



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y
de la Salud.

TÍTULO:

**“ASOCIACIÓN ENTRE MUTACIONES DEL GEN *BMP2* E HIPERTENSIÓN
ARTERIAL PULMONAR, EN PACIENTES CON ESCLERODERMIA”**

MODALIDAD DE GRADUACIÓN : T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE : MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

P R E S E N T A :

JOSÉ LUIS HERNÁNDEZ OROPEZA.

TUTORES PRINCIPALES: Dr. Tomás Pulido Zamudio

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Dra. Tatiana Sofía Rodríguez Reyna

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Julio Sandoval Zárate

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

Dr. Carlos Rodríguez Osorio

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

México, D.F., Noviembre de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

ÍNDICE.....	1
1.-RESUMEN.....	3
2.-MARCO TEÓRICO.....	5
Esclerosis sistémica.....	5
Hipertensión arterial pulmonar.....	6
Hipertensión pulmonar asociada a esclerosis sistémica.....	9
Ecocardiografía en el diagnóstico de hipertensión pulmonar.....	11
Mutaciones del gen BMPR2 e hipertensión arterial pulmonar.....	13
3.- JUSTIFICACIÓN.....	20
4.-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	20
5.-HIPÓTESIS.....	21
6.-OBJETIVOS.....	21
7.-METODOLOGÍA.....	22
Diseño del estudio.....	22
Tamaño de la muestra.....	23
Criterios de inclusión y exclusión.....	24
Análisis estadístico.....	26
Descripción del procedimiento	27
Métodos de laboratorio.....	27
8.-RESULTADOS.....	29
9.-DISCUSIÓN.....	31
10.-CONCLUSIONES.....	36

11.-BIBLIOGRAFÍA.....	37
12.-ANEXOS.....	42
Tabla1.....	42
Tabla 2.....	43
Tabla 3.....	44
Tabla 4.....	44
Tabla 5.....	45
Figura 1.....	46
Figura 2.....	46
Figura 3 A.....	47
Figura 3 B.....	47
HRMA de un caso.....	48

RESUMEN

ANTECEDENTES. La prevalencia de hipertensión arterial pulmonar (HAP) en pacientes con esclerosis sistémica (ES, esclerodermia o escleroderma) es de 15 a 20% y es la principal causa de muerte en estos pacientes. Las mutaciones del gen del receptor de las proteínas morfogénicas del hueso tipo 2 (BMP2) se han asociado a otros tipos de HAP.

OBJETIVO. Determinar la prevalencia de las mutaciones del gen BMP2 en pacientes con ES con y sin HAP y estimar su asociación.

METODOLOGÍA. Estudio de casos y controles anidado en una cohorte. Casos: pacientes con ES y HAP. Controles: pacientes con ES sin HAP. Pareados por edad y tiempo de evolución de escleroderma. Determinamos la presencia de mutaciones por melting de alta resolución (HRMA).

En el análisis estadístico se evaluó la fuerza de asociación con una Razón de Momios (RM) calculada con el método de McNemar para estudios pareados, junto con su intervalo de confianza (IC) al 95%, la prueba de hipótesis en este caso se realizó con la prueba de χ^2 de McNemar. Las diferentes pruebas de hipótesis entre los casos y los controles se realizó con la prueba de rangos señalados de Wilcoxon o la prueba T pareada según corresponda. El nivel de significancia α se estableció a un 5% a 1 cola.

RESULTADOS. Se identificaron 38 casos y se parearon con 38 controles, 80% del sexo femenino al establecer una comparación entre casos y controles, la edad [mediana 51 intervalo intercuartil (39 - 64) vs 49 (38 - 59) años, P:0.48], tiempo de evolución de la escleroderma a partir del primer síntoma atribuible a la misma [mediana 12.5 intervalo intercuartil (6-19) vs 12(6-17)años, P:0.70].

En la prueba de caminata de 6 minutos [mediana 355 intervalo intercuartil (350-390) en casos vs 400 (400-405)metros en controles, P:<0.001], presión sistólica de arteria pulmonar [mediana 57 intervalo intercuartil (53-60) vs 25(25-28)mmhg, P:<0.001], velocidad máxima de insuficiencia tricuspídea [mediana 3.6 intervalo intercuartil (3.5-3.6) vs 2.5(2.4-2.7)metros/segundo, P:<0.001],

Excursión del anillo tricuspídeo ó TAPSE [mediana 17 intervalo intercuartil (15-18) vs 25(25-25) milímetros, P: <0.001].

Se identificaron mutaciones del gen BMPR2 en 7 casos (18%) y 1 control (3%). RM: 31 con IC al 95% (5.1-1263.4), P: < 0.001.

En un sub-análisis de los pacientes que tuvieron la mutación (como se muestra en la tabla 5) ; 75% son del sexo femenino (n=6) y 25% del sexo masculino (n=2), el 75% (n=6) con Esclerosis Sistémica Limitada y el 25% (n=2) con Esclerosis Sistémica Difusa. El 100% presentó actividad articular, el 88% (n=7) desarrolló HAP, el 75% (n=6) de los pacientes presentó Raynaud severo, 62% presentó alteraciones GastroIntestinales y fibrosis cutánea severa. El porcentaje de anticuerpos presentes (Topoisomerasa 12%, , RNP 25%, ANA 62%, ninguno con anticentrómero).

Se realizó una correlación de Spearman entre las variables de hipertensión arterial pulmonar y Raynaud grave obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.43 con una P= 0.078 con tendencia a la significancia estadística y un Intervalo de Confianza al 95% de (-1.076 a 0.767).

De los únicos 2 pacientes a los que les realizó cateterismo cardiaco derecho, con la mutación y con hipertensión arterial pulmonar el patrón hemodinámico fué de hipertensión arterial pulmonar severa con presión media pulmonar mayor de 40 mmhg, Índice de resistencias vasculares pulmonares mayores de 1500 dinas/seg/M² y en ambos casos fueron no respondedores a la prueba de vasorreactividad con adenosina.

CONCLUSIONES. La prevalencia de mutaciones del gen BMPR2 es mayor en pacientes con ES y HAP que en aquellos sin HAP. Los resultados sugieren que las mutaciones del gen BMPR2 incrementan el riesgo de desarrollar HAP en estos pacientes.

2.-MARCO TEÓRICO

ESCLEROSIS SISTÉMICA.

La Esclerosis Sistémica (ES) ó Esclerodermia es una enfermedad sistémica autoinmune, caracterizada por alteración de la microvasculatura, trastornos del sistema inmune, depósito de colágena y otras sustancias de la matriz extracelular en el tejido conectivo. Afecta a 250 personas por millón de habitantes en EUA ¹. Las manifestaciones clínicas consisten en engrosamiento de la piel y puede afectar a otros órganos y sistemas; pulmonar, renal, circulación periférica, sistema músculo esquelético, tracto gastrointestinal y corazón; por la extensión de la afección cutánea se clasifica en limitada o difusa ³. La forma difusa cutánea ES (ESdc) se presenta con progresiva induración de la piel que inicia en los dedos y ascenso distal a proximal en las extremidades, la cara y el tronco, estos pacientes están en riesgo para desarrollar, fibrosis pulmonar temprana y lesión renal aguda. En la forma limitada cutánea ES (ESlc) los pacientes tienen larga historia de fenómeno de Raynaud antes que aparezcan otras manifestaciones de la enfermedad, la induración de la piel está limitada a partes distales de extremidades (distal a codos y rodillas), sin afección de tórax ni abdomen. ^{1,3}

Las anormalidades vasculares son la parte central de la fisiopatología de la ES , la alteración principal es la pérdida de la relación normal entre células endoteliales, matriz extracelular y factores intravasculares ⁴; dando como resultado tanto alteraciones estructurales (hiperplasia de la íntima, fibrosis y oclusión) así como funcionales (activación endotelial, vasoreactividad y angiogénesis desorganizada), dichas anormalidades permiten la diseminación de manifestaciones clínicas tales como fenómeno de Raynaud, úlceras digitales, enfermedad pulmonar-renal, crisis renal e hipertensión arterial pulmonar ⁵. La prevalencia de estas complicaciones es variable, en cerca del 100% presentan fenómeno de Raynaud ⁶, 5% desarrolla crisis renal aguda ^{7, 8} y un

estimado 7 al 60% desarrolla hipertensión arterial pulmonar dependiendo del método diagnóstico (invasivo o no invasivo) ^{9, 10, 11}. Estas observaciones apuntan a que el grado de compromiso vascular no es universal y que es difícil de predecir ^{15,16}.

HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR.

La hipertensión pulmonar (HP) es un síndrome resultante de la restricción al flujo a través de la circulación arterial pulmonar, resultando en un incremento de la resistencia vascular pulmonar que culmina en una falla cardiaca derecha. Múltiples vías de patogenia han sido involucradas en el desarrollo de HP, desde el desbalance entre sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras incluyendo factores moleculares y genéticos ¹². La HAP es un estado hemodinámico y fisiopatológico heterogéneo que puede observarse en múltiples situaciones clínicas, que se han clasificado en 6 grupos diagnósticos.

Por lo tanto la hipertensión arterial pulmonar (HAP) que afecta a los pacientes del grupo 1, se define como la existencia de una presión arterial pulmonar media (PAPm) >25 mmHg, presión capilar pulmonar (PCP) < 15mmHg y resistencias vasculares pulmonares (RVP) < 3 unidades Wood. Incluye causas infrecuentes que tienen en común un cuadro clínico y hemodinámico comparable y unas alteraciones anatomopatológicas prácticamente idénticas en la microcirculación pulmonar. Comprende formas idiopáticas y familiares, así como las formas asociadas a enfermedades de tejido conectivo, cardiopatías congénitas con cortocircuito sistémico-pulmonar, hipertensión portal e infección por el VIH. Las lesiones anatomo-patológicas afectan especialmente a la microcirculación, arterias pulmonares distales (<500 micras). Se caracterizan por hipertrofia de la media, alteraciones proliferativas de la íntima, engrosamiento de la adventicia con infiltrados

inflamatorios perivasculares, lesiones complejas (lesiones plexiformes dilatadas) y lesiones trombóticas. Clásicamente, las venas pulmonares no se ven afectadas. Los procesos que inician las alteraciones anatomopatológicas observadas en la HAP no se conocen con exactitud debido a que la fisiopatología es multifactorial e intervienen diversos tipos celulares y vías bioquímicas. El aumento de las resistencias vasculares pulmonares (RVP) está relacionado con diferentes mecanismos, entre los que se encuentran la vasoconstricción, el remodelado proliferativo y obstrucción de la pared vascular pulmonar, la inflamación y la trombosis. El aumento de las RVP conduce a una sobrecarga del ventrículo derecho (VD), con hipertrofia y dilatación, y finalmente a una insuficiencia de VD y la muerte del paciente ¹⁸. La media de supervivencia en la era pre-tratamiento era de 1 año en adultos y 3 meses en niños. Actualmente se ha demostrado que determinados tratamientos farmacológicos específicos (prostanoides, antagonistas de los receptores de la endotelina e inhibidores de la fosfodiesterasa 5) son eficaces en este grupo y pueden administrarse también de manera combinada. Existe un algoritmo de tratamiento basado en la evidencia para estos pacientes ¹²

Clasificación actualizada de la Hipertensión Pulmonar (Dana Point 2008).

1.- Hipertensión Arterial Pulmonar (HAP)

- 1.1. HAP idiopática
- 1.2. Hereditaria (BMR2, ALK1)
- 1.3. Fármacos y toxinas
- 1.4. HAP asociada con
 - 1.4.1. Enfermedades del tejido conectivo
 - 1.4.2. Infección por VIH
 - 1.4.3. Hipertensión portal
 - 1.4.4. Cardiopatía congénita
 - 1.4.5. Esquistosomiasis
 - 1.4.6. Anemia hemolítica crónica
- 1.5. HP persistente del recién nacido.

¹. Enfermedad venooclusiva pulmonar o hemangiomatosis capilar pulmonar

2.-Hipertensión pulmonar debida a cardiopatía izquierda

- 2.1. Disfunción sistólica
- 2.2. Disfunción diastólica
- 2.3. Enfermedad valvular

3.-Hipertensión pulmonar debida a enfermedades pulmonares o hipoxia

- 3.1. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
- 3.2. Neumopatía intersticial
- 3.3. Apnea del sueño
- 3.4. Exposición crónica a gran altitud

4.-Hipertensión pulmonar tromboembólica crónica.

5.-Hipertensión pulmonar con mecanismos poco claros o multifactoriales

- 5.1. Trastornos mieloproliferativos, esplenectomía
- 5.2. Sarcoidosis, histiocitosis de células de Langerhans pulmonar, linfangioleiomiomatosis, leiomiomatosis, neurofibromatosis, vasculitis
- 5.3. Enfermedad por almacenamiento de glucógeno, enfermedad de Gaucher, trastornos tiroideos
- 5.4. Obstrucción tumoral, mediastinitis fibrosante, insuficiencia renal crónica en diálisis

HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR ASOCIADA A ESCLEROSIS SISTÉMICA.

La HAP es una complicación común de la ES, y es la principal causa de muerte en pacientes con ES limitada, en México la prevalencia de esta complicación en pacientes con ES es de 30% estimada por ecocardiograma². En la ES limitada la HAP es resultado de anomalías vasculares pulmonares y en ocasiones como causas concomitantes a anomalías cardíacas o compromiso del intersticio pulmonar. El daño vascular pulmonar ocurre principalmente en la forma Limitada de ES, frecuentemente en ausencia de enfermedad pulmonar intersticial (EPI) o si la hay se trata de EPI leve. En contraste, los pacientes con ES difusa desarrollan frecuentemente fibrosis pulmonar severa y cuando desarrollan hipertensión pulmonar esta se considera secundaria a hipoxemia, es decir del grupo 3¹³.

Como en otras formas de HAP, la disnea es el síntoma más común de presentación, desafortunadamente muchos pacientes no son enviados a valoración hasta que los síntomas son severos. Desde que el paciente se diagnostica con escleroderma debe ser considerado de alto riesgo para desarrollar HAP, se debe realizar un ecocardiograma basal y uno anual para evaluar la presencia de remodelación del ventrículo derecho, datos como hipertrofia o dilatación ventricular derecha, previos al desarrollo de los síntomas. Si el ecocardiograma es anormal, como en la hipertensión arterial pulmonar Idiopática (HAPI), debe realizarse un cateterismo cardíaco derecho, para confirmar el diagnóstico, evaluar la severidad hemodinámica y excluir otros factores que contribuyan al deterioro clínico, como son los defectos cardíacos o incremento de la presión venosa pulmonar¹⁸.

Aunque la ecocardiografía doppler tiene muy buena correlación con la hemodinamia y los hallazgos clínicos que sugerían la presencia de HAP, el cateterismo cardíaco derecho (CCD) con evaluación de las resistencias vasculares pulmonares se requiere para confirmar el diagnóstico y

para definir el perfil hemodinámico con detalle y exactitud. Algunos pacientes en quienes se sospecha HAP se podrá descartar el diagnóstico con pruebas no invasivas, sin embargo a todos los pacientes que se persistan con síntomas después de la evaluación no invasiva debe de realizárseles CCD previo al inicio de tratamiento específico .La prueba de vasodilatación aguda se realiza durante el cateterismo cardiaco derecho con agentes selectivos de la circulación pulmonar de acción rápida y corto efecto como son oxido nítrico, epoprostenol intravenoso o adenosina intravenosa. El razonamiento para esta prueba está basado en 2 factores : 1) la respuesta al vasodilatador identifica a los pacientes con mejor pronóstico y 2) los que respondan, probablemente tendrán un beneficio sostenido a calcio antagonistas orales, los pacientes candidatos a esta prueba son HAP idiopática, familiar, asociada a anorexigénicos y pacientes con escleroderma. Una prueba de vasoreactividad positiva se define como la disminución de 20% de la presión media pulmonar y de las resistencias vasculares pulmonares ^{12,14, 15, 16,17, 19, 20} .

Las razones para las diferencias de pronóstico entre hipertensión arterial pulmonar asociada a enfermedad de tejido conectivo especialmente escleroderma limitada, e hipertensión arterial pulmonar idiopática (HAPI), ambas del grupo 1 , pudiera explicarse debido a las co-morbilidades en pacientes con escleroderma (tales como enfermedad pulmonar intersticial) y la relación del factor de la edad relacionado al inicio tardío de HAP-ES ^{21,22,23} . También se sugiere que las alteraciones de la motilidad esofágica, la gastroparesia y la baja absorción intestinal pueden contribuir a la absorción y metabolismo alterados de la terapia oral específica ²⁴ . La asociación entre HAP moderada a severa (medidas por cateterismo cardiaco) tienen solamente una modesta significancia pronóstica, sin embargo un bajo índice cardiaco y una presión media de la aurícula derecha elevada están asociados consistentemente con pobre supervivencia ²⁵ .

ECOCARDIOGRAFÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE HIPERTENSIÓN PULMONAR.

Las guías recientes de práctica clínica sugieren que las conclusiones ecocardiográficas pueden asignar niveles de probabilidad. Uno de los problemas con el diagnóstico no invasivo es que el ecocardiograma transtorácico (ECOTT) reporta una estimación de la presión sistólica pulmonar en lugar de la presión media pulmonar en la cual está basada la actual definición de HAP.

Cuando la velocidad máxima de insuficiencia tricuspídea (VMIT) excede 2.8 metros/segundo, correlaciona con presión sistólica de la arteria pulmonar (PSAP) mayor de 36 mmHg, que a su vez correlaciona con una presión media de la arteria pulmonar (PmAP) por cateterismo de al menos 25 mmhg. Por consecuencia si la VMIT es menor de 2.8 metros/segundo el diagnóstico de HAP es improbable, si la VMIT se encuentra entre 2.8 y 3.4 metros/segundo es considerado probable y si la VMIT es mayor de 3.4 metros/segundo es considerado muy probable, tomando en cuenta que también existan otros signos ecocardiográficos de sobrecarga ventricular derecha por ejemplo dilatación e hipertrofia de de cavidades derechas¹².

VMIT m/seg	PSAP mmhg	Dilatación, hipertrofia VD	Grado probabilidad
≤ 2.8	≤ 36	No	Improbable
2.8-3.4	37-50	No	Probable
> 3.4	>50	Sí	Muy probable

La Ecocardiografía transtorácica bidimensional y ecocardiografía doppler se han convertido en herramienta clave para detección y manejo hemodinámico en estos pacientes.¹² El ecocardiograma doppler transtorácico como método no invasivo permite su diagnóstico a pesar de presencia de síntomas inespecíficos relacionado a HAP. Es útil como estudio de detección temprana de HAP tiene una sensibilidad hasta del 90% y especificidad 75%, aumentando la especificidad 97% al contar con los 3 parámetros de alta probabilidad descritos en el párrafo

anterior . La correlación de estos parámetros ecocardiográficos con el cateterismo cardiaco fue de $r=0.83$ ^{59, 60}, además es muy útil para excluir otras causas secundarias de hipertensión pulmonar como patología valvular, congénitas o miocárdicas.¹²

Los predictores ecocardiográficos de mal pronóstico en pacientes con HAP son derrame pericárdico recurrente, dilatación auricular y ventricular derecha, índice de excentricidad del Ventrículo Izquierdo (Lei) >1.2 , índice de rendimiento miocárdico del Ventrículo Derecho (Tei) 0.83 , excursión sistólica del anillo tricuspídeo (TAPSE) < 1.5 cm y dilatación de la vena cava inferior.⁵⁹

El ecocardiograma transtorácico es un componente esencial en el algoritmo diagnóstico de la hipertensión arterial pulmonar y que con los métodos actuales es posible confirmar el diagnóstico además tiene un valor pronóstico y ayuda al monitoreo de la eficacia del tratamiento⁶⁰.

Basados en estas recomendaciones , en este estudio consideramos como casos a los pacientes con esclerosis sistémica valorados por Reumatología en la clínica de Escleroderma, con datos clínicos de hipertensión arterial pulmonar valorados en Cardioneumología, en la clínica de Hipertensión Pulmonar del Instituto que además datos clínicos , contarán con un ecocardiograma con parámetros de alta probabilidad¹² .

MUTACIONES DEL GEN *BMPR2* E HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR.

Debido al crecimiento exponencial en materia de genómica médica, han surgido nuevas oportunidades para caracterizar el impacto del perfil genético del enfermo en la fisiopatología de la enfermedad, en las alternativas terapéuticas (farmacogenómica) e incluso en su pronóstico de vida. Un ejemplo fue el descubrimiento de la mutación en el gen del *BMPR2* (por sus siglas en inglés *Bone Morphogenic Protein Receptor*) en el 2000, en una cohorte de pacientes con hipertensión arterial pulmonar familiar²⁶. La comparación entre diversos genotipos de individuos afectados y no afectados orientó a los investigadores hacia el locus 31-33 del brazo largo del cromosoma 2. Fue en esta región donde se encontraron mutaciones en el gen *BMPR2* prevalentes en un 50 a 75% de los casos de HAP familiar²⁷.

El gen de 13 exones, codifica para un receptor que pertenece a la superfamilia de factores de transformación (TGF- β por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- β*) y de proteínas morfogénicas del hueso (BMP por sus siglas en inglés: *Bone Morphogenic Proteins*)²⁸. Estas proteínas expresadas en diversos tipos celulares, incluidas las células endoteliales y de músculo liso pulmonar controlan principalmente el ciclo celular inhibiendo el crecimiento y estimulando la apoptosis²⁹. El receptor tiene 4 dominios funcionales típicamente conservados dentro de la superfamilia que son el dominio N-terminal extracelular para el ligando, una región única transmembrana, región serina/treonina-cinasa y el dominio citoplasmático. Este último particularmente especial, tiene una porción larga codificada por el exón 12³⁰.

El *BMPR2*, inicia su acción con la heterodimerización junto con su homólogo el *BMPR1*, otro receptor transmembrana serina/treonina-cinasa. La activación del *BMPR1*, resulta en la fosforilación de proteínas reguladoras SMAD (por sus siglas en inglés *Mothers Against Decapentaplegic*) 1,5,8 que finalmente se dimerizan con la proteína SMAD-4 (vía común entre la

familia de TGF β). Este último complejo multiprotéico es trasladado al núcleo donde regula la transcripción de diversas proteínas que activan o reprimen el ADN y por ende, controlan funciones celulares específicas³¹. Entre las funciones específicas del BMPR2 se encuentran:

- 1) Inhibir el crecimiento e inducir apoptosis de las células del músculo liso vascular
- 2) Estimular el crecimiento de células endoteliales

Hasta la fecha se ha reportado que todas las mutaciones del gen BMPR2 se traducen en una disminución en la función del receptor (haploinsuficiencia)³². Sin embargo es importante mencionar que dependiendo del tipo de mutación, la vía de señalización se altera de diferentes maneras. Por ejemplo, sustituciones de aminoácidos en el dominio extracelular producen un cambio conformacional en el receptor que afecta parcialmente su función, y por otro lado, una alteración en el dominio serina/treonina-cinasa produce la pérdida total de señalización intracelular^{33,34}.

Finalmente la disfunción del receptor produce apoptosis excesiva de células endoteliales que a su vez, dispara el remodelamiento vascular a expensas de un crecimiento acelerado y sin control de células del músculo liso³⁵. Esta insuficiencia proteica ha sido incluso demostrada en estudios con inmunohistoquímica de muestras de tejido de pacientes con HAP idiopática que fueron sometidos a trasplante de corazón-pulmón^{36,37}.

Ahora bien, las vías intracelulares de los receptores para TGF- β y BMP son muy complejas, pues dentro de la misma célula, diversos factores de TGF actúan contradictoriamente con un BMP para regular la proliferación celular³⁸. Por ende la valoración de la función no sólo debe enfocarse en una sola proteína sino se debe tratar de abarcar la mayor parte de la superfamilia. Un ejemplo es el gen ALK-1 (por sus siglas en inglés *Activin Receptor-Like Kinase 1*), que codifica para el receptor

tipo 1 de TGF-B. Esta mutación es la principal responsable de la entidad conocida como Telangiectasia Hereditaria Hemorrágica (HHT por sus siglas en inglés *Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia* ó Síndrome de Osler-Weber-Rendu), asociada de igual manera a hipertensión arterial pulmonar hasta en 20% ³⁹.

A pesar de que la relación entre la alteración de la función del receptor BMPR2 y la presencia de HAP es franca para la subclase familiar (reportada hasta en un 80%), no es así para la HAP idiopática, pues sólo un 11-40% de los pacientes presentan una mutación heterocigota para el gen. Se ha estudiado bien que la herencia exhibe un patrón dominante con penetrancia incompleta. Esta última característica ha orillado a diversos investigadores a tratar de explicar la diversidad en la presentación clínica de aquellos pacientes portadores de una mutación.

Desde el primer reporte en el año 2000, se han descubierto alrededor de 298 mutaciones diferentes en el gen que codifica para el BMPR2 ⁴⁰. A diferencia de lo que se establecía anteriormente, las mutaciones no sólo se deben a alteraciones de una sola base nitrogenada (SNP por sus siglas en inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), sino también a deleciones o duplicaciones exónicas completas ⁴¹. Incluso existen reportadas mutaciones no para los genes que codifican a la proteína *per se*, sino en regiones no codificantes (intrones) dentro del gen pero que al mutar producen un codón de terminación prematura en el exón1, afortunadamente este último tipo de mutaciones pueden ser eliminadas por la vía de NMD (por las siglas en inglés *Nonsense-Mediated Decay*) ^{42,43}. Asimismo, se han reportado otro tipo de alteraciones como inestabilidad de microsatélites ⁴⁴ y alteraciones en los perfiles de expresión génica, ambas en biopsias de endotelio vascular pulmonar ⁴⁵.

Diversos grupos de investigación han realizado estudios para valorar la prevalencia de las mutaciones existentes (principalmente SNPs) y han reportado múltiples mutaciones nuevas. Se ha demostrado que las mutaciones más frecuentes en el marco de lectura del BMPR2, son aquellas por pérdida de una base (*Nonsense Mutations*, 29%) y las de corrimiento de marco (*frame-shift mutations*, 24%). Específicamente las mutaciones de corrimiento que se traducen en codones de terminación prematura y consecuentemente proteínas aberrantes⁴⁶, son el único grupo de mutaciones que tienen implicación clínica directa⁴⁷.

En los últimos 5 años, se han realizado estudios para valorar las diferencias clínicas entre portadores y no portadores de una mutación⁴⁸. Loyd y cols, demostraron que ciertos polimorfismos específicos correlacionaban con una edad al diagnóstico más temprana y con una mayor penetrancia del gen³⁸. Su estudio demostró que algunos individuos pueden estar afectados en más de una vía celular o en múltiples puntos de la misma vía, y esto de igual manera modifica la penetrancia. Asimismo, descubrieron que algunos individuos mostraban un fenotipo consistente para homocigoto, aún cuando no tuvieran una deficiencia enzimática completa. Este fenómeno fue denominado por los autores “Heterocigotos sinérgicos”.

Elliot y Cols, por su parte, realizaron un estudio donde comprobaron que los pacientes portadores de mutaciones del gen eran más propensos a tener una prueba de vasorreactividad negativa durante el cateterismo cardiaco derecho⁴⁹. Posteriormente Humbert y cols, realizaron un estudio donde correlacionaron la presencia de mutación del gen BMPR2 (un cambio de G por A en el Exón 5 en la posición 545⁴⁹), con otras variables clínicas. Encontraron que ser portador de una mutación, no modifica la supervivencia ($p < 0.51$) pero sí correlaciona con edad al diagnóstico más temprana (una diferencia de casi 10 años $p < 0.0001$), y con menor tiempo sin necesidad de trasplante de pulmón-corazón⁵⁰.

Resulta complicado establecer la prevalencia y el papel de la mutación del gen BMPR2 en HAP Idiopática la cual es definida como la ocurrencia aislada de HAP, sin causa identificada y sin afectación a otros miembros de la familia. El término idiopático se aplica cuando se busca intencionadamente y no se encuentra dicha mutación, pero no en todos los casos de HAP llamada idiopática se determinaba la mutación de BMPR2 rutinariamente. Algunos estudios han mostrado mutaciones del gen BMPR2 en más de 25% de los sujetos denominados previamente como HAP Idiopática, es decir, sin causa aparente y sin otros casos en la familia. Se ha especulado sobre las razones por las que otros miembros de la familia no están afectados; se han documentado algunas mutaciones *de novo* en el gen BMPR2, de tal manera que los pacientes índice son la primera persona con una nueva potencial familia con HAP. Las mutaciones de novo comprenden cerca del 25% del grupo de HAP idiopática en donde se encuentran mutaciones de BMPR2. La segunda explicación es la relativamente baja penetrancia de enfermedad clínica (20%) en sujetos con mutaciones del BMPR2, por lo que algunos pacientes con HAP Idiopática pueden pertenecer a familias con las mutaciones del BMPR2 pero con muy baja penetrancia de la enfermedad^{54,55}.

Interesantemente las mutaciones del BMPR2 no están limitadas a los pacientes con HAP Familiar y HAP Idiopática. Éstas se han encontrado en cerca de 6% de sujetos con HAP y enfermedades cardíacas congénitas y en varias familias con enfermedad pulmonar veno-oclusiva. Esto apoya la relevancia del receptor de BMPR2 en el desarrollo cardíaco fetal, e indica que las venas pulmonares pueden estar afectadas por un proceso de enfermedad similar al de las arteriolas.

Como se ha mencionado previamente, la HAP es una complicación de las enfermedades del tejido conectivo: esclerosis sistémica, enfermedad mixta del tejido conectivo, dermatomiositis y lupus eritematoso generalizado. La histopatología de las lesiones vasculares pulmonares es muy similar

a la observada en HAP Idiopática. El descubrimiento de mutaciones del gen ALK-1, se ha ligado a la patogénesis de la HAP con telangiectasia hereditaria hemorrágica (HHT), que causa epistaxis severa recurrente y telangiectasias diseminadas. Existen algunos paralelismos entre Escleroderma y HHT, ambas presentan telangiectasias y HAP en ausencia de enfermedad pulmonar intersticial o embolismo pulmonar. Es posible que los periodos de isquemia causados por recurrentes episodios de Raynaud activen la angiogénesis en pacientes con escleroderma.

Sin embargo a pesar de estos recientes avances en genética, hay poco conocimiento del papel de las mutaciones genéticas en pacientes con escleroderma e hipertensión arterial pulmonar. Las mutaciones de BMP2 no han sido identificadas en dos pequeñas cohortes de pacientes con escleroderma y HAP^{56,57}.

La prevalencia de las mutaciones del gen BMP2 en las diferentes poblaciones con HAP puede estar infra-estimada debido a la baja penetrancia. La prueba genética ahora está disponible en pocos centros, por lo que futuros estudios incluirán estudios con el genoma completo de poblaciones extensas con resultados relevantes, que ayudarán al mejor entendimiento del papel de esta y otras mutaciones en el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar⁵⁸.

HRMA (por sus siglas en inglés High Resolution Melting Analysis)

Este equipo ha ido poco a poco reemplazando al dHPLC por su mayor eficiencia en tiempo de procesamiento de muestras, mejor manejo post-PCR y finalmente porque no destruye el producto analizado y permite su re-uso para la secuenciación. Este procedimiento ha sido ampliamente validado para el monitoreo de plomorfismos en diversos genes (principalmente en el área de cáncer de mama) y se han reportado análisis de genes incluso hasta de 79 exones, con una sensibilidad y especificidad del 100 y 98% respectivamente⁵³. Se ha logrado confirmar la identificación de variantes presentes en heteroplásmidos con rangos de 1-100%. El proceso

consiste en someter las muestras de homo y heteroduplex a temperaturas elevadas para lograr su derretimiento (melting). Los productos son previamente marcados con un contraste para ADN y luego se corren en el equipo. Se pueden analizar hasta 96 muestras por placa, permitiendo un análisis rápido y eficiente. El equipo registra la fluorescencia a una determinada longitud de onda y traza una curva, en la cual conforme aumenta la temperatura se registra una disminución de fluorescencia. En caso de existir una mutación se traza una curva aberrante. Los heteroduplex son más termolábiles que los homoduplex y muestran una imagen similar a la figura 3.

3.-JUSTIFICACION.

No hay antecedentes de estudios de asociación entre mutaciones del gen *BMPR2* e hipertensión arterial pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica, y un proyecto de este tipo puede aportar valiosa información para apoyar y completar proyectos nacionales como el “Genoma de la población mestiza mexicana” e incluso internacionales, al descubrir posibles mutaciones específicas de la raza mestiza-mexicana. El INCMyNSZ es un centro de referencia nacional para enfermedades del tejido conectivo, la cohorte está constituida por un número significativo de paciente mexicanos con ES (aproximadamente 250 pacientes), provenientes de todo el país.

La evaluación de la prevalencia de mutaciones para el gen *BMPR2* en Escleroderma y su asociación con HAP así como la caracterización de cada una de estas mutaciones, todo en conjunto con una correcta valoración clínica ofrece una perspectiva diferente para el abordaje del paciente con HAP. De igual manera abre nuevos caminos para entender la fisiopatología de esta enfermedad, y expande el potencial de nuevas farmacoterapias, sobretodo de aquellas dirigidas a las diversas vías celulares de la familia de TGF-B y BMP.

4.-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe asociación entre la presencia de mutaciones del gen *BMPR2* e hipertensión arterial pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica?

5.-HIPÓTESIS.

Ho: No existe asociación entre la presencia de mutaciones del gen *BMPR2* e hipertensión arterial pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica.

H1: Existe asociación entre la presencia de mutaciones del gen *BMPR2* e hipertensión arterial pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica.

6.-OBJETIVOS:

OBJETIVO PRIMARIO:

Determinar la asociación entre la presencia de mutaciones del gen *BMPR2* e hipertensión arterial pulmonar en pacientes con esclerosis sistémica.

OBJETIVOS SECUNDARIOS.

Realizar un sub-análisis de los pacientes que resulten con la mutación del gen *BMPR2* de acuerdo al tipo de Esclerodermia, al tipo de anticuerpos presentes y al tipo de afecciones orgánicas.

7.-METODOLOGÍA GENERAL.

7.1-DISEÑO DEL ESTUDIO:

Se trata de un estudio de casos y controles anidado en una cohorte de pacientes con escleroderma, que involucra a un centro de referencia nacional de enfermedades del tejido conectivo (INCMyNSZ). Se eligió un control por caso, los controles se parearon por edad (± 5 años), género, grupo étnico y tiempo de evolución de la esclerosis sistémica, tomando en cuenta el primer síntoma atribuible a la escleroderma.

7.1.1-COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN:

El presente estudio de investigación fue registrado y avalado por el comité de ética e investigación del Instituto y la participación de los pacientes fue bajo consentimiento informado.

7.2 -TAMAÑO DE LA MUESTRA:

$$n = \frac{\left[z_{1-\alpha/2} \sqrt{2p(1-p)} + z_{1-\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right]^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

-Una cola

-Para un alfa de 0.05 y un poder de 0.8

-Buscamos un OR: 5

-Prevalencia de controles: 0.001

-Prevalencia de casos: 0.20

-n1 = 50 casos

-n2= 50 controles

7.3 –CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS CASOS:

- 1.-Pacientes con escleroderma e hipertensión arterial pulmonar del grupo 1
(Dana Point 2008)
- 2.-Pacientes que firmen el consentimiento informado.
- 3.- Clase funcional de la Organización Mundial de la Salud I, II, III o IV.
- 4.-Mayores de 17 años.
- 5.-Padres, abuelos y bisabuelos mexicanos.
- 6.- Diagnóstico de HAP por ecocardiografía y/o cateterismo cardiaco derecho:

ECOCARDIOGRAFÍA.

Para considerarse como caso el paciente debe cumplir al menos 3 de las 4 características siguientes en el ecocardiograma:

- a) Velocidad máxima de insuficiencia tricuspídea > de 3.4 metros/segundo
- b) Presión sistólica de la arteria pulmonar > 40 mmhg
- c) TAPSE < de 20 mm
- d) Dilatación e hipertrofia del ventrículo derecho

CATETERISMO CARDIACO DERECHO (* El cateterismo cardiaco es parte de la evaluación de un paciente con HAP en la clínica de hipertensión pulmonar del Instituto , pero el no tenerlo no fue criterio para no incluirlo en el estudio)

Para considerarse como caso el paciente debe cumplir las 3 siguientes características en el cateterismo cardiaco derecho:

- a) Presión arterial pulmonar media > de 25 mmhg.
- b) Presión capilar pulmonar menor de 15 mmhg.
- c) Resistencias vasculares pulmonares > 3 unidades Wood o 240 dinas /segundo/m².

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN DE LOS CASOS.

- 1.-Hipertension arterial pulmonar de otra etiología

CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LOS CONTROLES:

- 1.-Pacientes con escleroderma.
- 2.-Sin evidencia clínica ni por ecocardiograma de hipertensión arterial pulmonar.
- 3.-Pacientes que firmen el consentimiento informado.
- 4.- Clase funcional de la Organización Mundial de la Salud I, II, III , IV.
- 5.-Mayores de 17 años.
- 6.-Padres, abuelos y bisabuelos mexicanos.

7.4- VARIABLES

Variables demográficas

Edad
Sexo
IMC

Otras Variables

VARIABLE	TIPO	ESCALA	MEDICION
MUTACION del gen BMP2	Nominal		Presente Ausente
Dilatación del ventrículo derecho	Nominal		Presente Ausente
Hipertrofia del ventrículo derecho	Nominal		Presente Ausente
Velocidad máxima insuficiencia tricuspídea (VMIT)	Numérica	Continua	metros/segundo
Presión sistólica de la arteria pulmonar (PSAP)	Numérica	Continua	mmhg
Excursión del anillo tricuspídeo(TAPSE)	Numérica		mm

Presión media pulmonar	Numérica	Continua	mmhg
Presión capilar pulmonar	Numérica	Continua	mmhg
Resistencias Vasculares Pulmonares	Numérica	Continua	Dinas/seg/m²
Distancia recorrida en (Prueba de caminata de 6 minutos)	Numérica	Continua	Metros

Las variables se clasificaron de acuerdo a su distribución de normalidad.

7.5- ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Se evaluó la fuerza de asociación con una Razon de Momios (RM) calculada con el método de McNemar para estudios pareados, junto con su intervalo de confianza (IC) al 95%, la prueba de hipótesis en este caso se realizó con la prueba de χ^2 de McNemar. Las diferentes pruebas de hipótesis entre los casos y los controles se realizó con la prueba de rangos señalados de Wilcoxon o la prueba T pareada según corresponda. El nivel de significancia α se estableció a un 5% a 1 cola.

Se utilizó el programa STATA Statistic/Data Analysis versión 11.1

7.6-DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO:

Se determinará mediante el método de desnaturalización Melting (HRMA) la presencia o ausencia de mutaciones del gen BMP2.

7.7.-METODOS DE LABORATORIO.

Los procesos de laboratorio se dividen principalmente en:

1. Purificación de ADN de las muestras de sangre
2. Amplificación de los exones específicos
3. Monitorización (screening) de mutaciones en cada exón para cada paciente

Existen 2 métodos para llevar a cabo el monitoreo de mutaciones. Ambos procesos tienen fundamentalmente el mismo principio para encontrar alteraciones de bases nitrogenadas desde una base hasta una kilobase. Posterior al proceso de PCR se desnaturalizan los productos de una muestra control y de la muestra del paciente.

Las hélices desnaturalizadas se deben renaturalizar (ver fig 1) para que se junten las cadenas de controles (homoduplex) y cadenas mutadas con controles (heteroduplex). Una vez teniendo los heteroduplex las muestras se corren por los diferentes métodos de Screening.

PURIFICACIÓN DEL DNA

Las muestras fueron obtenidas de 38 casos y 38 controles de pacientes con esclerodermia con HAP y sin HAP, de sangre periférica (5 ml). La purificación del DNA fue realizada con el Kit de purificación Wizard@Genomic ADN (Promega) de acuerdo a la recomendación del fabricante . La cuantificación del DNA fue realizada por espectrofotometría empleando un equipo Nanodrop

1000 (Isogen, Sint-Pieters-Leeuw, Belgium). Se obtuvieron por cada muestra aproximadamente 10 µg de ADN. La pureza e integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de Agarosa al 2%.

REACCION EN CADENA DE POLIMERASA

La reacción de PCR en tiempo real fue realizada empleando el KIT Ssofast™ EvaGreen@ Supermix. USA., el procedimiento fue el siguiente: se mezclaron 10µl de cocktail 2x, 1µg de DNA, 1µl de primer Forward, 1µl de primer Reverse y se aforó con H₂O a 20µl. Las condiciones de reacción fueron: Temperatura de desnaturalización de 98 C⁰ durante 3 minutos en el primer ciclo y posteriormente 95 C⁰ por 30 segundos, temperatura de anillamiento 58 C⁰ por 30 segundos y temperatura de extensión 72 C⁰ por 30 segundos, amplificando la muestra durante 35 ciclos, en un equipo CFX 96 Real-Time-System (Bio-Rad, USA). Los cebadores para la amplificación de las 342 pares de bases (PB) que abarcó el exón 5 fueron Sense o forward 5' TCA TGC TAT TCT GCA TTC ATC T . 3', Antisense o reward 5' CAG GTC TAG TAT CAC AGT AGA . 3'

MELTING DE ALTA RESOLUCIÓN

Posterior al término del PCR en tiempo real descrito en el párrafo anterior, la determinación del punto de fusión (melting) fue realizada en el mismo equipo mediante el empleo del módulo C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA); Las curvas de Melting fueron analizadas con el programa Bio-Rad Precision Melt Analysis software (Bio-Rad, USA).

Como se comentó existen hasta el momento existen 298 mutaciones descritas del gen BMPR2, las cuales pueden estar presentes en los 11 exones, sin embargo se realizó la búsqueda de la mutación en el exón 5 debido a que en un estudio no publicado, en el laboratorio de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología , que es donde se procesan las muestras del estudio , se encontró en una población de pacientes con hipertensión arterial pulmonar idiopática una mayor frecuencia de curvas de Melting anormales en este exón.

8.-RESULTADOS

Se identificaron 38 casos y se parearon con 38 controles, 80% del sexo femenino. La tabla 1 muestra las características demográficas de los pacientes al establecer una comparación entre casos y controles, la edad [mediana 51 intervalo intercuartil (39 - 64) vs 49 (38 - 59) años, P:0.48], tiempo de evolución de la escleroderma a partir del primer síntoma atribuible a la misma [mediana 12.5 intervalo intercuartil (6-19) vs 12(6-17) años, P:0.70].

La tabla 2 muestra las características hemodinámicas de los pacientes. En la prueba de caminata de 6 minutos [mediana 355 intervalo intercuartil (350-390) en casos vs 400 (400-405) metros en controles, P:<0.001], presión sistólica de arteria pulmonar [mediana 57 intervalo intercuartil (53-60) vs 25(25-28)mmhg, P:<0.001], velocidad máxima de insuficiencia tricuspídea [mediana 3.6 intervalo intercuartil (3.5-3.6) vs 2.5(2.4-2.7)metros/segundo, P:<0.001], Excursión del anillo tricuspídeo ó TAPSE [mediana17 intervalo intercuartil (15-18) vs 25(25-25)milímetros,P: <0.001].

Cabe mencionar que de acuerdo a la definición operacional entre caso y control la diferencia entre los grupos era esperada al medir las características en clase funcional, prueba de caminata de 6 minutos y las variables hemodinámicas medidas por ecocardiografía.

Se identificaron mutaciones del gen BMP2 en 7 casos (18%) y 1 control (3%). RM: 31 con IC al 95% (5.1-1263.4),P: < 0.001.

En un sub-análisis de los pacientes que tuvieron la mutación (como se muestra en la tabla 5) : 75% son del sexo femenino(n=6) y 25% del sexo masculino (n=2), el 75% (n=6) con Esclerosis Sistémica Limitada y el 25% (n=2) con Esclerosis Sistémica Difusa. El 100% presentó actividad articular, el 88%(n=7) desarrolló HAP, el 75%(n=6) de los pacientes presentó Raynaud severo, 62%

presentó alteraciones GastroIntestinales y fibrosis cutánea severa . El porcentaje de anticuerpos presentes (Topoisomerasa 12%, , RNP 25%, ANA 62%, ninguno con anticentrómero).

Se realizó una correlación de Spearman entre las variables de hipertensión arterial pulmonar y Raynaud grave obteniéndose un coeficiente de correlación de 0.43 con una P= 0.078 con tendencia a la significancia estadística y un Intervalo de Confianza al 95% de (-1.076 a 0.767).

De los únicos 2 pacientes a los que les realizó cateterismo cardiaco derecho, con la mutación y con hipertensión arterial pulmonar el patrón hemodinámico fué de hipertensión arterial pulmonar severa con presión media pulmonar mayor de 40 mmhg, Índice de resistencias vasculares pulmonares mayor de 1500 dinas/seg/M2 y en ambos casos fueron no respondedores a la prueba de vasorreactividad con adenosina.

9.-DISCUSION

El presente trabajo de investigación es el primero que analiza la prevalencia de las mutaciones del gen BMPR2 en pacientes con esclerosis sistémica e hipertensión arterial pulmonar, en población mestizo mexicana.

Encontramos en este estudio de casos y controles de pacientes con esclerosis sistémica con y sin hipertensión arterial pulmonar en primer lugar una prevalencia total de 11 % en la muestra, 18% en casos y 3% en controles. En estudios previos y en poblaciones similares no se encontró prevalencia de la mutación del gen BMPR2^{56,57}, una posible explicación es que los tamaños de muestra fueron muy pequeños en estos estudios y a las técnicas no disponibles para la detección de dichas mutaciones el cual está limitado a pocos centros.

En segundo lugar encontramos una asociación entre la presencia de las mutaciones del gen BMPR2 y el riesgo de tener hipertensión arterial pulmonar con un RM estimado de 31, clínicamente significativa. Creemos que la asociación es sólida en términos biológicos, metodológicos y estadísticos.

Las fortalezas del estudio son que el diseño permitió controlar para los confusores al parear los casos con los controles por edad, sexo y tiempo de evolución de la esclerosis sistémica, esto representa una metodología sólida que soporta la asociación encontrada. Todos los pacientes fueron evaluados por Reumatología en la clínica de esclerodermia y en Cardioneumología por la clínica de hipertensión pulmonar del Instituto.

Presentamos los resultados de nuestro estudio usando métodos estadísticos que permiten controlar confusores utilizando X² de McNemar para estudios pareados.

Las limitaciones del estudio son que los pacientes con hipertensión arterial pulmonar fueron definidos por un ecocardiograma de alta probabilidad , sin embargo hasta el momento se cuenta con el cateterismo cardiaco del 55% de estos casos y en todos se confirmó la hipertensión pulmonar pre-capilar. Asimismo la presencia o ausencia de la mutación se determinó por el método del Melting (HRMA) la cual es una prueba con sensibilidad de 100% y especificidad del 98% para la determinación de mutaciones⁵³ , vale la pena señalar que en un estudio todavía no publicado en el Instituto Nacional de Cardiología en el laboratorio de biología celular donde se lleva a cabo el proceso de análisis de las muestras del presente reporte, en un estudio de asociación genética hubo concordancia del método con la secuenciación genética de un 100%.

Históricamente los pacientes con HAP asociada a ES tienen enfermedad más severa con la mortalidad más alta de todos los sub-grupos de HAP. Aunque los pacientes con HAP asociada a ES han mostrado mejoría en la supervivencia con la introducción de prostaciclina, antagonistas de receptores de endotelina e inhibidores de la fosfodiesterasa 5, su pronóstico continúa siendo peor incluso que el de los pacientes con HAP Idiopática. La prevalencia de HAP asociada a ES es alta y es la principal causa de muerte en ES.

A pesar de los recientes avances, hasta el momento no se conocen con claridad los factores de riesgo para desarrollar la enfermedad en este grupo de pacientes. Algunos autores sugieren que la presencia de ciertos autoanticuerpos, la gravedad de la afección vascular de la escleroderma y otras características clínicas de la enfermedad como edad de inicio pueden influir en el riesgo de desarrollar HAP en estos pacientes ^{61,63}. Los anticuerpos específicos de esclerodermia son infrecuentemente vistos en otras enfermedades del tejido conectivo. Estos anticuerpos están presentes usualmente desde el inicio de los síntomas y no cambian de un anticuerpo a otro diferente durante el curso de la enfermedad⁶¹. Se desconoce si los anticuerpos en ES tienen algún

papel en la patogénesis de la enfermedad pero son marcadores de características clínicas, genéticas y posiblemente etiológicas.

Hasta el momento de 9 anticuerpos séricos se han reportado en pacientes con esclerodermia: Anticentrómero (ACA), anti-topoisomerasa (anti-topo I; anti-Scl-70), anti-RNA polimerasa III (anti-RNAP III), anti-U1 RNP, anti-Ku, anti U11/U12 RNP y 3 anticuerpos anti-nucleolares (anti-U3 RNP, anti-PM-Scl y anti-Th/To). Cada paciente con ES típicamente es positivo para uno de estos anticuerpos. Es conocido que estos anticuerpos correlacionan con manifestaciones de la enfermedad y con el pronóstico⁶⁴.

Los anticuerpos anti-nucleolares han sido detectados en un 10 a 15% de los pacientes en los diferentes estudios. Las características clínicas y pronóstico de anti-U3 RNP no han sido bien caracterizados⁶⁵. En estudio retrospectivo observacional se encontró una alta proporción que anticuerpos anti-nucleolares en varones afroamericanos, una edad más temprana de inicio de la enfermedad, fibrosis cutánea importante, afección del músculo esquelético y HAP comparándose con sujetos sin el anticuerpo⁶⁶.

Todos los pacientes con escleroderma están en riesgo de desarrollar HAP y la presencia de ciertas características fenotípicas pueden ser de utilidad. Clásicamente los pacientes con fenómeno de Raynaud severo, escleroderma limitada y la presencia de anticuerpos anticentrómero tienen un riesgo mayor de presentar hipertensión arterial pulmonar⁶², en un estudio observacional de sujetos con ES y daño a órganos blanco de acuerdo al tipo de anticuerpos de Steen y Cols⁶³ los pacientes con escleroderma con anticuerpos anti-nucleares (ANA) con patrón nucleolar con anticuerpos anti-topoisomerasa (anti-Scl-70) negativo tuvieron una mayor frecuencia de HAP. A pesar que los ANA nucleolares aislados sólo están presentes en 15% de todos los pacientes con esclerodermia, más de un 30% de pacientes con ES y HAP tienen ANA con patrón nucleolar. Los

pacientes que tuvieron anticuerpos anti-U3 RNP y anti-Th/To desarrollaron con mayor frecuencia HAP y fibrosis pulmonar. En este estudio se encontró que el patrón de ANA nucleolares puede ser muy útil para la identificación temprana de pacientes con ES en riesgo de desarrollar HAP⁶³.

En el presente estudio en los pacientes con la mutación del gen BMPR2 hay una alta proporción de pacientes con anticuerpos antinucleares (ANA) con patrón anti-nucleolar 62% a diferencia de estudios previos no hubo afección del músculo esquelético pero si de fibrosis cutánea importante e hipertensión arterial pulmonar. En estos pacientes no se encontró la presencia de anticuerpos anticentrómero.

No hay antecedente en la descripción del tipo de esclerodermia con la mutación del del gen BMPR2 y el presente estudio aporta que la mayoría de pacientes fueron ES limitada (tabla5), el 100% presentó actividad articular y de los únicos 2 pacientes a los que les realizó cateterismo cardiaco derecho, con la mutación y con hipertensión arterial pulmonar el patrón hemodinámico fue de hipertensión arterial pulmonar severa y en ambos casos fueron no respondedores a la prueba de vasorreactividad con adenosina, lo cual concuerda con los hallazgos de Elliot y Cols⁴⁹.

De igual manera, se ha visto que nuestra población se comporta en cierta forma diferente a la descrita en estudios internacionales⁵¹. Por ejemplo, la mortalidad de HAP idiopática reportada en adultos en el Instituto Nacional de Cardiología, tienen una mayor supervivencia comparados con otros grupos étnicos. Además otros estudios realizados por Sandoval y cols demuestran que la población pediátrica tiene la misma evolución que su contraparte adulta, lo cual difiere de otros reportes internacionales, donde este grupo tiene a tener peor pronóstico⁵². Este tipo de comportamiento invita a buscar una particularidad en el genotipo de nuestra población que confiera información de un pronóstico diferente frente a otros grupos étnicos.

El presente estudio nos permitió conocer que a diferencia de otras poblaciones (con tamaños de muestra muy pequeñas) donde no se había reportado la presencia de mutaciones del gen BMP2, en esta muestra de pacientes de población mexicana con esclerodermia la prevalencia es del 11%. También nos permitió estimar en esta muestra de pacientes con esclerodermia, que existe un mayor riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar por ser portador de la mutación en comparación los pacientes con esclerodermia sin la mutación.

PERSPECTIVAS: El presente estudio servirá para en un futuro a mediano plazo documentar la genotipificación completa (mediante secuenciación del gen) , establecer claramente una relación genotipo-fenotipo de estos pacientes para su mejor caracterización y de igual manera explorar este tipo de mutaciones en otras enfermedades del tejido conectivo.

CONFLICTO DE INTERES : Ninguno

10.-CONCLUSIONES

La prevalencia de mutaciones del gen BMPR2 en pacientes con esclerodermia con hipertensión arterial pulmonar es mayor en comparación con esclerodermia sin hipertensión arterial pulmonar, 18% en los casos vs 3% en los controles . Los resultados sugieren que las mutaciones del gen BMPR2 incrementan el riesgo de desarrollar HAP en estos pacientes.

De los pacientes que tuvieron la mutación del gen BMPR2 las características más frecuentes fueron predominantemente del sexo femenino, Escleroderma Limitada, el tipo de anticuerpos antinucleares (ANA) y las afecciones orgánicas más frecuentes fueron; articular, Raynaud severo, fibrosis cutánea severa y alteraciones gastrointestinales.

11.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Mayes MD, Lacey JV jr, Beebe-Dimmer J, et al. Prevalence, incidence, survival, and disease characteristics of systemic sclerosis in a large US population. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2246-2255.
- 2.- Rodriguez-Reyna TS, Hinojosa-Azaola A, Martinez-Reyes C, Nuñez-Alvarez CA, Torrico-Lavayen R, Garcia-Hernandez JL, Cabiedes-Contreras J. Distinctive autoantibody profile in Mexican Mestizo systemic sclerosis patients. *Autoimmunity* 2011; 44:576-584.
- 3.-Le Roy EC, Black C, Fleischmajer R, et al. Scleroderma (systemic sclerosis), classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol* 1988 ;15:202-205.
- 4.-Schachna L, Wigley FM. Targeting mediators of vascular injury in scleroderma. *Current Opinion Rheumatology* 2002; 14:686-693.
- 5.-Kahaleh B. Vascular disease in scleroderma: mechanism of vascular injury. *Rheum Dis Clin North Am* 2008 ;34-57.
- 6.-Guducci S , Giacomelli R, Cerinic MM. Vascular complications of scleroderma. *Autoimmun Rev* 2007 ;6: 520-523.
- 7.-Penn H, Howie AJ, Kindon AEJ, et al. Scleroderma renal crisis: patients characteristics and long term outcomes. *QJM* 2007; 100:485-494.
- 8.-Teixeira L, Mouthon L, Mahr, et al. Mortality and risk factors of scleroderma renal crisis: a French retrospective study of 50 patientes. *Ann Rheum Dis* 2008; 67:110-116.
- 9.-Mukerjee D, St George D, ColeiroB, et al. Prevalence and outcome in systemic sclerosis associates pulmonary arterial hypertension: application of a registry approach. *Ann Rheum Dis* 2003; 62:1088-1093.
- 10.-Hachulla E, Gressin V, Guillevin L et al. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nation wide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 3792-3800.
- 11.-Wigley FM, Lima JA, Mayes M, et al. The prevalence of undiagnosed pulmonary arterial hypertension in subjects with connective tissue disease at the secondary healthcare level of community-based rheumatologists (the UNCOVER study). *Arthritis Rheum* 2005; 2005:52:2125-2132.
- 12.-ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2009; 119.
- 13.-Stupi AM, Steen VD, Owens GR, et al. Pulmonary Hypertension in the CREST syndrome variant of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 515-524.
- 14.-Ungerer RG, Tashkin DP, Furst D, et al. Prevalence and clinical correlates of pulmonary arterial hypertension in progressive systemic sclerosis. *AM J Med* 1983; 75: 65-74.

- 15.-Salerni R, Rodnan GP, Leon DF, et al. Pulmonary hypertension in the CREST syndrome . A variant of progressive systemic sclerosis. *Ann Intern Med* 1977; 86: 394-399.
- 16.-Steen V: Systemic sclerosis and related syndromes: clinical features. In *Primer on Rheumatic Diseases*. Edited by Klippel JHCL, Stone JH, Weyand CM. Atlanta: Atlanta Arthritis foundation: 1977:267-272.
- 17.-Campbell E, Harris B: Idiopathic pulmonary fibrosis clinical conference. *Arch Intern Med* 1981; 141: 771-774.
- 18.-Andrew J Peacock, Lewis J Rubin. *Pulmonary Circulation: Diseases and their Treatment*. Second Edition 2004; 181-190.
- 19.-Sibon O, Humbert M, Jais X, et al. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111: 3105-11.
- 20.-Klings ES, Hill NS, Leong MH, et al, Systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension: short-and long-term effect of epoprostenol (prostacilin). *Arthritis Rheum* 1999; 42:2638-45.
- 21.-Fisher MR, Mathai SC, Champion HC, et al. Clinical differences between idiopathic and scleroderma-related pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum* 2006; 54:3043-3050.
- 22.-Kawut SM, Taichman DB, Archer-Chiko CL , et al. Hemodynamics and survival in patients with pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis. *Chest* 2003; 123:344-350.
- 23.-Schachna L, Wigley FM, Chang B, et al. Age and Risk of pulmonary arterial hypertension in scleroderma. *Chest* 2003; 124:2098-2104.
- 24.-Mathai SC, Girgis RE, Fisher MR, et al. Addition of sildenafil to bosentan monotherapy in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2007; 29: 469-475.
- 25.-Macnee W. Right ventricular function in cor pulmonale. *Cardiology* 1998; 75(Suppl):30-40.
- 26.-Lane KB, Machado RB, et al. Heterozygous germline mutations in *BMP2*, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nature Genetics* 2000; 25:81-84.
- 27.-Newman JH ,et al. Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of pulmonary hypertension in a large kindred. *NEJM* 2001;345(5): 319-324.
- 28.-Newman JH,Phillips JA, Loyd JE.Narrative Review. The enigma of pulmonary arterial hypertension: new insights from genetic studies. *Ann Internal Medicine* 2008; 148:278-283.
- 29.-Chan S, Lozcalzo J. Pathogenic mechanism of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Cell Cardiology* 2008; 44:14-30.
- 30.-Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J. Human type II receptor for bone morphogenic proteins(BMPs) extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*.1995;15:3479-86.

- 31.-Derynck R, et al. Smad-dependent and Smad- Independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 2003;425:577-584.
- 32.- Machado R, et al. BMPR2 haploinsufficiency as a the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Human Genetic* 2001; 68:92-102.
- 33.- Nishihara et al. Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* 2001;13: 3055-63.
- 34.-Rudarakanchana et al. Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genetic* 2002; 11:1517-25.
- 35.-Rabinovich M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2008;118: 2372-79.
- 36.-Atkinson C, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002; 105:1672-78.
- 37.-StewartD. Bone morphogenic protein receptor-2 and pulmonary arterial hypertension: unraveling a riddle inside an enigma. *Circulation* 2005;96: 1033-1035.
- 38.-Philips JA, et al. Synergistic heterozygosity for TGFB SNPs and BMPR2 mutations modulates the age at diagnosis and penetrance of familial pulmonary arterial hypertension. *Genetic Medicine* 2008;10: 359-65.
- 39.-FujiwaraM, et al. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to Bone Morphogenic Protein Receptor II Gene (BMPR2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008; 72:127-133.
- 40.-Machado RD, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am College Cardiology* 2009;54: S32-S42.
- 41.-Cogan JD, et al. High Frecuency of BMPR2 exonic deletion/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J resp Crit Care Med* 2006;174:590-598.
- 42.- Alfred M. BMPR2 gene rearrangements account for a significant proportion of mutations in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 2006;27:212-213.
- 43.-Alfred et al. Characterization of the BMPR2 5'- untraslated region and novel mutation in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:819-24.
- 44.-Machado R, et al. Investigation of second genetic hits at the BMPR2 locus as a modulator of disease progression in familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005;111:607-613.

- 45.-Geraci M, et al. gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: A gene microarray analysis. *Circ Res* 2001;88:555-562.
- 46.-Morisaki H, et al. BMPR2 mutations found in Japanese patients with familial and sporadic primary pulmonary hypertension. *Hum Mutat* 2004;23:632.
- 47.-Koehler R, et al. Low frequency of BMPR2 mutations in a german cohort of patients with sporadic idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2004;4:e127.
- 48.-Rosenzweig R, et al. Clinical implications of determining BMPR2 mutations status in a large cohort of children and adults with pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:668-74.
- 49.-Elliot CG, et al. Relationship of BMPR2 mutations to vasoreactivity in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 113:2509-15.
- 50.-Sztrymf B, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in Carriers of BMPR2 mutation. *AM J resp Crit Care Med* 2008;177:1377-1383.
- 51.-Sandoval J, et al. Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. *Circulation* 1994;89:1733-44.
- 52.-Sandoval J, et al. Primary pulmonary hypertension in children: clinical characterization and survival. *J Am Coll cardiology* 1995; 25:466-74.
- 53.-Vossen et al. Hig-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum Mutat* 2009;30: 860-6.+
- 54.- Newman JH, et al. Genes and pulmonary hypertension. *Advances in Pulmonary Hypertension* 2006: 21-23.
- 55.-Portillo K, et al. Estudio del gen BMPR2 en pacientes con hipertensión arterial pulmonar. *Archivos de Bronconeumología* 2010; 46: 129-134.
- 56.-Callaghan AS, et al. Mutations of activin-receptor-like kinase 1(ALK-1) are not found in patients with pulmonary hypertension and underlying connective tissue disease. *Clin Rheumatol* 2007;26:947-49.
- 57.-Morse J, et al. Pulmonary hypertension in scleroderma spectrum of disease: lack of bone morphogenetic protein receptor 2 mutations. *J Rheumatol* 2002;29:2379-81.
- 58.-Hassoun P. *Pulmonary Arterial Hypertension Complicating Connective Tissue Diseases*. Pulmonary hypertension 2010 Elsevier: 161-175.
- 59.-Habib G, Torbicki A. The role of echocardiography in the diagnosis and management of patients with pulmonary hypertension. *Eur Respiratory* 2010; 19:288-299.

- 60.-Bossone E, et al. Pulmonary Arterial Hypertension, the key role of Echocardiography. CHEST 2005;127: 1836-1843.
- 61.-Reveille JD. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: anticentromere, Scl-70, and nucleolar antibodies. Arthritis Rheum 2003; 49: 399-12.
- 62.-Fischer A. Practical Approach to Screening for Scleroderma, Associated Pulmonary Arterial Hypertension. American C. of Rheumatology 2012; 64: 303-310.
- 63.-Steen VD. Autoantibodies in Systemic Sclerosis. Seminar Arthritis Rheum. 2005; 35-42.
- 64.-Okano Y. Antinuclear antibodies in systemic sclerosis(scleroderma). Rheum Dis Clin North Am 1996; 22: 709-35.
- 65.- Riboldi P, et al. Antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Clin Exp Rheum 1985; 31:205-11.
- 66.-Aggarwal R, et al. Anti-U3 RNP Autoantibodies in Systemic Sclerosis. American C of Rheumatology 2009; 60: 1112-1118.

12.-ANEXOS

Tabla 1

VARIABLES DEMOGRAFICAS

Variable	Casos n=38	Controles n=38	P
Edad (años) <i>md e intervalo intercuartil</i>	51 (39-64)	49 (38-59)	0.48*
Tiempo de evolución (años) <i>md e intervalo intercuartil</i>	12.5 (6-19)	12 (6-17)	0.70*
IMC (kg/m2) <i>Media y desviación estándar</i>	23.7 ± 4.35	23.11 ± 4.0	0.50 **

*Prueba de Rangos Señalados de Wilcoxon

**Prueba T pareada

Tabla 2

VARIABLES HEMODINÁMICAS

Variable	Casos n=38	Controles n=38	P
Prueba de caminata de 6 minutos (metros) <i>md e intervalo intercuartíl</i>	355 (350 - 390)	400 (400-405)	<0.001*
Velocidad máxima de insuficiencia tricuspídea (metros /segundo) <i>md e intervalo intercuartíl</i>	3.6 (3.5-3.6)	2.5 (2.4-2.7)	<0.001*
Presión sistólica de la arteria pulmonar (mmhg) <i>md e intervalo intercuartíl</i>	57 (53-60)	25 (25-28)	<0.001*
Excursión del anillo tricuspídeo (mm) <i>md e intervalo intercuartíl</i>	17(15-18)	25 (25-25)	<0.001*

***Prueba de Rangos Señalados de
Wilcoxon**

Tabla 3

PREVALENCIA DE MUTACIONES DEL GEN *BMPR2*

Variable	Casos n / %	Controles n / %	P
Mutación del gen <i>BMPR2</i>	7 (18)	1(3)	<0.001*

* χ^2 de McNemar

Tabla 4

RAZON DE MOMIOS

Variable	R M	Intervalo de confianza al 95%	P
Mutación del gen <i>BMPR2</i>	31	5.1 – 1263.4	< 0.001 *

* χ^2 de McNemar

Tabla 5

PACIENTES CON MUTACIÓN DEL GEN BMPR2

	Número	%
	(N=8)	
Sexo femenino	6	75
Esclerodema Limitada	6	75
Escleroderma Difusa	2	25
HAP	7	88
Raynaud grave	6	75
Afección Articular	8	100
Afección	5	62
Gastrointestinal		
Fibrosis cutánea	5	62
anti topoisomerasa	1	13
RNP	2	25
ANA	5	62

Figura 1

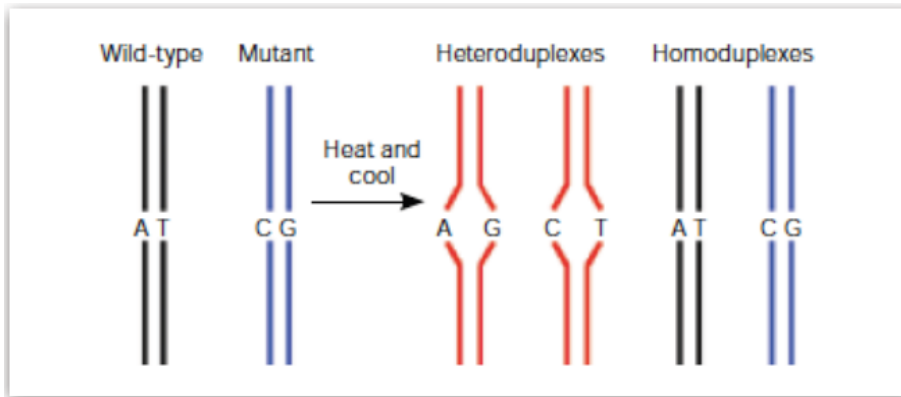


Figura 1. Desnaturalización y renaturalización de muestras de ADN para formar homo y heteroduplex.

Figura 2

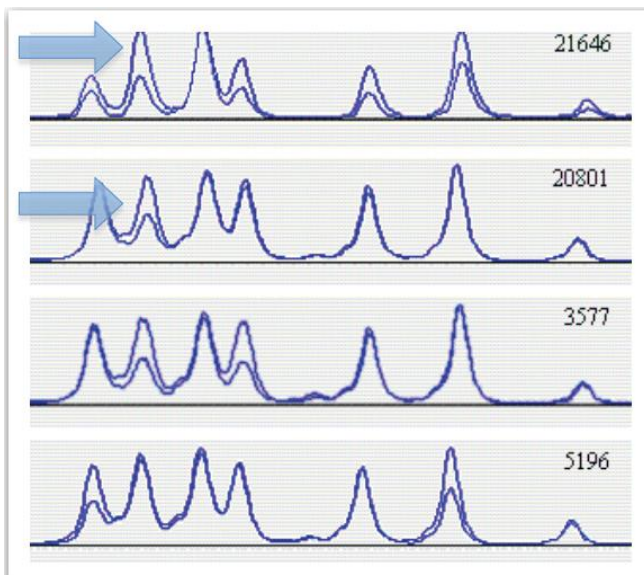
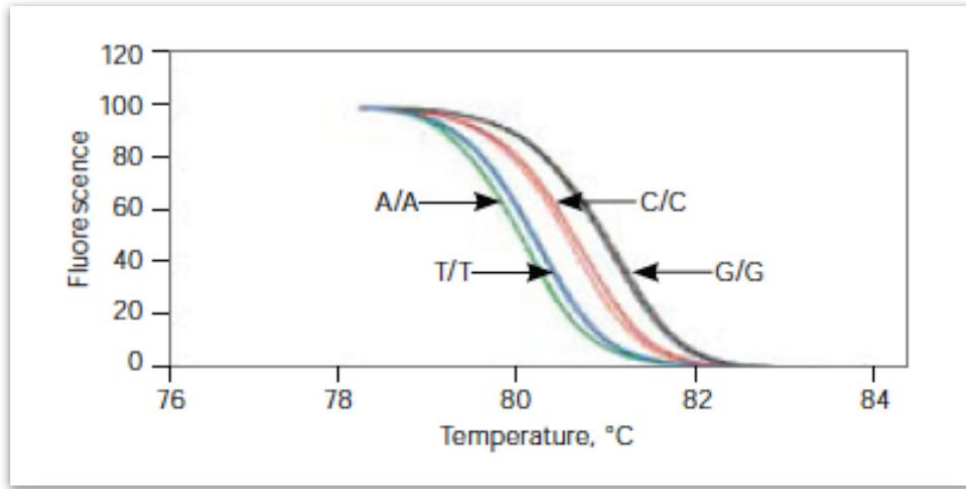


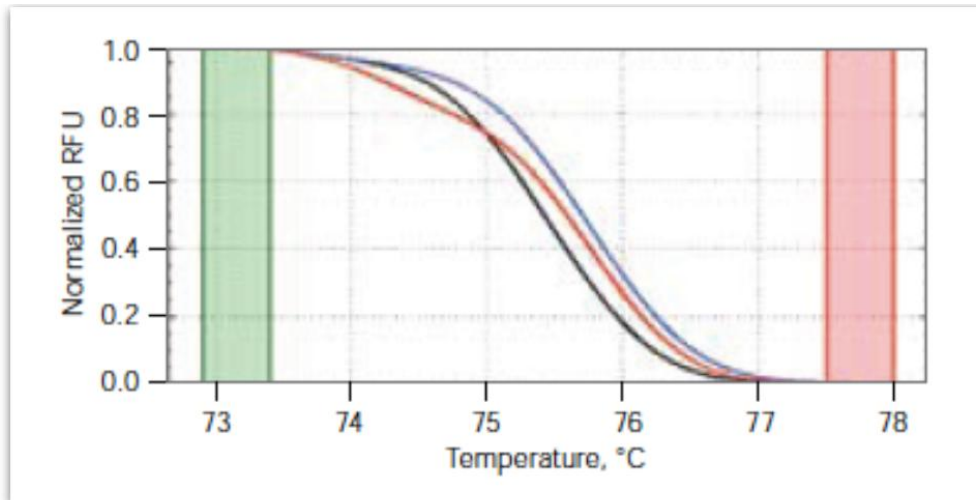
Figura 2. Se aprecian donde las disminuciones mayores al 50% (flechas azules) del pico máximo (control sano) confirman una alteración de la secuencia y por ende debe ser secuenciada.

Figura 3 A



A

Figura 3 B



B

Figura 3. A) Curva normal para muestras sin mutación. Se puede observar que hay diferentes curvas de derretimiento dependiendo si los fragmentos son más ricos en bases G/G o C/C. Los fragmentos ricos en G/C son más termoestables que los fragmentos ricos en A/T. B) Curva anormal para muestras con heteroduplex los cuales son representados en la curva color rojo. La curva es menos simétrica porque es menos termoestable.



reuma exon 5-11 13 06 12 analysis 1.melt

13/06/2012 06:44 p.m.

Report Information

User: BioRad\admin
Data File Name: reuma exon 5-11 13 06 12 analysis 1.melt
Data File Path: C:\Documents and Settings\JOSE ANTONIO\Escritorio\Melting.CFX96\REUMA
Well Group Name: All Wells
Report Differs from Last Save: Yes

Run Setup

Run Information

Run User: admin
Run Date: 13/06/2012 10:08:14 a.m.
ID:
Notes:
Sample Volume: 20
Temperature Control Mode: Calculated
Lid Temperature: 105
Base Serial Number: CC011613
Optical Head Serial Number: 785BR4560

Protocol

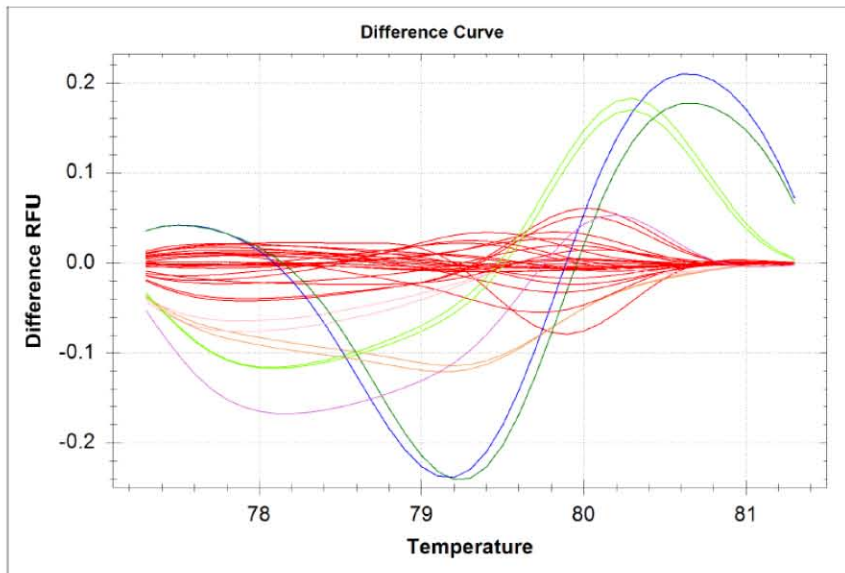
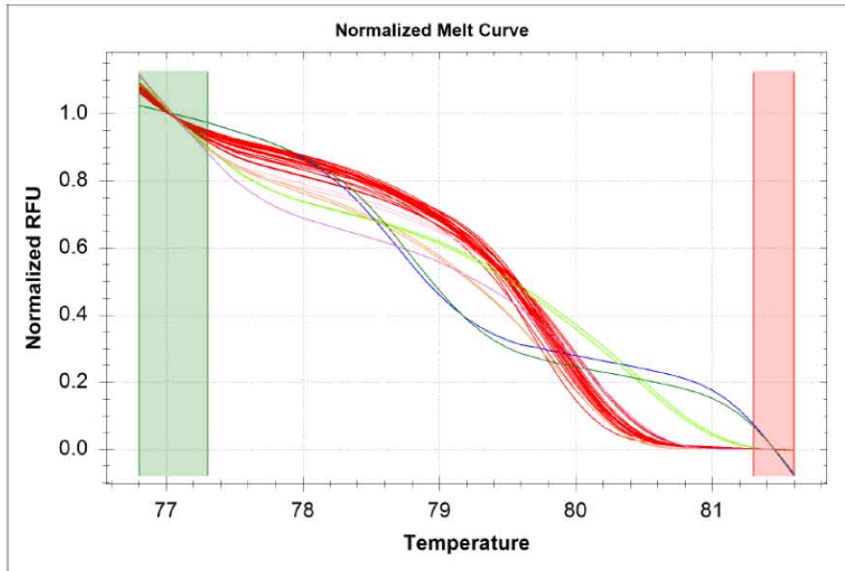
- 1: 98.0°C for for 3:00
- 2: 95.0°C for for 0:30
- 3: 58.0°C for for 0:30
- 4: 72.0°C for for 0:30
- Plate Read
- 5: GOTO 2, 35 more times
- 6: 95.0°C for for 0:30
- 7: 72.0°C for for 0:30
- 8: Melt Curve 72°C to 90°C : Increment 0.1°C for 0:05
- Plate Read

Plate Display

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Unk SYBR 25e-5	Unk SYBR 31e-5	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 17e-5	Unk SYBR 27e-5	Unk SYBR 26e-11	Unk SYBR 32e-11	Unk SYBR 36e-11	Unk SYBR 9e-11	Unk SYBR 19e-11	
B	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 32e-5	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 8e-5	Unk SYBR 19e-5	Unk SYBR 27e-5	Unk SYBR 26e-11	Unk SYBR 32e-11	Unk SYBR 36e-11	Unk SYBR 9e-11	Unk SYBR 19e-11	
C	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 32e-5	Unk SYBR 36e-5	Unk SYBR 8e-5	Unk SYBR 19e-5	Neg SYBR 19	Unk SYBR 29e-11	Unk SYBR 33e-11	Unk SYBR 37e-11	Unk SYBR 9e-11	Neg SYBR 0	
D	Unk SYBR 29e-5	Unk SYBR 33e-5	Unk SYBR 37e-5	Unk SYBR 9e-5		Neg SYBR 19	Unk SYBR 25e-11	Unk SYBR 33e-11	Unk SYBR 37e-11	Unk SYBR 9e-11	Neg SYBR 0	
E	Unk SYBR 29e-5	Unk SYBR 33e-5	Unk SYBR 37e-5	Unk SYBR 9e-5			Unk SYBR 30e-11	Unk SYBR 34e-11	Unk SYBR 38e-11	Unk SYBR 11e-11		
F	Unk SYBR 30e-5	Unk SYBR 34e-5	Unk SYBR 38e-5	Unk SYBR 11e-5			Unk SYBR 30e-11	Unk SYBR 34e-11	Unk SYBR 38e-11	Unk SYBR 11e-11		
G	Unk SYBR 30e-5	Unk SYBR 34e-5	Unk SYBR 38e-5	Unk SYBR 11e-5	Unk SYBR 26e-5		Unk SYBR 31e-11	Unk SYBR 35e-11	Unk SYBR 39e-11	Unk SYBR 17e-11		
H	Unk SYBR 31e-5	Unk SYBR 35e-5	Unk SYBR 39e-5	Unk SYBR 17e-5	Unk SYBR 26e-5		Unk SYBR 31e-11	Unk SYBR 35e-11	Unk SYBR 39e-11	Unk SYBR 17e-11		

Precision Melt

Auto detected melt region: No
Pre-melt range: 76.8° to 77.3°
Post-melt range: 81.3° to 81.6°
Normalized view: Yes
Zoomed to melt region: Yes
Temperature-shifted view: No
Temperature shift bar height: .20
Melt curve shape sensitivity for cluster detection: 50
Tm difference threshold for cluster detection: .15



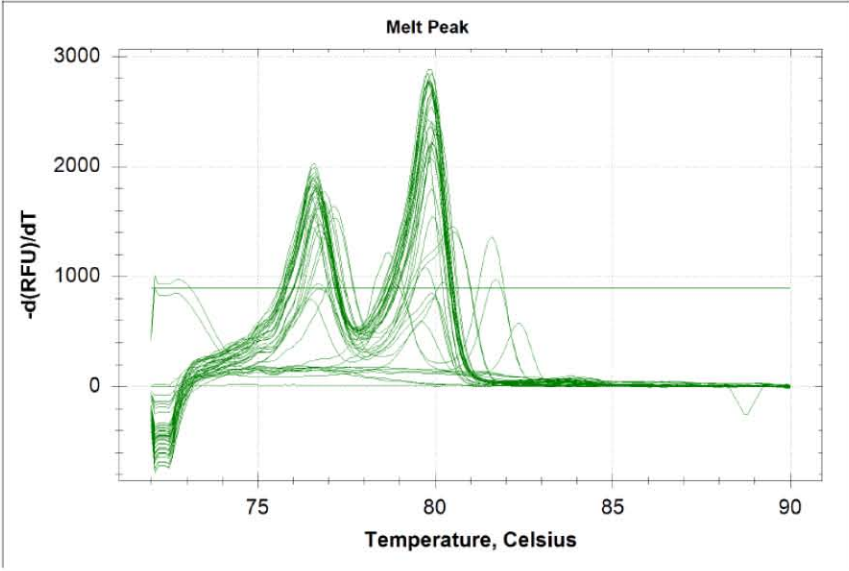
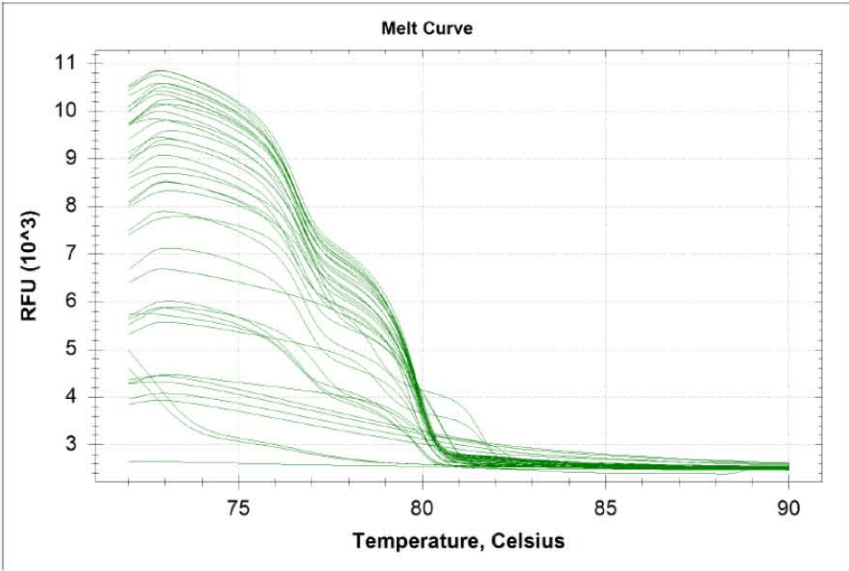
Precision Melt Data

Well	Content	Sample	Cluster	Percent Confidence	Call Type
A02	Unkn	31 e-5	Cluster 01	98.3	Auto
A03	Unkn	35 e-5	Cluster 01	98.7	Auto
A04	Unkn	38 e-5	Cluster 01	97.7	Auto
B02	Unkn	32 e-5	Cluster 01	99.5	Auto
B03	Unkn	36 e-5	Cluster 01	99.6	Auto
C02	Unkn	32 e-5	Cluster 01	99.8	Auto
C03	Unkn	36 e-5	Cluster 01	99.5	Auto
D01	Unkn	29 e-5	Cluster 01	96.8	Auto
D02	Unkn	33 e-5	Cluster 01	99.4	Auto
D03	Unkn	37 e-5	Cluster 01	98.4	Auto
D04	Unkn	9 e-5	Cluster 01	98.3	Auto
E01	Unkn	29 e-5	Cluster 01	97.0	Auto
E02	Unkn	33 e-5	Cluster 01	98.9	Auto
E03	Unkn	37 e-5	Cluster 01	97.0	Auto
E04	Unkn	9 e-5	Cluster 01	96.2	Auto
F01	Unkn	30 e-5	Cluster 01	98.9	Auto
F02	Unkn	34 e-5	Cluster 01	99.4	Auto
F03	Unkn	39 e-5	Cluster 01	98.5	Auto
G01	Unkn	30 e-5	Cluster 01	99.5	Auto
G02	Unkn	34 e-5	Cluster 01	99.1	Auto

G03	Unkn	39 e-5	Cluster 01	99.4	Auto
H01	Unkn	31 e-5	Cluster 01	98.0	Auto
H02	Unkn	35 e-5	Cluster 01	98.9	Auto
H03	Unkn	38 e-5	Cluster 01	98.1	Auto
A07	Unkn	28 e-11	Cluster 02	97.6	Auto
A11	Unkn	19 e-11	Cluster 02	94.2	Auto
B07	Unkn	28 e-11	Cluster 02	99.2	Auto
B11	Unkn	19 e-11	Cluster 02	96.3	Auto
C10	Unkn	9 e-11	Cluster 02	76.5	Auto
D07	Unkn	29 e-11	Cluster 02	87.3	Auto
D09	Unkn	37 e-11	Cluster 02	97.5	Auto
D10	Unkn	9 e-11	Cluster 02	93.0	Auto
E07	Unkn	30 e-11	Cluster 02	97.9	Auto
E10	Unkn	11 e-11	Cluster 02	97.9	Auto
F07	Unkn	30 e-11	Cluster 02	98.0	Auto
F10	Unkn	11 e-11	Cluster 02	97.3	Auto
G07	Unkn	31 e-11	Cluster 02	98.2	Auto
G10	Unkn	17 e-11	Cluster 02	96.8	Auto
A08	Unkn	32 e-11	Cluster 03	99.1	Auto
A09	Unkn	36 e-11	Cluster 03	99.3	Auto
B08	Unkn	32 e-11	Cluster 03	99.2	Auto
B09	Unkn	36 e-11	Cluster 03	65.6	Auto
C08	Unkn	33 e-11	Cluster 03	99.6	Auto
C09	Unkn	37 e-11	Cluster 03	98.9	Auto
D08	Unkn	33 e-11	Cluster 03	99.5	Auto
E09	Unkn	38 e-11	Cluster 03	95.2	Auto
F09	Unkn	38 e-11	Cluster 03	99.4	Auto
G08	Unkn	35 e-11	Cluster 03	99.9	Auto
G09	Unkn	39 e-11	Cluster 03	99.3	Auto
H08	Unkn	35 e-11	Cluster 03	98.7	Auto
H09	Unkn	39 e-11	Cluster 03	99.5	Auto
H10	Unkn	17 e-11	Cluster 03	86.3	Auto
A05	Unkn	17 e-5	Cluster 04	99.8	Auto
H04	Unkn	17 e-5	Cluster 04	99.8	Auto
B05	Unkn	19 e-5	Cluster 05	99.6	Auto
C05	Unkn	19 e-5	Cluster 05	99.5	Auto
B01	Unkn	28 e-5	Cluster 06	99.7	Auto
C01	Unkn	28 e-5	Cluster 06	99.7	Auto
A01	Unkn	25 e-5	Cluster 07	100.0	Auto
H07	Unkn	31 e-11	Cluster 08	71.5	Auto
A06	Unkn	27 e-5	Cluster 09	100.0	Auto
B06	Unkn	27 e-5	Cluster 10	100.0	Auto
A10	Unkn	8 e-11		N/A	N/A
B04	Unkn	8 e-5		N/A	N/A
B10	Unkn	8 e-11		N/A	N/A
C04	Unkn	8 e-5		N/A	N/A
C06	Neg Ctrl	19		N/A	N/A
C07	Unkn	29 e-11		N/A	N/A
C11	Neg Ctrl	0		N/A	N/A
D06	Neg Ctrl	19		N/A	N/A
D11	Neg Ctrl	0		N/A	N/A
E08	Unkn	34 e-11		N/A	N/A
F04	Unkn	11 e-5		N/A	N/A
F08	Unkn	34 e-11		N/A	N/A
G04	Unkn	11 e-5		N/A	N/A
G05	Unkn	26 e-5		N/A	N/A
H05	Unkn	26 e-5		N/A	N/A

Melt Curve

Step #: 8



Melt Curve Data

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Melt Temp
A01	SYBR		Unkn	25 e-5	80.20
A01	SYBR		Unkn	25 e-5	77.20
A02	SYBR		Unkn	31 e-5	76.70
A02	SYBR		Unkn	31 e-5	79.90
A03	SYBR		Unkn	35 e-5	76.70
A03	SYBR		Unkn	35 e-5	79.90
A04	SYBR		Unkn	38 e-5	76.50
A04	SYBR		Unkn	38 e-5	79.90
A05	SYBR		Unkn	17 e-5	None
A06	SYBR		Unkn	27 e-5	78.90
A06	SYBR		Unkn	27 e-5	81.70
B01	SYBR		Unkn	28 e-5	80.50
B01	SYBR		Unkn	28 e-5	77.10
B02	SYBR		Unkn	32 e-5	76.60
B02	SYBR		Unkn	32 e-5	79.90
B03	SYBR		Unkn	36 e-5	76.70
B03	SYBR		Unkn	36 e-5	79.90
B04	SYBR		Unkn	8 e-5	None
B05	SYBR		Unkn	19 e-5	76.70
B05	SYBR		Unkn	19 e-5	79.90

B06	SYBR	Unkn	27 e-5	78.70
B06	SYBR	Unkn	27 e-5	81.60
C01	SYBR	Unkn	28 e-5	80.50
C01	SYBR	Unkn	28 e-5	77.20
C02	SYBR	Unkn	32 e-5	76.60
C02	SYBR	Unkn	32 e-5	79.90
C03	SYBR	Unkn	36 e-5	76.60
C03	SYBR	Unkn	36 e-5	79.80
C04	SYBR	Unkn	8 e-5	None
C05	SYBR	Unkn	19 e-5	76.70
C05	SYBR	Unkn	19 e-5	79.90
C06	SYBR	Neg Ctrl	19	None
D01	SYBR	Unkn	29 e-5	76.90
D01	SYBR	Unkn	29 e-5	80.10
D02	SYBR	Unkn	33 e-5	76.60
D02	SYBR	Unkn	33 e-5	79.80
D03	SYBR	Unkn	37 e-5	76.50
D03	SYBR	Unkn	37 e-5	79.80
D04	SYBR	Unkn	9 e-5	76.60
D04	SYBR	Unkn	9 e-5	79.80
D06	SYBR	Neg Ctrl	19	72.80
E01	SYBR	Unkn	29 e-5	76.90
E01	SYBR	Unkn	29 e-5	80.00
E02	SYBR	Unkn	33 e-5	76.50
E02	SYBR	Unkn	33 e-5	79.80
E03	SYBR	Unkn	37 e-5	79.70
E04	SYBR	Unkn	9 e-5	76.50
E04	SYBR	Unkn	9 e-5	79.60
F01	SYBR	Unkn	30 e-5	76.60
F01	SYBR	Unkn	30 e-5	79.90
F02	SYBR	Unkn	34 e-5	76.60
F02	SYBR	Unkn	34 e-5	79.90
F03	SYBR	Unkn	39 e-5	76.60
F03	SYBR	Unkn	39 e-5	79.90
F04	SYBR	Unkn	11 e-5	None
G01	SYBR	Unkn	30 e-5	76.70
G01	SYBR	Unkn	30 e-5	79.90
G02	SYBR	Unkn	34 e-5	76.60
G02	SYBR	Unkn	34 e-5	79.90
G03	SYBR	Unkn	39 e-5	76.50
G03	SYBR	Unkn	39 e-5	79.80
G04	SYBR	Unkn	11 e-5	None
G05	SYBR	Unkn	26 e-5	None
H01	SYBR	Unkn	31 e-5	76.70
H01	SYBR	Unkn	31 e-5	79.90
H02	SYBR	Unkn	35 e-5	76.60
H02	SYBR	Unkn	35 e-5	79.90
H03	SYBR	Unkn	38 e-5	76.50
H03	SYBR	Unkn	38 e-5	79.80
H04	SYBR	Unkn	17 e-5	76.70
H05	SYBR	Unkn	26 e-5	None