pudiendo llevar a MHF (Xu y col, 2010).

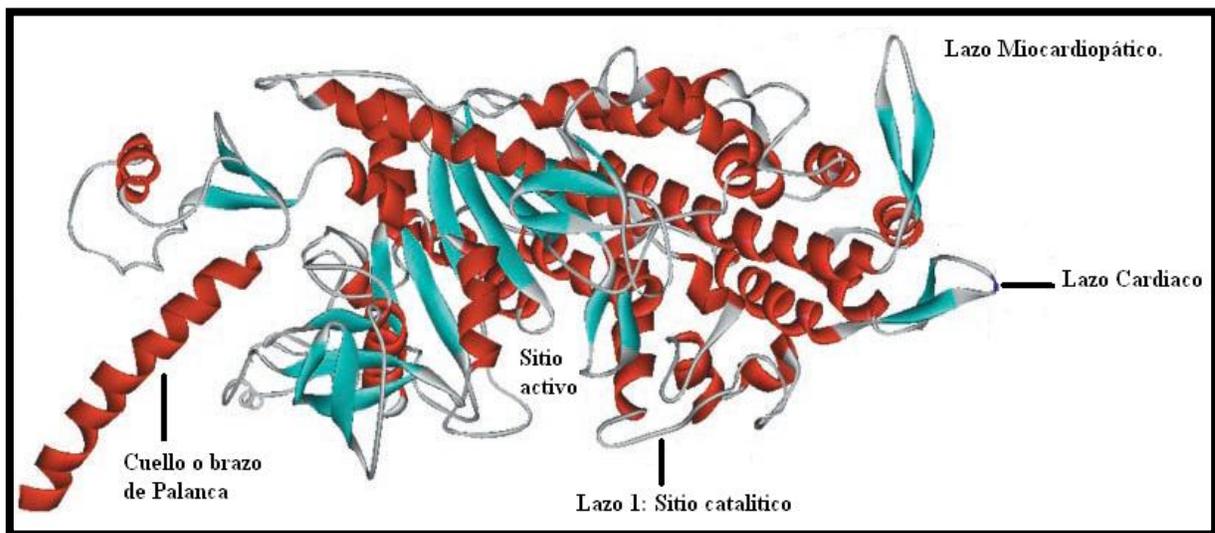


Figura 12. Modelo proteico estructural de la región S1 (cabeza globular) y parte de la región S2 (cuello o palanca) de la proteína β -MyHC. Se muestra el sitio catalítico o el lazo 1 que se moviliza para la entrada de ATP y Mg^{+2} . Modificado de Ajtai y Col, 2003.

III. JUSTIFICACIÓN.

Según la organización mundial de la salud para el año 2010, la mortalidad por miocardiopatías alcanzó el 80%.

Siendo el tipo MHF contribuyente principal de esta cifra, esta es una enfermedad autosómica dominante y hereditaria (Ramírez y Padrón, 2004) cuya consecuencia más grave es la muerte súbita (Rodríguez y col, 2009). Esta patología tiene como causa principal mutaciones en genes que codifican para proteínas del sarcómero siendo el gen *myh7*, donde se ha reportado el mayor número de casos Como se describió en el segmento anterior este gen codifica para la proteína β -MyHC la cual tiene un importante papel en la contracción muscular ya que cumple una función motora dentro del sarcómero siendo la principal proteína constituyente. Entre un 30-50% de los casos de MHF están vinculados al gen *MYH7*, (Ramírez y Padrón, 2004; Rodríguez R, 2010) registrando más de 230 mutaciones diferentes en comparación con las 185 mutaciones diferentes del gen *mybpc3* que es el segundo más afectado y que representa alrededor del 30% de los casos de MHF (Hershberger y col, 2009).

El estudio del gen *MYH7* es relevante ya que las mutaciones encontradas en la cabeza globular (región S1) y parte del cuello (región S2) codificada por los exones 3 al 26 de la miosina muestra una gran penetrancia donde la mayoría de los individuos desarrollan una importante hipertrofia y las más alta tasas de muerte súbita (Richard y col, 2003; Dandona y Roberts, 2008). Además la tendencia indica que el número de mutaciones asociadas con la MHF sigue en aumento (Maron y Salberg, 2006). En Venezuela hasta ahora no existen reportes epidemiológicos que describan el espectro de mutaciones asociadas a la MHF, y dadas las características estructurales y funcionales que presenta este

gen, así como tampoco su asociación con la patología, resulta muy interesante y pertinente además de importante realizar estudios epidemiológicos en pacientes con sospechas de MHF en la población venezolana, que detecten las mutaciones y que además se pueda establecer una asociación fenotipo-genotipo, lo que finalmente contribuirá para discutir sobre el tipo de tratamiento a aplicar por los médicos y especialistas, además nos pudiera permitir estratificar los riesgos de los pacientes y sus familiares. Así mismo este conjunto de conocimientos asociados a la búsqueda e identificación de mutaciones nos aportará información que contribuyan a conocer los mecanismos por los cuales estas modificaciones causan la enfermedad cardíaca.

Para la búsqueda de mutaciones existen varias técnicas moleculares, en este trabajo se utilizara el SSCP por sus siglas en ingles (Polimorfismo de conformación de cadena simple) que tiene como principales características que es una técnica de fácil manipulación y aplicación, bajo costo, rápida y sencilla (Cotton y col, 1988; Nollau y Wagener, 1997; Castro y col, 2003; Estrada-Cuzcano y col, 2005; Liu y col, 2005; Castro y col, 2009). En conjunto con esta técnica, se requiere la secuenciación automatizada para obtener la identificación de las posibles mutaciones, que serán visualizadas y analizadas principalmente con el programa MAC vector versión 11.1.2. El estudio contempla el uso de recursos bioinformaticos de servidores públicos disponibles en internet, usando bases de dato secundarias, como lo son NCBI, EBI y cardiogenomics ampliamente usadas en diversas investigaciones (www.ncbi.nlm.nih.gov/; cardiogenomics.med.harvard.edu/)

El análisis de la proteína cadena pesada beta miosina, involucra la realización de modelos *in silico* de la proteína β -MyHC (Coureux y Col, 2003) con la intención de estratificar riesgos de acuerdo a las mutaciones encontradas, y así poder determinar un

efecto sobre la estructura de la misma y las posibles modificaciones en la interacción con otras proteínas del sarcómero, ofreciendo información al personal médico tratante de los pacientes sobre los riesgo asociados al cambio estructural y funcional (Lorenz y Holmes, 2010).

I.V. ANTECEDENTES.

Aunque el aspecto clásico de la hipertrofia asimétrica del septo interventricular es una de las principales características fenotípicas de la MHF, no había sido descrita sino hasta 1869 por Liouville y Hallopeau. La miocardiopatía hipertrófica surgió como una entidad clínicamente aceptada sólo en la década de 1950 con la descripción de la obstrucción funcional del ventrículo izquierdo por Sir Russell Brock, (Elliott y McKenna, 2004) y de la hipertrofia septal asimétrica por Teare Donald (Teare D, 1958). Después de la publicación de estos artículos, hubo un período de intensa investigación clínica en la que se definieron las características morfológicas y hemodinámicas de la enfermedad. Muchos de los pseudónimos utilizados para la enfermedad durante este período por ejemplo, estenosis subaórtica hipertrófica idiopática, ponen de relieve cómo el trastorno general se pensaba que era exclusivamente caracterizado por un cambio en el gradiente de la presión dinámica subaórtica (Elliott y McKenna, 2004).

Esta opinión fue reforzada con la implementación de nuevas técnicas diagnóstica como el electrocardiograma, que puede detectar hipertrofia septal y determinar obstrucción de la región subaórtica. Pero no fue sino hasta el desarrollo y aparición de la técnica de ecocardiograma bidimensional, que se obtuvieron mejores detalles macroscópicos para la detección de MHF. Esta técnica dejó al descubierto que los patrones de hipertrofia eran mucho más heterogéneos, y que la obstrucción del flujo en reposo estaba presente sólo en una minoría de los pacientes. En la década de los años 80, los trabajos sobre la fisiopatología clínica de la enfermedad avanzan, y aumentan también la aparición de más casos familiares, lo cual motivó esfuerzos para identificar el defecto genético subyacente (Maron y col, 1981). En 1989 Jarcho y col, empleando análisis de ligamiento, localizaron el

primer locus relacionado con la enfermedad, ubicado en el cromosoma 14 banda q1 y posteriormente fue descrito como CMH1. Un año después se identificó la primera mutación asociada a la MHF identificada en el gen que codifica la cadena pesada de miosina, cuyo cambio consistió en la sustitución del aminoácido alanina por serina en el exón 27 (Geisterfer-Lowrance y Col, 1990). Desde ahí, se han descrito una gran cantidad de mutaciones en el gen *MYH7*, como en el trabajo de Fananapazir y col, 1993 en cuyo estudio se aplicó PCR, análisis por Southern Blot y SSCP reportando hasta 6 mutaciones distintas, dos de ellas reportadas previamente, R403Q y la L908V. La estrategia usada para analizar este gen fue analizar los 40 exones y sus regiones flanqueantes, además realizaron un análisis histológico de los pacientes con dichas mutaciones encontrando desarreglo miofibrilar en cada uno de ellos.

Para la década de los 90 comenzaron los estudios para determinar los efectos fenotípicos en la contracción muscular, para ello se llevaron a cabo ensayos de movilidad *in vitro* (*in vitro motility*) e *in vivo*, (Marian y Roberts, 1995). Los estudios *in vitro* con diversas mutaciones en beta-MHC y troponina T indicaron que el defecto deteriora algún aspecto de la contracción a través de mecanismos como una disminución en la unión de la miosina a la actina o una disminución en la generación de actividad ATPasa a estos. Tanto los ensayos *in vitro* como *in vivo* demostraron que la proteína mutante se incorpora en la miofibrillas del sarcómero, siendo los ensayos *in vivo* los que determinaron que la hipertrofia y el aumento del tejido fibroso parecen ser las respuestas compensadoras al defecto genético, supuestamente debido a la liberación de factores de crecimiento. En general la metodología en este tipo de trabajos (Sata y col, 1996 y Cuda y col, 1997), se basó en clonar el gen de la proteína cadena pesada de β -miosina que luego de expresarla se

utilizaba para realizar los ensayos *in vitro*. En uno de estos ensayos se realizó la comparación de la actividad ATPasa y midiendo la velocidad máxima ATPasa de la miosina silvestre con respecto a las miosinas mutadas, en cual se media el nivel basal de hidrólisis de ATP y su velocidad catalítica colocando EDTA y posteriormente se media el nivel máximo de ambas variables colocando Ca^{+2} . En todos los casos la actividad ATPasa y velocidad máxima (V_{max}) de las proteínas mutadas estuvo por debajo de la actividad ATPasa (480 nmol Pi/mg por min) y V_{max} (3,31) de la proteína silvestre. Otro ensayo realizado en el mismo trabajo evaluó la velocidad de deslizamiento sobre el filamento grueso de actina, de la proteína silvestre con proteínas que presentaban las siguientes mutaciones Arg249Gln, Arg403Gln, Arg453Cis y Val606Met, las cuales disminuían significativamente la velocidad de deslizamiento sobre la actina, en especial la mutación Arg403Gln y Arg453Cis cuya velocidad estaba por debajo de los 0,5 $\mu\text{m/s}$, siendo la velocidad de la proteína silvestre mayor a 1,5 $\mu\text{m/s}$. La tendencia de este trabajo concuerda con los valores obtenidos en el trabajo de Cuda y col, 1997, donde de igual forma la proteína mutada Arg403Gln obtuvo valores por debajo de 0,127 $\mu\text{m/s}$. Pero antes de estos trabajos en 1995, Rayment y col, desarrollaron el primer modelo proteico estructural de la beta miosina cardíaca con el propósito de estratificar los riesgos relacionados con mutaciones en dicha proteína. La estructura generada se definió usando el molde o plantilla de la proteína cristalizada beta miosina de pollo con un alineamiento de 79% de similaridad con la proteína beta miosina cardíaca de humano. En este trabajo se determinó que la mayoría de las mutaciones reportadas estaban localizadas en la región S1 de la proteína y que otras se ubicaron en la región proximal S2, es decir cerca del brazo de palanca, aunque ninguna de las mutaciones afectaba considerablemente el plegamiento de la proteína, se sugirió podrían afectar la traducción de energía y la capacidad de movimiento por la

modificación de las interacciones entre átomos de la molécula. Más adelante hacia finales de los años 90 se desarrollaron trabajos que demostraron el carácter hipertrófico de diversas mutaciones en el gen *MYH7*, como por ejemplo el trabajo realizado por Ritter y col, 1999 donde se midió el nivel de ARNm de pacientes con MHF, los cuales presentaron niveles más elevados de ARNm de la β -miosina cardiaca que los valores obtenidos de las personas controles, estos resultados se verificaron además con ensayos de western blot (inmunoensayos con proteínas), donde se observó igualmente una sobreexpresión en los pacientes de la β -miosina cardiaca mutada. Al comienzo del año 2000 surge entonces la necesidad de adquirir más datos con respecto a la etiología de la enfermedad, y trabajos como los realizados por Marian y col, 1999; Dalloz y col, 2001 estudiaron los primeros efectos de las mutaciones utilizando modelos animales. En todos los casos se determinó incremento ventricular, desarreglo miofibrilar y alteraciones en la presión sistólica lo cual aumentaba considerablemente el riesgo de muerte súbita de los ratones. De esta manera los estudios de MHF ya involucraban el análisis *in vitro* e *in vivo* de las variables bioquímicas y biofísicas sobre los efectos de las mutaciones en las proteínas, el desarrollo de modelos *in silico* y por último la generación de modelos animales transgénico para abarcar no solo estos aspectos específicos sobre las proteínas del miocardio sino también sobre los aspectos clínicos subyacentes de la patología.

Desde entonces se han reportado, muchas mutaciones en ésta y en otras proteínas del sarcómero, lo que condujo a la noción moderna de que la enfermedad es un trastorno del aparato contráctil del miocardio (Nishi y col, 1995, Richard y col, 2000; Mörner y col, 2003; Song y col, 2005, Morimoto S, 2008; Hershberger y col 2009; Purushotham y col, 2010). Este sigue siendo el punto de vista contemporáneo, pero la caracterización genética,

quizás más que nunca, ha puesto de manifiesto la diversidad de la expresión clínica y está empezando a demostrar que los defectos genéticos pueden desencadenar en miocardiopatía dilatada y en miocardiopatía restrictiva en ausencia de hipertrofia (Kamisago y col, 2000; Mogensen y col, 2003).

Por eso durante los últimos años y en varios países como Japón (Kawaguchi, 2003), Francia (Millat y col; 2010), Brasil (Piva e Mattos y col, 2008) Dinamarca (Andersen y col, 2008) India (Tanjore y col, 2010) Alemania (Seggewiss y col, 2009) Italia (Nanni y col, 2003), Suecia (Mörner y col, 2003) China (Song y col, 2004), Holanda (Posma y col, 1996), Pakistán (Hussain y col, 2009), España (Borchert y col, 2010), Sudáfrica (Moolman-Smook y col, 2002), Reino Unido (Wordsworth y col, 2010) Australia (Doolan y col 2004) y Estados Unidos (Richard y col, 2003; Lowey S, 2002; Marian A, 2010), se han llevado a cabo investigaciones que involucran el diagnóstico de la enfermedad, mediante la búsqueda de mutaciones asociadas a MHF. Estos resultados han permitido determinar los principios etiológicos de la enfermedad, encontrando en todo los casos que la principal causa de MHF está relacionada con mutaciones en genes que codifican proteínas del sarcómero.

Los aportes teóricos y experimentales de estas investigaciones propiciaron la realización de trabajos con herramientas de biología molecular para la búsqueda e identificación de mutaciones que puedan estar asociadas a la MHF. Estos estudios contribuyeron al descarte de otras patologías cardiovasculares con sintomatología similar, además de establecer las bases genéticas como el carácter homócigo o heterócigo y el nivel de expresividad genética, que permitieron la estratificación del riesgo para los pacientes y sus familiares.

Dada la importancia del gen *MYH7*, se han dedicado esfuerzos en buscar y reconocer con prontitud mutaciones asociadas con MHF llevando a cabo estudios completos o

parciales del gen *myh7* (Eldin y col, 1995; Nishi y col, 1995; Darin y col, 2007; Buvoli y col, 2008; Tanjore y col, 2010, Carneiro y col, 2009; Borchert y col, 2010; Purushotham y col, 2010). Cuando la búsqueda se ha realizado de manera parcial en el gen *myh7*, se ha hecho sobre los exones con mayor número de reportes de mutaciones o cuyos exones codifiquen a regiones que participen directamente en el correcto funcionamiento de la proteína β -MyHC, por ejemplo los primeros trabajos realizados como el de Nishi y col. 1995 buscaron mutaciones en los exones 3 al 22 de 100 pacientes no relacionados previamente diagnosticado con MHF por medio de exámenes físicos, electrocardiograma y ecocardiograma. El análisis se llevó a cabo mediante PCR-DCP por sus siglas en inglés (Análisis de polimorfismo por conformación de ADN), encontrando dos variaciones en la secuencia de los exones 3 y 22 para un mismo paciente, el cambio en el exón 3 fue sin efecto en la proteína, siendo el primer reporte de esta clase. Sin embargo para el exón 22 se encontró una mutación de arginina por histidina de carácter heterocigoto. Para identificar los cambios se realizaron secuenciación directa y para verificar la información utilizaron sondas alelo específicas. Los resultados obtenidos permitieron definir que el efecto fenotípico de la mutación estaba relacionado con la MHF, mientras que se sugirió que el cambio sin efecto ensamblaba la proteína silvestre no afectando la salud del paciente.

A pesar de que el diagnóstico molecular no resulta 100% efectivo en el diagnóstico de la enfermedad debido a la gran variabilidad intra e intergénica y a los diferentes niveles de expresividad que presenten las personas incluidas en el estudios (Kawaguchi, H, 2003; Uro-Coste y col, 2008), actualmente se sigue la búsqueda de mutaciones en el gen *myh7* especialmente en los primeros 26 exones por ser altamente sensible como lo demuestra el trabajo de Buvoli y col, 2008, el cual revela con el uso de herramientas de bioinformática, la alta sensibilidad de mutaciones para la β -miosina, especialmente en la región S1 o cabeza

globular. Algunos de los estudios más actualizados han empleado como técnica base para el diagnóstico de MHF el SSCP (análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla). En el trabajo de Tanjore y col, 2010 analizaron 95 pacientes con sospecha de MHF y 100 controles, la extracción de ADN genómico se llevó a cabo por el método desarrollado por Lahiri y Nurberger, 1991, para una posterior amplificación por PCR de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*. Tanto el diseño y las secuencias de los cebadores la obtuvieron de la base de datos de cardiogenomics, (cardiogenomics.med.harvard.edu/, 2010), encontrando variaciones en el SSCP para los amplimeros 7, 12, 19 y 20 de diferentes pacientes. Los cambios fueron verificados con el análisis directo de las secuencias nucleotídicas. Es importante destacar que los 4 cambios estaban reportados como SNPs y que uno de los cambios ocurrió en la región intrónica adyacente al exón 19. Las variaciones en los exones 7, 12 y 20 se correlacionaron con el fenotipo para MHF y MD. Por otro lado, el trabajo de Carneiro y col, 2009, fue muy similar en cuanto al uso de la técnica SSCP obteniendo el diseño y secuencia de los cebadores de la base de datos de cardiogenomics, sin embargo este trabajo evaluó los exones 15, 20, 21, 22 y 23 del gen *myh7* de 20 pacientes, por ser los exones involucrados en 139 mutaciones de la 441 reportadas para la fecha. El objetivo de este trabajo era encontrar una relación genotipo-fenotipo asociando los efectos clínicos de mutaciones reportadas con las posibles mutaciones encontradas. En este trabajo se detectaron 6 cambios diferentes por SSCP, que posteriormente al analizar directamente las secuencias se encontraron: dos polimorfismos en el intrón 19, ambas sustituciones A>G. El primero fue identificado en la posición c.13615-64 y se presentó con una frecuencia de 25% en los pacientes y 19,5% en los controles. El segundo polimorfismo se identificó en la posición c.13615-64 y se presentó con una frecuencia de 100% en los controles y los pacientes evaluados. En el intrón 22, una

variación de la secuencia fue identificada, con una sustitución de T> C en la posición c.14663 32. También en el exón 22, se encontró la sustitución A> C en la posición c.14537, que cambia el codón TCC a TCA, ambos codones codifican el aminoácido serina. En el exón 23, dos polimorfismos se caracterizaron por una sustitución de T> C: el primero en la posición c.15355, que modifica el codón TCG a GCC, ambos codifican para el aminoácido alanina, este apareció con una frecuencia de 5% entre los pacientes y 1,56% en controles. El segundo polimorfismo, se encontró en la posición c.15431, cambia el codón CTG a TTG ambos codones codifican para el aminoácido leucina obteniendo una frecuencia de 2,5% en los pacientes y 0,78% en los controles.

La mayoría de los estudios llevados a cabo en los últimos años, se sirven de la secuenciación directa para detectar mutaciones, por ser una técnica que permite obtener resultados en tiempos relativamente cortos analizando diferentes genes del sarcómero por completo e incluyendo más de 100 pacientes y controles en un mismo estudio. La técnica es altamente sensible pero resulta más costosa que la técnica PCR-SSCP (Andersen y col, 2008; Purushotham y col, 2010). Sin embargo otros trabajos han optado por probar variantes de la técnica SSCP como el SSCP en electroforesis capilar, alcanzando 100% de sensibilidad para detectar 34 mutaciones diferentes reportadas previamente. Esta modificación se realizó con la intención de obtener resultados en menor tiempo que el SSCP convencional, considerando además la prestación de ser una metodología automatizada (Larsen y col, 1999). Estos autores revelaron que la técnica puede detectar cambios en productos de PCRs en un rango comprendido entre 166 a 1223 pb, con temperatura constante de 20 °C, en comparación con el SSCP que tiene sensibilidad de 97% para productos de PCRs entre 100 a 300 pb de bases además, la sensibilidad se ve comprometida si no se ajustan correctamente las condiciones de estandarización para cada

muestra, como la calidad del buffer, la composición del gel y las temperaturas que deben estar entre 14°C y 45 °C, además de ajustar las condiciones necesarias para obtener un óptimo revelado del gel. Otros estudios han empleado diferentes técnicas como por ejemplo el trabajo de Mörner y col, 2003, en el cual aplicaron la cromatografía líquida de alta eficacia por sus siglas en inglés: dHPLC junto con SSCP evaluando los primeros 24 exones del gen *myh7* de 46 personas diagnosticadas previamente con MHF. Para el SSCP se usaron las siguientes condiciones: temperatura de desnaturalización a 94°C, minigeles de poliacrilamida al 10% y buffer TBE para la corrida electroforética. La aplicación de ambas técnicas lograron detectar por separado dos variaciones, que posteriormente fueron secuenciadas hallando dos mutaciones Ala 43 por Glu y la otra Glu 924 por Lys ambas mutaciones se asociaron con la enfermedad por las manifestaciones clínicas y las alteraciones en los parámetros electrocardiográficos y ecocardiográficos que presentaron los pacientes del estudio.

Además del SSCP, se ha implementado el uso de otras técnicas como la corrida de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización por sus siglas en inglés: DGGE (Zeller y col, 2006) y análisis de alta resolución por temperatura de hibridación mejor conocido por su siglas en inglés: HRM (Millat y col, 2010), estos estudios lograron detectar mutaciones asociadas con la patología cardíaca, lo que implica que el uso de herramientas de biología molecular han favorecido el diagnóstico efectivo de la enfermedad. Sin embargo es necesario complementar el análisis con la secuenciación automatizada para determinar la naturaleza del cambio en la secuencia nucleotídica y su posible implicación en la traducción proteica.

Debido a la dificultad de establecer una relación genotipo-fenotipo, (Alcalai y col, 2007) se han realizado trabajos de modelaje molecular de proteínas mutadas, modelos de mutaciones en animales y ensayos de *in vitro motility* con la intención de estratificar el riesgo y contribuir con el tratamiento del paciente. Durante los últimos 15 años se han descrito más de 4800 artículos sobre modelos de mutaciones en animales (ver <http://circres.ahajournals.org/cgi/collection>), estos trabajos han demostrado que los modelos de ratón con un solo mutante mostraran las características histopatológicas de la MHF, como la fibrosis intersticial y la desorganización de los miocitos, pero la característica fenotípica de la MHF (es decir, la hipertrofia cardiaca) suele ser leve o ausente, lo que podría ser considerada como una de las limitaciones de utilizar este tipo de modelo animal (Tsoutsman y col, 2008). Por otro lado los ensayos de *in vitro motility*, han permitido definir los parámetros cinéticos como velocidad de contracción y actividad ATPasa, pudiendo determinar los efectos de la mutación sobre la actividad contráctil del músculo, sin embargo estos trabajos requieren del uso de biopsias a individuos afectados o realizar los ensayos sobre proteínas transgénicas. A pesar de las desventajas presentadas por estos dos tipos de ensayos, se ha logrado obtener una mejor correlación genotipo-fenotipo de acuerdo a la mutación evaluada. Sin embargo, la información resulta incompleta cuando se requiere evaluar los efectos estructurales que sufren las proteínas del sarcómero (Köhler y col 2002). Para ello, en los últimos años se han desarrollado modelos moleculares de las proteínas del sarcómero mutadas (Köhler y col 2002; Wang y col, 2003), que han permitido evaluar los efectos de las mutaciones en la estructura como por ejemplo, grado de interacción de la región afectada con otras proteínas del sarcómero, interrupción de la proteína, nivel de solapamiento e interrupción de la mutación con otros aminoácidos, lo que ha llevado a determinar si la mutación tiene un efecto potenciador o de menoscabo sobre el

funcionamiento de la proteína, permitiendo estratificar riesgo y sugerir medicamentos inotrópicos o cronotrópico de acuerdo al caso (Köhler y col 2002; Tyska y col 2002).

En Venezuela, los trabajos realizados sobre MHF son escasos, enfocados en los aspectos clínicos fisiopatológicos (Bermúdez y col, 2000; Puigbó y col, 2001), obteniendo las mismas características sintomáticas y los mismos patrones de alteraciones electrocardiográficas y ecocardiográficas que estudios realizados en otros países. Sin embargo, no se tiene referencia sobre estudios de biología molecular para MHF en la población venezolana.

V. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL.

- Analizar los exones 3 al exón 26 del gen *MYH7* en pacientes con Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Optimizar las condiciones de amplificación por PCR, de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.
2. Identificar cambios en la movilidad electroforética en los exones de los pacientes y controles objeto de estudio mediante SSCP.
3. Analizar las secuencias de los exones 3 al 26 del gen *MYH7* para algunos pacientes.
4. Estudiar el funcionamiento de la proteína cadena pesada de β -miosina cardiaca a través de los cambios estructurales que se producen a partir de las mutaciones reportadas en individuos con MHF.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Selección de pacientes.

La selección de pacientes fue llevada a cabo basándose en los datos clínicos aportados por los especialistas asociados al proyecto, tomando en cuenta un historial clínico familiar, hábitos psicobiológicos como tabaquismo y chimoico, además de descarte de enfermedad de Chagas, se les realizó además un examen físico que involucra la medición de la presión sanguínea, detección de dolencia esternoidea, frecuencia cardíaca y dificultad de respiración, análisis por electrocardiograma y ecocardiograma, así como también otras sintomatologías asociadas con la patología. La selección de controles se realizó con personas voluntarias que no tuvieran antecedentes familiares de enfermedades cardíacas ni manifestación clínica de MHF. A todas las personas involucradas en el estudio tanto pacientes como controles se les dio el consentimiento informado validado y aprobado por el comité de bioética del IVIC, el cual debieron firmar para participar (Anexo 1 y 2). El estudio involucró veinte y dos (22) pacientes y 3 (tres) controles.

VI.2. Obtención de las muestras.

La sangre periférica de todos los individuos fue recolectada por medio de la técnica de venopunción en el período comprendido entre Febrero 2010 y Octubre 2010. La sangre se trató con EDTA (anticoagulante) y se guardó a -20 °C para realizar posteriormente el aislamiento del ADN genómico.

De cada paciente y control se obtuvieron datos claves como la edad y sexo. La sangre fue colectada por el personal médico del Hospital ASCARDIO de Barquisimeto estado Lara, y el personal médico del Hospital Pérez Carreño. Unidad de Cardiología.

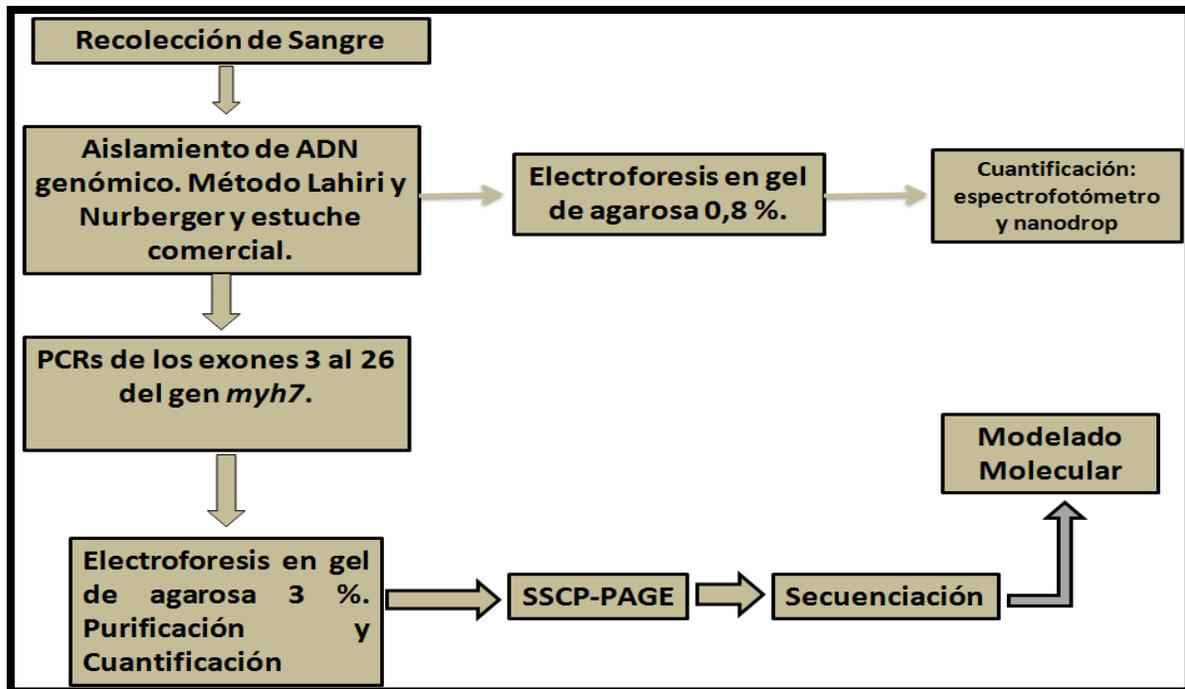


Figura 13. Diagrama de plan de trabajo.

VI.3. Aislamiento de ADN genómico.

Para aislar el ADN genómico de sangre periférica se dividió la muestra de 5 mL en dos alícuotas: una de 4mL para aislar el ADN por el método desarrollado por Lahiri y Nurberger 1991 y la otra alícuota de 1 mL para aislar el ADN genómico a través de estuche comercial.

La metodología seguida aplicando el método de Lahiri y Nurberger 1991 fue la siguiente: Por cada paciente y control se colectaron 4 mL de sangre en un tubo cónico que contenía 100µL de EDTA-Na₄ al 15%, la sangre con el anticoagulante se colocó entonces en un tubo falcon de 15 mL para agregar igual volumen de amortiguador TKM1 (Tris-HCl pH 7,6 10mM; KCl 10mM; MgCl₂ 10mM y EDTA-Na₂ 2mM). La mezcla se agitó en vortex por 10 segundos. Posteriormente para lograr la lisis celular se agregaron 125-150 µL de Nonidet P-40 y se agitó por 10 segundos en vortex. Después se centrifugó a 4000 G

por 10 minutos a temperatura ambiente, al terminar la centrifugación se descartó el sobrenadante cuidadosamente, preservando el precipitado. Luego se lavó el precipitado hasta un máximo de 2 veces (con igual volumen de sangre original) agregando nuevamente TKM1 y pasando por vortex por un minuto volviendo a centrifugar a 4000 G por 10 minutos, cada vez. El precipitado resultante de los lavados se resuspendió en 0,8 mL de amortiguador TKM2 (TKM1 mas 0,4M NaCl) añadiendo 44 µL de SDS al 10% y agitando suavemente con este paso se lograba la lisis nuclear de la célula (Usar 11µL de SDS por cada mL de sangre original), luego se incubó por 10 minutos a 60 °C, y se dejó reposar a temperatura ambiente, para luego añadir 0,3 mL de NaCl 5,3 M para precipitar las proteínas centrifugando a 12000 G por 5 minutos. Al sobrenadante resultante que es donde se encuentra el ADN, se le agregó 2,5 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente invirtiendo suavemente el tubo. El ADN precipitado, que se observó como una malla blanca, se capturó con una punta de micropipeta para ser transferido a un vial de 1,5 mL que contenía etanol al 70% frío. En este paso se puede conservar el ADN a temperatura ambiente, hasta ser usado para su análisis, cuando entonces, se centrifugó a 14000 G por 5 minutos, para eliminar el etanol por decantación, escurriendo bien y dejando secar en estufa o a temperatura ambiente. Luego se agregó entre 50 y 300 µL de agua estéril para resuspender el ADN (dependiendo del tamaño de la malla). Alternativamente se utilizo el buffer TE (tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 1mM) para resuspender. La alícuota de 1 mL de sangre se usó para aislar el ADN por medio de un estuche comercial de extracción (Axygen mini extracción), para esta metodología se utilizó un volumen de 250 µL de sangre, por lo cual se hicieron cuadruplicados por cada paciente y muestra control del aislamiento de ADN. La base de este procedimiento involucra columnas de silica gel, a las cuales se une el ADN libre de proteínas, mientras que las moléculas contaminantes pueden pasar

libremente. Es un método que no usa fenol-cloroformo y permite obtener ADN libre de inhibidores de la PCR, como son los cationes divalentes y las proteínas, los cuales son removidos eficientemente durante dos pasos de lavados.

VI.4. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.

Los exones 3 al 26 del gen *myh7* que codifican parte de la proteína cadena pesada β -miosina cardiaca se amplificaron utilizando la técnica de PCR. Para el diseño de los cebadores (iniciadores o en inglés primers) se contó con las secuencias disponibles en la base de datos cardiogenomics (cardiogenomics.med.harvard.edu/, 2010). (Tabla 4)

Tabla 4. Secuencias de los cebadores sentidos (5' - 3') y cebadores antisentidos (3' - 5') para la amplificación de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.

Exon	Secuencia nucleotidica	Longitud en pares de bases (bp)
BMHC 3F	tcttgactcttgagcatgggtgcta	(24 bp)
BMHC 3R	tctgtccaccagggtgtacaggtg	(24 bp)
BMHC 4F	aggaaggagggaaagcccaggctg	(24 bp)
BMHC 4R	tctgcatgcactcaatctgagtaa	(24 bp)
BMHC 5F	atctttctctaactccccaaaatca	(24 bp)
BMHC 5R	actcacgtgatcaggatggactgg	(24 bp)
BMHC 6F	tgtcacogtcaacccttacaagtg	(24 bp)
BMHC 6R	gaggctgagtcctatgcctcgggg	(23 bp)
BMHC 7F	cttgctgggtctccagtagtattgt	(24 bp)
BMHC 7R	ctgcgggtacaggaccttgaggggc	(24 bp)
BMHC 8F	gcctccaaggtcctgtaccgcag	(24 bp)
BMHC 8R	gtccaagtccaaggccaagggtca	(24 bp)
BMHC 9F	gacaactcctcccgcttcgtg	(21 bp)
BMHC 9R	aacagagggagggaggggagag	(22 bp)
BMHC 10F	ccttttgcttgctacatttatcat	(24 bp)
BMHC 10R	gccacaagcagaggggaccag	(21 bp)
BMHC 11F	ctgcttcctcaggccatgtgctgt	(24 bp)
BMHC 11R	accaatggccagagctcttagctct	(24 bp)
BMHC 12F	cacagggattaaggagacaagttt	(24 bp)
BMHC 12R	ttacagctgccccagaatc	(20 bp)
BMHC 13F	agtcattctctttaccaacttgcta	(25 bp)
BMHC 13R	attatcatctgaagatggaccacc	(25 bp)
BMHC 14F	caagttcactcttccaacaaccct	(25 bp)
BMHC 14R	atgtgggagcagtgagtgattggt	(25 bp)

Exon	Secuencia nucleotidica	Longitud en pares de bases (bp)
bMHC 15F	actcacaccccactttctgactgctc	(25 bp)
bMHC 15R	gaattcaggtggtaaggccaaagag	(25 bp)
bMHC 16F	ataactgtactcagagctgagccta	(25 bp)
bMHC 16R	tccatcccactgagctctgtaaacct	(25 bp)
bMHC 17F	gcaaatgccagcaaggatgtaaag	(24 bp)
bMHC 17R	agagaagggagatgggaagtaa	(22 bp)
bMHC 18F	catctctgtgacttctcgaattct	(24 bp)
bMHC 18R	cactgtggtggtaggtaggagat	(24 bp)
bMHC 19F	acaaagccaggatcagaaccaga	(24 bp)
bMHC 19R	gtccagagtcacccatgctctgca	(24 bp)
bMHC 20F	tgggtatgaggggtgcaccagagct	(24 bp)
bMHC 20R	gcatcagaggagtcaatggaaaag	(24 bp)
bMHC 21F	taggctgttacccttcctaaggta	(24 bp)
bMHC 21R	gcctctgaccctgtgactgcagtg	(24 bp)
bMHC 22F	ggacctcaggtaggaaggaggcag	(24 bp)
bMHC 22R	tgtgcagggaggtgcaggggtgtg	(24 bp)
bMHC 23F	tcctatttgagtgatgtgcctctc	(24 bp)
bMHC 23R	atggtctgagagctcctgatgagac	(24 bp)
bMHC 24F	agatggcaccaagctggtgacctt	(24 bp)
bMHC 24R	tctgggcacagatagacatggcat	(24 bp)
bMHC 25F	ggcaatctcacagtcaccttaataa	(24 bp)
bMHC 25R	tttttgccagggaggaccatctaa	(24 bp)
bMHC 26F	actctttacctgtatcattaccat	(24 bp)
bMHC 26R	gcctccatggacacataatcagtt	(24 bp)

Las secuencias de los cebadores sentidos (F) y antisentidos (R) de la base de datos fueron evaluadas adicionalmente realizando un BLAST (**Basic Local Alignment Search Tool**) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) con la intención de corroborar que las secuencias presentaran un alto porcentaje de similitud con las secuencias de los exones que se requería amplificar ubicados en el cromosoma 14 de *homo sapiens*. Además, estas secuencias se analizaron usando programas específicos para evaluar las características fisicoquímicas y propiedades de interacción de las secuencias nucleotidicas de los cebadores y la secuencia del templado: OLIGO Primer Analysis Software versión 1.5 y OLIGO analyzer software versión 1.5 respectivamente.

VI.5. Diseño de cebadores.

En el esquema se ilustra la posición en pares de base (pb) donde comienza la amplificación (parte superior de las fechas) de los cebadores sentido y antisentidos (fechas amarillas) en el gen *MYH7* (línea negra continua), el tamaño del amplimero (cuadro color rojo), el tamaño del exón en pb (cuadro color azul), la separación entre un cebador antisentido y el siguiente cebador sentido (llave color rojo) y los cebadores sentidos que amplifican una región en común con un cebador antisentido (fechas azules) (Figura 14).

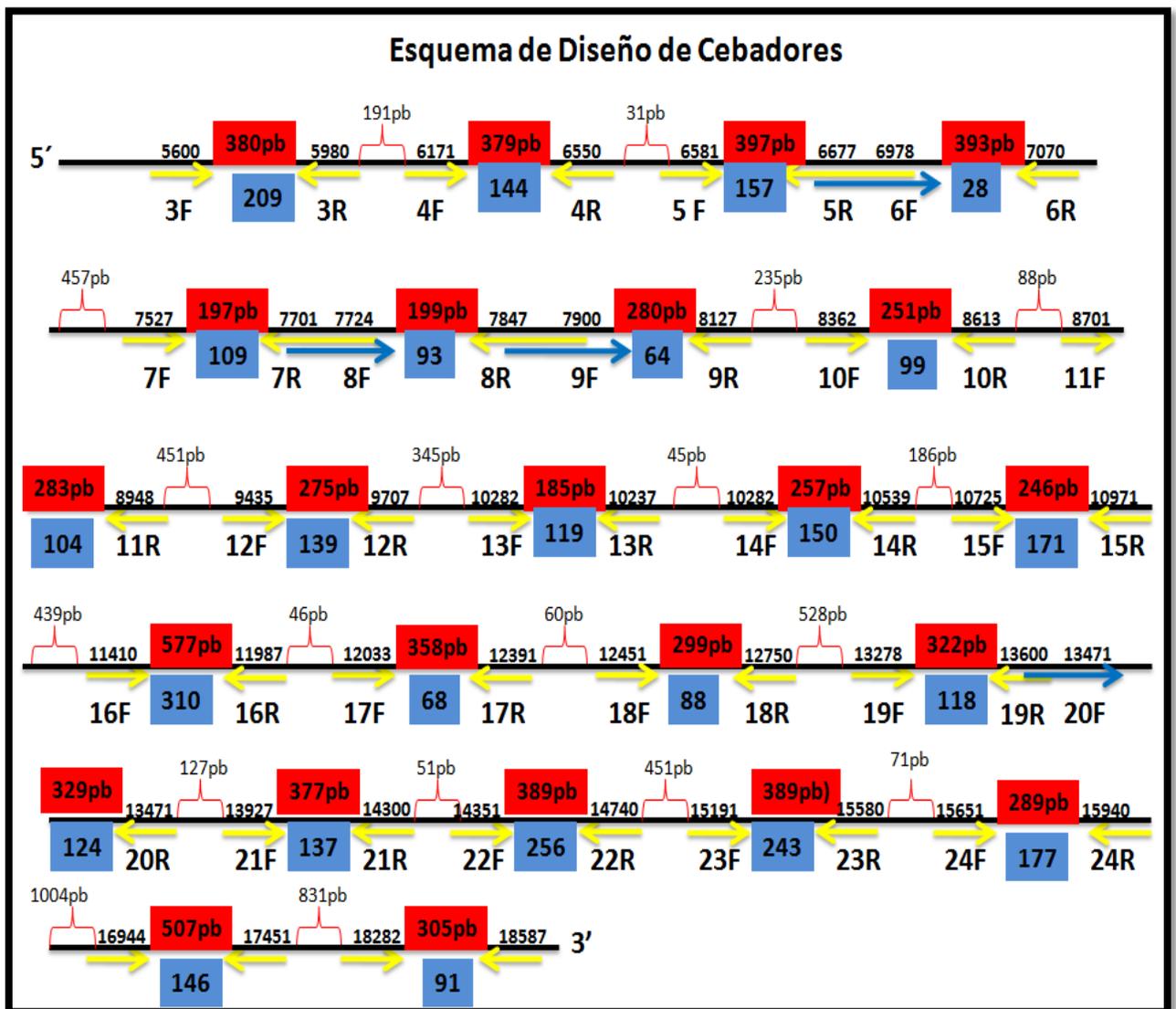


Figura. 14. Esquema de diseño de cebadores.

Es importante definir que el amplimero es el producto de amplificación por PCR, que contiene el exón y parte de sus regiones intrónicas adyacente en direcciones 3' y 5' (Tabla 5).

Tabla 5. Tamaño y ubicación de las regiones amplificadas del gen *MYH7*.

Amplimero	Tamaño del amplimero (pb)	tamaño del exón (pb)	Posición del exón en el gen (pb)	Región amplificada del intrón en dirección 5' al exón (pb)	Tamaño del amplificado de la región intrónica 5' (pb)	Región amplificada del intrón en dirección 3' al exón (pb)	Tamaño del amplificado de la región intrónica 3' (pb)
3	380	209	5600-5980	5713-5600	113	5980-5921	59
4	379	144	6225-6368	6171-6225	54	6368-6550	182
5	397	157	6657-6813	6581-6657	76	6813-6978	165
6	393	28	6945-6972	6677-6945	268	6972-7070	98
7	197	109	7581-7689	7527-7581	54	7689-7724	12
8	199	93	7772-7701	7701-7772	71	7864-7900	36
9	280	64	7968-8031	7847-7968	121	8127	96
10	251	99	8450-8548	8362-8450	88	8613-8548	65
11	283	104	8788-9891	8788-8701	87	8891-8984	93
12	275	139	9538-9676	9435-9538	103	9707-9676	31
13	185	119	10095-10213	10052-10095	43	10213-10237	24
14	257	150	10338-10487	10282-10338	56	10487-10539	52

15	246	171	10772-10942	10725-10772	47	10942-10971	29
16	577	310	11547-11856	11410-11547	137	11856-11987	131
17	358	68	12128-12195	12033-12128	95	12195-12391	196
18	299	88	12570-12657	12451-12570	119	12657-12750	93
19	322	118	13352-13469	13278-13352	74	13469-13600	131
20	329	124	13615-13738	13471-13615	144	13738-13800	62
21	377	137	14015-14151	13927-14408	88	14151-14300	149
22	389	256	14408-14663	14351-14408	37	14663-14740	77
23	389	243	15283-15525	15191-15283	92	15525-15580	55
24	289	177	15709-15885	15651-15709	58	14885-15940	55
25	507	146	17101-17246	16944-17101	157	17246-17451	205
26	305	91	18377-18468	18282-18377	95	18467-18587	120

La intención de obtener un amplificado más extenso que contenga el exon, es tratar de garantizar que se detecten los cambios mediante SSCP que ocurren hacia los extremos 5' y 3' de los exones, ya que esta técnica pierde sensibilidad cuando dichos cambios se localizan en esas posiciones.

Luego de la evaluación *in silico* de los cebadores, se diseñaron los programas de amplificación de cada fragmento utilizando las temperaturas de hibridación recomendadas por la base de datos cardiogenomics en conjunto con las obtenidas por los programas OLIGO Primer Analysis Software versión 1.5 y OLIGO analyzer software versión 1.5 respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Temperaturas sugeridas para la amplificación de los amplimeros que contienen las regiones de los exones de interés.

Exones para amplificar	temperatura de annealing	Exones para amplificar	temperatura de annealing
3	62°C	20	62°C
4	62°C	21	62°C
6	62°C	22	62°C
7	62°C	23	62°C
8	62°C	24	62°C
9	62°C	5	60 °C
11	62°C	10	60 °C
13	62°C	18	60 °C
14	62,7 °C	25	60 °C
15	62°C	26	60 °C
16	62°C	12	58 °C
19	62°C	17	58 °C

Se prepararon mezclas de reacción de PCR de volumen final 100 µL para cada uno de los exones que consistió de: ADN genómico entre 40-200 ng, tampón (Tris-HCl pH 8,3 10 mM, KCl 50 mM), MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,04 mM, cebadores 4 pmol/µL. Se utilizó 0,5 µL de enzima Go tag polimerasa 5U/mL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Minicycler Biochrom) con 40 ciclos en total. Los programas para la amplificación que se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Programa usado para llevar a cabo las reacciones de PCRs.

Pasos	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial (paso 1)	96	8
Desnaturalización (paso 2)	94	1
Ciclo Hibridación de cebadores o Annealing (paso 3)	ver Tabla 6	1
Extensión (4 paso)	72	1
Extensión final (5 paso)	72	10
etapa final	0	--

VI.6. Análisis de ADN extraído de sangre total y amplificación por PCR: purificación y cuantificación.

Para evaluar la integridad del ADN extraído de sangre total se usaron geles de agarosa al 0,8%, mientras que para observar los diferentes fragmentos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 3%. La agarosa en ambos casos se preparó con bromuro de etidio (concentración final 0,02 mg/mL) en 100 mL de buffer TBE 0.5X (5,4 grs Tris base, 2,75 grs de ácido bórico; 2 mL 0,5M EDTA pH8). Para observar el ADN se mezcló una alícuota de 2 µL de ADN genómico recién aislado con 2 µL de tampón de carga (EDTA 1mM pH8, azul bromofenol 0,25%, Xileno-cianol 0,5%, glicerol 50%). La corrida electroforética se llevó a cabo por 1 hora y 30 minutos a 80 V y 500 mA. La visualización se efectuó en el transiluminador Cámara UV. Transiluminador marca White/2UV adaptado a una cámara fotográfica Olimpos con la cual se realizó el registro fotográfico.

Para medir la concentración del ADN se utilizaron, el equipo nanodrop ACTGene ASP-3700 y un espectrofotómetro midiendo a una longitud de onda de 260 nm. La calidad de la muestra se determinó midiendo a longitud de onda 260 nm y 280 nm, tomando como referencia las relaciones 260/280 que indicaban el nivel de pureza de las muestras.

Alternativamente, determinamos la concentración de ADN genómico extraído de forma cualitativa cuando se comparaban en los geles de agarosa, las intensidades de luz usando concentraciones conocidas de ADN genómico proveniente de fago lambda.

Para observar los productos de PCR se realizó una electroforesis colocando 5 μ L de solución del producto de amplificación mezclado con 2 μ L de buffer de carga. La corrida se llevó a cabo por una hora a 90 Voltios y 500 mA. Después de verificar que se obtuvieron los amplificadores, los fragmentos fueron amplificados con estuche comercial (AxyPrep PCR clean-up), mezclando los 95 μ L de solución restante del tubo de PCR con 300 μ L de solución PCR-A, para unir los fragmentos de DNA a la malla de exclusión, después de centrifugar a 12000 G por 1 minuto. Luego en dos pasos consecutivos se lavaba con buffer W2 que es un buffer de desalinización. Para el primer paso de lavaron se utilizó un volumen de 700 μ L y en el segundo paso un volumen de 400 μ L, centrifugando en ambos casos a 12000 G por 1 minuto. La elución de los fragmentos de PCR se llevó a cabo agregando 60 μ L de buffer de elución (Tris-HCl, 2,5 mM pH 8,5) previamente calentando a 65°C. La cuantificación de los productos purificados, se llevó a cabo de forma cualitativa por comparación de los productos de PCRs con concentraciones conocidas, visualizados en geles de agarosa al 3%. A partir de este paso las muestras estuvieron preparadas para realizar las técnicas de SSCP y/o secuenciación automatizada.

VI.7. Búsqueda de mutaciones en el gen *MYH7*.

Una vez obtenidos y purificados los fragmentos de PCR de interés que corresponde a los exones 3 al 26 de cada paciente y muestra control se procedió a realizar la técnica de SCCP. Este estudio se concentró en la búsqueda de mutaciones para los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7*, ya que estos exones son los que poseen el mayor número de reportes de mutaciones (ver tabla 7)

Tabla 8. Número de mutaciones por exon reportadas en la base de datos de cardiogenomics.

exon	numero de mutaciones reportadas
3	4
4	1
5	7
6	0
7	7
8	6
9	5
10	0
11	4
12	2
13	12
14	11
15	14
16	13
17	1
18	5
19	9
20	15
21	13
22	23
23	17
24	0
25	3
26	1

Se observan en negritas los exones objeto a estudio (13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23)

Se consideró que los exones candidatos a estudiar eran aquellos que poseían un número mayor a 10 mutaciones diferentes reportadas, se incluyó además el exón 19 con nueve mutaciones diferentes descritas.

El análisis por SSCP se delimito para algunos exones de determinados pacientes. Alternativamente, se procedió a secuenciar directamente los productos de PCRs de cada exón para el resto de los pacientes (tabla 9).

Tabla 9. Técnicas aplicadas a cada paciente para la búsqueda de mutaciones en los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23.

Paciente	Exon 13	Exon 14	Exon 15	Exon 16	Exon 19	Exon 20	Exon 21	Exon 22	Exon 23	
001	SEC	SEC	SEC	SSCP y Sec	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	
002										
003										
004										
005										
006										
007										
008										
009	SEC	SEC	SEC	SSCP y Sec	SEC	SEC	SEC	SEC		
010										
011										
012										
013										
014				SSCP					SSCP	SSCP
015										
016										
017	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC	SEC		
018										
019										
020										
021	SEC									

Búsqueda de mutaciones en los pacientes mediante SSCP y análisis de secuenciación (Sec).

VI.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida. SSCP.

Para el análisis por SSCP se requiere amplificar las regiones de interés por medio de PCR, luego cada uno de los amplimeros se desnaturalizan con el propósito de convertir el producto de ADN doble cadena a simple cadena y por último los fragmentos cadena sencilla se les aplican electroforesis en geles verticales de poliacrilamida para luego visualizarlos con tinción de plata (Orita y col, 1989).

El procedimiento específico implementado en este trabajo fue el siguiente: A los productos de PCR purificados se les realizó diluciones 1:20 (aprox.5 ng/ μ L) para un volumen final de 20 μ L, que representa la solución de trabajo, de la cual se tomó una alícuota de 2 μ L y se mezcló con 18 μ L de tampón desnaturizante (formamida desionizada 95%, EDTA 20mM, Azul de bromofenol 0,5%). Luego las muestras se incubaron en el termociclador a 95°C por 20 minutos. Inmediatamente se colocaron en hielo por 5 minutos, después de transcurrido este tiempo las muestras ya se encontraban preparadas para ser corridas en geles de poliacrilamida.

VI.8.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones no desnaturizantes.

Los 20 μ L de solución de producto desnaturizado se cargaron en geles de poliacrilamida de 6% o 8%, según el tamaño del fragmento a analizar. El tamaño de los geles fue de 10,1 cm (ancho) x 7,3 cm (largo) y 0,75 mm de grosor, la mezcla de preparación de los geles se realizó de la siguiente manera: acrilamida: 1,5 ml (geles de 6%) y 2 ml (geles de 8%), TBE 5X: 1,5 ml, tetrametiletlenodiamina (TEMED): 7,5 μ L, agua destilada: 4,4 mL (geles de 6%) y 3,9 (geles de 8%), persulfato de amonio 10% (PSA) para

un volumen final de 7,5 mL. Para realizar la corrida electroforética se usó una mini tetra cámara de BIO-RAD. Colocando 80 Voltios, 125 mA, manteniendo la temperatura regulada a 15 °C, los tiempos de corrida dependieron del tamaño de los amplímeros,. Para el exón 14 (gel 8%) 14 horas, exón 16 (gel 6%) 12 horas, exón 19 y 20 (gel 8%) 14 horas, exón 21 (gel 8%) 15 hora, los tiempos de corrida electroforética se eligieron de tal manera que las muestras recorrieran hasta $\frac{3}{4}$ (tres cuarto) del gel, con la intención de optimizar la resolución.

Después de la corrida, se procedió a teñir los geles usando estuche comercial de tinción de BIO-RAD (N° catalogo 1610443), los geles se sumergían por treinta minutos en solución fijadora (metanol 40% más ácido acético 10%), posteriormente se colocaban por 5 minutos en solución oxidativa, luego se lavaba con grandes volúmenes de agua de 7 -8 veces en un máximo de 15 minutos, seguidamente se agregaba la solución que contenía el reactivo de plata por 20 minutos, pasado este tiempo se lavó rápidamente por treinta segundos y por último se develó el gel aplicando la solución de revelado, al final se detiene la reacción de revelado con solución de ácido acético 5% por 15 minutos. Finalmente la captura de la imagen se realizó usando el sistema escáner imagescanner III marca General Electric.

VI.8.2. Preparación de muestras para secuenciación automatizada.

La secuenciación de las muestras seleccionadas para amplificar fue realizada por la compañía Macrogen (Seúl, Corea) que ofrece servicios de secuenciación automatizada, utilizando un secuenciador de ácidos nucleicos modelo 23 ABI 3730XLs.

Las muestras purificadas y cuantificadas de los productos de PCR tanto la reacción sentido (5'-3') y antisentido (3'-5'), se prepararon a una concentración final de 50 ng/μL en un volumen final de 25 μL de H₂O. Los cebadores sentido como antisentido, se prepararon a una concentración final de 10 pmol/μL o 60 ng/μL en un volumen final de 20 μL de H₂O desionizada.

VI.8.3. Análisis por SSCP y comparación de secuencias nucleotídicas.

Los criterios de evaluación para SSCP y secuenciación de los pacientes se basaron principalmente en la comparación con las muestras controles. Aunque también se evaluaron las diferencias en el patrón de corrida electroforética entre los pacientes.

VI.8.3.1. Evaluación de pacientes por SSCP.

Después de la corrida electroforética los patrones de migración de las muestras de pacientes se compararon con el patrón de migración de las muestras control. Además se compararon entre sí mismos los patrones de migración de las muestras de pacientes. Aquellas muestras de pacientes con diferencias en la movilidad electroforética se seleccionaron para secuenciar, con el propósito de determinar si hubo un cambio en su secuencia nucleotídica. Cuando no se encontraban cambios en la movilidad electroforética entre las muestras y su control, se eligieron algunas para secuenciar, con el objetivo de

corroborar que los amplimeros no tenían diferencias en su secuencias nucleotidicas y evaluar la sensibilidad de la técnica de SSCP.

VI.8.3.2. Análisis comparativo de secuencias.

Las secuencias nucleotidicas generadas por secuenciación automatizada, tanto sentido como antisentido de cada amplimero, fueron alineadas con las secuencias del amplimero y exon correspondiente, suministradas por la base de datos cardiogenomics en su versión más reciente. Además, el alineamiento incluyó las secuencias sentidos y antisentidos de los controles. Para este estudio solo se contempló el análisis de secuencia de los exones de interés, es decir, sin tomar en cuenta la región correspondiente a intrones. Para el análisis sólo se incluyeron lecturas de secuencias libre de artefactos. Cuando las secuencia de los exones de cada paciente presentaban diferencias con respecto a los controles y las secuencias de la base de datos, se repetía una vez más el procedimiento de análisis del fragmento para verificar la presencia del cambio en la secuencia.

El programa usado para el análisis de secuencias fue el MAC vector versión 11.1.2. Los formatos de archivos se trabajaron con la extensión AB1, con los cuales se podían visualizar al mismo tiempo y en la misma ventana de diálogo, los electroferogramas y las secuencias en formato texto o de puntos.

VI.9. Modelado Molecular.

Cuando se observaba y confirmaba un cambio en la secuencia nucleotídica del exón, se tradujo la secuencia proteica usando el programa MAC vector 11.1.2, haciendo uso del código de codones para *Homo sapiens*. Esta secuencia de aminoácido se comparó con la secuencia traducida del exón de la base de datos y la secuencia de los controles. En los casos donde detectó una mutación en el exón se procedió a realizar un alineamiento a través del BLAST, corroborando que la traducción era correspondiente a la secuencia proteica de la cadena pesada β -miosina cardiaca de humano.

Realizado el BLAST, se eligieron secuencias con alta similaridad (100% de cobertura) de diversas especies, homólogas a la proteína cadena pesada β -miosina, incluyendo la propia cadena pesada β -miosina cardiaca de humano. Elegidas las secuencias se alinearon para determinar en cuales de esas secuencias estaba conservada la región donde ocurrió la mutación. El cristal molde utilizado fue el 2 MYS-A disponible en formato PDB, correspondiente a músculo esquelético de pollo, específicamente la región S1 de la proteína.

Antes de hacer el modelo se realizaron 2 alineamientos por ClustalW: 1ro) incluyó la secuencia proteica S1 cadena pesada β -miosina de humano sin la mutación con la secuencia proteica S1 cadena pesada β -miosina de pollo sin la mutación 2do) incluyó la secuencia proteica S1 cadena pesada β -miosina de humano mutada con la secuencia proteica S1 cadena pesada β -miosina de pollo sin la mutación.

Los dos alineamientos generados por el servidor ExPASy Proteomics Server (expasy.org/), fueron usados para realizar los modelos, con el servidor Swiss model (<http://swissmodel.expasy.org/>)

La visualización y el análisis de los modelos se realizó usando el programa Chimera-1.5.2-win32.exe.

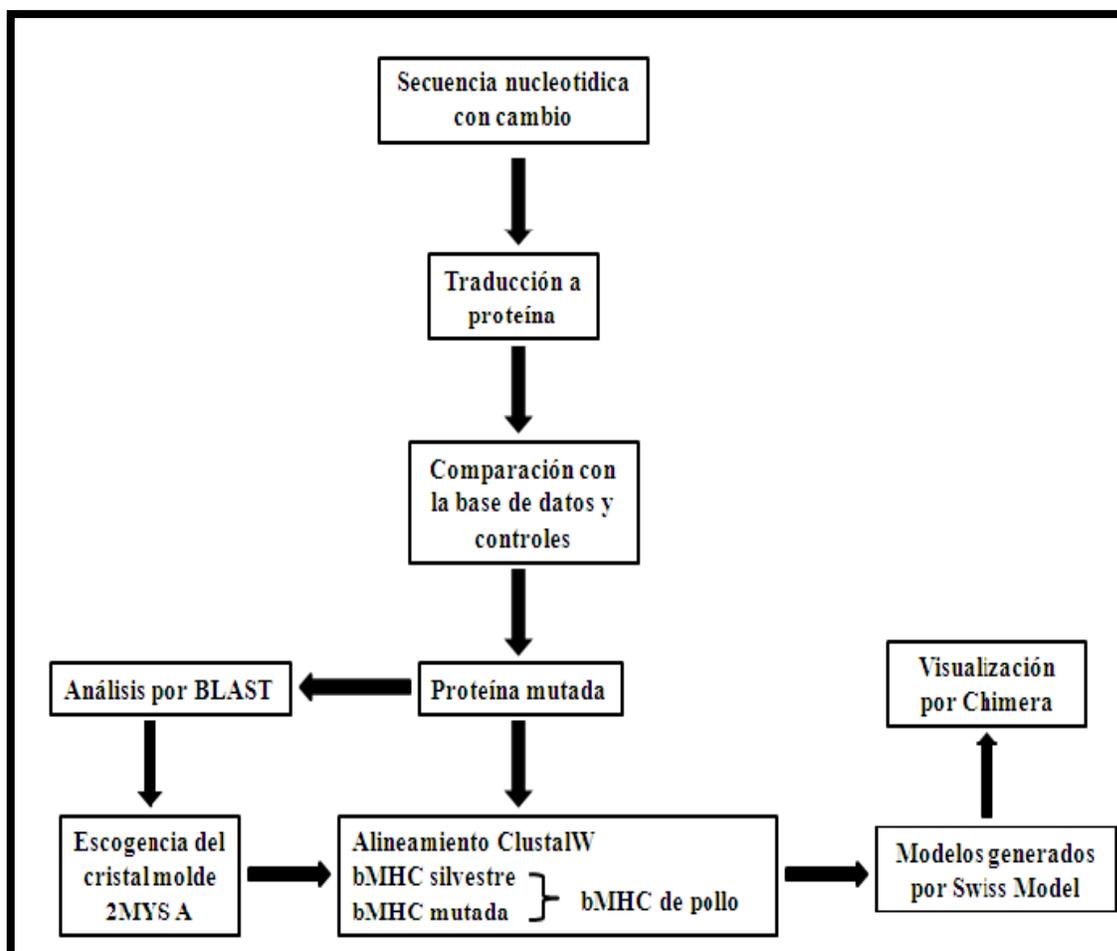


Figura 15. Esquema de trabajo para la realización de los modelos moleculares de la región S1 de la cadena pesada β -miosina cardiaca.

VI.11. Análisis estadístico.

Los cálculos realizados fueron la determinación del promedio y la desviación estándar de la edad, el porcentaje de distribución de género de las personas participantes en el estudio, el porcentaje de pacientes menores a 35 años y el porcentaje de pacientes mayores a 35 años, todos estos cálculos se realizaron para los pacientes y controles.

VI.11. Financiamiento.

Para la realización de este trabajo se contó, con el financiamiento por parte del IVIC. (Proyecto 973), así como de 2 empresas farmacéuticas que son: Industria venezolana de Productos Farmacéuticos de consumo KONSUMA y Farmacias Helmerich.

VII. RESULTADOS.

VII. 1. Análisis descriptivo de la población de estudio.

La búsqueda de mutaciones para el diagnóstico de MHF, involucró a 13 pacientes femeninos y 9 pacientes masculinos, comprendidos entre 12 y 59 años, incluyendo 3 controles 2 de sexo masculino y 1 de sexo femenino, en edades comprendida entre 24 y 35 años (Tabla 10). Los datos clínicos de los pacientes fueron manejados por los médicos especialistas asociados al estudio.

Tabla 10. Parámetros de la población.

	Pacientes n=22	controles n=3
Edad promedio	35,69 +/- 15años	28,6 +/- 5,68años
Sexo femenino	59.09%	33.33%
Sexo masculino	49.91%	66.67%
% de Edad < 35 años	53, 84 %	66.67%
% de Edad > 35 años	46, 15%	33.33%

VII. .2. Análisis molecular.

VII.2.1. Aislamiento de ADN genómico (ADNg).

Se realizó la extracción de ADN genómico proveniente de sangre periférica de todos los pacientes y controles utilizando un método comercial y un método salino desarrollado por Lahiri y Nurberger, 1991. La figura 16, muestra el ADN genómico extraído por este método no enzimático. La concentración del ADN genómico obtenido por esta técnica se ubicó entre 400 y 1200 ng/ μ L por cada 4 mL, de sangre, en mediciones realizadas por espectrofotometría y con el sistema NanoPhotometer, cuyas relaciones 260/280 se encontraban mayormente alrededor de 1,6 obteniéndose para algunos pacientes relación

de hasta 1,8. El ADN genómico se observó altamente aglomerado en la parte superior del gel ubicado mayormente por encima de las 4000 pb.

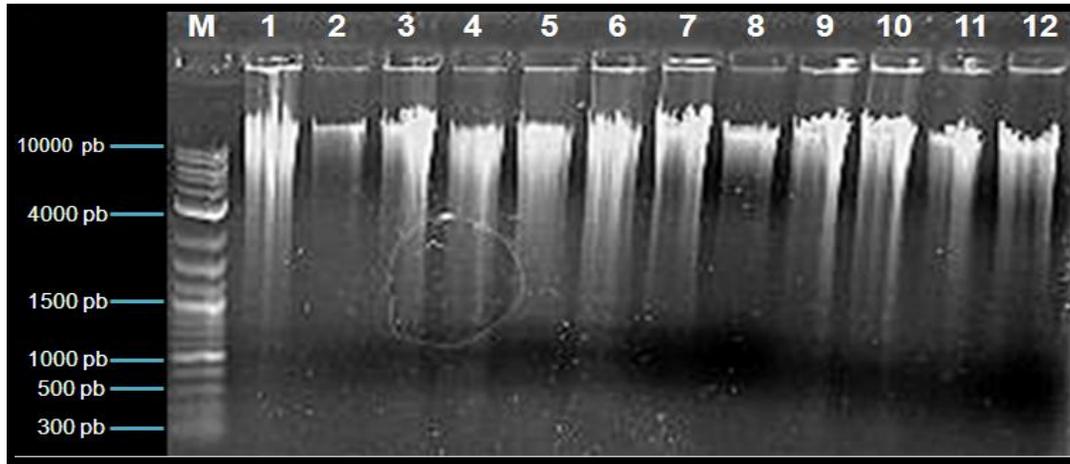


Figura 16. Análisis cualitativo del ADNg extraído de sangre periférica por el método de Lahiri y Nurberger 1991. Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8%, teñido con bromuro de etidio donde se muestra el ADNg. Carriles 1-3: muestras controles C1, C2 y C3, respectivamente. Carriles 4-12: muestras de pacientes 001-009 respectivamente. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder.

Para las extracciones de ADN genómico utilizando un estuche comercial (figura 17) donde se utilizó un volumen de 250 μ L de sangre, se obtuvieron medidas de concentración del ADN entre 80ng/ μ L y 200ng/ μ L, con una relación 260/280 que oscilaban entre 1.8 y 2. Las bandas correspondientes al ADN genómico se ubican por encima de las 10000 pb.



Figura 17. Análisis cualitativo del ADNg extraído de sangre periférica por el estuche comercial. Corrida electroforética en gel de agarosa 0,8%, teñido con bromuro de etidio donde se muestra el ADNg. C: control negativo (mezcla de reacción sin ADNg). Carriles 1-21: muestras de pacientes 001-021 respectivamente. C1, C2 y C3: muestras de controles C1-C3 respectivamente. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder.

Con respecto a la eficiencia de concentración final de ADN según su volumen inicial de sangre, (Tabla 11) la metodología del estuche comercial permitió alcanzar en promedio aproximadamente 35% ADNg mas concentrado que el método desarrollado por Lahiri y Nurberger, 1991. En cuanto a la relación 260/280 el estuche comercial obtuvo medidas 2,0 mientras el método de Lahiri y Nurberger, 1991, un valor de 1,6 lo que implica un 20% menos en la relación 260/280. Sin embargo el método de Lahiri y Nurberger, 1991, permitió procesar 16 veces más volumen de sangre en un solo procedimiento de extracción que la metodología del estuche comercial.

Tabla 11. Valores comparativos de los métodos de extracción de ADNg proveniente de sangre periférica.

Método	Volumen Inicial de sangre	Concentración final \bar{x}	Relación 260/280 \bar{x}
Lahiri y Nurberger	4 mL	800 ng/ μ L	1,6
Estuche comercial	0,250 mL	140 ng/ μ L	2,0

VII.2.2. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen *MYH7* utilizando la técnica de PCR.

Antes de realizar las reacciones de PCRs se revisaron las secuencias de los cebadores que fueron utilizadas para amplificar los exones de interés, por análisis comparativo de secuencias BLAST, obteniéndose que las secuencias de los cebadores tanto sentido como antisentido para cada amplímero, coincidían con el gen *MYH7* en el cromosoma 14, con valores de cobertura de 100% y error de coincidencia por debajo de cero (0). Cuando se evaluaron los alineamientos de los cebadores con algunas secuencias

similares, la identidad igualmente fue de 100%, corroborando así que estos cebadores son de uso general para amplificar exones del gen *MYH7*. También se compararon las temperaturas de hibridación sugeridas por la base de datos cardiogenomics con las temperaturas obtenidas al realizar el análisis utilizando los programas OLIGO Primer Analysis Software versión 1.5 y OLIGO analyzer software versión 1.5, obteniéndose como resultado una similitud entre las temperaturas sugeridas por la base de datos versus la calculada por los programas de computación, excepto para la temperatura de hibridación del amplímero del exón 14 que los programas determinaron una temperatura de hibridación entre 62,7 y 64 °C, siendo 62°C la temperatura de hibridación sugerida por la base de datos de cardiogenomics.

Luego de haber aislado el ADN genómico de pacientes y controles, y de determinar su integridad, pureza y concentración, se procedió a optimizar las condiciones de amplificación por PCR de los amplímeros para cada uno de los exones del 3 al 26 del gen *myh7*. Las reacciones de estandarización de los PCRs se realizaron utilizando ADN de controles. Las figuras 18 y 19 muestran los resultados de la amplificación de los 24 exones (exones 3 al 26) del gen *MYH7* de la muestra control C1. En cada carril se observa una banda única correspondiente al tamaño en pb esperado (figura 14) para cada uno de los amplímeros.

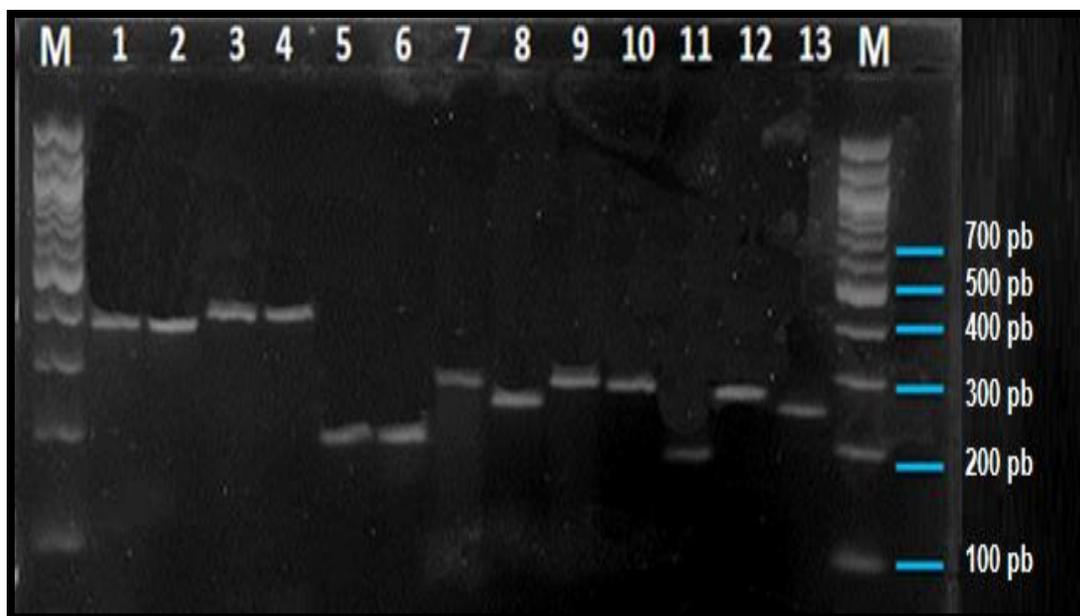


Figura.18. Amplificación de los exones 3 al 15 del gen *MYH7*. Corrida electroforética de los productos amplificados por PCR correspondiente a los amplimeros 3 al 15 del gen *MYH7*. Gel de agarosa 3% teñido con bromuro de etidio. Carril M: marcador de peso molecular 100 bp. Carril 1-13: amplimeros 3 al 15 respectivamente perteneciente a la muestra control C1.



Figura 19. Amplificación de los exones 16 al 26 del gen *MYH7*. Corrida electroforética de los productos amplificados por PCR correspondiente a los amplimeros 16 al 26 del gen *MYH7*. Gel de agarosa 3% teñido con bromuro de etidio. Carril M: marcador de peso molecular 100 bp. Carril 1-11: amplimeros 16 al 26 respectivamente perteneciente a la muestra control C1.

Establecidas las condiciones de PCR, se logró amplificar los 24 exones de los 22 pacientes y las 3 muestras controles.

Así el análisis *in silico* de los cebadores, permitió aumentar la posibilidad de obtener los productos de PCRs de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.

Los amplímeros obtenidos de los 24 exones (exón 3 al 26 del gen *MYH7*) para cada uno de las muestras controles, fueron secuenciadas para verificar su identidad en el gen *MYH7*. Para ello se realizó un análisis comparativo de las secuencias de cada exón de las muestras controles C1, C2 y C3 con las secuencias del exón en el gen *MYH7* y amplímeros correspondientes reportadas en la base de datos de cardiogenomics.

En la figura 20 se muestra como ejemplo el análisis del alineamiento para el exón 13.

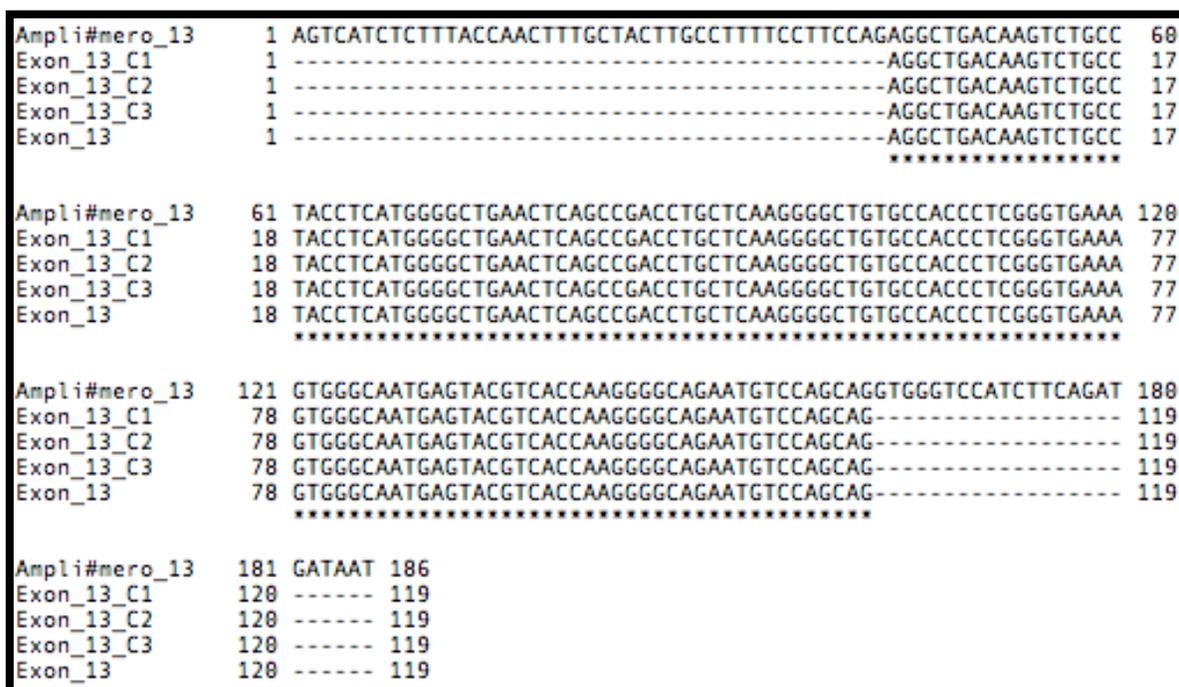


Figura 20. Alineamiento de secuencias del exón 13 para cada muestra control.

El alineamiento mostró un 100% de similaridad entre cada uno de los controles, la secuencia del exón 13 y la región del exón 13 dentro del amplimero.

VII. 3. Análisis de la movilidad electroforética de los exones del gen *MYH7* en pacientes con sospecha clínica de MHF mediante el uso de la técnica SSCP.

Antes de efectuar los análisis de SSCP con las muestras de pacientes, se estandarizaron previamente las condiciones necesarias de corrida electroforética con muestras controles, comenzando con los exones 16, 14, 19, 20, 21 respectivamente, pertenecientes al grupo de exones con mayor número de mutaciones reportadas (Tabla 8). Los parámetros considerados fueron referente a la naturaleza de la muestra como: Tamaño del amplimero, concentración del producto y contenido de G+C. Además se consideraron otras variables como: temperatura de desnaturalización de los productos de PCR, tiempo de incubación de las muestras en hielo, porcentaje del gel de poliacrilamida, tiempo de corrida electroforética, temperatura y voltaje durante la corrida electroforética. Algunos de los parámetros y condiciones principales se muestran en la tabla 11.

Tabla 12. Parámetros y condiciones para realizar los SSCP de los amplímeros 14, 16, 19, 20 y 21 del gen *MYH7*.

Amplimero del exón pb	Tamaño del amplimero	Contenido G+C %	Porcentaje del gel	Tiempo de corrida electroforética (horas)
14	257	54	8	14
16	577	53	6	12
19	322	59	8	14
20	329	52	8	14
21	377	56	8	15

En los SSCP realizados con las muestras de cada uno de los controles de los exones 14, 16, 19, 20 y 21, fue posible observar la separación de tres bandas: 2 correspondientes a cada una de las cadenas sencillas ubicadas en la parte superior y una del ADN doble cadena del amplimero. Ejemplo de esta condición se muestra en la figura 21 A) carril 1, 2 y 10 B) carriles 1, 2 y 8, figura 22 carriles 1 y 2, figuras 23-24 carril 10.

En el resultado de los análisis de SSCP de las muestras de pacientes para los exones 14, 16, 19, 20 y 21 (figuras 21-24), no se observaron cambios significativos en el patrón de migración entre sí, ni con sus respectivas muestras controles. Las diferencias encontradas se relacionaron más con las intensidades de las bandas.

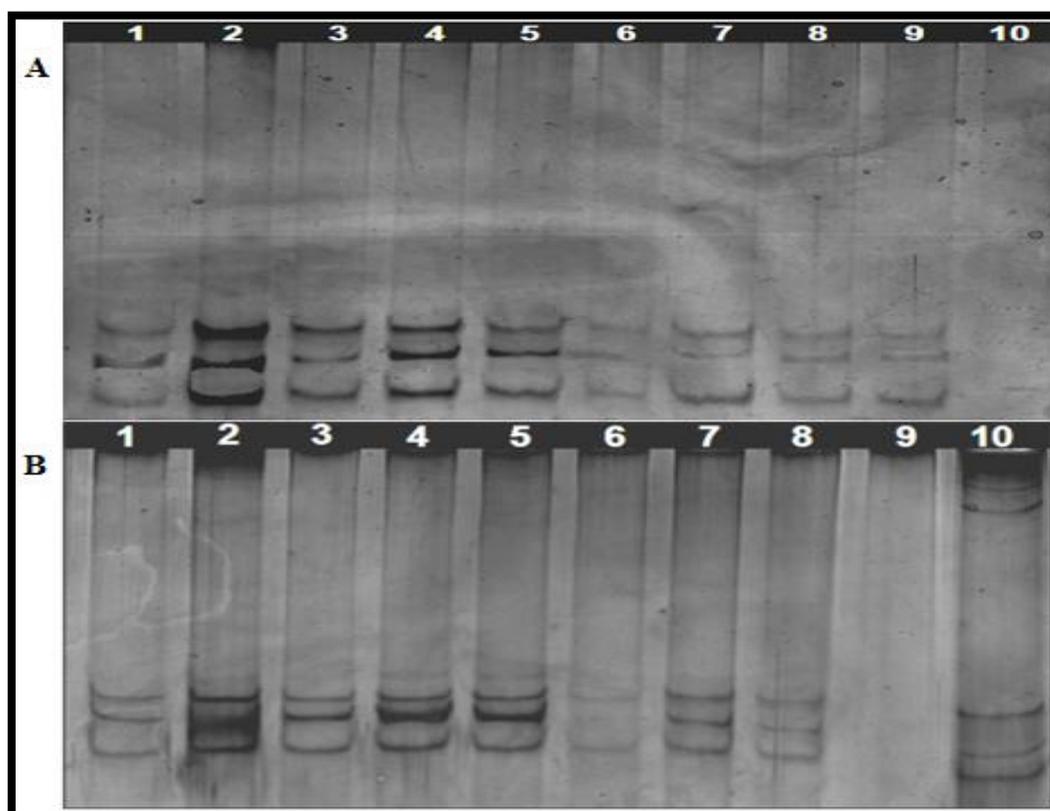


Figura 21. Análisis SSCP del exón 14 del gen *MYH7*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, visualizado con tinción de plata. A) Carriles 1, 2 y 9 muestras controles C1, C2 y C3 respectivamente. Carriles 3-8: muestra de paciente 009, 010, 011, 012, 013 y 014 respectivamente. Carril 10: control de contaminación. B) Carriles 1, 2 y 10: muestra control C1, C2 y C3 respectivamente. Carriles 3-8: muestra de paciente 015 016, 017, 018 y 019 respectivamente. Carril 9: control de contaminación. El control de contaminación consiste en mezcla de reacción de PCR con buffer desnaturalizante.

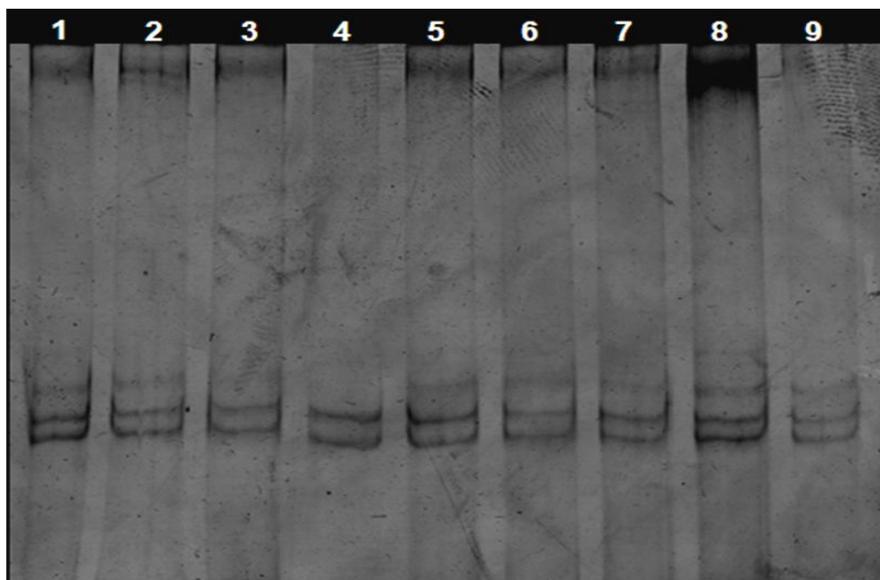


Figura 22. Análisis SSCP del exón 16 del gen *MYH7*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%, visualizado con tinción de plata. Carriles 1, 2 y 9: muestras controles C1, C2 y C3 respectivamente. Carriles 3-9: muestras de pacientes 001, 009, 010, 011, 012 y 013 respectivamente.

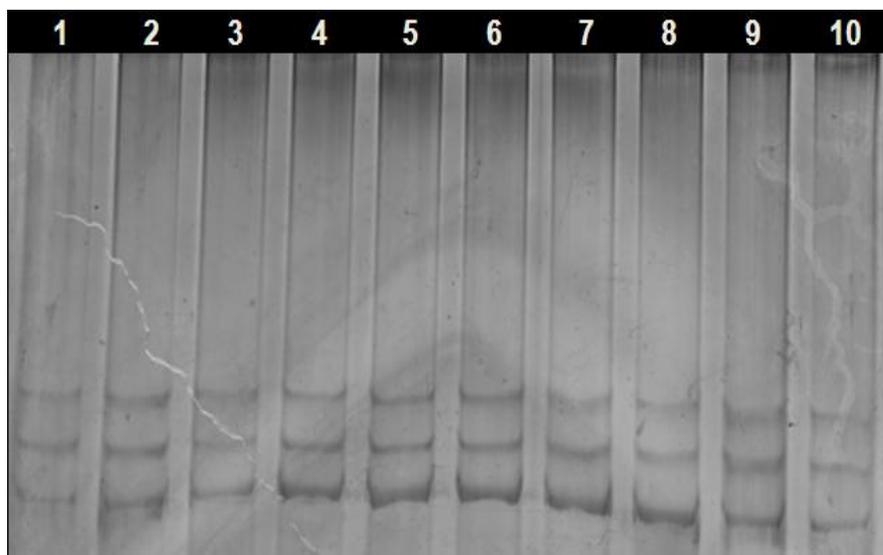


Figura 23. Análisis SSCP del exón 19 del gen *MYH7*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, visualizado con tinción de plata. Carril 10: muestra control C1. Carriles 1-9: muestras controles 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016 y 017 respectivamente.

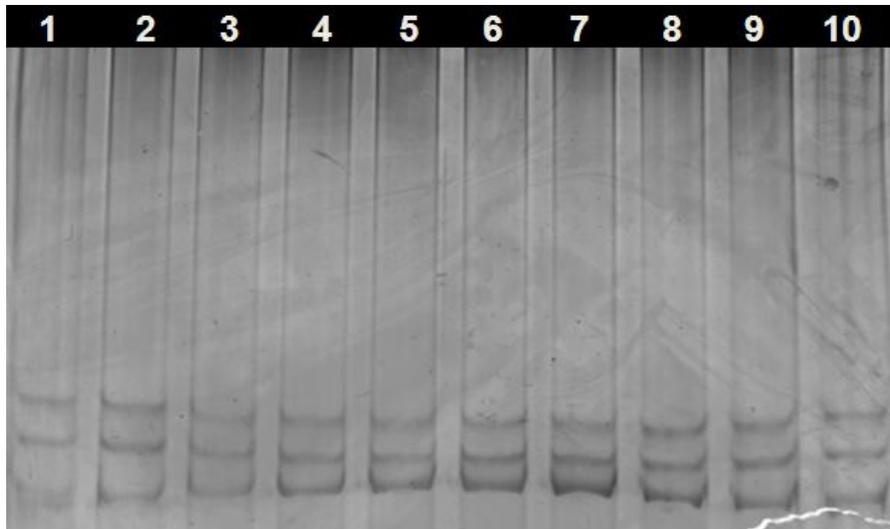


Figura 24. Análisis SSCP del exón 20 del gen *MYH7*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, visualizado con tinción de plata. Carril 10: muestra control C1. Carriles 1-9: muestras controles 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016 y 017 respectivamente.

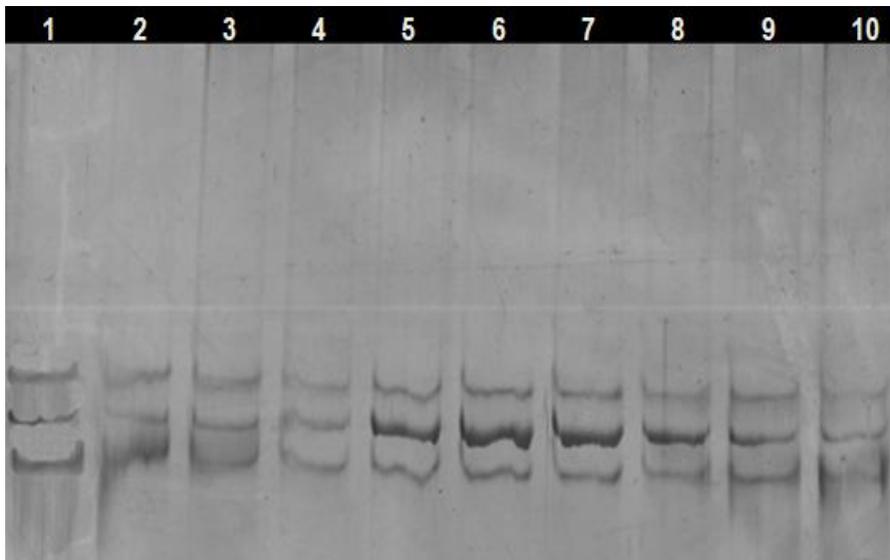


Figura 25. Análisis SSCP del exón 21 del gen *MYH7*. Electroforesis en gel de poliacrilamida 8%, visualizado con tinción de plata. Carril 10: muestra control C1. Carriles 1-9: muestras controles 009, 010, 011, 012, 013, 014, 015, 016 y 017 respectivamente.

VII. 4. Análisis de secuencias de pacientes con sospecha de MHF.

La estrategia de análisis de los exones plateó la obtención de las secuencias de nueve exones (13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23) del gen *MYH7* en 22 pacientes y tres muestras control (C1, C2 y C3), luego del análisis de cambios de movilidad electroforética en condiciones no desnaturizante.

VII.4.1. Evaluación *in silico* de las secuencias de los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7*.

El análisis de las secuencias de los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7*, planteó la comparación de las secuencias de los amplímeros de cada uno de los exones perteneciente a las muestras de pacientes con el amplímero de referencia seguido del exón, ambos proveniente de la base de datos de cardiogenomics. Simultáneamente, se evaluaron los electroferogramas en la búsqueda de variaciones asociadas a la presencia de condiciones heterocigóticas o deleciones.

Las figuras 26 a 32, muestran representativamente algunos de los análisis de secuencias nucleotídicas correspondientes a los exones de pacientes con sospecha clínica de MHF.

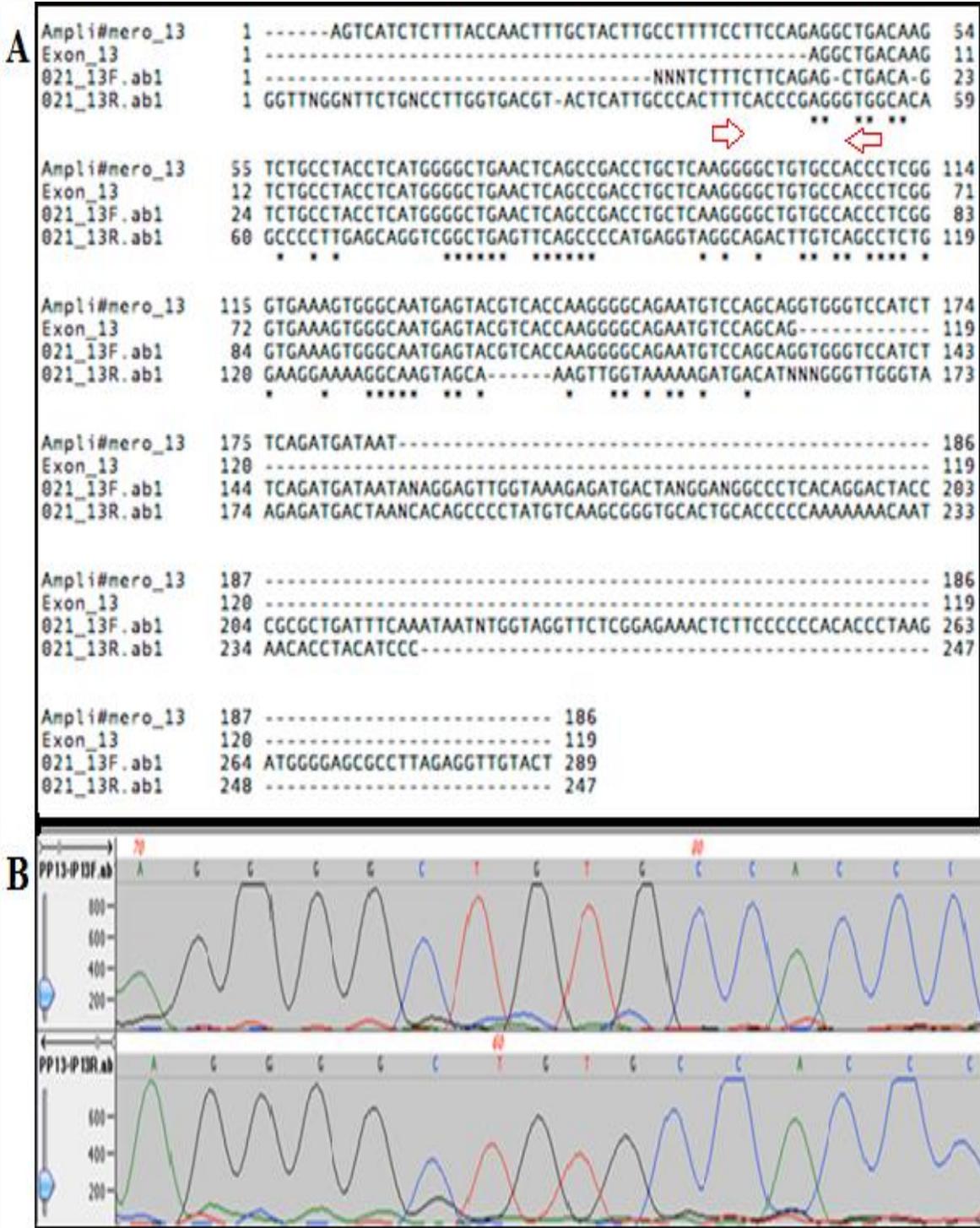


Figura 26. Alineamiento de secuencias de amplimero 13 del paciente 021. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 13 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 13 del paciente 021. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del exón 13 del paciente 021. Las fechas rojas enmarcan la región del exón evaluada por electroferograma.

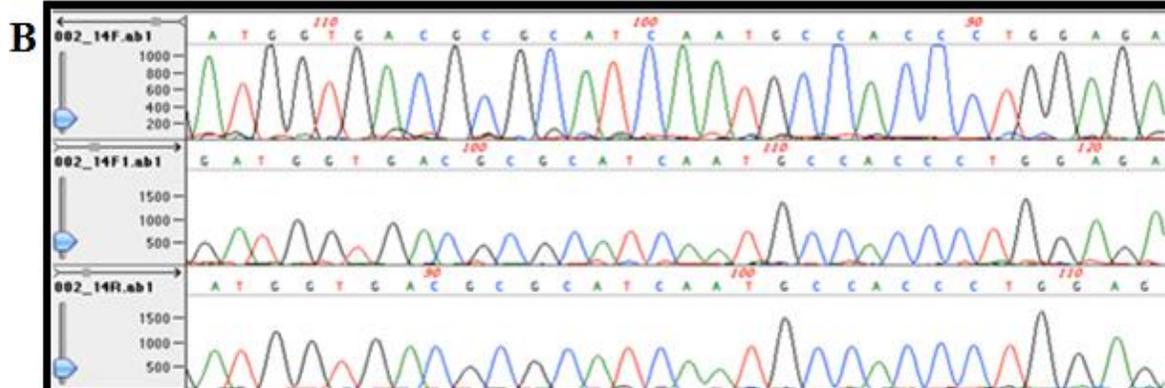
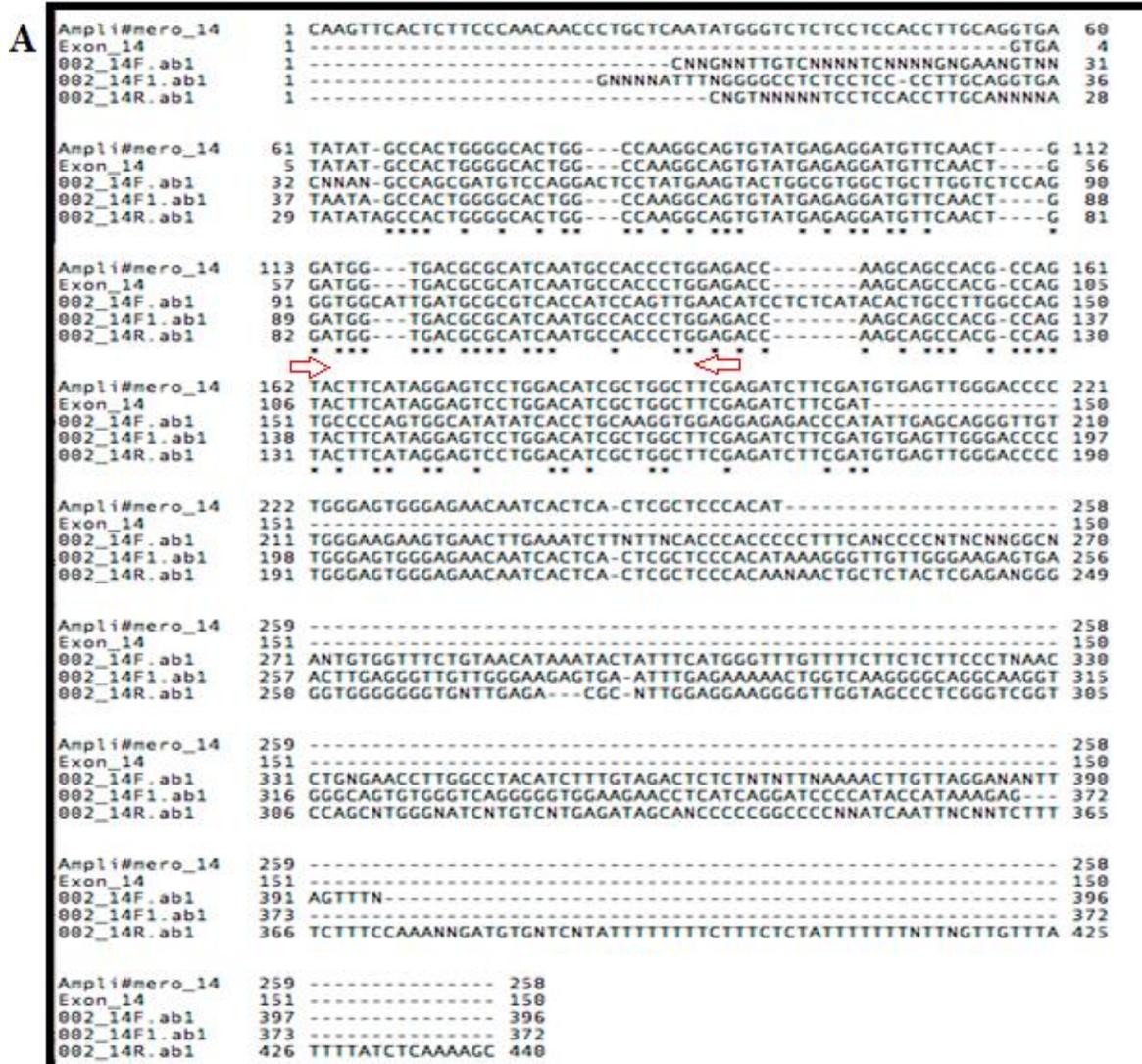


Figura 27. Alineamiento de secuencias de amplimero 14 del paciente 002. A) Se observa el alineamiento del amplimero y ex3n 14 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 14 del paciente 002. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del ex3n 14 del paciente 002. Las fechas rojas enmarcan la regi3n del ex3n evaluada por electroferograma.

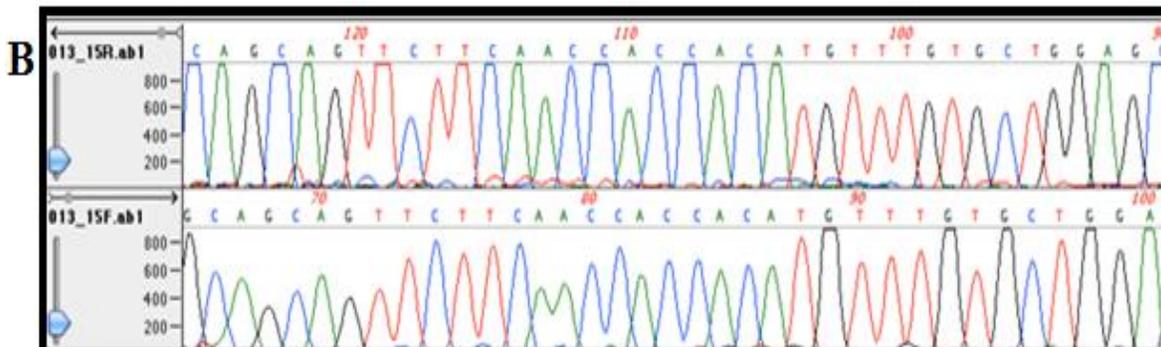
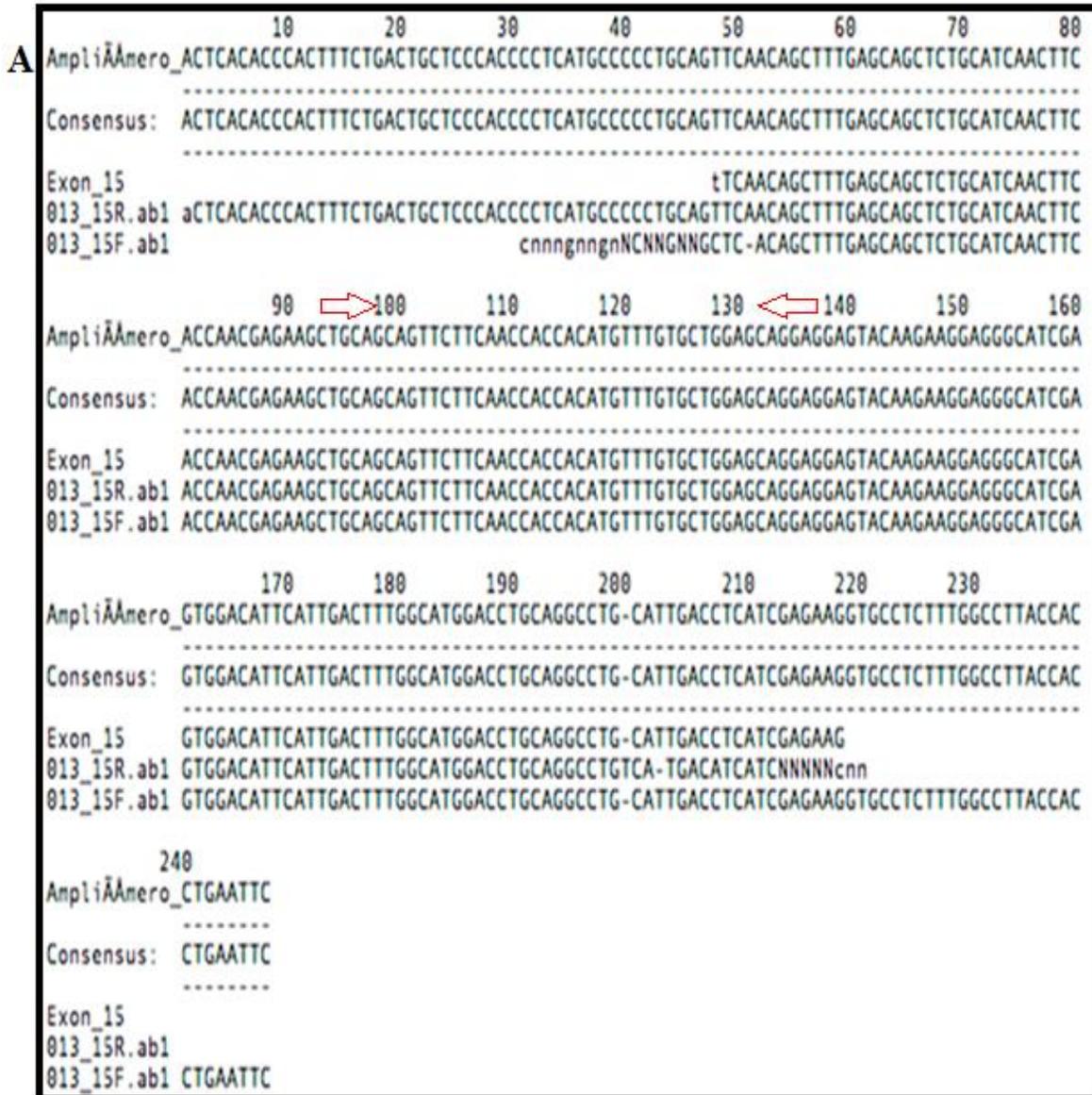


Figura 28. Alineamiento de secuencias de amplimero 15 del paciente 013. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 15 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 15 del paciente 013. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del exón 15 del paciente 013. Las flechas rojas enmarcan la región del exón evaluada por electroferograma.

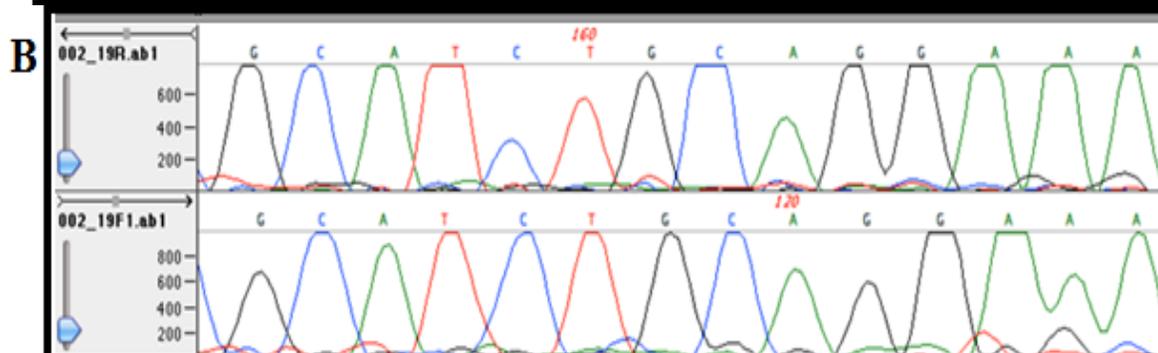
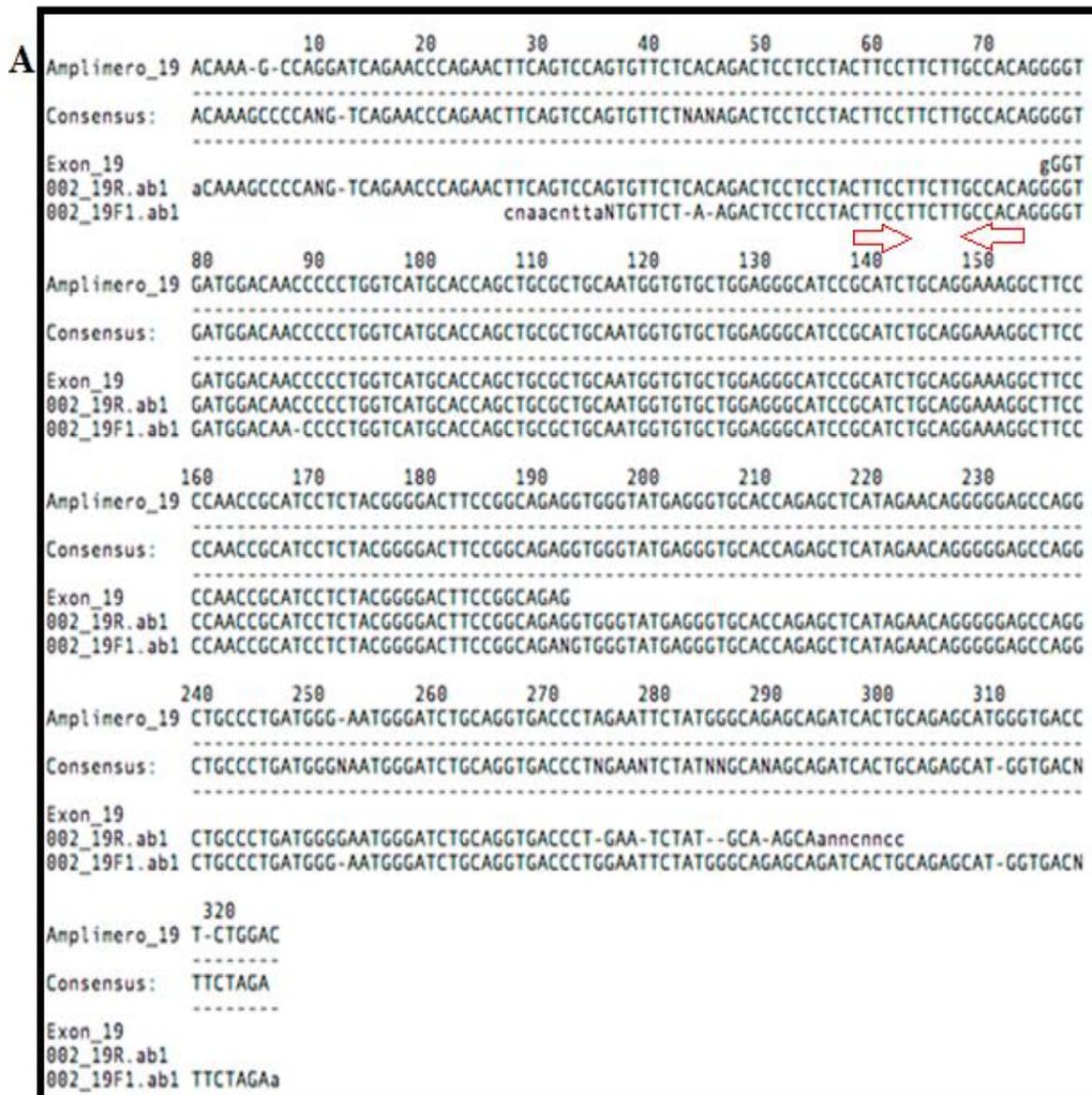


Figura 29. Alineamiento de secuencias de amplimero 19 del paciente 002. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 19 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 19 del paciente 002. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del exón 19 del paciente 013. Las fechas rojas enmarcan la región del exón evaluada por electroferograma.

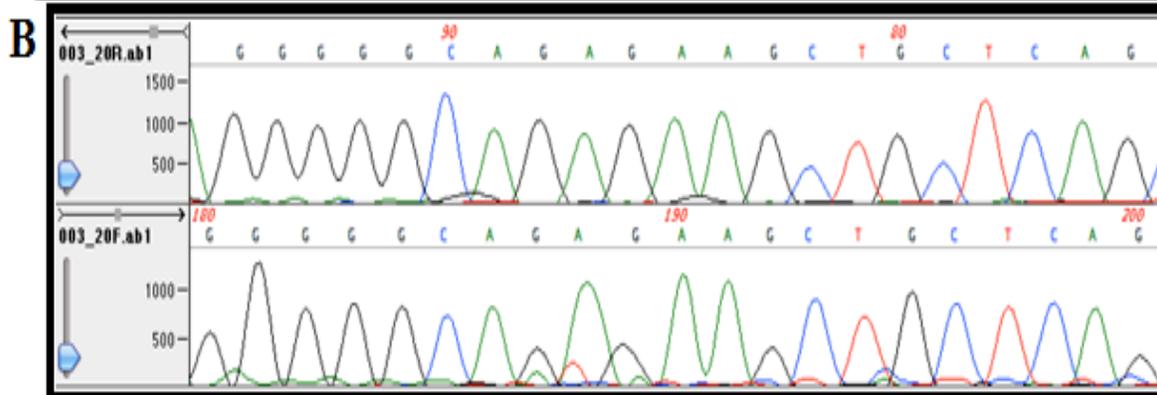
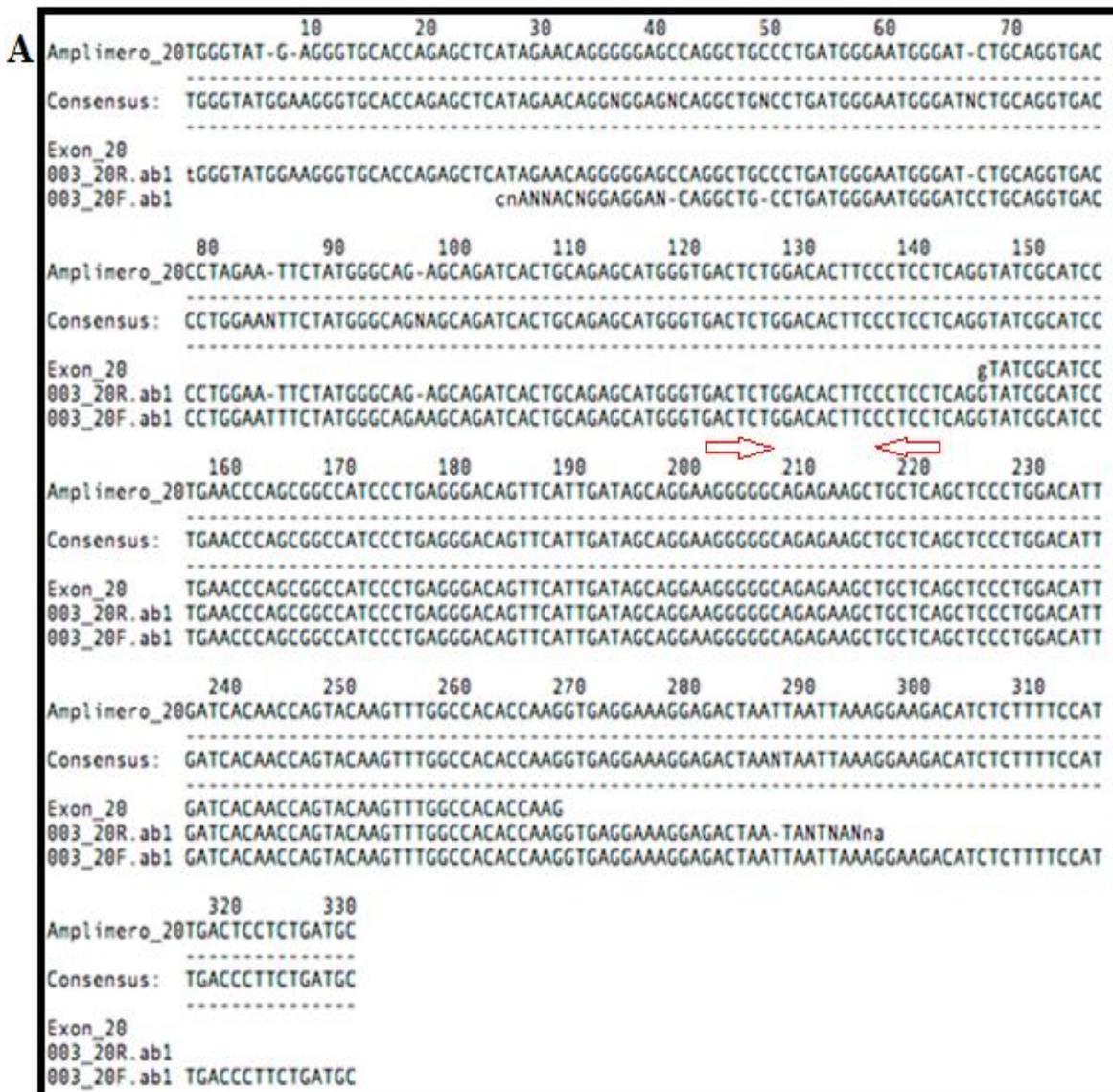


Figura 30. Alineamiento de secuencias del amplimero 20 del paciente 003. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 20 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 20 del paciente 003. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del exón 20 del paciente 003. Las flechas rojas enmarcan la región del exón evaluada por electroferograma.

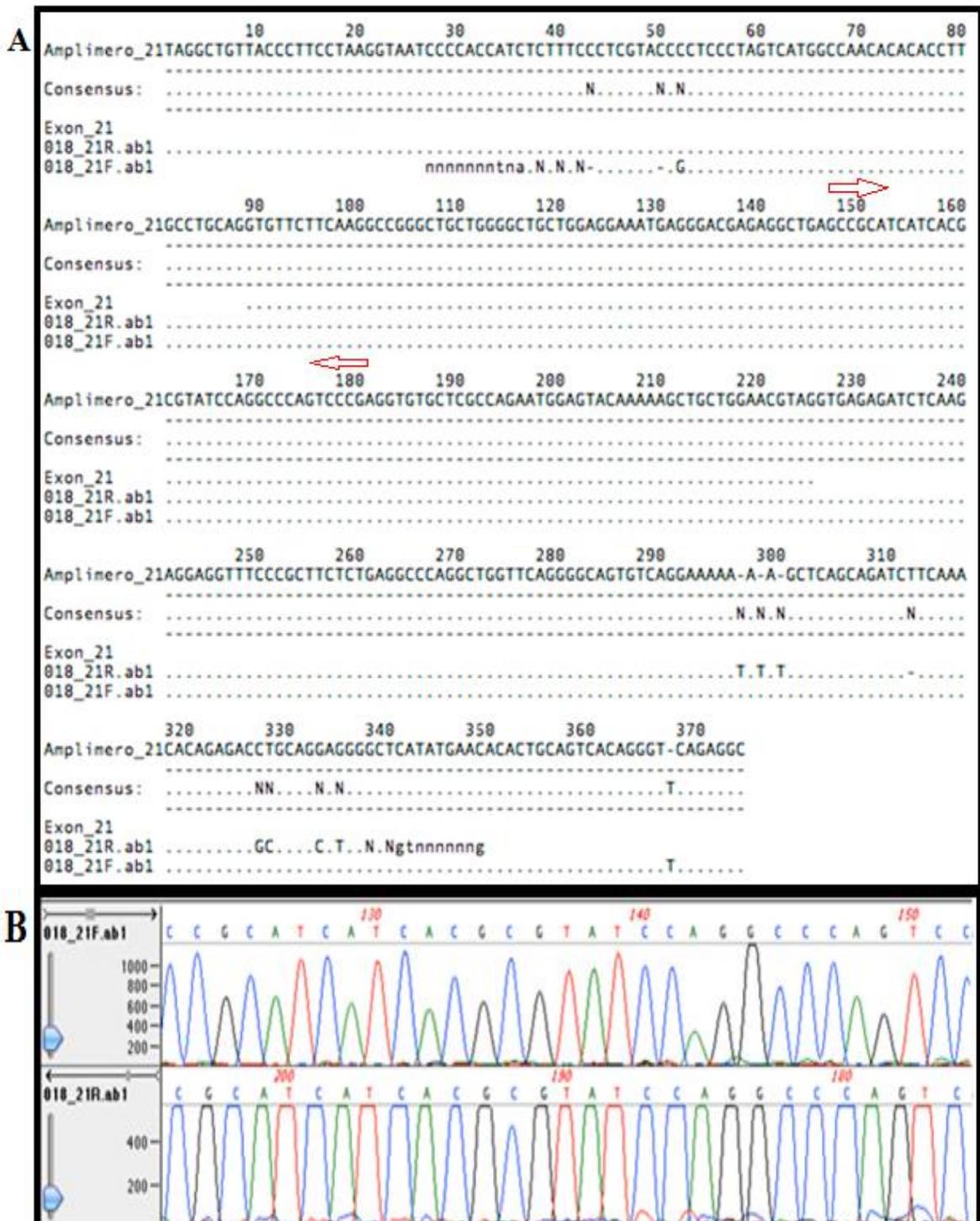


Figura 31. Alineamiento de secuencias del amplimero 21 del paciente 010. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 21 de la base de datos de cardiogenomics con la secuencia sentido y antisentido del amplimero 21 del paciente 010. B) Registro parcial del electroferograma de la secuencia sentido y antisentido del exón 21 del paciente 010. Las fechas rojas enmarcan la región del exón evaluada por electroferograma.

La evaluación de las secuencias de los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7* para cada uno de los pacientes no presentó discrepancia con respecto a la base de datos (excepto para el exón 16 del paciente 001), descartando mediante el análisis de electroferogramas la presencia de una condición heterociga en algunos de los dos alelos, ya que tanto la secuencias sentido como antisentido estaban representadas por el producto de PCR de los dos alelos. Una condición heterocigota se manifiesta como una superposición de dos curvas para una misma posición en la secuencia nucleotídica dentro del exón que en algunos casos no es notada cuando se evalúan las secuencias en formato texto. Un ejemplo de esta condición heterociga se observa en la figura 32 B.

Para verificar si la técnica SSCP fue sensible en la detección de cambios en la secuencias nucleotídicas de los amplímeros 14, 16, 19, 20, 21 y 22 del gen *MYH7*, se eligieron muestras de los exones 13, 19, 20 y 21 de tres pacientes y para el exón 16 se escogieron 5 pacientes encontrando como resultado más relevante un cambio en el exón del amplímero 16 del paciente 001 (figura 32).

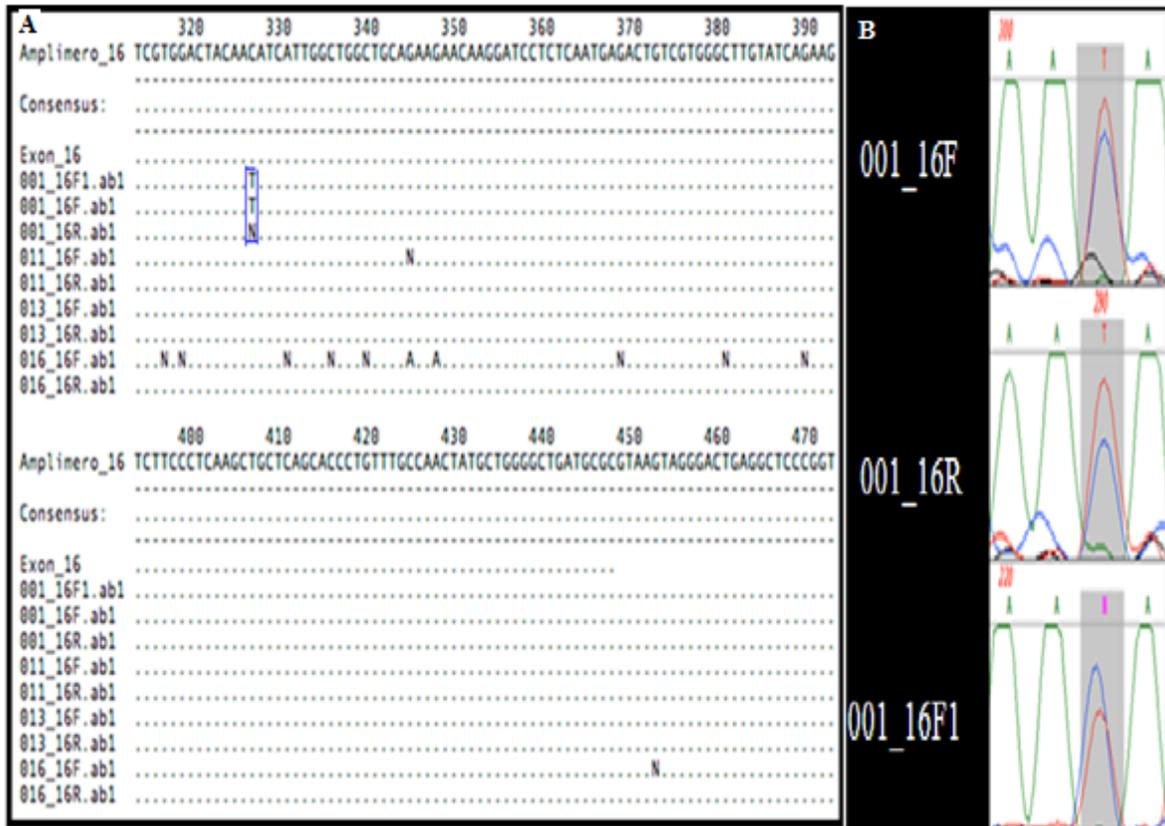


Figura 32. Alineamiento de secuencia para el exón 16 del paciente 001. A) Se observa el alineamiento del amplimero y exón 16 de la base de datos de cardiogenomics con los amplimeros 16 de los pacientes 001, 011, 013 y 016. Se realizó el alineamiento usando la secuencia sentido (5'-3') y antisentido (3'-5'). B) Registro parcial del electroferograma del exón 16 correspondiente al pacientes 001. La región sombreada muestra la presencia de dos curvas superpuestas.

En la figura 32 A, se ilustra en la región enmarcada en color azul el cambio en la secuencia nucleotídica para el paciente 001, tanto en la reacción sentido (001_16F) y antisentido (001_16R). Este resultado se verificó realizando una segunda reacción de PCR para una nueva reacción de secuenciación (001_16F1). Ni los controles ni otros pacientes evaluados en el mismo análisis (011, 013, y 016) presentaron dicho cambio.

Para observar los cambios en la secuencia del exón 16 del paciente 001 se realizó un análisis al unísono de la secuencia en formato texto y formato gráfico, este último a través del estudio minucioso de los electroferogramas, aportados por la empresa encargada de

hacer la secuenciación automatizada, corroborando así la presencia de dicho cambio (Figura 32).

En la región sombreada de la figura 32 B, se puede observar dos curvas superpuestas con similar amplitud, una de color azul que corresponde a la base silvestre y otra de color rojo que representa la sustitución de la base T por C en el exón 16 del paciente 001.

Tabla 12. Trabajo y resultados encontrados en los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 del gen *MYH7* para las muestras pacientes y controles.

exon / paciente	13	14	15	16	19	20	21	22	23
001				Cambio					
002									
003									
004									
005									
006									
007									
008									
009									
010									
011									
012									
013									
014									
015									
016									
017									
018									
019									
020									
021									
022									
C1									
C2									
C3									

De las 160 secuencias analizadas (cuadros grises) solo se encontró un cambio en el exón 16 del paciente 001 (Figura 32). Los cuadros blancos representan las muestras

analizadas por SSCP, de las cuales ninguna presentó variación en la movida electroforética en comparación con las muestras usadas como control.

VII. 5. Traducción a proteína de secuencias nucleotídicas con modificación.

Las secuencias nucleotídicas que se tradujeron a proteínas fueron aquellas donde se detectó un cambio en los exones de los pacientes analizados. La sustitución en el exón 16 T188C del paciente 001 fue la única traducción a aminoácido realizada, donde se muestra el aminoácido asparagina (figura 33).

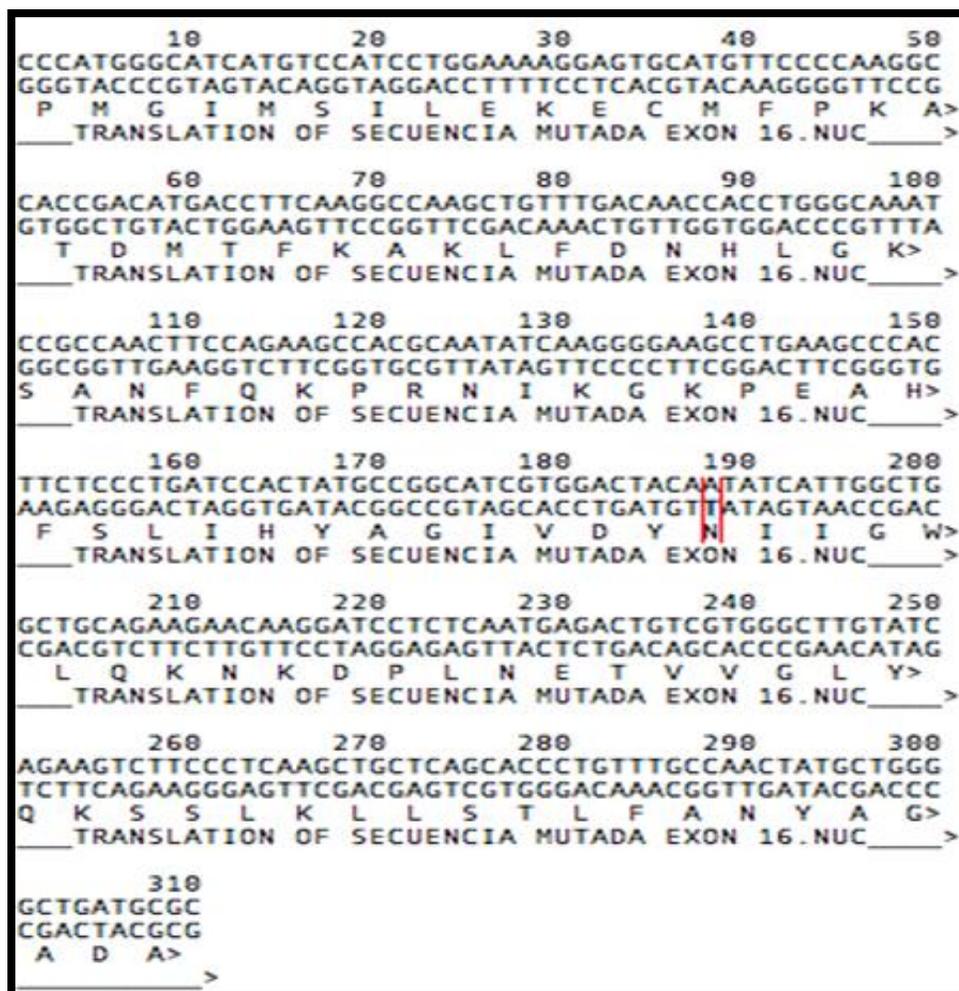


Figura 33. Traducción proteica del exón 16 del paciente 001. Enmarcado con líneas rojas se muestra la traducción del aminoácido asparagina en la posición 187 del exón 16 del gen *MYH7*.

Luego de la traducción proteica del exón 16 del paciente 001, se realizó un alineamiento con la secuencia proteica del exón 16 silvestre, no encontrándose diferencias, es decir la traducción del codón donde ocurrió el cambio es sinónima (figura 34).

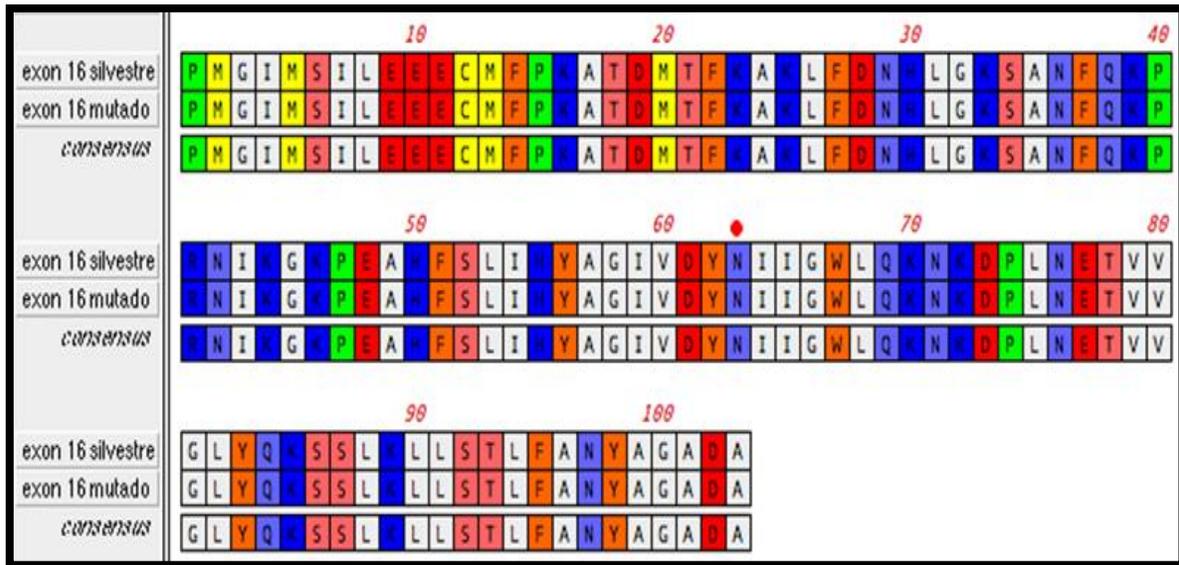


Figura 34. Alineamiento del exón 16 traducido a proteína. Se muestra la comparación del exón 16 proveniente de la base de datos con el exón 16 del paciente 001.

El punto rojo en la figura 34 muestra la posición dentro del exón donde se detecto el cambio en la secuencia proteica del exón 16 del paciente 001, el cual traduce el mismo aminoácido que el exón silvestre. Para verificar que la traducción generada correspondía al exón 16 del gen *MYH7* se realizó un BLASTP coincidiendo al 100% con secuencias perteneciente a la proteína cadena pesada de β -miosina cardiaca, específicamente con la región que es traducida por el exón 16. Además se verificó que el cambio no correspondía a ninguno de los 15 polimorfismos publicados en la base de datos de cardiogenomics ni con los 29 publicados para el gen *MYH7* de *Homo sapiens* en la base de datos SNP (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

VII. 6. Modelado molecular.

Este estudio contempló el análisis de un reducido número de pacientes ya que es un estudio preliminar para la búsqueda de mutaciones asociadas con MHF en Venezuela y razón por la cual probablemente no se detectaron mutaciones. Sin embargo, existen mutaciones que se han descrito que han resultado de suma importancia e interés como por ejemplo Arginina 403 por glutamina, esta se ha relacionado con un alto porcentaje de pacientes que han padecido muerte súbita.

Tabla 13. Características de la mutación reportada Arg403Gln.

Exón	13
Cambio de nucleótido	G>A
Posición del nucleótido en el exón	70
Posición del nucleótido en el gen	10164
Cambio de codón	CGG>CAG
Cambio de aminoácido	Arg→Gln
Cambio en la transcripción	Con sentido
Cambio en la traducción	Substitución

La sustitución Arg403Gln se ubica en la región S1 de la β miosina cardiaca. Para su análisis estructural se procedió a realizar los modelos, aceptando dos de ellos, el primero fue la región S1 sin la mutación y el segundo la región S1 con la mutación, siempre teniendo como base la plantilla cristalográfica de la región S1 de musculatura esquelética de pollo, cuyo porcentaje de similaridad con la proteína β miosina cardiaca de humano es de 79% (Rayment y col, 1995 y Lorenz y Holmes, 2010).

En la figura 35, se detalla en color verde el molde cristalográfico S1 de musculo esquelético de pollo y en color amarillo se detallan superpuestos los modelos de la región S1 de la cadena pesada β miosina cardiaca de humano.

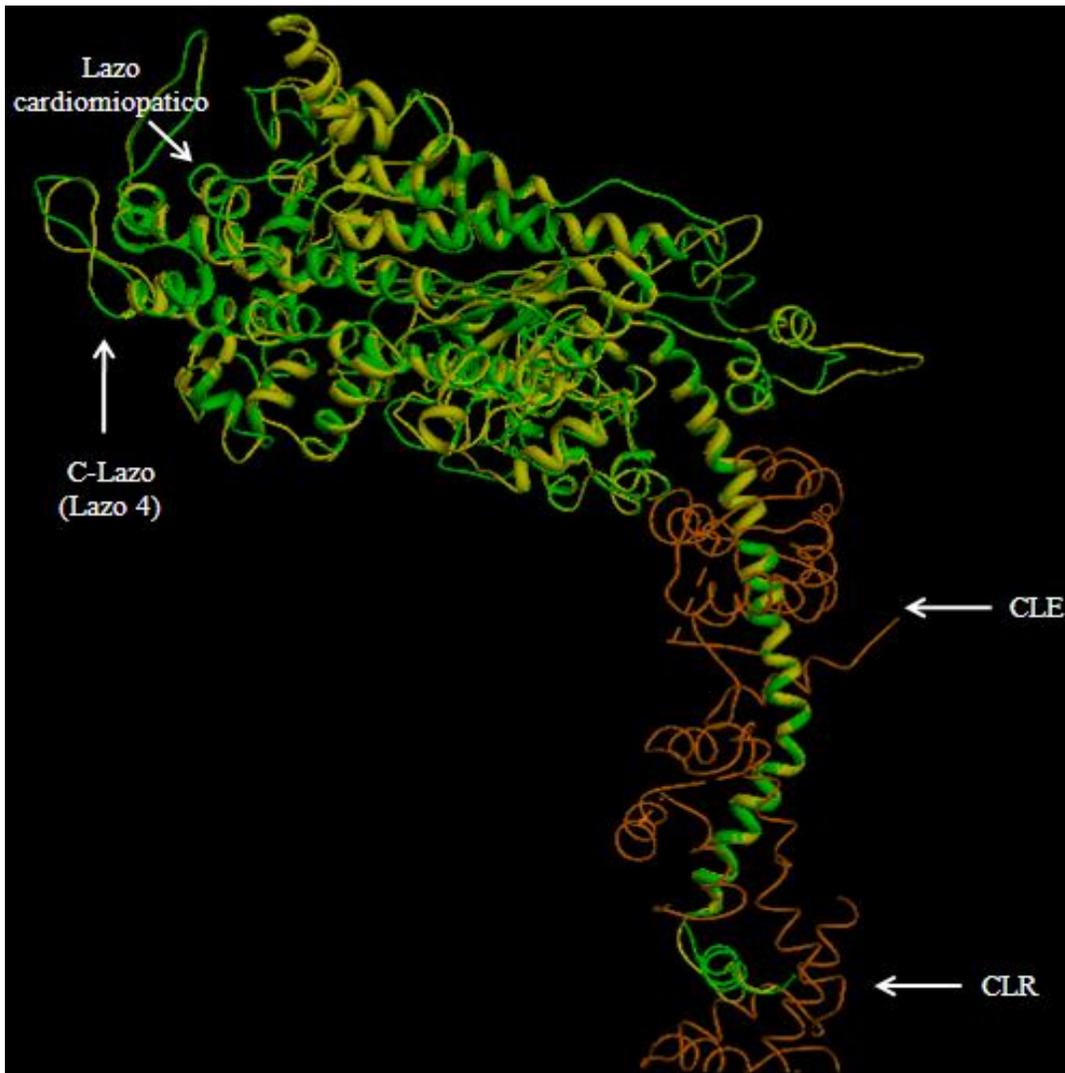


Figura 35. Modelo estructural de la región S1 de la cadena pesada β -miosina cardiaca. Se muestran los lazos de interacción con la actina. Además de las proteínas adjuntas cadena ligera esencial y cadena ligera reguladora.

En la misma figura 36, se observan los lazos que interaccionan con actina, tanto el lazo 2 como el lazo cardiomiopático de la β miosina cardiaca de humano se superposicionan espacialmente con β miosina cardiaca de pollo, encontrándose variaciones

leves en el Lazo-C (lazo 4) del cristal de musculo esquelético de pollo con respecto al Lazo-C de cadena pesada β -miosina cardiaca. Se detalla en correcta posición de interacción hacia el extremo C-terminal de la miosina tanto la cadena ligera reguladora como la cadena ligera esencial.

Al reconocer el sitio exacto de la mutación Arg403Gln en la secuencia proteica, se procedió a ubicarla espacialmente en los modelos generados, encontrándose que está en el lazo cardiomiopático de la cadena β -miosina cardiaca (figura 36).

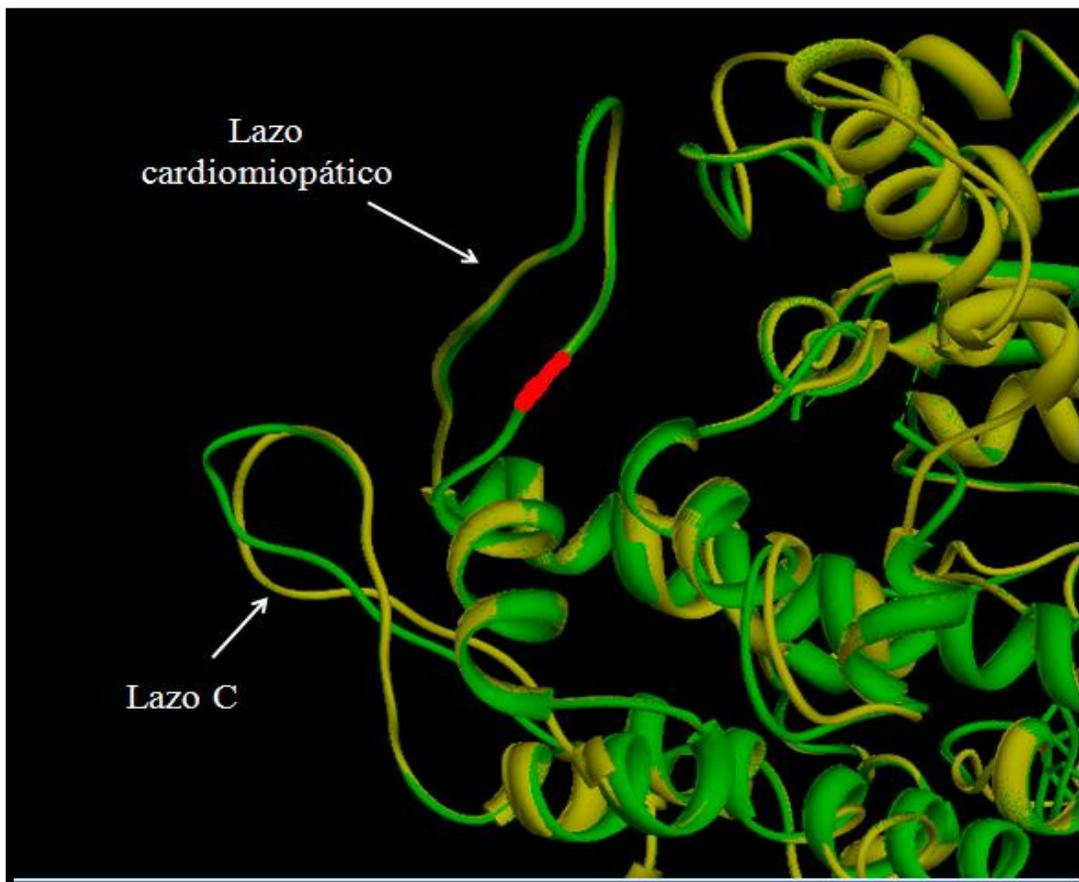


Figura 36. Lazo cardiomiopático y en región mutada. Se coloca en rojo la región donde se encuentra la mutación R403Q.

En la figura 36 se muestra una ampliación de la región donde se ubica la mutación, seleccionando los aminoácidos de la posición 403 de la proteína cadena pesada β miosina cardiaca de humana transformado a visualización por átomos, la proteína mutada presenta el aminoácido Gln y la proteína silvestre el aminoácido Arg.

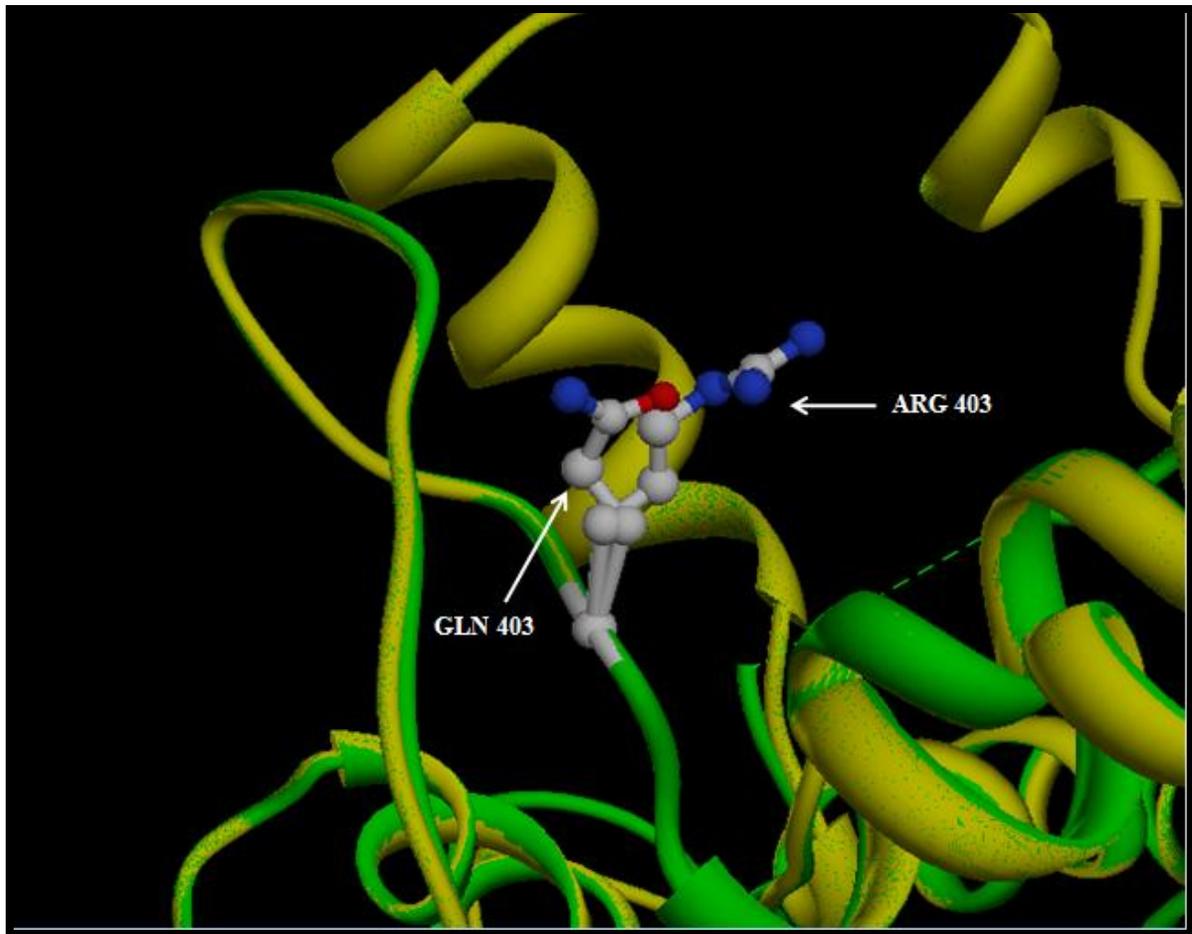


Figura 37. Representación de los aminoácidos por átomos en la posición 403 de la cadena pesada β -miosina cardiaca de humano. En gris los átomos de carbono, en color azul átomos de nitrógeno y en color rojo átomo de oxígeno.

VIII. DISCUSIÓN.

Los mecanismos por los cuales las mutaciones en las proteínas del sarcómero causan hipertrofia y desarreglo miofibrillar todavía no se conocen exactamente, pero parece que cada vez es más evidente la participación de las mutaciones en las proteínas del sarcómero en el deterioro de la función contráctil (función motora, producción de fuerza, desarreglo estructural de la proteína involucrada, o de la interacción de esta con otras proteínas) resultando en miocardiopatía hipertrófica familiar. La hipertrofia cardiaca puede ser el resultado de una serie de estímulos, incluyendo el ejercicio, la presión y la sobrecarga de volumen sanguíneo. Es posible que la proteína mutante del sarcómero β -miosina cardiaca, disminuya la contractilidad del miocardio e imponga presión sobre los miocardiocitos que podría desencadenar una respuesta hipertrófica (Roopnarine y Leinwand, 1998).

El diagnóstico clínico de MHF, ha resultado difícil por la complejidad fisiopatológica de la enfermedad, presentando síntomas (angina, síncope, palpitaciones fuertes y FCH) similares a otras enfermedades cardiovasculares además de presentar características electrofisiológicas y hemodinámicas al electrocardiograma común con otras miocardiopatías, aunado a que sólo el 50% de los pacientes con MHF son sintomáticos, siendo los patrones histológicos de hipertrofia al ecocardiograma lo que permite discriminar el tipo de miocardiopatía. Actualmente para efectuar un diagnóstico más preciso es necesario la combinación de las técnicas de electrocardiograma y ecocardiograma con herramientas de biología molecular para poder definir si existe una condición genética en el individuo (Roopnarine y Leinwand, 1998; Piva y Mattos y col,

2008). Para ello se hacen copias de las regiones de ADN genómico asociadas a la patología, en este caso los exones 3 al 26 del gen *MYH7* que codifica para la beta miosina cardiaca.

VIII.1. Amplificación de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.

Antes de realizar el análisis molecular a través del SSCP y comparación de secuencias, se debía garantizar la obtención de los amplificados para los exones 3 al 26 del gen *MYH7* utilizando la técnica de PCR. Para ello se realizó un aislamiento del ADN genómico de pacientes y controles mediante la aplicación del método no enzimático de Lahiri y Nurberger (1991) y también por medio del uso de estuche comercial para aislamiento de ADN genómico. Los resultados se pueden observar en las figuras 16 y 17 respectivamente. Las extracciones realizadas por estas metodologías conservó en gran medida la integridad del ADN, ya que se observan pocas o nada de bandas fragmentadas a lo largo de los carriles luego de la corrida electroforética. La pureza de ADN obtenida utilizando ambos procedimientos es aceptable para efectuar la amplificación por PCR, ya que relaciones 260/280 superior a 1,6 indican baja contaminación por proteínas las cuales puedan interferir con la actividad enzimática de la polimerasa y/o con la degradación del ADN por parte de nucleasas (Ausubel y col, 2002; Bartlett y Stirling, 2003; Luque y Herráez, 2006). Las bandas de ADN observadas por encima de los 10000 pb, garantizan que al menos la región que se requiera amplificar esté presente en su totalidad en la muestra de ADN, ya que el tamaño máximo de amplicero que se espera para *MYH7* es de 578 pb.

El alto porcentaje de similaridad (100 %) y bajo error por azar (baja probabilidad de que las secuencias coincidan con la región de interés producto del azar) conseguido por comparación de secuencia usando BLAST, permitió corroborar que las secuencias de los

cebadores coinciden con el cromosoma 14 específicamente con el gen *MYH7*, por lo que se pensó entonces que con el uso de estos cebadores se realizaría una amplificación efectiva de los exones 3 al 26, que son los exones de interés en este estudio. Adicionalmente, se evaluaron otras propiedades fisicoquímicas de los cebadores para garantizar las condiciones óptimas para la realización de la PCR. Este análisis se consiguió con el uso de programas de diseños de cebadores (OLIGO Primer Analysis Software versión 1.5 y OLIGO analyzer software versión 1.5 respectivamente) los cuales definieron que las secuencias cebadoras eran apropiadas para la amplificación específica de los exones 3 al 26 del gen *MYH7*. Las propiedades fisicoquímicas obtenidas se ajustan a las recomendadas por Sambrook y Rusell, 2001; Bartlett y Stirling, 2003; Dracapoli y col, 2004, ya que se registraron temperatura de espontaneidad de hibridación de los cebadores energéticamente favorables para la interacción con los exones 3 al 26 del gen *MYH7* respectivamente, es decir ΔG negativos, por otro lado el grado de complementariedad entre: el cebador sentido y antisentido, secuencias de los cebadores y entre el propio cebador, son energéticamente desfavorecidos evitando así la formación de dímeros y por tanto aumentando la eficiencia de unión de los cebadores con sus regiones blanco lo que permite obtener en teoría más de 10^{12} copias (Bartlett y Stirling, 2003).

Otra consideración tomada en cuenta fue comprobar que las diferencias entre las temperaturas de hibridación de los cebadores sentido y antisentido no superaran los 2 °C ya que esta condición permite obtener un alto rendimiento, evitando que la reacción de PCR se convierta en asimétrica (producción en mayor cantidad de una hebra de ADN que otra), además, los porcentajes de composición CG de los cebadores ubicados entre 40 y 60%, garantizan que la afinidad por la cadena molde sea flexible, separándose totalmente en el

ciclo de desnaturalización y permaneciendo unida durante el proceso de extensión (Bartlett y Stirling, 2003; Dracapoli y col, 2004). Todas estas propiedades fueron consideradas antes de emplear los cebadores disponibles en la base de datos cardiogenomics para la amplificación de los exones del gen *MYH7* con la intención de evitar la formación de falsos productos o la generación de productos inespecíficos que pudieran interferir en el análisis por SSCP y en la comparación de secuencias y por tanto llegar a conclusiones inciertas. Además el análisis de estas propiedades permitió obtener datos para optimizar la formación de productos específicos con gran número de copias, así, la sugerencia de la base de datos cardiogenomics para la temperatura de hibridación de los cebadores del amplimero 14 no se utilizó, empleándose otra temperatura (62,7°C).

Después del análisis de cebadores se realizó la PCR y se observó la presencia de productos únicos lo que sugiere una amplificación efectiva de los amplimeros 3 al 26 del gen *MYH7* (figura 18 y figura 19), además cada amplimero se ubicó en los geles de acuerdo al tamaño esperado (figura 14), por lo cual, las secuencias de los cebadores sentido y antisentido disponible en la base de datos cardiogenomics al parecer son apropiadas para la amplificación de los exones del gen *MYH7* y parte de sus regiones intrónicas adyacentes en dirección 5'-3' y 3'-5' respectivamente. Estas secuencia de cebadores también fueron usadas en los trabajos de Nishi y col, 1995; Darin y col, 2007. La optimización para obtener productos de PCR de regiones de interés es un paso fundamental para implementar las pruebas de diagnóstico molecular, ya que algunas técnicas como por ejemplo: DGGE, dHPLC, HRM y SSCP, utilizan dichos productos (Nishi y col, 1995; Mörner y col, 2003; Estrada-Cuzcano y col, 2005; Zeller y col, 2006; Millar y col, 2010).

VIII.2. Diagnostico Molecular.

VIII.2.1. Búsqueda de mutaciones en los exones 3 al 26 del gen *MYH7*.

En principio, la estrategia original para la búsqueda de mutaciones, implicaba el análisis de los exones 3 al 26 del gen *MHY7* de 20 pacientes involucrados en el estudio ya que estos exones codifican para la región proteica S1 o cabeza globular de la cadena pesada β -miosina cardiaca y parte de la región S2 o cuello conector entre la región S1 y S2, donde se ha reportado el mayor numero de mutaciones que además son las mutaciones mayormente relacionadas con muerte súbita. Sin embargo, se decidió estudiar solo los exones 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22 y 23 por poseer lo más altos reportes de mutaciones (tabla 8).

VIII.2.2. Análisis Molecular para las muestras de pacientes con sospecha clínica de MHF.

En este trabajo se realizó el análisis de los exones utilizando la técnica de SSCP y secuenciación. Primero se realizó la técnica de SSCP, y no se obtuvieron diferentes patrones de corrida cuando se compararon muestras entre pacientes y control y solo pacientes. Los SSCPs se realizaron en minigeles (10,1 cm x 7,3 cm y 0,75 mm), sin embargo, según Estrada-Cuzcano y col (2005) señalan que la mayoría de los geles para realizar SSCP deben ser maxigeles, generalmente geles tipo secuenciamiento (20 cm x 40 x 0,4) para obtener una mayor resolución, debido a que estos permiten mayor movilidad, por lo cual posiblemente nuestros análisis de SSCP se vieron limitados. Otros parámetros que influyen sobre la resolución y la sensibilidad de la técnica son los tomados en cuenta por Hongyo y col, 1993, como la concentración del amplificado, se ha demostrado que altas

concentraciones resultan en cantidades significativamente elevadas de ADN doble cadena y de visualización borrosa al teñir, esto se debe probablemente a la rápida cinética de realineamiento total y parcial que se consigue a elevadas concentraciones de ADN, mientras que concentraciones más bajas producen bandas con mejor nitidez, por eso en nuestro estudio se utilizaron concentraciones aproximadas de $5\text{ng}/\mu\text{L}$, la cual son recomendadas por Dracapoli y col, 2001, así en cada uno de los geles de SSCP se observaron dos bandas en la parte superior que corresponde a los productos simple cadena sentido y antisentido de cada amplimero y la presencia de ADN doble cadena en la parte inferior de gel ya que este migra más rápido porque es un producto lineal con menos impedimento físico que las cadenas simple cadena que están en una conformación secundaria determinada (Rodriguez y Col, 2009). Otro factor importante según Estrada-Cuzcano, 2005 es el contenido de G+C las cuales no deben ser inferiores al 40%, ya que se ha observado que sustituciones en regiones ricas en G+C pueden tener un mayor efecto en la movilidad. Sin embargo, en nuestro trabajo cualquier cambio se podría haber detectado, ya que el porcentaje de G+C de cada amplimero estaba entre 40 y 50 %. Por otro lado, Hongyo y Col, 1993 en su variante de SSCP en frío, destaca que uno de los principales parámetros que debe ser controlado estrictamente es la temperatura, la cuál debe ser constante durante toda la corrida para que se mantenga el estado único constante de conformación de las hebras sencillas, sin embargo el sistema implementado en nuestro trabajo para la corrida electroforética de los geles fueron las tetracameras con ajuste manual de temperatura a 15°C donde se registraron variaciones de temperatura que oscilaban hasta 2°C por debajo. Lo ideal, para mantener la temperatura constante son los sistemas de recirculación controlados por termostatos o bombas peristálticas que producen un control

superior de la temperatura en comparación con sistemas incubados en hielo o en cuartos de temperaturas (cavas).

VIII.2.2.1. Mutación en el exón 16 del paciente 001.

El resultado más relevante que se obtuvo con el análisis de las muestras por SSCP y análisis de secuencia fue que la muestra 001 del exon 16, presentó un cambio de base pero no mostró un cambio en la movilidad electroforética con respecto a los controles y al resto de los pacientes. Esto pudo deberse principalmente a que el tamaño del amplímero es de 578 pb, y según lo indican Larsen y col, 1999 el SSCP tiene sensibilidad de detección de 100% en productos de PCR entre 150 y 300 pares de bases, decayendo después de este límite. Este cambio se presentó en condición heterocigota, ya que el cambio de nucleótido T por C se refleja en la secuencia sentido y antisentido pero en forma de dos curvas superpuestas al electroferograma (Ver figura 32B). La superposición de las dos curvas indica que un alelo posee la base silvestre y el otro alelo el nucleótido mutante. Esta variación o cambio de nucleótido, traduce para el aminoácido control (figura 33 y 34). Sin embargo no se pueden descartar los efectos fenotípicos de MHF, ya que el estudio realizado por Tsoutsman y col, 2008 encontraron en un mismo paciente hipertrofia y variaciones nucleotidicas sin efecto junto con mutaciones con sentido. Aunque ellos sugieren que el desarrollo de hipertrofia es consecuencia de las mutaciones ubicadas en los exones y no en los intrones, tampoco descartaron que factores modificadores (ejercicio, factores ambientales, dieta) y factores genéticos como mutaciones en otros genes pudieron haber influido en la manifestación de la patología. Hasta ahora no se ha encontrado que los cambios sinónimos dentro de los exones en los genes que codifican proteínas del sarcómero se relacionen con MHF (Xu y col, 2010). Se sugiere que la mutación encontrada en el

paciente 001, sea un polimorfismo, aunque no se ha reportado como tal en las base de datos de cardiogenomics ni SNP. Igualmente, para definir la condición de polimorfismo es necesario que la sustitución se encuentre presente al menos en el 1% de la población general (Estrada-Cuzcano, 2005), y en este estudio no se manejó un alto número de muestras.

En cuanto al porcentaje de detección de mutaciones para la población estudiada, solo se encontró un cambio en uno de los 22 pacientes evaluados, lo que corresponde al 5%. En comparación con otro estudio donde se analizaron los exones 3 al 26 del gen *myh7* (Tanjore y col, 2010) la detección de cambios en las secuencias alcanza cifras comparablemente semejantes, ya que de 95 pacientes evaluados se consiguió 4 variaciones en distintas personas enfermas, lo que corresponde al 4,2% de los pacientes evaluados. Otro trabajo como el de Nishi y Col, 1995 obtuvo un 2% de identificación al evaluar 22 exones del gen *myh7*.

Aunque el porcentaje de detección resulto similar a algunos estudios es relativamente bajo en comparación con estudios hechos en poblaciones chinas donde se consiguen un elevado número de mutaciones, tal es el caso de Song y col, 2005, donde se realizo la búsqueda de mutaciones en los genes *myh7*, *mybpc3* y *tnnt2* reportando 25 mutaciones diferentes en 34 de los 100 pacientes estudiados. De las cuales 15 mutaciones fueron encontrada en los primeros 23 exones del gen *myh7*. Sin embargo la búsqueda de mutaciones se llevo completamente a cabo con el análisis directo de secuencias.

A pesar de que en este trabajo se obtuvo porcentajes de identificación de mutaciones en los pacientes evaluados similar a otros estudios, no se descarta el hecho de

que los criterios clínicos de inclusión de pacientes por parte del personal médico hayan sido flexibles, presumiendo que algunos pacientes evaluados en este estudio no poseían MHF, sino otro tipo de afección miocárdica, lo que pudo determinar bajos porcentajes de detección de mutaciones, esto es enfatizado por Andersen y col, 2008, que determinan que es necesario la aplicación de la totalidad de las pruebas clínicas, exámenes físicos, historial familiar e incluso pedigrí para cada uno de los pacientes. Otra condición presente es que a pesar de que se evaluó los exones del gen *MYH7* con mayor número de reporte de mutaciones para MHF, no se descarta que en la población venezolana la frecuencia mutacional para cada gen sean distintas a las encontradas en otros estudios, ya que esta enfermedad posee una alta variabilidad intra e intergenética (Kawaguchi, H, 2003; Uro-Coste y col, 2008).

Otro aspecto que debe considerarse es que debe incluirse el análisis de las regiones intrónicas adyacentes de los exones estudiados. Estas regiones son ampliamente conocidas como fuente de alta variabilidad y presencia de la mayoría de los polimorfismos reportados, sin embargo muchos estudios en MHF solo involucran el análisis de las regiones correspondientes a los exones incluyendo el realizado en este trabajo. La importancia de evaluar las regiones no codificantes radica en que estas pueden ser fuentes reguladoras a distancia de la transcripción (elementos en trans) y por tanto influir en la eficiencia y tasa de transcripción de la RNA polimerasa. Cambios en estas regiones pueden modificar los codones de ARNm y por tanto la traducción de una proteína mutada. Otra consecuencia es que se puede generar un efecto intensificador el cual se sobregene la producción de ARNm lo que conduzca a una sobreexpresión de la proteína y por tanto el desarrollo de hipertrofia del miocardio (Wheeler y col, 2009).

VIII.3. Ventajas y desventajas de la técnica SSCP en comparación con otras técnicas moleculares para la búsqueda de mutaciones asociadas a MHF.

La técnica de SSCP se sigue usando por ser factible para detectar polimorfismos o mutaciones conocidas o desconocidas, siendo las desconocidas las más numerosas del genoma y las más difíciles de reconocer. Sin embargo, cada vez se hace más evidente su suplantación por técnicas moleculares más sensibles o por la secuenciación automatizada, esta última de carácter más eficiente y con mejor precisión, pero costosa para ser usada de manera rutinaria (Estrada-Cuzcano y col, 2005).

En cuanto a las técnicas para detectar mutaciones en MHF está la prueba piloto realizada por Zeller y col, 2006 los cuales usaron electroforesis en geles con gradientes de desnaturalización por sus siglas en inglés (DGGE), detectando variaciones en la movilidad electroforética de amplificadores de hasta 600 pb, aunque la técnica es de fácil aplicabilidad se debe tener el equipo necesario. En cuanto al tiempo de ejecución es igual que el empleado para SSCP hasta de 15 horas incluso más.

Sin embargo, para alcanzar mayor sensibilidad en detectar mutaciones, se ha implementado el uso de la técnica HRM por parte de Millat y col, 2010, los cuales analizaron 34 mutaciones previamente identificadas en pacientes con MHF, detectadas en su mayoría en productos de PCRs que oscilaban entre 200 y 550 pares de bases, estos resultados se corroboraron mediante HPLC y secuenciación directa. La principal desventaja de aplicar esta técnica es contar con el equipo de escáner que se acople al termociclador y realtime, además se debe contar con el colorante intercalador de primera generación, ambas

cosas hacen costosa su aplicación aunque con resultados que pueden obtenerse en menos de 15 minutos.

VIII.4. Funcionamiento de la proteína cadena pesada de β -miosina cardiaca a través de los cambios estructurales que se producen a partir de la mutación R403Q.

Debido a la complejidad de establecer una relación genotipo fenotipo por medio de modelos animales se ha implementado el modelaje molecular como herramienta complementaria para determinar los efectos de las mutaciones en la estructura de la proteína y sus implicaciones en el sarcómero. Estos modelos estructurales permiten definir de manera más precisa la estratificación de riesgo e inferir sobre el tipo de medicamento regulatorio de la contracción más recomendable para su aplicabilidad de acuerdo al tipo de mutación.

La complejidad de relacionar el fenotipo con el genotipo, puede ejemplificarse con la mutación Arg 403 Gln incorporada en un modelo de miocitos cardíaco de felino que resultó en la interrupción del funcionamiento del sarcómero, que pudo ser debido al aumento de la tasa de rotación de la miosina sobre la actina o al deterioro de la interacción de la miosina mutada con la actina, afectando su unión con la actina (Marian y col, 1995). Esto último concuerda con los resultados de Roopnarine y Leinwand, 1998 en los cuales la interacción actomiosina se deterioró cuando se evaluaron los efectos de la mutación Arg403Gln en la región S1 de la miosina, lo que sugiere que los defectos bioquímicos del dominio motor pueden afectar a todo el conjunto de filamentos de miosina en el sarcómero. Sin embargo Becker y col, 1997 informaron que las mutaciones Arg249Gln y Arg403Gln ensamblaban correctamente los filamentos gruesos de los miocitos cardíacos de rata, lo que

sugiere que las proteínas mutantes no interrumpen el montaje de miofilamentos. Aunque las diferencias entre estos dos trabajos (Marian y col 1995; Becker y col, 1997), puede deberse a diferencias en los miocitos cardíacos (felino contra rata) y/o la cantidad de proteína mutante incorporada al sarcómero, producto del uso de diferentes vectores de expresión con diferentes promotores. Curiosamente en la biopsia de tejido de corazón de un paciente fallecido con la mutación Arg403Gln se mantuvo la organización miofibrilar intacta (Roopnarine y Leinwand, 1998).

Debido a la discrepancia en los efectos de la mutación R403Q en la patología, y a que se ha demostrado su presencia en varios casos de muerte súbita, se decidió usar esta mutación para desarrollar el modelo molecular con el propósito de obtener una mejor correlación genotipo-fenotipo.

Aunque la miosina cardíaca de humano no ha sido cristalizada, se han realizado muchos modelos estructurales usando la proteína miosina de musculo esquelético de pollo, que aunque presentan diferencias en su secuencia primaria y están alejadas filogenéticamente, lo más probable es que conservan la misma estructura, ya que otros modelos realizados con la proteína cristalizada de *Dyctyostelium discoideum* (anfibio) posee la misma conformación espacial que la proteína de pollo, lo que infiere que mutaciones en cualquiera de estas proteínas tengan consecuencias funcionales similares (Lowey S, 2002). La mutación R403Q por estar estrechamente relacionada a la interacción con la actina probablemente afecte la actividad enzimática y propiedad mecánica de la miosina. Esto resultados se corroboraron con estudios bioquímicos realizados por Cuda y col, 1993, donde se registró una reducción de la velocidad de movimiento en un 18 % con respecto a los controles, aparentemente parece poco significativo pero debe considerarse

que la mutación fue evaluada bajo condiciones heterocigota, cuya velocidad pudo ser compensada por el alelo normal, la base de estos resultados se explica a través de la hipótesis que la MHF es causada por la alteración de la interacción actinmiosina acompañada por pérdida de función y compensada por hipertrofia cardiaca.

Para realizar un análisis estructural de la proteína mutada R403Q, primero se debe lograr ubicar la posición no solo en la secuencia aminoacídica sino también su ubicación espacial, por tanto se desarrolló el modelo estructural para corroborar la posición espacial de la mutación (figura 36 y 37).

Los criterios de evaluación para estudiar los efectos estructurales de la mutación en el funcionamiento de la proteína fueron: evaluación del cambio de aminoácido estudiando el modelo generado en este trabajo. El otro criterio fue comparar y hacer correlaciones de mutaciones modeladas en otros estudios similares a la mutación R403Q. Desde el punto de vista bioquímico la mutación R403Q, tiene implicaciones funcionales debido a su localización, al cambio en la carga de aminoácido, además de cambios evidentes en la interacción proteína-proteína ya que se encuentra en el lazo miocardiopático cerca de los sitios de unión a la actina de la denominada región 50 kDa en S1 (figura 46).

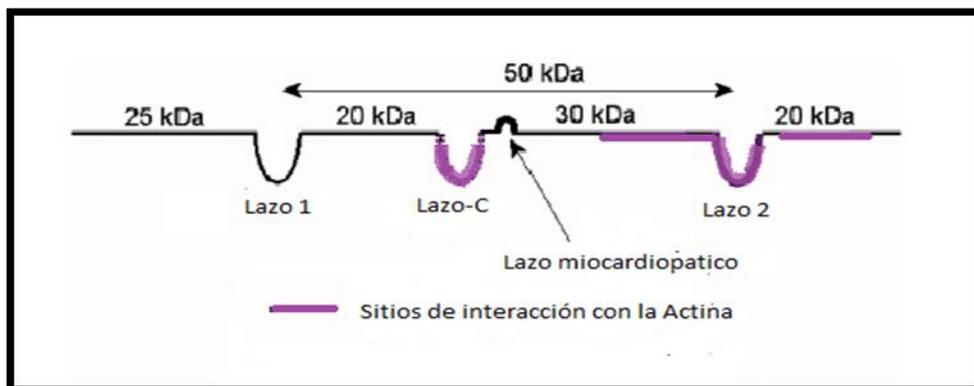


Figura 38. Esquema lineal estructural de la cadena pesada β -miosina cardiaca región S1. Se muestran los sitios de interacción con la actina en la denominada región 50 kDa de S1. Modificado de Ajtai y col, 2004.

Las principales regiones de contacto de la miosina con la actina en S1 ocurren entre los aminoácidos 529-558 y los aminoácidos 647-659, estas secuencias forman alfa-hélices y mantienen una interacción con la actina por fuerzas hidrofóbicas. Otra interacción primaria con la actina la forma el lazo 2 constituido por los aminoácidos 626 a 647, cuya interacción se produce por fuerzas iónicas. Adicionalmente, existe otro contacto con la actina en la región de 50kDa antes del lazo 2, específicamente entre los aminoácidos 567 a 578 y el lazo miocardiopático por los aminoácidos 404-415. Se infiere que la mutación R403Q, no posee implicaciones a nivel de aceptación o sensibilidad al ion calcio o a la actividad ATPasa, ya que solo cortes con tripsina en el lazo 1, tienen implicaciones severas sobre dicha actividad (Coureux y col, 2003; Ajtai y col, 2004).

Sin embargo, no se puede descartar dicha influencia sobre la actividad ATPasa, ya que en otros trabajos realizados por los autores Ajtai y col, 2001, develaron que el lazo C (aminoácidos 362-376), tiene importante influencia en la traducción de la energía y la posible interacción con la actina, y debido a la cercanía espacial de la mutación R403Q con esta región se puede pensar que tenga cierto grado de influencia en la interacción proteína-proteína por el cambio en la nube electrónica circundante (Ajtai y col, 2004).

Al evaluar el modelo desarrollado en este trabajo se determina que el cambio de aminoácido Arg403Gln ocurrido en el lazo miocardiopático, introduce una carga eléctrica de polaridad neutra, además de la reducción del número de átomos para la misma posición, siendo la glutamina un aminoácido con una cadena de carbono más corta que el aminoácido arginina. Asimismo el aminoácido Gln parece espacialmente más cercano a otra región del propio lazo miocardiopático, todo esto puede llevar a implicaciones sobre la interacción

proteína-proteína, afectando la capacidad de unión de la cabeza globular con la actina (figura 39).

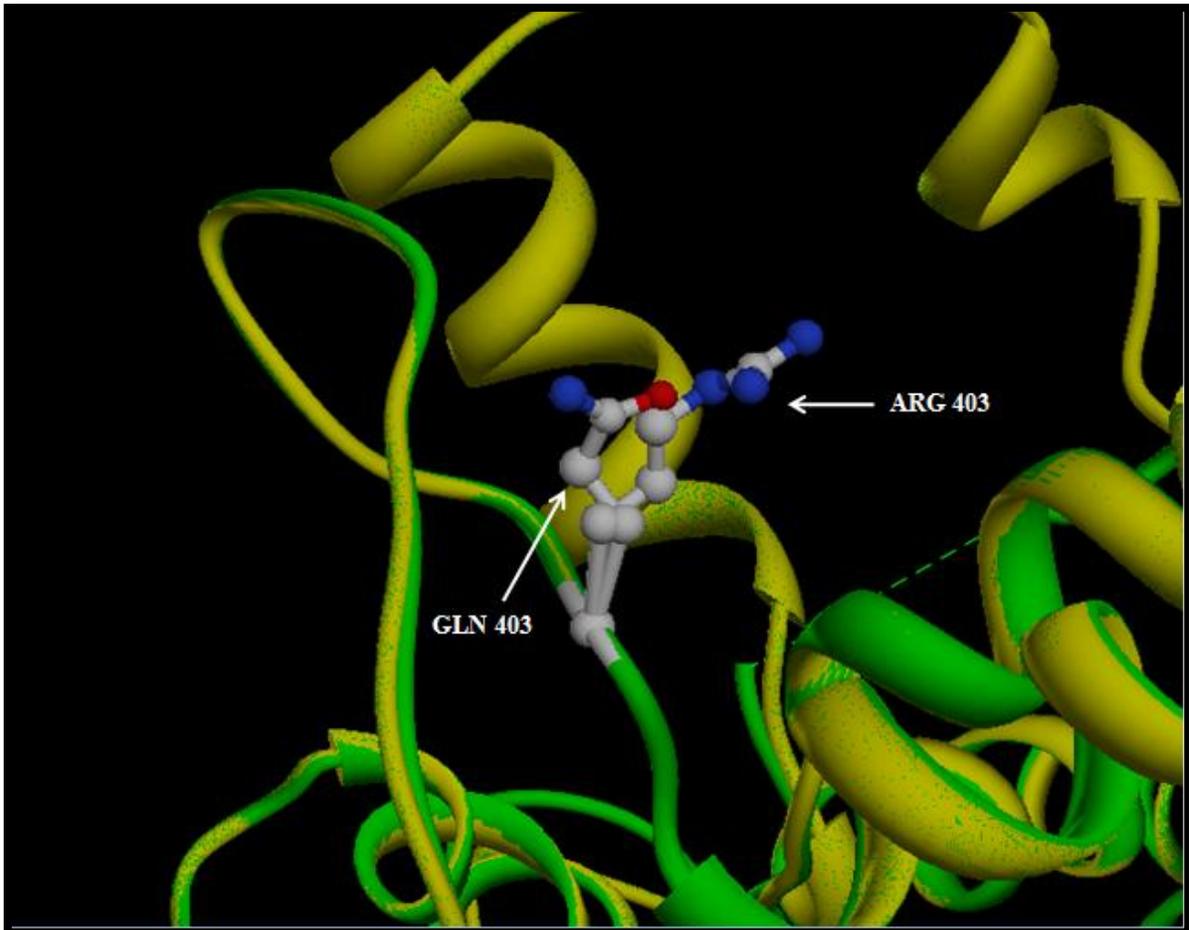


Figura 39. Representación atómica de la posición 403 en el modelo S1 de miosina cardíaca. En gris se muestra la cadena carbonata de los aminoácidos Gln y Arg en la posición 403 de la región S1 de la cadena pesada β -miosina cardíaca.

Desde el punto de vista estructural se pueden detallar con precisión los posibles efectos que conlleva la mutación R403 que aunque no interacciona directamente con la actina, si tiene efectos en el cambio de polaridad de la región adyacente a lazo 2. Este efecto es evaluado en una mutación similar Arg405Glu estudiada en el trabajo de Lorenz y Holmes, 2010, además este estudio es el más reciente donde se explican detalladamente los sitios y los aminoácidos involucrados en la interacción actino-miosina, en la figura 40, se muestra el complejo actina-miosina y los monómeros en la actina (AC1-AC5) por donde

rota la cabeza globular (S1), en la parte B de la figura se detallan el dominio superior 50K (Upper 50K) y el dominio inferior 50 K (Lower 50 K), donde ocurren la interacción mas fuerte con la miosina, estos dominios están separados por la hendidura formada por los denominados lazo 2 (Loop 2), lazo miocardiopatico (CM), y el lazo C también denominado lazo 4 (Loop 4), en estos lazos ocurren la interacción más débil pero necesaria para el acoplamiento final de la actina con la miosina. Además se muestra la localización cerca del brazo de palanca de las proteínas cadena ligera esencial (ELC) y la proteína cadena ligera reguladora (RLC).

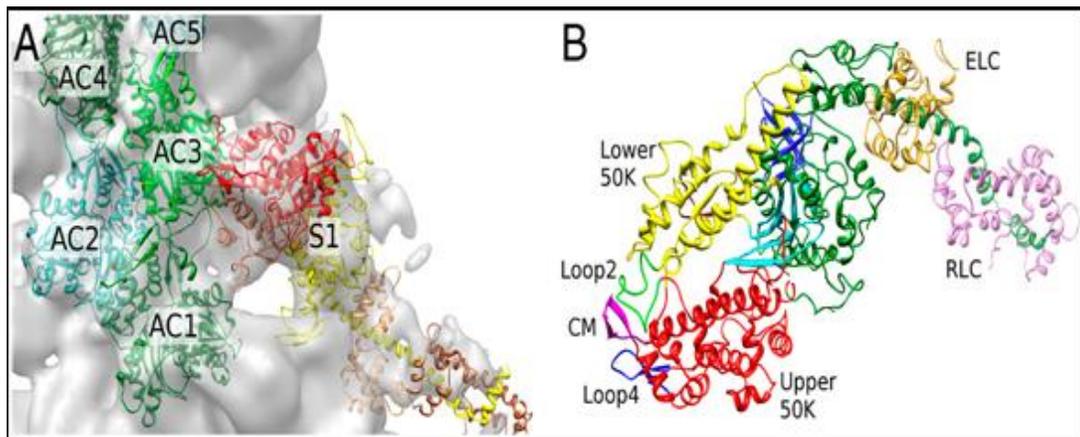


Figura 40. Complejo actina-miosina y sitios en S1 implicados en la interacción y regulación de la actividad contráctil. Modificado de Lorenz y Holmes, 2010.

El lazo miocardiopatico hace interacción hidrofóbica directa vía Glu 411 (S1) con la Lis 336 (AC3) (figura 41). La mutación Arg405Gln (similar a la Arg403Gln) produce severa MHF en humano y resulta en una disminución de la actividad ATPasa de la miosina lo cual dificulta el desplazamiento de la miosina con la miosina, esto probablemente se debe a que hay una repulsión electroestática por parte del aminoácido Glu, esto se detalla en la figura 41 donde la nube eléctrica se ve repelida por la actina (Nube azul en dirección a S1). Otra consecuencia es que esta mutación produce un puente salino con Glu 631 en el

lazo 2, lo que interfiere directamente en la traducción de energía cuando se hidroliza una molécula de ATP (Lorenz y Holmes, 2010).

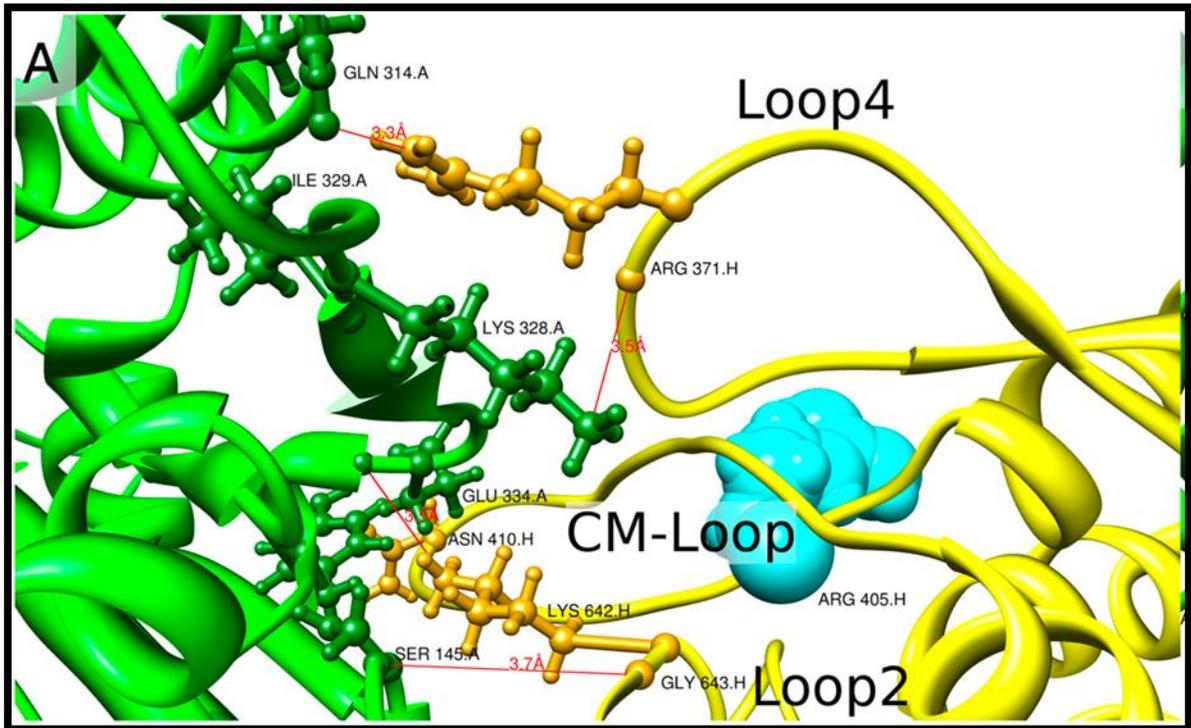


Figura 41. Interacciones electrostáticas entre los lazos de la miosina con la actina. Tomado de Lorenz y Holmes, 2010.

Haciendo analogía a los resultados encontrados por estos autores, se puede inferir que la mutación R403Q tiene un efecto más repulsivo que la mutación R405Q, ya que se encuentra más cercana a la actina, y por tanto, debe tener un mayor riesgo en cuanto a la severidad de la patología. Desde el punto de vista estructural y molecular se recomienda un tratamiento con droga con efectos cronotropicos positivo que aumente el ritmo de contracción y así compensar la disminución que produce la mutación R403Q sobre la velocidad de desplazamiento sobre la actina.

IX. CONCLUSIONES.

1. Se logró optimizar las condiciones de PCR, para obtener los fragmentos de interés correspondientes a los exones 3 al 26 del gen *MYH7* que codifica para la beta miosina cardiaca.
2. No se observó diferencia en la movilidad electroforética de corrida de los exones (14, 16, 19, 20,21) con respecto a los controles mediante la técnica de SSCP.
3. El resultado de SSCP para el exon 16 del gen *MYH7* no presentó la sensibilidad suficiente para detectar el cambio en la secuencia del amplímero en el exon 16 del paciente 001.
4. Se detectó un cambio en la secuencia de uno de los veinte y dos (22) pacientes involucrados en el estudio mediante análisis comparativo de secuencias. Lo que corresponde a un 4,5% de detección de la población evaluada.
5. El cambio T por C del exon 16 del paciente 001, resulto ser un cambio sinónimo, verificado por análisis comparativo de la secuencia proteica de los controles y de la base de datos.
6. Se logró representar la ubicación espacial de la mutación R403Q en el modelo realizado de β -miosina cardiaca.

X. RECOMENDACIONES Y LIMITACIONES.

Este estudio preliminar para el diagnóstico de MHF, hecho por primera vez en Venezuela, se puede implementar de rutina en el país siempre que se consideren las siguientes recomendaciones y limitaciones:

- Se recomienda contar con los datos clínicos y exámenes médicos de los pacientes para evaluar el criterio de inclusión en el estudio.
- El estudio debe contar con un mayor número de personas controles, para poder determinar los polimorfismos propios de la población venezolana.
- Debido a la alta variabilidad intra e intergenética de la patología es necesario involucrar el análisis del resto de los exones del gen *MYH7*, además de estudiar en conjunto otros genes del sarcómero relacionados con MHF. Se podría incluir la evaluación de las regiones intrónicas adyacentes de los exones ya que estas son regiones de importancia en la transcripción del ARNm.
- Se debe realizar el diagnóstico clínico y molecular de la familia completa del paciente con sospecha de MHF, esto permitirá determinar si la mutación se debe a un defecto genético o pertenece a un caso esporádico, en este último caso se podría indagar sobre las variables ambientales que pudieron influir en el desarrollo de MHF (actividad física, dieta estilo de vida en general).
- Se recomienda realizar los SSCP para los exones del gen *MYH7* que estén dentro del límite de resolución recomendado por los autores o al menos no mayor a los 400 pb de longitud del amplimero.
- Es conveniente aplicar técnicas moleculares complementarias al SSCP para el diagnóstico como DGGE o HRM, de esta manera lograr un estudio donde se

puedan evaluar un mayor número de muestras, verificación alterna de los resultados obtenidos con los métodos implementados y aumentar el límite de resolución y sensibilidad que se traducen en diagnóstico más asertivo.

- Se debe contar con equipos termocicladores con alta capacidad para obtener un mayor número de amplificadores en menos tiempo.
- Para evaluar directamente las mutaciones en el tipo de modelo generado en este trabajo es recomendable realizar dinámica molecular, que permita distinguir las interacciones proteína-proteína y los posibles efectos que causan en estas interacciones.

XI. BIBLIOGRAFÍA.

- Ahmad, F.; Seidman, J. Seidman, C. 2005. The Genetic Basis for Cardiac Remodeling. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **6**: 185 – 216.
- Ajtai, K., Garamszegi, S., Park, S., Velazquez, A., Burghardt, T. 2001. Structural Characterization of β -Cardiac Myosin Subfragment 1 in Solution. *Biochemistry.* **40** (40): 2078–12093
- Ajtai, K.; Garamszegi, S.; Watanabe, S.; Ikebe, M. 2004. The Myosin Cardiac Loop Participates Functionally in the Actomyosin Interaction. *J. Biol. Chem.* **279** (22): 23415 – 23421.
- Alan, E. 2003. Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* **349**: 60-72.
- Alcalai, R., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2007. Genetic Basis of Hypertrophic Cardiomyopathy: From Bench to the Clinics. *J. cardiovasc. Electr.* **19**: 104-110.
- Andersen, P.; Havndrup, O.; Hougs, L.; Sorensen, K.; Jensen, M.; Larsen, L.; Hedley, P.; Thomsen, A.; Moolman, J.; Christiansen, M.; Boungaard, H. 2008. Diagnostic Yield, Interpretation, and clinical Utility of Mutation Screening of Sarcomere Encoding Genes in Danish Hypertrophic Cardiomyopathy Patients and Relatives. *Hum. Mut.* **30** (3): 363 – 370.
- Anja, A., Kass, S., Tanigawa, G, Vosberg H-P., McKerina, W., Seidman, C., Seidman, J.G. 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: A β Cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell.* **62**: 999-1006.
- Arad, M., Seidman, J.G., Seidman, C.E. 2002. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet.* **20**: 2499-2506.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 2002. Short protocols in molecular biology. Quinta edición. Editorial Wiley. Southern Gate, England.
- Bartlett, J. M. S., Stirling, D. 2003. PCR protocols. Segunda edición. Editorial Humana press. Totowa, USA.
- Beckert, K., Gottshall, K., Hickey, R., Perriard, J., Chien, K. 1997. Point mutations in human beta cardiac myosin heavy chain have differential effects on sarcomeric structure and assembly: an ATP binding site change distupts both thick and thin

filaments, whereas hypertrophic cardiomyopathy mutations display normal assembly. *J. Cell. Biol.* 137: 131-140.

- Bermúdez, F.; Bermúdez Pirela, V.; Cano, C. 2000. La hipertrofia Ventricular Izquierda en el Hipertenso nueva clasificación Electrocardiográfica. *AVFT.* **19** (1): 17 – 34.
- Bobkov, A.; Bobkova, E.; Lin, S.; Reisler, E. 1996. The role of surface loops (residues 204 – 216 and 627 – 646) in the motor function of the myosin head. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 2285 – 2289.
- Borchert, B.; Tripathi, S.; Francino, A.; Navarro-López, S.; Kraft, T. 2010. The left and right ventricle of a patient with a R723G mutation of the beta – myosin heavy chain and severe hypertrophic cardiomyopathy show no differences in the expression of myosin m RNA. *Cardiol. J.* **17** (5): 518 – 522.
- Bruno, P.H., Matthew, T. G. 2009. *Cardiomyopathies cause, effects and treatments.* Primera edición. Editorial Nova Biomedical Books. New York, USA
- Buvoli, M.; Hamady, M.; Leinwand, L.; Knight, R. 2008. Bioinformatics Assessment of β – Myosin Mutations Reveals Myosins High Sensitivity to Mutations. *Trends Cardiovasc. Med.* **18**: 141 – 149.
- Carneiro, J.; Pimentel, M.; De Paula, F.; Barbirato, C.; Arteaga, E.; Queiroz de Araújo, A. 2009. Study of Mutations Causing Hypertrophic Cardiomyopathy in the Group of Patients Espirito Santo, Brazil. *Arq. Bras. Cardiol.* **94** (1): 10 – 17.
- Castro-García, M., Coto, E., Reguero, J., Berrazueta, J.R., Álvarez. V., Alonso. B., Sainz, R. y colaboradores. 2009. Espectro mutacional de los genes sarcoméricos myh7, mubpc3, tnnt2, tnni3 y tpml en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev. Esp. Cardiol.* **62**: 48-56.
- Castro-García, M., Reguero, J., Batalla, A., Catalán, F., Mayordomo, J., Coto, E. 2003. Detección directa de mutaciones malignas en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev. Esp. Cardiol.* **56**:1022-1025.
- Cotton, R.G.H., Rodriguez, N.R., Campbell, R.D. 1988. Reactivity of cytosine and thymine in single-base-pair mismatches with hydroxylamine and osmium tetroxide and its application to the study of mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 4397-4401.

- Coureux, P.; Sweeney, L.; Houdusse, A. 2004. Three myosin V delineate essential feature of chemo-. Mechanical Transduction. *The EMBO Journal*. **23**: 4527 – 4537.
- Coureux, P.; Wells A.; Menetrey, J.; Yengo, C.; Morriss, C.; Sweeney, H.; Houdusse, A. 2003. A structural state of the myosin V motor without bound nucleotide. *Nature*. **425**: 419 – 423.
- Cuda, G., Fananapazir, L., Zhu, W-S. 1993. Skeletal muscle expression and abnormal function of β -myosin in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **91**: 2861-2865.
- Cuda, G.; Fananapazir, L.; Epstein, N.; Sellers, J. 1997. The *in vitro* motility activity of β – cardiac myosin depends on the nature of the β – myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* **91**: 2861 – 2865.
- Dalloz, F.; Osinska, H.; Robbins, J. 2001. Manipulating the Contractile Apparatus: Genetically Defined Animal Models of Cardiovascular Disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**: 9 – 25.
- Dandona, S., Roberts, R. 2008. Identification of Myofilament Mutations: It's Role in the Diagnosis and Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Mayo Clin Proc.* **8**: 626-627.
- Darin, N.; Tajsharghi, I.; Smith, O. 2007. New Skeletal Myopathy and Cardiomyopathy Associated with a Missense mutation in *MYH7*. *Neurology*. Pp. 2039 – 2042.
- Doolan, A.; Langlois, N.; Semsarian, C. 2004. Causes of sudden cardiac death in young Australians. *MJA*. **180**: 110 – 112.
- Dracopoli, N. C., Haines, J. L. Korf, B. R., Morton, C. C., Rosenzweig, A., Seidman, E. C., Smith, D. R. 2004. Short protocols in human genetics. Editorial Wiley. Southern Gate, England.
- Dzau, V. J., Liew, C. 2007. Cardiovascular genetics and genomics for the cardiologist. Primera edición. Editorial Blackwell futura. Massachusetts, USA.
- Eldin, P.; Le Cunff, M.; Mornet, D.; Léger, J. 1995. The cardiac myosin heavy chain Arg – 403 → Gln mutation that causes hypertrophic cardiomyopathy does not affect the actin – or ATP – binding capacities of two size – limited recombinant myosin heavy chain fragments. *Biochem. J.* **306**: 345 – 351.

- Elliott, P.; McKenna, W. 2004. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*. **363**: 1881 – 1891.
- Estrada-Cuzcano, A.; Sandoval, J.; Guevara-Fujita, M.; Fujita, R. 2005. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitochondrial humano. *Rev. Perú. Biol.* **12** (3): 349 – 358.
- Fananapazir, L.; Dalacas, M.; Cyran, F.; Cohn, G.; Epstein, N. 1993. Missense mutations in the β – myosin heavy – chain gene cause central core disease in hypertrophic cardiomyopathy. *Prog. Natl. Acad. Sci.* **90**: 3993 – 3997.
- Geisterfer-Lowrance, A.A., Kass, S., Tanigawa, G. 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta cardiac myosin heavy chain gene missense mutation. *Cell*. **62**: 999-1006.
- Gourinath, S., Himmel, D., Brown, J., Reshetnikova, L., Szent-Györgyi, A., Cohen, C. 2003. Crystal Structure of Scallop Myosin S1 in the Pre-Power Stroke State to 2.6 Å Resolution: Flexibility and Function in the Head
- Hagège, A.A., Desnos, M. 2009. New trends in treatment of hypertrophique. *Elsevier Masson France*. **102**: 441 – 447.
- Hershberger, R.; Lindenfeld, J.; Mestrony, L.; Seidman, C.; Taylor, M.; Towbin, J. 2009. Genetic Evaluation of Cardiomyopathy – A Heart Failure Society of America Practice Guideline. *J. Cardiac. Fail.* **15** (2): 83 – 97.
- Himmel, D.; Gourinath, S.; Reshetnikova, L.; Shen, Y.; Szent – Györgyi, A.; Cohen, C. 2002. Crystallographic findings on the internally uncoupled and near – rigor states of myosin: further insights into the mechanics of the motor. *Ros. Bas. Med. Sci.* **99** (20): 12645 – 12650.
- Holmes, K.; Angert, I.; Kull, J.; Jahn, W.; Schröder, R. 2003. Electron cryo – microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature*. **425**: 423 – 427.
- Hongyo, T., Buzard, G., Calvert, R., Weghorst, C. 1993. “Cold SCCP”: a simple, rapid and no-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research*. **21** (16) 3637-3642.

- Hussain, S.; Asghar, M.; Javed, Q. 2009. Resistin gene promoter region polymorphism and the risk of hypertrophic cardiomyopathy in patients. *Translational Research*. Vol. 155, N° 3. Pp: 142 – 147.
- Jarcho, J. McKenna, W.; Pare, J.; Solomon, S.; Holcombe, R.; Dickie, S.; Levi, T. Donis-Keller, H. Seidman, J.; Seidman, C. 1989. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to Chromosome. *N. Engl. J. Med.* **321**: 1372 – 1378.
- Judge, D.; Johnson, N. 2008. Genetic Evaluation of familial cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Trans. Res.* **1**: 144 – 154.
- Kamisango, M., Sharma, S.D., DePalma, S., Salomon, S., Sharma, S., McDonough, B. Mutations in sarcómero protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1688-1696.
- Kawaguchi, H. 2003. Angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy. *Exp Clin Cardiol.* **8** (3): 155 – 159.
- Keller, D., Schwitter, J., Valsangiacomo, E., Landolt, P., Attenhofer, C. 2009. Hypertrophic cardiomyopathy due to beta-myosin heavy chain mutation with extreme phenotypic variability within a family. *International journal of cardiology.* **38** (3): 87-93.
- Keller, D.; Carrier, L.; Schwartz, K. 2002. Genetics of familial cardiomyopathies and arrhythmias. *Swiss Med. Wkly.* **132**: 401 – 407.
- Köhler, J.; Winkler, J.; Schulte, I.; Scholz, T.; Mckenna, W.; Brenner, B.; Kraft, T. 2002. Mutation of the myosin converter domain alters cross – bridge elasticity. *PNAS.* **99** (6): 3557 – 3562.
- Kull, J; Endow, S. 2004. A new structural state of myosin. *Trends Biochem. Sci.* **29** (3): 103 – 106.
- Lahiri, D.K., Nurnberger, J.I. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5444.
- Larsen, L.; Christiansen, M.; Vuust, J.; Andersen, P. 1999. High – Throughput Single – Strand Conformation Polymorphism Analysis by Automated Capillary Electrophoresis: Robust Multiplex Analysis and Pattern – Based Identification of Allelic Variants. *Hum. Mut.* **13**: 318 – 327.

- Liu, S.; Hu, S.; Sun, J.; Wang, J.; Wang, X.; Jiang, Y.; Cai, J. 2005. Characteristics of the beta myosin heavy chain gene Ala26Val mutation in a Chinese family with hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Inter. Med.* **16**: 328 – 333.
- Lorenz, M.; Holmes, K. 2010. The actin – myosin interface. . 107 (28): 12519 – 12534.
- Louie, E.; Maron, B. 1986. Hypertrophic cardiomyopathy with extreme increase in left ventricular wall thickness: functional and morphologic features and clinical significance. *JAAC.* **8** (1): 57 – 65.
- Lowey, S. 2002. Functional Consequences of Mutations in the Myosin Heavy Chain at Sites Implicated in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *TMC.* **12** (8): 348 – 354.
- Lowey, S.; Slayfer, H.; Weeds, A.; Baker, H. 1969. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.* **42** (1): 1 – 29.
- Luczak, E.; Leinwand, L. 2009. Sex – Based Cardiac Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* **71**: 1 – 18.
- Luque, J., Herráez, Á. 2006. Biología molecular e ingeniería genética conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencia de la salud. Primera edición. Editorial ELSEVIER. Madrid, España.
- Marian, A. 2009. Contemporary Treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Texas Heart Ins. J.* **36** (3): 194 – 294.
- Marian, A. 2010. Hypertrophic Cardiomyopathy: from genetics to treatment. *Eur. J. Clin. Invest.* **40** (4): 360 – 369.
- Marian, A.; Wu, Y.; Lim, D. 1999. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **104**: 1683 – 1692.
- Marian, A.; Yu, Q.; Mann, D.; Graham, F.; Roberts, R. 1995. Expression of a Mutation Causing Hypertrophic Cardiomyopathy Disrupts Sarcomere Assembly in Adult Feline Cardiac Myocytes. *Circ. Res.* **77**: 98 – 106.
- Maron, B. J., Salberg, L. 2006. Hypertrophic cardiomyopathy. Segunda edición. Editorial Blackwell futura. Massachusetts, USA.

- Maron, B.; Gottdiener, J.; Epstein, S. 1981. Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients. *Am. J. Cardiol.* **48**: 418 – 428.
- McBride, K., Garg, V. 2010. Impact of Mendelian inheritance in cardiovascular disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1214**: 122–137.
- Millat, G.; Chanavat., Créhalet, H.; Rousson, R. 2010. Development of a high resolution melting method for the detection of genetic variations in hypertrophic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta.* **411**: 1983 – 1991.
- Mogensen J., Murphy, R., Kubo, T., Bahl, A., Moon, J., Klausen, J., Elliot, P y col. 2004. Frequency and clinical expression of cardiac troponin I mutations in 748 consecutive families whit hypertrophic cardiomyopathy. *J.Am. Coll. Cardiol.* **44**: 2315-2325.
- Moolman-Smook, J., Flashman, E., de Lange, W., Li, Z., Corfield, V., Redwood, C., and Watkins, H. 2002. [Identification of novel interactions between domains of Myosin binding protein-C that are modulated by hypertrophic cardiomyopathy missense mutations.](#) *Circ Res.* **91**: 704-11.
- Morimoto, S. 2008. Sarcomeric proteins and inherited cardiomyopathies. *Cardiov. Res.* **77**: 659 – 666.
- Mörner, S.; Richad, P.; Kazzam, E.; Hellman, U.; Hainque, B. Scwartz, K. Waldenström, A. 2003. Identifications of genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**: 841 – 849.
- Nanni, L.; Pieroni, M.; Chementi, C.; Simionati, B.; Zimbello, R.; Maseri, A.; Frustaci, A.; Lanfranchi, A. 2003. Hypertrophic Cardiomyopathy: two homozygous cases with “tipical” hipertrophic cardiomyopathy in three new mutations in cases with progression to dilated cardiomyopathy. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **339**: ·91 – 398.
- Nishi, H.; Kimura, A.; Harada, H.; Koga, Y.; Adachi, K.; Matsuyama, K.; Koyanagi, T.; Yasunaga, S.; Imaizumi, T.; Toshima, H. Sasazuki, T. 1995. A Myosin Missense Mutation, Not A Null Allele, Causes Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circulation.* Pp. 2911 – 2915.

- Nollau, P.; Wagener, C. 1997. Methods for detection of point mutation: performance and quality assessment. *Clin. Chem.* **43**: 1114 – 1128.
- Olson, S. A. 1994. MacVector: an integrated sequence analysis program for the Macintosh. *Methods Mol Biol.* **25**: 195-201.
- Piva e Mattos, B.; Rodrigues, M.; Centeno de Freitas, V. 2008. Diagnostic Evaluation of Hypertrophic Cardiomyopathy in its Clinical and Preclinical Phases. *Arq Bras Cardiol.* **91** (1): 51 – 57.
- Posma, J.; Van Der Wall, E.; Blanksma, P.; Van Der Wall, E.; Lie, K. 1996. New diagnostic options in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart. J.* **132**: 1031 – 1041.
- Puigbó, J.; Combellas, I.; Giordano, H.; Acquatella, H.; Gómez, J.; Casal, H.; Tortoledo, Suárez, C. 2001. Estudio sobre la cardiomiopatía hipertrófica: aspectos clínicos, ecocardiográficos y angiocardiográficos en una serie de treinta pacientes. *Gac. Med. Car.* Volumen 109, Número 4.
- Purushotham, G.; Madhumohan, K.; Anwaruddin, M.; Nagarajaram, H.; Hariram, V.; Narasimhan, C.; Bashyam, M. 2010. The *MYH7* p.R787H mutation causes hypertrophic cardiomyopathy in two unrelated families. *Exp. Clin. Cardiol.* **15** (1): 1 - 4.
- Ramírez, C.D., Padrón, R. 2004. Cardiomiopatía hipertrófica familiar: Genes, mutaciones y modelos animales. *Invest.clín.* **45**: 69-100
- Randall, D.; Burggren, W.; French, K. 2002. Fisiología Animal. 5ta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España.
- Rayment, I.; Holden, H.; Sellers, J.; Fananapazir, L.; Epstein, N. 1995. Structural interpretation of the mutations in the β – cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 3864 – 3868.
- **Richard, P., Charron, P., Carrier, L., Ledeuil, C., Cheav, T., Pichereau, C., Benaiche, A y col. 2003.** Hypertrophic Cardiomyopathy. Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy. *Circulation.* **107**: 2227-2232.
- Richard, P.; Charron, P.; Leclercq, C.; Ledeuil, C.; Carrier, L.; Dubourg, O.; Desnos, M.; Bouhour, J.; Schwartz, K.; Daubert, J.; Komajda, M.; Hainque, B. 2000.

Homozygotes for a R869G Mutation in the β – myosin Heavy Chain Gene have a Severe Form of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **32**: 1575 – 1583.

- [Ritter](#), O; [Luther](#), H., [Haase](#), H., [Baltas](#), L., [Baumann](#), G., [Schulte](#), H., [Morano](#), I. 1999. Expression of atrial myosin light chains but not a-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *J. Mol. Med.* **77**: 677-685.
- Rodríguez, J.E., McCudden, C.R., Willis, M.S. 2009. Familial hypertrophic cardiomyopathy: Basic concepts and future molecular diagnostics. *Clin Biochem.***42**: 755-765.
- Rodríguez, R. 2010. Genética molecular e identificación de las mutaciones asociadas a la cardiomiopatía hipertrófica Familiar (MHF) en la población venezolana. Trabajo de ascenso Post-doctoral. Instituto venezolano de investigaciones científicas (IVIC). Altos de Pipe, Venezuela.
- Rogers K. 2011. The cardiovascular system. Primera edición. Editorial Britannica. New York, USA.
- Roopnarine O., Leinwand, L. 1998. Functional analysis of myosin mutations that cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Biophysical journal.* **75**: 3023-3030.
- Sambrook, J., Rusell, D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Tercera edición. Editorial CSHL pres. New York, USA.
- Sata, M., Ikebe, M. 1996. Functional analysis of the mutations in the human cardiac β -myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **98**: 2866-2873.
- Seggewiss, H., Rigopoulos, A. 2003. Ablación septal en la miocardiopatía hipertrófica: situación actual. *Rev Esp Cardiol.* **56**:1153-1159.
- Seggewiss, H.; Blank, C.; Pfelffer, B.; Rigopoulos, A. 2009. Hypertrophic Cardiomyopathy as a Cause of Sudden Death. *Herz.* **34**: 335 – 314.
- Sherrid, M. 2006. Pathophysiology and treatment of Hypertrophic Cardiomyopathy. *Prog. Cardio. Dis.* **49** (2): 123 – 151.

- Song, L.; Zou, Y.; Wang, J.; Wang, Z.; Zhen, Y.; Lou, K.; Zhang, Q.; Wang, X.; Wang, H.; Li, J.; Hui, R. 2005. Mutations profile in Chinese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin. Chim. Acta.* **351**: 209 – 216.
- Tanigawa, G.; Jarcho, J.; Kass, S.; Solomon, S.; Vosberg, H.; Seidman, J.; Seidman, C. 1990. A Molecular Basis for Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: An α/β Cardiac Myosin Heavy Chain Hybrid Gene. *Cell.* **62**: 991 – 998.
- Tanjore, R.; RangaRaju, A.; Vadapalli, S.; Remersu, S.; Narsimhan, C.; Nallari, P. 2010. Genetic variations of $\beta - MYH7$ in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *Ind. J. Hum. Gen.* **16** (2): 67 – 71.
- Tardiff, J. 2005. Sarcomeric Proteins and Familial Hypertrophic Cardiomyopathy: Linking Mutations in Structural Proteins to Complex Cardiovascular Phenotypes. *Heart Failure Rev.* **10**: 237 – 248.
- Teare D. 1958. Asymmetrical hypertrophy of the hear in young adults. *Brit. Heart. J.***20**:1-8.
- Tsoutsman, T., Kelly, M., Ng, D., Tan, J., Tu, E., Lam, L. Severe heart failure and early mortality in a double-mutation mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cirulation.* **177**: 1820-1831.
- Tyska, M.; Hayes, E.; Giewat, M.; Seidman, C.; Seidman, J.; Warshaw, D. 2002. Single – Molecule Mechanics of R403Q Cardiac Myosin Isolated From the Mouse Model of Hypertrophic Familial Cardiomyopathy. *Circ. Res.* **86**: 737 – 744.
- Uro-Coste, E.; Arné – Bes, M.; Pellissier, J.; Richard, P.; Levade, T.; Heitz, F.; Figarella – Branger, D.; Delisle, M. 2008. Strikin phenotypic variability in two familial cases of myosin storage myopathy with a *MYH7* Leu1793pro mutation. *Neur. Dis.* **19**: 163 – 166.
- Van Dijk, J.; Furch, M.; Derancourt, J.; Batra, R.; Kenetsch, M.; Manteins, D.; Chaussepied, P. 1998. Differences in the ionic interaction of actin with the motor domains of nonmuscle and muscle myosin II. *Eur. J. Biochem.* **260**: 672 – 683.
- Wang, Q.; Moncman, C.; Winkelmann, D. 2003. Mutations in the motor domain modulate myosin activity in myofibril organization. *J. Cell. Sci.* **116**: 4227 – 4238.

- Wheeler, M.; Pavlovic, A.; DeGoma, E.; salisbury, H.; Brown, C.; Ashley, E. 2009. A New Era in Clinical Genetic Testing for Hypertrophic Cardiomyopathy. *J. Cardiovasc. Trans. Res.* **2**: 381 – 391.
- Wordsworth, S.; Leal, J.; Blair, E; Legood, R.; Thomson, K.; Seller, A.; Taylor, J.; Watkins, H. 2010. DNA testing hypertrophic cardiomyopathy: a cost-effectiveness model. *Eur. Heart. J.* **31**: 926 – 935.
- Xu, Q.; Dewey, S.; Nguyen, S.; Gomes, A. 2010. Malignate and benign mutations in familial cardiomyopathies: Insights into mutations linked to complex cardiovascular phenotypes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**: 899 – 909.
- Yamazaki, T., Suzuki, J., Shimamoto, R. 2007. A new therapeutic strategy for hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy in humans. A randomized and prospective study with an angiotensin II receptor blocker. *Int Heart J.* 2007. **48**: 715-724.
- Yengo, C.; Sweeney, H. 2004. Functional role of Loop 2 in myosin V. *Biochem.* **43**: 2605 – 2612.
- Zeller, R.; Ivandic, B.; Ehlermann, P.; Mücke, O.; Zugck, C.; Remppis, A.; Giannitsis, G.; Katus, H.; Weichenhan, D. 2006. Large – Scale mutation screening in patients with dilated or hypertrophic cardiomyopathy: study using DGGE. *J. Mol. Med.* **84**: 682 – 692.

Recursos electrónicos:

- <http://blognutricionyalimentacion.blogspot.com/2009/02/sistema-circulatorio.html>, 2011.
- <http://www.cardiogenomics.med.harvard.edu/>, 2010
- <http://expasy.org/>, 2011.
- <http://circres.ahajournals.org/cgi/collection>, 2011.
- <http://www.swissmodel.expasy.org/>, 2001.
- <http://www.paho.org/hia/home.html>, 2011.
- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>
- <http://www.mpps.gob.ve/>, 2011.
- www.ebi.ac.uk/www.ncbi.nlm.nih.gov/cardiogenomics.med.harvard.edu/, 2010.
- www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, 2011.

- www.ncbi.nlm.nih.gov/snp, 2011.
- www.texasheartinstitute.org/HIC/Anatomy/, 2011

XII. ANEXOS.

1. CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Título del proyecto: Genética Molecular e Identificación de las Mutaciones Asociadas a la Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar (CHF) en la Población Venezolana.

Investigador Principal: Dra. Rosalva Rodríguez Petit

Nombre: _____

Fecha: _____

La Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar es una enfermedad hereditaria, compleja, con características únicas. Es una enfermedad que afecta el tamaño del corazón, específicamente aumenta el ventrículo izquierdo, que es uno de los lados del corazón.

Objetivo: El objetivo fundamental de esta investigación es el de realizar un estudio para identificar las mutaciones que se encuentren en las proteínas que forman el músculo del corazón (codificadas por los genes *myh7*, *mybpc3* y *myl2*) en pacientes de Venezuela con MHF. (Para que las personas entiendan mejor)

Estas investigaciones serán realizadas por Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C). En Venezuela es el primer estudio de éste tipo que se realiza, y pensamos que puede tener utilidad e importancia para facilitar el diagnóstico clínico y mejorar las opciones de tratamiento, para los pacientes portadores de la enfermedad.

Información para el Individuo: Para completar éste estudio se requiere de la participación de un grupo de personas que hemos denominado GRUPO CONTROL, las cuales son personas sanas que no padecen de ninguna afección cardiovascular. Ud está invitado a participar dentro de éste grupo. Sin embargo, su participación en éste estudio, es completamente voluntaria, si decide participar, puede retirarse del estudio sin perjuicio alguno, ni repercusiones de ningún tipo, en el momento que lo desee, como también será informado de cualquier cambio o información nueva

que ocurriese durante el estudio y que pueda afectar su participación. Esta investigación no implica riesgo alguno ni inconveniente para su salud. Para completar su participación Ud. debe responder un cuestionario, y proporcionar una muestra de sangre, que será colectada por personal capacitado para tal fin, para aislar el ADN genómico.

Confidencialidad: Todos los datos obtenidos de éste estudio serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será sólo accesible a los investigadores y médicos involucrados en la investigación. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones relacionadas con el estudio, permaneciendo en completo anonimato.

_____ Deseo participar en éste estudio.

_____ No deseo participar en éste estudio.

Uso de las Muestras: Las muestras de sangre que le sean extraídas serán utilizadas para obtener el ADN genómico, y serán almacenadas en el IVIC, bajo custodia de la Dra. Rosalva Rodríguez. Como parte de éste estudio se guardará una alícuota del ADN procedente de la muestra de sangre original cedida por Ud, para ser utilizada para futuras investigaciones relacionadas con la CHF, no para fines comerciales. Dichas investigaciones deberán ser aprobadas por el Comité de Bioética del I.V.I.C así como también por los Comités de Bioética de las Instituciones participantes en el estudio. Ud. no recibirá ninguna compensación económica derivada de cualquier resultado producto de ésta investigación.

Ud. puede decidir si desea o no que se guarde una alícuota de su ADN, así como también que sea contactado en el futuro. Marque con una X en la sección de abajo.

_____ Yo autorizo se guarde una alícuota de mi ADN para futuras investigaciones.

_____ Yo no autorizo se guarde una alícuota de mi ADN para futuras investigaciones.

_____ Puedo ser contactado nuevamente para información.

_____ No puedo ser contactado nuevamente para información.

Iniciales _____ fecha: _____

Preguntas: Ud. Es libre de preguntar sobre este estudio y sus derechos en este proyecto de investigación. Cualquier Pregunta o Información puede dirigirse a:

Dra. Rosalva Rodríguez Petit

Centro de Biología Estructural.

Lab Biología Molecular.

Teléf: 0212-5041715.

I.V.I.C.

Dr. Raúl Espinosa

Médico. Cardiólogo.

Unidad de Cardiología Hospital Pérez Carreño

Consulta de Cardiología del Hospital de Clínicas Caracas

Teléfono: 0416-6056384.

Dra. Marinela Falcone.

Médico adjunto del servicio de Ecocardiografía.

ASCARDIO. Barquisimeto.

Teléfono: 0251- 2524876

El propósito y procedimiento de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. Yo estoy de acuerdo en participar como individuo en este proyecto. Yo estoy enterado de que puedo suspender mi participación en cualquier momento.

Firma del Individuo: _____

Fecha: _____

Declaración del Investigador:

Yo le he declarado al individuo arriba nombrado la naturaleza y objetivos de los procedimientos arriba descritos. Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado sus preguntas con mi mayor capacidad.

Firma: _____

Fecha: _____

Cuestionario:

1. Padece o ha padecido Ud de dolores de pecho?

2. Padece o ha padecido Ud de dificultad para respirar?

3. Padece o ha padecido Ud de alguna falla cardíaca?

4. Ha padecido Ud de Infarto?

5. Padece Ud. de alguna enfermedad cardiovascular?

6. En su familia se ha registrado alguna vez algún caso de muerte súbita?

7. Alguno de sus familiares padece de alguna enfermedad cardiovascular?.

2. CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

Título del proyecto: Genética Molecular e Identificación de las Mutaciones Asociadas a la Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar (CHF) en la Población Venezolana.

Investigador Principal: Dra. Rosalva Rodríguez Petit

Nombre: _____

Fecha: _____

La Cardiomiopatía Hipertrófica es una enfermedad hereditaria, compleja, con características únicas. Es una enfermedad que afecta el tamaño del corazón, específicamente aumenta el ventrículo izquierdo, que es uno de los lados del corazón.

Objetivo: El objetivo fundamental de esta investigación es el de realizar un estudio para identificar las mutaciones que se encuentren en las proteínas que forman el músculo del corazón (codificadas por los genes *myh7*, *mybpc3* y *myl2*) en pacientes de Venezuela con CHF. (para que las personas entiendan mejor)

Estas investigaciones serán realizadas por Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C). En Venezuela es el primer estudio de éste tipo que se realiza, y pensamos que puede tener utilidad e importancia para facilitar el diagnóstico clínico y mejorar las opciones de tratamiento para los pacientes portadores de la enfermedad.

Información para el Individuo, Representante o Tutor (en caso de menores de edad): Para completar éste estudio se requiere de la participación de un grupo de personas que tengan familiares directos con la Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar. Ud. está invitado a participar dentro de éste grupo.

Nombre del familiar : _____,

Nexo: _____

Médico Tratante: _____

Hospital o Clínica: _____.

Sin embargo, su participación es completamente voluntaria. Si decide participar, puede retirarse del estudio en el momento que lo desee, sin perjuicio ni repercusiones de ningún tipo, para Ud. o para su familiar remitente. Si desea participar, será informado de cualquier cambio o información nueva que ocurriese durante el estudio y que pueda afectar su participación. Este estudio no

implica riesgo alguno ni inconveniente para su salud, ni para la de su familiar remitente. Para completar su participación debe proporcionar una muestra de sangre, que será colectada por personal capacitado para tal fin, para aislar el ADN genómico, y responder un cuestionario personal relacionado con enfermedades cardiovasculares.

Confidencialidad: Todos los datos obtenidos de éste estudio serán mantenidos en absoluto secreto y toda la información sobre su persona será sólo accesible a los investigadores y médicos involucrados en la investigación. Su identidad no será hecha pública en ninguno de los manuscritos científicos o en las presentaciones relacionadas con el estudio, permaneciendo en completo anonimato.

_____ Deseo participar en éste estudio.

_____ No deseo participar en éste estudio.

Procedimiento: Se le tomará una muestra de sangre (4 mL) para la extracción de su ADN genómico.

Uso de las Muestras: Las muestras de sangre que le sean extraídas serán utilizadas para identificar las mutaciones responsables de la Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar. Todas las muestras serán almacenadas en el IVIC, bajo custodia de la Dra. Rosalva Rodríguez. Como parte de éste estudio se guardará una alícuota del ADN procedente de la muestra de sangre original cedida por Ud, para ser utilizada para futuras investigaciones relacionadas con la CHF, no para fines comerciales. Dichas investigaciones deberán ser aprobadas por el Comité de Bioética del I.V.I.C así como también por los Comités de Bioética de las Instituciones participantes en el estudio. El individuo no recibirá ninguna compensación económica derivada de cualquier resultado producto de ésta investigación.

Ud. puede decidir si desea o no que se guarde una alícuota de su ADN, así como también que sea contactado en el futuro. Marque con una X en la sección de abajo.

_____ Yo autorizo se guarde una alícuota de mi ADN para futuras investigaciones.

_____ Yo no autorizo se guarde una alícuota de mi ADN para futuras investigaciones.

_____ Puedo ser contactado nuevamente para información.

_____ No puedo ser contactado nuevamente para información.

Iniciales _____ fecha: _____

Preguntas: Ud. Es libre de preguntar sobre este estudio y sus derechos en este proyecto de investigación. Cualquier Pregunta o Información puede dirigirse a:

Dra. Rosalva Rodríguez Petit

Centro de Biología Estructural.

Lab Biología Molecular.

Teléf: 0212-5041715.

I.V.I.C.

Dr. Raúl Espinosa

Médico. Cardiólogo.

Unidad de Cardiología Hospital Pérez Carreño

Consulta de Cardiología del Hospital de Clínicas Caracas

Teléfono: 0416-6056384.

Dra. Marinela Falcone.

Médico adjunto del servicio de Ecocardiografía.

ASCARDIO. Barquisimeto.

Teléfono: 0251- 2524876

El propósito y procedimiento de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. Yo estoy de acuerdo en participar como individuo en este proyecto. Yo estoy enterado de que puedo suspender mi participación en cualquier momento.

Firma del Familiar: _____

Fecha: _____

Nombre: Firma del representante o tutor (en caso de menores de 18 años): _____

Fecha: _____

Nombre: _____

Firma del Testigo: _____

Fecha: _____

Declaración del Investigador:

Yo le he declarado al individuo arriba nombrado la naturaleza y objetivos de los procedimientos arriba descritos. Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado sus preguntas con mi mayor capacidad.

Firma: _____

Fecha: _____

Cuestionario:

8. Padece o ha padecido Ud de dolores de pecho?

9. Padece o ha padecido Ud de dificultad para respirar?

10. Padece o ha padecido Ud de alguna falla cardíaca?

11. Ha padecido Ud de Infarto?

12. Padece Ud. de alguna enfermedad cardiovascular?

13. En su familia se ha registrado alguna vez algún caso de muerte súbita?

14. Alguno de sus familiares padece de alguna enfermedad cardiovascular?.

