



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ANÁLISIS DEL GEN *MYBPC3* EN LA BÚSQUEDA DE
MUTACIONES ASOCIADAS A LA MIOCARDIOPATIA
HIPERTRÓFICA FAMILIAR (MHF)**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el Br. Ricardo J. Soto B. como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dr. Rosalva Rodríguez.

Tutora: Dr. Palmira Guevara

**CARACAS, VENEZUELA
SEPTIEMBRE 2011**

RESUMEN

La Miocardiopatía Hipertrófica Familiar

La Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF) es una enfermedad cardíaca primaria, donde la característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo, y la consecuencia más grave es la muerte súbita. La MHF se debe mayormente a mutaciones en las proteínas del sarcómero. En este trabajo se realizó una búsqueda de mutaciones en el gen *MYBPC3*, que codifica para la proteína de unión a miosina C en 20 pacientes con diagnóstico clínico de MHF. Para ello se aisló ADN genómico de los pacientes posterior al consentimiento informado, se amplificaron por PCR 34 exones del gen, y para identificar las mutaciones se realizó secuenciación automática y SSCP. El análisis in silico de las secuencias se realizó a través del programa Mc Vector 11.1.2. Se encontraron mediante secuenciación, 2 mutaciones sinónimas, y una heterocigota (Leu 1268 Arg) ubicada en el dominio C10 de la proteína, mediante la técnica SSCP no se encontraron diferencias en los patrones de corrida. Se realizó modelaje molecular del dominio C10 mutado, con la ayuda de programa Chimera, para tratar de definir estructuralmente el efecto de la mutación. Este dominio es responsable y esencial para la unión a la porción LMM de miosina y podría ser relevante en este caso, ya que la historia clínica del paciente mostró hipertrofia del ventrículo izquierdo, con dolor en el pecho y sin antecedentes aparentes de enfermedad cardiovascular.

DEDICATORIA.

A Dios por haberme ayudado y a mis padres Ricaurte Soto y Oliva Bracho, los amo.

AGRADECIMIENTOS

Una vez más le doy gracias a Dios por su ayuda en todo momento, por darme la sabiduría y entendimiento para poder culminar esta etapa de mis estudios y darme las fuerzas para continuar aunque no las tenía como lo dice en la Biblia en Isaías 40:29-30 “Él da fuerzas al cansado y multiplica las fuerzas al que no tiene ninguna”, por haberme cuidado en todo momento y hasta en los líos que por mi causa me he metido me ha ayudado, sin Él este logro no hubiera sido posible.

Le doy gracias a mi Papa Ricaurte de Jesús Soto por haber confiado en mí, por haberme apoyado a lo largo de toda mi vida, por ser el padre que ha sido para mí, con ese amor que me ha dado incondicional, te doy gracias papa por siempre creer en mi aunque a veces nadie creía, por doblar siempre tus rodillas y mantenerme en tus oraciones por ser el padre que eres tanto en las buenas como en las malas, por eso te amo papa, gracias por estar allí.

Le doy gracias a mi madre querida Oliva Bracho por haberme traído al mundo con ese amor que solo ella puede tener, por velar por mí en todo momento, por escucharme y apoyarme en las decisiones de mi vida, por tus enseñanzas que han formado mi carácter y mi forma de ser, por ser la madre que has sido para mí, por sobreprotegerme a pesar que ya estoy grande mama (si mama ya voy a cumplir 25, el tiempo ha pasado rápido), gracias mama por tu apoyo incondicional, te amo.

A mi dos hermanos menores Alicia y Josué, por hacerme sentir ese amor de hermanos, a mi hermanita que la amo con todo mi corazón por darme ese amor puro que solo ella puede dar, te amo Ali, y a Josué por siempre animarme, por tomar a veces el puesto de hermano mayor y echarme unos regaños, te amo hermano aunque no le creas.

A mi otra familia que también ha sido un pilar en mi vida, Arelis, has sido una segunda madre para mí, y te doy gracias por haberme ayudado a ser el hombre que he

logrado ser hoy en día, tus palabras de aliento en el momento indicado siempre me han confortado, gracias por estar allí y por adoptarme con un hijo, a mis otros hermanos Andreina, Daniela y Johans, por dejarme entrar en sus vidas, los quiero y los amo gracias por su apoyo en todo momento. Le doy gracias a la familia García, en especial a Carlos (Carlitos bájate de allí!) por darme los consejos que necesitaba, te amo hermano.

A toda mi familia que es gigantesca, que si me pongo a escribir todos sus nombres sería otra tesis más. Gracias por los que estuvieron pendiente del desarrollo de esta tesis, los amo a todos.

Le doy infinitas gracias la Universidad Central de Venezuela, que me dio la oportunidad de estudiar, de formarme como persona y profesional, a la facultad de Ciencias por ser un segundo hogar a lo largo de todos estos años, y por darme los conocimientos necesarios para poder decir “soy un Biólogo de la UCV”.

Al movimiento universitario vida abundante MUVA y al prof. Pedro Balza y a toda su familia, por su apoyo a lo largo de la carrera y por darme amigos incondicionales como Israel, Sarai, Zoila, Rebeca, Marly, Juni y a todos aquellos que están en mi mente, si estás leyendo esto, “sabes que es contigo”, y por darme todos esos recuerdos gratos que nunca olvidare.

A David por ser unos de mis mejores amigos, siempre estuviste pendiente, por tratarme como un hermano menor, a la Tía Bety por permitirme quedarme en su casa para esas largas noches de estudio, a Milagros por ser esa persona tan Sencilla y humilde que siempre me regaña, aunque casi siempre tiene la razón, pero aun así te quiero, a Jennire por su apoyo en esta etapa final de mi carrera y la familia Vivas por adoptarme como un hijo, le doy gracias a Grace, Ximena, Arleth y Mónica, por ser parte de mi vida y de mis amistades, a Gisselle, Vanessita, Maryant, Jamileth, Andrea, Eduard-o, Ruben, Leomar, son muchos

los recuerdos que me quedan por compartir con ustedes, gracias por su amistad y a todos aquellos que no logre mencionar gracias por estar allí.

Le doy gracias al IVIC por darme la oportunidad de ingresar a este importante instituto, y darme donde vivir y el apoyo económico que me apoyo a culminar este trabajo.

Al Centro de Biología estructural y a la Dra. Rosalva Rodríguez por permitirme realizar este trabajo especial de grado, por creer en mí, y apoyarme a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis, por su esfuerzo y dedicación, al Dr. Padrón por su apoyo y ejemplo en constancia y dedicación, al Sr. Lorenzo por su ayuda en el momento de realizar el modelaje molecular, fue de gran ayuda, al técnico del laboratorio Alex Sánchez por su colaboración y dedicación en el trabajo realizado, a personal del centro del Centro: Dra. Eva, Sr Pinto, Gustavo, Carlos, Evelyn, Mónica, Verónica, Milagros, Andrea, Franklin, Guiden, Yamira, Carmen Delia, Odalys, Karina, Miguel, José, Laguado.

A mis compañeros de residencia Jorge Maracucho, Hanibal, Jorge Colombiano, liberen a Ingrid, Eva, José Poeta, José Maracucho, Viviana, Jio, Yolimar, Karin, Lety, Wendy a todos ellos, por darme compañía y brindar su amistad.

Le doy gracias a la profesora Palmira por sus aportes y consejos, por soportarme todo este tiempo, gracias por todo. A la profesora Guillermina, por colocarme los pies sobre la tierra, y por estar al tanto de este trabajo hasta el Sem II. Y como olvidar a mí querida profesora de Bioestadística Lourdes! Gracias a su forma de ser y su apoyo, fue de gran impulso para seguir con mi carrera, eres una excelente profesora.

Gracias a la vida por darme la oportunidad de tener todos estos recuerdos, por las etapas que he pasado y las metas que he cumplido y faltan por cumplir, apenas estamos comenzando el camino, falta mucho camino por recorrer.

INDICE

INDICE

RESUMEN.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABLAS.....	XVIII
ABREVIATURAS.....	XX
INTRODUCCION.....	1
1. El corazón y su función en la MHF.....	2
1.1. Estructura básica del citoesqueleto del músculo cardíaco.....	4
1.2. Función del sarcómero.....	6
1.2.1. La contracción muscular.....	6
1.2.2. Regulación de la contracción.....	8
2. Enfermedades Cardiovasculares (ECV).....	9
2.1. Miocardiopatía Dilatada.....	12
2.2. Miocardiopatía restrictiva.....	12
2.3. Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.....	12
3. Epidemiología de la MHF.....	13
3.1. Mutaciones en el sarcómero son la principal causa de MHF.....	14
4. Antecedentes de la MHF.....	17
4.1. Primera mutación descrita asociada con MHF.....	19
5. Penetrancia incompleta, factores ambientales y genes modificadores.....	21
6. Importancia de la proteína C de unión a la miosina en la MHF.....	21
6.1. Función de la proteína C de unión a la miosina. Isoforma cardíaca.....	26
6.1.1. Función estructural.....	27
6.1.2. Función reguladora.....	27
7. Primeros estudios que relacionan mutaciones en <i>MYBPC3</i> con MHF.....	30
7.1. Teorías que explican la patología de la MHF.....	31
7.1.1. La teoría del péptido venenoso.....	31
7.1.2. Haploinsuficiencia.....	31
7.1.3. Alteraciones en la fosforilación.....	32
8. Tratamiento.....	32
9. Diagnostico clínico.....	34
10. Importancia de las pruebas génicas.....	36

JUSTIFICACION.....	39
OBJETIVOS.....	41
MATERIALES Y METODOS.....	42
Métodos.....	43
1. Selección de pacientes.....	43
2. Recolección de muestras de sangre de pacientes y controles.....	43
3. Técnicas moleculares para el análisis genético.....	44
3.1. Aislamiento de ADNg a partir de Sangre Periférica.....	44
3.1.1. Aislamiento de ADNg de sangre periférica utilizando el método de lahiri y Nurnberger (1991).....	44
3.1.2. Aislamiento de ADNg con el uso de un kit comercial de purificación (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit).....	45
3.2. Electroforesis en geles de agarosa para la visualización de ADNg.....	46
3.2.1. Estimado de pureza del ADNg aislado.....	46
3.3. Cuantificación del ADNg.....	46
3.4. Amplificación por PCR de los exónes correspondientes al gen MYBPC3.....	47
3.4.1. Diseño de iniciadores.....	47
3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa.....	52
3.4.3. Electroforesis en geles agarosa 3% para observar la integridad del ADN obtenido por PCR.....	53
3.5. Búsqueda de mutaciones mediante la técnica SSCP (Polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN).....	54
3.5.1. Tinción de plata para mini geles de poliacrilamida.....	56
3.6. Secuenciación directa de 15 exónes del gen MYBPC3.....	57
3.6.1. Purificación de los productos de PCR a secuenciar.....	57
3.6.2. Análisis de secuencias.....	58
4. Modelaje molecular.....	59
5. Financiamiento.....	60
RESULTADOS.....	61
1. Aislamiento de ADNg.....	62
1.1. Método de Lahiri y Nurnberger.....	63
1.2. Utilizando un Kit Comercial.....	64
2. Amplificación por PCR de los 34 exónes del gen <i>MyBPC3</i>	66
2.1. Amplificación de los 34 exónes del gen MYBPC3.....	66
3. Análisis de las secuencias de los fragmentos de PCR utilizando Secuenciación Automática.....	69

4. Análisis del gen MYBPC3 mediante la técnica SSCP de los exónes con mayor incidencia de mutaciones.....	71
5. Secuenciación.....	75
6. Análisis realizado del gen MYBPC3 por secuenciación.....	78
6.1. Mutación heteróciga en el exón 5.....	78
6.2. Mutación heteróciga en el exón 26.....	80
6.3. Mutación heteróciga en el exón 34 del paciente CS.....	82
7. Modelaje molecular de la mutación encontrada.....	87
 DISCUSIÓN.....	 92
1. Aislamiento de ADN genómico.....	94
2. Amplificación de los 34 exónes del gen MYBPC3.....	96
3. Análisis del gen MYBPC3 en la búsqueda de mutaciones asociadas a la MHF.....	98
3.1. Mutación en el exón 5 del gen MYBPC3 del paciente DD.....	104
3.2. Mutación en el exón 26 del gen MYBPC3 del paciente EST.....	105
3.3. Mutación en el exón 34 del gen MYBPC3 del paciente CS y su pariente P.....	105
4. Modelaje molecular para la mutación L1268R del paciente CS.....	109
5. Importancia de la búsqueda de mutaciones y de los estudios familiares.....	110
 CONCLUSIONES.....	 113
 RECOMENDACIONES.....	 114
 BIBLIOGRAFIA.....	 115
 ANEXOS.....	 XXII
1) Consentimiento para participar en un proyecto de investigación (Modelo1).....	XXIII
2) Consentimiento para participar en un proyecto de investigación (Modelo2).....	XXVII
3) Consentimiento para participar en un proyecto de investigación (Modelo3).....	XXXI

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1.** Discos intercalares. En la imagen A se muestran de forma esquemática, mientras B corresponde a un barrido con el microscopio de luz polarizada.....2
- **Figura 2.** Fibras muscular cardíaca. Dibujo esquemático de los miocardiocitos y de la organización de sus elementos celulares.....3
- **Figura 3.** Estructura de sarcómero del miocito. Visión del sarcómero al microscopio electrónico.....4
- **Figura 4.** Proteínas contráctiles del sarcómero cardíaco: en este dibujo se aprecian las interacciones entre las distintas proteínas que forman el sarcómero.....5
- **Figura 5.** Los filamentos gruesos formados por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina formando puentes entre los filamentos de miosina y de actina (cross-bridges). En este esquema se muestra la contracción del sarcómero, mediante el deslizamiento de los filamentos delgados de actina sobre los filamentos gruesos de miosina.....6
- **Figura 6.** Esquema del movimiento de deslizamiento de los filamentos de actina sobre las de miosina.....7
- **Figura 7.** Sistema circulatorio y corazón. A) Sistema circulatorio, B) corazón multicameral.....9
- **Figura 8.** Representación esquemática de la organización en dominios de las tres isoformas de proteína C de unión a miosina.....22
- **Figura 9.** Proteína MYBPC cardíaco, compuesto por 8 dominios IgI y tres dominios FnIII. Mostrando la región específica cardíaca, sitios de fosforilación y los sitios para la unión de la miosina a la tinina.....23

- **Figura 10.** Proteína de la cadena pesada de la miosina, en asociación con el dominio C1 Y C2 de la proteína MYBPC3.....24
- **Figura 11.** Representación esquemática de la miosina, donde se encuentra la región S1 o cabeza globular, la región cuello o S2, las cadenas ligeras reguladoras de la miosina, la LLM: meromiosina ligera y HMM: meromiosina pesada.....25
- **Figura 12.** Dos modelos distintos proponen la disposición de la MBPC3 en el filamento grueso. A: Modelo de collar trimérico propuesto por Moolman-Smook y col. (2002). B: Modelo propuesto por Squire y col. (2003).....26
- **Figura 13.** Gen *MYBPC3* con la ubicación de los amplímeros. Se muestra las regiones del gen que son secuenciadas, las regiones donde hay solapamientos y las regiones que no van a ser secuenciadas.....48
- **Figura 14.** Se muestran 4 de los amplímeros especificando la región a amplificar, donde se encuentra los exónes, la región de solapamiento y las regiones del gen sin secuenciar.....48
- **Figura 15.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. El método utilizado para la extracción fue el propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991. En la figura se observa ADNg extraído de algunos pacientes, carriles 4-14.....63
- **Figura 16.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de ADNg aislado por el método del Kit comercial. Se realizo la extracción de ADN mediante un Kit de purificación de Axigen. En la figura se observa ADNg extraído de los 20 pacientes. Carril 1: MPM 10kb. Carril 2: ADN cuantificado 100ng, Carriles 3-26 ADNg.....65

- **Figura 17.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Productos de PCR de los exónes del gen *MYBPC3*. ADNc: ADN cuantificado a 100ng/μl, ADNg: ADN genómico.....67
- **Figura 18.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Productos de PCR de los exónes del gen *MYBPC3*.....68
- **Figura 19.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 18 del gen *MYBPC3* de tres de los controles (C1, C2, C3). CLUSTAL W. MacVector 11.12. En asteriscos se resalta la región exónica.....69
- **Figura 20.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 24 del gen *MYBPC3* de tres de los controles (C1, C2, C3). CLUSTAL W. MacVector 11.12. En asteriscos se resalta la región exónica.....71
- **Figura 21.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 3 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....72
- **Figura 22.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 7 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....72
- **Figura 23.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 10 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....72
- **Figura 24.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 11 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....73
- **Figura 25.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 17 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....73
- **Figura 26.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 19 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....73

- **Figura 27.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.
Exón 22 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....74
- **Figura 28.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.
Exón 24 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....74
- **Figura 29.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.
Exón 25 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....74
- **Figura 30.** Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%.
Exón 26 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.....75
- **Figura 31.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 5 del gen *MYBPC3* del paciente DD, realizando un alineamiento utilizando el programa MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma B) Electroferograma de la mutación encontrada en el exón 5 del paciente DD. Se puede observar una timina solapada con una citosina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).....79
- **Figura 32.** Alineamiento de la secuencia proteica del exón 5 del paciente DD. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el cuadro rojo se observa la mutación sin efecto.....80
- **Figura 33.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 26 del gen *MYBPC3* del paciente EST, realizando un alineamiento utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma B) Electroferograma de la mutación encontrada en el

- exón 26 del paciente EST. Se puede observar una timina solapada con una citosina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).....81
- **Figura 34.** Alineamiento de la secuencia proteica del exón 26 del paciente EST. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el cuadro rojo se observa la mutación sin efecto.....82
 - **Figura 35.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 34 del gen *MYBPC3* del paciente CS, realizando un alineamiento utilizando MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotidico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma. B) Electroferograma de la mutación encontrada en el exón 34 del paciente CS. Se puede observar una timina solapada con una guanina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).....83
 - **Figura 36.** Alineamiento de la secuencia proteica del exón 34 del paciente CS. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el asterisco rojo se observa la mutación encontrada, donde el aminoácido Leu cambia a Arg.....84
 - **Figura 37.** Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 34 del gen *MYBPC3* del paciente P, realizando un alineamiento utilizando MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotidico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma. B) Electroferograma de la sustitución encontrada en el exón 34 del paciente P. Se puede observar una timina solapada con una guanina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).....85

- **Figura 38.** Alineamiento de la secuencia proteica del exón 34 del paciente P. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el asterisco rojo se observa la mutación encontrada, donde el aminoácido Leu cambia a Arg.....86
- **Figura 39.** Comparación de dominio de diferentes proteínas similares al dominio C10 de la proteína MYBPC3.....88
- **Figura 40.** Registro fotográfico del dominio C10 de la proteína MYBPC3. Este modelo se realizo con la ayuda de la base de datos Modeller y para su visualización el uso del programa Chimera.....89
- **Figura 41.** Registro fotográfico del dominio C10 de la proteína MYBPC3 donde se muestran las posibles posiciones de la mutación Leu1268Arg que pueden tomar dentro del dominio de la proteína MYBPC3.....90
- **Figura 42.** Registro fotográfico del dominio C10 normal y mutado de la proteína MYBPC3, donde se observan los cambios ocasionados en el dominio de la proteína.....91
- **Figura 43.** Aminoácidos Leucina y Arginina.....106
- **Figura 44.** Localización de la mutación identificadas en este Trabajo Especial de Grado según el modelo de collar trimérico de la MYBPC3, propuesto por Moolman-Smook y col., 2002.....107
- **Figura 45.** Frecuencia de las mutaciones en los dominios de la MYBPC3.....108

LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1.** Genes involucrados en las diferentes enfermedades cardiacas.....11
- **Tabla 2.** Mutaciones encontradas en los genes involucrados en la MHF.....16
- **Tabla 3.** Secuencia de los iniciadores para la amplificación de los exónes del gen *MYBPC3*. Se indica la secuencia de los iniciadores para cada exón, cada uno de ellos conserva el nombre del exón al cual han de amplificar.....49
- **Tabla 4.** Región donde se encuentran los amplímero y los exónes en gen *MYBPC3*.....50
- **Tabla 5.** Temperatura de hibridación sugerida para cada uno de los exónes del gen *MYBPC3*.....51
- **Tabla 6.** Reactivos y concentraciones necesarias para una PCR, con un volumen final de 100µl.52
- **Tabla 7.** Programa utilizado para realizar la PCR.....52
- **Tabla 8.** Condiciones de corrida para los 10 exónes que se estandarizaron por SSCP.....55
- **Tabla 9.** Preparación de los geles de acrilamida.....55
- **Tabla 10.** Preparación de la solución oxidativa, reactivo de plata y reveladora.....57
- **Tabla 11.** Código y sexo de los pacientes y controles en el estudio.....62
- **Tabla 12.** Concentración del ADNg aislado por el método de Lahiri y Nurnberger medido con Nanodrop y los valores relación de pureza de algunos de los pacientes.....64
- **Tabla 13.** Concentración del ADNg aislado por el kit medido con el Nanodrop con los valores relación de pureza de algunos de los pacientes.....66

➤ Tabla 14. Temperatura de hibridación aplicada para cada uno de los exónes del gen <i>MYBPC3</i>	69
➤ Tabla 15. Técnicas utilizadas para el análisis de los exónes del gen MYBPC3 para los 20 pacientes en estudio.....	77
➤ Tabla 16. Mutaciones encontradas en este Trabajo especial de Grado.....	86
➤ Tabla 17. Número de mutaciones por exón indicando el porcentaje en el que puede ocurrir una mutación en los distintos dominios de la proteína.....	99
➤ Tabla 18. Comparación de series de pacientes con MHF que han sido publicados con un estudio sistemático del gen MYBPC3.....	102

ABREVIATURAS

- **SC.** Sistema cardiovascular.
- **MCH.** Miocardiopatía Hipertrófica.
- **DAVD.** Displasia arritmogénica ventricular derecha.
- **MCD.** Miocardiopatía Dilatada.
- **MCNC.** Miocardiopatía no compactada.
- **SQTL.** El síndrome del QT largo.
- **SQTC.** El síndrome de QT corto.
- **TVPC.** Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica.
- **CPDC.** Conducción Progresiva Defecto Cardíaco
- **WPW.** Síndrome de Wolf-Parkinson-White.
- **HVI.** Hipertrofia Ventricular Izquierda.
- **MS.** Muerte Súbita.
- **MHF.** Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.
- **LMM.** Meromiosina Ligera.
- **MYH7.** cadena pesada de la β -miosina.
- **MYBPC3.** proteína C enlazadora de miosina cardíaca
- **TNT.** troponina cardíaca T
- **α -TM.** tropomiosina alfa.
- **MLC2.** cadenas ligera reguladora de la miosina
- **TTN.** proteína titina.
- **MLCL.** cadenas ligera esencial de la miosina
- **ACTC.** alfa actina cardiaca
- **TNC.** troponina cardíaca C

- *MYH6*. cadena pesada me la miosina alfa.
- ECG. Ecocardiograma
- ELCG. Electrocardiograma.
- OMS. Organización mundial de la salud.
- PCUM. Proteína C de unión a miosina.
- PCUM3. Proteína C de unión a miosina cardiaca.

INTRODUCCION

Introducción

1. El corazón y su función en la MHF.

La MHF es una enfermedad que involucra directamente al corazón. El músculo cardíaco se encuentra formado por células musculares ramificadas denominadas miocardiocitos, con uno o dos núcleos, y que constituyen la unidad celular del músculo (Barany y Barary, 2002).

Los miocardiocitos, tienen el núcleo ubicado en el centro del citoplasma y presentan estriaciones transversales, similares a las del músculo esquelético. El retículo sarcoplásmico no está muy desarrollado y se distribuye irregularmente entre las miofibrillas, que no aparecen claramente separadas. Las mitocondrias están distribuidas regularmente y son las encargadas de aportar la energía para que la contracción pueda llevarse a cabo (Barany y Barary, 2002) (Figura 1).

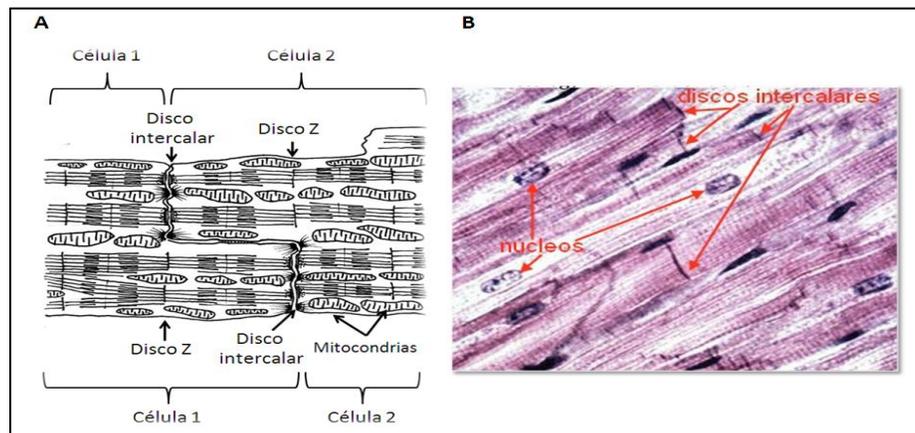


Figura 1. Discos intercalares. En la imagen A se muestran de forma esquemática, mientras B corresponde a un barrido con el microscopio de luz polarizada a 2 Å. Tomado de: (Alberts y col., 2004).

Los miocardiocitos se encuentran conectados entre sí, a través de los discos intercalares formando las fibras del miocardio (Ganong, 2004). Estas estructuras se encuentran en regiones de la membrana donde los extremos de dos células se enfrentan y se

ubican en lugar de un disco Z. Presentan una porción transversa, en la que se ubican dos tipos de uniones intercelulares: las uniones adherentes y los desmosomas (Fatkin y Graham, 2002). Estas estructuras mantienen la comunicación entre las células del músculo cardíaco, facilitando que, tanto el impulso eléctrico como la contracción discurren en una dirección.

Estructuralmente, las miofibrillas del músculo cardíaco, son esencialmente iguales a las del músculo esquelético. Por otra parte, los túbulos T del músculo cardíaco son de mayor diámetro que los del músculo esquelético y se ubican a nivel del disco Z. Los túbulos se asocian generalmente con una sola expansión de las cisternas del retículo sarcoplásmico, de manera que lo característico del músculo cardíaco, son las díadas, compuestas de un túbulo T y de una cisterna de retículo sarcoplásmico

A diferencia del músculo esquelético, las fibras musculares cardíacas están constituidas por un conjunto de células unidas entre sí en disposición lineal, que se bifurcan y recombinan para formar una compleja red tridimensional (Figura 2). Esta estructura de las fibras, además de la conexión entre las células mediante discos intercalares, determina que el corazón se comporte como un sincitio funcional (Fatkin y Graham, 2002; Ganong, 2004).

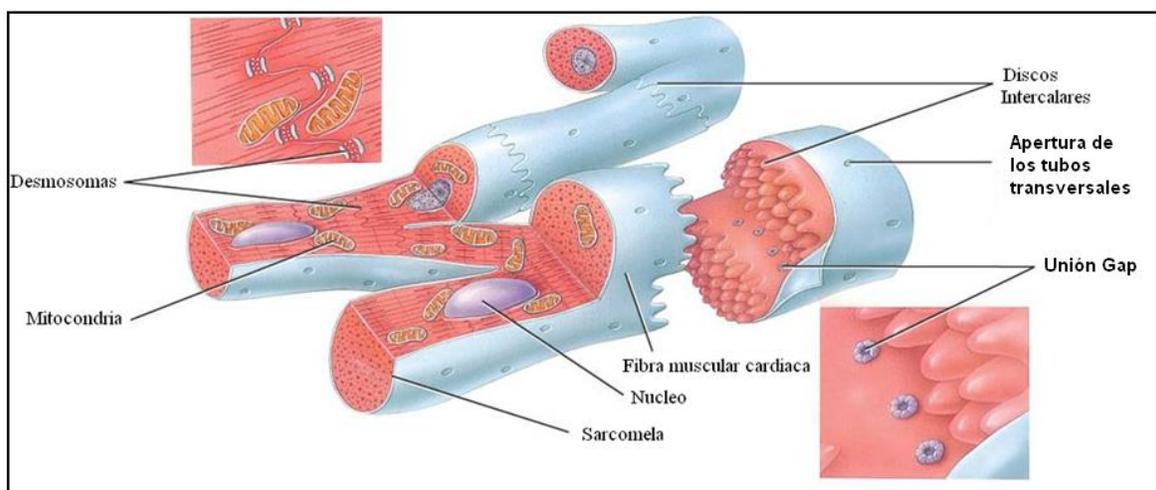


Figura 2. Fibras muscular cardíaca. Dibujo esquemático de los miocardiocitos y de la organización de sus elementos celulares. Tomado y modificado de: (Ganong, 2004).

1.1. Estructura básica del citoesqueleto del músculo cardíaco.

Los haces de miofibrillas se ordenan de forma longitudinal ocupando la mayor parte del citoplasma de las fibras cardíacas. La visión con el microscopio de barrido permite ver, en las miofibrillas, los patrones de bandas oscuras y claras (Figura 3) que se repiten de manera intercalada a lo largo de toda la miofibrilla.

Se encuentran unas líneas oscuras denominadas líneas Z (de *zwischen Scheibe* = disco intermedio) y en el centro de la banda A aparece una banda más clara, la banda H (de *hell* = claro) en cuyo centro aparece una línea más oscura, la línea M (de *mittellmembran* = membrana media) (Figura 3 y 4). Este patrón de bandas permite identificar la unidad de repetición de las miofibrillas, denominado el sarcómero, definido como la región que se extiende de una línea Z a la siguiente. Por tanto, abarca una banda A (con su banda H y línea M centrales) y dos semibandas I a sus lados (Alberts y col., 2004) (Figura 3).

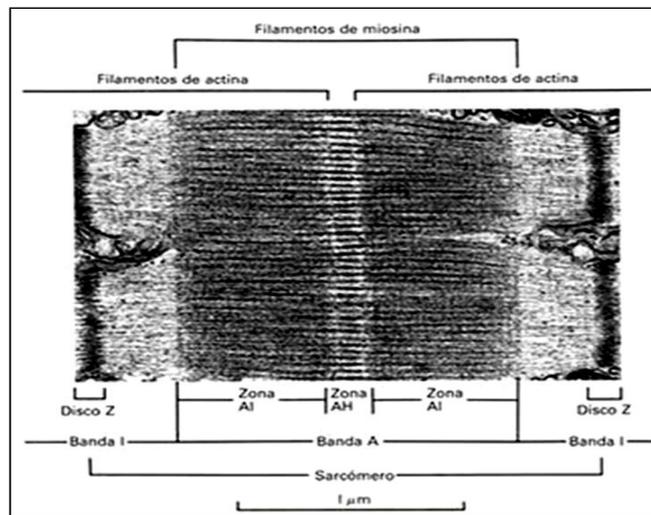


Figura 3. Estructura de sarcómero del miocito. Visión del sarcómero al microscopio electrónico. Tomado de: (Alberts y col., 2004).

El sarcómero, es el aparato contráctil fundamental que constituye al músculo esquelético y cardíaco, compuesto principalmente por la cadena pesada de la miosina y el filamento delgado de actina (Rodríguez y col., 2009). Es una máquina macromolecular

ordenada, que se encuentra integrada al menos por 28 proteínas diferentes (Figura 3), podemos agrupar las más importantes en: 1) Miosina y Actina, denominadas proteínas contráctiles que se ensamblan en filamentos poliméricos (los filamentos gruesos y delgados) que interactúan entre sí para generar fuerza y acortamiento del sarcómero 2) Troponinas y Tropomiosina, proteínas reguladoras que se enlazan con la Actina regulando así la interacción Actina-Miosina, y por tanto la contracción, en respuesta a cambios en la concentración de Ca_2 , y finalmente 3) Proteínas Estructurales que integran, estabilizan y mantienen la estructura del sarcómero, como por ejemplo, la proteína C de unión a Miosina, la Titina y Nebulina (Padrón y Ramírez., 2004).

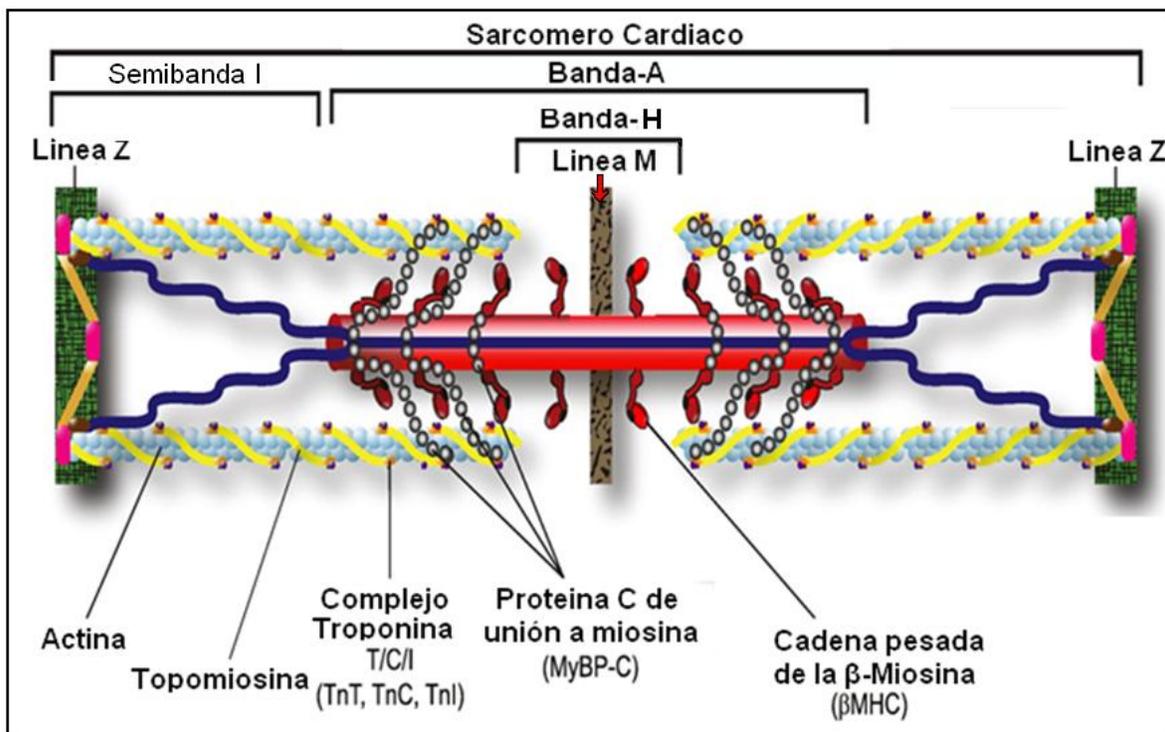


Figura 4. Proteínas contráctiles del sarcómero cardíaco: en este dibujo se aprecian las interacciones entre las distintas proteínas que forman el sarcómero. Dichas interacciones determinan la forma de los filamentos gruesos y de los filamentos finos. Tomado y modificado de: (Michael y col., 2002).

A nivel ultraestructural, la banda A se corresponde con la presencia de abundantes filamentos gruesos (12-16 nm de diámetro), mientras que las semibandas I que es la región

clara que se ve en la figura 4 se corresponden con la presencia de los filamentos finos (8 nm de diámetro) que se anclan a las bandas Z de los extremos del sarcómero (figura 4). Estos filamentos aparecen intercalados en una zona de solapamiento en los extremos de la banda A formando una malla regular con simetría hexagonal (Alberts y col., 2004).

1.2. Función del sarcómero.

1.2.1. La contracción muscular.

La teoría que explica la contracción muscular se denomina “modelo de los filamentos deslizantes” (Huxley y Niedergerke., 1954; Huxley y Hanson., 1954) (Figura 5). En este modelo, el motor molecular es la miosina que, en presencia de actina, convierte la energía química en energía mecánica (Holmes y Geeves., 2000).

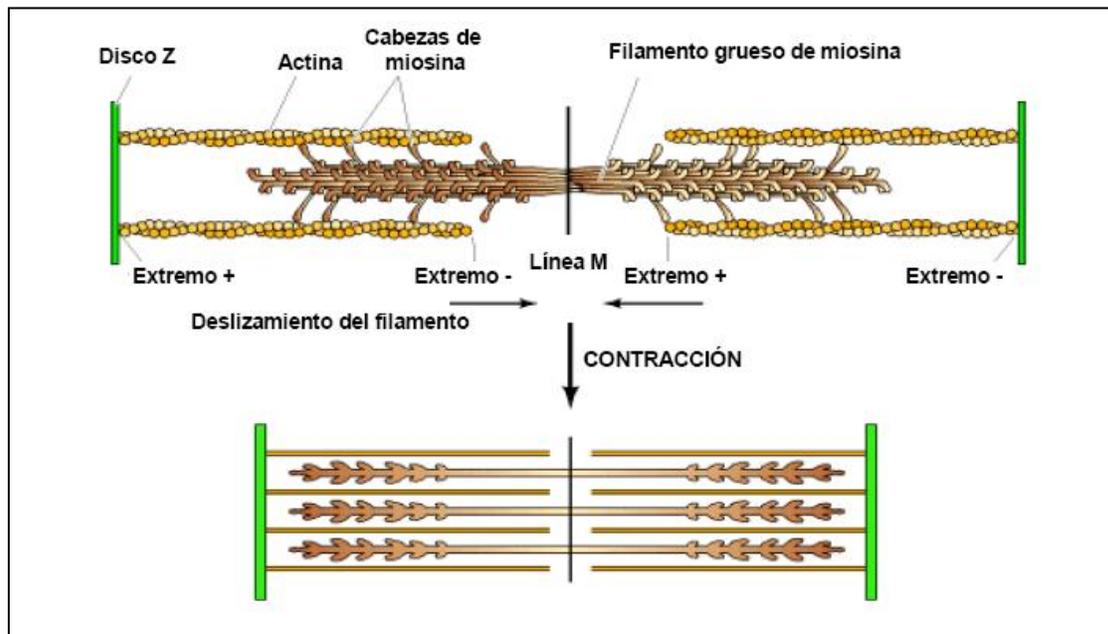


Figura 5. Los filamentos gruesos formados por la asociación de varios cientos de moléculas de miosina. Las cabezas globulares de la miosina se unen a la actina formando puentes entre los filamentos de miosina y de actina (cross-bridges). En este esquema se muestra la contracción del sarcómero, mediante el deslizamiento de los filamentos delgados de actina sobre los filamentos gruesos de miosina. Tomado de: Cooper., 2000).

El deslizamiento de los filamentos gruesos sobre los delgados se produce gracias a la unión y liberación cíclica de los puentes cruzados entre la actina y la miosina (Holmes y Geeves., 2000). Durante esa interacción, la cabeza de miosina hidroliza ATP a adenosín

difosfato (ADP) + Pi, generándose una serie ordenada de cambios alostéricos en su conformación. El proceso es reversible porque la energía de hidrólisis del ATP se almacena en la miosina, que adquiere una conformación altamente comprimida (Alberts y col., 2004; Mathews y col., 2001). Cada cabeza de miosina “camina” en una única dirección a lo largo del filamento delgado impulsada por una variación muy favorable de la energía libre. Al sufrir un cambio cíclico de conformación, la cabeza de la miosina va estirando el filamento de actina, provocando que éste se deslice sobre el filamento grueso (Figura 6).

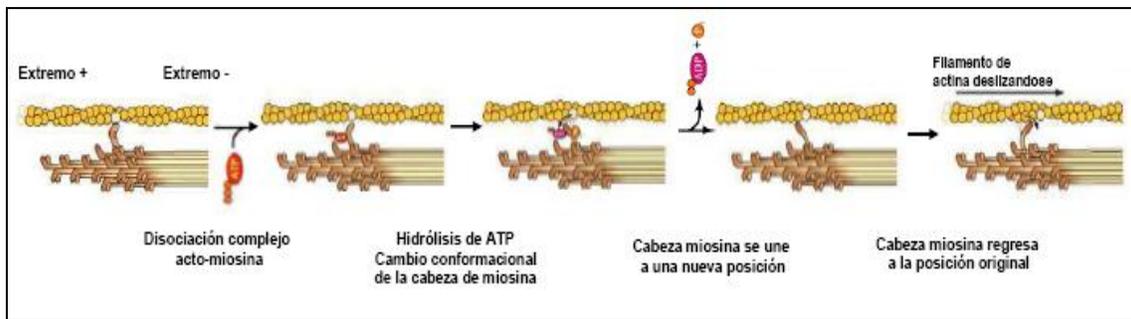


Figura 6. Esquema del movimiento de deslizamiento de los filamentos de actina sobre las de miosina (Cooper., 2000).

Cuando una cabeza de miosina se ha separado del filamento de actina, es arrastrada por la acción de otras cabezas del mismo filamento grueso. Cada filamento grueso tiene unas 5000 cabezas de miosina, y en una contracción rápida, cada una de ellas realiza 5 ciclos por segundo, lo que le confiere una velocidad al deslizamiento de los filamentos delgados sobre los gruesos de 15 $\mu\text{m/s}$ (Alberts y col., 2004; Cooper., 2000).

Los cambios estructurales en el dominio catalítico de la cabeza de la miosina son amplificados mediante la rotación de su cola, actuando como una palanca del brazo (Fisher y col., 1995; Domínguez y col., 1998)

El desplazamiento de la actina depende del número de estados ligados y de la orientación, tanto de la cabeza como de la cola súperenrollada de la miosina. Posiblemente

se puede unir tanto una cabeza de miosina a una molécula de actina en dos puntos, como dos o más cabezas de miosina a un único punto de la actina (Mathews y col., 2000)

1.2.2. Regulación de la contracción.

En el miocardio humano sano existe un equilibrio entre fosfatasas y quinasas. Estas enzimas son las encargadas de fosforilar a las proteínas reguladoras, que modulan la contractilidad del miocardiocito. Este equilibrio se rompe durante la insuficiencia cardíaca y en la MCH (Marón y col., 2002). El desequilibrio entre quinasas y fosfatasas es perjudicial ya que puede dar lugar al remodelado cardíaco y los cambios en la fosforilación de las proteínas reguladoras, que afectan a la función del miocardiocito.

A nivel del miofilamento, la activación de la proteína quinasa A (PKA), iniciadora de la cascada de quinasas de los receptores β -adrenérgicos, fosforila la troponina I, MYBPC3 y la titina, proteínas que todas ejercen efectos diferenciales sobre la función del miofilamento. De hecho, una disminución en la fosforilación de las proteínas diana de la PKA altera la función del miofilamento (Hamdani y col., 2008).

El complejo troponina-tropomiosina es el que ejerce, fundamentalmente, la regulación de la contracción del músculo, ya que funciona como un interruptor sensible al Ca^{2+} que regula la interacción entre la actina y la miosina (Mathews y col., 2001; Barany y Barary, 2002).

Entre otros factores reguladores encontramos la Cadena Ligera Esencial (CLE) y la Cadena Ligera Reguladora (CLR) que se unen a la α hélice de la palanca del brazo del puente cruzado de la miosina, modulando la cinética de los puentes cruzados (Sanbe y col., 2000). La proteína C de unión a miosina (MYBPC) participa en la regulación adrenérgica de la contracción cardíaca (Kunst y col., 2000). La fosforilación de esta proteína acelera la

cinética de los puentes cruzados en el miocardio. Una regulación defectuosa lleva a disfunción cardíaca (Hamdani y col., 2008; Tong y col., 2008).

2. Enfermedades Cardiovasculares (ECV).

Las enfermedades cardiovasculares son enfermedades del sistema circulatorio, que es la estructura anatómica que comprende el sistema linfático que se encarga de conducir la linfa y el sistema cardiovascular que conduce y hace circular la sangre (Figura 7A) (Hill y col., 2006).

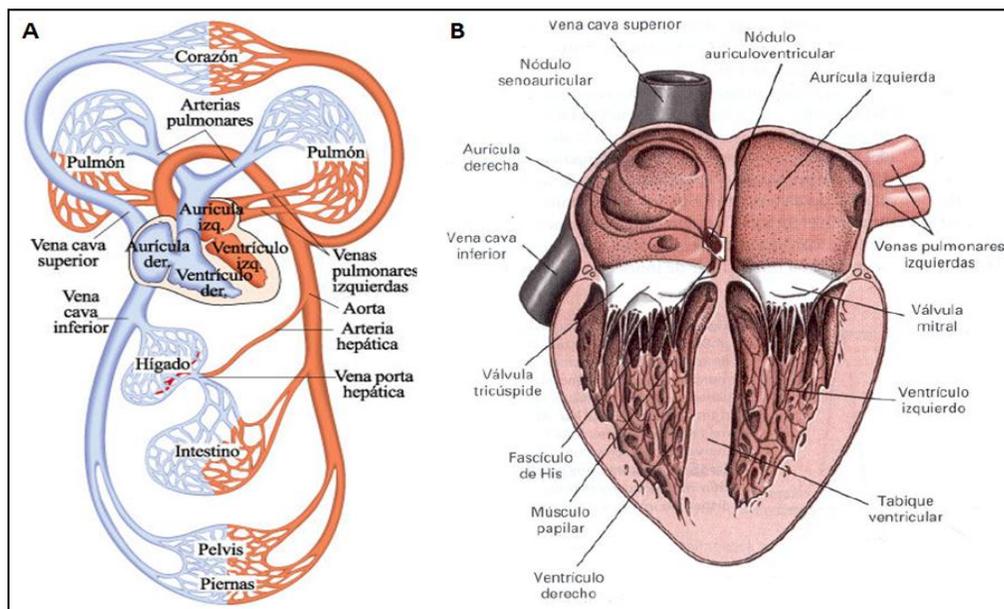


Figura 7. Sistema circulatorio y corazón. A) Sistema circulatorio, B) corazón multicameral. Tomado de (Eckert y Randall., 1997).

Las ECV poseen una etiología y localización diversa. Se clasifican principalmente en:

- 1) Enfermedades isquémicas del corazón como son: infarto agudo al miocardio, angina de pecho, miocardiopatías.
- 2) enfermedades cerebrovasculares como aneurismas, trombosis arterioesclerótica, hemorragia cerebral, embolias, aumento de la tensión arterial (hipertensión), las vasculopatías periféricas, las cardiopatías reumáticas, las cardiopatías

congénitas y la insuficiencia cardíaca. Todas estas enfermedades son de gran importancia, ya que son las responsables del más del 60% de la mortalidad cardiovascular.

Hasta el presente las ECV son la principal causa de muerte en todo el mundo. Cada año mueren más personas por ECV que por cualquier otra causa. Se calcula que en 2004 murieron por esta causa 17,1 millones de personas, lo cual representa un 29% de todas las muertes registradas en el mundo; 7,2 millones de esas muertes se debieron a la cardiopatía coronaria, y 5,7 millones a los accidentes vasculares cerebrales (AVC). Las muertes por ECV afectan por igual a ambos sexos, y más del 82% se producen en países pobres. La Organización Mundial de la Salud OMS estima que para el 2030 morirán cerca de 23,6 millones de personas por ECV, sobre todo por miocardiopatías y AVC, y se prevé que sigan siendo la principal causa de muerte.

En Latinoamérica las enfermedades cardiovasculares originan, en la actualidad, el 31% de las muertes, según datos expuestos en el Congreso Mundial de Cardiología en el 2008. De hecho, las estadísticas indican que 20,7 millones de personas morirán por esta causa durante la primera década del siglo XXI, solamente en América Latina.

En Venezuela, aproximadamente 20,61% de la mortalidad diagnosticada es consecuencia de las ECV; constituyendo así la primera causa de muerte en la población. Dentro de este tipo de enfermedades el infarto al miocardio tiene la mayor incidencia con 13,13% según el Anuario de Mortalidad emitido por el Ministerio del Poder Popular para la salud en el 2008.

Existen enfermedades cardíacas de origen genético, que desde el punto de vista empírico son las responsables de los numerosos casos de muerte súbita y se pueden clasificar en dos grupos: con anomalías estructurales y con trastornos primarios arritmogénicos (Blanco., 2009). El primer grupo incluye: Miocardiopatía Hipertrófica

Familiar (MHF), displasia arritmogénica ventricular derecha (DAVD), Miocardiopatía Dilatada (MCD), Miocardiopatía no compactada (MCNC). En el segundo grupo está incluido El síndrome del QT largo (SQTL), Síndrome de Brugada, Síndrome de QT corto (SQTC), Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (TVPC), Conducción Progresiva Defecto Cardíaco (CPDC) y el síndrome de Wolf-Parkinson-White (WPW). En ambos grupos, el diagnóstico puede ser difícil desde el punto de vista genético por la cantidad de genes involucrados (Blanco., 2009; Hernández y col., 2003) (Tabla 1).

Tabla 1. Genes involucrados en las diferentes enfermedades cardíacas. Tomado de: (Blanco., 2009; Hernández y col., 2003).

Síndrome	Genes
MHF	<i>MYH7, TNNT2, TPM1, MYBPC3, TNNI3, MYL3, ACTC, TTN, PRKAG2, MYH6, GLA, MYO6, MYLK2, TNNC1, TCAP.</i>
MCD	<i>MYH7, TNNT2, TPM1, ACTC, TNNC1, TTN, TCAP, ZASP, PLN, LMNA, DES, ABCC9, ACTN2, CSRP3.</i>
DAVD	<i>PKP2, DSP, JUP, DSC2, DSG2, RYR2, TGFB3, LAMR1, PTPLA, ZASP, DES.</i>
SQTL	<i>KCNQ1, KCNH2, SCN5A, ANKB, KCNE1, KCSADSNE2, KCNJ2, CACNA1c, CAV3, SCN4B.</i>
SQTC	<i>KCNH2, KCNQ1, KCNJ2, CACNA1C, CACNB2.</i>
WPW	<i>PRKAG2.</i>
TVPC	<i>RYR2, CASq2.</i>
CPDC	<i>SCNSA.</i>
Brugada	<i>SCNSA.</i>

Sin embargo, a pesar de la heterogeneidad que existe, de todas las enfermedades cardíacas, las Miocardiopatías, han sido la principal causa de mortalidad en países desarrollados y en todo el mundo, debido a esta alta incidencia, el estudio de este tipo de enfermedades asociadas al corazón ha ido en aumento cada año.

Las diferentes clases de miocardiopatías pueden ser clasificadas clínicamente de la siguiente manera:

2.1. Miocardiopatía Dilatada.

Se observa clínicamente una cavidad ventricular izquierda dilatada, en ocasiones con afectación biventricular y con contractilidad global muy disminuida. Los espesores del miocardio suelen ser de tamaño normal, encontrando una dilatación importante de la cavidad ventricular izquierda, con grosores conservados y con una disfunción ventricular muy importante, con fracción de eyección disminuida en diversos grados de severidad (Heart., 1997; Kim y col., 2010).

2.2. Miocardiopatía Restrictiva.

Es el tipo de miocardiopatía menos frecuente caracterizada por una mayor rigidez del miocardio que hace que la presión en el ventrículo aumente precipitadamente con sólo un aumento pequeño en el volumen. Los datos característicos que la definen son una cavidad ventricular izquierda anormal, con probable hipertrofia concéntrica marcada y disminución de la contractilidad, que conduce a una dificultad en el llenado y vaciado del ventrículo izquierdo (Nihoyannopoulos y Dawson., 2009).

2.3. Miocardiopatía hipertrófica Familiar:

La miocardiopatía hipertrófica (MHF) es una enfermedad cardíaca primaria de etiología genética. Se ha descrito que tiene un patrón de herencia autosómico dominante, cuya principal causa son mutaciones en diferentes genes que codifican para diferentes proteínas del sarcómero (Watkins y col., 1995; Richard y col., 2006; Marón y col., 2006; Ashrafian y Watkins 2007; Kimura, 2008), con distintos niveles de penetrancia, afecta a ambos sexos, presentándose en pacientes de diferentes razas encontrados en múltiples áreas geográficas (Elliott y McKenna., 2004).

Su característica diagnóstica básica es la hipertrofia del ventrículo izquierdo (HVI) en ausencia de cualquier otra enfermedad del corazón o sistémica que tienda a la hipertrofia

del miocardio (Davies y McKenna., 1994) por tanto, existe una dificultad en el llenado del ventrículo izquierdo con fallo de la función diastólica y en ocasiones una obstrucción en la eyección del ventrículo izquierdo. La consecuencia más grave es la muerte súbita (MS) en personas menores de 35 años y deportistas, aunque la hipertrofia ventricular a menudo ocurre en etapas avanzadas de la enfermedad, se ha encontrado que puede estar ausente, por lo cual el individuo se considera asintomático (Padrón y Ramírez, 2004) (Nagueh y col., 2001), lo que acentúa la heterogeneidad de la enfermedad (Spirito y col., 1997).

3. Epidemiología de MHF.

La MHF afecta a 1 de cada 500 individuos (García-Castro y col., 2003; Bos y col., 2009; Rodríguez y col., 2009). Es probablemente la enfermedad cardiovascular hereditaria más común (Padrón y Ramírez., 2004; Bos y col., 2009) y la causa más frecuente de muerte súbita en adultos, atletas jóvenes, así como también una causa importante de morbimortalidad a edad avanzada (García-Castro y col., 2008; Bos y col., 2009). Sin embargo, datos recientes han demostrado que la mortalidad parece haber disminuido en las últimas décadas, a un ritmo de aproximadamente 1-2% por año (Hagege y Desnos, 2009).

Las manifestaciones clínicas son de mayor o menor grado, dependiendo de la edad del paciente y del gen en el que se encuentre la mutación (Richard y col., 2006). Mayormente, se desarrolla durante la adolescencia aunque sus manifestaciones clínicas pueden aparecer también después de los 50 años de edad (Marón y col., 2004). Las personas mayores representan el 25% de los casos, de los que el 40-50% tienen formas obstructivas de MHF. Se puede presentar, ocasionalmente, en niños recién nacidos, asociándose con insuficiencia cardíaca y altos niveles de mortalidad, es una afección primaria y habitualmente familiar (Marón., 2002).

Aunque la causa de muerte es de una frecuencia menor al 1% por año, el riesgo de una muerte súbita sigue siendo muy elevado en pacientes jóvenes, llegando hasta un 6% por año en edades comprendidas entre 20-30 años (Hagege y Desnos., 2009).

En cuanto a las mutaciones que se han asociado a la patología, Rodríguez y colaboradores encontraron que la frecuencia de las mutaciones varía de un estudio a otro, entre 30% y 60% en pacientes con la enfermedad clínicamente definida. Esto se debe a diferentes aspectos como el lugar donde se realizó el estudio, las edades de los pacientes investigados, y la naturaleza de los pacientes remitidos. Sin embargo, se ha demostrado que no todos los pacientes que poseen MHF tienen mutaciones identificables (Rodríguez y col., 2009).

3.1. Mutaciones en el Sarcómero son la principal causa de MHF.

Hasta el presente, se han identificado más de 900 mutaciones en 20 genes que codifican distintas isoformas de las proteínas del sarcómero (Rodríguez y col., 2009), siendo los principales genes involucrados: El gen de la cadena pesada de la β -miosina cardíaca (*MYH7*); el gen de la troponina cardíaca T (*TNT*); el gen de la troponina C cardíaca (*TNC*); el gen de la Tropomiosina a (α -*TM*); el gen de la proteína C de unión a miosina cardíaca (*MYBPC3*); el gen de la troponina cardíaca 1 (*TNI*); y los genes de las cadenas ligera esencial (CLE) y reguladora (CLR) de la miosina (*MLC1* y *MLC2*) (Bos y col., 2009) (Tabla 2) (Padrón y Ramírez., 2004). También se han encontrado otras mutaciones en genes que codifican para la α -actina cardíaca, la titina, deleciones en el gen que codifica para el canal de potasio dependiente de voltaje (*KCNQ4*) y mutaciones en los genes mitocondriales que codifican para los tRNA de isoleucina y glicina, aunque en un menor número de casos. Así, podemos decir que la forma pura de MHF se asocia

principalmente a mutaciones en los genes que codifican para las proteínas contráctiles del sarcómero (Padrón y Ramírez., 2004).

La prevalencia de estas mutaciones varía según la población, siendo los genes *MYH7* y *MYBPC3* los que se han reportado con un mayor índice de mutaciones (Tabla 2) (Rodríguez y col., 2009; Matsuo y col., 2009; Godiksen y col., 2011).

Tabla 2. Mutaciones encontradas en los genes involucrados en la MHF. (Tomado y modificado de Rodríguez y col., 2009; Matsuo y col., 2009; Godiksen y col., 2011)

Gen	Proteína	Locus	Mutaciones
<i>MYH7</i>	cadena pesada de la β -miosina	14q11,2-q12	275
<i>MYBPC3</i>	proteína C de unión a miosina cardíaca	11p11,2	240
<i>TNT</i>	troponina cardíaca T	1q32	41
<i>TNI</i>	troponina cardíaca 1	19p13,	33
<i>α-TM</i>	tropomiosina alfa	15q22,1	13
<i>MLC2</i>	cadena ligera reguladora de la miosina	3p21-q24,3	11
<i>TTN</i>	proteína titina	2q24,3	10
<i>MLC1</i>	cadena ligera esencial de la miosina	3p21-p21,3	10
<i>ACTC</i>	alfa actina cardíaca	15q14	8
<i>TNC</i>	troponina cardíaca C	3p21-p24	4
<i>MYH6</i>	cadena pesada de la miosina alfa	14q11,2-q12	5

Los resultados de estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que las mutaciones causan un arreglo diverso en la estructura y función de las proteínas del sarcómero. Los tipos de mutaciones, su localización, y la función de la proteína afectada son importantes aspectos a considerar al observar la patología de la enfermedad. Sin embargo, el fenotipo final es la

hipertrofia cardíaca, fibrosis y desarreglo del sarcómero (Rodríguez y col., 2009) (Padrón y Ramírez., 2004).

En este tipo de enfermedad, hay un alto grado de heterogeneidad inter e intra genético, además de la predominancia de mutaciones privadas, (Rodríguez y col., 2009) a diferencia de otras enfermedades genéticas, la MHF no tiene un sitio caliente (hot-spots) o un gen blanco específico donde se ubiquen las mutaciones. En esta patología, las mutaciones se pueden encontrar a lo largo de todo el gen que se esté estudiando, inclusive en los intrones (Rodríguez y col., 2009).

En el caso del gen *MYBPC3* se han identificado tres tipos de mutaciones que son: Truncadas, mutaciones puntuales e inserciones (Oakaley y col., 2004). Otro de los principales genes de importancia en esta patología por su alta frecuencia de mutación es el gen *MYH7* que codifica a la cadena pesada de la β -miosina cardíaca, en este caso, las mutaciones encontradas en la cabeza globular de la miosina, muestran una penetrancia donde la mayoría de los individuos desarrollan una hipertrofia importante, ejemplo de mutaciones de este tipo son Arg 403 Gln, y Arg 453 por Cys, las cuales se han asociado con una severa hipertrofia y con altas tasas de muerte súbita (Bos y col., 2009).

4. Antecedentes de la MHF.

Las primeras observaciones que pueden ser consideradas como una descripción de Miocardiopatía Hipertrófica Familiar, fueron realizadas por Vulpian a finales del siglo 19 en el Hospital Salpetriere de Paris, Vulpian describió el fenotipo a nivel macroscópico como un “*retrecissement de l’* orifice ventriculo-aortique” (Padrón y Ramírez, 2004).

En 1869 Henri Liouville y Hallopeau, describieron algunos casos en los que el corazón presentaba una hipertrofia llamativa que afectaba el tabique ventricular y que hizo

pensar a estos autores que esa era la causa responsable de la obstrucción a la eyección del ventrículo izquierdo (Liouville H y Hallopeau M., 1869).

Para 1907 fue descrita la existencia de hipertrofia severa del miocardio del tabique interventricular en dos mujeres de 50 y 56 años de edad considerado por Schmincke A. de origen congénito. La MHF ha estado sujeta a controversia desde que Lord Block en 1943 la describiese como una entidad ligada a la obstrucción en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (Rodríguez y col., 2003).

Davies en 1952 describió una familia con anomalías cardíacas que afectaba a 5 de 9 hermanos y a uno de sus hijos. La afectación familiar sugería una alteración cardíaca hereditaria caracterizada por agrandamiento anormal del corazón o hipertrofia cardíaca, soplos sistólicos audibles y defectos de la conducción visibles en el electrocardiograma. Tres de las hermanas fallecieron por muerte súbita a los 16, 29 y 38 años (Davies LG., 1952).

En 1957 Sir Russell Brock describe el caso de una mujer de 58 años intervenida por sospecha de estenosis aórtica severa. En la intervención quirúrgica la aorta ascendente estaba marcadamente dilatada y el anillo valvular aórtico era normal, sin evidencia de calcificación. Durante la intervención, ante la probabilidad de una estenosis subvalvular, se realizó un registro de presiones en el VI y se demostró que existía estenosis a 2,5 cm por debajo de la válvula-aórtica. En la autopsia se demostró una severa hipertrofia del miocardio del VI que alcanzaba su mayor grosor a una distancia de 2,5 cm por debajo de la válvula aórtica donde el miocardio hipertrofiado protruía hacia la luz del ventrículo. Posteriormente describe el caso de una mujer de 63 años, con hallazgos similares a la anterior paciente, en la que también se demuestra en la autopsia una válvula aórtica normal

y una severa hipertrofia concéntrica del VI que se extendía hasta la región subvalvular aórtica (Brock R., 1957).

Tras una larga controversia, sobre si el proceso fundamental era la hipertrofia o la obstrucción, se impuso finalmente la idea de Goodwin, donde la hipertrofia era el hallazgo anatomopatológico que siempre estaba presente, acompañada en ocasiones por la obstrucción (Rodríguez y col., 2003) y ya para la década de 1959 a 1960 las características clínicas únicas de la hipertrófica se describieron sistemáticamente por primera vez (Padrón y Ramírez, 2004).

Para los años 1968 y 1973 se realizan las primeras descripciones de series de pacientes con MCH incidiendo en la fisiopatología, clínica e historia natural de la enfermedad (Frank S y col., 1968; Hardarson T y col., 1973).

Desde entonces el concepto de MHF ha ido variando desde su descripción anatomopatológica en 1957. En función de los progresos en los métodos de diagnóstico, se ha pasado de definir la MHF como una hipertrofia septal asimétrica, que produce obstrucción dinámica en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (VI), a que la distribución de la hipertrofia puede ser muy variable (septal, concéntrica, apical, entre otros) con o sin obstrucción.

Entre los años 1980-90, el desarrollo de la ecocardiografía (ECO) permite realizar una valoración no invasiva de las alteraciones morfológicas de la MCH determinando los patrones de distribución de los segmentos hipertróficos y las alteraciones funcionales cardíacas (Marón BJ., 1981). Durante estos años, se profundiza, además, en el conocimiento de los mecanismos de arritmogénia, isquemia y muerte súbita y se empiezan a definir pautas de tratamiento médico o quirúrgico para distintas formas clínico-morfológicas de MHF.

4.1. Primera mutación descrita asociada con MHF.

Ya para comienzos de la década de los 90, se describen casos de familias con muerte súbita en las que no se detecta hipertrofia macroscópica en las necropsias pero en las que se identifican trastornos histológicos del miocardio. Se empieza a hablar de MHF sin hipertrofia (McKenna WJ. y col., 1990). Para el mismo año, se descubrió la primera mutación en el gen *MYH7* que codifica la cadena pesada de miosina. Esta mutación puntual se encontró en el exón 13 del gen *MYH7* en el cromosoma 14 de un conjunto familiar, en un residuo altamente conservado de Arginina (Arg-403) el cual cambiaba a glutamina, demostrando así que el defecto en este gen era responsable de la MHF (Geisterfer-Lowrance y col., 1990).

Para los años 1991-97 la aplicación de técnicas de biología molecular al estudio de la MHF demuestran la existencia de diferentes alteraciones cromosómicas en pacientes, tanto en la forma familiar, como en los casos esporádicos con diversos grados de manifestaciones clínicas (Rosenzweig A. y col., 1991), considerándose así, que la MHF es de hecho una enfermedad genética asociadas a las proteínas del sarcómero (Sáenz de la Calzada C., 1996). Se realizaron estudios *in vitro* con mutaciones en *MYH7* y la troponina T indicando que estas mutaciones deterioran de alguna forma la contracción muscular, debido a las alteraciones en los mecanismos de unión de miosina con la actina y la disminución de la actividad ATPasa (Sata y col., 1996). Los resultados *in vivo* demostraron que estas mutaciones estaban asociadas al sarcómero determinando que la hipertrofia al parecer se debía al cambio genético realizado (Cuda y col., 1997).

Desde entonces, se han identificado mutaciones en 11 genes que codifican para proteínas contráctiles y componentes del sarcómero (Watkins y col., 1995; Richard y col., 2006; Marón y col., 2006).

En 1997, se encontró una serie de mutaciones en familias francesas, donde se estudio por primera vez la organización y la secuencia del gen *MYBPC3*, encontrando un espectro de mutaciones diferentes a los observados previamente en los otros genes, reforzando la importancia funcional de la proteína PCUM3 en la regulación del trabajo cardíaco (Carrier y col., 1997). La susceptibilidad a complicaciones como la muerte súbita y la progresión a situaciones como la insuficiencia cardíaca, han motivado a los investigadores a buscar indicadores capaces de identificar la enfermedad en estadíos tempranos.

5. Penetrancia incompleta, factores ambientales y genes modificadores.

La expresión de la enfermedad varía considerablemente, no sólo entre las distintas familias portadoras de una determinada mutación sino también dentro de una misma familia (Erdman y col., 2001). En ocasiones una misma mutación se ha relacionado en alguna familia con desarrollo tardío de la enfermedad, puesto que la penetrancia era incompleta en individuos jóvenes (Kubo y col., 2005), mientras que en otras familias la penetrancia era incompleta independientemente del grupo de edad al que pertenecía (Niimura y col., 1998), lo que parece sugerir que la manifestación de la enfermedad podría estar influenciada por factores como: sexo, edad, factores genéticos (mutaciones, polimorfismos, genes modificadores) y factores ambientales (el estilo de vida, el grado de ejercicio físico o la presión sanguínea) (Keren y col., 2008; Kimura, 2008).

6. Importancia de la Proteína C de unión a miosina en la MHF.

La proteína C de unión a miosina (PCUM) fue identificada como contaminante en preparativos de miosina hace 30 años. Una vez asignado su papel en la estructura y regulación del sarcómero, se incrementó el interés en la comunidad científica (Oakley y col

2004), por el estudio extenso de esta proteína, aunado a su papel en la patología cardíaca Miocardiopatía Hipertrófica Familiar.

La PCUM, fue purificada y caracterizada en 1973 por Offer y col. (1973). Está localizada sobre los filamentos gruesos en bandas discretas, separadas entre sí por 43 nm. El número exacto de tiras depende del tipo de músculo (Squire y col., 2003; Moolman-Smook y col., 2002; Luther y col., 2008). Cada tira está compuesta por 2-4 moléculas de la proteína y representa cerca del 2% de la masa de la proteína en la miofibrilla (Oakley y col., 2007).

Existen tres isoformas de proteína C de unión a miosina, codificadas por tres genes distintos (*MYBPC1*, *MYBPC2* y *MYBPC3*). Los dos primeros codifican para PCUM de músculo esquelético y el tercero para la PCUM cardíaca (Figura 8) (Flashman y col., 2004; Yamamoto y col., 1983; Yuan y col., 2006).

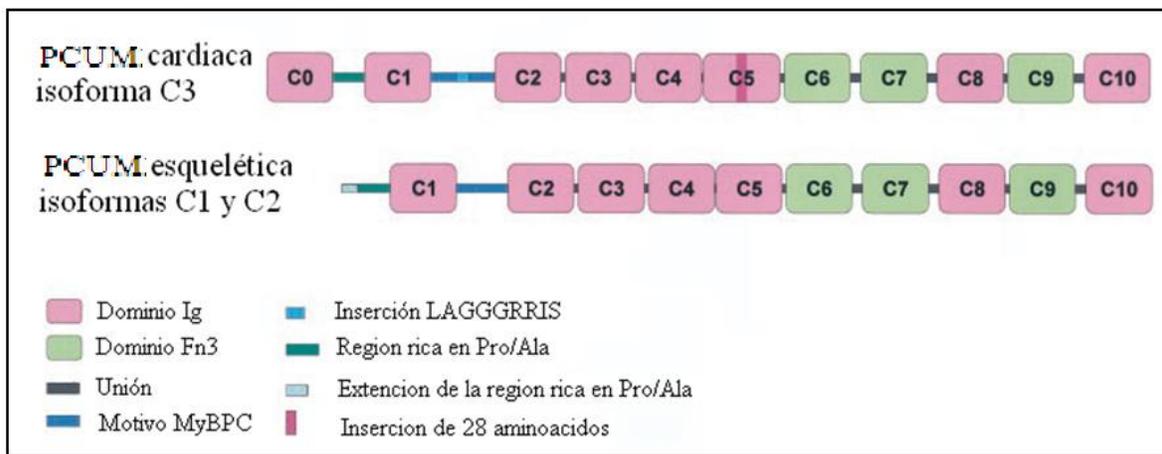


Figura 8. Representación esquemática de la organización en dominios de las tres isoformas de proteína C de unión a miosina. Las PCUM3 consisten en dominios repetidos de tipo Ig y Fn3. La Isoforma cardíaca tiene un dominio adicional N-terminal (C0), tres sitios específicos de fosforilación en S2 binding y una inserción rica en residuos prolina/alanina en el dominio C5.

Las proteínas C pertenecen, como otras proteínas de unión a miosina y titina, a la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig) intracelulares y está compuesta por dominios repetidos de Ig y fibronectinas (Fn). Son dominios muy conservados, en particular en sus

dominios carboxilo terminal. La proteína PCUM3 consta de 1274 aminoácidos, organizados en por lo menos 37 exones (Figura 9) (Nimura y col., 1998).

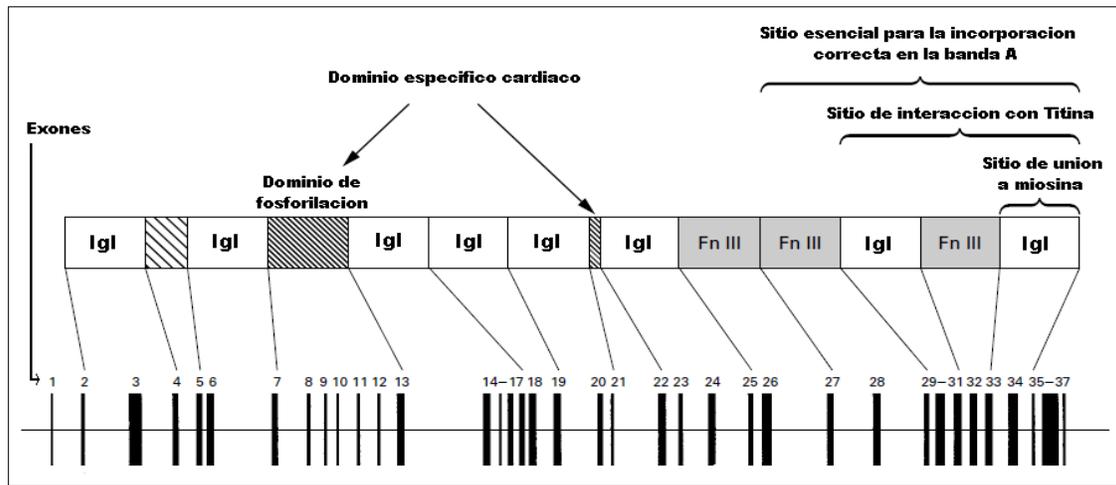


Figura 9. Proteína PCUM cardíaco, compuesto por 8 dominios Igl y tres dominios FnIII. Mostrando la región específica cardíaca, sitios de fosforilación y los sitios para la unión de la miosina a la titina. Modificado de: (Nimura y col., 1998)

Posee 10 dominios globulares (C1-C10), el motivo de unión a S2 y la región rica en prolina/alanina antes del dominio C1 que también tienen las otras isoformas, además, consta de un dominio Ig adicional en el extremo N-terminal (denominado C0), una secuencia de aminoácidos (LAGGRRIS) dentro del motivo de unión a S2, y una inserción de 28 aminoácidos en el dominio C5 (Flashman y col., 2004; Winegrad, 1999, Luther y col., 2008) (Figura 8 y 9). Estos dominios permiten a la proteína interactuar con otras proteínas del sarcómero. Se han descrito interacciones con la miosina, la titina y la actina.

Existen evidencias de que la PCUM3 se une a la actina en alguna parte de la región N-terminal C0-C2 (Oakley y col., 2007). Según Kulikovskaya y col. (2003) la interacción con la actina se produce en el dominio C0. Mientras que, para Squire y col. (2003), el dominio implicado en esta interacción podría ser la región rica en prolina y alaninas que hay en el linker entre C0 y C1.

Además, existe una centena de aminoácidos altamente conservados, en esta región N-terminal (C1-C2) que se unen a los 126 residuos proximales del segmento S2 de la miosina, cerca de la región bisagra (Gautel y col., 1995; Gruen y col., 1999; Ababou A. y col 2008). Este segmento de la miosina S2 es idéntico en todas las isoformas de miosina de vertebrados, y su interacción con cualquiera de las 3 isoformas de PCUM podría modular la movilidad cabeza-cola de la miosina (Figura 10) (Gruen y col., 1999).

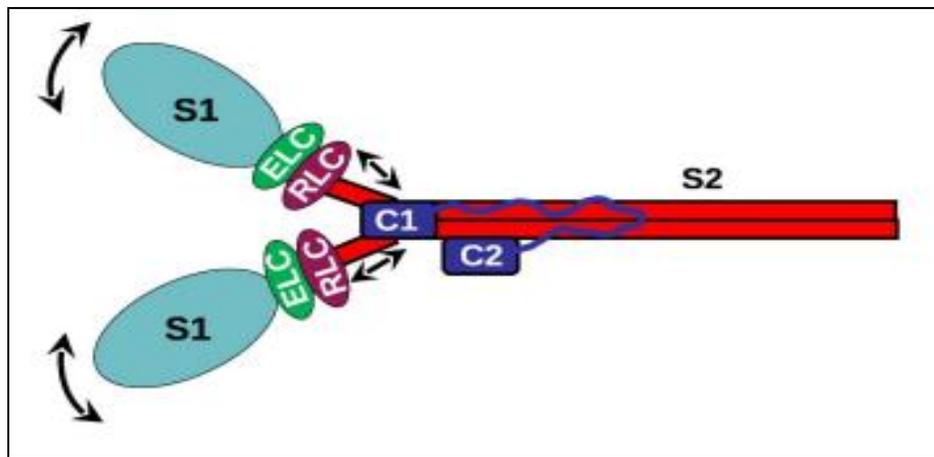


Figura 10. Esquema de la cadena pesada de la molécula de miosina que muestra la asociación propuesta del dominio C1 y C2 de la PCUM3 con el subfragmento S2. Tomado de (Ababou A. y col 2008).

Los dominios C-terminales de la PCUM3, están implicados en interacciones con la meromiosina ligera (LMM) y con la titina, que permiten estabilizar la estructura del sarcómero (Figura 11). Los dominios C7-C10 tienen una alta afinidad por la LMM, y en concreto el dominio C10 se une a cuatro aminoácidos de la LMM que están cargados positivamente (Miyamoto C.A y col., 1999; Oakley y col., 2007). Y los dominios C8-C10 interaccionan con la titina (Watkins y col., 1995).

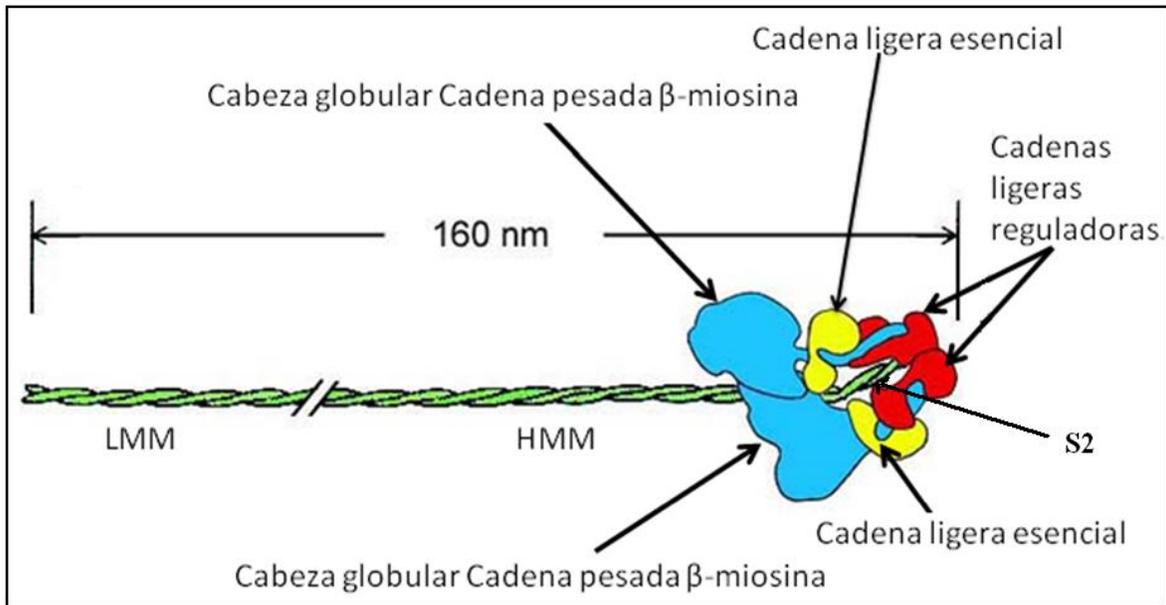


Figura 11. Representación esquemática de la miosina, donde se encuentra la región S1 o cabeza globular, la región cuello o S2, las cadenas ligeras reguladoras de la miosina, la LLM: meromiosina ligera y HMM: meromiosina pesada. Tomado y modificado de (Padrón, R., Álamo, L., 2004. Acta Microscópica 113: 14-29)

Se han postulado varios modelos que intentan explicar cómo se une la PCUM3 al filamento grueso. Moolman-Smook y col., (2002) proponen un modelo que consiste en una disposición de collar trimérico (Figura 12A). Los dominios C5-C10 de tres moléculas de PCUM rodean al filamento grueso formando un collar. De manera que el dominio C5 de una molécula interacciona con el C8 de otra, C6 con C9 y C7 con C10. Los dominios C0-C4 se extienden por el espacio interfilamentoso e interactúan, al menos, con la región S2 de la miosina (Moolman-Smook y col., 2002).

Por su parte Squire y col. (2003) proponen un modelo alternativo en el que no se producen interacciones entre las moléculas de PCUM (Figura 12B). Los motivos C7-C10 de una molécula se disponen axialmente a lo largo del esqueleto del filamento grueso y son capaces de interactuar con la titina. El extremo N-terminal queda fuera de la interacción miosina/actina (Squire y col., 2003).

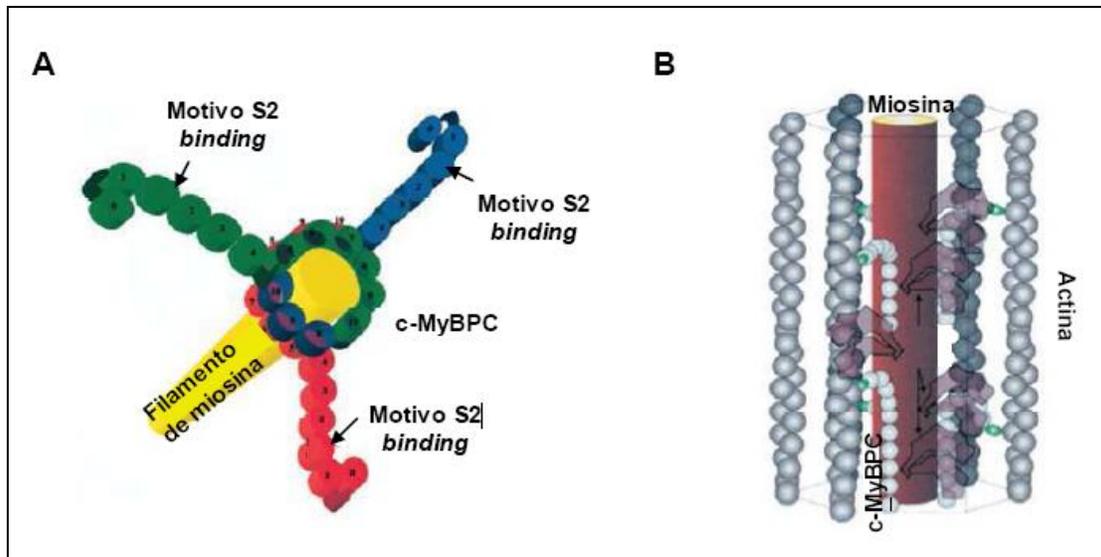


Figura 12. Dos modelos distintos proponen la disposición de la PCUM en el filamento grueso. A: Modelo de collar trimérico propuesto por Moolman-Smook y col. (2002). B: Modelo propuesto por Squire y col. (2003). Las moléculas de PCUM se disponen paralelamente a las colas. Los extremos N-terminales se extienden hacia la cabeza de las miosinas.

6.1. Funciones de la proteína C de unión a miosina. Isoforma cardíaca.

El hecho de que la PCUM3 sea una proteína modular hace que sus funciones se puedan separar dentro de fragmentos definidos que desempeñan funciones estructurales y regulatorias (Sadayappan y col., 2006).

Aunque en un primer momento se consideró que la PCUM era una proteína estructural, parece que juega un papel importante en la modulación de la contractilidad, idea que resultó apoyada al analizar los resultados obtenidos con ratones knock-out (KO) para el gen *MYBPC3*. Los ratones KO desarrollan MHF, pérdida de sensibilidad al Ca^{2+} longitud dependiente, relajación incompleta y aumento de la sensibilidad al Ca^{2+} del músculo cardíaco (Cazorla y col., 2006; Pohlmann y col., 2007; Carrier y col., 2004).

6.1.1. Función estructural.

La PCUM3 juega un papel importante en la formación del filamento grueso y/o en su estabilidad, facilitando la transmisión de fuerza entre los puentes cruzados acto-miosina y la línea M (Freiburg y Gautell., 1996; Gilbert y col., 1996; Moolman-Smook y col., 2002; Palmer y col., 2004a; Nyland y col., 2009).

El extremo C-terminal de la proteína refuerza el filamento grueso mediante su unión con la porción LMM de la miosina, con la titina, y con otras PCUM. (Starr y col., 1978; Okagaki y col., 1993; Freiburg y Gautel., 1996; Gilbert y col., 1996; Seiler y col., 1996; Moolman-Smook y col., 2002; Welikson y col., 2002).

El extremo N-terminal de la PCUM3 interacciona con la región más flexible de la súper-hélice de la miosina, la región S2. Esta unión contribuye a la resistencia del filamento grueso (Nyland y col., 2009) y a mantener la correcta disposición de las cabezas de miosina (Kulikovskaya y col., 2003; Cazorla y col., 2006).

Los análisis de los patrones de difracción de rayos X indican que esta proteína puede proporcionar la unión mecánica entre los filamentos grueso y fino, además de consolidar la estructura del miofilamento (Squire y col., 2003). Por tanto la PCUM3 contribuye significativamente a la integridad estructural y a las propiedades mecánicas del sarcómero y del ventrículo izquierdo (Palmer y col., 2004b).

6.1.2. Función reguladora

La fosforilación de la PCUM3 es esencial para el normal funcionamiento del corazón, aunque se necesitan más estudios para conocer en profundidad su papel. Existen evidencias de que está implicada en la regulación de la función miocárdica. Se ha descrito que niveles adecuados de proteína fosforilada le confieren propiedades cardioprotectoras. De hecho, dicha fosforilación disminuye en la insuficiencia cardíaca y en el daño isquémico

(Sadayappan y col., 2005; Sadayappan y col., 2006; El Armouche y col., 2007). Jacques y col., (2008a), realizaron medidas cuantitativas de la fosforilación total de la PCUM3 y obtuvieron una reducción de hasta un 60% en muestras de músculo del ventrículo humano, procedente de corazones con insuficiencia cardíaca o con miocardiopatía obstructiva. Estos resultados coinciden con los obtenidos al estudiar la fosforilación de otras proteínas contráctiles, en donde la fosforilación de la RLC y de la troponina I se reduce, incluso un 40%, y un 85%, respectivamente (Messer y col., 2007; Gallon y col., 2007; Van der Velden y col., 2003; Jacques y col., 2006a). Se ha sugerido que el responsable de este descenso sea el aumento de la actividad fosfatasa endógena.

La PCUM3 es la única proteína del filamento grueso que es fosforilada diferencialmente en múltiples sitios por la proteína fosfoquinasa A (PKA), PKC, y la proteína quinasa dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (Sadayappan y col., 2006; Oakley y col., 2007).

El motivo de fosforilación de la proteína se encuentra en el extremo N-terminal de la misma y parece ser crítico para que se produzcan las interacciones miosina-actina y el acoplamiento de los filamentos gruesos con los finos, funciones que se necesitan para el mantenimiento de la organización del filamento grueso (Sadayappan y col., 2006) y en definitiva, para la producción de fuerza (Lecarpentier y col., 2008).

A pesar de que no hay medidas del nivel de fosforilación de la PCUM3 en músculo cardíaco intacto en la literatura (Jacques y col., 2008a), hay varios trabajos en los que se publica la cantidad de fosfato que se puede incorporar cuando se utilizan quinasas exógenas. Además de las tres serinas localizadas en el linker cardiospecífico entre C1-C2 (S273, S282 y S302) (Gautel y col., 1995), algunos estudios han obtenido medidas de fosforilación de hasta 4 mol Pi/mol (Hartzell y col., 1984; Schlender y col., 1991) y en

otros, se han identificado hasta 5 aminoácidos diferentes que pueden ser fosforilados in vitro o in vivo (Yuan y col., 2006; Jacques y col., 2008a).

Este motivo, a través de la fosforilación, modula la función contráctil (Kunst y col., 2000; Gruen y col., 1999; Harris y col., 2004; Sadayappan y col., 2006) sin que sea necesario que el extremo C-terminal de la proteína esté anclado en el filamento grueso (Kunst y col., 2000).

Los resultados de estudios ultra-estructurales muestran que la fosforilación de la PCUM alarga las cabezas de la miosina desde la columna del filamento e incrementa su grado de orden y/o altera su orientación, disminuyendo la flexibilidad de los puentes cruzados (Weisberg y Winegrad, 1996; Weisberg y Winegrad 1998; Sadayappan y col., 2006), y por tanto, aumentando la producción de fuerza (Kunst y col., 2000). Mientras que, cuando la proteína no está fosforilada se une por su extremo N-terminal a la porción del subfragmento-2 de la miosina y reduce la actividad ATPasa de la acto-miosina (Gruen y col., 1999).

Los estudios realizados en Miocardiocitos aislados de ratones KO para la PCUM3, y con distintos grados de hipertrofia vuelven a poner en evidencia que la presencia de PCUM3 se requiere para la regulación normal de la contractilidad cardíaca. Cazorla y col. (2006) demostraron que la falta de PCUM3 reduce la sensibilidad al Ca^{2+} , dependiente de la longitud del sarcómero y además disminuye significativamente la sensibilidad al Ca^{2+} que produce la PKA.

7. Primeros estudios que relacionan mutaciones en PCUM3 con MHF:

En 1993 Carrier y col 1993, realizando estudios de ligamiento, relacionan, por primera vez, la MHF con el cromosoma 11p13-q13, lugar donde se localiza el gen

MYBPC3 que codifica la PCUM cardíaca. En 1995 dos grupos distintos identifican, por primera vez, mutaciones, que segregan con la MHF, en el gen que codifica para la PCUM3 (Bonne y col., 1995; Watkins y col., 1995).

Desde que se encontraron estas primeras mutaciones, en *MYBPC3*, han pasado más de 25 años y ya se han identificado más de 250 mutaciones (Rodríguez y col., 2009; Matsuo y col., 2009; Godiksen y col., 2011). La PCUM3 se ha convertido en una de las principales proteínas del sarcómero implicadas en la fisiopatología de la MHF (Kunst y col., 2000; Richard y col., 2003; Jacques y col., 2008a). De forma que, en el 11-18% de las muestras con MHF se encuentran mutaciones en el gen *MYBPC3* (Richard y col., 2003) Además, distintos estudios como por ejemplo los llevados a cabo por Richard y col., 2003; Jacques y cola., 2008a llevados a cabo en pacientes, muestran que el 40-50% de los que son portadores de mutación, lo son en el gen *MYBPC3*.

Según Richard y col. (2003) un tercio de las mutaciones, en este gen, son sustituciones de un único aminoácido, otra tercera parte son deleciones o inserciones que causan un cambio de pauta en la lectura, y el resto son mutaciones que causan codones de terminación, deleciones o inserciones que no producen cambio de pauta, o mutaciones que afectan al corte y empalme..

7.1. Teorías que explican la patología de la MHF.

Se han propuesto 3 hipótesis para explicar porque las mutaciones en los genes que codifican a las proteínas del sarcómero inducen al espectro de la enfermedad (Rodríguez y col., 2009).

7.1.1. La teoría del péptido venenoso.

La teoría del “**péptido tóxicos**”, propone que una sola proteína mutante dentro del sarcómero, puede interrumpir la función de las proteínas “tipo silvestre” (Rodríguez y col., 2009). Muchas de estas mutaciones en la MHF reflejan un cambio de codón, que parece no interferir con el ensamblaje inicial y la alineación apropiada de los miofilamentos y del propio sarcómero, pero ejercen un efecto negativo dominante sobre la función del miocito que sigue a su incorporación dentro de las miofibrillas (Oakaley y col., 2004). Las mutaciones por delección total o parcial que eliminen el codón de terminación, o el sitio de poliadenilación, así como también aquellas que contribuyan a la codificación para proteínas truncadas, pueden alterar la estequiometría de las proteínas del sarcómero (Marian y col., 1992; Oakaley y col., 2004).

7.1.2. Haploinsuficiencia.

La otra hipótesis señala que algunas mutaciones en estos genes que codifican para proteínas del sarcómero pueden generar un codón de terminación ocasionando la finalización prematura de la traducción, creando en algunos pacientes **haploinsuficiencia**, ya que la ausencia del C-terminal no garantiza el funcionamiento normal de la proteína (Oakaley y col., 2004). En la haploinsuficiencia, las mutaciones interrumpen una sola copia del gen, al encontrarse un alelo mutado disminuye la cantidad de proteínas en buen estado o funcionales tipo silvestre que puedan llevar a cabo el correcto funcionamiento del sarcómero (Rodríguez y col., 2009). Puesto que la estructura del sarcómero es estequiométricamente balanceada, la haploinsuficiencia de una proteína sarcomérica dada, resulta en un rendimiento menor del sarcómero (Rodríguez y col., 2009).

7.1.3. Alteraciones en la fosforilación.

La enfermedad cardíaca está relacionada con cambios en la fosforilación de las proteínas contráctiles. Por lo que, el descenso de PCUM3 fosforilada puede ser un hecho común a la disfunción contráctil e independiente de la naturaleza de la patología. Pero también, es posible que algunas de las mutaciones identificadas en el gen *MYBPC3* puedan alterar los niveles de fosforilación de la proteína y, por tanto, modifica la contracción muscular (Jacques y col., 2008a).

El mecanismo exacto por el cual muchas de éstas mutaciones causan MHF no se conoce aún, pero en algunos casos el grado en que estas mutaciones pueden afectar a la estructura y función de proteínas como PCUM3 puede deducirse utilizando herramientas como la comparación de secuencias (Oakaley y col., 2004).

8. Tratamiento.

Una vez que los pacientes han sido clínicamente identificados con MHF, se pueden implementar varias estrategias terapéuticas. Estas terapias incluyen el uso de fármacos inotrópicos, fármacos anti-rítmicos y bloqueantes beta-adrenérgicos entre otros (Rodríguez y col., 2009).

Los fármacos inotrópicos mejoran la contractilidad del miocardio y tienen efectos sobre los vasos periféricos; algunos son vasodilatadores (dobutamina), otros vasoconstrictores (noradrenalina) y otros pueden mostrar ambos efectos dependiendo de la dosis (dopamina, adrenalina) (Rodríguez y col., 2009).

Los inotrópicos se clasifican en:

- Aminas simpaticomiméticas.
- Glucósidos cardíacos.

- Otros no glucósidos/no simpaticomiméticos.

Los fármacos antiarrítmicos son un grupo de medicamentos que se usan para suprimir o prevenir las alteraciones del ritmo cardíaco, tales como la fibrilación auricular, el aleteo auricular, la taquicardia ventricular y la fibrilación ventricular, a concentraciones en la que no ejercen efectos adversos sobre la propagación normal del latido cardíaco. Los antiarrítmicos son el tratamiento de elección para los pacientes con trastornos del ritmo cardíaco, aunque pueden ser reemplazados en algunas ocasiones específicas por desfibriladores, marcapasos, técnicas de ablación y quirúrgicas (Nichol y col., 2002).

Los bloqueantes beta-adrenérgicos tienen beneficios potenciales en pacientes con Síndromes Agudos Coronarios, incluyendo pacientes con Infarto No-Q y Angina Inestable. En ausencia de contraindicaciones, los Beta-Bloqueantes debieran ser administrados a todos los pacientes con sospecha de infarto agudo al miocardio y Angina Inestable de alto riesgo. Los Beta-Bloqueantes son fármacos antiarrítmicos eficaces y han demostrado reducir la incidencia de fibrilación ventricular. Como agentes coadyuvantes de la terapia fibrinolítica, los Beta-Bloqueantes pueden reducir la frecuencia de Re-infarto y de Isquemia recurrente. Los Beta-Bloqueantes también reducen la mortalidad si se administran de forma temprana en pacientes en los que no esté indicada la Fibrinólisis (Helfand y col., 2009).

Los pacientes con mayor riesgo de muerte súbita pueden ser sometidos a procedimientos invasivos, como por ejemplo, el implante de un desfibrilador cardíaco, que controle los impulsos eléctricos del corazón, los cuales se producen por las arritmias ventriculares y por la insuficiencia cardíaca (Hagege y Desnos., 2009). En los últimos años, la terapia génica, cuyo objetivo es alcanzar la renovación de las proteínas del sarcómero, ha recibido mayor auge y atención ya que no involucra procesos invasivos (Hagege y Desnos., 2009; Rodríguez y col., 2009)

9. Diagnóstico clínico.

Para el diagnóstico clínico se utilizan una serie de técnicas de las cuales las principales son: Ecocardiograma y Electrocardiograma (ECG). El eco cardiograma también conocido como ultrasonido cardíaco, involucra técnicas estándares de ultrasonido para producir imágenes en rebanadas de dos dimensiones del corazón. Los últimos sistemas de ultrasonido ahora emplean imágenes tiempo real en 3D. La evaluación ecocardiográfica en pacientes con MHF, revela una hipertrofia predominante del tabique interventricular de carácter difuso, que comúnmente se extiende a la pared antero-lateral del ventrículo izquierdo (Padrón y Ramírez, 2004). El engrosamiento de la pared es cercano a los 20 mm, aun cuando se han reportado medidas entre 15 y 20 mm e incluso menores (entre 13 y 15 mm) y el desarreglo miofibrilar que se extiende entre un 5-30% del tejido del miocardio y tiene una baja correlación con el grado de hipertrofia (Padrón y Ramírez, 2004).

El electrocardiograma es el registro gráfico, en función del tiempo, de las variaciones de potencial eléctrico generadas por el conjunto de células cardíacas y recogidas en la superficie corporal. Al colocar electrodos en diferentes sitios y conectarlos a un instrumento de registro como el electrocardiógrafo, se obtiene el trazado característico. Estos análisis permiten observar si existe alguna hipertrofia o falla en alguna región del corazón.

Sin embargo, uno de los aspectos que ha complicado realizar un diagnóstico rápido y correcto es la complejidad clínica que caracteriza la MHF, la cual se hace más evidente cuando se analizan los aspectos genéticos de la enfermedad. En más del 50% de los casos, la MHF es una enfermedad de origen genético, y en los casos restantes, no se tiene aún un estudio sobre la causa bien definido, aunque se especule que pudiera ser de origen genético, pero con mutaciones en genes no descritos. Existen por lo menos tres factores que pueden

subestimar el diagnóstico de las formas génicas: 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 (Padrón y Ramírez., 2004) (García-Castro y col., 2008).

Otro aspecto a considerar es el cuadro clínico asociado, que puede ser muy variable y abarca desde personas que manifiestan síntomas como dolores de pecho, dificultad para respirar y falla cardíaca, hasta la ausencia de síntomas, incluso muchos pacientes permanecen asintomáticos durante largos periodos (García-Castro y col., 2008). Por ende, se recomienda realizar la detección de la patología en pacientes de todos los grupos de edad, incluyendo adultos considerados saludables en evaluaciones clínicas previas (Martin y col., 2009), pero con historia familiar relacionada con MHF.

En algunas personas, como por ejemplo los atletas, que podrían desarrollar una hipertrofia, el diagnóstico se hace difícil por tener que distinguir una hipertrofia por ejercicio, de una hipertrofia por una enfermedad congénita hereditaria (Davies y McKenna., 1994).

10. Importancia de las pruebas genéticas.

Para resolver algunos de los problemas relacionados con el diagnóstico, muchos investigadores han desarrollado técnicas genéticas de detección. Aunque en el futuro puede haber importancia pronóstica y terapéutica de éstas pruebas, en la actualidad el principal papel de ellas es el diagnóstico, ya que puede ser de gran importancia para el enfoque y evaluación de familiares y pacientes (Bos y col., 2009).

Las pruebas genéticas tienen el potencial de proporcionar el diagnóstico de la enfermedad para toda la descendencia, padres, hijos, hermanos y parientes más lejanos

(Bos y col., 2009). Una prueba genética positiva permitiría entonces el control sistemático de los familiares separando positivos y negativos en el diagnóstico. En otras palabras, las pruebas genéticas pueden estratificar el riesgo de la familia por 2 vías muy diferentes: Una por la estrecha vigilancia del genotipo-positivo ó pre-clínica individual, y otra por la observación casual o cese del genotipo-negativo / fenotipo-negativo relativo en su futura progeie (Bos y col, 2009), ayudando así a determinar si los pacientes tienen una posibilidad más alta o más baja de complicaciones, incluyendo la muerte súbita (Rodríguez y col., 2009).

Los genes con una mayor frecuencia de mutación son *MYBPC3* y *MYH7*, con una prevalencia estimada de 25% al 40% para ambos genes (Bos y col., 2009), los portadores de mutaciones en el gen *MYBPC3* presentan formas menos severas y de menos riesgo de muerte súbita cardíaca, en comparación con las mutaciones encontradas en los genes *MYH7* y *TNNT2* (García-Castro y col., 2008), aunque en estudios recientes, se ha registrado un aumento en el número de muerte súbita por mutaciones en el gen *MYBPC3* (Rodríguez y col., 2009).

La MCH es una enfermedad compleja desde el punto de vista clínico porque se manifiesta de manera muy heterogénea entre los portadores. En el caso concreto de los portadores de mutaciones en el gen *MYBPC3*, la expresión fenotípica de la enfermedad muestra un amplio rango de manifestaciones clínicas. De hecho, se puede expresar tanto, como una hipertrofia severa a edades tempranas (Lekanne y col., 2006; García-Pavía y col., 2007; Xin y col., 2007), como una forma suave durante la edad adulta (Bonne y col., 1995; Watkins y col., 1995; Carrier y col., 1997; Rottbauer y col., 1997; Yu y col., 1998; Lekanne y col., 2006).

El fenotipo de los pacientes con MCH y modificación en el gen *MYBPC3*, puede ser consecuencia de una única mutación o de más de una, ya que pueden existir mutaciones adicionales en este gen o en otros relacionados. Además, parece que la diferente expresión fenotípica entre los portadores de una misma mutación se puede deber a genes modificadores y factores ambientales (deporte, embarazo, etc.) (Martín y col., 2009; García-Castro y col., 2009).

En algunas poblaciones se identifican mutaciones con una alta frecuencia. Se trata de mutaciones que no presentan una alta mortalidad antes de la edad reproductora y que, por tanto, se pueden transmitir de generación en generación (Alders y col., 2003). El estudio de haplotipos determina, con frecuencia, que se trata de individuos con un ancestro común.

En el gen *MYBPC3*, con frecuencia, se identifican mutaciones nuevas que aparecen en una única familia. En estos casos, la asignación de la mutación como causa de enfermedad es difícil si la penetrancia es incompleta.

Justificación

La consecuencia más grave de la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF) es la muerte súbita, y se estima que la prevalencia de la enfermedad es de 1:500 manifestándose fenotípicamente con un incremento en el grosor de la pared cardíaca. Histológicamente, la enfermedad se puede identificar por un desarreglo de los miocardiocitos, desorganización del sarcómero, y fibrosis. Algunos de los pacientes pueden presentar dolores de pecho, dificultad para respirar, y falla cardíaca. Sin embargo, no todos los pacientes presentan o exhiben la misma sintomatología ya que esta enfermedad es heterogénea incluyendo personas que aunque presentando mutaciones en las proteínas del sarcómero no poseen manifestaciones clínicas de la enfermedad debido a la reducida penetrancia. En estos casos el diagnóstico se realiza de manera incidental o incluso después de que haya ocurrido la muerte súbita, se hace un estudio entre los familiares del paciente.

La MHF se debe mayormente a mutaciones en las proteínas del sarcómero, más de 900 mutaciones en 20 genes que codifican para las distintas isoformas de las proteínas del sarcómero se han identificado hasta el presente, siendo el gen PCUM3 que codifica para la proteína C de unión a miosina cardíaca uno de los principales donde se ha identificado un elevado número de mutaciones asociadas a la patología, más de 240 mutaciones, alguna de ellas asociadas con fenotipos severos de la enfermedad. La identificación de mutaciones en este gen permite confirmar el diagnóstico clínico e identificar la causa específica de la enfermedad, confirmar el diagnóstico de la causa de una Muerte Súbita, realizar un diagnóstico diferencial en casos dudosos y un diagnóstico preclínico o predictivo en familiares, que permita descartar el seguimiento clínico de los no portadores.

Unas de las características principales de ésta enfermedad es que tiene un alto grado de heterogeneidad inter e intra genética y la predominancia de mutaciones privadas. Contrario

a otras enfermedades genéticas que tienen hot-spots donde se localizan mayormente el número de mutaciones, lo cual facilita el diagnóstico, las mutaciones en MHF se pueden encontrar a lo largo de todos los genes que codifican para las proteínas del sarcómero, inclusive en los intrones.

Aunque el análisis del ADN para buscar las mutaciones responsables de la enfermedad es el método para establecer el diagnóstico, no es considerado aún como el método de rutina clínica, debido a la complejidad y costo de la prueba. En la actualidad está creciendo el interés en la aplicación de éste tipo de prueba, ya que nos permitiría realizar el diagnóstico antes de que el paciente desarrolle la hipertrofia.

En Venezuela son muy pocos los trabajos realizados sobre MHF, la mayoría de ellos se relacionan con el estudio de patrones de alteraciones ecocardiográficas y electrocardiográficas, sin realizar un estudio genético, por ende este Trabajo Especial de Grado constituye un estudio preliminar que nos permita detectar las mutaciones que se encuentran asociadas a la MHF en la población venezolana y poder así contribuir con el personal médico para la elaboración de tratamientos más precisos y así poder estratificar riesgos en aquellos pacientes o personas que aun no desarrollen la enfermedad, finalmente se podría contribuir al establecimiento de una metodología de rutina que nos permita la detección de mutaciones en este gen.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Búsqueda de mutaciones en el gen *MYBPC3* de personas con Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF) en Venezuela.

Objetivos específicos

- Amplificar por PCR los 34 exones del gen *MYBPC3*.
- Normalizar las condiciones de la técnica SSCP para analizar los exones del gen *MYBPC3* con mayor incidencia de mutaciones.
- Analizar por secuenciación directa 15 exones del gen *MYBPC3*, en la búsqueda de mutaciones asociadas a MHF.
- Proponer modelos que expliquen el funcionamiento de la proteína mutada codificada por el gen *MYBPC3* en pacientes con MHF.

MATERIALES Y METODOS

METODOS

1. Selección de pacientes.

La selección de pacientes para la búsqueda de mutaciones en los exones del gen *MYBPC3* fue llevada a cabo por los médicos especialistas asociados al proyecto, tomando en cuenta los criterios clínicos y la presencia de síntomas generales asociados a patologías cardíacas, además se tomaron en cuenta los resultados obtenidos por ecocardiograma y electrocardiograma para observar anomalías en las paredes del ventrículo, así como los antecedentes familiares de muerte súbita, hábitos como el tabaquismo y chimoico, y descarte de la enfermedad de chagas, así como también se les realizó un examen físico que involucra la medición de la presión sanguínea, frecuencia cardíaca y dificultad para respirar. Para la selección de las personas control se tomó en cuenta principalmente voluntarios que no presentaran sintomatología clínica relacionada con enfermedades cardiovasculares así como también personas sin antecedentes familiares de muerte súbita o patologías cardíacas entre familiares directos. A todas las personas participantes del estudio se les brindó la información concerniente al proyecto así mismo el consentimiento informado validado y aprobado por el comité de Bioética del IVIC, el cual debieron firmar para participar (anexos). Este estudio preliminar involucró veinte (20) pacientes y tres (3) controles.

2. Recolección de muestras de sangre de pacientes y controles.

La sangre fue recolectada por el personal médico de ASCARDIO y de la Unidad de Cardiología del Hospital Pérez Carreño. Se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa de cada paciente, y control, colocando la sangre en un tubo de recolección de sangre con EDTA-Na₄ almacenándose a una temperatura de 4 °C hasta su procesamiento.

3. Técnicas moleculares para el análisis genético.

3.1. Aislamiento de ADNg a partir de Sangre Periférica.

Para la extracción del ADNg de pacientes y controles, se emplearon dos métodos:

3.1.1. Aislamiento de ADNg de sangre periférica utilizando el método de Lahiri y Nurnberger (1991):

A partir de un volumen de 5ml de sangre periférica de cada individuo se comenzó el aislamiento del ADN agregando 5ml del buffer TKM1 (Tris-HCL 10 mM pH 7,6; KCL 10mM, MgCl₂ 10mM, EDTA 2mM) y 150 µl de Nonidet P-40 (30 µl por cada 1 ml de sangre). Se centrifugó a 4000g x 10 minutos a temperatura ambiente descartando el sobrenadante y reservando el sedimento que contiene el paquete de glóbulos blancos. Seguidamente se lavó el precipitado 2 veces con 4ml de TKM1 para eliminar la hemoglobina, luego se centrifugó a 4000g x 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando nuevamente el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 800 µl de la solución amortiguadora TKM2 (TKM1+NaCl 0,4 M). El contenido fue transferido a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se añadieron 55 µl de SDS al 10%. Se agitó suavemente y se incubó por 10 minutos a una temperatura de 60°C, transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente para luego agregar 300 µl de NaCl 5,3 mM. Se agitó hasta que precipitaran las proteínas. La muestra fue centrifugada a 14.000 g durante 5 minutos, y se reservó el sobrenadante. Posteriormente se dividió el sobrenadante en dos alícuotas, agregando cada una en un tubo Eppendorf que contenía previamente 1 ml de Etanol absoluto. Se mezcló por inversión suavemente hasta que se observó el ADN formando una malla blanca o transparente. El ADN precipitado se capturó con una pipeta, y se transfirió a un vial Eppendorf que contenía 1 ml de Etanol frío al 70%. El ADN se puede conservar de esta manera a temperatura ambiente ó a -20°C, para utilizar el ADN se descongeló la

muestra y se centrifugó a 14.000 g x 5 minutos, y el etanol se eliminó destapando el tubo para que se evaporaran los restos de alcohol dejando a temperatura ambiente por 10 minutos. Seguidamente se resuspendió en 100 o 200 µl de amortiguador de lectura estéril (Tris/HCL 10mM, pH 8; EDTA-Na₂ 1mM), incubando por 10 min a 65°C para disolver el ADN.

3.1.2. Aislamiento de ADNg con el uso de un kit comercial de purificación (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit).

Se añadió 500 µl de tampón AP1 a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, seguidamente se agregó un volumen de 200-250 µl de sangre anticoagulada y se mezcló por agitación utilizando un vórtex durante 10 segundos. Luego se agregó 100 µl del buffer AP2 agitando durante 10 segundos. La muestra fue centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente para precipitar las células. Se colocó una columna Miniprep en un tubo de microcentrífuga de 2 ml y con una pipeta se tomó el sobrenadante obtenido y se añadió en la columna Miniprep centrifugando a 6.000 g durante 1 minuto. El filtrado fue desechado colocando de nuevo la columna Miniprep en un tubo de microcentrífuga de 2 ml. Se agregó a la columna 700 µl de tampón W1A dejando reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego, se centrifugó a 6.000 g durante 1 minuto, desechando de nuevo el filtrado, la columna se volvió a colocar en el tubo de microcentrífuga de 2 ml y se le añadió 800 µl de Buffer W2 centrifugando a 12.000 g durante 1 minuto. Se descarta el filtrado del tubo de microcentrífuga y se vuelve a colocar la columna en el tubo de microcentrífuga de 2 ml, seguidamente se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto. Se colocó la columna Miniprep en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se añadió entre 80-200 µl de buffer TE, dejando reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego se centrifugó a 12.000 g durante 1 minuto para eluir el ADN genómico.

3.2. Electroforesis en geles de agarosa para la visualización de ADNg.

Para evaluar el ADNg aislado de las muestras de sangre, se realizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. La agarosa se preparó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL en buffer TBE 0,5X. (TBE 10X: 108grs Tris base, 55grs Acido Bórico; 40mL 0,5M EDTA pH8). Se tomó una alícuota de 3µL del ADNg recién obtenido, y se mezcló con 2 µL de tampón de carga (1mM EDTA pH8, 0,25% Azul bromofenol, 0,5 Xileno-cianol, 50% glicerol) para un volumen final de 5 µL. La muestra se dejó correr por 1 hora a 80 V y 500mA. Transcurrido el tiempo el ADNg se observó en el transiluminador de luz ultravioleta, aprovechando la capacidad que tiene el bromuro de etidio de excitarse a una determinada longitud de onda e intercalarse con el ADN. Para medir la concentración de ADNg se utilizó un Nanodrop a una longitud de onda de 260nm. Para evaluar la calidad de la extracción se determinó la relación 260/280 la cual refleja el grado de pureza de la muestra (Estrada-Cuzcano, 2006).

3.2.1. Estimado de pureza del ADNg aislado.

Para estimar la pureza de la muestra se realizaron mediciones de D.O a 260nm y a 280nm, ya que la relación entre las medidas (D.O.₂₆₀:D.O.₂₈₀) proporciona un estimado de la pureza del ADNg aislado. Las medidas obtenidas deben tener un valor D.O.₂₆₀:D.O.₂₈₀ de 1.8 a 2, donde valores por debajo de este rango son un indicativo de contaminación con proteínas (Estrada-Cuzcano, 2006)

3.3. Cuantificación del ADNg.

La concentración del ADNg se determinó de forma cualitativa y de forma cuantitativa, de forma cualitativa se realizó una estimación de la concentración tomando en cuenta la intensidad de fluorescencia emitida por compuestos como el bromuro de etidio intercalado en la matriz del gel de agarosa enlazado con la muestra de ADN. En éste

método se compara la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra del genómico recién aislado versus una muestra con una concentración de ADN conocida.

Otra forma de medir la concentración del ADNg es de forma cuantitativa utilizando espectrofotometría. Si la muestra es pura, sin cantidades significativas de contaminación con proteínas, grasa u otros agentes contaminantes, se pueden tomar lecturas de densidad óptica (DO) a longitudes de onda de 260nm.

La lectura a 260nm nos permitió calcular la concentración del ADNg aislado, ya que una D.O.₂₆₀ de 1.0, corresponde aproximadamente a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ADN doble cadena sencilla y utilizando la siguiente relación se pudo estimar la concentración de ADNg obtenido:

$$[\text{ADNg}] = 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \times \text{D.O.}_{260} \times \text{factor de dilución}$$

3.4. Amplificación por PCR de los exones correspondientes al gen *MYBPC3*.

3.4.1. Diseño de iniciadores.

Las secuencias de los iniciadores utilizados para la amplificación de los fragmentos de interés correspondientes al gen *MYBPC3* fueron tomadas de la base de datos cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>) (ver tabla 3). Para el análisis del gen sólo se incluyeron los exones. Los iniciadores utilizados para la amplificación de los exones no abarca todo el gen, como se puede observar en la figura 13, hay regiones intrónica del gen que no son amplificadas (línea negra) y otras regiones donde hay solapamiento (cuadros verdes) amplificando la región intrónica, es decir, el producto amplificado por PCR el cual llamamos amplímero, contiene el exón de interés amplificando parte de la región intrónica tanto para el sentido 5` como 3` (Figura 13 y 14), esto es importante, ya que en este trabajo especial de grado, el análisis llevado a cabo para la búsqueda de mutaciones en el gen *MYBPC3*, se centra en la región exónica.

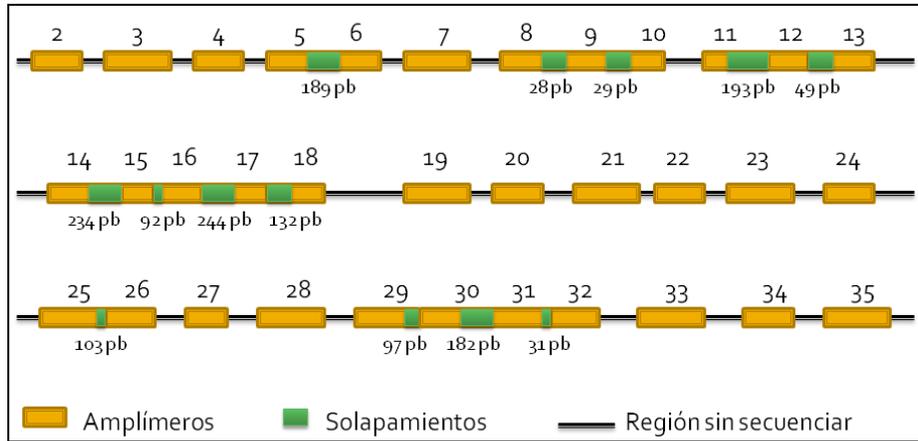


Figura 13. Gen *MYBPC3* con la ubicación de los amplímeros. Se muestra las regiones del gen que son secuenciadas, las regiones donde hay solapamientos y las regiones que no van a ser secuenciadas.

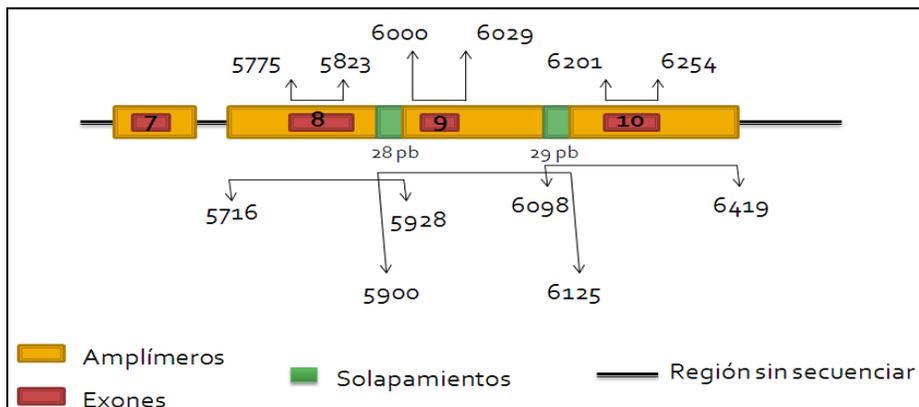


Figura 14. Se muestran 4 de los amplímeros especificando la región a amplificar, donde se encuentra los exones, la región de solapamiento y las regiones del gen sin secuenciar.

Tabla 3: Secuencia de los iniciadores para la amplificación de los exones del gen MYBPC3. Se indica la secuencia de los iniciadores para cada exón, cada uno de ellos conserva el nombre del exón al cual han de amplificar. Tomado de: (http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/genes/MYBPC3_exons.html)

Iniciadores	Secuencia	Iniciadores	Secuencia
2F	gacctcagctctctggaattcatc	19F	acaggcacacgtgtttcac
2R	gctcagaggccacgtcctcgtcaa	19R	cagtctccacctgtcccatc
3F	gtgcacgtccaaccag	20F	agaataccaacaagccaggacaag
3R	cagcaaaggcaagaaagtgtg	20R	gcgggaaagtgagcagaacc
4F	ctgggacggggaggagaatgtg	21F	tgctttgccccgtgctacttg
4R	gctttgagacctgccctggac	21R	gccccagacccccacttttgat
5F	gggcacctgcggtcccagctaact	22F	tctcctggctctcccgtttctct
5R	acgcgggctgagaaggtgatg	22R	gcgcccctctgctgtctcttc
6F	ctaccctggagccccgatgacc	23F	gtctctctgctccctacttcc
6R	tgctcccagattccccacacc	23R	atggccatcagcacacttcac
7F	ctggagctcctggtcttatgtgat	24F	tcggtgccacagagatgatttga
7R	ggagccgtgacaccaagatgataa	24R	ggctgcccctctgtgttcca
8F	gcttctcaaacggccccctctg	25F	cctgtggcggtagttgg
8R	agctccgccccgcaaatcatcc	25R	caccggtagctctctctctctt
9F	gggctgggatgatttg	26F	ccgagggaaaggtggtgtgg
9R	ggagggagaaagggacacta	26R	tctgtaaaatgcggctgagatcc
10F	aatctggctagtgtccctttctcc	27F	ggaagtgccccctatgt
10R	agccctttaaactcttccactg	27R	tcgactgctcaagaag
11F	tcggccaactgactta	28F	tcagaggagtggcagtgaggatg
11R	cccatgggctttactt	28R	ctggggtgcaatggcgggtctt
12F	cggctccccacggacag	29F	gcctggagttgctgtgttag
12R	cccagccaggcaggact	29R	ggctgcccctctttgttc
13F	tccccagccccttca	30F	gcggccggcccttgaggt
13R	gccgactccgctcttt	30R	tggaaaatgtgagctgtgggttg
14F	ggcggcacagaggggattg	31F	gcattcaggcacttaccaggtgacg
14R	accggcaggagcaaaaggatg	31R	cacggtgaggacagtgaagggtagc
15F	atccggctgacctggaact	32F	ggccgcagctaccctcac
15R	cagtgcgccccgtgataatc	32R	ggcccctctccctgttc
16F	aacactcaacggccccctctg	33F	ggcctctcggtaccaagtctctgc
16R	gccccctctccgatacttcacac	33R	caacgtcggggcctgtgagc
17F	cggacgacgcagctaccagt	34F	gcagggccatggtactactcttg
17R	gtcagctccaccccgtcctca	34R	ccgcccgtcttcccactctc
18F	ggaggagggggcgcaagtcaaat	35F	cacagtgcacatggcctctcttct
18R	gtcaaaggccaaggtcacagagg	35R	gcccctacagcctcccattact

Los datos presentados en la tabla 4, muestran la región del gen donde se está realizando la amplificación, observando el tamaño de amplímero y el tamaño del exón en pares de bases, la región del gen donde se encuentra el exón mostrando la posición donde se encuentra en pares de bases. Estos datos fueron proporcionados por la base de datos cardiogenomics.

Tabla 4: Región donde se encuentran los amplímero y los exones en gen MYBPC3.
Tomado de: (http://genepath.med.harvard.edu/seidman/cg3/genes/PCUM_3exons.html).

Amplímero	Amplímero			Exón		
	Desde pb	Hasta pb	Tamaño del amplímero	Desde pb	Hasta pb	Tamaño del exón
2	863	1173	311	1011	1059	49
3	2129	2557	429	2177	2443	267
4	2864	3248	385	3067	3180	114
5	3408	3785	378	3569	3667	99
6	3596	4044	449	3758	3906	149
7	4976	5503	528	5139	5256	118
8	5716	5928	213	5775	5823	49
9	5900	6125	226	6000	6029	30
10	6098	6419	322	6201	6254	54
11	6566	6954	389	6651	6653	3
12	6761	7165	405	7036	7053	18
13	7116	7630	515	7310	7473	164
14	9908	10309	402	10025	10157	133
15	10075	10449	375	10387	10389	3
16	10357	10807	451	10504	10628	125
17	10563	10928	366	10714	10819	106
18	10796	11195	400	10905	11071	167
19	11354	11698	345	11493	11658	166
20	12291	12692	402	12406	12512	107
21	12577	12763	187	12618	12647	30
22	13813	14191	379	13860	13999	140
23	14207	14516	310	14246	14326	81
24	14809	15175	367	14971	15130	160
25	15760	16109	350	15855	15959	105
26	16006	16409	404	16070	16258	189
27	17534	17990	457	17638	17772	135
28	18363	18654	292	18440	18607	168
29	19473	19939	467	19638	19726	89
30	19842	20197	356	19896	20091	196
31	20015	20541	527	20315	20454	140
32	20510	20901	392	20675	20834	160
33	20913	21144	232	20945	21081	137
34	21220	21623	404	21389	21575	187
35	21738	21896	159	21766	21802	37

Una vez evaluada la secuencia de los iniciadores realizando un Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verificando que sólo se amplifica la región de interés (cromosoma 14 gen *MYBPC3*) y que presentan un porcentaje de similitud elevado con los iniciadores seleccionados, se procedió a evaluar las temperaturas de hibridación de cada uno de los exones proporcionadas por la base de datos cardiogenomics con la ayuda de programas como OligoExplorer 1.1 y Oligo Analyser 1.5 (tabla 5), realizando así un esquema de trabajo para la amplificación en conjunto de aquellos exones que poseían una temperatura de hibridación similar y un tamaño aproximado del amplímero en pb.

Tabla 5: Temperatura de hibridación sugerida para cada uno de los exones del gen *MYBPC3*. Tomado de: (http://genepath.med.harvard.edu/~seidman/cg3/genes/MYBPC3_exons.html).

Exónes	Temperatura de hibridación Sugerida (Ta)	Exónes	Temperatura de hibridación Sugerida (Ta)
2	x	19	61
3	65	20	62
4	62	21	62
5	x	22	62
6	62	23	62
7	x	24	62
8	62	25	62
9	63	26	62
10	62	27	62
11	58	28	62
12	67	29	62
13	62	30	62
14	62	31	x
15	65	32	65
16	62	33	65
17	62	34	62
18	62	35	62

3.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Una vez obtenida la información concerniente al diseño de iniciadores, región a amplificar, ubicación del exón, temperatura de hibridación, se realizó la estandarización de la técnica de PCR para cada uno de los exones del gen *MYBPC3*. Para realizar la mezcla de PCR se utilizaron los reactivos descritos en la tabla 6, utilizando el programa descrito en la tabla 7 con la temperatura de hibridación diferente para cada exón dependiendo de su longitud y su contenido en guanina y citosina. Para llevar a cabo la técnica se utilizó un termociclador MJ Research 200ml y 500ml Minicycler.

Tabla 6. Reactivos y concentraciones necesarias para una PCR, con un volumen final de 100µl.

Nombre del compuesto	Volumen (µL)	[CONCENTRACION]
Buffer	10	10X
dNTPs	10	2 mM por cada dNTP
H ₂ O up	41.5	-
Polimerasa (GoTaq)	0.5	5 u/µL
MgCl ₂	8	1.0-4.0 mM
ADNg	10	20-40 ng
Forward	10	2mM
Reverse	10	2mM

Tabla 7: Programa utilizado para realizar la PCR.

Pasos	Condiciones	
1	94°C	10 min
2	94°C	1 min
3	Ta	30 seg
4	72°C	1 min
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72°C	10 min
7	4°C	-

Para comenzar el análisis se tomaron como temperaturas de hibridación las sugeridas por la base de datos (ver tabla 5). Cuando no se observaba un producto de PCR óptimo, o no se sugería una temperatura para un exón determinado, se calculó la temperatura de hibridación para cada uno de los iniciadores utilizando la fórmula:

$$T_a: 2(A+T) + 4(G+C)$$

Se promediaban las dos temperaturas y se seleccionaba un rango de temperatura entre 58-63°C para realizar la PCR.

3.4.3. Electroforesis en geles agarosa 3% para observar la integridad del ADN obtenido por PCR.

Para evaluar el ADN de los productos de PCR obtenidos, se realizó la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 3%. La agarosa se preparó con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL en buffer TBE 0,5X. (TBE 10X: 108grs Tris base, 55grs Acido Bórico; 40mL 0,5M EDTA pH8). Se tomó una alícuota de 3µL del producto de PCR recién obtenido, y se mezcló con 2 µL de tampón de carga (1mM EDTA pH8, 0,25% Azul bromofenol, 0,5 Xileno-cianol, 50% glicerol) para un volumen final de 5 µL. La muestra se dejó correr por 1 hora a 80 V y 500mA. Transcurrido el tiempo el ADNg se observó en un transiluminador, aprovechando la capacidad que tiene el bromuro de etidio de excitarse a una determinada longitud de onda e intercalarse con el ADN. Para medir la concentración de ADNg se utilizó un nanodrop a una longitud de onda de 260 nm. Para evaluar la calidad de la extracción se determinó la relación 260/280 la cual refleja el grado de pureza de la muestra, donde valores menores a 1,8 sugiere una contaminación de proteínas y valores iguales o mayores a 1.8 indican poca contaminación con proteínas (Estrada-Cuzcano, 2006).

Una vez obtenido los productos de PCR con el ADN de los controles, se procedió a secuenciar cada amplímero y realizando un alineamiento de la secuencia obtenida con la de la base de datos NCBI y Cardiogenomics, se comprobaron que los amplímeros obtenidos en efecto eran los del gen *MYBPC3*. Verificados los productos obtenidos se procedió a realizar las técnicas de detección de mutaciones SSCP y secuenciación para todos los pacientes.

3.5. Búsqueda de mutaciones mediante la técnica SSCP por sus siglas en ingles “Single-Strand conformational polymorphims”.

Una vez purificada y amplificada por PCR la región específica del gen *MYBPC3* donde potencialmente se encuentra la mutación, se tomaron 2 μ L del producto de PCR sin purificar (aproximadamente 5 ng/ μ l) y se le agregaron 18 μ L de solución desnaturizante (95% de Formamida desionizada. EDTA 20mM, Azul de Bromo Fenol 0.5%) que compite con la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos aminos y carbonilo propios de las bases nitrogenadas del ADN, facilitando así la ruptura de sus apareamientos y la consiguiente separación de hebras, se mezcló bien y se incubó a 96 °C por 20 minutos (se utilizó el termociclador para controlar la temperatura y el tiempo de la desnaturización), una vez terminado el tiempo se colocaron las muestras rápidamente a 4 °C por 5 minutos para que la hebra de ADN simple cadena no se uniera de nuevo por complementaridad de bases obteniendo la muestra en óptimas condiciones para la corrida en el gel de poliacrilamida.

Se optimizaron las condiciones para realizar la técnica SSCPs de 10 exones (tabla 8), las condiciones y tiempo de corrida se ajustaron de acuerdo al tamaño de los amplímeros y el porcentaje C+G que posee cada secuencia.

Tabla 8. Condiciones de corrida para los 10 exones que se estandarizaron por SSCP.

Exón	Tamaño pb	% del gel	Condiciones de corrida
3	429	6%	100V, 124 mA, 16 horas
7	528	6%	100V, 124 mA, 16 horas
10	322	8%	80V, 124 mA, 14 horas
11	389	8%	80V, 124 mA, 14 horas
17	366	8%	80V, 124 mA, 14 horas
19	345	8%	80V, 124 mA, 14 horas
22	379	8%	80V, 124 mA, 14 horas
24	367	8%	80V, 124 mA, 14 horas
25	351	8%	80V, 124 mA, 14 horas
26	404	6%	100V, 124 mA, 16 horas

Luego, se procedió a cargar las muestras en el gel de poliacrilamida y a realizar la electroforesis del ADN simple cadena a un pH neutral separando el ADN simple cadena por el gel de electroforesis bajo condiciones no desnaturizantes (tabla 9).

Tabla 9. Preparación de los geles de acrilamida.

Reactivo	Geles 8%	Geles 6%
Acrilamida	2 mL	1.5 mL
TBE 5X	1.5 mL	1.5 mL
TEMED	7.5 µL	7.5 µL
Agua destilada	3.9 mL	4.4 mL
Persufato de amonio (PA) 10%	75 µL	75 µL
Volumen final	7.5 mL	7.5 mL

Para la visualización de las muestras en el gel, se utilizó la coloración con nitrato de plata que tiene como ventaja la interacción del reactivo de plata con las bases nitrogenadas de la cadena de ADN permitiéndonos ver a simple vista las bandas obtenidas (ver resultados).

3.5.1. Tinción de plata para mini geles de poliacrilamida.

La tinción se realizó mediante un kit comercial (Bio-Rad Silver stain kit). En una bandeja de plástico, se agregó al gel de poliacrilamida una solución con 40% metanol / 10% ácido acético (v/v) durante 30 min la cual fijaba la muestra de ADN en el gel, una vez culminado los 30 minutos se añadió un volumen de la solución oxidadora diluida (tabla 10) por 5 minutos seguido de un lavado continuo con agua destilada durante 15 minutos eliminando la mayor cantidad de la solución oxidadora del gel sin remover el ADN hasta que se pierde la coloración amarilla. Seguidamente se agregó el Reactivo de Plata diluido como se muestra en la tabla 10 por 20 minutos y se realizó un rápido lavado con agua destilada por 30 segundos aproximadamente. Para revelar las bandas en el gel se agregó un volumen de solución de revelado cubriendo todo el gel, por 30 segundos hasta que apareció un precipitado de color marrón oscuro, realizando lavados continuos con la solución de revelado hasta que se obtuvo la intensidad de las bandas deseadas. Cuando las bandas se visualizan se agrega una solución que detiene la reacción, (ácido acético al 5% (v/v)) durante 15 minutos, sumergiendo el gel totalmente en la solución.

Las soluciones se prepararon el mismo día de la tinción. La solución oxidativa y la del reactivo de plata, se encuentran en una concentración de 480 ml y la reveladora tiene 4-115 g.

Tabla 10. Preparación de la solución oxidativa, reactivo de plata y reveladora.

Solución	Reactivo mL	Mini geles H ₂ O mL	Total en mL
Oxidativa	10	90	100
Reactivo de Plata	10	90	100
Reveladora	Disolver 32g en 1 litro de agua destilada		

3.6. Secuenciación directa de 15 exónes del gen *MYBPC3*.

Luego de haber amplificado por PCR, se procedió a realizar una secuenciación automatizada de los exones 2, 5, 10, 11, 13, 18 al 23, 27, 28, 34 y 35 para identificar la mutación. Para ello se procedió a purificar la muestra mediante un kit de purificación AXYGEN y se enviaron a MacroGen Corea para su secuenciación, el cual brinda servicios de secuenciación y análisis de ácidos nucleicos. Una vez obtenida la secuencia nucleotídica enviada por MacroGen, se comparó con la secuencia que se encuentra en la base de datos NCBI juntamente con los controles previamente secuenciados. Para realizar la secuenciación del exón del paciente de interés, se realizó una reacción de PCR como se describe anteriormente en el apartado 3.5.2.

3.6.1. Purificación de los productos de PCR a secuenciar.

Se realizó la purificación de los fragmentos de PCR mediante un Kit de purificación comercial AXYGEN (AxyPrep-96 PCR Clean-up Kit). La purificación se inició agregando en un eppendorf de 1,5 ml, 300 µl de buffer PCR-A y 100 µl de producto de PCR. Luego en un tubo eppendorf de 2 ml se colocó una columna de purificación PCR y se agregó la mezcla realizada en el tubo eppendorf de 1,5 ml centrifugando durante 1 minuto a 12000 x g a temperatura ambiente, una vez terminada la centrifugación se descartó el filtrado del tubo eppendorf de 2 ml y se colocó la columna de nuevo en el tubo, luego se agregaron 700 µl del buffer W2 en la columna PCR y se centrifugó por 1 minuto a 12000 x g a

temperatura ambiente, descartando el sobrenadante del tubo eppendorf de 2 ml retornando la columna PCR al tubo eppendorf de 2 ml, seguidamente se agregaron 400 μ l del buffer W2 a la columna PCR centrifugando a 12000 x g durante 1 minuto a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se transfirió la columna PCR a un tubo eppendorf de 1,5 ml, y se añadió 30 μ l del eluyente, el cual se calentó previamente a 65 °C, se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 12000 x g por 1 minuto obteniendo el producto purificado. Se corrieron las muestras purificadas en un gel de agarosa de 3% para su visualización, observando la cantidad de ADN que se obtuvo.

3.6.2. Análisis de secuencias.

Usando el programa MacVector 11.1.2 se realizó un alineamiento múltiple de secuencias, se utilizó la secuencia del amplímero proporcionada por NCBI y Cardiogenomics para utilizarla como referencia, seguido por el exón y las secuencias sentido y antisentido de los pacientes enviadas a secuenciar permitiendo observar y comparar las similitudes y diferencias entre las secuencias, analizando los exones sin tomar en cuenta la región intrónica, evaluando en conjunto en una misma ventana de diálogo tanto las secuencias como los electroferogramas. Una de las ventajas de usar el programa MacVector 11.1.2 es que el mismo programa realizaba la reversa complementaria de la secuencia antisentido del amplímero secuenciado.

4. Modelaje Molecular

El modelaje molecular se realizó mediante la utilización de programas de visualización de proteínas en 3 dimensiones (Chimera 1.5.2) y con la ayuda de Meta-servidores como el BioInfoBank MetaServer (http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl), el cual nos permitió la búsqueda de dominios similares a las regiones de interés de la proteína PCUM3 realizando un modelado por homología.

En este modelado por homología, se envía la secuencia de aminoácidos del dominio de interés de la proteína PCUM3 al Meta-servidor, que a su vez la envía a los servidores asociados, los cuales hacen la comparación con secuencias de proteínas “Moldes” cuyas estructuras tridimensional es conocida para luego copilar los resultados proporcionados por cada servidor asignando un puntaje según el grado de homología entre las secuencia molde y la secuencia de prueba.

Una vez obtenida la proteína molde, se procedió a realizar un modelaje del dominio de interés de la proteína C utilizando como molde la proteína que no solo obtuviese un alto puntaje si no que presente una relación estructural con la proteína de prueba obtenida con el servidor BioInfoBank MetaServer, para ello se utilizó un programa online llamado MODELLER el cual te permite generar un modelo homologo en tres dimensiones del dominio de interés (www.MODELLER.com).

Luego se procedió a introducir la mutación en nuestro modelo comparando ambas estructuras la mutada y la no mutada utilizando Chimera para ver los cambios ocurridos en las interacciones de la proteína.

5. Financiamiento.

Este Trabajo Especial de Grado fue financiado por el IVIC (Proyecto 973) y con la ayuda de 2 empresas farmacéuticas las cuales son: Industria Venezolana de Productos Farmacéuticos de Consumo (KONSUMA) y Farmacias Helmerich.

RESULTADOS

Resultados

El objetivo principal de este Trabajo Especial de Grado fue la búsqueda de mutaciones asociadas a la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar en el gen *MYBPC3* que codifica para la proteína C de unión a miosina. La búsqueda de mutaciones se realizó en un total de veinte (20) pacientes, diez hombres (10) y diez mujeres (10), utilizando tres (3) controles, dos hombres y una mujer. Las edades comprendidas de los pacientes y controles era entre 12 y 59 años con una edad promedio total de 39 años. Para realizar el análisis del gen *MYBPC3*, se extrajo ADN genómico (ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células) a partir de muestras de sangre periférica obtenida del grupo de pacientes en estudio (Tabla 11).

Tabla 11. Código y sexo de los pacientes y controles en el estudio.

Código de Pacientes	Sexo	Código de Pacientes	Sexo
AA	M	P	M
BB	M	ELM	F
CC	F	AM	M
DD	F	EST	F
EE	M	PP	M
FF	F	RR	M
GG	F	MaS	F
HH	M	CS	F
II	M	C1	M
LL	M	C2	F
MS	F	C3	M
MMz	F		
M = masculino, F: femenino. Total de M=12 y F=11			

1.1. Aislamiento de ADN genómico.

Para la extracción del ADNg se procedió al procesamiento de sangre periférica, lisando las células liberando todo el contenido celular al medio, extrayendo y separando proteínas, polisacáridos y lípidos asociadas al ADNg para luego realizar su purificación.

Durante el proceso se debió mantener el ADNg libre de DNasas teniendo una manipulación meticulosa para evitar contaminación y degradación de la muestra. Para la purificación del ADNg se emplearon los dos métodos que se presentan a continuación.

1.1. Método de lahiri y Nurnberger.

En la figura 15 se observa el registro fotográfico de una corrida electroforética de un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. Las muestras cargadas en el gel fueron ADNg aislado de sangre periférica de 12 pacientes utilizando el método salino no enzimático propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (carriles 4-15), mientras que en los carriles 1,2 y 3 encontramos el marcador de peso molecular (MPM) de 1kb Ladder que contiene trece fragmentos discretos en un rango de 300pb, siendo una referencia en pares de bases nos permite ubicar el ADNg en el gel de acuerdo a su tamaño. Partiendo de esto, se observó en los carriles del 4 al 15 una banda gruesa por encima de la banda de 10.000 pb del marcador, sugiriendo el gran tamaño de la molécula de ADNg.

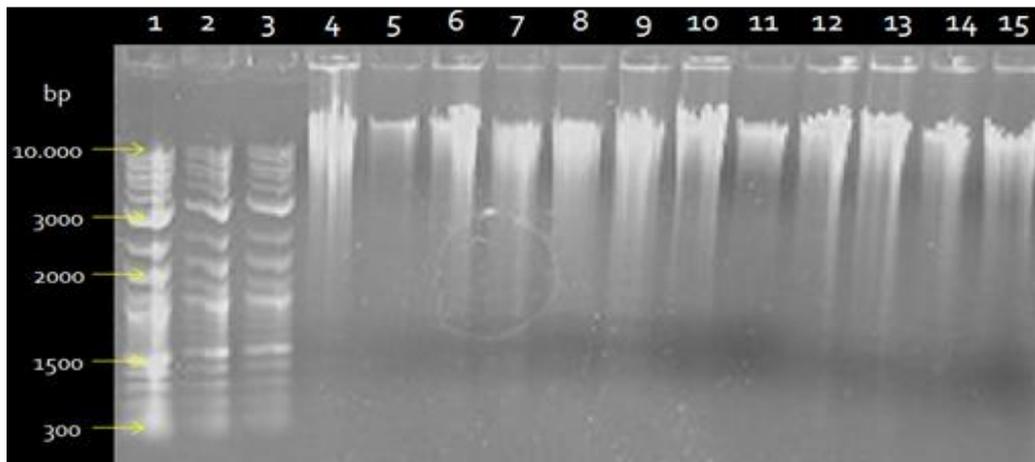


Figura 15: Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. El método utilizado para la extracción fue el propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991. En la figura se observa ADNg extraído de algunos pacientes, carriles 4-14.

Para estimar la cantidad de ADNg de forma cualitativa, se utilizó como referencia el marcador de peso molecular MPM de 1kb ladder sabiendo que la banda de 3000 pb que

posee el MPM posee una concentración de 120 ng/μl, se pudo estimar la concentración del ADNg encontrada en los carriles 4 al 15 al comparar la intensidad de la banda de 3000 pb con la intensidad de la banda pesada que representa el ADNg recién aislado siendo estimada en 400 ng/μl para cada muestra.

Para obtener las concentraciones de ADNg de forma cuantitativa, se utilizó el Nanodrop el cual nos permitió medir la cantidad de ADNg por microlitro mas el grado de pureza de algunas de la muestras (Ver tabla 12). Se obtuvieron valores alrededor de 800 ng/μl para la concentración de ADNg y valores de 1.6 en la relación 260/280nm del grado de pureza. La densidad óptica a 260nm nos permitió calcular la concentración de los ácidos nucleicos ya que una D.O.260=1 equivale a 50ug/mL de ADN. Se utilizó la siguiente fórmula para dicho cálculo:

$$[\text{ADN}] = 50 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1} \times \text{D.O.}_{260\text{nm}} \times \text{factor de dilución}$$

Tabla 12. Concentración del ADNg aislado por el método de Lahiri y Nurnberger medido con Nanodrop y los valores relación de pureza de algunos de los pacientes.

Muestra de ADNg	Concentración en ng/μl	Relación 260/280nm
MS	920	1.66
P	735	1.54
AM	840	1.67
EST	850	1.62

1.1. Método kit comercial.

Se procedió la extracción de ADNg utilizando un Kit comercial marca Axygen. En la figura 16, se muestra el registro fotográfico de una electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. En el primer carril encontramos el marcador de peso molecular (MPM) de 1Kb ladder, en el segundo carril encontramos ADN cuantificado a 100ng/μl de 187pb que corresponde al exón 21 del gen *MYBPC3* cuantificado tanto de

manera cualitativa como por espectrofotometría, en los carriles 3 al 26 encontramos las 23 muestras que se utilizaron para el estudio del gen *MYBPC3*, muestras de 20 pacientes y 3 controles.

Se puede observar en la figura que la cantidad de ADN_g obtenido es de aproximadamente 200 ng/μl esto es tomado de forma cualitativa comparando las intensidades de las bandas con el ADN cuantificado de 100 ng/μl del carril 2 el cual nos da una referencia visual de la concentración de ADN_g que hay en cada carril, también se midió la concentración del ADN_g de algunas de las muestras utilizando un Nanodrop, obteniendo valores comprendidos en un rango de 200-250 ng/μl. Al medir la relación de absorbancia 260/280nm se obtuvo el grado de pureza de las muestras que fue mayor a 1.8 (Ver tabla 13).

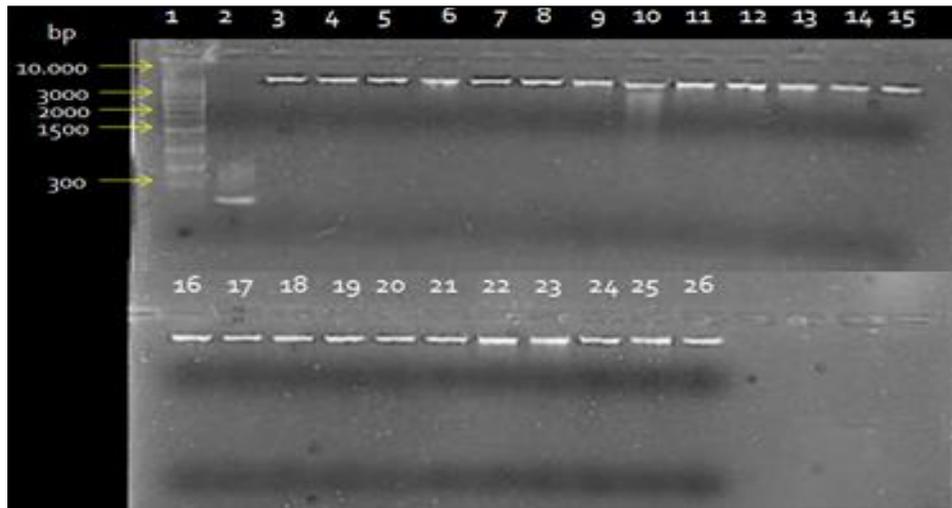


Figura 16: Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de ADN_g aislado por el método del Kit comercial. Se realizó la extracción de ADN mediante un Kit de purificación de Axigen. En la figura se observa ADN_g extraído de los 20 pacientes. Carril 1: MPM 10kb. Carril 2: ADN cuantificado 100ng, Carriles 3-26 ADN_g.

Tabla 13. Concentración del ADNg aislado por el kit medido con el Nanodrop con los valores relación de pureza de algunos de los pacientes.

Muestra de ADNg	Concentración en ng/μl	Relación 260/280nm
AA	280	1.87
BB	248	1.9
CC	185	1.76
DD	215	1.82

2. Amplificación por PCR de los 34 exones del gen *MYBPC3*

2.1. Amplificación de los 34 exones del gen *MYBPC3*.

Una vez realizada la extracción del ADNg, se procedió a la estandarización de la amplificación de los 34 amplímeros para cada uno de los 34 exones del gen *MYBPC3*.

En la figura 17 se observa el registro fotográfico de una corrida electroforética en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL en buffer TBE 0,5X de los productos de PCR de los exones que poseían una temperatura de hibridación de 62 °C. En el carril 1 tenemos el marcador de peso molecular de 100 bp Ladder que contiene trece fragmentos de ADN lineal comprendido entre 100 pb y 3000 pb, el cual nos permitió saber el tamaño aproximado de los amplímeros que contiene los exones que estamos amplificando, en el segundo carril encontramos ADN cuantificado a 100 ng/μl, al saber la concentración que hay en la muestra de ADN podemos estimar la concentración de los productos de PCR amplificados, del carril 3 al 14 se pueden observar 12 exones del gen *MYBPC3* amplificados por PCR donde podemos apreciar los diferentes tamaños que poseen cada uno de ellos, esto nos permite realizar una comparación de tamaños entre ellos, sin embargo en el carril 9 no se observa ninguna banda que correspondería al exón 12 para el cual no se logró la estandarización de amplificación.

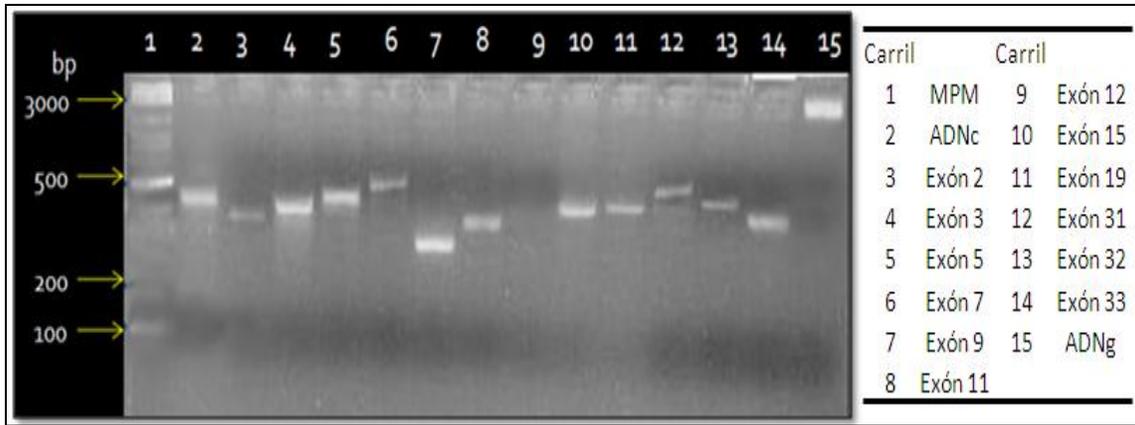


Figura 17: Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Productos de PCR de los exones del gen *MYBPC3*. ADNc: ADN cuantificado a 100ng/μl, ADNg: ADN genómico.

En la figura 18 podemos observar el registro fotográfico de una corrida electroforética en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL en buffer TBE 0,5X de los productos de PCR de los exones que poseían una temperatura de hibridación de 62,7 °C. En el carril 1 tenemos el marcador de peso molecular de 100 bp Ladder el cual nos permitió saber el tamaño aproximado de los exones que estamos amplificando, utilizando la banda de 500pb podemos estimar la concentración de los productos de PCR amplificados de forma cualitativa ya que esta banda posee una concentración de 150ng/10μl, del carril 2 al 23 se pueden observar 22 exones del gen *MYBPC3* amplificados por PCR donde podemos apreciar los diferentes tamaños que poseen cada uno de ellos, esto nos permite realizar una comparación de tamaños entre ellos junto con el marcador de peso molecular, sin embargo en el carril 20 se observan más de una bandas, esto nos da a entender que no hubo una amplificación óptima del exón 30 del gen *MYBPC3*.

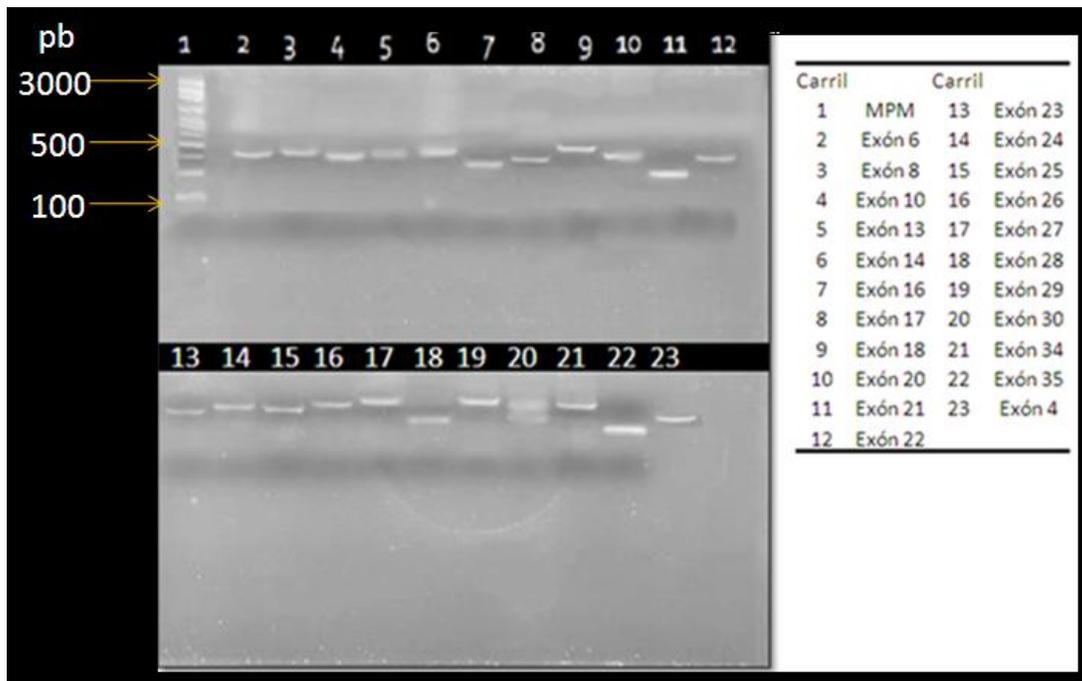


Figura 18: Registro fotográfico de una electroforesis en gel de agarosa al 3%. Productos de PCR de los exones del gen *MYBPC3*.

Para aquellos exones que presentaban dificultades para su amplificación, se utilizó la fórmula para el cálculo de la temperatura de hibridación para cada uno de los iniciadores:

Una vez logrado estandarizar 32 de los 34 exones del gen *MYBPC3*, encontramos en la tabla 14 las nuevas temperaturas de hibridación que fueron aplicadas para cada uno de ellos.

Tabla 14. Temperatura de hibridación aplicada para cada uno de los exones del gen *MYBPC3*.

Exónes	Temperatura de hibridación aplicada	Exónes	Temperatura de hibridación aplicada
2	62,7	19	62,7
3	62,7	20	62
4	62	21	62
5	62,7	22	62
6	62	23	62
7	62,7	24	62
8	62,7	25	62
9	62,7	26	62,7
10	62	27	62
11	62,7	28	62
12	-	29	62
13	62	30	-
14	62,7	31	62,7
15	62,7	32	62,7
16	62,7	33	62,7
17	62	34	62
18	62	35	62
(-) no se logro estandarizar			

3. Análisis de las secuencias de los fragmentos de PCR utilizando Secuenciación Automática.

Terminada la estandarización de los 32 de los 34 exones del gen *MYBPC3* se procedió a la secuenciación de cada uno de los amplímeros obtenidos. Para verificar que los fragmentos de PCR amplificados correspondían a los exones de interés, las muestras fueron enviadas a Macrogen en Corea (<http://dna.macrogen.com/eng/>) y la secuencia obtenida fue comparada con el amplímero y el exón proporcionados por la base de datos cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>) y la base de datos de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el fin de verificar la correcta amplificación del exón en estudio. Se realizó un alineamiento entre el amplímero, el exón y secuencias de los tres

controles (C1, C2, C3) obteniendo una secuencia consenso igual en todas las regiones. Esto se realizó en los 32 exones que se lograron amplificar mediante PCR, lo cual se puede observar como ejemplo las figuras 17 y 18.

En la figura 19 se muestra el alineamiento del exón 18 del gen *MYBPC3* con los tres controles en estudio (C1, C2, C3). En asterisco se resalta el exón que se está estudiando junto con las secuencias de los controles y la secuencia del amplímero proporcionada por la base de datos Cardiogenomics, observando un alineamiento de 100% en esa región, sin cambios en la secuencia. Este alineamiento fue realizado utilizando el programa de MacVector 11.1.2, el cual nos permite realizar un alineamiento múltiple de las secuencias a estudiar.

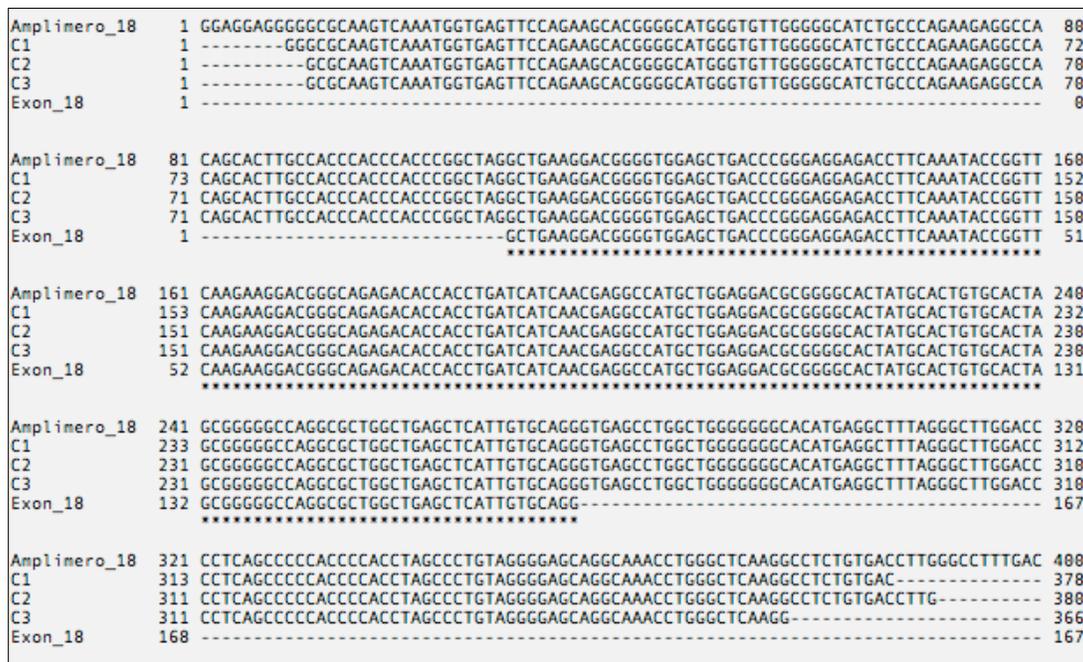


Figura 19. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 18 del gen *MYBPC3* de tres de los controles (C1, C2, C3). CLUSTAL W. MacVector 11.12. En asteriscos se resalta la región exónica.

En la figura 20 se muestra el alineamiento del exón 24 del gen *MYBPC3* con los tres controles en estudio (C1, C2, C3). Resaltando en asterisco el exón que se está estudiando junto con las secuencias de los controles y la secuencia del amplímero proporcionada por la

base de datos Cardiogenomics, observando un alineamiento de 100% en esa región, sin cambios en la secuencia. Los números que se encuentran al comienzo y al final de las secuencias nos indican el tamaño del amplímero, los controles y el exón en pares de bases.



Figura 20. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 24 del gen *MYBPC3* de tres de los controles (C1, C2, C3). CLUSTAL W. MacVector 11.12. En asteriscos se resalta la región exónica.

4. Análisis del gen *MYBPC3* mediante la técnica SSCP de los exones con mayor incidencia de mutaciones.

Luego de haber verificado por secuenciación que los amplímeros amplificados por PCR eran los correctos, se procedió a la normalización de la técnica SSCP para 10 exones del gen *MYBPC3* con mayor índice de mutaciones encontradas, entre los cuales tenemos: exón 3, exón 7, exón 10, exón 11, exón 17, exón 19, exón 22, exón 24, exón 25 y el exón 26.

La técnica es simple, versátil y económica, pero exige la optimización de parámetros para cada fragmento a evaluar, dependiendo del tamaño del amplímero cambian las condiciones de corrida, concentraciones del gel, tiempo de corrida y voltaje. En las figuras

21 al 30 se encuentra el registro fotográfico de los 10 exones que fueron normalizados mediante la técnica, donde podemos observar en cada uno de los geles un patrón de bandas diferentes.

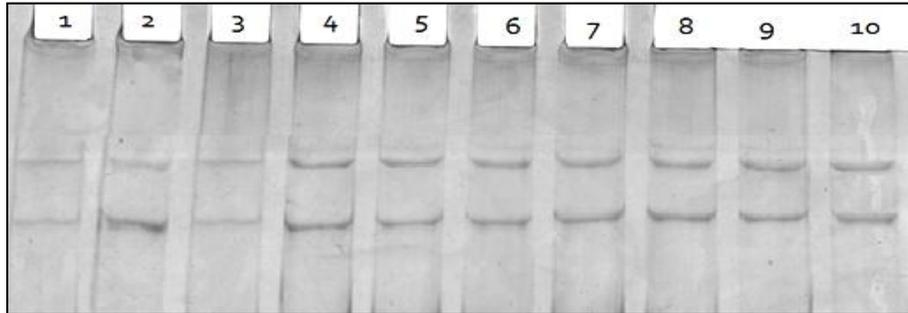


Figura 21. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 3 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

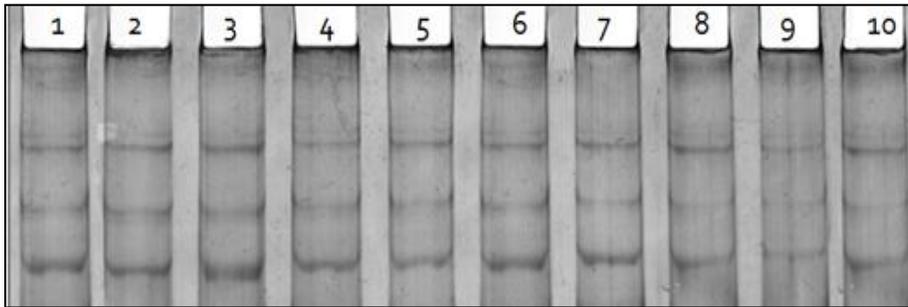


Figura 22. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 7 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

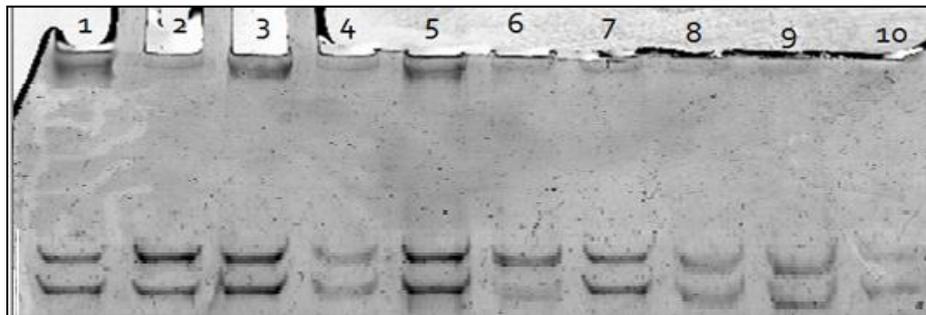


Figura 23. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 10 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

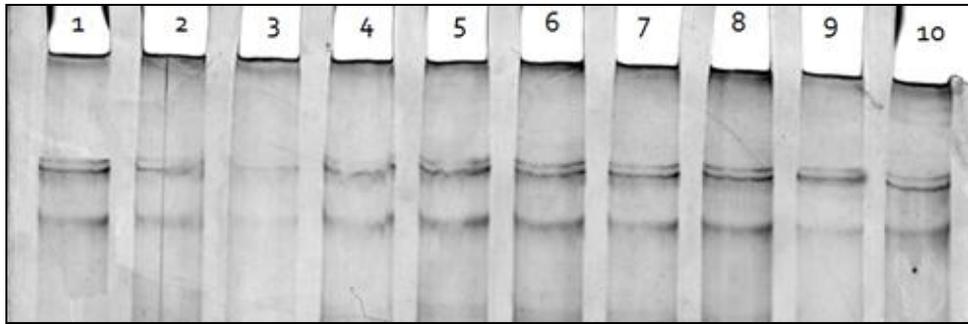


Figura 24. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 11 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

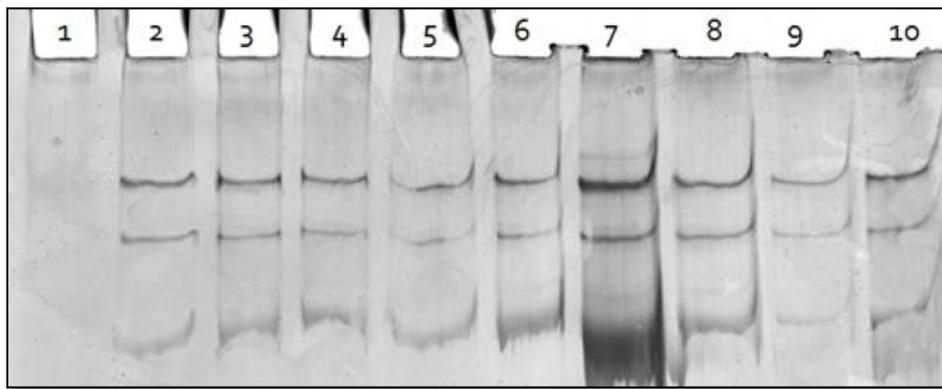


Figura 25. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 17 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

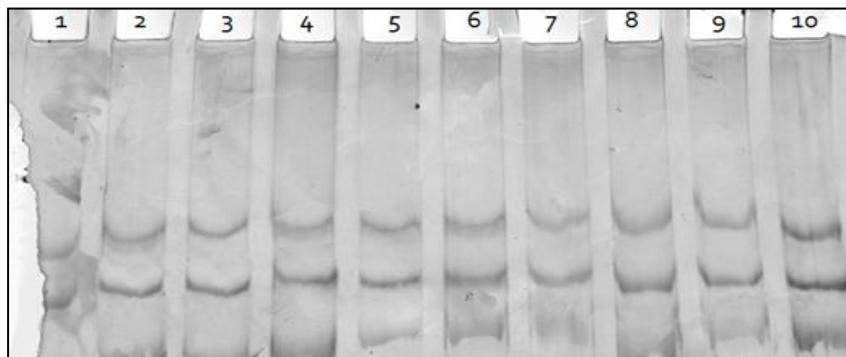


Figura 26. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 19 del gen *MYBPC3* para 10 de los pacientes.

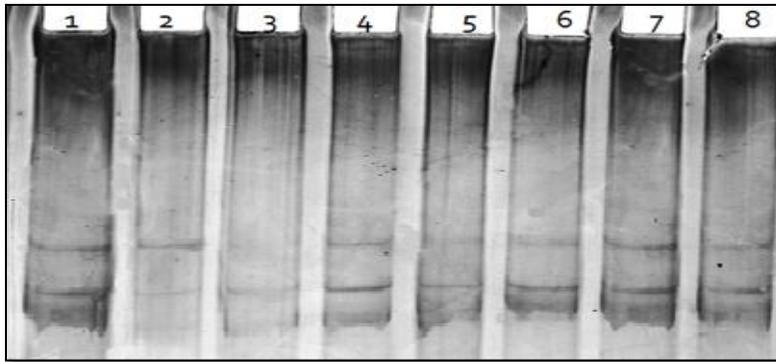


Figura 27. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 22 del gen *MYBPC3* para 8 de los pacientes.

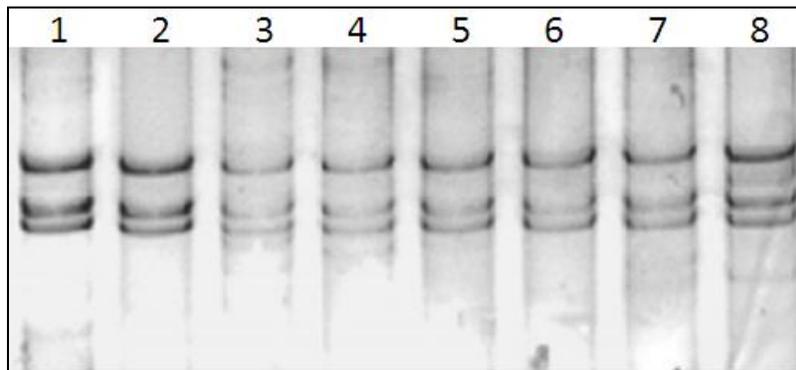


Figura 28. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 24 del gen *MYBPC3* para 8 de los pacientes.

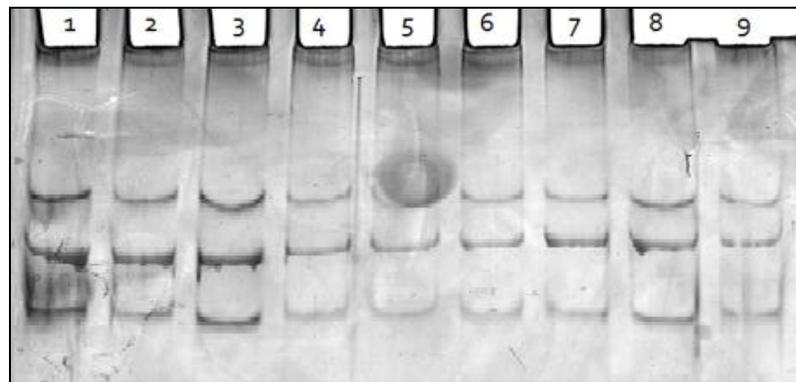


Figura 29. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 25 del gen *MYBPC3* para 9 de los pacientes.

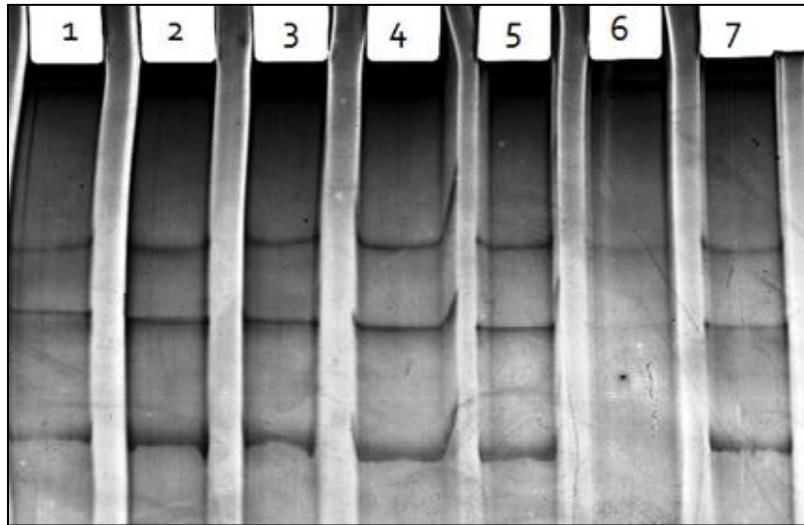


Figura 30. Registro fotográfico de una electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Exón 26 del gen *MYBPC3* para 7 de los pacientes.

5. Secuenciación.

Los esfuerzos iniciales para secuenciar ácidos nucleicos dieron pocos resultados. Hasta los años 70 era difícil y costoso secuenciar fragmentos de solo 5 o 10 nucleotidos. Fueron los métodos químicos de Maxam y Gilbert (1977) y enzimático de Sanger (1980) los que abrieron camino a una secuenciación con un mayor rango de alcance abriendo camino a dicho objetivo. En la actualidad, el desarrollo de la secuenciación del ADN ha acelerado significativamente la investigación y los descubrimientos en biología. Las técnicas actuales permiten realizar esta secuenciación a gran velocidad, lo cual ha sido de gran importancia para proyectos de secuenciación a gran escala, obteniendo el máximo nivel de precisión de la secuencias del ADN. En este Trabajo Especial de Grado, se enviaron a secuenciar un total de 15 exones para los 20 pacientes involucrados en el estudio (Tabla 15). Se escogieron aquellos exones que según la base de datos poseían el mayor número de mutaciones importantes y se realizó la secuenciación automatizada para cada una de las muestras.

En la tabla 15 se muestran los exones 10, 11, 19 y 22 los cuales fueron analizados por ambas técnicas (SSCP y secuenciación), en el análisis realizado por SSCP no se encontró un patrón de corrida diferente en ninguna de las bandas obtenidas de las muestras cargadas en el gel de poliacrilamida y al realizar la secuenciación automatizada de estas muestras no se encontró ningún cambio que alterara la secuencia nucleotídica verificando así la sensibilidad de la técnica SSCP. Algunos de los exones del gen *MYBPC3* (16, 17, 24, 25 y 26) no fueron analizados en su totalidad con una sola técnica, algunas de las muestras fueron analizadas por SSCP y otros por secuenciación como se puede observar en la tabla 15, donde se pudo normalizar un total de 10 exones para la técnica del SSCP y con la ayuda de la secuenciación se realizó la búsqueda de mutaciones en los otros exones correspondientes al gen de *MYBPC3*.

6. Análisis realizado del gen *MYBPC3* por secuenciación.

Se obtuvieron los siguientes resultados en el análisis realizado por secuenciación directa de los exones antes mencionados en la tabla 15.

6.1. Mutación heterocigota en el exón 5.

Se encontró una mutación en condición heterocigota en el exón 5 del paciente DD donde se realizó un alineamiento de la secuencia del paciente con el amplímero y el exón del gen *MYBPC3* proporcionado por la base de datos cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>), estas secuencias también fueron comprobadas con la base de datos de NCBI. Para el análisis de la secuencia del exón 5 del paciente DD se utilizó tanto la secuencia sentido (DD5-F) como la secuencia anti-sentido (DD5-R) proporcionadas por MacroGen (<http://dna.macrogen.com>) (Figura 31A).

En el alineamiento de la figura 31A se observa una alteración en la secuencia nucleotídica (asterisco rojo), ya que el secuenciador no puede asignar un nucleótido debido al solapamiento de curvas en esa región del electroferograma debido al cambio de una Citosina por una timina en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 31B), encontrando una N para la secuencia de la reacción sentido y una Y para la secuencia de la reacción anti-sentido, el resto de la secuencia se encuentra igual a la proporcionada por las bases de datos cardiogenomics y NCBI.

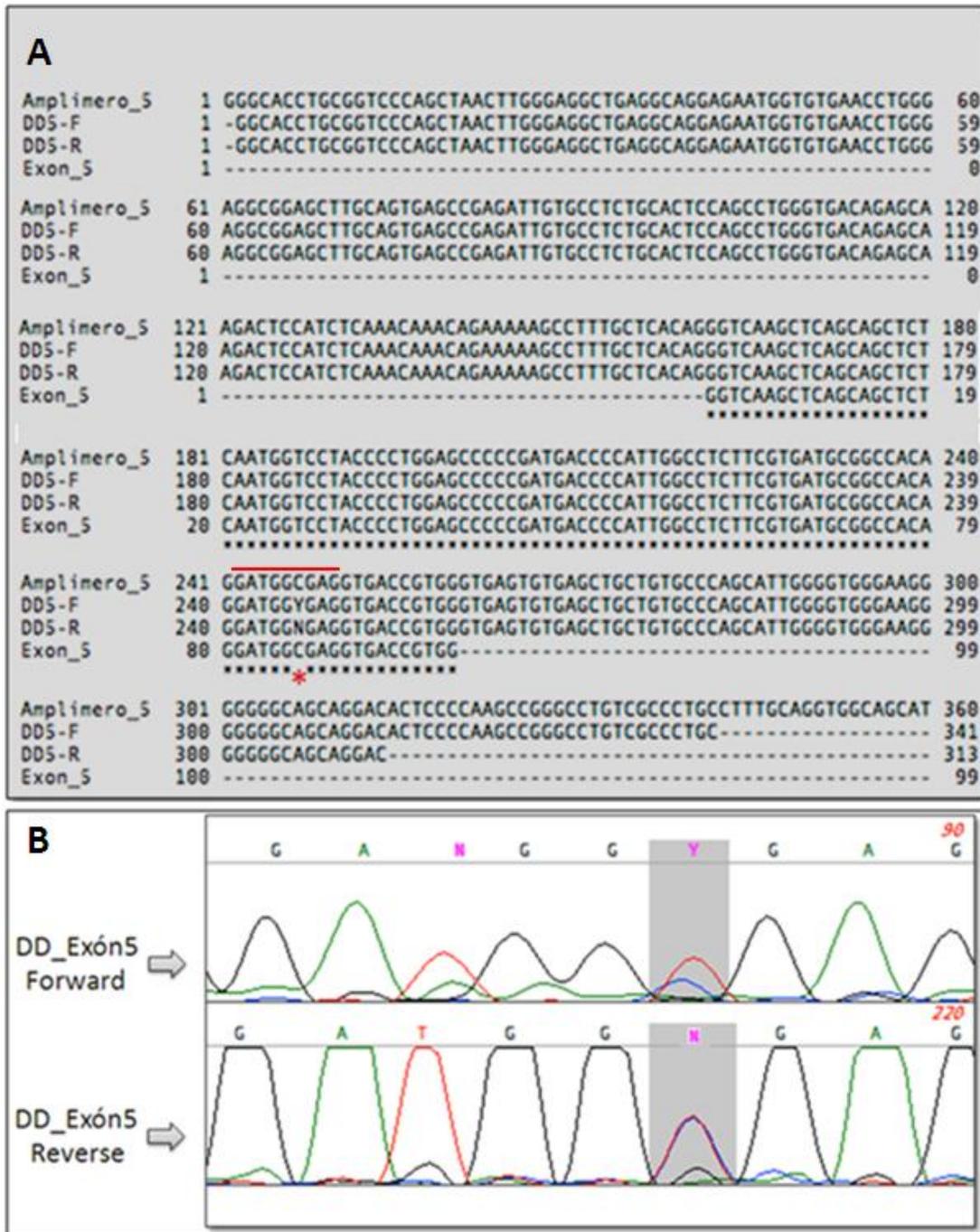


Figura 31. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 5 del gen *MYBPC3* del paciente DD, realizando un alineamiento utilizando el programa MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma B) Electroferograma de la mutación encontrada en el exón 5 del paciente DD. Se puede observar una timina solapada con una citosina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).

Esta mutación heterocigota no produjo ningún cambio en la proteína ya que ambos codones GGC que cambia a GGT codifican para el mismo aminoácido (Glicina), esto lo podemos observar en el alineamiento de la secuencia proteica de PCUM3 con la secuencia traducida del exón 5 (Figura 32).



Figura 32. Alineamiento de la secuencia proteica del exón 5 del paciente DD. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el cuadro rojo se observa la mutación sin efecto.

6.2. Mutación heterocigota en el exón 26

Se encontró una mutación heterocigota en el exón 26 del paciente EST donde se realizó un alineamiento de la secuencia del paciente con el amplímero y el exón del gen *MYBPC3* proporcionado por la base de datos de cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>). Para el análisis de la secuencia del exón 26 del paciente EST se utilizó tanto la secuencia sentido (Forward) como la secuencia anti-sentido (Reverse) proporcionadas por MacroGen (Figura 33A).

En el alineamiento de la figura 33A se observa una alteración en la secuencia nucleotídica del paciente (asterisco rojo), encontrando dos (Y) tanto en la secuencia sentido como la sentido resecuenciada que nos indica una variación en la secuencia que el lector del secuenciador no puede reconocer. Al visualizar el electroferograma se observan dos curvas totalmente solapadas en la misma posición evitando que el secuenciador pudiera identificar o seleccionar el nucleótido colocando una Y en esa posición, esta señal

corresponde a una citosina que cambia por una timina en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 33B).

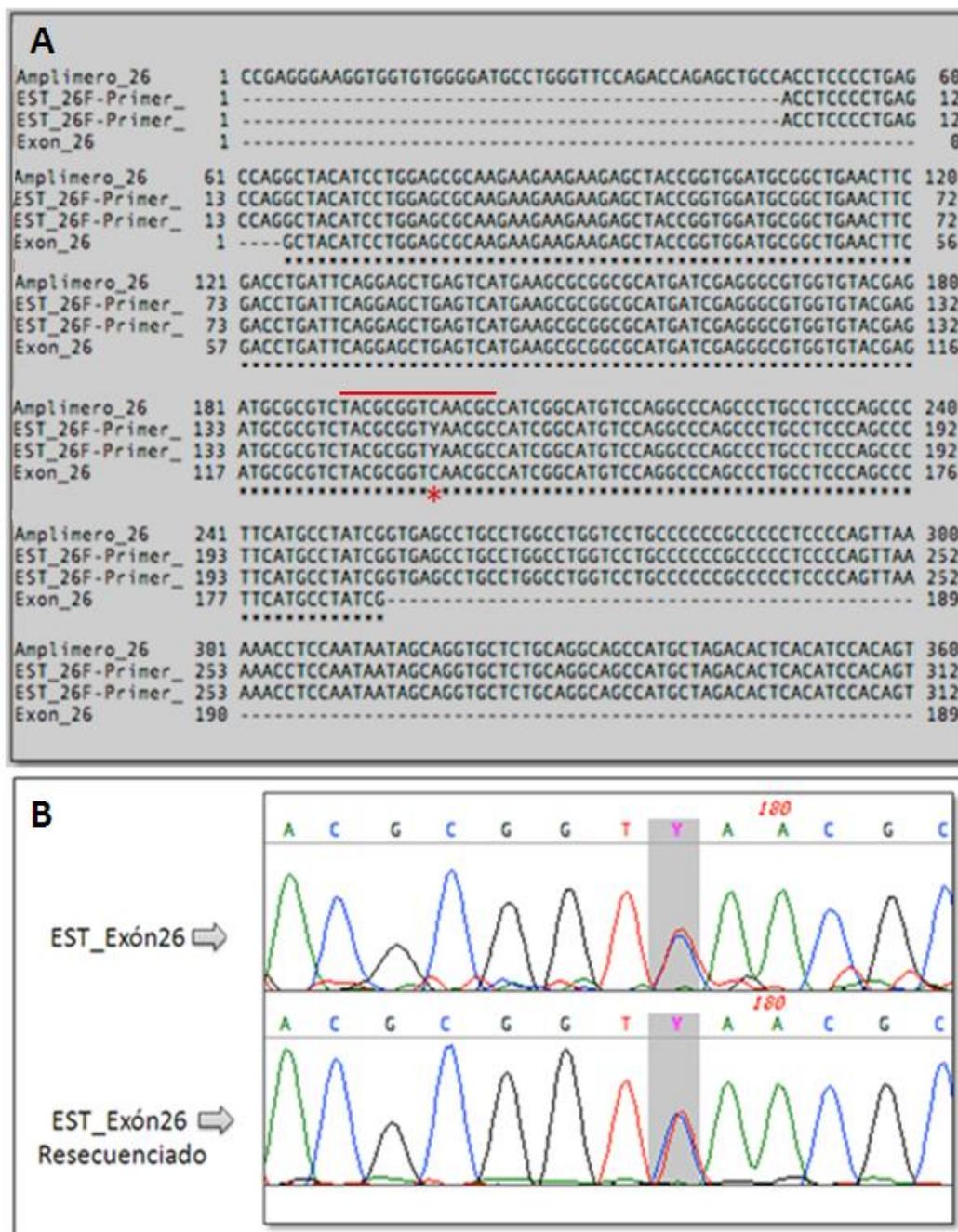


Figura 33. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 26 del gen *MYBPC3* del paciente EST, realizando un alineamiento utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma B) Electroferograma de la mutación encontrada en el exón 26 del paciente EST. Se puede observar una timina solapada con una citosina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).

Esta mutación heterocigota no produce ningún cambio en la proteína ya que ambos codones GTC que cambia a GTT codifican para el mismo aminoácido (Valina), esto lo podemos observar en el alineamiento de la secuencia proteica de PCUM3 con la secuencia traducida del exón 26 (Figura 34).

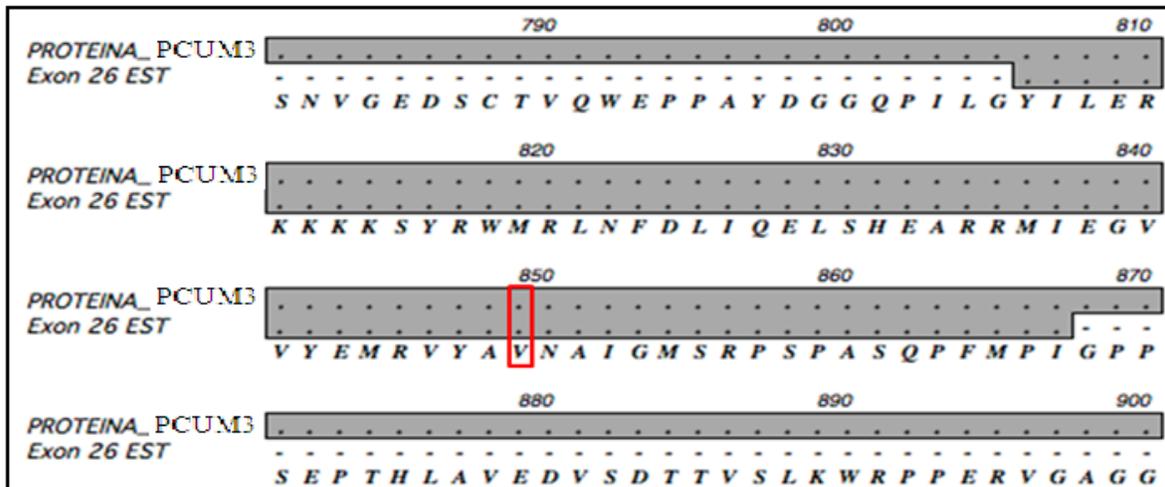


Figura 34. Alineamiento de la secuencia proteica del exón 26 del paciente EST. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el cuadro rojo se observa la mutación sin efecto.

6.3. Mutación heterocigota en el exón 34 del paciente CS.

Finalmente se encontró una mutación heterocigota en el exón 34 del paciente CS donde igualmente se realizó un alineamiento con el amplímero y el exón 34 del gen *MYBPC3* proporcionado por la base de datos de cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>) junto con la secuencia obtenida por la secuenciación automatizada del exón 34 del paciente CS realizada por Macrogen, secuencia sentido y secuencia anti-sentido (Figura 35A).

En el alineamiento de la figura 35A se observa el cambio que hubo en la secuencia nucleotídica, encontrando que en ambas secuencias (tanto en la sentido como en la anti-sentido) se encuentra una sustitución de una timina por una guanina, pero al visualizar el Electroferograma se observa con más detalle dos curvas solapadas en la misma posición para la secuencia anti-sentido y una señal un poco más débil para la secuencia sentido del

exón 34 del paciente CS, indicando así que es una sustitución heterocigota donde cambia una timina por una guanina en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 35B).

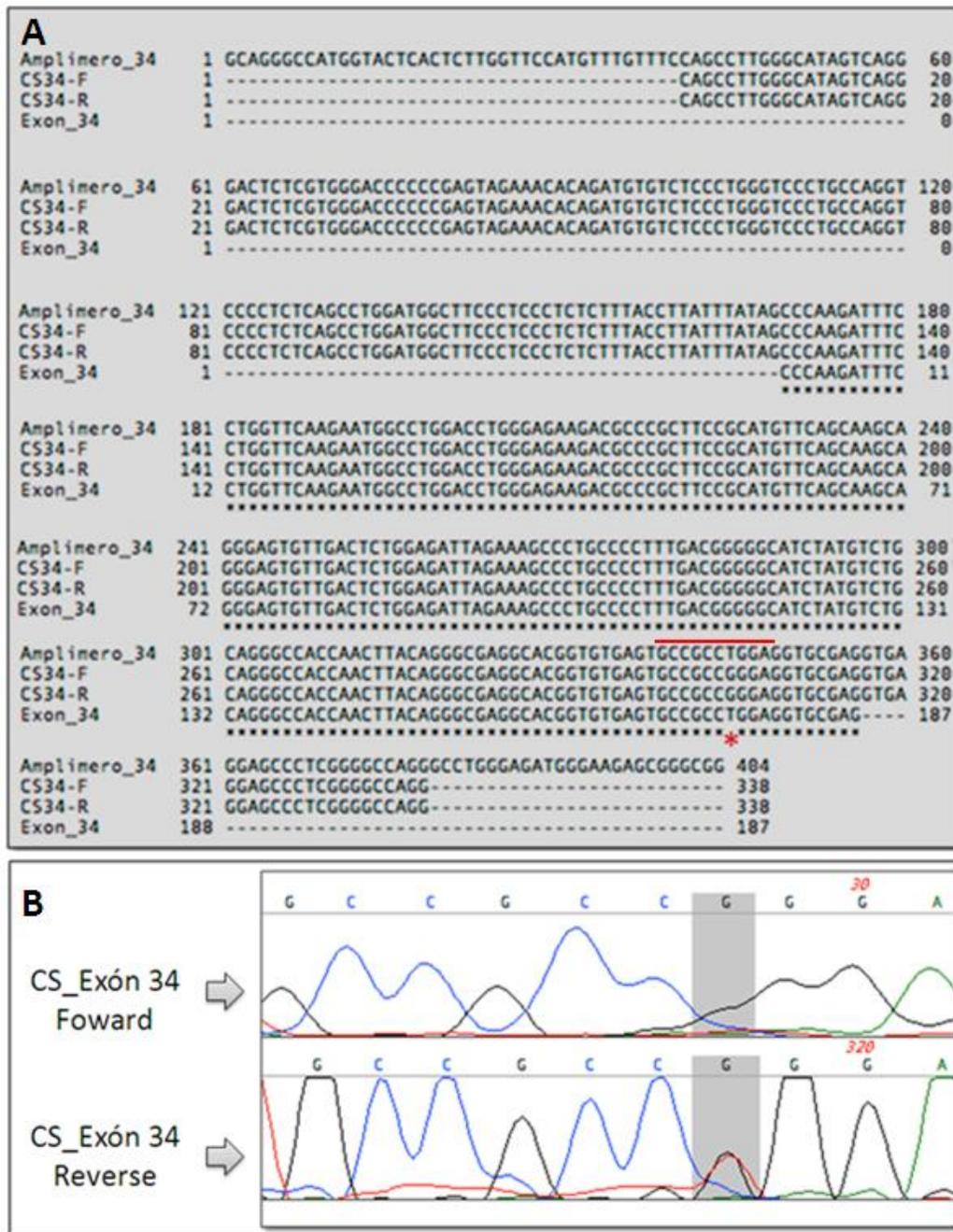


Figura 35. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 34 del gen *MYBPC3* del paciente CS, realizando un alineamiento utilizando MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma. B) Electroferograma de la mutación encontrada en el exón 34 del paciente CS. Se puede observar una timina solapada con una guanina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).

Esta mutación heterocigota produce un cambio de aminoácidos en la secuencia proteica, ya que el codón CTG que codifica para una Leucina (Leu) cambia a CGG que codifica para una Arginina (Arg), esto lo podemos observar en el alineamiento de la secuencia proteica de PCUM3 con la secuencia traducida del exón 34 en la figura 36.

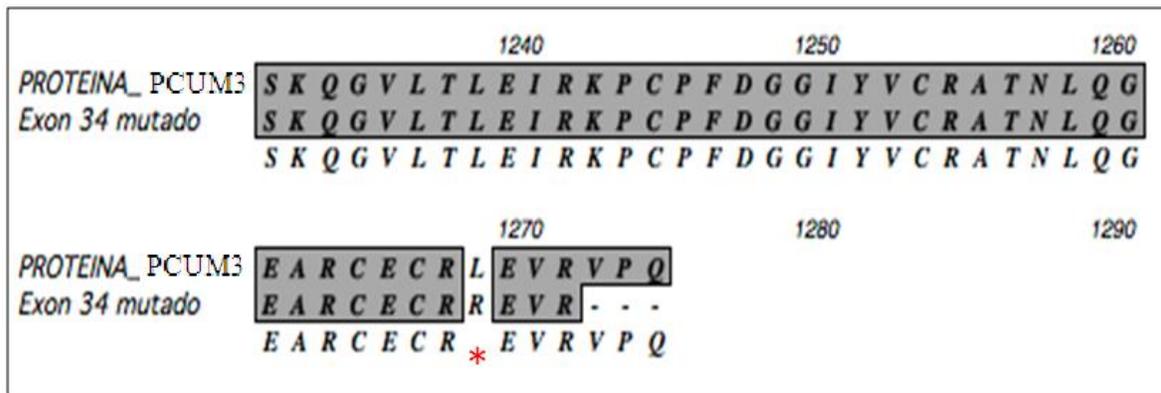


Figura 36. Alineamiento de la secuencia proteica del exón 34 del paciente CS. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el asterisco rojo se observa la mutación encontrada, donde el aminoácido Leu cambia a Arg.

Se realizó el estudio en uno de los parientes del paciente CS y se encontró la misma sustitución heterocigota en el exón 34 donde igualmente se realizó un alineamiento con el amplímero y el exón 34 del gen *MYBPC3* proporcionado por la base de datos cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>) y la secuencia sentido y la antisentido obtenida por la secuenciación automatizada del exón 34 del Pariente, proporcionada por la secuenciación automatizada en MacroGen (<http://dna.macrogen.com>) (Figura 37A).

En el pariente igualmente se observó un cambio en la secuencia nucleotídica, encontrando que en ambas secuencias (tanto en la sentido como en la antisentido) se encontraba una sustitución de una timina por una guanina. Al visualizar el electroferograma se observa con más detalle las dos curvas solapadas en la misma posición para la secuencia antisentido y una señal un poco más débil para la secuencia sentido indicando así que es

una mutación heterocigota ya que cambia a una timina por una guanina en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 37B).

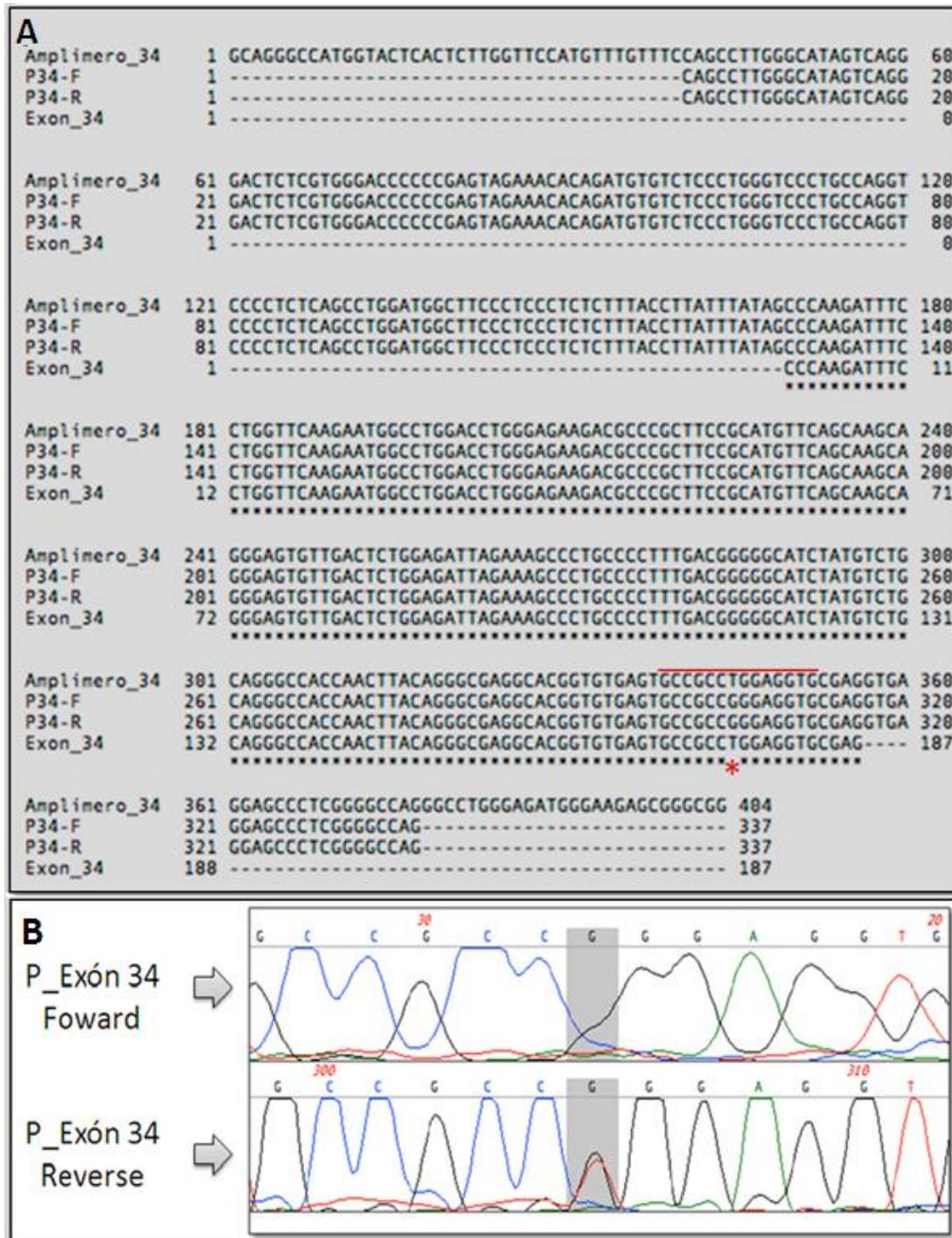


Figura 37. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas para el exón 34 del gen *MYBPC3* del paciente P, realizando un alineamiento utilizando MacVector 11.12. A) En asteriscos negros se resalta la región exónica y el asterisco rojo se observa el cambio nucleotídico encontrado, la línea roja indica la región mostrada en el electroferograma. B) Electroferograma de la sustitución encontrada en el exón 34 del paciente P. Se puede observar una timina solapada con una guanina en la misma posición (Región sombreada en gris en la figura).

Esta mutación heterocigota al igual que el paciente CS produce un cambio de aminoácidos en la secuencia proteica, ya que el codón CTG que codifica para una Leucina (Leu) cambia a CGG que codifica para una Arginina (Arg), esto lo podemos observar en el alineamiento de la secuencia proteica de PCUM3 con la secuencia traducida del exón 34 en la figura 38.

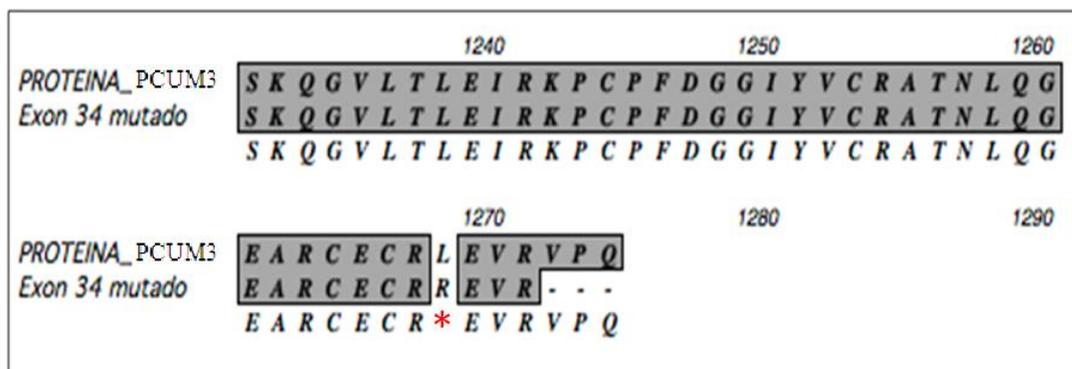


Figura 38. Alineamiento de la secuencia proteica del exón 34 del paciente P. Se realizó utilizando CLUSTAL W. MacVector 11.12. En el asterisco rojo se observa la mutación encontrada, donde el aminoácido Leu cambia a Arg.

En total se encontraron 2 mutaciones en 2 de los exones del gen *MYBPC3* que no producían ningún cambio en el aminoácido y una mutación en uno de los pacientes que produjo un cambio en el aminoácido L1268R (Tabla 16).

Tabla 16. Mutaciones encontradas en este Trabajo especial de Grado.

Paciente	Exón	Cambio nucleotídico	Posición en nucleótidos	Cambio de aminoácido	Posición en la proteína
DD	5	C>T	3654	G>G	164
EST	26	C>T	16203	V>V	849
CS	34	T>G	21564	L>R	1268
P	34	T>G	21564	L>R	1268

7. Modelaje molecular de la mutación encontrada.

Se realizó un modelo del dominio donde se encontró la mutación (dominio C10 de inmunoglobulina Ig), al no encontrarse la proteína PCUM3 cristalizada ni el dominio C10, se procedió a realizar un modelo homologo con un dominio similar al C10 (Figura 40). Se utilizó BioInfoBank MetaServer (http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl), que permitió la búsqueda y comparación de varios dominios de diferentes proteínas que fueran más similares al dominio C10, tomando en cuenta el tamaño del aminoácido, la carga y la posición en la que se encuentra dentro del dominio en donde se encontró la mutación. Se tomó la proteína de mayor similitud tomando en cuenta los valores de Jscore y Rscore que nos indicaran la proteína mas similar al dominio C10 (Ver figura 39), la proteína con gran similitud y con más relación al dominio C10 de la proteína PCUM3 fue una proteína asociada al músculo de la superfamilia de las inmunoglobulinas, identificada en el Protein Data Base con el código PDB-1WIT, el cual posee un Jscore de 49,33 y un Rscore de $4e^{-18}$ y es. Con la ayuda del programa Modeller se procedió a realizar un modelaje de la secuencia del dominio C10 utilizando como molde la proteína 1witA, construyendo así un modelo homologo en tres dimensiones del dominio C10 de la proteína PCUM3 (Ver figura 40).

POB Hit	Jscore	Rescore	psipred
2wp30 Transferase Structural Protein ; Crystal Structure Of The Titin M10-Obsecuri	50.67	102.49	AMLCVAFGSPFKISWFFHMGDLGCDADAFPMFSKQVLIILEIKPFCDFGCIYVCPATNLOGCEARCE
2cqvA Contractile Protein ; Solution Structure Of The Eighth Ig-Like Domain Of Hu	50.67	4e-16	VELFGKVTGTPITCTWKKFKQIQESHHKVENSENSKGLITLAAQEHGCGYLLVKNKLSFGQAQVNLIVVYD
2cqvA Contractile Protein ; Solution Structure Of The Eighth Ig-Like Domain Of Hu	50.67	104.52	VELFGKVTGTPITCTWKKFKQIQESHHKVENSENSKGLITLAAQEHGCGYLLVKNKLSFGQAQVNLIVVYD
1wwbX Transferase ; Ligand Binding Domain Of Human Trkb Receptor	50.33	100.52	WCIPFFVKCHPRPALQWYFNGCALHESKYICTKHVYHGCCLQDNPTRHNGDYLILAKNEYGCDKQISAFHFC
1wwX Transferase ; Ngr Binding Domain Of Human Trka Receptor	50.33	-44.8	WCIPFFVKCHPRPALQWYFNGCALHESKYICTKHVYHGCCLQDNPTRHNGDYLILAKNEYGCDKQISAFHFC
1wwb_X Transferase ; Ligand Binding Domain Of Human Trkb Receptor	50.33	-47.3	AELKCVLGEPPPPVVVWKEGQQLAASEPESFPADCAERHGLLTAALPTDAGYVVCRAHAAAGEYAAAANVTLE
2wp3_0	50.00	100.59	HCLIEFVVRCHPPPILHMLHNCQPLDESKLHVETYSKGLLKNKPTHTNNGHTYLLANPFCITANQINGHF
1wwA Transferase ; N3 Binding Domain Of Human TrkC Receptor	50.00	2e-15	LNLTCWVGCDDPPPEVSVLKHKEKALQTDHCKNKEAGRTAYFTINGVSTADSKYGLVWKNYKGS
2r15A Contractile Protein ; Crystal Structure Of The Myomesin Domains 12 And 13	50.00	100.21	WCIPFFVDCQAPAPSLMFLWFGVSLHETSFIPTFELEPHCCLELNQPTHTNNGHTYLLANPFC
2lfgA Transferase ; Structure Of The Extracellular Segment Of Human Trka In Compl	50.00	-46	AELKCVLGEPPPPVVVWKEGQQLAASEPESFPADCAERHGLLTAALPTDAGYVVCRAHAAAGEYAAAANVTLE
3knb_B	49.67	100.29	CPMDFRYSGLPAPDVSYSWYLCRTVQSDQLRHWSEKGLHSLIEVVFASDAGAYACVAKNPA
2kdqA Structural Protein ; Solution Structure Of The 1st Ig Domain Of Myotilin	49.67	-45.1	HCLIEFVVRCHPPPILHMLHNCQPLDESKLHVETYSKGLLKNKPTHTNNGHTYLLANPFCITANQINGHF
1ww_A Transferase ; N3 Binding Domain Of Human TrkC Receptor	49.67	101.14	LNLTCWVGCDDPPPEVSVLKHKEKALQTDHCKNKEAGRTAYFTINGVSTADSKYGLVWKNYKGS
2r15A Contractile Protein ; Crystal Structure Of The Myomesin Domains 12 And 13	49.33	2e-16	ARFSDCDCEPPPTVTVLRSQQLVSTASRQVTTIKTKSTFEISSVQASDSEKNTSVVWVNSEGRQ
1ncA Muscle Protein ; Titin Module M5, N-Terminally Extended, Nmr	49.33	7e-18	ARFSDCKECPDPEVWVWFHDDNPVKESSHFDYDVEGNCSTIIEVCGDDAKYTKCAVAKNPA
1fhpA Contractile Protein ; High Resolution Refinement Of Telokin	49.33	-44.8	CPMDFRYSGLPAPDVSYSWYLCRTVQSDQLRHWSEKGLHSLIEVVFASDAGAYACVAKNPA
2kdq_A	49.33	-44.8	HCLIEFVVRCHPPPILHMLHNCQPLDESKLHVETYSKGLLKNKPTHTNNGHTYLLANPFCITANQINGHF
1wwbX Transferase ; Ligand Binding Domain Of Human Trka Receptor	49.00	3e-15	WCIPFFVKCHPRPALQWYFNGCALHESKYICTKHVYHGCCLQDNPTRHNGDYLILAKNEYGCDKQISAFHFC
2bk8A Ig Domain ; M1 Domain From Titin	49.00	5e-16	VRTVCKLIENTDQSQTWTFVQVQLENSRENYEITVEYDCAVLLYVEDIKLDDCYTRGCRVVDY

Figura 39 Comparación de dominios de diferentes proteínas similares al dominio C10 de la proteína MYBPC3. Se toma en cuenta el tamaño del aminoácido, la carga y la posición en la que se encuentra el aminoácido dentro del dominio en donde se encontró la mutación.

En la figura 40 encontramos un modelo homólogo en tres dimensiones del dominio C10 de la proteína PCUM3, el cual se encuentra muy cerca del sitio donde se une la primera moléculas de MML, este modelo es visualizado con el programa UCSF Chimera. Se precedió a realizar en cambio en la secuencia proteica de la mutación encontrada en el exón 34 del paciente en estudio correspondiente a L1268R para evaluar los cambios estructurales ocasionados en la proteína y como podrían afectar el sarcómero.

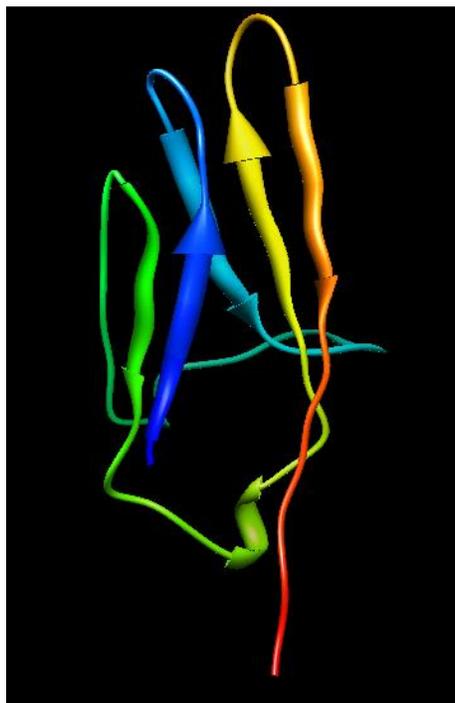


Figura 40. Registro fotográfico del dominio C10 de la proteína PCUM3. Este modelo homólogo se realizó con la ayuda del programa Modeller y para su visualización y representación en cintas se usó el programa Chimera.

En la figura 41 se encuentra el modelo homólogo del dominio C10 con la mutación encontrada en el exón 34 del gen *MYBPC3*, donde se muestran los rotámeros más probables de donde se debe ubicar el aminoácido en el dominio de acuerdo al tamaño, impedimento estérico y posición con menor energía dentro del dominio de la proteína.

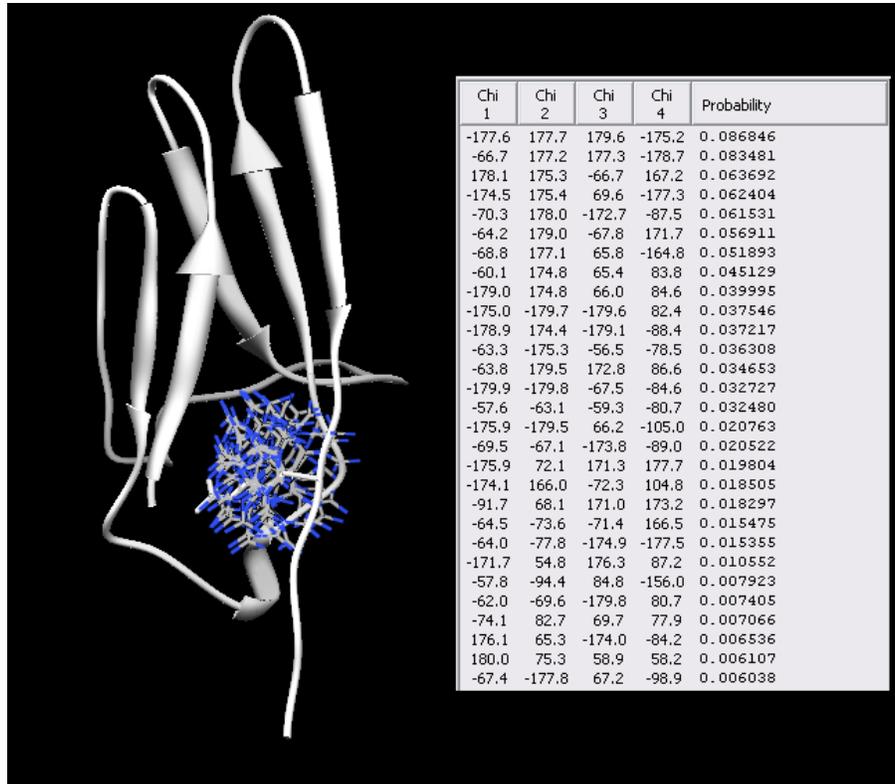


Figura 41. Registro fotográfico del dominio C10 de la proteína PCUM3 donde se muestran los posibles rotámeros de la mutación Leu1268Arg que pueden tomar dentro del dominio de la proteína PCUM3.

Al seleccionar la posición del aminoácido con el menor estado de energía y de mayor probabilidad dentro del dominio, se procedió a comparar ambas estructuras para poder ver que cambios introduce la mutación Leu1268Arg en la función del dominio C10 y poder estudiar que causas podría provocar esta mutación en el correcto funcionamiento del sarcomero (Ver figura 42). Al comparar ambos modelos, superponiendo tanto el modelo del dominio C10 normal con el mutado, se observan los cambios producidos por la mutación en el dominio de la proteína, pudiendo ayudar a comprender las bases moleculares de la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar y poder estratificar riesgos.

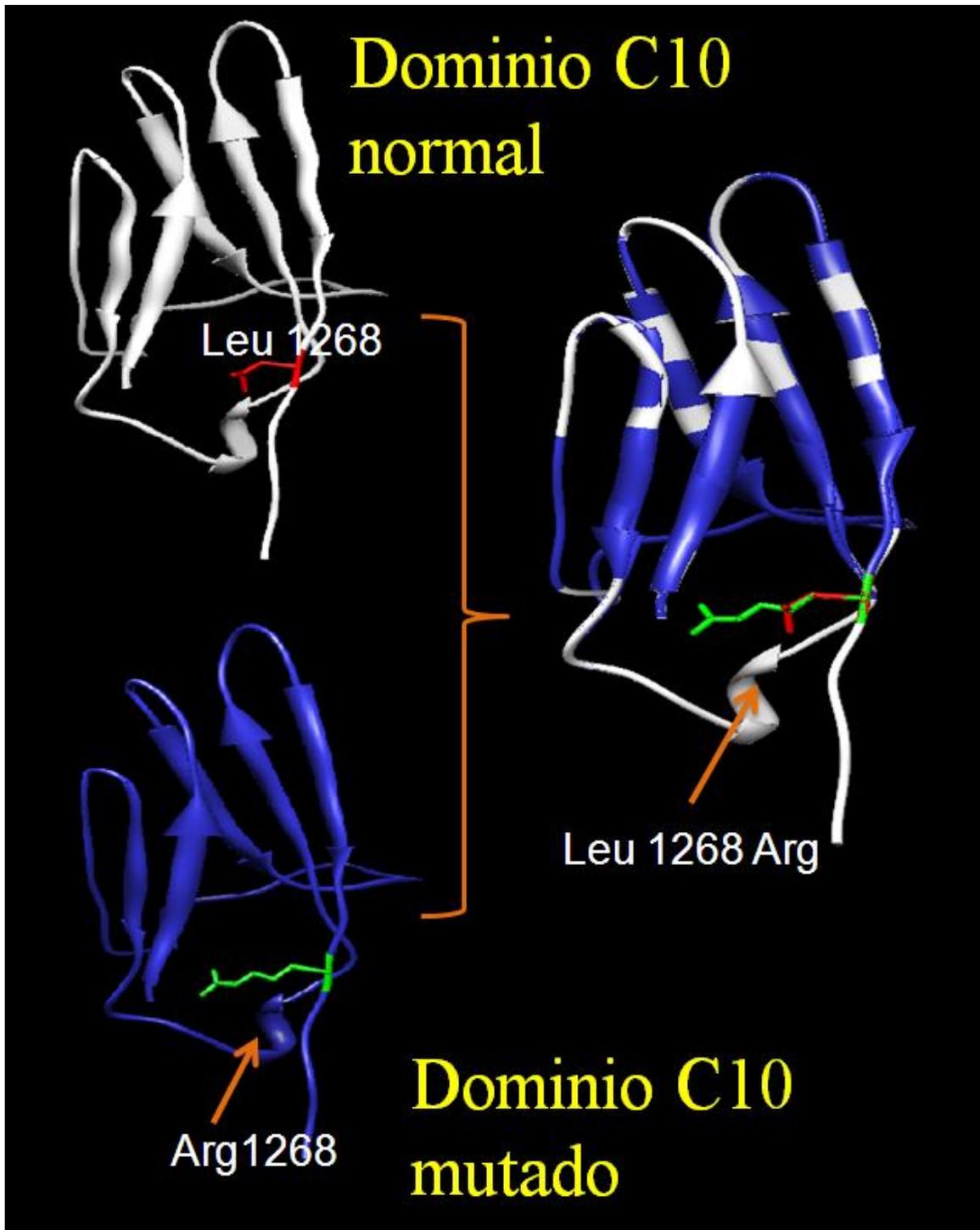


Figura 42. Registro fotográfico del dominio C10 normal y mutado de la proteína PCUM3, donde se observan los cambios ocasionados en el dominio de la proteína.

DISCUSIÓN

Discusión

La Miocardiopatía Hipertrófica Familiar (MHF) es una enfermedad del miocardio caracterizada por un engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo principalmente, sin dilatación de la cavidad ventricular, que puede presentarse con una gran variedad de datos clínicos y morfológicos (Marón y col., 1995). Se ha demostrado recientemente que existen alteraciones genéticas y trastornos de las proteínas del sarcómero en la MHF y se cree que la hipertrofia del miocardio puede, de hecho, ser una repuesta compensadora a una contracción ineficiente. También se ha demostrado que puede haber MHF sin hipertrofia y que las alteraciones histológicas no son específicas y además se distribuyen de forma aleatoria por distintas áreas del miocardio (Davis y Mackenna., 1994).

En este trabajo especial de grado se analizó un total de 20 pacientes donde primeramente se realizó un estudio ecocardiográfico y electrocardiográfico por el personal médico de en ASCARDIO y Hospital Pérez Carreño, para observar las alteraciones cardíacas y engrosamiento de las paredes del ventrículo izquierdo del corazón, esto fue realizado por el personal de la Asociación Cardiovascular Centro Occidental ASCARDIO en Barquisimeto y el Hospital Pérez Carreño en Caracas, una vez analizados y diagnosticados con alteraciones cardíacas, se enviaron muestras de sangre de éstos pacientes al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, al Centro de Biología Estructural, laboratorio de Biología Molecular para realizar la extracción del ADNg, y de allí partir para realizar el análisis específico del gen *MYBPC3* que codifica para la proteína C de unión a miosina cardíaca (PCUM3) en la búsqueda de mutaciones asociadas a la MHF.

1. Aislamiento de ADN genómico.

La extracción del ADNg se realizó a partir de sangre periférica, que contiene los leucocitos también llamados glóbulos blancos, que son células nucleadas con gran contenido de ADNg. Para ello se utilizaron dos métodos, el de Lahiri y Nurnberger 1991 y mediante el uso de un kit comercial marca AxiGen.

El kit nos permitió una extracción rápida, segura y de alto rendimiento, permitiendo aislar aproximadamente 12µg de ADNg de alto peso molecular a partir de 250µl de sangre periférica anticoagulada.

Utilizando buffers optimizados se garantizó que la columna sólo captara los ácidos nucleicos, mientras que las proteínas celulares, los metabolitos y los inhibidores de la PCR eran eliminados. El ADNg purificado es de aproximadamente 30 Kb de tamaño, y se logró aislar libre de proteínas contaminantes, polisacáridos, lípidos y pigmentos, siendo ideal para utilizarlo en las aplicaciones de PCR.

El ADNg aislado fue corrido en geles de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio. Se obtuvieron diferencias en la integridad del ADN aislado por ambos métodos. En el aislamiento realizado con el método de Lahiri y Nurnberger podemos observar gran cantidad de ADNg obtenido, se puede ver una banda muy gruesa que nos indica que las muestras no se encuentran totalmente integras, en comparación con el ADN aislado con el kit que posee una banda bien definida (Figuras 15 y 16). A pesar de que al ADNg aislado por el método de Lahiri y Nurnberger se encuentra un poco fraccionado, no es de gran relevancia para la amplificación del gen *MYBPC3*, porque el ADNg posee un tamaño de 30.300.000 Kb en 23 moléculas lineales con 100.000 genes aproximadamente siendo poco probable que se fraccione en la región de interés (Luque y Herráez., 2006) ya que los productos de PCR amplificados poseen un tamaño comprendido entre 159pb y 528pb.

La pureza del DNA se calculó mediante la relación entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm; considerando DNA de alta pureza, aquellos que arrojaron valores igual a $1,8 \pm 0,1$. Con el uso de un Nanodrop se midió el grado de pureza de algunas de las muestras de ADN_g obtenido utilizando ambos métodos. Se calculó la relación 260/280nm para el método de Lahiri obteniendo valores alrededor de 1,6, lo cual indica que el ADN aislado posee una baja contaminación por proteínas asociadas al ADN que son difíciles de separar como las histonas, helicasas, topoisomerasas y otros componentes celulares (Luque y Herráez., 2006). Con el uso del kit de purificación se obtuvieron muestras de ADN más puras, en la relación 260/280nm se obtuvieron valores mayores a 1,8, indicando el alto grado de pureza. A pesar de estas diferencias en la integridad y pureza, el ADN_g obtenido por ambos métodos pudo ser utilizado para la amplificación de los 34 exones del gen *MYBPC3*.

Desde la primera extracción del ADN hasta la fecha se han diseñado diversos métodos de aislamiento; en los últimos años se hicieron populares los Kits patentados que simplifican la extracción, pero disminuyen la calidad del ADN con costos cada vez mayores. Unas de las ventajas de utilizar el kit para el aislamiento de ADN_g es la poca cantidad de sangre que se necesita, ya que cuando se trata de estudiar bebés o niños pequeños en la búsqueda de mutaciones asociadas a esta patología, con sólo una gota de sangre por punción, se puede realizar la extracción de ADN_g altamente purificado y de alto rendimiento para realizar el posterior análisis molecular. Por otra parte el método salino de Lahiri y Nurnberger es de bajo costo, en comparación con otros métodos y no se requiere de peligrosos disolventes orgánicos como el fenol y el cloroformo, eliminando también el uso de la proteínasa K, haciendo del método una forma segura para la extracción de ADN de sangre total (Lahiri y Nurnberger., 1991).

2. Amplificación de los 34 exones del gen *MYBPC3*.

Para llevar a cabo los ensayos de PCR se utilizaron las secuencias de los iniciadores que se encuentran en la base de datos Cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>). Estas secuencias fueron evaluadas realizando un blast nucleotide en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> observando en que regiones de toda la secuencia nucleotídica del ADNg de PCUM3 podían unirse los iniciadores, verificando así que tanto los iniciadores sentido como antisentido amplificaban los exones constituyentes del gen *MYBPC3* y que eran sitio-específico.

Mediante la aplicación en forma cíclica de los procesos de desnaturalización, hibridación y replicación, se consiguió la amplificación de 32 de los 34 exones del gen *MYBPC3*, obteniendo múltiples copias de cada fragmento en un corto espacio de tiempo. Para ello se requirió un control preciso de las variables que condicionan este proceso ajustando los parámetros de concentraciones de la enzima, iniciadores, magnesio a utilizar y las temperaturas de hibridación y elongación, evitando así la generación de dímeros de los iniciadores y bandas inespecíficas de ADN y falsos productos de PCR (Bartlett y Stirling, 2003; Sambrook y Rusell, 2001). Con la ayuda de un termociclador se pudieron establecer las condiciones para cada etapa y repetirlas cíclicamente (tiempo, temperatura, número de ciclos etc.), logrando un mayor rendimiento, especificidad y fidelidad de las muestras amplificadas.

Los productos de PCR amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 ug/mL en buffer TBE 0,5X. Los amplímeros se ubicaron en el gel en la posición que se esperaba utilizando el MPM como referencia, indicándonos en primera instancia una correcta amplificación de los fragmentos de interés (Figura 17 y 18). Una vez estandarizados 32 de los 34 exones del

gen *MYBPC3* encontramos en la tabla 14 las nuevas temperaturas de hibridación que fueron aplicadas para cada uno de los exones. Primeramente se utilizó la temperatura de hibridación sugerida por la base de datos cardiogenomics (Tabla 5), luego con los resultados que se fueron obteniendo a lo largo del Trabajo Especial de Grado (bandas inespecíficas, ausencia de producto, poca cantidad de producto etc.) se fueron ajustando dichas temperaturas, así como las concentraciones de ADNg óptimas para una PCR, de enzimas, oligonucleótidos, iniciadores y buffer hasta obtener una banda bien definida del exón amplificado según Bartlett y Stirling 2003.

Los productos de PCR obtenidos fueron verificados por secuenciación, arrojando como resultado 100% de similitud al comparar la secuencia de los amplímeros con las secuencias proporcionadas por la bases de datos Cardiogenomics y NCBI, dándonos a entender que las secuencias de los iniciadores proporcionados por la base de datos Cardiogenomics nos permiten una amplificación correcta de los exones del gen *MYBPC3*.

La importancia de obtener productos óptimos de PCR se debe a que las pruebas que se realizaron para la búsqueda de las mutaciones, que fueron SSCP y la secuenciación, requieren de un producto de PCR purificado, libre de contaminantes e íntegro que permita realizar el análisis sin la interferencia de otros artefactos que puedan alterar los resultados obtenidos, ya que estos resultados se relacionan directamente con el diagnóstico de una patología e influye en el tratamiento a utilizar.

3. Análisis del gen *MYBPC3* en la búsqueda de mutaciones asociadas a la MHF.

En este Trabajo especial de Grado se realizó una búsqueda de mutaciones en 22 exones del gen *MYBPC3* para los 20 pacientes del estudio (Tabla 15) para ello se escogieron aquellos exones que poseían una frecuencia de mutaciones según la base de datos Cardiogenomics (Tabla 17), en amarillo se resaltan los exones que se analizaron por

ambas técnicas y el número de mutaciones que han sido reportadas en la base de datos Cardiogenomics. El porcentaje en el que puede ocurrir una mutación se realizó multiplicando en número de mutaciones por dominio por cien dividiendo el resultado entre el número total de mutaciones reportadas por cardiogenomics. La búsqueda de mutaciones en el gen *MYBPC3* se realizó utilizando la técnica SSCP y secuenciación directa de los fragmentos de PCR obtenidos.

Tabla 17. Número de mutaciones por exón indicando el porcentaje en el que puede ocurrir una mutación en los distintos dominios de la proteína. Tomado de la base de datos Cardiogenomics (<http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>).

Exón	Mutaciones	% mutación	Dominios
2	2	12,80%	C0, C1
3	5		
4	1		
5	1		
6	3		
7	7		
8	3		
9	3		
10	0		
11	0		
12	1		
13	4	22,30%	C2-C4
14	3		
15	1		
16	8		
17	2		
18	12		
19	7		
20	6	57,40%	C5-C10
21	1		
22	8		
23	2		
24	13		
25	4		
26	12		
27	6		
28	6		
29	1		
30	7		
31	4		
32	5		
33	5		
34	5		
35	0		

Ya que generalmente los cambios que se presentan en MHF son SNP (polimorfismo de un solo nucleótido), se utilizó la técnica SSCP que nos permite detectar mutaciones SNP que se encuentran en el ADN_g (Estrada-Cuzcano, 2006) es decir, una mutación puntal que se ubica en uno de los dos alelos del gen *MYBPC3*, que a su vez puede localizarse en cualquier exón de este gen, puede ser detectada con una sensibilidad del 80% mediante esta técnica (Estrada-Cuzcano, 2006).

Se logró la estandarización para la búsqueda de mutaciones mediante SSCP de 10 exones del gen, sin encontrar un patrón de corrida diferente que indique la presencia de una mutación (Tabla 15), en principio se pensaba que la técnica no era sensible para detectar cambios en las secuencias y generar patrones de corrida diferentes debido a que se estaba realizando en minigeles de 10,1 cm de largo con 7,3 cm de ancho y con un grosor de 0,75 mm, ya que reportes de otros autores que igualmente realizaron SSCP para el análisis y búsqueda de mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano, utilizaron geles muchos más grandes (maxigeles) para aumentar la resolución de la técnica (Estrada-Cuzcano y col., 2006). Sin embargo, para éste estudio igualmente se enviaron a secuenciar algunas de las muestras analizadas por SSCP (exones 10, 11, 19 y 22) tabla 15, y no se observó ningún cambio en la secuencia nucleotídica, lo que parece indicar que a pesar de que en este estudio preliminar se utilizaron minigeles para realizar los SSCP, se encontró una buena correlación entre las dos técnicas (secuenciación y SSCP), y posiblemente la SSCP tiene una alta sensibilidad en minigeles para la detección de las mutaciones en *MYBPC3*. Sin embargo, para tener una certeza de la sensibilidad de ésta técnica con el uso de minigeles, ya que en nuestro trabajo no se encontró ninguna mutación usando ésta técnica, y al secuenciar las mismas muestras de ADN utilizadas para realizar la SSCP tampoco se encontró mutación alguna, se recomienda usar un control positivo, es decir una mutación

conocida en el exón del gen *MYBPC3* en estudio, y que al realizar el análisis por SSCP, arroje un patrón de banda diferente a los controles.

A su vez, se analizaron por secuenciación 15 exones del gen *MYBPC3* para los 20 pacientes del estudio (Tabla 15) y se identificaron 3 mutaciones en el gen *MYBPC3*, dos de ellas mutaciones sin efecto para la proteína, que codifican a un mismo aminoácido y una de ellas una sustitución que codifica para un aminoácido diferente Leu 1268 Arg (Tabla 16). Sin embargo, el hecho de no haber identificado una gran cantidad de mutaciones en estos exones del gen *MYBPC3*, como el número encontrado en algunos trabajos hechos en Francia, Italia, USA y China (Richard y col., 2003; Olivotto y col., 2008; Van Driest y col., 2004; Song y col., 2005) no se descarta la posibilidad de que las mutaciones se encuentren en el resto de los genes que codifican para otras proteínas del sarcómero, igualmente los criterios de inclusión y selección de pacientes, pudieron no ser lo suficientemente rígidos para realizar una selección de personas que tengan específicamente Miocardiopatía Hipertrófica sino que probablemente enviaron muestras de pacientes con otras afecciones cardíacas, ya que el diagnóstico de la patología es en la mayoría de los casos difícil de realizar, de allí la importancia de realizar estudios de éste tipo. Aunque no se sabe cuál es el patrón de mutaciones que sigue la población venezolana y existe la posibilidad de que las mutaciones sean más frecuentes en otro gen, diferente a *MYBPC3*, que codifique para otra proteína del sarcómero u otra proteína de distinta naturaleza. Asimismo, las mutaciones se pueden encontrar en regiones que no están contempladas en el estudio y por ende, no se detectaron, aunado al hecho de que los criterios de selección pudieron excluir pacientes asintomáticos pero portadores de mutaciones.

La estrategia elegida hasta ahora principalmente para establecer una correlación genotipo-fenotipo para ésta enfermedad se ha basado en el uso de herramientas de

Bioinformática como por ejemplo el modelaje molecular, dinámica molecular, la realización de estudios entre familias cuando ha sido posible, y análisis de la integración de la información existente entre estudios funcionales y familiares (Miyamoto C.A. y col., 1999).

Hasta ahora las mutaciones en el gen *MYBPC3* está entre las causas más frecuentes de la MHF (Richard y col., 2003). De hecho, se han identificado un gran número de mutaciones en algunas poblaciones analizadas, variando la frecuencia con la que aparecen (Tabla 18). En algunos estudios, incluyendo el nuestro, se han obtenido frecuencias desde un 5%, mientras que en otros se supera el 50% (Nimura y col., 1998; Alders y col., 2003).

Tabla 18. Comparación de series de pacientes con MHF que han sido publicados con un estudio sistemático del gen PCUM3.

Referencia	País	Nº de pacientes	Nº de controles	Nº y % de mutaciones	Edad media de los pacientes
Van Driest y col., 2004	USA	389	200	71 (18%)	41
Richard y col., 2003	Francia	197	100	52 (26%)	?
Olivotto y col., 2008	Italia	203	150	68 (34%)	43
Erdmann y col., 2001	Alemania	110	?	15 (14%)	?
Andersen y col., 2004	Dinamarca	81	100	10 (12%)	?
Ingles y col., 2005	Australia	80	150	11 (14%)	?
Morner y col., 2003	Suecia	46	100	10 (22%)	62
Cardim y col., 2005	Portugal	45	?	5 (11%)	46
Jaaskelainen y col., 2002	Finlandia	37	11	9 (24%)	50
Alders y col., 2003	Holanda	22	100	16 (73%)	?
García-Castro y col., 2009	España	10	100	3 (30%)	?
Marsiglia y col., 2009	Brasil	20	64	2 (10%)	46
Trabajo especial de grado	Venezuela	20	3	1 (5%)	39
Total		1260	1078	273 (22%)	47
(?) Datos desconocidos					

Algunas de las causas que pueden explicar las variaciones en estos resultados son:

- Los criterios de selección de los pacientes.

- La edad de diagnóstico de los pacientes y la exclusión o no de individuos emparentados, entre otros.
- La sensibilidad de la técnica utilizada para la búsqueda de variantes.
- La presencia de mutaciones en familias que tienen un antecesor común.

Aunque la idea que finalmente persiguen los distintos investigadores abocados al estudio de mutaciones relacionadas con MHF sigue siendo desde los últimos diez años establecer la relación genotipo-fenotipo que permita abordar el estudio de una variante y predecir el efecto de una determinada mutación y así poder estratificar riesgos. Para ello se han descrito diferentes estrategias como son:

- Estudio de las propiedades físico-químicas de los aminoácidos implicados, donde se puede estudiar el cambio de carga y de hidrofobicidad que experimentan ya que puede estar asociado con un pronóstico más severo de la enfermedad (Meurs y col., 2007).
- Estudio de los dominios funcionales entre las interacciones entre dos proteínas ya que la patogenicidad de una mutación puede estar íntimamente relacionada con la región funcional en la que se produce (Woo y col., 2003).
- Realización de estudios funcionales. Con este tipo de ensayos se pueden sugerir los mecanismos de acción de las distintas mutaciones así como identificar interacciones entre aminoácidos de una misma proteína o proteínas distintas.
- Los estudios familiares son útiles para determinar la segregación de la mutación con la enfermedad, comprobar si una mutación ha surgido de novo en un individuo,

plantear la existencia de un ancestro común en dos o más familias y conocer el rango de manifestación fenotípica.

- Utilización de herramientas bioinformáticas. Existen programas que, mediante diferentes algoritmos, predicen la patogenicidad de una mutación missense con mayor o menor fiabilidad. Y otros predicen si un cambio en un donador o aceptor puede afectar al corte empalme.

Este trabajo especial de grado comprende fundamentalmente un estudio preliminar ya que en Venezuela no existe hasta ahora ningún reporte de mutaciones asociadas a la MHF por ende, en principio sólo se abordó la búsqueda de las mutaciones que pudieran estar relacionadas con la patología para en un futuro poder aplicar alguno de los criterios de estudios mencionados arriba. Sin embargo como resultado relevante pudimos encontrar en 22 pacientes 3 mutaciones, situadas en 3 de los 22 exones estudiados por SSCP y secuenciación (resultados tabla 16).

3.1. Mutación en el exón 5 del gen *MYBPC3* del paciente DD.

Se encontró una mutación heterocigota en el exón 5 del paciente DD realizando un alineamiento múltiple utilizando las secuencias de los amplímeros y de los exones proporcionadas por la base de datos Cardiogenomics y NCBI (resultados Figura 31). Se encontró un cambio en la secuencia nucleotídica de una citosina por una timina observándose el solapamiento de las curvas en el electroferograma (resultados Figura 31B). Al realizar la traducción del exón no se encontró cambios en la proteína, ya que ambos codones (CGC→CGT) codifican para Glicina.

Mutaciones encontradas en otros trabajos indican que esta región es de gran importancia, ya que al comparar la secuencias de aminoácidos de esta región con la base de datos de NCBI, se observa que está bastante conservada en el hombre (*Homo sapiens*),

ratón (*Mus musculus*), rata (*Rattus norvegicus*), perro (*Canis lupus familiaris*), buey (*Bos taurus*) y chimpancé (*Pan troglodytes*), lo que sugiere que esta es una región muy importante para la proteína PCUM3 (Marsiglia y col., 2010) encontrando una gran cantidad de aminoácidos altamente conservados. En esta región N-terminal (C1-C2) se unen los 126 residuos proximales del segmento S2 de la miosina, cerca de la región bisagra (Gautel y col., 1995; Gruen y col., 1999) el cual modula la movilidad cabeza-cola de la miosina (Gruen y col., 1999).

3.2. Mutación en el exón 26 del gen *MYBPC3* del paciente EST.

Encontramos una mutación heterocigota en el exón 26 del paciente EST realizando un alineamiento de la secuencia del paciente con el amplímero y el exón del gen *MYBPC3* proporcionado por la base de datos Cardiogenomics, observando dos curvas totalmente solapadas en la misma posición, esta señal correspondió a una citosina que cambia a una timina en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 33B). Esta mutación heterocigota no produjo ningún cambio en la proteína ya que ambos codones GTC que cambia a GTT codifican para el mismo aminoácido Valina (Figura 34).

Distintos autores han propuesto que mutaciones en los exónes 22 al 34 (dominios C5-C10), pueden contribuir al desarreglo del ensamblaje del filamento grueso mediante su interacción con la cola de la β -miosina (fundamentalmente el dominio C10) y su interacción con la titina (C7-C10) alterando así la disposición de las propias moléculas sobre el filamento grueso y las interacciones existentes entre ellas, sin embargo ninguna de estas mutaciones tienen consecuencias en la secuencia de aminoácidos y por ende en la estructura proteica.

3.3. Mutación en el exón 34 del gen *MYBPC3* del paciente CS y su pariente P.

Finalmente se encontró una mutación heterocigota en el exón 34 del paciente CS al realizar al igual que para los casos anteriores, un alineamiento múltiple con el amplímero y el exón 34 del gen *MYBPC3* junto con la secuencia del exón 34 del paciente CS (Figura 35A) aportada por Macrogen. En el alineamiento se observa el cambio de una timina por una guanina, observándose dos curvas solapadas en la misma posición, indicando así que es una sustitución heterocigota en uno de los alelos del gen *MYBPC3* (Figura 35B). Esta mutación heterocigota produce un cambio de aminoácidos en la secuencia proteica, ya que el codón CTG que codifica para una Leucina (Leu) cambia a CGG que codifica para una Arginina (Arg) (Figura 36). Por ser la Miocardiopatía Hipertrófica Familiar una enfermedad autosómica dominante, se realizó este mismo análisis a unos de sus parientes, encontrando la misma mutación. La Leucina es un aminoácido que posee una cadena lateral no polar, un grupo isobutilo, siendo una molécula hidrofóbica es decir menos soluble en el agua, en cambio, la Arginina es un aminoácido grande que posee seis átomos de carbono y un grupo guanidino cargado positivamente a pH 7 (Figura 43).

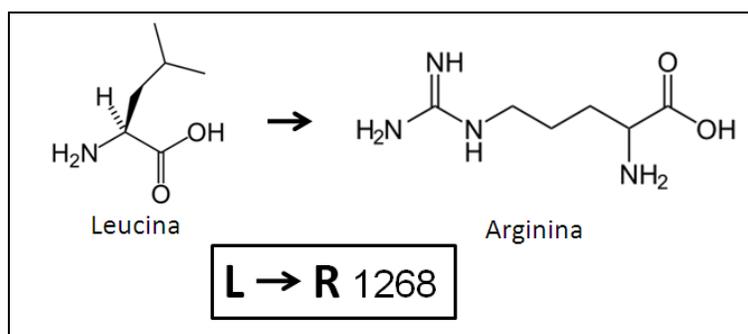


Figura 43. Aminoácidos Leucina y Arginina.

Mutaciones en esta región de la proteína, pueden desestabilizar la estructura del sarcómero ya que los dominios C7-C10 tienen una alta afinidad por la meromiosina ligera (MML), y en concreto el dominio C10 donde se encontró la mutación, se une a cuatro

aminoácidos de la MML que están cargados positivamente (Oakley y col., 2007; Miyamoto C.A. y col 1999) (Figura 44), estos resultados son de gran importancia ya que la Arginina al proporcionar dos cargas positivas afecta las interacciones que posee con el primer aminoácido de la MML que este también está cargado positivamente generando repulsión, esto resulta interesante ya que Lutero y col., 2011 sugieren que la PCUM3 se une tanto a los filamentos gruesos y finos, pudiendo afectar el correcto funcionamiento del sarcómero. Esta mutación L1268R no ha sido reportada en ninguna base de datos como la de Cardiogenomics o la de SNPs.

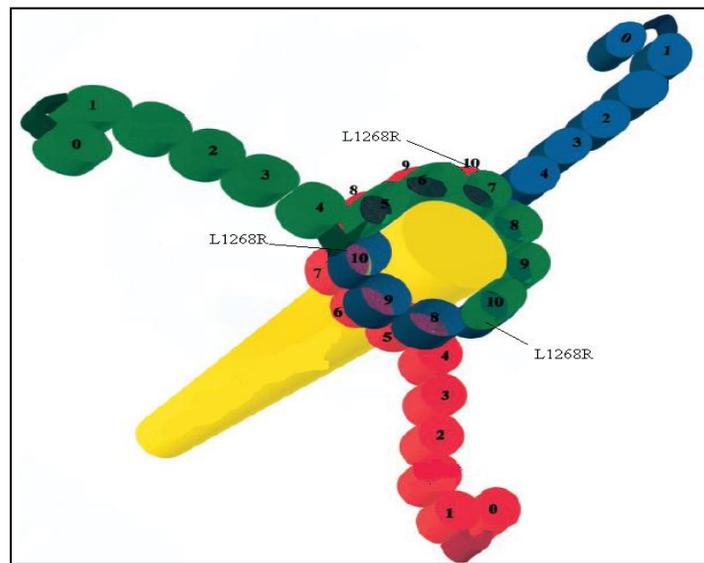


Figura 44. Localización de la mutación identificadas en este Trabajo Especial de Grado según el modelo de collar trimérico de la PCUM 3, propuesto por Moolman-Smook y col., 2002.

Estudios realizados por Miyamoto y colaboradores en 1999 de mutagénesis sitio-dirigidas en el dominio C10 de la PCUM3 con la MML, indicaron que mutaciones con residuos positivos afectan la reacción de unión del C10 con la MML disminuyendo la concentración crítica de polimerización de la miosina, ya que este dominio es de gran importancia para la correcta incorporación de la PCUM3 en la banda A, también se estudió

que mutaciones de truncamiento en este dominio pueden producir una inhibición dominante del ensamblaje de las miofibrillas de miosina (Miyamoto C.A. y col., 1999).

En la figura 45 se puede apreciar en que región de la proteína se encuentran las tres mutaciones encontradas en este Trabajo Especial de Grado, la mutación en el exón 5 se encuentra ubicada en el dominio C1. Esa región posee una frecuencia mutagénica de 16,2%. Para la mutación encontrada en el exón 26 se encuentra en el dominio de Ig C7, esta región posee un índice de mutación de 47,3% al igual que la mutación encontrada en el exón 34 que se encuentra en el dominio C10. Los resultados están basados en los cálculos realizados en la tabla 17 de acuerdo al número de mutaciones encontradas para cada dominio de la proteína. Estos resultados nos hacen pensar que hay sitios en la proteína que poseen una mayor susceptibilidad de sufrir mutaciones que otros, aunque en la actualidad no hay reportes o trabajos que indiquen o demuestren con resultados contundentes la veracidad de dicho enunciado siendo de gran interés para su posterior estudio estos sitios de mayor probabilidad mutagénica (Figura 45).

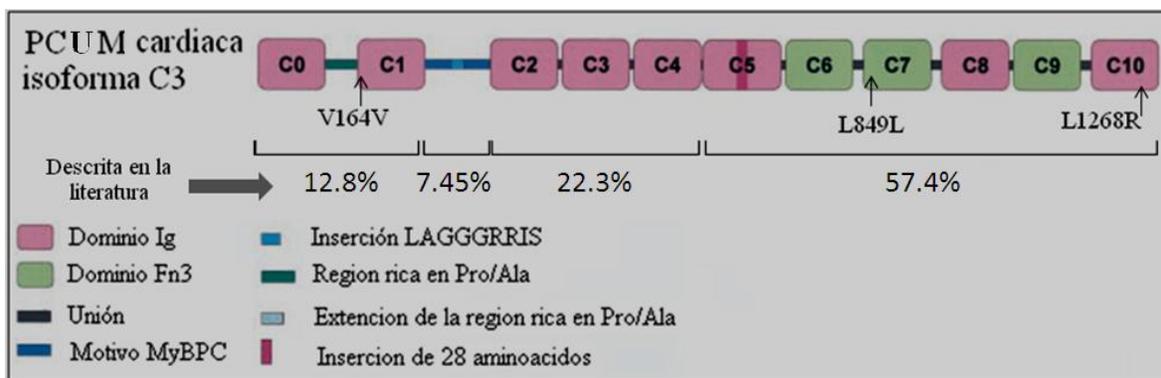


Figura 45. Frecuencia de las mutaciones en los dominios de la PCUM3

4. Modelaje molecular para la mutación L1268R del paciente CS.

Se realizó un modelo en tres dimensiones del dominio donde se encontró la mutación (dominio C10 de inmunoglobulina Ig) (Figura 40), que se encuentra muy cerca del sitio

donde se une la primera molécula de MML. La proteína no se encuentra cristalizada, debido a esto, se utilizó como molde una proteína cristalizada de un Nematodo (*Caenorhabditis elegans*) asociada al músculo, que posee un dominio de la superfamilia de las inmunoglobulinas muy similar al dominio C10 de la proteína PCUM3 (Fong S. y col 1996), permitiéndonos realizar un modelo del dominio C10. Introduciendo la mutación encontrada se pudo comparar tanto el modelo del dominio C10 normal con un modelo realizado con la mutación. Al superponer ambos modelos con el programa Chimera 1.5.2, se observan los cambios ocasionados por la mutación en el dominio de la proteína (figura 42), lo que nos permitió tener una idea de la severidad que podría tener la mutación y los daños que se podrían ocasionar en el sarcómero permitiéndonos así estratificar riesgos.

La localización del residuo mutado L1268R en el modelo tridimensional de la C10, proporciona un fuerte apoyo para nuestra interpretación de datos que implica la unión con MML. Con el apoyo de los resultados obtenidos por Miyamoto y col en 1999 se podrían establecer las mutaciones de riesgo que pueden afectar la unión de C10 con MML, de acuerdo con el tipo de mutación encontrada, mutaciones cargadas negativa o positivamente que pueden generar atracción o repulsión iónica que ocurre entre el dominio C 10 y la miosina y de que manera puede alterar la polimerización de la miosina (Miyamoto C.A. y col 1999). A pesar de que la PCUM3 fue descubierta hace más de 40 años, el mecanismo de función sigue siendo desconocido. Si analizamos todo lo que se ha expuesto sobre la patogenicidad de las mutaciones, se evidencian las dificultades para extraer conclusiones genéricas. Además, asignar una mutación como causante de MHF es complicado. Se necesita la integración de todos los datos existentes, que en muchas ocasiones son insuficientes, por lo tanto, una descripción detallada de las interacciones entre el dominio C 10 con la miosina sería un paso significativo para la comprensión integral del ensamblaje

del filamento grueso de miosina del músculo cardíaco y el correcto funcionamiento del sarcomero. Estos modelos son una gran ventaja al momento de estudiar la patología y como esta afecta el correcto funcionamiento del sarcomero y la contracción muscular, ya que nos permitiría realizar un estudio de la proteína sin requerir una biopsia del corazón la cual acarrea una gran cantidad de riesgos al paciente como arritmias cardíacas, sangrado en el sitio de la biopsia, infección, lesión en el nervio laríngeo recurrente, lesión a la vena o a la arteria, ruptura del corazón entre otras, que pueden colocar al paciente en peligro de empeorar la enfermedad o hasta la muerte .

5. Importancia de la búsqueda de mutaciones y de los estudios familiares.

Los clínicos son los encargados de asesorar a los pacientes y a las familias que tienen una enfermedad genética o que tienen el riesgo de padecerla. Los pacientes deben recibir información acerca de su enfermedad para que puedan tomar decisiones informadas. La MHF, es una enfermedad con una gran heterogeneidad clínica y genética, con múltiples variantes (más de 900 mutaciones en 20 genes asociados con la enfermedad), hechos que complican su diagnóstico (Van Driest y col., 2004).

La búsqueda de mutaciones en genes, como *MYBPC3*, que codifican proteínas del sarcómero permite identificar la causa específica de la enfermedad en pacientes con diagnóstico clínico establecido de MHF. Se ha estimado que el 43% de las muestras, con genotipo positivo, presentan una mutación en el gen *MYBPC3* (Richard y col., 2003), lo cual justifica la importancia de estudiar este gen. Sin embargo, dado que los portadores de mutación en *MYBPC3* pueden ser completamente asintomáticos, es posible que la presencia de mutación en este gen sea más prevalente de lo que muestran los estudios realizados.

La identificación de mutaciones, asociadas con MHF, es de gran importancia para las familias, ya que permitirá el diagnóstico de los miembros con mayor riesgo.

El análisis de los resultados obtenidos en este Trabajo Especial de Grado y lo descrito en la literatura muestra que hay familias con una misma mutación, en las que la penetrancia y la expresión fenotípica pueden variar (Erdmann y col., 2001). Pero la expresión de la enfermedad puede ser diferente entre los miembros de una misma familia, sugiriendo que existen otros factores como el sexo, la actividad física, la nutrición, la etnia o el efecto de genes modificadores, que influyen en la etiología de la enfermedad (Tanjore y col., 2008).

Por último, es de gran importancia un registro global de mutaciones y polimorfismos de Miocardiopatías con sus fenotipos para poder realizar con mayor precisión, un análisis clínico que me permita ver a detalle la correlación genotipo-fenotipo y poder prevenir así una de las consecuencias más grave de la MHF que es la muerte súbita.

CONCLUSIONES

Conclusiones

- Se logró la estandarización de PCR para 32 de los 34 exones del gen *MYBPC3* que codifica para la proteína C de unión a miosina.
- Se logró la normalización de la técnica SSCP para 10 exones del gen *MYBPC3* que codifica para la proteína C de unión a miosina, sin detectar mutaciones mediante la técnica.
- Se logró el análisis por secuenciación de los 32 exones del gen *MYBPC3* para los 3 controles.
- Se logró el análisis por secuenciación de 15 exones del gen *MYBPC3* para 20 pacientes.
- Se identificó en el paciente DD la mutación C > T del tipo sustitución. La mutación está localizada en la posición c.3654 en el exón 5 y no altera la proteína ya que ambos codones GGC y GGT codifican para Glicina G164G.
- Se identificó en el paciente EST la mutación C > T del tipo sustitución. La mutación está localizada en la posición c.16203 en el exón 26 y no altera a la proteína ya que ambos codones GTC y GTT codifican para Valina V16203V.
- Se identificó en el paciente CS la mutación T > G del tipo sustitución. La mutación está localizada en la posición c.21564 en el exón 34 y altera el codón de CTG > CGG, de esa forma alterando el aminoácido, Leucina a Arginina L 1268 R.
- Al parecer, la enfermedad sigue un patrón autosómico dominante, ya que se estudió uno de los parientes (P) del paciente CS encontrando la misma mutación L 1268 R.
- El 5% de los pacientes de éste estudio presentaron mutaciones en los exones del gen *MYBPC3*.
- Se realizó un modelaje molecular del dominio C10 de la proteína PCUM3 con la ayuda de programas de bioinformática que nos permitieron el análisis de la mutación L1268R a nivel molecular.
- En general, el tener una integración entre la información obtenida utilizando herramientas de bioinformática con los conocimientos que existen de la proteína PCUM3 en el dominio C10 nos ayudaría a estimar la patogenicidad de una mutación en esa región, y en el futuro determinar que pacientes podrían tener un riesgo más alto de sufrir la enfermedad.

Recomendaciones

Es necesario realizar un estudio detallado de las características clínicas tanto de los casos de pacientes con la patología como de los familiares, siempre que sea posible. La información de la que se dispone es muchas veces escasa y cualquier aporte, desde el punto de vista clínico y genético, ayuda en la toma de decisiones clínicas.

Se debe disponer de una estrategia que nos permita eliminar las limitaciones que surgen de la heterogeneidad clínica y genética de la MHF, ya que la mayoría de los datos surgen de estudios a pequeña escala, realizados sobre pacientes con MHF que han sido seleccionados en base a diferentes criterios. Por lo tanto, es de gran importancia homogenizar los criterios de selección de pacientes que participan en los estudios y aumentar el número de familias estudiadas afectadas, tanto desde el punto de vista clínico como genético.

El estudio debe contar con mayor cantidad de controles, debido a los polimorfismos que pueden estar presentes en la población Venezolana. Además se deben incluir otros genes del sarcómero que han demostrado tener una asociación con MHF, incluyendo las regiones de los intrones.

Para este estudio, se recomienda la normalización del SSCP de los exones restantes que no fueron analizados, ya que mediante su uso se podrían detectar mutaciones de modo que sería de gran ayuda en los laboratorios de diagnóstico implementar una técnica de rutina y de bajo costo.

Se recomienda el uso de dinámica molecular para el estudio de interacciones de proteína, que nos permita tener un modelo proteico mucho más exacto al momento de estudiar la mutación, y poder ver los efectos que causan estas interacciones.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Ababou A., Rostkova E., Mistry S., Le Masurier C., Gautel M., Pfuhl M. 2008. Myosin binding protein C positioned to play a key role in regulation of muscle contraction: structure and interactions of domain C1. *J Mol Biol.* **19**; **384**:615-30.
- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. *Biología Molecular de la Célula.* (4ª edición). Ediciones Omega, Barcelona. 2004.
- Alders M., Jongbloed R., Deelen W., van den Wijngaard A., Doevendans P., Ten Cate F., Regitz-Zagrosek V., Vosberg H.P., van Langen I., Wilde A., Dooijes D., Mannens M. 2003. The 2373insG mutation in the MYBPC3 gene is a founder mutation, which accounts for nearly one-fourth of the HCM cases in the Netherlands. *Eur Heart J*; **24**(20):1848-1853.
- Andersen P.S., Havndrup O., Bundgaard H., Larsen L.A., Vuust J., Pedersen A.K., Kjeldsen K., Christiansen M. 2004. Genetic and phenotypic characterization of mutations in myosinbinding protein C (MYBPC3) in 81 families with familial hypertrophic cardiomyopathy: total or partial haploinsufficiency. *European Journal of Human Genetics*; **12**:673-677.
- Armouche A., Pohlmann L., Schlossarek S., Starbatty S., Yeh Y., Nattel S., Dobrev D., Eschenhagen T., Carrier L. 2007. Decreased phosphorylation levels of cardiac myosin-binding protein-C in human and experimental heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **43**:223–229
- Ashrafian H., Watkins H. 2007. *Reviews of Translational Medicine and Genomics in Cardiovascular Disease: New Disease Taxonomy and Therapeutic Implications*

Cardiomyopathies: Therapeutics Based on Molecular Phenotype. *Journal of the American College of Cardiology*; **49(12)**: 0735-1097

- Barany M., Barany K. *Biochemistry of Muscle Contraction*. Academic Press. 2002.
- Bartlett J.M.S., Stirling D. 2003. *PCR Protocol*. Second Edition. Editorial Humana Press. Totowa New Jersey.
- Bonne G., Carrier L., Bercovici J., Cruaud C., Richard P., Hainque B., Gautel M., Labeit S., James M., Beckmann J., Weissenbach J., Vosberg H.P., Fiszman M., Komajda M., Schwartz K. 1995. Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*; **11(4)**:438-40.
- Bos J.M., Towbin J.A., Ackerman M.J. 2009. Diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of genetic testing for hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; **14**; **54(3)**:201-11.
- Brock R. 1957. Functional obstruction of the left ventricle. (Acquired aortic subvalvar stenosis). *Guy's Hosp Rep*; **106**:221-238.
- Cardim N., Perrot A., Santos S., Morgado P., Padua M., Ferreira S., Reis RP., Monteiro C., Ferreira T., Correia J.M., Osterziel K.J. 2005. Hypertrophic cardiomyopathy in a Portuguese population: mutations in the myosin-binding protein C gene. *Rev Port Cardiol*; **24(12)**:1463-1476.
- Carrier L., Bonne G., Bährend E., Yu B., Richard P., Niel F., Hainque B., Cruaud C., Gary F., Labeit S., Bouhour J.B., Dubourg O., Desnos M., Haggège A.A., Trent R.J., Komajda M., Fiszman M., Schwartz K. 1997. Organization and sequence of human cardiac myosin binding protein C gene (MYBPC3) and identification of

mutations predicted to produce truncated proteins in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*; **80(3)**:427-34.

- Carrier L., Knoll R., Vigniera N., Kellera D.L., Bauseroa P., Prudhona B., Isnard R., Ambrosinea M.L., Fiszmana M., Ross J., Schwartz K., Kenneth R. 2004. Asymmetric septal hypertrophy in heterozygous cMyBP-C null mice. *Cardiovascular Research*; **63**:293-304.
- Carrier L., Hengstenberg C., Beckmann J.S., Guicheney P., Dufour C., Bercovici J., Dausse E., Berebby-Bertrand I., Wisnewsky C., Pulvenis D. 1993. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet*; **4**:311-313.
- Cazorla O., Szilagy S., Vignier N., Salazar G., Kramere E., Vassort G., Carrier C., Lacampagne A. 2006. Length and protein kinase a modulations of myocytes in cardiac myosin binding protein C-deficient mice. *Cardiovascular Research*; **69**:370-380.
- Cooper G.M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. Editorial, segunda Edicion, España.
- Cuda G., Fananapazir L., Epstein N.D., Sellers J.R. 1997. The in vitro motility activity of beta-cardiac myosin depends on the nature of the beta-myosin heavy chain gene mutation in hypertrophic cardiomyopathy. *J Muscle Res Cell Motil*; **18(3)**:275-83.
- Davies L.G. 1952. A familial heart disease. *Br Heart J*; **14**:206-212.
- Davies M.J. y McKenna W.J. 1994. Hypertrophic cardiomyopathy: an introduction to pathology and pathogenesis. *Br Heart J*; **72**: S2-S3.

- Dominguez R., Freyzon Y., Trybus K.M., Cohen C. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell*; **94(5)**:559-71.
- Elliott P., McKenna W. 2004. Hypertrophic cardiomyopathy. *Lancet*; **363**: 1881-91.
- Erdmann J., Raible J., Maki-Abadi J., Hummel M., Hammann J., Wollnik B., Frantz E., Fleck E., Hetzer R., Regitz-Zagrosek V. 2001. Spectrum of clinical phenotypes and gene variants in cardiac myosin-binding protein C mutation carriers with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; **38(2)**:322-330.
- Estrada-Cuzcano A., Sandoval J., Maria L., Guevara F., Fugita H. 2005. Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano. *Rev. peru. Biol*; **12(3)**: 349- 358.
- Fatkin D., Graham R. 2002. Molecular Mechanisms of Inherited Cardiomyopathies *Australia Physiol Rev*; **82**: 945–980.
- Fisher A.J., Smith C.A., Thoden J.B., Smith R., Sutoh K., Holden H.M., Rayment I. 1995. X-ray structures of the myosin motor domain of Dictyostelium discoideum complexed with MgADP.BeFx and MgADP.AIF4-. *Biochemistry*; *34(28)*:8960-72.
- Flashman E., Redwood C., Moolman-Smook J., Watkins H. 2004. Cardiac Myosin Binding Protein C Its Role in Physiology and Disease. *Journal of the American Heart Association*; **94**:1279-1289.
- Fong S., Hamill S.J., Proctor M., Freund S.M., Benian G.M., Chothia C., Bycroft M., Clarke J.1996. Structure and stability of an immunoglobulin superfamily domain from twitchin, a muscle protein of the nematode Caenorhabditis elegans. *J Mol Biol.* **6**; 264(3):624-39.

- Frank S, Braunwald E. 1968. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis: clinical analysis of 126 patients with emphasis on the natural history. *Circulation*; **37**:759-788.
- Freiburg A., Gautel M. 1996. A molecular map of the interactions between titin and myosin-binding protein C Implications for sarcomeric assembly in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Eur. J. Biochem.*; **235**: 317-323.
- Gallon C., Jacques A., Messer A., Tsang V., McKenna W., Marston S. 2007. Altered function and post-translational modification of contractile proteins in myectomy samples from HOCM patients. *J Mol Cell Cardiol*; **42**: 162–170.
- Ganong, William F. Fisiología médica. El Manual Moderno 19ª Ed. 2004.
- García-Castro M., Coto E., Reguero J.R., Berrazueta J.R., Alvarez V., Alonso B., Sainz R., Martin M., Moris C. 2009. Espectro mutacional de los genes sarcomericos *MYH7*, *MYBPC3*, *TNNT2*, *TNNI3* y *TPM1* en pacientes con Miocardiopatía Hipertrófica. *Rev Esp Cardiol*; **62(1)**:48-56.
- García-Castro M., Reguero J.R., Batalla A., Catalán F., Mayordomo J., Coto E. 2003. Detección directa de mutaciones malignas en pacientes con miocardiopatía hipertrófica. *Rev. Esp Cardiol*; **56**:1022-5.
- García-Pavía P., Segovia J., Molano J., Mora R., Kontny F., Erik Berge K., Leren T.P., Alonso-Pulpón L. 2007. High-risk hypertrophic cardiomyopathy associated with a novel mutation in cardiac Myosin-binding protein C. *Rev Esp Cardiol*; **60(3)**:311-4.

- Gautel M., Zuffardi O, Freiburg A., Labeit S. 1995. Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction. *EMBO J*; **14**:1952–1960.
- Gautell M., Zuffardi O., Freiburg A., Labeit S. 1995. Phosphorylation switches specific for the cardiac isoform of myosin binding protein-C: a modulator of cardiac contraction. *The EMBO Journal*; **14**: 1952-196.
- Geisterfer-Lowrance A.A., Kass S., Tanigawa G., Vosberg H.P., McKenna W., Seidman C.E., Seidman J.G. 1990. A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a beta-myosin heavy chain gene missense. Mutation. *Cell*; **62**:999-1006.
- Gilbert R., Kelly M., Mikawa T. and Fischman D. 1996. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *Journal of Cell Science*; **109**: 101-111.
- Godiksen M., Granstrøm S., Koch J., Christiansen M., Godiksen et al. 2011. Hypertrophic cardiomyopathy in young Maine Coon cats caused by the p.A31P cMyBP-C mutation - the clinical significance of having the mutation. *Acta Veterinaria Scandinavica*; **53**:7.
- Gruen M., Prinz H., Gautel M. 1999. cAPK-phosphorylation controls the interaction of the regulatory domain of cardiac myosin binding protein C with myosin-S2 in an on-off fashion. *FEBS Lett*; **453**:254-259.
- Hagège A.A., Desnos M. 2009. New trends in treatment of hypertrophic cardiomyopathy. *Arch Cardiovasc Dis*; **102(5)**:441-7.

- Hallopeau M. 1869. Rétrécissement ventriculo-aortique; rétrécissement mitral; vascularisation des sigmoïdes aortiques; accidents d'anémie cérébrale. *Gazette Med Paris*; **24**:683-684.
- Hamdani N., de Waard M., Messer A.E., Boontje N.M., Kooij V., van Dijk S., Versteilen A., Lamberts R., Merkus D., Dos Remedios C., Duncker D.J., Borbely A., Papp Z., Paulus W., Stienen G.J., Marston S.B., van der Velden J. 2008. Myofilament dysfunction in cardiac disease from mice to men. *J Muscle Res Cell Motil*; **29(6-8)**:189-201.
- Hardarson T, De la Calzada CS, Curiel R, Goodwin JF. 1973. Prognosis and mortality of hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *Lancet*; **2**:1462-1467.
- Harris S.P., Rostkova E., Gautel M., Moss R.L. 2004. Binding of Myosin Binding Protein-C to Myosin Subfragment S2 Affect Contractility Independent of a Tether Mechanism. *Circ. Res*; **95**: 930-936.
- Hartzell H.C., Glassy D.V. 1984. Phosphorylation of Purified Cardiac Muscle C-protein by Purified CAMP-dependent and Endogenous Ca²⁺-Calmodulin-dependent Protein Kinases. *JBC*; **259**: 1-9.
- Hernández A., Sánchez F., Formento E., Garrido C., Dobón M., Gállego C. 2003. Muerte súbita secundaria a una displasia arritmogénica del ventrículo derecho en un paciente de 20 años. *Nota Clínica Emergencias*; **15**: 305-309.
- Hill W.A. 2006. Fisiología animal. Editorial medica Panamericana. Madrid España.
- Holmes K.C., Geeves M.A. 2000. The structural basis of muscle contraction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; **355**: 419-431.

- Huxley A.F. 1973. Lecture contraction muscular. *Journal of Physiology*; **243**(1):1-43.
- Huxley A.F., Niedergerke R. 1954. Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres. *Nature*; **173**(4412):971-973.
- Huxley H., Hanson J. 1954. Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*; **173**(4412):973-976.
- Ingles J., Doolan A., Chiu C., Seidman J., Seidman C., Semsarian C. 2005. Compound and double mutations in patients with hypertrophic cardiomyopathy: implications for genetic testing and counselling. *J Med Genet*; **42**:e59.
- Jaaskelainen P., Kuusisto J., Miettinen R., Karkkainen P., Karkkainen S., Heikkinen S., Peltola P., Pihlajamaki J., Vauhkonen I., Laakso M. 2002. Mutations in the cardiac myosinbinding protein C gene are the predominant cause of familial hypertrophic cardiomyopathy in eastern Finland. *J Mol Med*; **80**(7):412-422.
- Jacques A., Messer A., Tsang V., McKenna W., Marston S. 2006. Evidence for reduced troponin I phosphorylation and altered troponin function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. biophysical society abstracts. *Biophys J*; **90**:114.
- Jacques A.M., Copeland O., Messer A.E., Gallon C.E., King K., McKenna W.J., Tsang V.T., Marston S.B. 2008. Myosin binding protein C phosphorylation in normal, hypertrophic and failing human heart muscle. *J Mol Cell Cardiol*; **45**(2):209-16.

- Keren A., Syrris P., McKenna W.J. 2008. Hypertrophic cardiomyopathy: the genetic determinants of clinical disease expression. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*; **5(3)**:158-68.
- Kim B., Chang S., Kim S., Hwang J., Jung J. 2010. Dilated Cardiomyopathy in a 2 Month-Old Infant: A Severe Form of Hypocalcemia With Vitamin D Deficient Rickets. *Korean Circ J*; **40(4)**: 201–203.
- Kimura A. 2008. Molecular etiology and pathogenesis of hereditary cardiomyopathy. *Circ J*; 72:38-48.
- Kubo T., Kitaoka H., Okawa M., Matsumura Y., Hitomi N., Yamasaki N., Furuno T., Takata J., Nishinaga M., Kimura A., Doi YL. 2005. Lifelong left ventricular remodeling of hypertrophic cardiomyopathy caused by a founder frameshift deletion mutation in the cardiac Myosin-binding protein C gene among Japanese. *J Am Coll Cardiol*; **46**:1737-43.
- Kulikovskaya I., McClellan G., Flavigny J., Carrier L., Winegrad S. 2003. Effect of MyBP-C Binding to Actin on Contractility in Heart Muscle. *J. Gen. Physiol.*; **122**: 761-774.
- Kunst G., Kress K.R., Gruen M., Uttenweiler D., Gautel M., Fink R.H. 2000. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res*; **86(1)**:51-8.
- Lahiri D. and Nurnberger J. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*; **19** : 19.

- Lecarpentier Y., Vignier N., Oliviero P., Guellich A, k Lucie Carrier., Catherine Coirault. 2008. Cardiac Myosin-Binding Protein C Modulates the Tuning of the Molecular Motor in the Heart. *Biophysical J*; **95**: 720–728.
- Lekanne Deprez R.H., Muurling-Vlietman J.J., Hruda J., Baars M.J., Wijnaendts L.C., Stolte-Dijkstra I., Alders M., van Hagen J.M.. 2006. Two cases of severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy caused by compound heterozygous mutations in the MYBPC3. *J Med Gene*; **43(10)**:829-32.
- Liouville H. 1869. Rétrécissement cardiaque, sous-aortique. *Gazette Med Paris*; **24**:161-163.
- Luque L., Herráez A. 2006. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Primera edición. Editorial Elsevier. Madrid, España.
- Luther P.K., Bennett P.M., Knupp C., Craig R., Padrón R., Harris S.P., Patel J., Moss R.L.. 2008. Understanding the organisation and role of myosin binding protein C in normal striated muscle by comparison with MyBP-C knockout cardiac muscle. *J Mol Biol*; **5**; 384(1):60-72.
- Marian A.J., Yu Q.T., Mares A. Jr., Hill R., Roberts R., Perryman M.B.. 1992. Detection of a new mutation in the beta-myosin heavy chain gene in an individual with hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest* ; 90(6):2156-2165.
- Maron B. 2002. Hypertrophic cardiomyopathy A Systematic Review. *Journal of the American College of Cardiology* ; **287**: 10.
- Maron B., Towbin J., Thiene, G.; Antzelevitch C., Corrado D., Arnett D., Moss A., Seidman C., Young J. 2006. Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies. *Journal of the American heart Association*; **113**: 1807-1816.

- Maron B., Seidman J., Seidman C. 2004. Proposal for Contemporary Screening Strategies in Families With Hypertrophic Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* ; **44**: 11.
- Maron BJ, Gottdiener JS, Epstein SE. 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 Cardio*; **48**:418-428.
- Marsiglia JD, Batitucci Mdo C, Paula F, Barbirato C, Arteaga E, Araújo AQ. 2010. [Study of mutations causing hypertrophic cardiomyopathy in a group of patients from Espírito Santo, Brazil]: *Arq Bras Cardiol*; **94**(1):10-7.
- Martín M., Reguero J.J., Castro M.G., Coto E., Hernández E., Carro A., Calvo D., de la Tassa C.M. 2008. Hypertrophic cardiomyopathy and athlete's heart: a tale of two entities. *Eur J Echocardiogr* ;10(1):151-3.
- Mathews C.K. Van Hole, Ahren KG. Bioquímica. 3ª edición. Addison- Wesley. 2001.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Biotechnology*; **24**:99-103.
- McKenna W.J., Stewart J.T., Nihoyannopoulos P., McGinty F., Davies M.J. 1990. Hypertrophic cardiomyopathy without hypertrophy: two families with myocardial disarray in the absence of increased myocardial mass. *Br Heart J*; **63**:287-290.
- Messer A., Jacques A., Marston B. 2007. Troponin phosphorylation and regulatory function in human heart muscle: Dephosphorylation of Ser23/24 on troponin I could account for the contractile defect in end-stage heart failure. *J Mol Cell Cardiol*; **42**: 247–259.

- Meurs K.M., Norgard M.M., Ederer M.M., Hendrix K.P., Kittleson M.D. 2007. A substitution mutation in the myosin binding protein C gene in ragdoll hypertrophic cardiomyopathy. *Genomics*; **90**:261-264.
- Michael Arad¹, J.G. Seidman¹ and Christine E. Seidman. 2002. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics*; **11(20)**: 2499–2506.
- Miyamoto C.A., Fisman D.A., REINACH F C. 1999. The interface between MyBP-C and myosin: site-directed mutagenesis of the CX myosin-binding domain of MyBP-C. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*; **20**: 703-715.
- Moolman-Smook J., Flashman E., de Lange W., Li Z., Corfield V., Redwood C., 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(8):704-11.
- Morner S., Richard P., Kazzam E., Hellman U., Hainque B., Schwartz K., Waldenstrom A. 2003. Identification of the genotypes causing hypertrophic cardiomyopathy in northern Sweden. *J Mol Cell Cardiol*; **35**:841-849.
- Nagueh S.F., Bachinski L.L., Meyer D., Hill R., Zoghbi W.A., Tam J.W, Quiñones M.A., Roberts R., Marian A.J. 2001. Tissue Doppler Imaging Consistently Detects Myocardial Abnormalities in Patients With Hypertrophic Cardiomyopathy and Provides a Novel Means for an Early Diagnosis Before and Independently of Hypertrophy. *Circulation*; **104**:128-130
- Nihoyannopoulos P., Dawson D. 2009. Restrictive cardiomyopathies. *European Journal of Echocardiography*; **10**:iii23–iii33.

- Niimura H., Bachinski L.L., Sangwatanaroj S., Watkins H., Chudley A.E., McKenna W., Kristinsson A., Roberts R., Sole M., Maron B.J., Seidman J.G., Seidman C.E. 1998. Mutations in the gene for cardiac myosin-binding protein C and late-onset familial hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med*; **338**:1248-1257.
- Nyland L., Palmer B., Chen Z., Maughan D., Seidman C., Seidman J., Kreplak L. and Vigoreaux J. 2009. Cardiac Myosin Binding Protein-C Is Essential for Thick-Filament Stability and Flexural Rigidity. *Biophysical Journal*; **96** : 3273–3280.
- Oakley C.E., Chamoun C., Brown L., Hambly B. 2007. Myosin binding protein-C: Enigmatic regulator of cardiac contraction. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; **39**: 2161-2166.
- Oakley C.E., Hambly B.D., Curmi P., Brown L.J. 2004. Myosin Binding protein C: Structural abnormalities in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Cell res*; 14(2); 95-110.
- Offer G., Moos C., Starr R. 1973. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, Purification and characterization. *J Mol Biol*; **74**:653-676.
- Okagaki T., Weber F., Fischman D., Vaughan K., Mikawa T., Reinach F. 1993. The Major Myosin-binding Domain of Skeletal Muscle MyBP-C (C Protein) Resides in the COOH-terminal, Immunoglobulin C2 Motif. *The Journal of Cell Biology*; **123** (3): 619-626.
- Olivotto I., Girolami F., Ackerman M.J., Nistri S., Bos J.M., Zachara E., Ommen S.R., Theis J.L., Vaubel R.A., Re F., Armentano C., Poggesi C., Torricelli F., Cecchi

- F. 2008. Myofilament protein gene mutation screening and outcome of patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Mayo Clinic Proceedings*; **83**:630-638.
- Palemer B., Georgakopoulos D., Janssen P., Wang Y., Alpert N., Belardi D., Harris S., Moss R., Burgon P., Seidman C., Seidman J., Maughan D., Kass D. 2004. Role of Cardiac Myosin Binding Protein C in Sustaining Left Ventricular Systolic Stiffening. *J. of the Am H Ass*; **94**: 1249-1255.
 - Pohlmann L., Kroger I., Vignier N., Schlossarek S., Kramer E., Coirault C., Sultan K. El- Armouche A., Winegrad S., Eschenhagen T. and Carrier L. 2007. Cardiac Myosin- Binding protein C Is Required for Complete Relaxation in Intact Myocytes. *J. of the Am H As*; **101**: 928-938.
 - Ramírez C.D., Padrón R. 2004. [Familial hypertrophic cardiomyopathy: genes, mutations and animal models. A review]. *Invest Clin*; 45(1):69-99.
 - Richard P., Charron P., Carrier L., Ledeuil C., Cheav T., Pichereau C., Benaiche A., Isnard R., Dubourg O., Burban M., Gueffet J.P., Millaire A., Desnos M., Schwartz K., Hainque B., Komajda M. 2003. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation*; **107**:2227-2232.
 - Richard P., Villard E., Charron P., Isnard R. 2006. The Genetic Bases of Cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology*; **48**: 9.
 - Rodríguez J.E., McCudden C.R., Willis M.S. 2009. Familial hypertrophic cardiomyopathy: basic concepts and future molecular diagnostics. *Clin Biochem*; 42(9):755-65.

- Rosenzweig A, Watkins H, Hwang DS, Miri M, McKenna W, Traill TA et al. 1991. Preclinical diagnosis of familial hypertrophic cardiomyopathy by genetic analysis of blood lymphocytes. *N Engl J Med*; **325**:1753-1760.
- Rottbauer W., Gautel M., Zehelein J., Labeit S., Franz G.M., Fischer C. Vollrath V., Mall G., Dietz R., Kübler W., Katus H.A.1997. Novel Splice Donor Site Mutation in the Cardiac Myosin-binding Protein-C Gene in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy *J. Clin. Invest*; **100(2)**: 475–482.
- Sadayappan S., Gulick J., Osinska H., Martin L.A., Hahn H.S., Dorn G.W. II., Klevitsky R., Seidman C.E., Seidman J.G., Robbins J. 2005. Cardiac myosin binding protein-C phosphorylation and cardiac function. *Circ Res*; **97**:1156-1163.
- Sadayappan S., Osinska H., Klevitsky R., Lorenz J.N., Sargent M., Molkentin JD., Seidman C.D., Seidman J.G., Robbins J. 2006. Cardiac myosin binding protein c phosphorylation is cardioprotective. *PNAS*; **103**: 16918–16923.
- Sáenz de la Calzada C, Tello de Meneses R, Delgado Jiménez J, Gómez Pajuelo C, Gómez Sánchez MA, González Cocina E. 1996. Historia natural de la miocardiopatía hipertrófica. *Rev Esp Cardiol*; **49**:214-225.
- Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Plainview, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanbe A., Gulick J., Hayes E., Warshaw D., Osinska H., Chan C.B., Klevitsky R., Robbins J. 2000. Myosin light chain replacement in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; **279**:H1355-1364.

- Sata M., Ikebe M. 1996. Functional analysis of the mutations in the human cardiac beta-myosin that are responsible for familial hypertrophic cardiomyopathy. Implication for the clinical outcome. *J Clin Invest*; **15;98(12)**:2866-73.
- Schlender K.K., Bean L.J. 1991. Phosphorylation of chicken cardiac C-protein by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem*; **266**:2811-2817.
- Schmincke A. 1907. Ueber linksetigé muskul[^]se Conusstenosen. *Dtsch Med Wochenschr*; **33**:2082-2083.
- Seiler S., Fischman D., Leinwand L. 1996. Modulation of Myosin Filament Organization by C-Protein Family Members. *Molecular Biology of the Cell*; **7**: 113-127.
- 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(1-2)**:209-16.
- Spirito P., Seidman C., Mckenna W. and Maron B. 1997. The Management of Hypertrophic Cardiomyopathy. *N Engl J Med*; **336 (11)**: 775- 785.
- Squire J.M., Luther P.K., Knupp C. 2003. Structural evidence for the interaction of C-protein (MyBP-C) with actin and sequence identification of a possible actin-binding domain. *J Mol Biol*; **15; 331(3)**:713-24.
- Star R., Offer G. 1978. The Interaction of C-Protein with Heavy Meromyosin and Subfragment-2. *Biochemical Journal*; **171**:813-816.
- Tanjore R.R., Rangaraju A., Kerkar P.G., Calambur P., Nallari P. 2008. MYBPC3 gene variations in hypertrophic cardiomyopathy patients in India. *Can J Cardiol*; **24(2)**:127-130.

- Teare D. 1958. Asymmetrical hypertrophy of the heart in young adults. *Br Heart J*; **20**:1-18.
- Tong C.W., Stelzer J.E., Greaser M.L., Powers P.A., Moss R.L. 2008. Acceleration of crossbridge kinetics by protein kinase A phosphorylation of cardiac myosin binding protein C modulates cardiac function. *Circ Res*; 103:974-982.
- Van der Veldena J., Pappb Z., Zarembaa R., Boontjea N.M., De Jongc J.W., Owend V.J., Burton P.B.J , Goldmann P., Jaquet K. 2003. Increased Ca⁻sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res*; **57**: 37–47.
- Van Driest S.L., Jaeger M.A., Ommen S.R., Will M.L., Gersh B.J., Tajik A.J., Ackerman M.J. 2004. Comprehensive analysis of the beta-myosin heavy chain gene in 389 unrelated patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*; **44(3)**:602-610.
- Watkins H., Conner D., Thierfelder L., Jarcho J.A., MacRae C., McKenna W.J., Maron B.J., Seidman J.G., Seidman C.E. 1995. Mutations in the cardiac myosin binding protein-C gene on chromosome 11 cause familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet*; **11(4)**:434-7.
- Weisberg A., Winegrad S. 1996. Alteration of myosin crosses bridges by phosphorylation of myosin-binding protein C in cardiac muscle. *Cell Biol*; **93**:8999-9003.
- Weisberg A., Winegrad S. 1998. Relation between Crossbridge Structure and Actomyosin ATPase Activity in Rat Heart. *Circ. Res.* **83**: 60-72.

- Welikson R., Fischman D. 2002. The C-terminal IgI domains of myosin-binding proteins C and H (MyBP-C and MyBP-H) are both necessary and sufficient for the intracellular crosslinking of sarcomeric myosin in transfected non-muscle cells. *Journal of Cell Science* ;**115**: 3517-3526 .
- Winegrad S. 1999. Cardiac Myosin Binding Protein C. *Journal of the American Heart Association*; **84**: 1117-1126.
- Woo A., Rakowski H., Liew J.C., Zhao M.S., Liew C.C., Parker T.G., Zeller M., Wigle E.D., Sole M.J. 2003. Mutations of the beta myosin heavy chain gene in hypertrophic cardiomyopathy: critical functional sites determine prognosis. *Heart*; **89**:1179-1185.
- Xin B., Puffenberger E., Tumbush J., Bockoven J.R., Wang H. 2007. Homozygosity for a novel splice site mutation in the cardiac myosin-binding protein C gene causes severe neonatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Med Genet A*; 143(22):2662-2667.
- Yamamoto K., Moos C. 1983. The C-proteins of Rabbit Red, White, and Cardiac Muscles. *The Journal of Biological Chemistry*; **258 (13)**: 8395-8401.
- Yu B., French J.A., Carrier L., Jeremy R.W., McTaggart D.R., Nicholson M.R., Hambly B., Semsarian C., Richmond D.R., Schwartz K., Trent R.J. 1998. Molecular pathology of familial hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac myosin binding protein C gene. *J Med Genet*; 35(3):205-10.
- Yuan C., Guo Y., Ravi R., Przyklenk K., Shilkofski N., Diez R., Cole R. and Murphy A. 2006. Myosin binding protein C is differentially phosphorylated upon

myocardial stunning in canine and rat hearts— Evidence for novel phosphorylation sites. *Proteomics*; **6**: 4176–4186.

Recursos electrónicos.

- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.2011.
- <http://cardiogenomics.med.harvard.edu/home>2010.
- <http://ffas.ljcrf.edu/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>.2011.
- <http://meta.bioinfo.pl/modeller.pl?id=49154&meta=v2&server=rpdb90=0>.2011.
- http://meta.bioinfo.pl/submit_wizard.pl.2011.
- <http://swissmodel.expasy.org/>.2011.
- <http://www.ascardio.org/ascardioweb/intro.php>.2011.
- <http://www.ebi.ac.uk/>.2011.
- <http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>.2011.
- http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp.2011.
- <http://www.mpps.gob.ve/>.2011.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.2011.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.2011.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.2011.
- http://www.paho.org/home_spa.htm2011.
- <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>.2011.
- <http://www.who.int/es/>.2011.

ANEXOS

Para los controles:

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. Ésta enfermedad se ha asociado con la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del músculo del corazón.

Objetivo: El objetivo fundamental de esta investigación es el de realizar un estudio para identificar las mutaciones que se encuentren en los genes *myh7*, *mybpc3* y *myl2* en pacientes de Venezuela con CHF.

Estas investigaciones serán llevadas a cabo por Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) en colaboración con algunos hospitales del país. 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: Su participación en éste estudio consta de dos partes: La primera: Responder un cuestionario relacionado con la CHF, y la segunda proporcionar una muestra de sangre. Su participación es completamente voluntaria, así mismo si Ud. decide participar, puede retirarse del estudio sin perjuicio alguno para Ud., 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. Este estudio no implica riesgo alguno ni inconveniente para su salud.

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.

Preguntas:

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?.

Uso de las Muestras: Las muestras de sangre que le sean extraídas serán utilizadas para extraer 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: 0212-5041713.

I.V.I.C.

Dr. Raúl Espinosa

Médico. Cardiólogo.

Unidad de Cardiología Hospital Pérez Carreño

Consulta de Cardiología de Clínica Ávila. Caracas

Dra. Yris Flores.

Médico adjunto del servicio de Ecocardiografía.

ASCARDIO. Barquisimeto.

El propósito y procedimiento de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. He sido informado acerca de todas las incomodidades, riesgos y beneficios que pueden

resultar y los he comprendido. He sido informado de que pueden ocurrir eventos inesperados. 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 y los previstos riesgos, las incomodidades y los beneficios que pueden resultar. Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado sus preguntas con mi mayor capacidad. He considerado y rechazado procedimientos alternativos de respuesta a las preguntas sobre esta investigación.

Firma: _____

Fecha: _____

Para los pacientes:

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. Ésta enfermedad se ha asociado con la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del músculo del corazón.

Objetivo: El objetivo fundamental de esta investigación es el de realizar un estudio para identificar las mutaciones que se encuentren en los genes *myh7*, *mybpc3* y *myl2* en pacientes de Venezuela con CHF.

Estas investigaciones serán llevadas a cabo por Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) en colaboración con algunos hospitales del país.

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.

Derechos del Individuo:

- 1) Su participación es completamente voluntaria.

- 2) Ud. puede retirarse del estudio sin perjuicio alguno para Ud., ni repercusiones de ningún tipo, en el momento que Ud. lo desee.
- 3) Ud. será informado de cualquier cambio o información nueva que ocurriese durante el estudio y que pueda afectar su participación.

Beneficios del Individuo: Todos los participantes recibirán como beneficio el estudio genético de las familias así como también el asesoramiento correspondiente en relación al diagnóstico, pronóstico y riesgo de recurrencia de la enfermedad.

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

Procedimiento: Todos los pacientes que de acuerdo al protocolo clínico sean definidos como portadores del fenotipo de Cardiomiopatía Hipertrófica Familiar, se les hará la invitación para participar en éste estudio, así como también a los familiares directos del mismo (padre, madre, hermanos, tíos, abuelos). Si aceptan participar se les tomará una muestra de sangre (4 mL) para la extracción de 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 paciente 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: 0212-5041713.

I.V.I.C.

Dr. Raúl Espinosa

Médico. Cardiólogo.

Unidad de Cardiología Hospital Pérez Carreño

Consulta de Cardiología de Clínica Ávila. Caracas

Dra. Yris Flores.

Médico adjunto del servicio de Ecocardiografía.

ASCARDIO. Barquisimeto.

El propósito y procedimiento de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. He sido informado acerca de todas las incomodidades, riesgos u beneficios que pueden resultar y los he comprendido. He sido informado de que pueden ocurrir eventos inesperados.

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 Paciente: _____

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 y los previstos riesgos, las incomodidades y los beneficios que pueden resultar. Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado sus preguntas con mi mayor capacidad. He considerado y rechazado procedimientos alternativos de respuesta a las preguntas sobre esta investigación.

Firma: _____

Fecha: _____

Para los familiares:

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. Ésta enfermedad se ha asociado con la presencia de mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del músculo del corazón.

Objetivo: El objetivo fundamental de esta investigación es el de realizar un estudio para identificar las mutaciones que se encuentren en los genes *myh7*, *mybpc3* y *myl2* en pacientes de Venezuela con CHF.

Estas investigaciones serán llevadas a cabo por Investigadores del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C) en colaboración con algunos hospitales del país.

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: Ud ha sido referido como familiar (_____) del paciente:
_____ cuyo médico tratante
es:_____.

Sin embargo, su participación es completamente voluntaria. Si Ud. decide participar, puede retirarse del estudio sin perjuicio alguno para Ud., ni para sus familiares, ni repercusiones de ningún tipo, para Ud o para sus familiares, en el momento que lo desee. Asi mismo 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 sus familiares.

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.

Beneficios del Individuo: Ud recibirá como beneficio el estudio genético de su familia así como también el asesoramiento correspondiente en relación al diagnóstico, pronóstico y riesgo de recurrencia de la enfermedad.

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: 0212-5041713.

Dr. Raúl Espinosa

Médico. Cardiólogo.

Unidad de Cardiología Hospital Pérez Carreño

Consulta de Cardiología de Clínica Ávila. Caracas

Dra. Yris Flores.

Médico adjunto del servicio de Ecocardiografía.

ASCARDIO. Barquisimeto.

El propósito y procedimiento de este proyecto me han sido explicados y los he comprendido bien. He sido informado acerca de todas las incomodidades, riesgos u beneficios que pueden resultar y los he comprendido. He sido informado de que pueden ocurrir eventos inesperados. 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 y los previstos riesgos, las incomodidades y los beneficios que pueden resultar. Le he preguntado si tenía alguna pregunta sobre los procedimientos y he contestado sus preguntas con mi mayor capacidad. He considerado y rechazado procedimientos alternativos de respuesta a las preguntas sobre esta investigación.

Firma: _____

Fecha: _____