



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION

CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACION EN
CARDIOLOGIA PEDIATRICA

**"ANALISIS DEL GEN BMPR2 EN PACIENTES CON HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR
DEL SERVICIO DE CARDIOLOGIA PEDIATRICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE
NOVIEMBRE ISSSTE"**

TRABAJO DE INVESTIGACION CLINICA

P R E S E N T A

DRA. NASHIELLI GUADALUPE GARCIA GUTIERREZ

PARA OBTENER EL TITULO DE POSGRADO DE:
CARDIOLOGIA PEDIATRICA

ASESOR DE TESIS:
DRA. MARIA DEL CARMEN CHIMA GALAN
DR. HUMBERTO GARCIA AGUILAR

2012

No. DE REGISTRO: 136.2011



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.

Dra. Aura Erazo Valle Solís
Subdirectora de Enseñanza e Investigación

Dr. Antonio Salgado Sandoval
Profesor titular del Posgrado en Cardiología Pediátrica

Dra. María del Carmen Chima Galán
Asesor de Tesis

Dr. Humberto García Aguilar
Asesor de Tesis

Dra. Nashielli Guadalupe García Gutiérrez
Autora de Tesis

AGRADECIMIENTO.

A Dios por darme una vida llena de oportunidades.

A mi mamá y hermano por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia por creer siempre en mí.

A Santiago, Mateo y Patricio por ser mi inspiración.

A mis maestros por ser mis guías en este camino.

A mis compañeros por hacer más fácil el recorrido.

A Liliana, Ivone y Erika por su apoyo en este proyecto.

A los pacientes y a sus padres por haber aceptado colaborar en este proyecto.

INDICE

1. ANTECEDENTES	6
2. OBJETIVOS	21
3. DISEÑO DEL ESTUDIO	22
4. MATERIAL Y METODOS	24
5. ETICA	32
6. RESULTADOS	33
7. DISCUSION	45
8. CONCLUSIONES	47
9. BIBLIOGRAFIA	48
10. ANEXO 1	50

RESUMEN

ANALISIS DEL GEN *BMP2* EN PACIENTES CON HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR DEL SERVICIO DE CARDIOLOGIA PEDIATRICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE" ISSSTE

INTRODUCCION: La hipertensión arterial pulmonar se define clínicamente como la presencia de una presión media en la arteria pulmonar mayor de 25 mmHg en reposo y mayor de 30mmhg durante el ejercicio. En la última década han surgido importantes avances en cuanto a la comprensión de la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, en algunos casos se han identificado mutaciones en el gen *BMP2*. *BMP2* es un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento beta ($TGF-\beta$), esta familia traduce señales en los receptores tipo 1 y tipo 2, que activa cinasas de serina y treonina. Se han encontrado mutaciones en el gen *BMP2*, en pacientes adultos con hipertensión arterial pulmonar y niños portadores de cardiopatía congénita de tipo canal auriculoventricular, conducto arterioso permeable y comunicación interauricular.

OBJETIVO: Identificar la presencia de cambios en la secuencia del gen *BMP2* en pacientes con hipertensión arterial pulmonar primaria o secundaria a cardiopatía, del servicio de cardiología pediátrica del CMN 20 de Noviembre del ISSSTE.

MATERIAL Y METODOS: Se incluyeron un total de 20 pacientes ; 13 femenino(65%), 7 masculino (35%) con una edad promedio de 10 años, se clasificaron en 2 grupos de acuerdo a la etiología de la hipertensión arterial pulmonar, el grupo A; 7 pacientes con diagnóstico de HAP primaria, el grupo B; 13 pacientes con diagnóstico de HAP secundaria a cardiopatía congénita, se realizó toma de muestra sanguínea , se extrajo el DNA con la técnica que combina el método de técnica salina y precipitación de cloroformo-alcohol isoamílico, se cuantificó el DNA por espectrofotometría, se amplificaron los exones 6,8 y 11, se purificaron las bandas de los amplificadores y se realizó la secuenciación.

RESULTADOS: En la secuenciación del exón 6 se encontró un paciente (5%) con corrimiento en el marco de lectura, en la secuencia del exón 8 se encontraron en total 6 pacientes con cambios en la secuencia (30%) : 1 paciente (5%) con corrimiento en el marco de lectura ,5 pacientes heterocigotos (25%) ; de estos 3 pacientes (60%) pertenecen al grupo de HAP secundaria a cardiopatía congénita y los otros 2 pacientes (40%) pertenecen al grupo de HAP primaria. En la secuencia del exón 11 se encontró un 100% de cambios en la secuencia del gen con 20 pacientes con corrimiento en el marco de lectura, de estos en 15 pacientes (75%) únicamente se encontró el corrimiento ya que no fue posible la lectura en ninguna parte del exón, en 5 pacientes (25%) además del corrimiento en algunos pares de bases se logró identificar un cambio heterocigoto.

CONCLUSIONES: se encontraron varios cambios en la secuencia del gen *BMP2* sin embargo se deben realizar estudios con mayor número de pacientes con la patología e incluso en pacientes sanos para determinar si estas son mutaciones no reportadas anteriormente y su relación con el pronóstico de la patología.

PALABRAS CLAVE: *BMP2*, *BMP*'s, Hipertensión arterial pulmonar, remodelación vascular pulmonar.

ANTECEDENTES

DEFINICION

La hipertensión arterial pulmonar se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por el aumento progresivo de las resistencias vasculares pulmonares que conduce a un fallo del ventrículo derecho y a la muerte prematura, clínicamente definiéndose como la presencia de una presión media en la arteria pulmonar mayor de 25 mmHg en reposo y mayor de 30mmhg durante el ejercicio¹.

En la última década han surgido importantes avances en cuanto a la comprensión de la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad, en algunos casos se han identificado mutaciones en el gen *BMPR2* (receptor 2 de la proteína morfogenética ósea) (Fig 1), así como anomalías en las células de los vasos pulmonares que juegan un papel importante para el desarrollo de la hipertensión pulmonar.¹

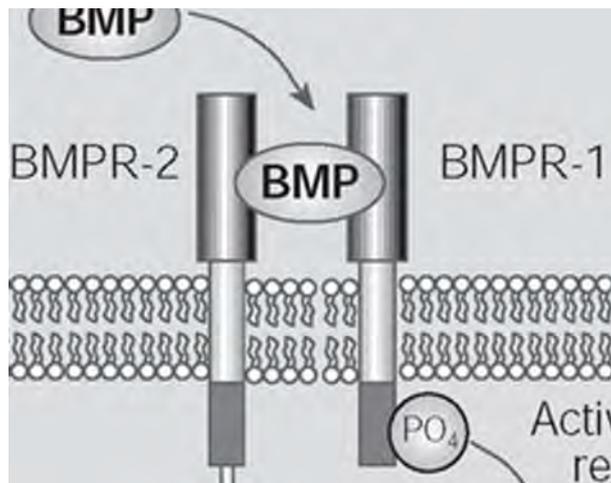


FIG 1. Esquema de los receptores de la proteína morfogenética del hueso tipo 1 y tipo 2.

EPIDEMIOLOGIA

La frecuencia de la hipertensión arterial pulmonar primaria en niños es poco conocida sin embargo, se estima una incidencia de hipertensión arterial pulmonar primaria de entre 1 a 2 casos por millón de habitantes, se ha visto una mayor frecuencia en mujeres con una relación de 1.8:1 con respecto al sexo masculino.²

Sin tratamiento la esperanza de vida es de 3 años a partir del diagnóstico.³

CLASIFICACION

La clasificación de la hipertensión pulmonar es el resultado de una amplia discusión y representa un consenso mundial que se llevo a cabo durante el tercer Congreso Mundial de Hipertensión Pulmonar en Dana Point en el año 2008(Tabla 1). la cual se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. CLASIFICACION CLINICA DE DANA POINT. REVISION 2008.

<p>1. HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR</p> <ul style="list-style-type: none">1.1 IDIOPATICA1.2 HEREDITARIA1.3 INDUCIDA POR DROGAS O TOXINAS1.4 SECUNDARIA A :<ul style="list-style-type: none">A) ENFERMEDAD DEL TEJIDO CONECTIVOB) CORTOCIRCUITOS SISTEMICO-PULMONARES**C) INFECCION POR VIHD) HIPERTENSION ARTERIALE) ESQUISTOSOMIASISF) ANEMIA HEMOLITICA CRONICA1.5 PERSISTENTE EN EL RECIEN NACIDO1.6 ENFERMEDAD PULMONAR VENO-OCCLUSIVA
<p>2. HIPERTENSION PULMONAR CON CARDIOPATIAS IZQUIERDAS</p> <ul style="list-style-type: none">2.1 DISFUNCION SISTOLICA2.2 DISFUNCION DIASTOLICA2.3. PATOLOGIA CARDIACA VALVULAR
<p>3. HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR ASOCIADA A PATOLOGIA RESPIRATORIA Y/O HIPOXIA</p> <ul style="list-style-type: none">1.1 ENFERMEDAD PULMONAR CRONICA OBSTRUCTIVA1.2 ENFERMEDAD PULMONAR INTERSTICIAL1.3 PATOLOGIA PULMONAR DEL SUEÑO1.4 ENFERMEDADES CON HIPOVENTILACION ALVEOLAR1.5 EXPOSICION CRONICA A GRANDES ALTURAS1.6 ANORMALIDADES DEL DESARROLLO
<p>4. HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR CAUSADA POR ENFERMEDADES CRONICAS TROMBITICAS O EMBOLICAS</p> <ul style="list-style-type: none">4.1 OBSTRUCCION SECUNDARIA A TROMBOEMBOLISMO DE ARTERIAS PULMONARES PROXIMALES4.2 OBSTRUCCION DE LAS ARTERIAS PULMONARES DISTALES

5. HIPERTENSION PULMONAR POR MECANISMO POCO CLARO O MULTIFACTORIAL
- 5.1 DESORDENES HEMATOLOGICOS MIELOPROLIFERATIVOS, ESPLENECTOMIA
 - 5.2 DESORDENES SISTEMICOS: VASCULITIS, SARCOIDOSIS, HISTIOCITOSIS X, NEUROFIBROMATOSIS
 - 5.3 DESORDENES METABOLICOS: ENFERMEDADES DE DEPOSITO DE GLICOGENO, ENFERMEDAD DE GAUCHER, TIROIDOPATIA
 - 5.4 CARDIOPATIAS CONGENITAS DIFERENTES DE AQUELLAS CON CORTOCIRCUITO SISTEMICOPULMONAR
 - 5.5 OTRAS: OBSTRUCCION TUMORAL, MEDIASTINITIS FIBROSANTE, ENFERMEDAD RENAL CRONICA EN DIALISIS, OTRAS.

++ Comunicación interauricular, comunicación interventricular, conducto arterioso persistente, conexión anómala parcial o total de venas pulmonares, tronco común, canal auriculoventricular. ¹

FISIOPATOLOGIA

Las anomalías conocidas en los vasos pulmonares que participan en la fisiopatología de esta enfermedad son:

- Disfunción endotelial pulmonar que se caracteriza por una alteración en la síntesis de óxido nítrico, tromboxano A₂, prostaciclina y endotelina.
- Alteración de los canales de potasio.
- Alteración en la expresión del transportador de serotonina en el músculo liso.
- Aumento de la producción de matriz celular en la adventicia.

Se han encontrado diversas enfermedades y factores asociados al desarrollo de hipertensión arterial pulmonar que se resumen en la tabla 2.

TABLA 2. Factores de riesgo y enfermedades asociadas de acuerdo con el nivel de evidencia (Fig. 1 A)

1. Fármacos y toxinas

1.1. Definitivo

- Fenfluramina
- Desfenfluramina
- Aceite tóxico

1.2. Muy probable

- Anfetaminas
- L-triptofano

1.3. Posible

- Metanfetaminas
- Cocaína

- Agentes quimioterapéuticos
- 1.4. Improbable
 - Antidepresivos
 - Anticonceptivos orales
 - Terapia estrogénica
 - Tabaquismo
- 2. Condiciones demográficas y médicas
 - 2.1. Definitivo
 - Sexo
 - 2.2. Posible
 - Embarazo
 - Hipertensión arterial sistémica
 - 2.3. Improbable
 - Obesidad
- 3. Enfermedades
 - 3.1. Definitivo
 - Infección por VIH
 - 3.2. Muy probable
 - Hipertensión portal/enfermedad hepática
 - Enfermedades del tejido conectivo
 - Cortocircuitos cardíacos sistémico-pulmonares congénitos
 - 3.3. Posible
 - Enfermedades del tiroides
 - Enfermedades hematológicas
 - Asplenia secundaria a esplenectomía quirúrgica
 - Anemia falciforme
 - Talasemia- β
 - Enfermedades crónicas mieloproliferativas
 - Enfermedades genéticas o metabólicas raras
 - Enfermedad de depósito de glucógeno tipo 1a (Enfermedad de Von Gierke)
 - Enfermedad de Gaucher
 - Telangiectasia hemorrágica hereditaria (enfermedad de Osler-Weber-Rendu)

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

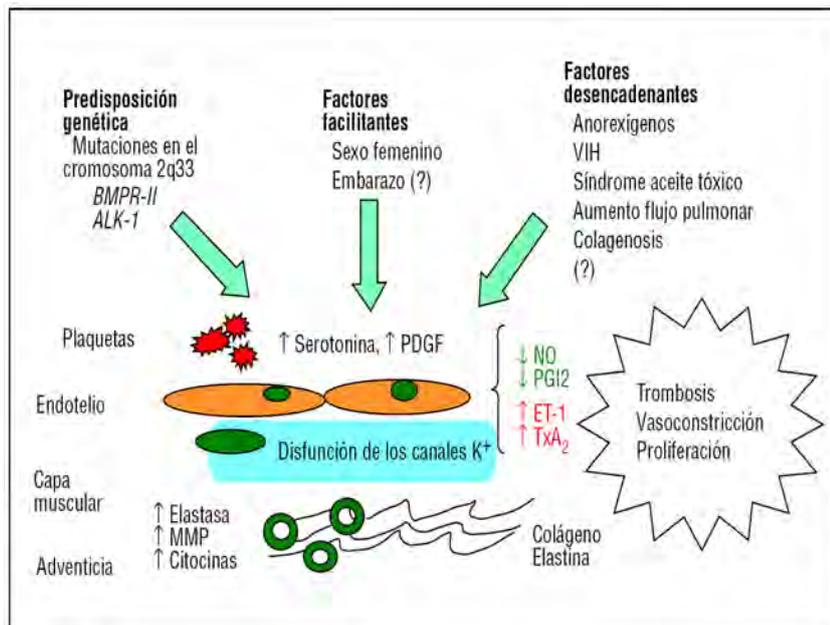


Figura 1 A: factores de riesgo asociados a Hipertensión arterial pulmonar.

En la patología de la hipertensión pulmonar se han identificado distintos cambios en la vasculatura pulmonar (Fig. 2.) que producen el desarrollo de la enfermedad dentro de los cuales se encuentran:

- Arteriopatía pulmonar
 - o Hipertrofia de la media: existe el aumento del área seccional de la media de las arterias pulmonares preacinarias e intraacinarias que se debe a la hipertrofia e hiperplasia de las fibras musculares arteriales como al aumento del tejido conectivo y de las fibras elásticas en la media de las arterias.
 - o Engrosamiento de la íntima: puede ser laminar, concéntrico o excéntrico, las células presentes se han identificado como fibroblastos, miofibroblastos y células de músculo liso.
 - o Engrosamiento de la adventicia
 - o Lesiones complejas caracterizadas por la proliferación focal de canales endoteliales alineados por miofibroblastos, células de músculo liso y matriz de tejido conectivo las cuales se presentan generalmente en la bifurcación de las arterias o en el origen de una arteria supernumeraria.
- Enfermedad venooclusiva pulmonar

La venopatía pulmonar se caracteriza por la oclusión extensa de las venas pulmonares con el engrosamiento de las mismas y que participa en el desarrollo de un porcentaje de la hipertensión pulmonar.¹

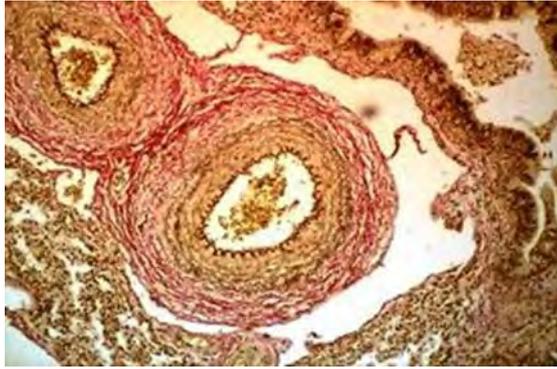


Figura 2. Imagen histopatológica de los cambios producidos en la hipertensión arterial pulmonar en los vasos sanguíneos pulmonares

Dentro de la fisiopatología de la hipertensión arterial pulmonar, la vasoconstricción es un componente principal de la hipertensión arterial pulmonar, se ha observado que esta patología se relaciona con niveles plasmáticos reducidos de sustancia vasodilatadora y antiproliferativa como lo es el péptido intestinal vasoactivo¹

La disfunción endotelial conduce a reducción crónica de la producción de sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico y la prostaciclina y el aumento en la expresión de vasoconstrictores como el tromboxano A2 y la endotelina.

Todos estos mecanismos incrementan el tono vascular y promueven el remodelado vascular que afecta a todas las capas de la pared del vaso y se caracteriza por cambios proliferativos y obstructivos en distintos tipos de células, dentro de las cuales destacan las endoteliales, musculares lisas y fibroblastos.

A nivel de la adventicia, aumenta la producción de matriz extracelular como el colágeno y la fibronectina, en los pacientes hipertensos, se ha identificado una hiperactividad de la angiopoyetina 1, que es un factor angiogénico esencial para el desarrollo vascular pulmonar y que se relaciona con una mayor severidad de la enfermedad.

Por otra parte, en la hipertensión arterial pulmonar se ha encontrado un incremento de las citocinas proinflamatorias que producen vasoconstricción

También se han demostrado anomalías protrombóticas y se encuentran trombos tanto en la microcirculación como en las arterias.¹

La definición de hipertensión arterial pulmonar en niños es igual a la de los adultos: una presión media en arteria pulmonar mayor de 25 mm Hg en reposo y mayor de 30 mm Hg durante el ejercicio

Anteriormente el diagnóstico de hipertensión arterial pulmonar era virtualmente una sentencia de muerte especialmente en los niños que tenían en promedio una sobrevida de 1 año, existiendo estudios con una sobrevida de 2.8 años; sin embargo, con la nueva tecnología y avances en el diagnóstico ha cambiado la sobrevida de estos pacientes.

En los niños existen características especiales para esta patología a diferencia de los adultos:

1. La vida productiva es mayor
2. Los niños tienen mayor reactividad de la circulación pulmonar y mejor respuesta al tratamiento con vasodilatadores
3. Existen estudios que sugieren una mayor reactividad en niños ante un tratamiento vasodilatador a largo tiempo

CUADRO CLINICO

Clínicamente la hipertensión arterial pulmonar se presenta en niños pequeños como rechazo a la alimentación, letargia, diaforesis, taquipnea, taquicardia e irritabilidad; en niños de mayor edad puede presentarse solo como disnea y dolor precordial, en pacientes con larga evolución puede encontrarse cianosis, y datos de falla cardíaca derecha.

En el examen clínico, se encuentra a la inspección una asimetría del tórax por abombamiento del hemitórax derecho, debido a hipertrofia de cavidades derechas del corazón; a la auscultación un incremento en el componente pulmonar del segundo ruido, puede encontrarse datos de falla cardíaca derecha como hepatomegalia, edema periférico y acrocianosis.²

DIAGNOSTICO

Además del diagnóstico clínico, existen diversos estudios que permiten realizar el diagnóstico preciso de Hipertensión Arterial pulmonar en un paciente, dentro de los que se encuentran:

Electrocardiograma: con una sensibilidad del 55% y especificidad del 70% en el que los hallazgos más comunes son hipertrofia de ventrículo derecho (87%) y desviación del eje a la derecha (79%) este último dato no aplicable a niños menores de 6 meses.

Radiografía de tórax: se ha encontrado que aproximadamente en el 90% de los casos es anormal, siendo los hallazgos más frecuentes dilatación del tronco de la arteria

pulmonar, crecimiento de las cavidades derechas y disminución de la vasculatura periférica. (Fig. 3)



Figura 3. Radiografía de tórax de paciente con Hipertensión arterial pulmonar en la cual se observa importante dilatación de la arteria pulmonar y disminución del flujo pulmonar en la periferia de ambos campos pulmonares.

Gammagrafía pulmonar: se puede observar defecto en la perfusión y deberá descartarse tromboembolia pulmonar.

Ecocardiograma: es el método mas utilizado por ser no invasivo y poder evaluar en el función del ventrículo derecho, crecimiento de ventrículo derecho (Fig. 4), grado de hipertensión arterial pulmonar con cuantificación del gradiente por insuficiencia pulmonar o tricuspídea(Fig. 5), dilatación del tronco de arteria pulmonar, así como detectar defectos congénito asociados.

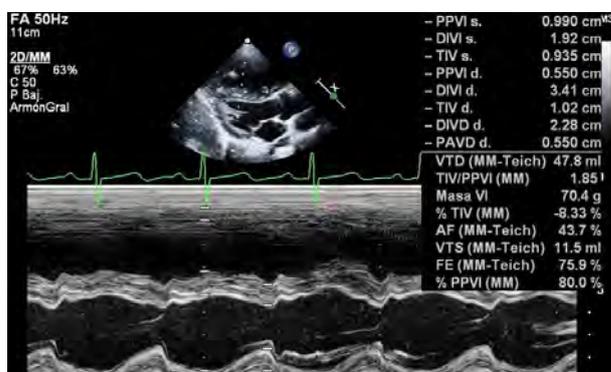


Figura 4. Ecocardiograma de paciente con HAP que muestra crecimiento de ventrículo derecho

- TREPROSTNIL: análogo de las prostaciclina como efectos secundarios importantes se encuentran cefalea e infecciones recurrentes, se administra intravenosa
 - ILOPROST: análogo de la prostaciclina, se administra inhalado cada 2 hrs
- Antagonistas del receptor de endotelina:
Bosentan es el primer medicamento que muestra realmente eficacia en el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, se ha utilizado en los diferentes tipos de HAP y se ha demostrado su efectividad en niños, su principal efecto secundario es la elevación de las enzimas hepáticas lo cual debe vigilarse con pruebas de funcionamiento hepáticas periódicas.
Existe un nuevo medicamento selectivo del receptor de endotelina A denominado SITAXENTAN y AMBRISENTAN de los cuales aun no existen estudios en niños.
 - Inhibidores de la fosfodiesterasa
Sildenafil es el primer medicamento de este grupo utilizado en niños como tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, el efecto secundario mas observado ha sido hipotensión arterial sistémica, se utiliza en dosis de 0.5mg/kg/dosis 2 a 3 veces al día.
 - Anticoagulación y antiagregantes plaquetarios:
Los pacientes con enfermedad vascular pulmonar pueden desarrollar trombosis, para contrarrestar esto se ha dado ácido acetilsalicílico como antiagregante plaquetario en niños pequeños y adolescentes, en estos últimos ocasionalmente se ha utilizado warfarina, el INR debe ser vigilado sobre todo en aquellos pacientes que reciben algún análogo del receptor de endotelina.
 - Oxígeno:
El oxígeno es un potente vasodilatador pulmonar, el suplemento nocturno de oxígeno está indicado y puede ser benéfico en hipertensión arterial pulmonar severa
 - Septostomía atrial
El procedimiento está indicado en niños con hipertensión arterial pulmonar idiopática e hipertensión arterial postquirúrgica que sufren síncope o insuficiencia cardiaca derecha severa. Este procedimiento reduce el incremento de la presión pulmonar, así como la presión de las cavidades cardiacas derechas
 - Transplante cardiopulmonar: está indicado cuanto la terapéutica anterior ha fallado y la hipertensión arterial pulmonar continúa avanzando.⁴

GENETICA DE LA HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR

La hipertensión arterial pulmonar es un padecimiento multifactorial, en el que participan factores ambientales y genéticos.

Mutaciones en *BMPR2* (gen que codifica el receptor 2 de la proteína morfogenética del hueso) han sido identificadas en aproximadamente 50% de los pacientes con Hipertensión Arterial Pulmonar familiar y 25% de los pacientes con Hipertensión Arterial Pulmonar esporádica. Se estima que una persona sana a quien se le detecta una mutación en *BMPR2*, tiene de un 10 a un 20% de riesgo de presentar HAP.¹⁶

Con respecto a todos los casos de HAP, se calcula que el 6% corresponden a la forma familiar, con un patrón de herencia autosómica dominante. En estos casos, se ha visto que la penetrancia es variable y en algunas familias es baja, en diversos estudios se ha encontrado una transmisión vertical hasta de 5 generaciones que indican un gen dominante.⁵

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son idénticas tanto en la hipertensión arterial pulmonar familiar o la adquirida.⁵

Estudios genéticos han demostrado que el receptor tipo II de la proteína morfogenética del hueso (BMPR II) participa en la patogénesis de la HAP familiar y esporádica. Se han encontrado mutaciones en el gen *BMPR2*, en pacientes adultos con hipertensión arterial pulmonar y niños portadores de cardiopatía congénita de tipo canal auriculoventricular, conducto arterioso permeable y comunicación interauricular.⁸

Los hallazgos sugieren que todas las formas de hipertensión pulmonar están relacionadas con defectos en la vía de señalización (Fig. 6) que involucra a angiopoyetina 1, TIE2, *BMPR1A* y *BMPR2*, que participan en la proliferación y en la diferenciación celular, así como en la morfogénesis y organogénesis.¹⁰

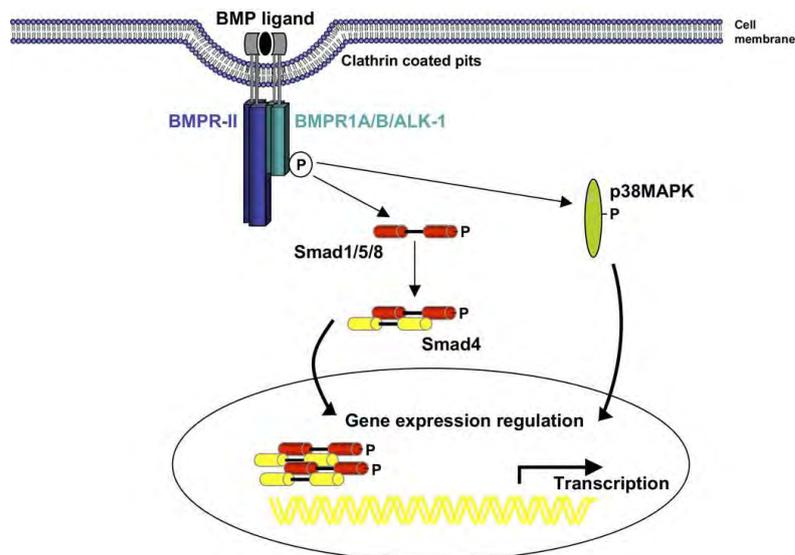


Figura 6. Señalización de los receptores de la proteína morfogenética del hueso tipo 1 y 2.

Las proteínas morfogenéticas óseas fueron originalmente identificadas como factores que inducen la formación de cartílago y hueso, posteriormente se encontró que también regulan el crecimiento en dientes, riñón, piel, cabello, músculo y neuronas, y mantienen el metabolismo del hierro y la homeostasis vascular.¹⁵

Las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del receptor BMPR2 juegan un papel importante en algunos tejidos:

- Tejido vascular: en pacientes con mutaciones en BMPR2 hay proliferación de las células endoteliales y musculares de la vasculatura pulmonar, y se han encontrado cambios en la presión sistólica del ventrículo derecho así como hipertrofia del mismo.¹⁷

Se ha propuesto que BMPR-II participa en la regulación del crecimiento de las células vasculares en el pulmón, inhibiendo la proliferación y posiblemente favoreciendo la apoptosis en células endoteliales y del músculo liso. Se considera que las mutaciones en *BMPR2* interfieren en la señalización de BMPR II, lo que puede causar un remodelamiento arterial y arteriolar anormal, (Fig. 7) lo que origina la HAP.¹¹

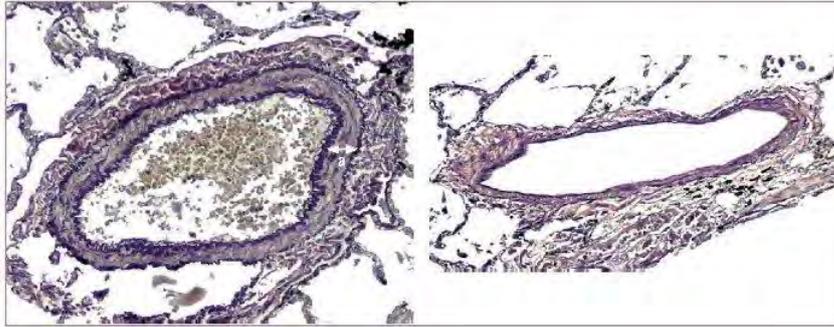


Figura 7. Remodelación de las arterias a nivel pulmonar con hipertrofia de músculo liso y del endotelio.

BMPR II es un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento beta (TGF- β), esta familia traduce señales en los receptores tipo 1 y tipo 2, que activa cinasas de serina y treonina.⁷

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) son una familia de proteínas que inducen la formación de hueso en sitios extracelular in vivo. BMPs actuar sobre los osteoblastos y los condrocitos, así como otros tipos de células, incluyendo las neurales, y juegan un papel importante en el desarrollo embrionario. Los miembros de la familia de las BMP son BMP1 a BMP6, BMP7, también llamada proteína osteogénica-1 (OP1), OP2 (BMP8), y otros. BMPs pertenecen a la beta del factor de crecimiento transformante (TGF-beta) superfamilia, que incluye, además de las versiones TGF-beta, activina / inhibinas (por ejemplo, alfa-inhibina), la inhibición de la sustancia de Müller, y la línea de células gliales derivadas del factor neurotrófico. TGF-betas y activinas traducen sus señales a través de la formación de complejos heteroméricos de dos tipos diferentes de serina o treonina. Los receptores quinasa pueden ser receptores tipo I con un peso molecular de 50 a 55 kD y, los receptores tipo II de 70 a 80 kD. Los receptores de tipo II se unen ligandos en la ausencia de receptores tipo I. BMPR2 es un receptor de tipo II para BMPs.²²

Las vías de señalización utilizados por el TGF- β , activina y receptores BMP son diferentes a las vías de los receptores con actividad intrínseca de la tirosincinasa o de las vías asociadas con las tirosincinasas intracelulares.

Por lo menos 17 RSTKs se han aislado y pueden dividirse en 2 subfamilias identificadas como receptores tipo I y tipo II. Los ligandos primero se unen a los receptores tipo II que entonces llevan a la interacción con los receptores tipo I. Cuando se forma el complejo entre el ligando y las 2 formas del receptor, el receptor tipo II fosforila al receptor tipo I lo que lleva a la iniciación de la cascada señalización intracelular.²³

El gen que codifica dicho receptor, se localiza en 2q33 (Fig. 8) y se encuentra constituido por 13 exones (Fig. 9) que codifican una proteína de 1,038 aminoácidos . (Fig. 10)¹²

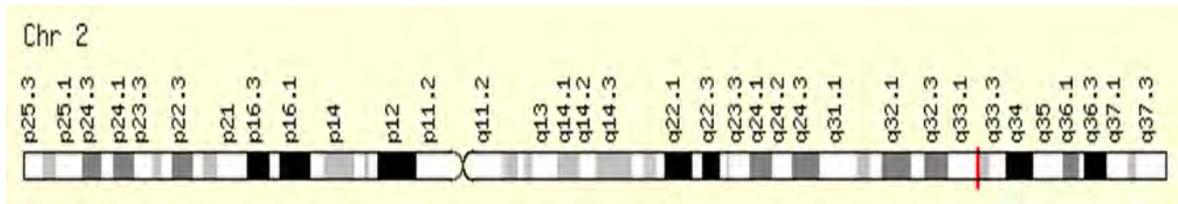


Figura 8. Localización del gen BMP2 dentro del cromosoma 2.

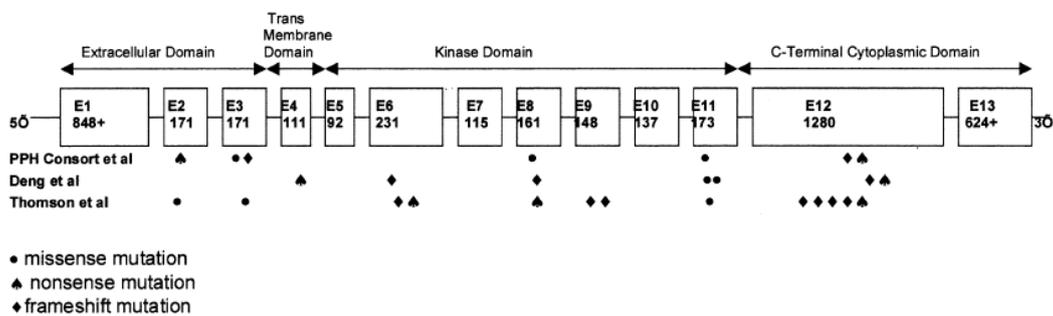


Figura 9. Esquema de los exones del gen BMP2 y las localizaciones de las mutaciones más frecuentemente encontradas.

El espectro de mutaciones encontradas en *BMP2* es variado, el 68% de ellas condicionan un polipéptido truncado que condicionan un codón de paro prematuro y por lo tanto haploinsuficiencia del receptor, e incluyen mutaciones sin sentido (29%), fuera del marco de lectura (24%), en el sitio del “splicing” (9%) y deleciones/duplicaciones (6%)¹⁹ Las mutaciones de sentido equivocado se localizan principalmente en las regiones codificantes del gen, importantes para la actividad del receptor y que están confinadas a los exones 2, 3, 6 al 9, 11 y 12.(Fig. 9)⁵

Las mutaciones encontradas en pacientes con hipertensión arterial familiar se han localizado en los exones 3, 5, 6, 8 y 11. En los pacientes con cardiopatía congénita más hipertensión arterial pulmonar, en los exones 2, 3, 4, 5 y 11. Los exones 2 y 3 codifican el dominio extracelular del *BMP2*, el exón 5 corresponde al dominio de cinasa, mientras que el exón 11 codifica al dominio citoplasmático. (Fig. 11)⁸

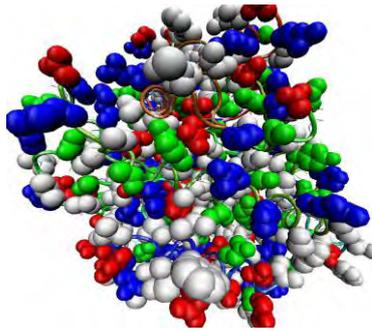


Figura 10. Esquema tridimensional del receptor de la proteína morfogenética del hueso tipo 2

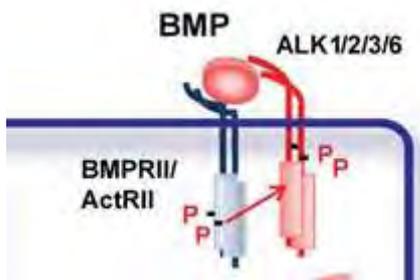


Figura 11. Imagen del receptor BMPR2 con sus dominios intra y extracelulares.

Cerca del 30% de las mutaciones conservan la secuencia de aminoácidos y la función del receptor, cuando se produce mutación en BMPR2 que altera la función, hay efectos en el crecimiento, la migración y la diferenciación celular.¹⁸

Otros factores genéticos asociados a la hipertensión arterial pulmonar son:

- El receptor tipo 1 similar a la activin-kinasa (ALK 1) que corresponde a los factores de crecimiento Beta , el cual se encuentra en las células endoteliales y se han encontrado con mutaciones en pacientes con HAP hereditaria.
- El transportador de la serotonina el cual se ha identificado en las células musculares de las arterias a nivel pulmonar y se ha asociado a la proliferación de las mismas.²⁴

OBJETIVOS

GENERAL

Identificar la presencia de cambios en la secuencia del gen *BMPR2* en pacientes con hipertensión arterial pulmonar primaria o secundaria a cardiopatía, del servicio de cardiología pediátrica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE.

ESPECIFICOS

1. Seleccionar los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
2. Obtener los datos clínicos y sociodemográficos de los pacientes incluidos en el estudio
3. Analizar la secuencia de los exones 6, 8 y 11 del gen *BMPR2*, por medio de secuenciación automatizada, de los pacientes incluidos en el estudio
4. Comparar el tipo de cambio en la secuencia de los pacientes con hipertensión pulmonar primaria con los de hipertensión pulmonar secundaria a cardiopatía.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Se trata de un estudio de casos:

- Trasversal, observacional, descriptivo y comparativo.

Universo de estudio

Pacientes pediátricos con HAP primaria y secundaria a cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Cardiología Pediátrica del CMN 20 de Noviembre

Criterios de inclusión:

- Niños entre 1 mes y 16 años de edad con HAP primaria y secundaria a cardiopatía congénita atendidos en el servicio de Cardiología Pediátrica del CMN 20 de Noviembre.
- Que acepten participara través del consentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Pacientes con antecedente de transfusión sanguínea 30 días previos a la toma de la muestra.

Criterios de eliminación:

- Pacientes a quienes no fue posible extraer suficiente cantidad de DNA, o que la calidad de este no sea adecuada para el estudio.
- Pacientes quienes decidan retirar su consentimiento informado y retirarse del estudio

Variables :

Dependiente: Grado de hipertensión arterial pulmonar

- Hipertensión arterial pulmonar se define como una presión en arterial pulmonar mayor de 25mmhg en reposo y mayor de 30mmhg en ejercicio.
- Leve: presión pulmonar correspondiente hasta un tercio de la presión arterial sistémica
- Moderada: presión pulmonar correspondiente hasta 2/3 partes de la presión sistémica
- Severa: presión pulmonar igual a la presión sistémica
- Suprasistémica: presión pulmonar mayor a la presión arterial sistémica

Independiente:

- Gen BMPR2: el gen BMPR2 es una secuencia de nucleótidos localizada en el cromosoma 2 q33 que codifica para la una proteína conocida como receptor morfogenético del hueso tipo 2 cuya función es regular el crecimiento de las células endoteliales y musculares a nivel pulmonar así como regular la apoptosis de esta células contribuyendo a la remodelación vascular a nivel pulmonar.
- Presencia de cambios en la secuencia del gen BMPR2: mutaciones o polimorfismos, de la secuencia de nucleótidos de los exones 6, 8 y 11 del gen BMPR2 en los pacientes del estudio; al compararlas con la secuencia normal del GeneBank.

Covariables

- sexo: femenino, masculino
- edad (años)
- cardiopatía congénita: malformación cardíaca presente al nacimiento

MATERIAL Y METODOS

A los padres de los pacientes que cumplan los criterios de selección se les invitó a participar en el estudio, explicándoles en detalle en que consiste el estudio y los fines del mismo, en caso de aceptar que su hijo(a) participe se firmó carta de consentimiento informado.

Se incluyeron un total de 20 pacientes los cuales se clasificaron en 2 grupos:

Grupo A: pacientes con diagnóstico de hipertensión arterial pulmonar primaria

Grupo B: pacientes con cardiopatía congénita e hipertensión arterial pulmonar

Se realizó la toma de muestra por los médicos del servicio de cardiología pediátrica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre previa asepsia y antisepsia de la región elegida para toma de muestra se extrajo con técnica estéril por punción venosa con aguja hipodérmica 20G x 32 mm o 22G x 32 mm muestra de 3ml de sangre que se colocó directamente en un tubo con anticoagulante estándar tapado, se identificó con número y nombre completo del paciente, se traslado la muestra al laboratorio de Medicina genómica en donde se refrigeró a 4°C

Para el análisis de la secuencia del gen *BMP2*, en primer lugar se extrajo el DNA de las muestras de sangre periférica de los pacientes, con un método que combina la técnica salina y precipitación con cloroformo-alcohol isoamílico descrita por Sambrook que se detalla a continuación (Fig. 12.):

1. 500µl de sangre total en tubo ependorf de 1.5 ml
2. adicionar 500µl de solución de lisis
3. vortexear
4. incubar 30 minutos a 4°C
5. centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
6. decantar el sobrenadante
7. lavar con 1 ml de solución de lisis
8. vortexear
9. centrifugar a 14,000 rpm x 2 minutos
10. decantar el sobrenadante
11. adicionar 1 ml de solución de lisis
12. vortexear
13. centrifugar a 14,000 rpm por 2 minutos
14. decantar el sobrenadante
15. resuspender el botón en 570µl de NaCl 5.0 mM
16. vortexear
17. adicionar 40µl de SDS al 10%

18. vortexear durante 5 minutos
19. adicionar 200µl de cloruro de sodio saturado
20. vortexear
21. centrifugar 14,000 rpm por 10 minutos
22. recuperar la fase líquida
23. adicionar 600µl cloroformo-alcohol isoamílico 49:1
24. vortexear 2 minutos
25. centrifugar a 14,000 rpm por 6 minutos
26. transferir la fase superior a un frasco conteniendo 5 ml de etanol absoluto frío (-20°C)
27. almacenar toda la noche a -20°C
28. transferir el DNA a un tubo ependorf de 0.5ml que contenga 400µl de etanol 70%
29. centrifugar a 14,000 rpm x 6 minutos
30. decantar el etanol
31. dejar secar el DNA a temperatura ambiente
32. resuspender de acuerdo al botón con agua



Figura 12. EXTRACCION DNA: Precipitación del DNA en etanol.

Posteriormente se cuantificó la concentración del DNA por medio del método de espectrofotometría obteniendo en todas las muestra una concentración promedio de mas de 100µg/ml. (Cuadro 1)

Cuadro 1. Concentración del DNA

MUESTRA	CONCENTRACION	MUESTRA	CONCENTRACION
1	193.8	11	147.2
2	130.7	12	125
3	80.2	13	100
4	293.2	14	89.6
5	247	15	98.2
6	95	16	117
7	86.1	17	89
8	92.7	18	165
9	180.1	19	91.1
10	185	20	176.4

Se verificó la calidad del DNA por electroforesis

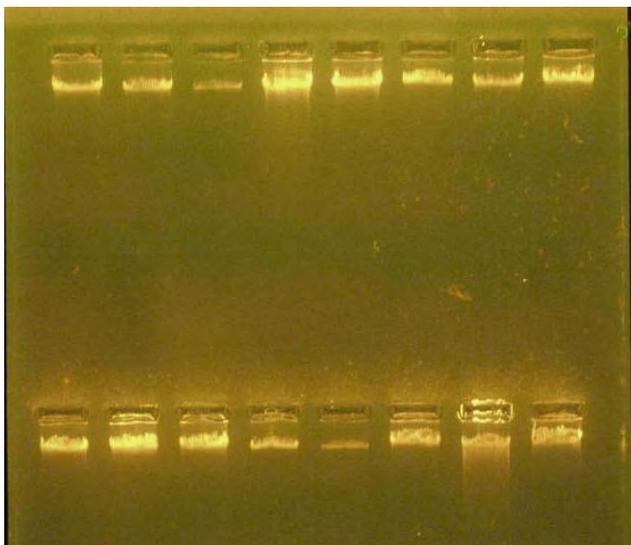


Figura 13. DNA pacientes 1al 8 : se observan muestras de DNA integras y en algunos casos (paciente 5 y 6) con una concentración mayor 100ng/ μ l

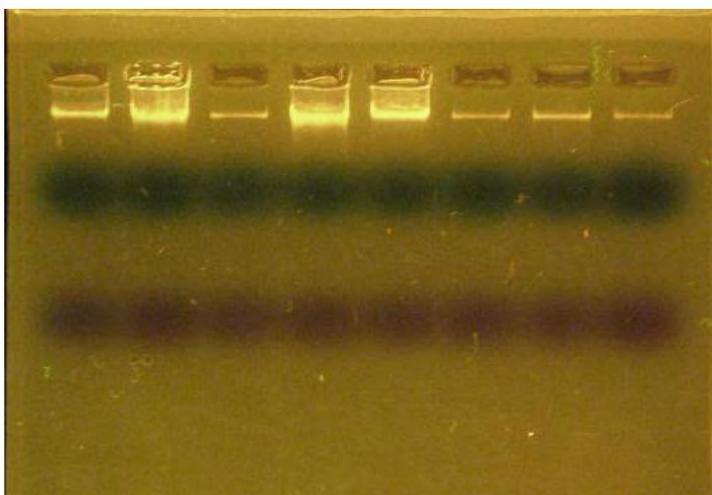


Figura 14. ELECTROFORESIS DE DNA pacientes 8 al 16: se observan muestras de DNA integras y en el caso del paciente 1, 2, 4 y 5 con una concentración mayor de 100ng/ μ l.

Los *primers* utilizados para las reacciones de amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction) de los exones 6, 8 y 11 de *BMP2*, se muestran en la tabla 3. Los cuales se prepararon a una concentración de 10 μ l/l

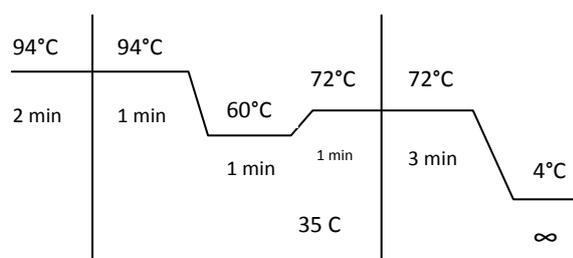
Tabla 3.

Exón	Pares de bases	°C	Fw	Rw
6	237	60	CAG CTG ATT GGC CGA GGT CG	TAC ATT GGG ATA GTA CTC CA
8	319	60	GCA GAA AAA TAA TAC TAC TTC TAT A	GAT GTT TTA ATT AAA TTA TCA TTT C
11	345	60	GGT AAA CTG AAA AGC TCA ATA C	CAT TGA ACT ATT AGG CTG GT

Se estandarizaron las reacciones de PCR para la amplificación de los exones ,6 , 8 y 11 con los siguientes reactivos y condiciones:

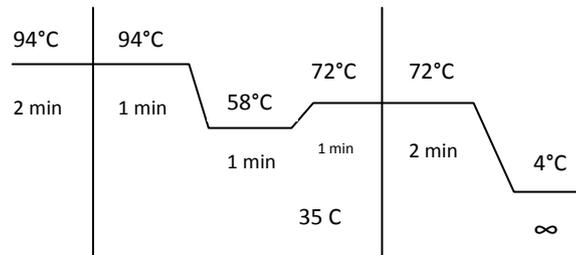
EXON 6 PROGRAMA BMR2 '6 BIORED

	1x	3x
H ₂ O	8.55	42.75
Buffer	1.25	6.25
MgCl ₂	0.5	2.5
dNTP's	0.5	2.5
Fw	0.3	1.5
Rv	0.3	1.5
Taq	0.1	0.5
DNA	1	-
	12.5µL	



EXON 8 Y 11 PROGRAMA BMRP2 '8 Y 11 BIORED

	1x	3x
H ₂ O	8.55	25.65
Buffer	1.25	3.75
MgCl ₂	0.5	1.5
dNTP's	0.5	1.5
Fw	0.3	0.9
Rv	0.3	0.9
Taq	0.1	0.3
DNA	1	-
	12.5µL	34.5µL c/u de 11.5µL



Se verificó la amplificación de los exones mencionados, a través de una electroforesis de 80 mVolts durante 40 minutos, utilizando como soporte geles de agarosa al 1%.

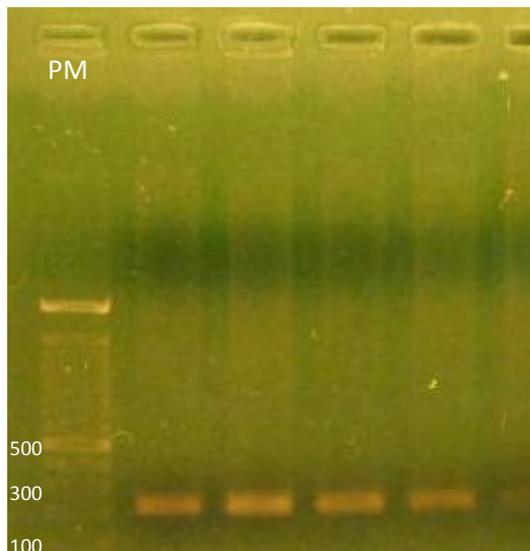


Figura 15. PCR exón 6 pacientes 1 al 4: en el pozo No. 1 se observa el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, el pozo No. 2 al 5 la amplificación del exón 6 del paciente 1 al 4.

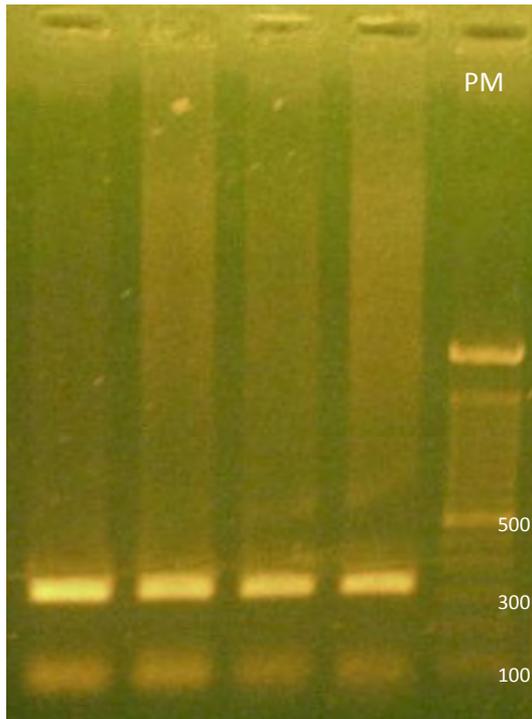


Figura 16. PCR exón 8 pacientes 10 al 14 : en el pozo No.5 se observa el marcador de peso molecular de 100 pares de bases , del pozo No, 1 al 4 los amplificados del exón 8 de los pacientes 10 al 14.

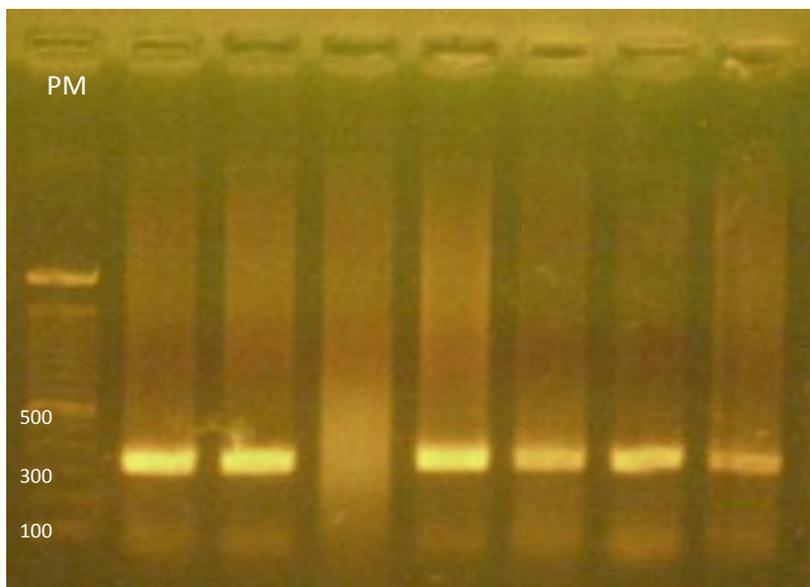


Figura 17. PCR exón 11 : en el pozo No.1 se observa el marcador de peso molecular, y del pozo 2 al 8 los amplificados del paciente 8 al 14, el paciente 10 en el pozo No. 4 no amplifico el exón 8 repitiéndose posteriormente la muestra.

Se cortaron las bandas de los amplificados y se purificaron con el método comercial WIZARD SV GEL AND PCR CLEAN UP SYSTEM PROMEGA de la siguiente manera:

1. Pesar en un tubo ependorf 1.5ml de la banda de DNA de interés
2. Adicionar la solución "MEMBRANE BINDING" a razón de 10 μ l x 10mg del gel de agarosa
3. Incubar por 10 minutos o hasta que se disuelva la agarosa a 50-65 $^{\circ}$ C
4. Transferir el gel derretido por las columnas previamente montadas sobre un tubo e incubar por 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Centrifugar la columna a 14,000 rpm por 1 minuto y desechar la fase líquida del tubo
6. Lavado adicionar 700 μ l de la solución "MEMBRANE WASH" previamente diluido en etanol al 95% por 1 minuto, centrifugar la columna a 14,000 rpm desechando la fase líquida
7. Repetir el lavado adicionando 500 μ l y centrifugando a 14,000 rpm por 5 minutos
8. Eliminar el etanol residual centrifugando por 1 minuto a 14,000 rpm después dejar evaporar el etanol
9. Cuidadosamente colocar la columna en otro tubo de microcentrifuga 1.5ml
10. Agregar 30 μ l de "NUCLEASE FREE WATER" en el centro de la columna
11. Inmediatamente incubar y centrifugar 14,000 rpm por 1 minuto
12. Conservar el DNA a una temperatura de 4 $^{\circ}$ C ó -20 $^{\circ}$ C
13. Verificar que no se haya perdido demasiada cantidad de DNA cuantificando en el Nanodrop y electroforesis de 1 gel de agarosa

Se verificó la concentración de los templados para secuenciar de manera cuantitativa y cualitativa.

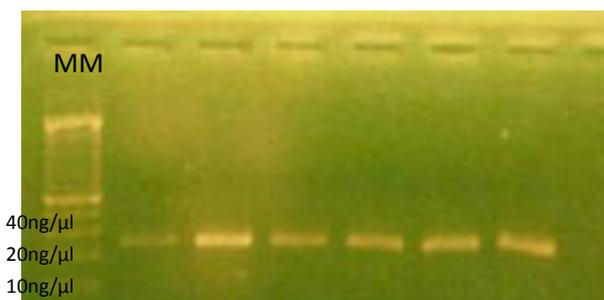


Figura 18. Se observa templado del exón 11; en el pozo No. 1 se observa el marcador de masa de 10ng/ μ l, del pozo No.2 al 7 los templados de los pacientes 6 al 11 todos con una concentración entre 20 y 40 ng/ μ l, necesaria para la reacción de secuencia de acuerdo a los parámetros marcados por el proveedor.

A continuación se preparó la reacción de secuencia utilizando el KIT de secuenciación DTCS QUICK START marca BECKMAN COULTER de acuerdo a la condiciones recomendadas por el proveedor

Reactivo	1x	20x
H2O	8.0µl	160µl
DTCS*	8.0µl	160µl
PRIMER Fw(10Mm)	0.64µl	12.8µl
Templado (10nM)	1.36µl	27.2µl
Vol final	20µl	

Se secuenciaron los exones 6 ,8 y 11 del gen *BMPR2* en un equipo Beckman coulter cQ8000.

CONSIDERACIONES ETICAS DEL ESTUDIO

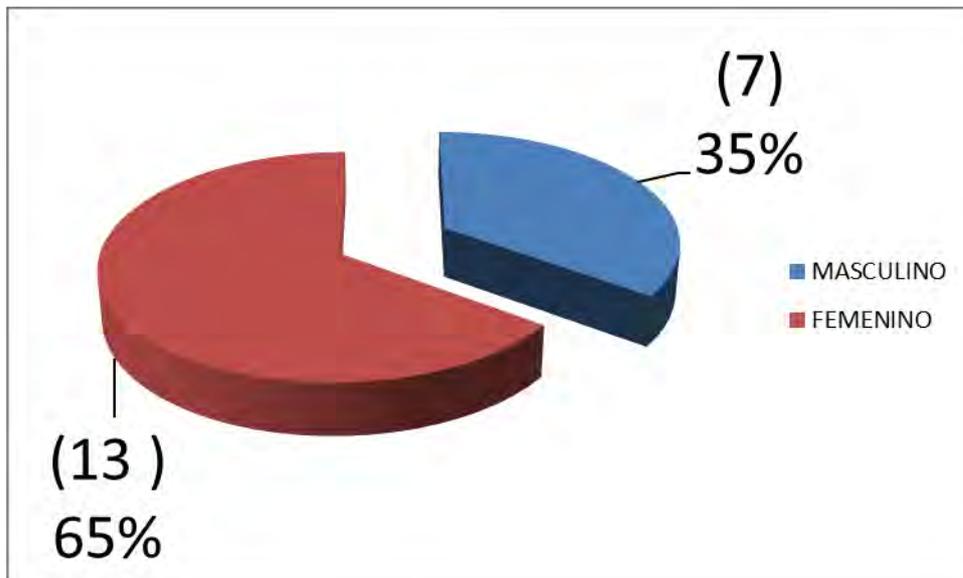
Dado que se trata de una investigación en seres humanos se cumplió con los principios éticos necesarios para su realización, para lo cual se presentó una carta de consentimiento informado a los padres de los participantes del estudio y a los mayores de 13 años se les pidió su asentimiento; para garantizar su autonomía ; con base en los artículos 22 a 27, 34 – 56 y 100 de la ley general de salud y la declaración universal sobre el genoma y los derechos humanos promulgada por UNESCO en el 2003. ANEXO 1.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Etica en Investigación del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE; así como por el Comité de Investigación y el estudio se encuentra registrado en la Coordinación de Investigación con el número 136.2011.

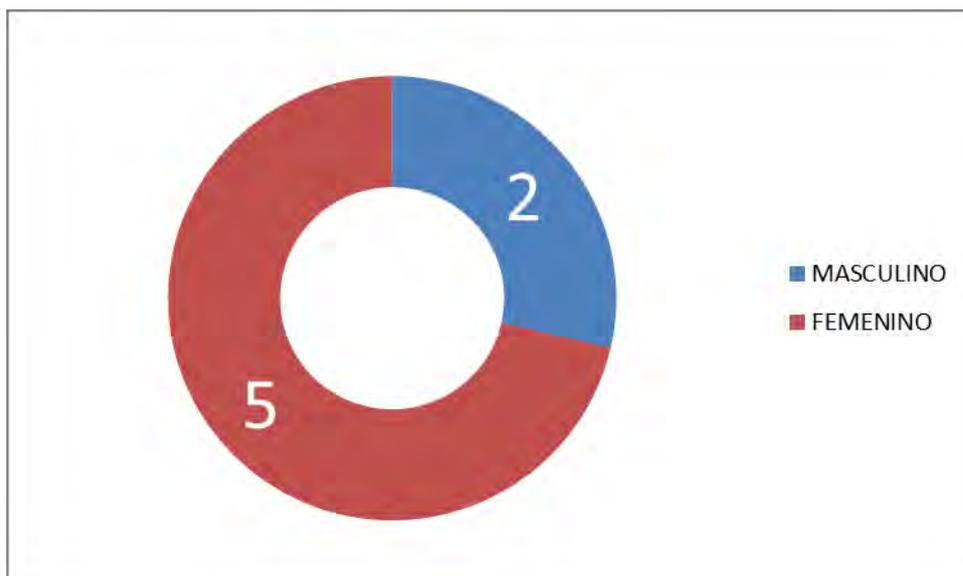
Se dio información de resultados a los padres de los pacientes de forma confidencial.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 20 pacientes: 13 del sexo femenino (65%), 7 del sexo masculino (35%), con una edad promedio de 10 años (7 meses- 17 años)



Grupo A : 7 pacientes con diagnóstico de hipertensión arterial pulmonar primaria con edad promedio de 11 años (4-17) 5 del sexo femenino (71%)y 2 del sexo masculino (29%)

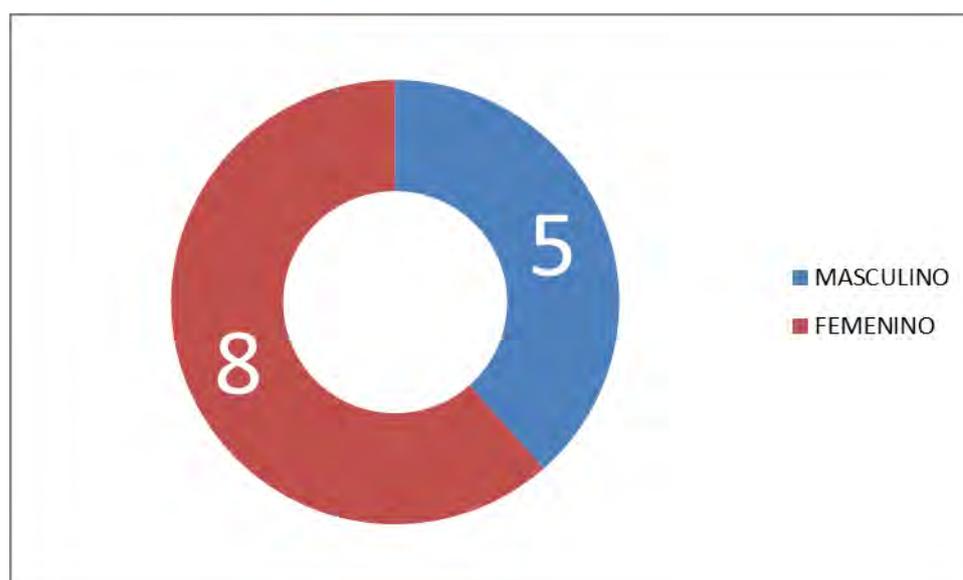


En la tabla 4 se resumen los síntomas y tratamiento de los pacientes con diagnóstico de Hipertensión arterial pulmonar primaria.

Tabla 4.

PACIENTE	SEXO	SINTOMAS	TRATAMIENTO
1	F	DISNEA	ACIDO ACETILSALICILICO SILDENAFIL
4	F	DISNEA , CIANOSIS	BOSENTAN, ACIDO ACETILSALICILICO, ESPIRONOLACTONA, FUROSEMIDE
5	M	CIANOSIS	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO, FUROSEMIDE, ESPIRONOLACTONA, ENALAPRIL
6	M	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO, ESPIRONOLACTONA
10	F	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO
12	F	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO, ESPIRONOLACTONA
15	F	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO

Grupo B: 13 pacientes con diagnóstico de hipertensión arterial pulmonar secundaria a cardiopatía congénita con una edad promedio 11 años (7 meses – 18años) 8 femenino (60%) 5 masculino (40%)



En la tabla 5 se definen las cardiopatías, síntomas y tratamiento de los pacientes del grupo B:

PACIENTE	SEXO	CARDIOPATIA	SINTOMAS	TRATAMIENTO
2	F	PCA	DISNEA, SINCOPE	BOSENTAN, ACIDOACETILSALICILICO ATRIOSEPTOSTOMIA
3	F	CANAL AV TIPO B RASTELLI	DISNEA	SILDENAFIL, FUROSEMIDE, ESPIRONOLACTONA
7	F	CIV	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO, FUROSEMIDE CAPTOPRIL
8	M	CIV	DISNEA, DIAFORESIS	FUROSEMIDE, ESPIRONOLACTONA, CAPTOPRIL
9	F	TGA	DISNEA, CIANOSIS	ESPIRONOLACTONA, DIGOXINA, SILDENAFIL
11	F	CIA, CIV	DISNEA	SILDENAFIL, ACIDO ACETILSALICILICO
13	F	PCA	DISNEA	ACIDO ACETILSALICILICO, FUROSEMIDE ESPIRONOLACTONA
14	M	CIV	DISNEA	FUROSEMIDE, ESPIRONOLACTONA CAPTOPRIL
16	M	CIV CIA	DISNEA CIANOSIS	SILDENAFIL, FUROSEMIDE, ACIDO ACETILSALICILICO
17	F	DVSVD	DISNEA	FUROSEMIDE, ACIDO ACETILSALICILICO, SILDENAFIL
18	M	CIV	DISNEA	FUROSEMIDE, CAPTOPRIL, ESPIRONOLACTONA

19	M	PCA	DISNEA	SILDENAFIL, ACETILSALICILICO	ACIDO
20	F	AT 1 C	DISNEA, CIANOSIS	BOSENTAN,ESPIRONOLACTONA, ACIDO ACETILSALICILICO	

PCA: PERSISTENCIA DEL CONDUCTO ARTERIOSO, CIA: COMUNICACIÓN INTERAURICULAR, CIV: COMUNICACIÓN INTERVENTRICULAR, CANAL AV: CANAL AURICULOVENTRICULAR, TGA: TRANSPOSICION DE GRANDES ARTERIAS, DVSVD: DOBLE VIA DE SALIDA DEL VENTRICULO DERECHO
AT: ATRESIA TRICUSPIDEA

En la tabla 6 se muestra el grado de hipertensión arterial pulmonar en cada paciente, tomado por ecocardiograma.

PACIENTE	GRADO DE HIPERTENSION ARTERIAL PULMONAR
1	HAP SEVERA
2	HAP SUPRASISTEMICA
3	HAP SEVERA
4	HAP SUPRASISTEMICA
5	HAP MODERADA
6	HAP SEVERA
7	HAP MODERADA
8	HAP SEVERA
9	HAP SUPRASISTEMICA
10	HAP SEVERA
11	HAP MODERADA
12	HAP MODERADA
13	HAP SEVERA
14	HAP MODERADA
15	HAP SEVERA

16	HAP SEVERA
17	HAP MODERADA
18	HAP SEVERA
19	HAP SEVERA
20	HAP SEVERA

En la tabla 7 se muestran los resultados mostrando los cambios por paciente en cada exón.

Tabla 7.

Paciente	exón 6	exón 8	exón 11
1	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
2	secuencia normal	heterocigoto E369K	corrimiento en el marco de lectura
3	secuencia normal	heterocigoto E369K	corrimiento en el marco de lectura
4	secuencia normal	heterocigoto E369K	corrimiento en el marco de lectura
5	secuencia normal	heterocigoto E369K	corrimiento en el marco de lectura
6	corrimiento en el marco de lectura	corrimiento en el marco de lectura	corrimiento en el marco de lectura
7	secuencia normal	heterocigoto E369K	corrimiento en el marco de lectura
8	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura heterocigoto E489K varios cambios sinónimos
9	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
10	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
11	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
12	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura

13	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura heterocigoto R509K
14	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
15	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura heterocigoto R509K
16	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura heterocigoto E489K
17	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
18	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura
19	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura heterocigoto R509K
20	secuencia normal	secuencia normal	corrimiento en el marco de lectura



Con respecto a los resultados de la secuenciación 6, 8 y 11 BMRP 2 se desglosan a continuación por exón :

SECUENCIA EXON 6

PACIENTES	SECUENCIA	
1,2,3,4,5,7,8, 9,10,11,12,13, 14,15,16,17,18,20	NORMAL	
6	CORRIMIENTO EN EL MARCO DE LECTURA	<p>Analyzed Data</p>

SECUENCIA EXON 8

PACIENTES	SECUENCIA	
1,8,9,10,11,12,13, 14,15,16,17,18,19, 20	NORMAL	
2	HETEROCIGOTO E369K (A2253G)	

3	HETEROCIGOTO E369K(A2253G)	
4	HETEROCIGOTO E369K(A2253G)	
5	HETEROCIGOTO E369K(A2253G)	
6	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
7	HETEROCIGOTO E369K(A2253G)	

SECUENCIAS EXON 11

PACIENTE		
1	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	

2	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
3	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
4	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
5	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
6	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
7	CORRIMIENTO MARCO LECTURA	
8	CORRIMIENTO MARCO LECTURA E489K(G2613A) VARIOS CAMBIOS SINONIMOS	

9	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA	
10	CORRIMIENTO EN MARCO LECTURA	
11	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA	
12	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA	
13	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA R509K(A2680G)	
14	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA	
15	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA R509K(A2680G)	

16	CORRIMIENTO MARCO LECTURA E489K(G2613A)	
17	CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA	
18	CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA	
19	CORRIMIENTO EN MARCO DE LECTURA R509K(A2680G)	
20	CORRIMIENTO DEL MARCO DE LECTURA	

Se encontraron los siguientes cambios en la secuencia del gen BMPR2 :

En la secuenciación del exón 6 se encontró un paciente (5%) con corrimiento en el marco de lectura, este paciente es del sexo masculino y corresponde al grupo de Hipertensión arterial pulmonar primaria con grado severo de la misma y actualmente con tratamiento farmacológico.

En la secuencia del exón 8 se encontraron en total 6 pacientes con cambios en la secuencia (30%) :

- 1 paciente (5%) con corrimiento en el marco de lectura correspondiente al paciente en quien se identifico el mismo corrimiento desde el exón 6.
- 5 pacientes heterocigotos (25%); en estos pacientes se encontró el cambio en el aminoácido E369K que corresponde al cambio A2253G en el mapa genómico, que corresponde a un cambio de sentido equivocado, cambiando un aminoácido ácido por un básico.

De estos 5 pacientes : 3 pacientes (60%) pertenecen al grupo de HAP secundaria a cardiopatía congénita siendo el paciente 2 con diagnóstico de persistencia del conducto arterioso con HAP suprasistémica , paciente 3 con diagnóstico de canal atrioventricular con HAP severa, el paciente 7 con diagnóstico de comunicación interventricular con HAP severa , todos con necesidad de tratamiento farmacológico por sintomatología. ; los otros 2 pacientes (40%) pertenecen al grupo de HAP primaria.

En la secuencia del exón 11 se encontró un 100% de cambios en la secuencia del gen con 20 pacientes con corrimiento en el marco de lectura, de estos en 15 pacientes (75%) únicamente se encontró el corrimiento ya que no fue posible la lectura en ninguna parte del exón, en 5 pacientes (25%) además del corrimiento en algunos pares de bases se logro identificar un cambio heterocigoto que se detalla a continuación:

- 2 pacientes (40%) con los siguientes cambios de sentido equivocado en los aminoácidos E489K que corresponde al cambio G2613A del mapa genómico, ambos pacientes corresponden al grupo de HAP secundaria a cardiopatía congénita, un paciente (pt 8)con diagnóstico de Comunicación interventricular y el otro (pt 16) con diagnóstico de comunicación interventricular e interauricular.
- En el paciente 8 además de los cambios mencionados anteriormente se encontraron varias mutaciones puntuales sinónimas.
- En los otros 3 pacientes se identifico el cambio en aminoácidos R509K que corresponde al cambio A2680G en el genómico, de estos 3 pacientes 2 (66%) pertenecen al grupo de HAP secundaria a cardiopatía congénita y en ambos casos la cardiopatía es de tipo persistencia del conducto arterioso, el otro paciente (33%) pertenece al grupo de HAP primaria.

Aunque se encontraron un gran numero de cambios en la secuencia del gen, este es un estudio piloto y deberán secuenciarse los mismos exones en 100 personas sanas para corroborar si se trata de una mutación, ya que estos cambios no se encuentran reportados en estudios previos.

DISCUSION

En años recientes, los estudios genéticos de *BMPR2* realizados en pacientes con hipertensión arterial pulmonar, han demostrado la participación de este gen en la enfermedad, se calcula que en más del 50% de los casos familiares existen mutaciones en *BMPR2*²², y 26% de los pacientes con HAP esporádica⁵, mientras que en los pacientes con HAP y cardiopatía congénita se ha encontrado que el 6% presentan cambios en la secuencia de *BMPR2*⁸

En este trabajo se eligió estudiar a los pacientes con Hipertensión arterial pulmonar por ser esta una de las 5 primeras causas de consulta en el servicio de cardiología pediátrica, así como por implicaciones en el pronóstico de los pacientes de acuerdo al tratamiento establecido y el diagnóstico temprano.

Se ha reportado que dentro de las mutaciones del *BMPR2*, el 6% del total de los pacientes con HAP esporádica, corresponden a mutaciones sin sentido, 6% a mutaciones de sentido equivocado y 14% a mutaciones de corrimiento en el marco de lectura⁵

En los casos seleccionados, se encontró que 50 % de los pacientes presentaron cambios de sentido equivocado y 50% de corrimiento en el marco de lectura, a diferencia de los reportado, esto puede deberse a que como se trata de un estudio de algunos exones, es decir, no realizo el análisis completo del gen, no es posible establecer si algunos de los casos considerados como mutaciones de corrimiento del marco de lectura son realidad mutaciones sin sentido en exones previos, por lo que se requiere de estudios más amplios y del análisis alelo específico.

En los estudios realizados en pacientes con HAP y cardiopatía se ha reportado que el 6% de los pacientes con hipertensión pulmonar y cardiopatía congénita (canal atrioventricular completo tipo C, CIA, PCA, CIV y ventana aortopulmonar) presentan mutaciones en *BMPR2*. Los resultados apoyan los estudios animales que implican a las proteínas morfogenéticas de hueso y al factor de crecimiento transformante TFG-beta en la inducción de anomalías análogas en el canal atrioventricular, así como en los defectos septales y troncoconales.⁸

En este trabajo encontramos que el 70% de los cambios en la secuencia fueron en pacientes con hipertensión arterial secundaria a cardiopatía congénita y de estos 43% de los casos con diagnóstico de comunicación interventricular, el 43 % de los pacientes con persistencia del conducto arterioso y 14% con canal atrioventricular además de que clínicamente corresponde a los casos con hipertensión arterial pulmonar severa y suprasistémica.

Los pacientes con Hipertensión arterial pulmonar severa o suprasistémica tuvieron cambios en la secuencia que corresponde a mutaciones sin sentido , siendo menor el grado de hipertensión arterial pulmonar en la mayoría de los pacientes con corrimiento en el marco de lectura.

El gen BMPR2 tiene dominios primordiales para la función del receptor: el dominio cinasa del receptor se encuentra altamente conservado en los vertebrados, mientras que el dominio extracelular y el citoplasmático son más divergentes. Dentro del extremo citoplasmático, se han identificado varias regiones conservadas: un motivo de 44 aminoácidos de prolina-glutamina- serina-treonina, relacionado con subdominios funcionales o estructurales. Además se ha encontrado una mayor proporción de sustituciones no sinónimas en el exón 12 y 13 que codifican principalmente al dominio citoplasmático, lo que sugiere que este dominio ha evolucionado entre diferentes especies. De lo que se puede concluir que las mutaciones de sentido equivocado se presentan en las regiones conservadas, críticas para la función del receptor; y las mutaciones neutrales o polimorfismos en las menos conservadas²⁶

Esta investigación muestra que los cambios encontrados en los exones de dominios conservados son en su mayoría cambios sin sentido, y los cambios en las regiones poco conservadas son en su mayoría corrimiento en el marco de lectura.

CONCLUSIONES

Aunque encontramos varios cambios en la secuencia del gen BMP2 tanto en pacientes con hipertensión arterial pulmonar primaria como en la que es secundaria a cardiopatía congénita, este trabajo debe servir como base a futuros estudios en los que se deberá realizar secuencia completa de los exones correspondientes a BMP2 y en personas sanas para determinar si existen otros tipos de cambios en la secuencia y si estos finalmente corresponden a mutaciones que aún no han sido reportadas.

Sin embargo es importante reportar que los cambios encontrados fueron constantes en varios pacientes por lo que es importante a futuro determinar si se trata de una mutación y si existe relación con el pronóstico de los pacientes, así como si es determinante para normar una conducta de tratamiento.

En este estudio el porcentaje de cambios en la secuencia del tipo mutaciones sin sentido fue similar en ambos grupos 53% de los pacientes con hipertensión arterial pulmonar secundaria a cardiopatía congénita y 57% de los pacientes con hipertensión arterial pulmonar primaria, y el 100% de ambos grupos mostro cambios con corrimiento en el marco de lectura que deberá detallarse en estudios posteriores con secuenciación del gen completo.

BIBLIOGRAFIA

1. Galie N, Torbicki A, Barst R, Dartevaille P, Haworth S, Higenbottam T, et al. Guías de práctica clínica sobre el diagnóstico y tratamiento de la Hipertensión Arterial Pulmonar. Sociedad europea de Cardiología. Rev Esp Cardiol. 2005; 58(5): 523-66.
2. Widlitz A, Barst R. Pulmonary arterial hypertension in children. Eur Respir J. 2003; 21: 155-76.
3. Balóira A, Vilariño C, Leiro V, Valverde D, Mutaciones en el gen que codifica BMPR2 en pacientes con hipertensión arterial pulmonar esporádica. Arch ronconeumol. 2008; 44(1):29-34
4. Haworth S. The management of pulmonary hypertension in children. Arch Dis Child. 2008; 93: 620-5.
5. Loyd J. Genetics and Pulmonary Hypertension. Chest 2002;122;284S-286S
6. Newman J, et al. Genetic Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. JACC: 2004; 33s-39s
7. McLaughlin V, McGoon M. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2006;114;1417-1431.
8. Roberts K, McElroy J, Wong W, Yen E, Widlitz A, Barst R. BMPR2 mutations in pulmonary arterial hypertension with congenital heart disease. Eur Respir J 2004; 24: 371–374
9. Austin EB, Loyd JE. Genetics and mediators in pulmonary arterial hypertension. Clin Chest Med, 2007: 43-45: VII-VIII
10. Du, L. et al, Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hipertensión. New Eng J Med. 348:500-509, 2003.
11. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. Nature 2003;425:577-84
12. Kawata M. et al, Cloning a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor- beta receptor. J Biol Chem 2008: 270: 5625-5630
13. Sambrook J, Fitch EF, Maniats T. Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor , NY 1989
14. Deng Z, Et al. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. Am J Hum Genet. 2000;67:737-44.
15. Meng L,C-G Liu. Gene therapies for pulmonary hypertension – from experimental trials to bedside aspects. European Journal of cardio- thoracic surgery. 2010;37: 407-19
16. McGoon M, Et al. Screening, Early detection, and Diagnosis of Pulmonary Arterial Hypertension. Chest 2004; 126: 14 S- 34S.
17. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. J Biochem. 2010;147 (1): 35-51

18. Davies R, Morrell N. Molecular Mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest*.2008;134:1271-7
19. Machado R. Et al. Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54: S32-S42
20. Saggar R, et al. Diagnosis and hemodynamic assessment of pulmonary arterial hypertension . *Semin Respir Crit Care*. 2009;30: 399- 410.
21. Guías para el diagnóstico y tratamiento de la Hipertensión Arterial Pulmonar . Colombia Febrero 2010.
22. <http://omim.org/entry/600799>
23. <http://themedicalbiochemistrypage.org/spanish/signal-transduction-sp.html#rstk>
24. Vallerie. Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2006; 114: 1417-31.
25. Esobedo, Jimenez. Hipertensión arterial pulmonar en el año 2004. *Rev Esp Cardiol. Supl*. 2005; 5:9; 90ª- 103 A
26. Wai P., et al. Comparative Analysis of BMPR2 gene and its Mutations in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2005; 128: 615S

ANEXO 1

Declaración ibero-latinoamericana sobre derecho, bioética y genoma humano¹

Declaración de Manzanillo de 1996, revisada en Buenos Aires en 1998 y en Santiago en 2001

Teniendo presente que los constantes avances que se están produciendo sobre el conocimiento del genoma humano y los beneficios que podrán obtenerse de sus aplicaciones y derivaciones, invitan a mantener un diálogo abierto y permanente sobre sus consecuencias para el ser humano;

Destacando la importancia que para este diálogo comportan la Declaración Universal de la Unesco sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de 1997, adoptada y hecha suya por la Asamblea General de las Naciones Unidas en 1998, así como el Convenio del Consejo de Europa para la Protección de los Derechos Humanos y la Dignidad del Ser Humano con respecto a las Aplicaciones de la Biología y la Medicina: Convenio sobre Derechos Humanos y Biomedicina de 1997;

Asumiendo que es irrenunciable la participación de los pueblos ibero-latinoamericanos en el debate internacional sobre el genoma humano, con el fin de que puedan aportar sus propias perspectivas, problemas y necesidades;

Los participantes en los Encuentros sobre Derecho, Bioética y Genoma Humano de Manzanillo (1996), de Buenos Aires (1998) y de Santiago (2001), procedentes de diversos países de Ibero América y de España, y de diferentes disciplinas relacionadas con la Bioética;

DECLARAMOS

PRIMERO: Nuestra convicción en los valores y principios proclamados tanto en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos como en el Convenio Europeo sobre Derechos Humanos y Biomedicina, en cuanto constituyen un importante primer paso para la protección del ser humano en relación con los efectos no deseables de los desarrollos científicos y tecnológicos en el ámbito de la genética, a través de instrumentos jurídicos internacionales.

¹ *Comisión Nacional de Bioética, reproducido con fines académicos.*

SEGUNDO: La reflexión sobre las diversas implicaciones del desarrollo científico y tecnológico en el campo de la gen ética humana debe hacerse atendiendo a:

- a. El respeto a la dignidad, a la identidad ya la integridad humanas ya los derechos humanos recogidos en los instrumentos jurídicos internacionales;
- b. Que el genoma humano forma parte del patrimonio común de la humanidad como una realidad y no sólo como una expresión meramente simbólica;
- c. El respeto a la cultura, las tradiciones y los valores propios de todos los pueblos.

TERCERO: Que dadas las diferencias sociales y económicas en el desarrollo de los pueblos, nuestra región participa en un grado menor de los beneficios derivados del referido desarrollo científico y tecnológico, lo que hace necesario:

- a) Una mayor solidaridad entre los pueblos, promovida en particular por parte de aquellos estados que poseen un mayor grado de desarrollo;
- b) El diseño y la realización por los gobiernos de nuestros países de una política planificada de investigación sobre la gen ética humana;
- c) La realización de esfuerzos para extender de manera general a todas las poblaciones, sin ningún tipo de discriminación, el acceso a las aplicaciones de los conocimientos gen éticos en el campo de la salud;
- d) Respetar la especificidad y diversidad gen ética de los individuos y de los pueblos, así como su autonomía y dignidad en cuanto tales;
- e) El desarrollo de programas de información y educación extensivos a toda la sociedad, en los que se destaque la especial responsabilidad que concierne en esta materia a los medios de comunicación ya los profesionales de la educación.

CUARTO: Los principios éticos que deben guiar las acciones de la gen ética médica son:

- a) La prevención, el tratamiento y la rehabilitación de las personas con enfermedades gen éticas como parte del derecho a la salud, para que puedan contribuir a paliar el sufrimiento que ellas ocasionan en los individuos afectados y en sus familiares;
- b) La equidad en el acceso a los servicios de acuerdo a las necesidades del paciente, independientemente de su capacidad económica;
- c) La voluntariedad en el acceso a los servicios, la ausencia de coerción en su utilización y el consentimiento libre e informado basado en el asesoramiento gen ético no directivo;
- d) Las pruebas gen éticas y las acciones que se deriven de ellas tienen como objetivo el bienestar y la salud del individuo, sin que puedan ser utilizadas para imposición de políticas poblacionales, demográficas o sanitarias, ni para la satisfacción de requerimientos de terceros;

e) El respeto a la autonomía de decisión de los sujetos para realizar las acciones que siguen a los resultados de las pruebas genéticas, de acuerdo con los marcos normativos de cada país, que deberán respetar los criterios éticos y jurídicos aceptados por la comunidad internacional;

f) La información genética individual es privativa del sujeto del que proviene y no puede ser revelada a terceros sin su consentimiento expreso.

QUINTO: Que algunas aplicaciones de la genética humana operan ya como una realidad cotidiana en nuestros países, sin una adecuada y completa regulación jurídica, dejando en una situación de indefensión y vulnerabilidad tanto al paciente respecto de sus derechos, como al profesional de la salud respecto de su responsabilidad. Esto hace necesario que, mediante procesos democráticos y pluralistas, se promueva una legislación que regule, al menos, los siguientes aspectos:

a) El manejo, el almacenamiento y la difusión de la información genética individual, de tal forma que garantice el respeto a la privacidad y la intimidad de cada persona;

b) La actuación del genetista como consejero o asesor del paciente y de sus familiares, y su obligación de guardar la confidencialidad de la información genética obtenida;

c) El manejo, al almacenamiento y la disposición de los bancos de muestras biológicas (células, ADN, etc.), que deberán regularse garantizando que la información individualizada no se divulgue sin protección del derecho a la privacidad del individuo, ni se use para fines distintos de aquellos que motivaron su recolección;

d) El consentimiento libre e informado para la realización de pruebas genéticas e intervenciones sobre el genoma humano, que debe ser garantizado a través de instancias adecuadas, en particular cuando se trate de menores, incapaces y grupos vulnerables que requieran de una atención especial.

SEXTO: Más allá de los profundos cuestionamientos éticos que genera el patentamiento del material genético humano, cabe reiterar en particular:

a) La necesidad de prohibir la comercialización del cuerpo humano, de sus partes y de sus productos;

b) La necesidad de reducir en esta materia el objeto de las patentes a los límites estrictos del aporte científico realizado, evitando extensiones injustificadas que obstaculicen futuras investigaciones, y excluyéndose la posibilidad de patentar la información y el material genéticos en sí mismos. Asimismo, limitar las expectativas de ganancias de las empresas lucrativas, de modo de facilitar el acceso a todos los seres humanos sin distinciones económicas;

c) La necesidad de facilitar la investigación en este campo mediante el intercambio libre e irrestricto de la información científica, en especial el flujo de información de los países desarrollados a los países en desarrollo.

SÉPTIMO: Sin perjuicio de reafirmar la validez universal de los principios contenidos en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos de 1997, estiman que este texto, además de su valor jurídico propio, debería constituir el primer paso de un proceso normativo que habría de culminar con Convenio o Tratado Internacional sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos.

En consecuencia con las consideraciones precedentes

HEMOS RESUELTO:

1° Mantener el contacto y el intercambio de información entre los especialistas de la región, fomentar el estudio, el desarrollo de proyectos de investigación y la difusión de la información sobre los aspectos sociales, .éticos y jurídicos relacionados con la gen ética humana, así como promover la creación de redes de informática respecto a estos temas.

2° Remitir a los gobiernos de nuestros países la presente Declaración, incitándoles a que adopten las medidas necesarias, en especial legislativas, para desarrollar y aplicar los principios contenidos en esta Declaración y en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos Humanos.

En Santiago, República de Chile, a 29 de agosto de 2001.

Declaración Universal sobre el Genoma y Derechos Humanos.

11 de noviembre de 1997

La Conferencia General proclama los principios siguientes y aprueba la presente Declaración:

A. LA DIGNIDAD HUMANA Y EL GENOMA HUMANO

Artículo 1.

El genoma humano es la base de la unidad fundamental de todos los miembros de la familia humana y del reconocimiento de su dignidad y diversidad intrínsecas. En sentido simbólico, el genoma humano es el patrimonio de la humanidad.

Artículo 2.

a) Cada individuo tiene derecho al respeto de su dignidad y derechos, cualesquiera que sean sus características genéticas.

b) Esta dignidad impone que no se reduzca a los individuos a sus características genéticas y que se respete su carácter único y su diversidad.

Artículo 3.

El genoma humano, por naturaleza evolutivo, está sometido a mutaciones. Entraña posibilidades que se expresan de distintos modos en función de entorno natural y social de cada persona, que comprende su estado de salud individual, sus condiciones de vida, su alimentación y su educación.

Artículo 4.

El genoma humano en su estado natural no puede dar lugar a beneficios pecuniarios.

B. DERECHOS DE LAS PERSONAS INTERESADAS.

Artículo 5

a) Una investigación, un tratamiento o un diagnóstico en relación con el genoma de un individuo, sólo podrá efectuarse previa evaluación rigurosa de los riesgos y las ventajas que entraña y de conformidad con cualquier otra exigencia de la legislación nacional.

b) En todos los casos, se recabará el consentimiento previo, libre e informado de la persona interesada. Si ésta no está en condiciones de manifestarla, el consentimiento o autorización habrán de obtenerse de conformidad con lo que estipule la ley, teniendo en cuenta el interés superior del interesado.

c) Se debe respetar el derecho de toda persona a decidir que se le informe o no de los resultados de un examen genético y de sus consecuencias.

d) En el caso de la investigación, los protocolos de investigaciones deberán someterse, además, a una evaluación previa, de conformidad con las normas o directrices nacionales e internacionales aplicables en la materia.

e) Si en conformidad con la ley una persona no estuviese en condiciones de expresar su consentimiento, sólo se podrá efectuar una investigación sobre su genoma a condición de que obtenga un beneficio directo para su salud, y a reserva de autorizaciones y medidas de protección estipuladas por la ley. Una investigación que no represente un beneficio directo previsible para la salud sólo podrá efectuarse a título excepcional, con la mayor prudencia y procurando no exponer al interesado sino a un riesgo y una coerción mínimos, y si la investigación está encaminada a redundar en beneficio de la salud de otras personas pertenecientes al mismo grupo de edad o que se encuentren en las mismas condiciones genéticas, a reserva de que dicha investigación se efectúe en las condiciones previstas por la ley y sea compatible con la protección de los derechos humanos individuales.

Artículo 6.

Nadie podrá ser objeto de discriminaciones fundadas en sus características genéticas, cuyo objeto o efecto sería atentar contra sus derechos y libertades fundamentales y el reconocimiento de su dignidad.

Artículo 7.

Se deberá proteger en las condiciones estipuladas por ley la confidencialidad de los datos genéticos asociados con una persona identificable, conservados o tratados con fines de investigación o cualquier otra finalidad.

Artículo 8.

Toda persona tendrá derecho, de conformidad con el derecho internacional y el derecho nacional, a una reparación equitativa del daño de que haya sido víctima, cuya causa directa y determinante haya sido una intervención en su genoma.

Artículo 9.

Para proteger los derechos humanos y las libertades fundamentales, sólo la legislación podrá limitar los principios de consentimiento y confidencialidad, de haber

razones imperiosas para ello, y a reserva del estricto respeto del derecho internacional público y del derecho internacional relativo a los derechos humanos.

C. INVESTIGACIONES SOBRE EL GENOMA HUMANO

Artículo 10.

Ninguna investigación relativa al genoma humano ni sus aplicaciones, en particular en las esferas de la biología, la genética y la medicina, podrán prevalecer sobre el respeto de los derechos humanos, de las libertades fundamentales y de la dignidad humana de los individuos o, si procede, de los grupos humanos.

Artículo 11.

No deben permitirse las prácticas que sean contrarias a la dignidad humana, como la clonación con fines de reproducción de seres humanos. Se invita a los Estados y a las organizaciones internacionales competentes a que cooperen para identificar estas prácticas y a que adopten en el plano nacional o internacionales las medidas que corresponda, para asegurarse de que se respetan los principios enunciados en la presente declaración.

Artículo 12.

a) Toda persona debe tener acceso a los progresos de la biología, la genética y la medicina en materia de genoma humano, respetándose su dignidad y derechos.

b) La libertad de investigación, que es necesaria para el progreso del saber, procede de la libertad de pensamiento. Las aplicaciones de la investigación sobre el genoma humano, en particular en el campo de la biología, la genética y la medicina deben orientarse a aliviar el sufrimiento y mejorar la salud del individuo y de toda la humanidad.

D. CONDICIONES DEL EJERCICIO DE LA ACTIVIDAD CIENTÍFICA.

Artículo 13.

Las consecuencias éticas y sociales de las investigaciones sobre el genoma humano imponen a los investigadores responsabilidades especiales de rigor, prudencia, probidad intelectual e integridad, tanto en la realización de sus investigaciones como en la presentación y explotación de los resultados de éstas. Los responsables de la formulación de políticas científicas públicas y privadas tienen también responsabilidades especiales al respecto.

Artículo 14.

Los Estados tomarán las medidas apropiadas para favorecer las condiciones intelectuales y materiales propicias para el libre ejercicio de las actividades de

investigación sobre el genoma humano y para tener en cuenta las consecuencias éticas, legales, sociales y económicas de dicha investigación, basándose en los principios establecidos en la presente Declaración.

Artículo 15.

Los Estados tomarán las medidas apropiadas para fijar el marco del libre ejercicio de las actividades de investigación sobre el genoma humano respetando los principios establecidos en la presente Declaración, a fin de garantizar el respeto de los derechos humanos, las libertades fundamentales y la dignidad humana y proteger la salud pública. Velarán por los resultados de esas investigaciones no puedan utilizarse con fines no pacíficos.

Artículo 16.

Los Estados reconocerán el interés de promover, en los distintos niveles apropiadas, la creación de comités de ética independientes, pluridisciplinarios y pluralistas, encargados de apreciar las cuestiones éticas, jurídicas y sociales planteadas por las investigaciones sobre el genoma humano y sus aplicaciones.

E. SOLIDARIDAD Y COOPERACIÓN INTERNACIONAL.

Artículo 17.

Los Estados deberán respetar y promover la práctica de la solidaridad para con los individuos, familias o poblaciones expuestos a riesgos particulares de enfermedad o discapacidad de índole genética. Deberían fomentar, entre otras cosas, las investigaciones encaminadas a identificar, prevenir y tratar las enfermedades genéticas o aquéllas en las que interviene la genética, sobre todo las enfermedades raras y las enfermedades endémicas que afectan a una parte considerable de la población mundial.

Artículo 18.

Los Estados deberán hacer todo lo posible, teniendo debidamente en cuenta los principios establecidos en la presente Declaración, para seguir fomentando la difusión internacional del saber científico sobre el genoma humano, la diversidad humana y la investigación genética, y a este respecto favorecerán la cooperación científica y cultural, en particular entre países industrializados y países en desarrollo.

Artículo 19.

a) En el marco de la cooperación internacional con los países en desarrollo, los Estados deben velar por que:

- I. Se prevengan los abusos y se evalúen los riesgos y ventajas de la investigación sobre el genoma humano;
- II. Se desarrolle y fortalezca la capacidad de los países en desarrollo para realizar investigaciones sobre biología y genética humanas;
- III. Los países en desarrollo puedan sacar provecho de los resultados de las investigaciones científicas y tecnológicas a fin de que su utilización en pro del progreso económico y social puedan redundar en beneficio de todos;
- IV. Se fomente el libre intercambio de conocimientos e información científicos en los campos de la biología, la genética y la medicina.

b) Las organizaciones internacionales competentes deben apoyar y promover las medidas adoptadas por los Estados a los fines enumerados más arriba.

F. FOMENTO DE LOS PRINCIPIOS DE LA DECLARACIÓN.

Artículo 20.

Los Estados tomarán las medidas adecuadas para fomentar los principios establecidos en la Declaración, a través de la educación y otros medios pertinentes, y en particular, entre otras cosas, mediante la investigación y formación en campos interdisciplinarios y mediante el fomento de la educación en materia de bioética, en todos los niveles, en particular para los responsables de las políticas científicas.

Artículo 21.

Los Estados tomarán las medidas adecuadas para fomentar otras formas de investigación, formación y difusión de la información que permitan a la sociedad y a cada uno de sus miembros cobrar mayor conciencia de sus responsabilidades ante las cuestiones fundamentales relacionadas con la defensa de la dignidad humana que puedan ser planteadas por la investigación en biología, genética y medicina y las correspondientes aplicaciones. Se comprometen, además, a favorecer al respecto un debate abierto en el plano internacional que garantice la libre expresión de las distintas corrientes de pensamiento socio-culturales, religiosas y filosóficas.

Artículo 22.

Los Estados intentarán garantizar el respeto de los principios enunciados en la presente Declaración y facilitar su aplicación por cuantas medidas resulten apropiadas.

Artículo 23.

Los Estados tomarán las medidas adecuadas para fomentar mediante la educación, la formación y la información, el respeto de los principios antes enunciados y favorecer su reconocimiento y aplicación efectiva. Los Estados deberán fomentar también los intercambios y las redes entre comités de ética independientes, a medida que sean establecidos, para favorecer su plena colaboración.

Artículo 24,

El Comité Internacional de Bioética de la Unesco contribuirá a difundir los principios enunciados en la presente Declaración y a proseguir el examen de las cuestiones planteadas por su aplicación y por la evolución de las tecnologías en cuestión. Deberá organizar consultas apropiadas las partes interesadas, como por ejemplo los grupos vulnerables. Presentará, de conformidad con los procedimientos reglamentarios de la Unesco, recomendaciones a la Conferencia General y presentará asesoramiento en lo referente al seguimiento de la presente Declaración, en particular en lo tocante a la identificación de prácticas que pueden ir en contra de la dignidad humana, como las intervenciones en línea germinal.

Artículo 25.

Ninguna disposición de la presente Declaración podrá interpretarse como si confiriera a un Estado, un grupo o un individuo, un derecho quiera a ejercer una actividad o realizar un acto que vaya en contra de los derechos humanos y libertades fundamentales, y en particular los principios establecidos en la presente Declaración