

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
NEONATOLOGÍA**

Presenta: Luisa María García Valdez

**IDENTIFICACIÓN DE POLIMORFISMOS EN
HIPERTENSIÓN PULMONAR PERSISTENTE DEL RECIÉN
NACIDO.**

México, D.F.

2014

1.- TÍTULO:

Identificación de polimorfismos en Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido.

2.- INVESTIGADORES:

ME Luisa María García Valdez

Residente de segundo año de Neonatología

Departamento de Neonatología

UMAE Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS

Correo electrónico: lugablel@hotmail.com

TUTOR DE TESIS:

Dra. en Cs. Lemus Varela María de Lourdes

Investigador Asociado A

SIN Nivel I

Pediatra Neonatóloga, Departamento de Neonatología

UMAE Pediatría, Centro Médico Nacional de Occidente, IMSS

Correo electrónico: lulalemus@hotmail.com

RESUMEN

Introducción: La hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (HPPRN) es una grave condición de elevada morbilidad y mortalidad, cuyo abordaje terapéutico es complejo. Existe considerable interés en la identificación de alteraciones en las vías de señalización que regulan la vasoconstricción pulmonar.

Objetivo: Identificar polimorfismos característicos en pacientes con HPPRN.

Material y Métodos: Se incluyeron 42 recién nacidos, 21 con HPPRN, confirmada ecocardiográficamente (grupo de estudio) y 21 sin HPPRN (grupo control). Se recabaron antecedentes de interés, peso, edad gestacional y vía de nacimiento. La extracción de ADN, se realizó a partir de 1.5 ml de sangre periférica. Por medio de la reacción en cadena de polimerasa con iniciadores específicos del gen de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), que participa en la vía de óxido nítrico-GMPc, se identificaron los polimorfismos T786C e I/D (VNTR de 27 pares de bases), previo corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida, teñidos con nitrato de plata. Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó t de student, X^2 y prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg. Se consideró significancia estadística cuando el valor de P fue < 0.05 con intervalos de confianza del 95%.

Resultados: El grupo de estudio con HPPRN, fue de menor edad gestacional (35.6 ± 2.81 vs 38.1 ± 1.9 semanas; $p=0.008$), consecuentemente el promedio del peso corporal fue menor en este grupo: 2622 ± 626 g, en contraste con el grupo control 2.992 ± 565 g. El polimorfismo T786C del gen eNOS, mostró diferencias estadísticamente significativas, tanto en la distribución genotípica como en la unión de los genotipos T/C-C/C observado en el 59% (13/21) de los pacientes con HPPRN en contraste con el 25% (5/21) del grupo control se comportó como factor de riesgo [OR 4.33 (95% IC 1.15-16.2), $p=0.029$], en contraste el genotipo T/T, observado en el 43% (9/21) de los pacientes con HPPRN y en el 76% (16/21) del grupo control (sin HPPRN), se comportó como factor de protección [OR 0.23 (95% IC 0.06-0.88), $p<0.029$].

El genotipo I/D, observado en el 50% (11/21) de las pacientes con HPPRN en comparación con el 10% (2/21) del grupo control; se comportó como factor de riesgo [OR 10.4 (95% IC 1.9-76.38), $p=0.002$]. Las mutaciones identificadas alteran la función de eNOS, enzima fundamental en la vía de óxido nítrico-GMP, por tanto favorecen vasoreactividad pulmonar y quizás pobre respuesta a óxido nítrico inhalado.

Conclusión: Los polimorfismos identificados en el gen *eNOS* explican en parte la vasoreactividad característica de esta grave patología, así como la remodelación vascular; según nuestro conocimiento no existen trabajos previos que exploren polimorfismos característicos en los pacientes con HPPRN.

ÍNDICE	PÁGS.
1. Título.....	2
2. Investigadores.....	2
3. Resumen.....	3
4. Introducción.....	7
5. Marco teórico.....	8
6. Justificación.....	28
- 5.1 Magnitud.....	28
- 5.2 Trascendencia.....	28
- 5.3 Factibilidad.....	29
- 5.4 Vulnerabilidad.....	29
7. Planteamiento del problema.....	30
8. Objetivos.....	31
- 7.1 General.....	31
- 7.2 Específicos.....	31
9. Hipótesis de trabajo.....	32
10. Material y métodos.....	32
- 9.1 Diseño de estudio.....	32
- 9.2 Universo de estudio.....	32
- 9.2.1 Criterios de inclusión.....	34
- 9.2.2 Criterios de exclusión.....	34
- 9.2.3 Criterios de eliminación.....	34
- 9.3 Muestra de estudio.....	35

- 9.3.1	Tamaño de la muestra.....	35
- 9.3.2	Forma de selección de los casos al gpo. de estudio.....	36
- 9.4	Descripción de procedimientos.....	36
- 9.5	Análisis estadístico.....	39
11.	Aspectos éticos.....	41
12.	Recursos y financiamiento.....	42
- 11.1	Recursos.....	42
- 11.1.1	Recursos humanos.....	42
- 11.1.2	Recursos materiales.....	42
- 11.1.3	Recursos financieros.....	42
12	Operacionalización de variables.....	43
13.	Cronograma de actividades.....	44
14.	Resultados.....	45
15.	Discusión.....	52
16.	Conclusión.....	54
17.	Referencias bibliográficas.....	55
18.	Anexos.....	63
- 18.1	Consentimiento informado.....	63
- 18.2	Formato de recolección de datos.....	66

3. INTRODUCCION:

La Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN), es una condición grave de elevada morbilidad y mortalidad. Los avances en el tratamiento de esta grave patología, tales como: ventilación mecánica de alta frecuencia, vasodilatadores pulmonares selectivos, verbigracia el óxido nítrico inhalado, el oxigenador de membrana extracorpórea (ECMO por sus siglas en inglés), han mejorado la sobrevida, sin embargo en los informes de la literatura se reporta mortalidad variable entre 20 y 40% y morbilidad respiratoria hasta en el 70% de los sobrevivientes.

La HPPRN se atribuye a la falla en la transición fetal a neonatal, por tanto Gersony le llamo Persistencia de Circulación Fetal. La etiología de esta compleja y heterogénea patología permanece poco clara, se ha asociado a patologías como Síndrome de aspiración de meconio, Neumonía congénita, Hernia Diafragmática congénita, sin embargo puede presentarse sin causa aparente o patología subyacente y se reconoce como “idiopática”.

La HPPRN idiopática ocurre en 1 a 2/1000 recién nacidos vivos, clásicamente se presenta como falla respiratoria hipoxémica, dentro de las primeras horas de edad postnatal, en recién nacidos de término (RNT) y preterminos tardíos. Estudios recientes han incrementado nuestro entendimiento en las bases genéticas de esta grave patología. La susceptibilidad genética se ha inferido, basados en estudios de factores de riesgo ambientales, existe considerable interés en la identificación de polimorfismos en esta grave patología, que contribuyan a la alterada reactividad vascular pulmonar característica de la HPPRN.

4.- MARCO TEÓRICO:

La hipertensión pulmonar persistente del recién nacido es una condición grave que se presenta en el recién nacido de término o en el pretermino tardío (≥ 34 semanas de gestación) y se caracteriza por una falla en la relajación del lecho vascular pulmonar durante la transición a la vida extrauterina. ⁽¹⁾ Se identifica como una patología rápidamente progresiva que conduce a hipoxemia severa, falla ventricular derecha y muerte. ⁽²⁾

La HPPRN fue descrita por primera vez por Gersony en 1969 con el término de persistencia de la circulación fetal; años más tarde se modificó en forma consensuada al término a HPPRN ya que describe de una manera más acertada la fisiopatología de la enfermedad. ⁽³⁾

La incidencia se reporta con amplia variabilidad en los diferentes informes de la literatura en 2 a 6 casos por cada 1000 recién nacidos vivos. ^(3, 4)

Hacia los años 80's la mortalidad reportada de 11 a 35%; actualmente gracias a los nuevos tratamientos la mortalidad se estima en un 10% en los centros de tercer nivel de atención en países desarrollados, ⁽³⁾ sin embargo en los países en vías de desarrollo la mortalidad se eleva desde un 30-60 %, ⁽⁵⁾ y los sobrevivientes encaran gran morbilidad, en el neurodesarrollo a largo plazo de un 25%, y se estima que hasta un 24% de los pacientes persistirán con problemas respiratorios y un 6.4% presentaran algún tipo de pérdida auditiva del tipo neurosensorial ^(4,6)

La circulación pulmonar es un sistema único que difiere de la circulación sistémica en estructura, función y regulación.

Durante la vida fetal, la placenta funciona como un órgano de intercambio gaseoso ya que la resistencia vascular placentaria es baja y recibe cerca de la mitad del gasto ventricular. Durante este periodo, la resistencia vascular pulmonar fetal (RVP) es alta y el flujo sanguíneo es desviado de la arteria pulmonar a la aorta a través del conducto arterioso, y a la placenta a través de las arterias umbilicales (figura 1) ⁽⁷⁾

Circulación en el Feto

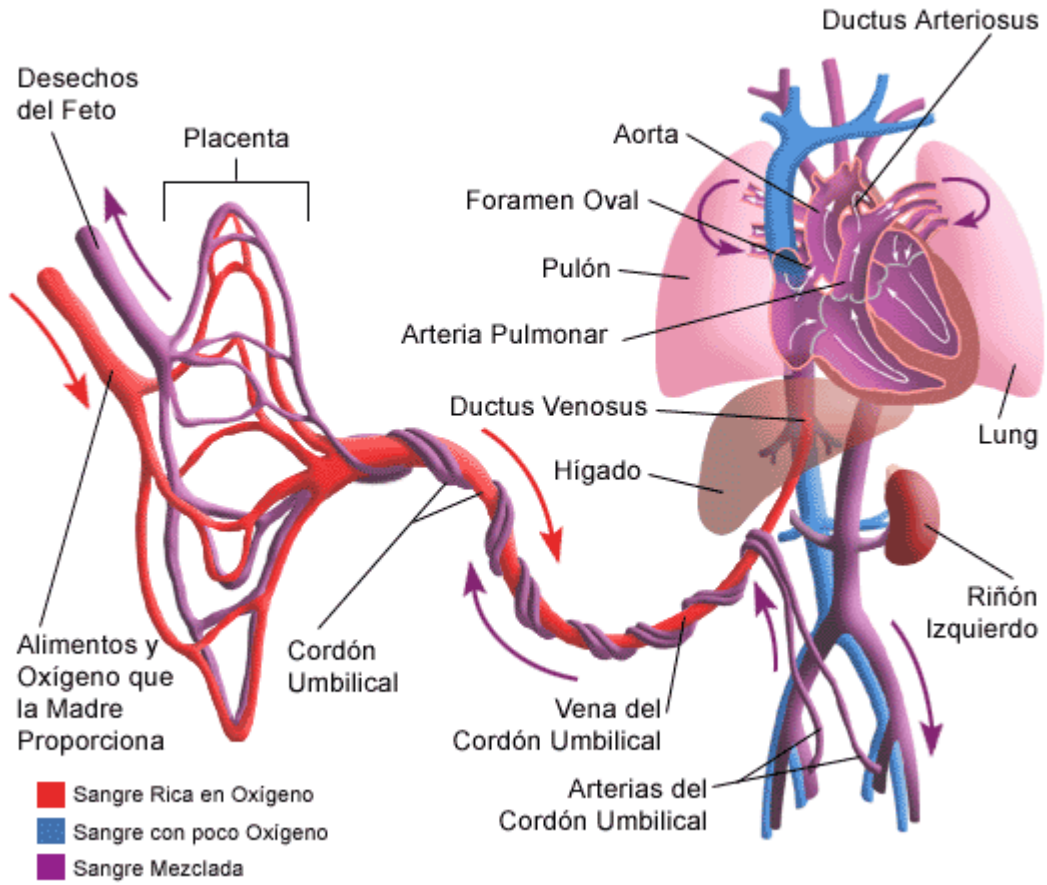


FIGURA 1. CIRCULACION FETO-PLACENTARIA

Estudios en pulmones fetales de ovejas sugieren que la alta resistencia vascular pulmonar permite que solo el 8-10% del gasto ventricular, pase a los pulmones durante la vida fetal; sin embargo estudios más recientes mediante Doppler en fetos humanos han mostrado un mayor flujo del gasto ventricular hacia las arterias pulmonares, reportado del 13% a las 20 semanas de gestación, del 25% a las 30 semanas y de 21% a la semana 38. ⁽⁷⁾

Durante el desarrollo pulmonar en la segunda mitad de la gestación, la fase canalicular presenta una alta resistencia vascular pulmonar causada por la baja densidad de la vasculatura; en la etapa sacular el amplio septo intrasacular contiene una doble cadena capilar y densidad vascular incrementada que disminuyó la resistencia vascular pulmonar. En la fase alveolar a pesar de una rápida proliferación en el número de pequeñas arterias pulmonares, la elevada resistencia vascular pulmonar (RVP) es mantenida por vasoconstricción activa secundaria a una mayor sensibilidad a los mediadores vasoconstrictores como la endotelina-1 y la hipoxemia relativa. ⁽⁷⁾

Al nacer, la primera inspiración, eleva la oxigenación alveolar y del lecho vascular pulmonar, por tanto se reduce a la mitad la resistencia vascular pulmonar e incrementa el flujo pulmonar; provocando el aumento de la presión atrial izquierda por encima de la derecha, lo que favorece el cierre del foramen oval. Al retirar la baja resistencia del lecho placentario de la circulación sistémica al nacimiento, incrementa la resistencia vascular sistémica y como la RVP cae por debajo de esta, condiciona un flujo reverso a través del ducto arterioso; posteriormente se espera el cierre de conducto en respuesta a la tensión de oxígeno y con esto queda establecido el patrón normal postnatal. ⁽⁷⁾

La baja tensión superficial del oxígeno durante la vida fetal y la liberación de vasoconstrictores endógenos como la endotelina-1 y el tromboxano facilitan el mantenimiento de la elevada resistencia vascular pulmonar; conforme madura el feto, la circulación pulmonar se torna más sensible a los efectos vasodilatadores del oxígeno; así al nacimiento, la depuración del líquido pulmonar, la distensión de los espacios aéreos, el incremento de la tensión de superficie y el incremento en el flujo sanguíneo condicionan la vasodilatación pulmonar. El oxígeno, la disminución en la presión parcial de dióxido de carbono y un incremento en el pH promueven la liberación de vasodilatadores conocidos como mediadores derivados del endotelio: óxido nítrico y prostaglandinas. ⁽³⁾

En presencia de oxígeno, la enzima sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS por sus siglas en inglés) convierte la L-arginina en L-citrulina y óxido nítrico, este último difunde fácilmente a la célula de músculo liso vascular en donde estimula a la guanilato ciclasa

soluble (sGC) y esta convierte al nucleótido de guanosin trifosfato (GTP) a guanosin monofosfato cíclico (cGMP); el incremento intracelular de cGMP produce disminución en la afluencia de calcio lo cual permite la relajación del musculo liso vascular o vasorelajación. La fosfodieterasa tipo 5 (PDE -5) degrada al cGMP y limita la vasodilatación (figura 2) ⁽³⁾

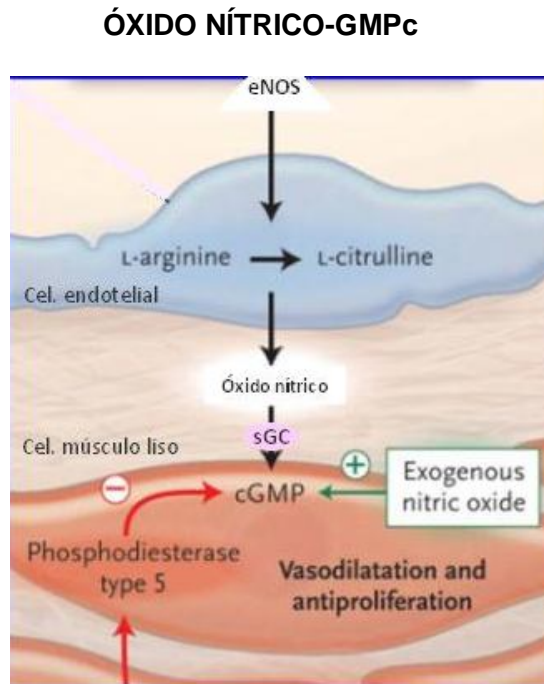


FIGURA 2. VIA DE SEÑALIZACIÓN ÓXIDO NÍTRICO-GMP CICLICO.

eNOS.-Sintasa de oxido nítrico endotelial. sGC.- Guanilato ciclasa soluble.

cGMP.- Monofosfato de guanosina cíclico.

La vía de las prostaglandinas es una complementación de la vasodilatación inducida por el sistema del óxido nítrico-cGMP.

En presencia de oxígeno, la prostaglandina sintasa (PGIS), convierte el ácido araquidónico en prostaciclina (PGI₂), la cual llega a la célula de musculo liso vascular donde activa la enzima adenilato ciclasa y convierte el nucleótido de adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (cAMP) el cual disminuye la afluencia de calcio permitiendo la relajación del musculo liso vascular. La fosfodiesterasa tipo 3 (PDE-3) degrada al cAMP y limita la duración de la vasodilatación (figura 3). ⁽³⁾

PROSTACICLINA-AMPc

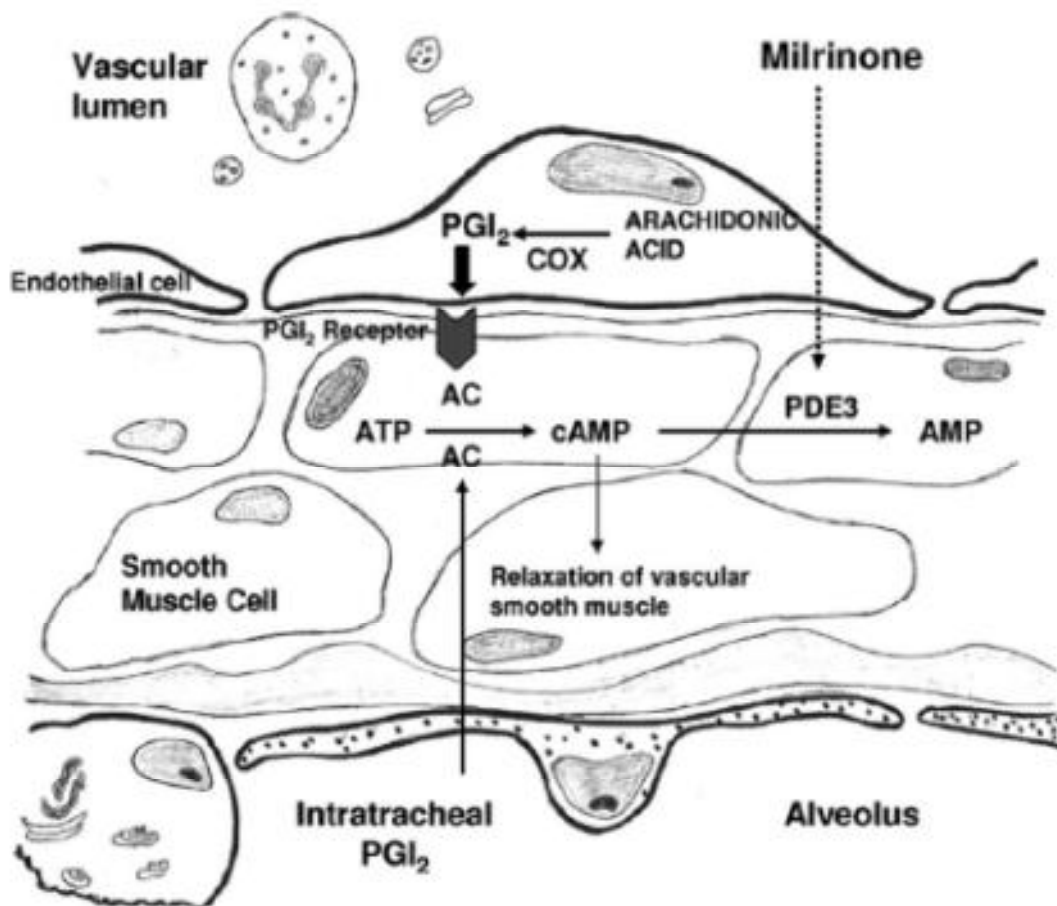


FIGURA 3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN PROSTACICLINA Y AMP CICLICO

PGI₂.- prostaciclina, AC.- anhidrasa carbónica, PDE3.- fosfodiesterasa-3.

En algunos recién nacidos las resistencias vasculares pulmonares se mantienen elevadas después del nacimiento redirigiendo el flujo sanguíneo fuera del pulmón y condicionando marcada hipoxemia. ⁽⁸⁾

La falla en la vasodilatación postnatal puede resultar de una inadecuada oxigenación o expansión pulmonar o por falla en las vías metabólicas de óxido nítrico y prostaglandinas:

✚ Alteraciones bioquímicas en la vía del óxido nítrico-cGMP:

- Disminución en la expresión de eNOS

- Disminución en la disponibilidad de la L- arginina
- Disminución en la producción de oxido nítrico: inhibición competitiva de eNOS por el análogo asimétrico dimetil argina (ADMA); Inhibición de eNOS por elevación en los niveles de endotelina-1; incremento en los niveles de radicales libres, o especies reactivas de oxígeno como el superóxido
- Disminución en la expresión de Guanilato ciclasa soluble
- ✚ Alteraciones bioquímicas en la vía de prostaglandinas-cAMP
- Expresión enzimática alterada
- Inhibición en la síntesis de prostaglandinas
- Exposición prenatal a anti inflamatorios no esteroideos (AINES) ⁽³⁾

La HPPRN no es una entidad aislada, sino un síndrome clínico asociado a diversas enfermedades. Algunos neonatos pueden tener una etiología anatómica o estructural; sin embargo, la mayoría de los casos tienen un desarrollo cardiovascular normal y usualmente es generada por insultos perinatales.⁽⁹⁾

Puede clasificarse en tres alteraciones de la vasculatura pulmonar y de ahí las diferentes etiologías:

1.- VASCULATURA PULMONAR NORMAL CON VASOCONSTRICCIÓN ANOMALA:

- ✚ **Síndrome de aspiración de meconio (SAM).**- se presenta en 5% de los nacimientos que presentan líquido amniótico teñido de meconio y se sugiere que es el resultado de baja reserva fetal *in útero*, con aspiración de meconio de un feto comprometido. Se consideraba la principal causa de la HPPRN.

El meconio puede condicionar falla respiratoria mediante varios mecanismos:

- Obstrucción mecánica de la vía aérea, particularmente durante la exhalación que condiciona atrapamiento de aire, hiperinsuflación y alto riesgo de neumotórax.
- Los componentes del meconio inactivan el surfactante
- El meconio incita respuesta inflamatoria mediante liberación de citocinas

- Incrementa producción de vasoconstrictores como endotelina-1 y tromboxano⁽³⁾

✚ **Síndrome de dificultad respiratoria (SDR).**- La HPPRN se puede presentar en los prematuros como complicación del SDR. La creciente reactividad de las arterias pulmonares en este periodo gestacional predispone a estos neonatos cuando el intercambio gaseoso se ve disminuido por la deficiencia de surfactante.

✚ **Neumonía Congénita.**- Las endotoxinas bacterianas pueden causar aumento de resistencias vasculares por varios mecanismos, tales como liberación de tromboxano, endotelina-1 y citocinas como el factor de necrosis tumoral.

2.- VASCULATURA PULMONAR ESTRUCTURALMENTE ANOMALA:

✚ **Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido primaria.**- usualmente se caracteriza por hipoxemia como signo cardinal, en ausencia de una patología pulmonar identificada. Se reporta como segunda causa; la etiología es aun imprecisa pero se han identificado posibles causas tales como una susceptibilidad genética basada en estudios de factores de riesgo ambientales tales como exposición prenatal a anti-inflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y en variaciones en el desarrollo y severidad de la enfermedad. ^(2, 3)

3.- ALTERACIONES EN LA VASCULATURA POR HIPOPLASIA PULMONAR:

✚ En este grupo de pacientes se encuentran la hernia diafragmática congénita y otras causas de hipoplasia pulmonar como Síndrome de Potter. En estos casos la hipertensión se presenta como una complicación secundaria a una disminución en el número de vasos sanguíneos pulmonares y una reactividad aumentada de estos con gran remodelación por engrosamiento de la intima y adventicia. La hipertensión pulmonar generalmente es crónica y de mínima o nula respuesta a terapia vasodilatadora. Los resultados en estos pacientes están en relación al grado de hipoplasia pulmonar y anomalías asociadas. ⁽³⁾

Mientras una respuesta incompleta al estímulo vasodilatador pulmonar caracteriza a la HPPRN, los factores que incrementan el riesgo persisten en el terreno de la discusión, entre ellos se encuentran:

✚ Vía de nacimiento: en diversos estudios se ha observado que los recién nacidos obtenidos por vía cesárea presentan un riesgo 5 veces mayor de desarrollar HPPRN en comparación con una población control.⁽⁸⁾

✚ Exposición a fármacos prenatales:

- Aspirina (ácido acetil salicílico), se reporta riesgo 4.9 veces mayor que la población control, mientras que otros anti-inflamatorios no esteroideos presentan un riesgo 6 veces mayor.

Los mecanismos ligados a estos medicamentos y la hipertensión pulmonar se relacionan con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxano que pueden condicionar cierre prematuro del ducto arterioso y subsecuentemente incremento en la presión pulmonar.⁽⁸⁾

- Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (de sus siglas en inglés SSRI): se ha demostrado una asociación entre el uso de estos medicamentos y la HPPRN presentando un riesgo 6 veces mayor cuando se utiliza en la 2da mitad del embarazo predominantemente en el tercer trimestre.

El mecanismo de afección aun no es muy claro, sin embargo estudios en ratones adultos indican que una sobre expresión del gen transportador de 5-hidroxitriptamina (5-HT) potencializa la hipertensión pulmonar ocasionada por hipoxia e incrementa la remodelación vascular.⁽⁸⁾

✚ Otros factores que incrementan hasta 6 veces el riesgo de HPPRN en relación con población controles se encuentran: género masculino, edad gestacional entre 34-37 semanas (preterminos tardíos) y > 41 semanas, raza asiática o afroamericanos, tabaquismo materno, obesidad materna (índice masa corporal >27) y diabetes gestacional^(8,10)

Existe particular interés en precisar características específicas que expliquen las alteraciones en vías de señalización que regulan la vasoreactividad pulmonar. El progreso alcanzado por la Biología Molecular ha dado gran impulso a nuevas técnicas que permiten

identificar polimorfismos genéticos, es decir; encontrar una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población o que comparten una patología en común. ⁽¹¹⁾

Aproximadamente el 99.9% de las secuencias de ADN de individuos diferentes, es la misma, pero sus diferencias fenotípicas y/o susceptibilidad a ciertas enfermedades radica en el 0.1% de variación; de tal forma, que a este tipo de variaciones genéticas se les conoce como polimorfismos genéticos, los cuales representan diferentes formas en la secuencia del ADN. ⁽¹¹⁾

En otras palabras los polimorfismos se pueden definir como un locus (localización de un gen sobre el cromosoma) en donde dos o más alelos (variaciones en un gen) están presentes en la población con una frecuencia mayor del 1%. (figura 4). Los polimorfismos por cambios de un nucleótido (de sus siglas en ingles SNPs) constituyen más del 90% de las variaciones genéticas en el genoma humano, las variaciones restantes se producen por inserciones, deleciones, duplicaciones de secuencias en más de dos nucleótidos. ⁽¹²⁾

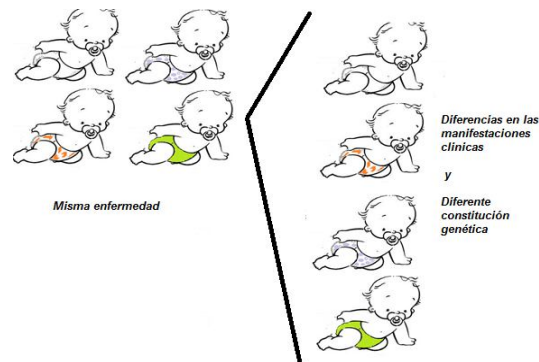


Figura 4. Representación esquemática de polimorfismo genético

Los polimorfismos se distinguen terminológicamente de las mutaciones por su frecuencia. Las diferentes formas de polimorfismos (llamados alelos) son más frecuentes que las mutaciones (frecuencia >1%). La mayoría de los polimorfismos simples tienen 2 alelos los cuales están representados por una sustitución de base por otra. Debido a que los humanos son diploides, un individuo puede tener uno de tres genotipos: homocigoto para el alelo más frecuente, heterocigoto u homocigoto para el alelo menos frecuente. ⁽¹¹⁾

Se han descrito más de 9 millones de polimorfismos en la secuencia de ADN y se ha calculado que los polimorfismos de cambio de una base por otra se presentan uno cada 200 pares de bases en el genoma humano. Con lo cual, se esperaría que existieran

aproximadamente 6 millones de polimorfismos simples en el genoma humano (algunos ya descritos en la base pública de datos de polimorfismos [dbSNP's]).⁽¹¹⁾

Los polimorfismos pueden afectar la función de las proteínas, esto conduce a diversas investigaciones de susceptibilidad genética a diferentes patologías. Así mismo, estas variaciones funcionales pueden estar localizadas en la región promotora del gen que pueden modificar su expresión e inducir alguna enfermedad.⁽¹¹⁾

Adicionalmente, la variabilidad genética también la constituyen los haplotipos, los cuales están compuestos por más de dos polimorfismos en el mismo gen o varios polimorfismos de diferentes genes localizados en un mismo cromosoma. Estos haplotipos son de gran utilidad, ya que proporcionan información acerca de la recombinación (meiosis) que existe entre genes, que permite identificar mutaciones que originan algunas enfermedades mediante métodos de análisis de ligamiento.⁽¹¹⁾

El estudio de los polimorfismos tiene varias aplicaciones en medicina, investigaciones biológicas y procesos jurídicos. En medicina la identificación de polimorfismos es relevante ya que algunas enfermedades genéticas pueden ser causadas por estos; estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades; tratando de delimitar si son causa de riesgo o progresión de la enfermedad; por lo tanto los polimorfismos pueden utilizarse como marcadores de estas enfermedades.⁽¹¹⁾

Expresión alterada de genes y/o proteínas involucradas en la fisiopatología de la HPPRN.

La HPPRN es una patología grave compleja y heterogénea. Si bien se han propuesto varias hipótesis acerca de su etiología, estas no son precisas. Estudios recientes han descrito la asociación de esta enfermedad con diferentes polimorfismos en diferentes genes, entre los que se encuentran: riesgo ambientales, el receptor proteico morfogenético óseo tipo II (BMP2, por sus siglas en inglés) asociado con más de 70% de casos de hipertensión pulmonar familiar en adultos; así como con polimorfismos T-786C y Glu298Asp en el gen *eNOS*, en pacientes con incremento de la reactividad vascular pulmonar.^(2, 13,14)

Otros polimorfismos descritos:

1. Polimorfismos funcionales en el gen (SLC6A4) transportador de serotonina, potente vasoconstrictor pulmonar; que pueden modular el riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar ^(15,62).
2. Se han asociado a la Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN), variantes genéticas, relacionadas con el eje Hipotálamo/Pituitario/Adrenal. Se han documentado alteraciones en los genes CRHR1 y CRHBP, localizados en el cromosoma 17 y 5 respectivamente, que codifican para el receptor y la proteína de unión de la corticotropina, la cual estimula la liberación de cortisol intraútero, regulador esencial de la proliferación celular del músculo liso pulmonar y el tono vascular ⁽¹⁷⁾.
3. Se ha reportado como factor de riesgo genético para desarrollar HPPRN, a la asociación entre genotipo heterocigoto T1405N de carbamoyl-fosfatasa sintetasa, posiblemente por la pérdida de sustrato para la expresión del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). ^(18,19).
4. Mutaciones en la proteína del surfactante B (SP-B), de genes que conducen a la síntesis o procesado defectuoso del surfactante, puede causar falla respiratoria hipoxémica y consecuentemente HPPRN. El defecto más común en la síntesis de SP-B es debido a una mutación en el codón 121 del gen de SP-B ⁽³⁾.

Proteínas involucradas en la fisiopatología de la HPPRN:

Elastasa vascular endógena, su actividad se ha relacionado con inducción de cambios estructurales en las arterias pulmonares. Estos hallazgos se han reportado en modelos de experimentación sometidos a hipoxia o inyección de monocrotaline ^(20,21). Otros estudios demuestran que mediante el empleo de inhibidores de la Elastasa Serine se consiguió evitar el desarrollo o progresión de los cambios vasculares pulmonares y la HPPRN ⁽¹⁸⁾. La elastasa vascular endógena, puede liberar mitógenos de células de músculo liso activado biológicamente; como el factor de crecimiento fibroblástico y depositarse en la matriz extracelular ^(22,23).

El resultado de la hiperplasia de las células de músculo liso contribuye a la hipertrofia de la pared de las arterias, a la liberación de otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), que pueden inducir aumento en la síntesis de elastina y colágeno que a su vez favorecen el engrosamiento vascular ⁽²³⁾.

Glicoproteína de la matriz de tenascina, se ha demostrado que su activación interactúa cooperativamente con factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico y factor de crecimiento de fibroblastos básico, en la inducción de la respuesta proliferativa en la pared del vaso ⁽²⁴⁾.

Endotelinas, son péptidos vasoactivos con diferentes isoformas (ET-1, ET-2, ET-3) que han demostrado causar aumento de la resistencia vascular pulmonar fetal. La endotelina 1 (ET-1) ha sido la más estudiada. En experimentos con fetos de corderos y conejos, ha demostrado contraer las arterias pulmonares fetales. La ET-1 presenta una respuesta bifásica mediada por sus receptores ET-B, que presenta una acción vasodilatadora por estimulación del NO y la ET-A, que media la vasoconstricción sostenida. Kumar y su grupo demostraron aumento de la ET-1 inmunorreactiva sérica en recién nacidos humanos con HPPRN ⁽²⁵⁻²⁷⁾.

La **Rho quinasa**, produce una vasoconstricción sostenida de la musculatura lisa a través de la fosforilación y la inactivación de la fosfatasa de la cadena liviana de la miosina, que a su vez aumenta la sensibilidad de la célula muscular lisa vascular al calcio, produciendo una vasoconstricción sostenida. La Rho quinasa puede activarse por efecto de hipoxia y mediadores bioquímicos como la ET-1, tromboxano y serotonina, incrementando así la resistencia muscular vascular sostenidamente ^(28,29).

En modelos experimentales, se ha encontrado que la **dimetil arginina asimétrica** (ADMA), análogo de la arginina, puede producir inhibición competitiva de la eNOS, con lo cual provoca disminución del óxido nítrico (NO). ^(3,30) Se ha descrito aumento de la ADMA en pacientes con cardiopatía congénita e hipertensión pulmonar. ^(31, 32)

DIAGNÓSTICO CLINICO DE LA HPPRN

El escenario clásico es: un recién nacido a término o pretérmino tardío, con síntomas de dificultad respiratoria poco después del parto, pueden ser secundarias a diferentes enfermedades pulmonares, o simplemente una transición alterada a la vida extrauterina, sin embargo, si la dificultad respiratoria se acompaña de oxigenación lábil e hipoxemia desproporcionadas al grado de enfermedad pulmonar, debe sospecharse una HPPRN (33,34,35).

El examen físico del paciente con HPPRN muestra un cuadro de dificultad respiratoria mínimo en comparación con la situación de grave hipoxemia; se observa taquipnea, con esfuerzo respiratorio cuantificado en la escala de Silverman que no suele ser importante, presencia de leves tirajes y quejido. ⁽³⁶⁾ Como característica principal presentan labilidad en la oximetría de pulso, observándose disminución de oximetría y cianosis marcada frente a estímulos como el llanto, cambios de posición, colocación de sonda orogástrica (3,33,34,37,38).

A la auscultación pueden encontrarse ruidos cardiacos anómalos, con la presencia de soplos sistólico de regurgitación tricuspídea, reforzamiento del segundo ruido a nivel paraesternal derecho; propio de la insuficiencia tricuspídea. La tensión arterial sistémica disminuye hasta 3 desviaciones estándar; sin embargo estos signos no son patognomónicos de HPPRN ^(3,35,36,37).

DIAGNÓSTICO:

ESTANDAR DE ORO DIAGNÓSTICO DE LA HPPRN: ECOCARDIOGRAFIA

Si bien la clínica orienta al diagnóstico, el estándar de oro es el ecocardiograma que puede realizarse al pie de la cama, no es invasivo y permite estimar presión sistólica pulmonar elevada o suprasistémica, además descartar alteraciones estructurales cardíacas y evaluar respuesta a estrategias terapéuticas y consecuentemente pronóstico. (39, 40, 41,42)

Debido a que la HPPRN es una alteración hemodinámica, la técnica Doppler es un excelente complemento de la ecocardiografía modo M y bidimensional convirtiéndose en el método fidedigno no invasivo, para estimar la presión de la arteria pulmonar que se

detecta en más del 90% de los casos de HPPRN y que se correlaciona con más del 95% de las presiones medidas por cateterización ^(36, 43).

Después de descartar una cardiopatía congénita cianótica, se evalúa la función miocárdica, la cual a menudo se encuentra afectada; se determina la severidad de la hipertensión pulmonar, mediante la regurgitación tricuspídea y cortocircuitos extrapulmonares: conducto arterioso y foramen oval ^(42, 44,45,46,47).

1. DIRECCIÓN Y VELOCIDAD DEL CORTO CIRCUITO DUCTAL.- posterior a las 2 primeras horas de vida, cualquier *Ductus* arterioso debe tener un cortocircuito de lo sistémico a lo pulmonar (izquierda a derecha). Generalmente se observa como un jet de flujo naranja sobre la vista ecográfica ductal. Sin embargo, en la HPPRN, este cortocircuito va de lo pulmonar a lo sistémico (de derecha a izquierda) y el jet de flujo aparece azul ^(40, 41,44,46).

1a. Flujo de sangre únicamente de derecha a izquierda (de lo pulmonar a lo sistémico).- indica que la presión en la arteria pulmonar es mayor que en la aorta durante todo el ciclo cardiaco. Un cortocircuito exclusivo de derecha a izquierda puede ser un factor predictivo de mortalidad (OR: 7.8; 95%, IC: 1.2 a 52.8; p=0.04) ^(40, 41,44,46).

1b. Flujo de sangre Bidireccional.- ocurre cuando las presiones tanto en la aorta como en la pulmonar son iguales. El flujo es de izquierda a derecha, durante la diástole y de derecha a izquierda durante la sístole (debido a que la onda de presión de la pulmonar alcanza el *Ductus* primero que la onda de presión de la aorta) El flujo de sangre bidireccional es frecuente en niños saludables en las primeras 12 horas de vida y debe cambiar a sólo de izquierda a derecha cuando la presión aórtica empieza a ser mayor que la presión pulmonar ^(40, 41,44,46).

1c. Flujo de sangre exclusivo de izquierda a derecha determina la necesidad de manejo cardiovascular (persistencia de conducto arterioso) (OR: 0.13; 95% IC: 0.01 a 1.22; p=0.07) ^(40,41,44,46).

2. CUANTIFICACIÓN DEL JET DE VELOCIDAD DE LA INSUFICIENCIA TRICUSPÍDEA.- es el método más preciso de determinar la presión arterial pulmonar.

La ecografía debe mostrar el jet de flujo sanguíneo que se escapa a través de la válvula tricúspide, y la velocidad del jet es un indicador directo de la presión ventricular derecha e indirecto de la presión de la arteria pulmonar por medio de la ecuación de Bernoulli (el gradiente de presión entre 2 cámaras, a través de un orificio estrecho es igual a 4 veces la velocidad al cuadrado) ^(40,41,44,46).

Al estimar la velocidad del jet (si existe) el gradiente de presión a través de la válvula tricuspídea puede estimarse como 4 veces la velocidad al cuadrado y a este resultado sumarle 5 mmHg (una estimación de la presión de la aurícula derecha) y así calcular la presión del ventrículo derecho y asumir la de la arteria pulmonar. Este valor se compara con la presión arterial sistólica sistémica (no la presión media sistémica) y así se determina la severidad de la hipertensión pulmonar. Si la presión del ventrículo derecho al final de la diástole es mayor a 20 mmHg, el riesgo de muerte súbita es relativamente alto. La mayoría de los ecocardiógrafos actuales nos ofrecen en forma directa el valor de velocidad y el gradiente de presión del flujo regurgitante tricuspídeo. Presión del ventrículo derecho = presión de la aurícula derecha + $(4 \times (\text{velocidad de jet de la insuficiencia tricuspídea})^2)$ ^(41,43,44,47).

La estimación de la presión de la arteria pulmonar es un aspecto importante para el diagnóstico y tratamiento de la HPPRN, sin embargo la presión barométrica a la que se encuentra el neonato al momento de desarrollar la enfermedad, puede influir en la presentación de la misma ya que un porcentaje de la población de recién nacidos normales pueden presentar insuficiencia tricuspídea en los primeros días de vida en forma fisiológica, abarcando ésta sólo la protosístole a diferencia de la encontrada en la HPPRN en que ésta es holosistólica ⁽⁴⁶⁾.

3. EVIDENCIA DE LA DISTORSIÓN SEPTAL VENTRICULAR.- en situaciones fisiológicas, la presión del ventrículo izquierdo es mayor que el derecho, por lo tanto el tabique interventricular hace un arco hacia la derecha. Sin embargo en HPPRN la presión ventricular derecha es a menudo igual o mayor que la izquierda, por lo que el tabique estará aplanado e incluso haciendo arco o convexidad hacia el ventrículo izquierdo ^(40,41,44,46).

También puede encontrarse una desviación del tabique interauricular hacia la izquierda reflejo del llenado de la aurícula derecha (diástole), la presión de llenado ventricular o más de la presión sistólica del ventrículo derecho ⁽⁴⁷⁾.

Fraise y colaboradores, encontraron que la existencia de un cortocircuito de izquierda a derecha. Puede aumentar el riesgo de una pobre respuesta a óxido nítrico (OR: 7,46; intervalo de confianza del 95% 1,23 a 45.1; p = 0.028) ⁽⁴⁸⁾.

GRADIENTE PREDUCTAL Y POSDUCTAL

Esta prueba se realiza con el objeto de establecer un diagnostico presuntivo de la hipertensión pulmonar del recién nacido ⁽⁴⁹⁾.

El grado de oxigenación pre y posductal, medido en forma simultánea por determinación de la presión arterial de oxígeno o de la saturación de oxígeno, es útil para confirmar la presencia de shunt de derecha a izquierda, a nivel ductal. En el 50 a 60 % de los casos de HPPRN, existe este shunt o cortocircuito ⁽³⁴⁾.

Con base en el grado y situación del cortocircuito de derecha a izquierda, se observan varios niveles de oxigenación en los sitios preductales (arteria temporal derecha o radial derecha) y sitios postductales (arterias umbilicales o extremidades inferiores) ⁽⁵⁰⁾.

En la HPPRN puede producirse cortocircuito en el foramen oval, conducto arterioso o ambos. Cuando el cortocircuito ocurre exclusivamente en el conducto arterioso, los gases sanguíneos arteriales extraídos preductalmente son mayores que los gases posductales. Una diferencia o gradiente mayor de 15-20 mmHg debe considerarse significativa y una prueba negativa no excluye el diagnostico, pues el cortocircuito a nivel auricular o a través del foramen oval no produce esta diferencia en el 40 % de los casos ^(35,51).

Las diferencias de presión arterial de oxígeno deben ser de más de 10 mmHg cuando la PaO₂ es baja (por ejemplo: 40 mmHg posductal y 51 mmHg preductal) y de más de 15 a 20 mmHg de mercurio en los casos de PaO₂ más elevada (por ejemplo: 85 mmHg postductal y 100 mmHg preductal) ⁽³⁴⁾.

Esta prueba también se podría realizar con oximetría transcutánea (TcPaO₂), mediante el empleo de dos oxímetros con un sensor colocado en la parte superior derecha de la pared torácica (preductal) y el otro en la parte inferior izquierda del abdomen (postductal),

este método se ha abandonado, por las quemaduras generadas en el paciente; como alternativa actualmente se usa el oxímetro de pulso con un sensor colocado en la mano derecha y otro en el pie izquierdo (postductal) ⁽⁵¹⁾.

Una saturación preductal mayor del 10% que la postductal, sugiere un cortocircuito de derecha a izquierda por el conducto arterioso⁽⁵¹⁾.

Una diferencia de saturación del 2 al 3 % ya puede ser significativa, si las mediciones son precisas.

La otra condición en la que la presión arterial de oxígeno y la saturación preductal es mayor que la postductal es la obstrucción de salida ventricular izquierda como sucede en la coartación o interrupción aortica, con *ductus* arterioso permeable ⁽³¹⁾.

Cuando en esta cardiopatía hay mejor flujo pulmonar, la diferencia pre y postductal casi desaparece, pero el recién nacido estará clínicamente peor, porque disminuye significativamente el flujo sistémico *ductus* dependiente ⁽³⁴⁾.

Si la diferencia o gradiente de O₂ entre la pre y postductal es invertida, es decir, la postductal es mayor que la preductal, podemos estar ante una obstrucción aortica con malformaciones del cono-tronco (ejemplo: transposición de grandes vasos) ⁽³⁴⁾.

En un pequeño grupo de pacientes el diagnóstico puede continuar incierto. En ellos, lo importante es no omitir cardiopatías que cursa con HPPRN como la anomalía del retorno venoso pulmonar ^[2], los recién nacidos con esta cardiopatía congénita, tienen cianosis, hipoxemia, corazón anormal o pequeño y congestión venosa en la radiografía de tórax y no suelen presentar diferencias pre y postductal en la presión arterial de oxígeno ni en la saturación u oximetría de pulso ⁽³⁴⁾.

INDICE DE OXIGENACIÓN

El índice de oxigenación (IO) fue creado en la década de los ochentas. Pese a existir otros índices que evalúan el intercambio gaseoso pulmonar la particularidad de este índice es que evalúa la oxigenación relacionándola con el grado de soporte ventilatorio a través de la medición de la presión media de la vía aérea ⁽⁵²⁾. Representa la relación entre la cantidad de oxígeno entregado al pulmón y la cantidad de oxígeno que se difunde en la sangre. Puede ser interpretado como un marcador

subrogado de la función pulmonar y de la capacidad de respuesta del sistema cardiorespiratorio ⁽⁵³⁾.

La fórmula para su cálculo es:

$$\frac{\text{PMVA} \times \text{FiO}_2}{\text{PaO}_2} \times 100$$

Donde:

PMVA.-presión media de la vía aérea, por sus siglas en inglés, en cmH₂O.

FiO₂.-fracción inspirada de oxígeno, expresada en porcentaje.

PaO₂.-presión parcial de oxígeno arterial (mmHg).

La PaO₂ empleada es habitualmente la postductal, extraída del catéter de la arteria umbilical.

Cuanto mayor son los valores mayor es la gravedad de la insuficiencia respiratoria. El IO constituye un índice fácil de medir ya que sus componentes (PMVA, FIO₂ y PAO₂), están habitualmente documentados en el monitoreo de rutina de los recién nacidos con insuficiencia respiratoria debido a HPPRN u otras causas. Su cálculo es fácil comparado con otros índices y se efectúa al lado de la cama del enfermo. Su mayor debilidad es que el valor de la presión media de la vía aérea, que es parte de la fórmula, no sólo depende de la gravedad de la patología pulmonar sino también de la habilidad del Neonatólogo tratante en la ventilación de recién nacidos ⁽³⁵⁾.

En el año 1985 Barlett y colaboradores ^(54,55) reportaron que empleaban el IO en recién nacidos de término con insuficiencia ventilatoria para predecir displasia brocopulmonar o muerte. En su servicio un IO igual o mayor a 40 correlacionaba con un riesgo de mortalidad de 80-90% y si el IO era igual o mayor a 25 pero inferior a 40 la mortalidad era del 50%. Actualmente no se mantienen estos porcentajes gracias al advenimiento nuevas estrategias terapéuticas como óxido nítrico, ventilación de alta frecuencia y surfactante exógeno⁽³⁵⁾.

En los años siguientes el IO fue empleado para comparar gravedad de recién nacidos y en estudios aleatorizados para definir tratamiento con óxido nítrico inhalado (ONi) o determinar indicación de oxigenador de membrana extracorpórea (ECMO, por sus siglas en inglés).


En el metaanálisis sobre el empleo de ONi para el tratamiento de la insuficiencia respiratoria en niños de término o cercanos al término, el IO era empleado no sólo para determinar indicación de ONi sino también para evaluar la eficiencia del ONi después de 30 a 60 minutos de iniciado el tratamiento tanto como valor absoluto como variación desde el valor basal. Los autores concluyen que sería apropiado iniciar tratamiento con ONi en aquellos pacientes cuyo IO sea igual o mayor a 25 o si la PaO₂ es menor a 100 mmHg recibiendo 100% de oxígeno adicional ⁽⁵⁶⁾. El IO también es empleado para decidir el ingreso a ECMO en pacientes con insuficiencia respiratoria severa pero potencialmente reversible. A través del tiempo un IO mayor o igual a 40 se ha transformado en una de las indicaciones mas empleadas para decidir el ingreso a ECMO de un recién nacido con insuficiencia respiratoria ⁽⁵⁷⁾. El IO también se ha empleado como predictor de sobrevida en recién nacidos con hernia diafragmática congénita ⁽⁵⁸⁾.

TRATAMIENTO

El tratamiento para la HPPRN está enfocado en restablecer la adaptación cardiopulmonar, evitando lesión pulmonar y efectos adversos en perfusión sistémica.

Aunque el soporte hemodinámico y una adecuada ventilación/perfusión son vitales en el manejo, el tratamiento vasodilatador pulmonar es el estándar de oro. ⁽⁴⁾

1.-VASODILATADORES PULMONARES

 **OXIDO NITRICO INHALADO (iNO):** alcanza el espacio alveolar y difunde hasta el musculo liso del lecho vascular pulmonar donde incrementa la concentración de cGMP condicionando la vasodilatación. Preferentemente se distribuye en los segmentos ventilados del pulmón, resultando en un incremento en la perfusión de estos segmentos y una mejoría en la oxigenación la cual es evidente en pocos minutos.

Su seguridad y eficacia para tratar la HPPRN ha sido estudiada en múltiples estudios controlados longitudinales. El iNO disminuye significativamente la necesidad de ECMO, sin embargo hasta en un 40% de los casos pueden ser no respondedores por lo que no presentaran mejoría en la oxigenación.

Diversos estudios han demostrado que aunque se inicie el iNO en estadios tempranos de la falla respiratoria (índice oxigenación entre 15-25) no disminuye la incidencia de requerir ECMO o muerte o mejorar el desenlace a otros niveles como alteraciones en el neurodesarrollo a largo plazo; sin embargo un retraso en el inicio del iNO hasta estadios avanzados de la falla respiratoria (IO >40) condiciona una mayor dependencia de oxígeno y peor pronóstico. ⁽⁴⁾

Este fármaco puede administrarse ya sea por ventilación mecánica o por dispositivos de presión positiva continua de la vía aérea o por canula nasal. La dosis recomendada es de 20 partes por millón, demostrándose que dosis más altas, no mejoran los resultados y solo condicionan mayor riesgo de toxicidad. ^(3,4)

2.- INHIBIDORES DE FOSFODIESTERASA

🚦 **Inhibidor fosfodiesterasa 5:** (Sildenafil) La PD-5 pertenece a una familia de enzimas que hidrolizan e inactivan cGMP condicionando una vasoconstricción. El sildenafil actúa inhibiendo esta enzima permitiendo incremento en la concentración de cGMP lo que disminuye la afluencia de calcio y permite la vasorelajación de la vasculatura pulmonar. ^(3,4)

Su vía de administración es oral y la dosis recomendada es de 1-2 mg/kg/dosis

🚦 **Inhibidor de la fosfodiesterasa 3:** (Milrinona) La PD-3 es una enzima que hidroliza e inactiva cAMP favoreciendo una vasoconstricción del lecho vascular pulmonar. La milrinona actúa inhibiendo esta enzima lo que permite incremento en cAMP y favorecer la vasorelajación de la vasculatura pulmonar. ^(3,4)

3.- OTRAS ALTERNATIVAS

🚦 **Antagonista de receptores para Endotelina-1:** (Bosentan). La endotelina-1 es el más potente vasoconstrictor y se cree que tiene un rol importante en la fisiopatología de la HPPRN, por lo cual se considera que bloquear su receptor condicionaría una vasorelajación de la vasculatura pulmonar; sin embargo aun está en estudio su uso en el recién nacido. ⁽⁴⁾

5. JUSTIFICACIÓN

La Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN), es una condición grave de elevada morbilidad y mortalidad. Los avances en el tratamiento de esta grave patología, tales como: ventilación mecánica de alta frecuencia, vasodilatadores pulmonares selectivos, verbigracia el óxido nítrico inhalado, el oxigenador de membrana extracorpórea, han mejorado la sobrevida, sin embargo en los informes de la literatura se reporta mortalidad variable entre 20 y 40% y morbilidad respiratoria hasta en el 70% de los sobrevivientes.

5.1 Magnitud del problema:

HPPRN pone en peligro la vida, desarrollo neurológico, estrategias terapéuticas de costo elevado, vasodilatador pulmonar selectivo (óxido nítrico) y no todos son respondedores, y solo un centro hospitalario del medio privado en el país cuenta con ECMO.

5.2 Trascendencia:

El estudio de los polimorfismos tiene muchas aplicaciones en medicina, investigación biomédica y procesos jurídicos. En medicina, de manera particular, la identificación de polimorfismos toma vital relevancia ya que algunas enfermedades genéticas pueden ser causadas por estos; estudios de asociación permiten identificar genes relacionados con distintas enfermedades, tratando de delimitar si son causa de riesgo o progresión de la enfermedad; por lo tanto los polimorfismos pueden utilizarse como marcadores de ciertas enfermedades.

Como es habitual, los pocos estudios publicados a nivel internacional sobre identificación de polimorfismos son realizados en adultos; incluso en nuestro país, encontramos estudios de correlación entre polimorfismos y enfermedades de la población adulta como enfermedad coronaria aguda, cáncer de mama y enfermedades respiratorias, pero ninguno en la población pediátrica.

La hipertensión pulmonar persistente del recién nacido es una patología grave, compleja y heterogénea. Si bien, se han propuesto varias hipótesis acerca de su etiología, esta no es precisa. En la última década han incrementado los estudios del endotelio vascular debido a su función vasodilatadora y ateroprotectora mediante la producción de óxido nítrico

(NO). Al parecer, defectos en la síntesis de NO pueden predisponer al desarrollo de enfermedades cardiovasculares e hipertensión arterial; sin embargo la regulación de la disponibilidad de esta molécula es dependiente de la enzima eNOS. La búsqueda de polimorfismos en este gen, podrían ser relevantes en la susceptibilidad para el desarrollo de la Hipertensión pulmonar neonatal.

Dado que no existen estudios en donde asocien los polimorfismos VNTR 4a/b y T786C del gen eNOS con la hipertensión arterial pulmonar neonatal, el desarrollo del presente trabajo podría dar las bases para estudios de asociación de los polimorfismos anteriores y otros polimorfismos en el mismo gen, así como en otros genes que participan en la vía metabólica del ON de la población analizada.

5.3 Factibilidad:

La Unidad de Terapia Intensiva Neonatal de la UMAE del Centro Médico Nacional de Occidente recibe pacientes de 6 estados de la Republica Mexicana, contamos con 700 ingresos anuales y aproximadamente el 8-10% corresponden a esta entidad.

5.4 Vulnerabilidad:

Ante la elevada morbilidad y mortalidad que acompaña a la HPPRN y la pobre o nula respuesta a las diferentes opciones terapéuticas, las múltiples readmisiones hospitalarias de los sobrevivientes, los elevados gastos económicos, el desequilibrio en la dinámica familiar, etc, consideramos que merece la pena continuar con la búsqueda de etiología precisa para impactar en el desarrollo de estrategias terapéuticas, llegando así en un futuro no lejano a una medicina genómica personalizada.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

La hipertensión pulmonar persistente del recién nacido se caracteriza clínicamente por una falla respiratoria hipoxémica en los primeros días de vida en los recién nacidos de término o pretermino tardíos sin asociación a anomalías congénitas o lesiones cardíacas cianóticas, que condiciona vasoconstricción, disminución del intercambio gaseoso, acidemia e hipercarbia y que no tratarse a tiempo puede condicionar la muerte.

Se ha observado que la presencia de algunos polimorfismos intervienen en la expresión alterada de genes y/o proteínas involucradas en la respuesta vasoconstrictora pulmonar, tales como VNTR 4a/b y T786C del gen eNOS, por lo que su identificación sería de mucha utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la HPPRN.

Es por ello que se plantea la siguiente pregunta de Investigación: ***¿Es posible identificar polimorfismos característicos de la HPPRN?***

7. OBJETIVOS

7.1 GENERAL

Identificar polimorfismos característicos en neonatos con Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido.

7.2 ESPECÍFICOS

- a) Determinar asociaciones entre polimorfismos y proteínas involucradas en vías de señalización bioquímicas de vasoreactividad pulmonar.
- b) Relacionar polimorfismos con factores ambientales.
- c) Categorizar determinado polimorfismo identificado con pronóstico o desenlace final.

8. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe un patrón característico de polimorfismos en la HPPRN.

9. MATERIAL Y MÉTODOS:

9.1 DISEÑO DE ESTUDIO:

Transversal comparativo

9.2 UNIVERSO DE ESTUDIO:

Se estudiarán a todos los recién nacidos de término y pretermino tardío, que ingresarán a la unidad de terapia intensiva neonatal del hospital de pediatría de la UMAE de Centro Médico Nacional de Occidente que presentarán dificultad respiratoria progresiva hipoxémica con índice de oxigenación ≥ 20 y que se confirmó mediante ecocardiografía Doppler HPPRN. A su vez por cada paciente con confirmación diagnóstica, se incluyó a un recién nacido de término o pretermino tardío que ingresó a la unidad y que **no** presentó HPPRN.

El diagnóstico de Hipertensión Pulmonar Persistente de Recién Nacido, se confirmó por estudio ecocardiográfico, mediante hallazgos como mezcla venoarterial extrapulmonar, es decir, flujo de derecha e izquierda o bidireccional a nivel de foramen oval y ducto arterioso, así como estimación de la presión sistólica arterial pulmonar igual o mayor a la sistémica. El Ecocardiograma se realizó por el servicio de Cardiología Pediátrica de la unidad mediante el equipo ecocardiografico tridimensional modelo iE33 XMatrix, con transductor X3, marca Philips, cuyo número de serie es: B00F64.

Cálculo de la presión pulmonar

1.-Por jet de insuficiencia tricuspídea.-Se utilizó la imagen en 4 cámaras, se evaluó por Doppler continuo, auxiliado por la imagen de Doppler color. Se calculo el gradiente de presión entre el ventrículo derecho y la aurícula derecha y se utilizo la ecuación modificada de Bernoulli:

Gradiente de presión=4(Vmax)2

Donde Vmax corresponde a la velocidad máxima del jet de insuficiencia tricuspídea.

La presión sistólica del VD se calcula de la siguiente manera:

$$4 \times (V_{\max})^2 + AD$$

AD= 5 sí la aurícula tiene un tamaño normal y 10 sí está dilatada.

2.- Por intervalos sistólicos.- Se utiliza el flujo Doppler pulsado en el tronco de la arteria pulmonar, en la imagen paraesternal eje corto, a 1 cm distal de la válvula pulmonar y en la parte media del vaso.

El periodo pre-expulsivo se mide desde el inicio de la onda Q del electrocardiograma hasta el inicio del flujo y el tiempo de aceleración desde el inicio del flujo hasta el momento de la máxima velocidad.

Obtenidos estos valores se utilizan las ecuaciones de regresión que proporcionan las presiones físicas.

$$PSP = 55 \times PPE/TA - 0.8$$

$$PDP = 35.3 \times PPE/TA - 10.8$$

$$PPM = 43.2 \times PPE/TA - 4.6$$

Donde:

PPE es el periodo pre-expulsivo

TA es el tiempo de aceleración

PSP es la presión sistólica pulmonar

PDP es presión diastólica pulmonar

PMP es presión media pulmonar

9.2.1 Criterios de inclusión (PACIENTES CON HPPRN):

- Edad gestacional entre 34 y 42 semanas.
- Diagnóstico de HPPRN por ecocardiograma.
- Autorización o consentimiento informado por escrito del padre o tutor (anexo 1).

9.2.2 Criterios de inclusión (PACIENTES SIN HPPRN):

- Edad gestacional entre 34 y 42 semanas.
- Que no presenten diagnóstico de HPPRN
- Autorización o consentimiento informado por escrito del padre o tutor (anexo 1).

9.2.3 Criterios de Exclusión:

- Malformaciones congénitas mayores.
- Anomalías cromosómicas.
- No autorización de consentimiento informado para ingresar al protocolo de estudio.

9.2.4 Criterios de Eliminación:

- Transferencia a otra unidad médica o alta voluntaria.
- Pérdida o baja de la seguridad social del Instituto.
- Declinar el consentimiento previamente autorizado por el padre o tutor, antes de la toma de muestra sanguínea

9.3 CALCULO MUESTRAL

9.3.1 Tamaño de la muestra:

El tamaño de muestra se calculó con base la fórmula muestreo no probabilístico por casos consecutivos:

$$m' = \frac{(Z_{1-\alpha/2} \sqrt{(r+1)PQ} + Z_{1-\beta} \sqrt{(r*P1*Q1+P2*Q2)})^2}{r*(P2-P1)^2}$$

$$m' = \frac{(1.960 \sqrt{(1.00+1)0.45*0.55} + 0.842 \sqrt{(1.00*0.60*0.40+0.30*0.70)})^2}{1.00(0.30-0.60)^2}$$

$$m' = 41.97$$

Donde:

r = razón de controles:casos = 1:1

P1 = Proporción de presencia del factor de riesgo en los controles (grupo sano) = 0.60

Q1 = 1-P1 = 0.40

P2 = Proporción de presencia del factor de riesgo en los casos (grupo enfermo) = 0.30

Q2 = 1-P2 = 0.70

P= Proporción promedio ponderada de presencia del factor en el universo = 0.45

P= (P1+r*P2)/ r+1

Q = 1-P = 0.55

α = Nivel de significancia o probabilidad error tipo 1 = 0.05

1- α/2 = Percentil bilateral para el nivel de significancia asignado = 0.975

Z_{1- α/2} = Z_{0.975} de la distribución normal estandarizada que deja un área de 0.80 a la izquierda, implica un poder del 80% = 0.842

m´ = Tamaño de la muestra

m = Tamaño de la muestra corregido

$$m = m' * \left[1 + \sqrt{\frac{1 * 2 (r+1)}{m' * r * (P2-P1)}} \right]^2$$

N=42

Tamaño de muestra para el grupo de referencia (controles): $m_1=r*m$ 42

Tamaño de muestra para el grupo de estudio (casos): $m_2=m$ 42

Para el cálculo de la muestra se tomó en cuenta el polimorfismo más frecuente.

9.3.2 Forma de selección del universo de estudio:

Por cada neonato con HPPRN diagnosticado por el estándar de oro, se incluyó un paciente sin HPPRN, como control.

9.4 DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS:

Previo consentimiento informado (Anexo I), se obtuvo 1.5 ml de muestra sanguínea de cada paciente con HPPRN y sin HPPRN, la cual se recolectó en tubo de ensayo con EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetraacético) como anticoagulante y se almacenó bajo refrigeración (-5°C).

Se realizó la extracción de DNA a partir de leucocitos mediante el micro-método de DTAB-CTAB.⁽⁶⁰⁾ Se verificó la calidad y pureza del DNA por el análisis espectrofotométrico y electroforesis en geles de agarosa.⁽⁶¹⁾ Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con iniciadores específicos para cada reacción y las condiciones de amplificación descritos a continuación:

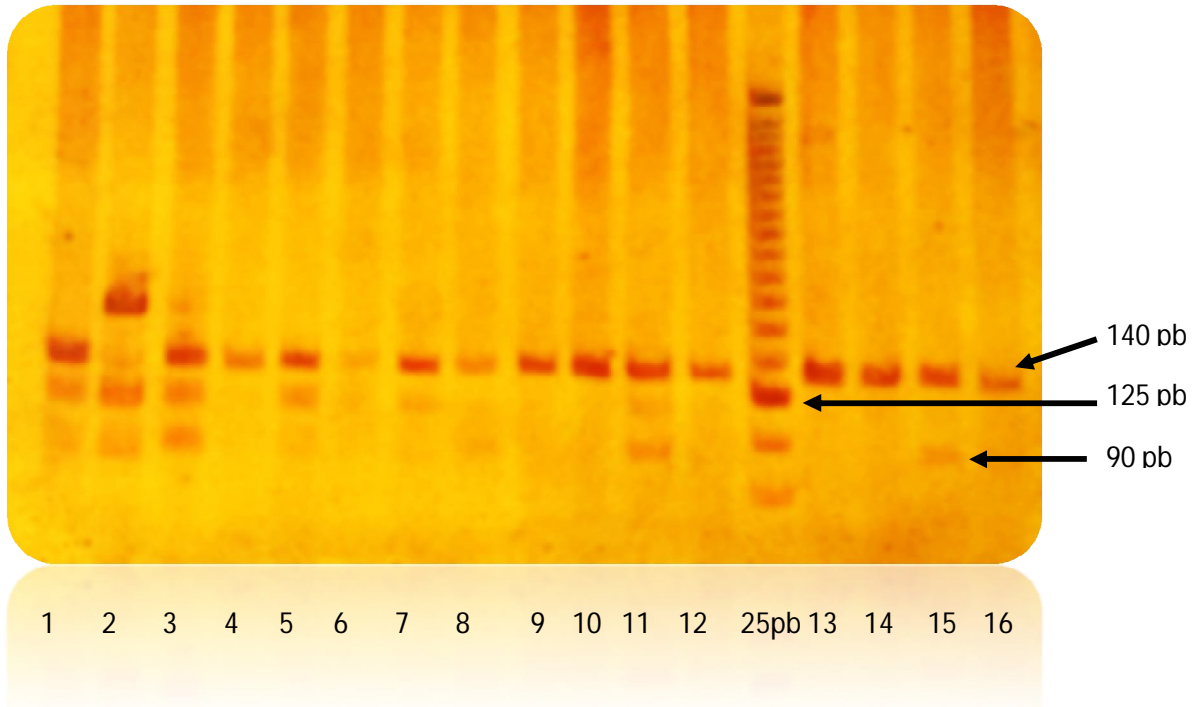
POLIMORFISMO DEL GEN T786C DEL GEN eNOS:

Para la identificación del polimorfismo T786C, se amplificó un fragmento de 180 pb, con los iniciadores 5'-TGG AGA GTG CTG GTG TAC CCC A-3' y 5'-GCC TCC ACC CCC ACC CTG TG-3'.⁽⁶²⁾ Mediante las condiciones modificadas de PCR; Buffer (10x): 5pmol de cada iniciador, 200µm de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1.5 unidades de taq polimerasa, BSA (albumina ácida) 10% y 50ng de ADN genómico.⁽⁶²⁾ Bajo el siguiente programa de amplificación: desnaturalización por 4 minutos a 94° C, 35 ciclos (50 segundos a 94°C, 55 segundos a 59°C y 50 segundos a 72°C) y una extensión final por 7 minutos a 72°C.

Posteriormente el producto amplificado se sometió a corte con la enzima de restricción Msp I a 37°C por dos horas. La identificación de los alelos se realizó a través de un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida 6% (29:1) previa tinción de nitrato de plata, como se muestra en la figura 1; de tal manera que se observaran tres genotipos:

- ✚ Homocigoto T/T (genotipo normal; 140, 40 y 50 pares de bases (pb)).
- ✚ Heterocigoto T/C, (bandas 140, 90, 40, y 50 pb).
- ✚ Homocigoto C/C (genotipo polimórfico; 90, 40 y 50 pb).

Figura 1.



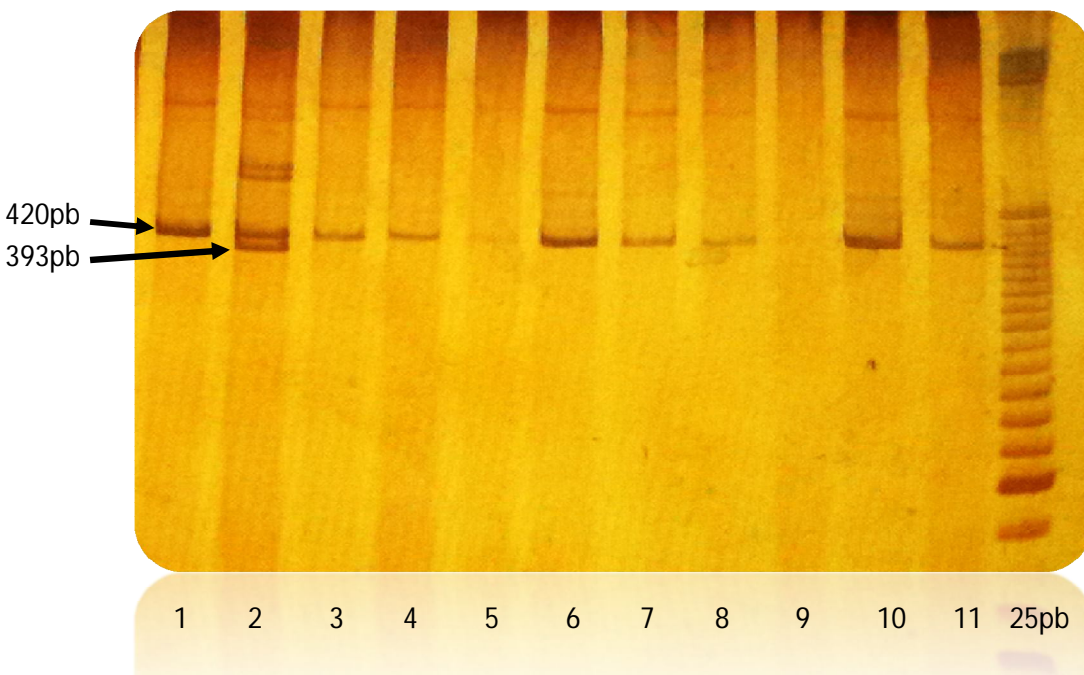
El genotipo heterocigoto T/C se observó en los carriles 1, 3, 5, 8, 11 y 15; el genotipo homocigoto CC se observó en el carril 2 y el genotipo TT en los carriles 4, 6, 7, 9, 10, 13, 14 y 16.

POLIMORFISMO VNTR I/D (repetición de 27pb) DEL GEN eNOS

La identificación del polimorfismo I/D fue llevada a cabo con los iniciadores 5'- AGG GGG TAT GGT AGT GCC TTT-3' y 5'- TCT CTT AGT GCT GTG GTC AC-3'. Mediante las condiciones modificadas de PCR; Buffer (10x): 5pmol de cada iniciador, 200µm de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂, 1.5 unidades de taq polimerasa, BSA (albumina acida) 10% y 50ng de ADN genómico. ^[62] Bajo el siguiente programa de amplificación: desnaturalización por 4 minutos a 94° C, 35 ciclos (1 min a 94°C, 1 min a 57°C y 1,30 min a 72°C) y una extensión final de 7 min a 72°C. La identificación de los alelos se realizó a través de un corrimiento electroforético en geles de poliacrilamida 6% (29:1) previa tinción de nitrato de plata, de tal manera que se observaron tres genotipos.

- ✚ Homocigoto I/I (Inserción/inserción, 5 repetidos de 27 pb, genotipo normal; banda de 420pb)
- ✚ Heterocigoto I/D (Inserción/Delección, bandas 420 y 393pb)
- ✚ Homocigoto D/D (Delección/Delección, 4 repetidos de 27 pb, genotipo polimórfico; banda de 393pb)

Figura 2.



El genotipo I/I se observó en los carriles 1, 3-8 y 10-11 y el genotipo heterocigoto I/D en el carril 2

9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

9.5.1 Análisis estadístico de aspectos demográficos

Las variables cualitativas se expresaron por proporciones y las cuantitativas con medias y desviación estándar. La comparación de las variables cualitativas se llevó a cabo con la prueba χ^2 y exacta de Fisher según el caso y las variables cuantitativas se contrastaron con la prueba t de student.

Se considero un valor estadísticamente significativo cuando p fue < 0.05 con nivel de confianza de 95%.

Se utilizó el paquete estadístico SPSS (Statistical package for the social sciences, por sus siglas en inglés) versión 21.0.

9.5.2 Análisis estadístico de los polimorfismos

Estimación de las frecuencias alélicas y genotípicas.

Fueron estimadas por el método de conteo directo.

Informativa de los marcadores.

La heterocigocidad observada corresponde a la frecuencia de individuos heterocigotos observados en la muestra total y fue calculada mediante la fórmula: $H_{obs} = 1 - H_o$. [H_o constituye los individuos con genotipo homocigoto (dos alelos iguales) observados].

Prueba de Chi cuadrada (χ^2)

Las frecuencias observadas fueron comparadas con las esperadas, mediante intervalos de confianza (IC) al 95%, se tomó como significativo cuando el valor de p fue < 0.05 .

Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW)

Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg del grupo de referencia para cada polimorfismo mediante la comparación de frecuencias de los genotipos observados con los esperados por medio de χ^2 . Los genotipos observados fueron comparados con los esperados para cada marcador, por medio del binomio $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$ (p : frecuencia de alelos silvestres; q : frecuencia de alelos polimórficos).

Razón de momios (Odds ratio)

La asociación de los polimorfismos con la enfermedad se determinó mediante odds ratio con el programa Epi info 6.0. Así como por análisis de regresión en el programa SPSS 18.0.

10. ASPECTOS ÉTICOS:

Título Segundo. De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos: Capítulo I Disposiciones comunes. Artículo 17. Se considera como riesgo de la investigación a la probabilidad de que el sujeto sufra algún daño como consecuencia inmediata o tardía del estudio para efectos de este reglamento, las investigaciones se clasifican en diferentes categorías. El apartado II el que compete a esta investigación. II Investigación con riesgo mínimo: Estudios prospectivos que emplean el registro de datos a través de procedimientos comunes, tales como exámenes físicos o psicológicos de diagnóstico y tratamiento rutinarios, entre los que se consideran: Investigación con medicamentos de uso común, amplio margen terapéutico, autorizados para su venta, apegándose a las indicaciones, dosis y vías de administración establecidas y que no sean medicamentos de investigación que se definen en el artículo 65 de este reglamento ⁽⁶³⁾

Se considero un estudio con riesgo mínimo (categoría II). El estudio se elaboro bajo los lineamientos de la ley general en salud en materia de investigación para la salud emitido por la secretaria de salud.

Los procedimientos estuvieron de acuerdo con las normas éticas, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y con la declaración de Helsinki de 1975 enmendada en 1989 y códigos y normas Internacionales vigentes de las buenas prácticas de la investigación clínica. Se solicitó autorización de los padres a través de una carta de consentimiento informado (anexo 1).

11. RECURSOS Y FINANCIAMIENTO

11.1.1 RECURSOS HUMANOS

Investigador responsable: Dra. en Cs. Lourdes Lemus Varela

Investigador principal: M.E. Luisa María García Valdez

11.1.2 RECURSOS MATERIALES:

Computadora Laptop SONY VAIO

Impresora HP Deskjet D2660

Cartuchos de tinta para impresora HP

Material de oficina: lápiz, plumas, hojas blancas, broches Baco, carpetas, fotocopias.

Tubos de ensayo con EDTA

11.1.3 RECURSOS FINANCIEROS:

Fueron proporcionados por los investigadores, específicamente consumibles.

12. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	UNIDAD DE MEDICIÓN	ESCALA	ESTADÍSTICA
Sexo	Condición de genero	a) Mas b) Fem	Nominal	Proporciones
Edad gestacional	Estimación de la edad al nacimiento mediante el método de Ballard modificado	Expresado en semanas	Continua	Media y DE
Peso	Es la cantidad de materia de un cuerpo.	Expresado en gramos	Continua	Media y DE
AINE's antenatales	Consumo materno de acido acetil salicilico durante el embarazo	a) si b) no	Nominal	χ^2
SSRIs antenatales	Consumo materno de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina durante el embarazo	a)Si b) no	Nominal	χ^2
Tabaquismo materno	Consumo materno de tabaco durante el embarazo	a)Si b) no	Nominal	χ^2
Hipertensión inducida por el embarazo	Diagnostico materno de hipertensión arterial sistémica durante el embarazo	a)Si b) no	Nominal	χ^2
Vía de nacimiento	Mecanismo por el cual es obtenido el recién nacido	a)cesárea b) parto	Nominal	χ^2
Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido	Presión sistólica de la arteria pulmonar \geq -sistémica	a)Si b)no	Nominal	χ^2
Ecocardiograma	Presión sistólica de la arteria pulmonar \geq a la sistémica. Cortos circuitos a través del conducto arterioso y/o foramen oval de derecha a izq o bidireccionales.	a)Si b) No	Nominal	χ^2
Índice de Oxigenación ≥ 20	Es la presión media de la vía aérea por la fracción inspirada de oxígeno entre la presión arterial de Co2 por 100.	a)Si b) no	Nominal	χ^2
Polimorfismo	Variación en la secuencia de ADN	a)Si b)no	Nominal	χ^2

13.CALENDARIO: CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES 2013 - 2014:

2013

2014

ACTIVIDAD POR MES	Sept	Sept	Oct	Nov	Dic	Ene	Feb
Planeación	✓						
Elaboración del protocolo	✓	✓	✓				
Montaje e instrumentación			✓				
Presentación del protocolo			✓				
Aceptación del protocolo ♣							
Desarrollo de la metodología				✓	✓	✓	
Procesamiento de datos							✓
Análisis e interpretación de resultados							
Reporte preliminar					✓		✓
Redacción del informe final							✓

♣ Sujeto a decisión de las autoridades

14. RESULTADOS:

En el presente trabajo se incluyeron 42 recién nacidos, 21 con HPPRN (grupo de estudio) y 21 sin HPPRN (grupo control), en el periodo comprendido del 1º de octubre del 2013 al 31 de enero del 2014. No observamos diferencias con significancia estadística en el género de ambos grupos: en el grupo de estudio 11 (52.4%) masculinos y 10 femeninos (47.6%) y en el control 10 masculino (47.6%) y 11 femeninos (52.4%). En relación a la edad gestacional: el grupo de estudio con HPPRN el promedio: 35.6 ± 2.81 semanas y en el control: 38.1 ± 1.9 semanas, consecuentemente el peso fue menor en el grupo de estudio 2622 ± 626 gramos en contraste con 2992 ± 565 gramos en el grupo control. La mayor parte de los recién nacidos fueron obtenidos por cesárea, en el grupo de estudio el 76.2 % y en el grupo control: 81%. (Cuadro 1)

CUADRO 1. Aspectos demográficos

Variables	HPPRN (n=21)	Control (n=21)	Valor de P
Genero			
Masculino n (%)	11 (52.4)	10 (47.6)	0.750
Femenino n (%)	10 (47.6)	11 (52.4)	
Edad gestacional (SEG)			
Media	35.6 ± 2.81	38.1 ± 1.9	0.008
PESO (g)			
Media	2622 ± 626	2992 ± 565	0.052
Vía de nacimiento			
Parto n (%)	5 (23.8)	4 (19)	0.707
Cesárea n (%)	16 (76.2)	17 (81)	

Se muestran medidas de tendencia central de los aspectos demográficos de la población de estudio.

Acerca de los antecedentes perinatales, encontramos que no hubo diferencia de significancia estadística en la patología materna, ni crónica ni gravídica. En uno de los casos del grupo de pacientes con HPPRN, la madre ingirió inhibidor selectivo de la

recaptación de serotonina, del tipo de la fluoxetina, factor asociado al desarrollo de la patología foco del estudio del presente trabajo (cuadro 2).

CUADRO 2. Aspectos perinatales

Variables	HPPRN (n=21)	Control (n=21)	Valor de P
Patología materna			
SI n (%)	7 (33.3)	2 (9.5)	0.060
NO n (%)	14 (66.7)	19 (90.5)	
Hipertensión inducida Por el embarazo			
SI n (%)	3 (14.3)	4 (19)	0.672
NO n(%)	18 (85.7)	17 (81)	
Esteroides maternos			
SI n (%)	2 (9.5)	1 (4.8)	0.549
NO n (%)	19(90.5)	20 (95.2)	
AINES prenatal			
SI, n(%)	0 (0)	1 (4.8)	0.311
NO, n(%)	21 (100)	20 (95.2)	
IRSS prenatal			
SI, n(%)	1 (4.8)	0 (0)	0.311
NO, n(%)	20 (95.2)	21 (100)	
Tabaquismo			
Si, n(%)	1 (4.8)	0 (0)	0.311
NO, n(%)	20 (95.2)	21 (100)	

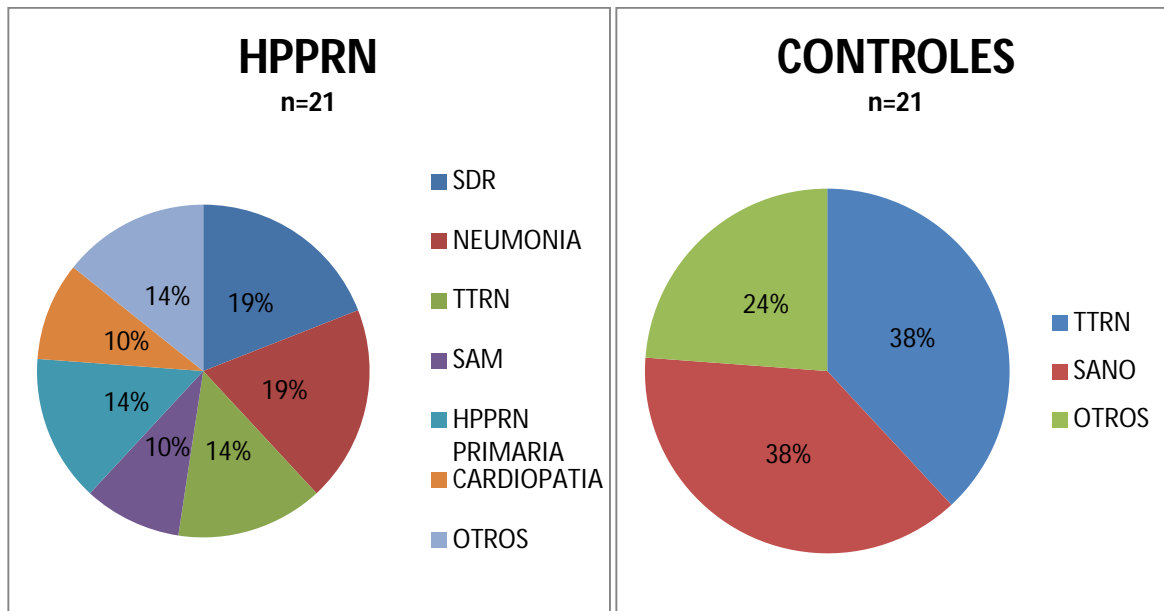
IRSS: Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina.

Se muestran medidas de tendencia central de aspectos perinatales de la población de estudio

La patología de base del grupo de estudio, que desarrolló HPPRN, fue síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y neumonía en un 19%, seguidos por taquipnea transitoria del recién nacido (TTRN), HPPRN primaria ambas en un 14%, en tercer lugar síndrome de aspiración de meconio y cardiopatía congénita con el 10%.

En el grupo control, el 38% fueron recién nacidos sanos y con TTRN 38% y misceláneas 24%, lo cual se muestra esquemáticamente distribuido en la grafica1.

Gráfica I. Diagnósticos de ingreso a unidad de cuidados intensivos neonatales



Otros: error innato del metabolismo, atresia esofágica tipo 3, hernia diafragmática, malformación ano rectal baja, hipertrofia estenótica de píloro, hipocalcemia.

En relación a los polimorfismos, encontramos diferencia estadísticamente significativa en la identificación de polimorfismos relacionados con la vía del óxido nítrico y GMPc, específicamente, en la *eNOS*, la distribución genotípica y alélica del polimorfismo *T786C* del gen *eNOS* se muestra en el cuadro 3 y se esquematiza en la grafica 2. El genotipo *T/T* observado en el 43% (9/21) de las pacientes con HPPRN en contraste con el 76% (16/21) del grupo control (sin HPPRN), se comportó como factor de protección [OR 0.23 (95% IC 0.06-0.88), $p < 0.029$]. La unión de los genotipos *T/C-C/C* observado en el 59% (13/21) de los pacientes con HPPRN en contraste con el 25% (5/21) del grupo control se comportó como factor de riesgo [OR 4.33 (95% IC 1.15-16.2), $p = 0.029$]. Se demostró mediante la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg que la distribución de genotipos del grupo control guardo equilibrio ya que dicha prueba de calidad no mostro significancia estadística (chi-cuadrada = 0.408; $p = 0.5229$).

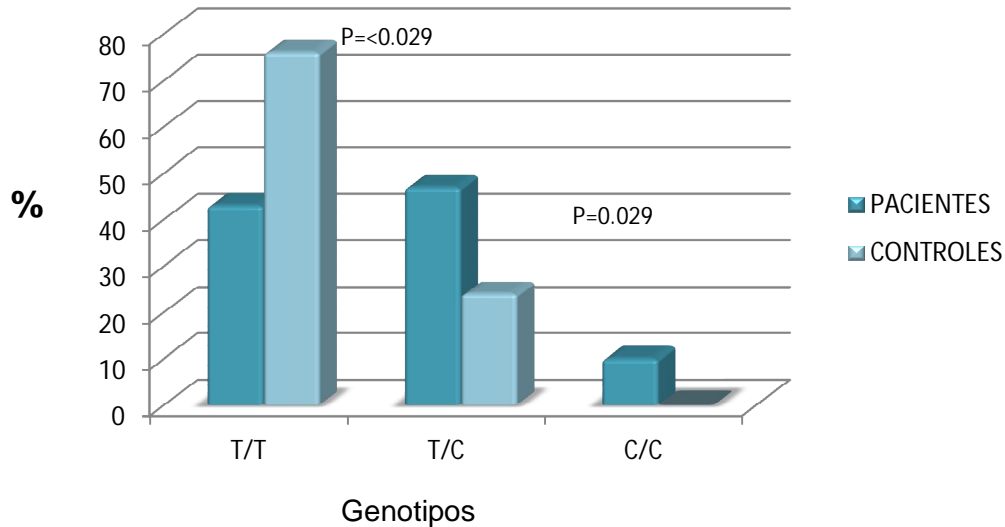
El alelo *T* se mostró como factor de protección, mientras que el alelo *C* como factor de riesgo en los grupos de estudio, tal como observamos en el cuadro 3.

CUADRO.3 Distribución genotípica y alélica del polimorfismo T786C del gen eNOS en los grupos de estudio

Grupos							
Genotipos**	HPPRN ⁽ⁿ⁼²¹⁾		Control ^{(n=21)*}		Pacientes vs. Controles		
	(n)	%	(n)	%	OR	(IC95%)	Valor p
T/T	(9)	43	(16)	76	0.23	(0.06-0.88)	0.029
T/C	(10)	47	(5)	24	0.4		0.14
C/C	(3)	10	(0)				0.56
TC-CC	(13)	59	(5)	24	4.33	(1.13-16.0)	0.029
Alelos							
T	(28)	66	(37)	88	0.27	(0.087-0.83)	0.019
C	(14)	34	(5)	12	3.7	(1.19-11.48)	0.019

*El grupo control esta en Equilibrio de Hardy-Weinberg (chi-cuadrada = 0.408; p = 0.5229); **La informatividad del polimorfismo T786C como marcador fue de 0.545: un valor mayor a 0.7 es considerado como altamente informativo mientras que un valor de 0.44 es considerado como moderadamente informativo.

Gráfica 2. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo T786C del gen eNOS en los grupos de estudio



En la búsqueda de asociaciones entre el estándar de oro diagnóstico de HPPRN y el polimorfismo documentado, encontramos que a mayor presión sistólica de la pulmonar (PSAP) mayor expresión del gen índice, de tal forma que consideramos que los genotipos T/C-C/C del polimorfismo T786C del gen eNOS mostró asociación como factor de riesgo cuanto más elevados resultaron los valores de la PSP en el estudio ecocardiográfico (cuadro 4).

CUADRO.4 Asociación de los genotipos T/C-C/C del polimorfismo T786C con los valores del Ecocardiograma PSAP (mmHg) en el grupo de pacientes.

	P	OR	95% IC	
			inferior	superior
T/C-C/C				
Ecocardiograma PSAP (mmHg)	0.0022	8	2.01	31.8

OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza.

Se muestra asociación entre cifras \geq de 45mmHg de PSAP y el polimorfismo T786C.

Polimorfismo VNTR I/D del gen eNOS

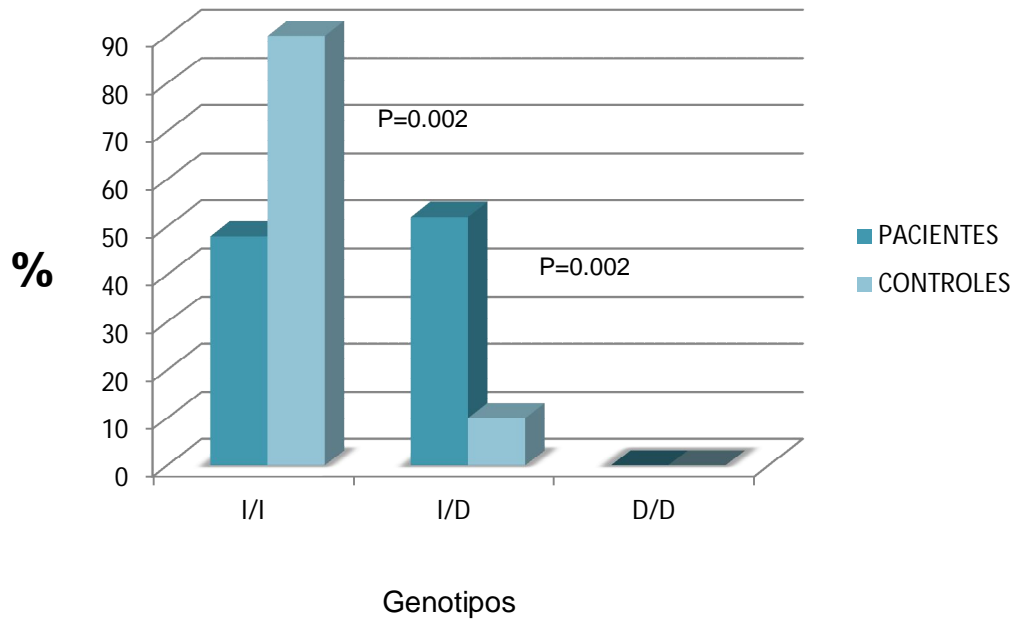
La distribución genotípica y alélica del polimorfismo VNTR I/D del gen eNOS se muestra en el cuadro 5 y esquematizado en grafica 3. El genotipo II observado en el 48% (10/21) de los pacientes con HPPRN en comparación con el 90% (19/21) del grupo control; se comportó como factor de protección [OR 0.09 (95% IC 0.017-0.51), p=0.002]. El genotipo ID observado en el 50% (11/21) de las pacientes con HPPRN en comparación con el 10% (2/21) del grupo control; se comportó como factor de riesgo [OR 10.4 (95% IC 1.9-76.38), p=0.002]. La distribución de genotipos del grupo control estuvo en equilibrio de Hardy-Weinberg. El alelo I se mostró como factor de protección, mientras que el alelo D como factor de riesgo en los grupos de estudio.

Cuadro 5. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo I/D del gen eNOS en los grupos de estudio

Genotipos**	Grupos						
	HPPRN [†] (n=21)		Control ^{(n=21)*}		Pacientes vs. Controles		
	(n)	%	(n)	%	OR	(IC95%)	Valor p
II	(10)	48	(19)	90	0.09	(0.017-0.51)	0.002
ID	(11)	52	(2)	10	10.4	(1.9-76.38)	0.002
D/D	(0)		(0)				
Alelos							
I	(31)	74	(40)	95	0.14	(0.047-0.46)	0.0002
D	(11)	26	(2)	5	6.7	(2.1-20.91)	0.0002

*El grupo control esta en Equilibrio de Hardy-Weinberg (prueba de chi-cuadrada = 0.055; p = 0.8139; **La informatividad del polimorfismo I/D como marcador fue de 0.9: un valor mayor a 0.7 es considerado como altamente informativo mientras que un valor de 0.44 es considerado como moderadamente informativo.

Grafica 3. Distribución genotípica y alélica del polimorfismo I/D del gen eNOS en los grupos de estudio



15.DISCUSION

En los últimos años se ha observado asociación entre HPPRN y recién nacido pretermino tardío ⁽⁷⁾, tal como observamos en nuestra población de estudio: grupo con HPPRN el promedio de edad gestacional fue de 35.6 ± 2.81 semanas y en el grupo control, la edad gestacional de 38.1 ± 1.9 semanas. Así mismo a nivel internacional en los últimos 8 años se ha reportado el síndrome de distres respiratorio como la principal patología de base asociada a la HPPRN, desplazando al síndrome de aspiración de meconio ⁽³⁾, en nuestro estudio coincidimos con estos datos, ya que el 19%(4/21) de nuestro grupo de estudio (HPPRN) presentó SDR, empatando con neumonía también en un 19% (4/21).

Quizás explicado por la n del presente trabajo no encontramos asociaciones entre ingesta de medicamentos maternos y o patología materna con HPPRN (cuadro 2)

Como parte de la transición fisiológica normal al nacimiento, la resistencia vascular pulmonar disminuye a través de vías complejas que permiten que el flujo sanguíneo pulmonar aumente aproximadamente 10 veces. Los procesos físicos y bioquímicos que contribuyen a esta transición pulmonar normal del recién nacido incluyen distensión mecánica pulmonar y aumento de PO₂ que estimulan a la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS)⁽⁶⁴⁾. Esta enzima convierte a la L-arginina a L - citrulina con la liberación de óxido nítrico (NO), que a su vez activa la guanilato ciclasa soluble en las células musculares lisas vasculares que genera cGMP necesario para la vasodilatación ⁽⁶⁵⁾.

Los avances en la epidemiología molecular y la genética han aumentado nuestro conocimiento de los mecanismos sobre HPPRN y la relación entre la exposición a agentes toxico, la dieta y las variaciones genéticas individuales en la susceptibilidad. Se ha propuesto que la reducción endotelial de la vía L-arginina dependiente de NO podrían incrementar la resistencia periférica. Las altas concentraciones de NO y sus metabolitos contribuyen como promotores de la transcripción de genes y la activación de la proteína que se une a blancos específicos que pueden afectar la adecuada función celular. Sin embargo, el mecanismo exacto de estas contribuciones es desconocido ⁽⁶⁶⁾.

El propósito del presente estudio fue demostrar la asociación de los polimorfismos T786C e I/D del gen *eNOS* en pacientes con HPPRN y un grupo control, así encontramos que el polimorfismo T786C localizado en la región promotora del gen *eNOS* ha sido uno de los más estudiados en el desarrollo a la susceptibilidad de HPPRN. Se ha observado que este polimorfismo está asociado con la deficiencia de la enzima *eNOS* y del RNAm. Tanto en estudios clínicos como experimentales se sugiere que alteraciones en el metabolismo del NO pueden contribuir al desarrollo de la hipertensión pulmonar ⁽⁶⁷⁾.

Así mismo, se ha reportado la asociación del genotipo C/C con hipertensión pulmonar. Según nuestro conocimiento, el presente es el primer estudio en la literatura en donde se demuestra la asociación del polimorfismo T786C con HPPRN. La frecuencia del alelo C observada en el grupo de pacientes con HPPRN se comportó como un factor de riesgo ⁽⁶⁷⁾. Especulamos que el alelo C pudiese estar asociado con vasoreactividad pulmonar, tanto en portadores CT como CC.

Con respecto al polimorfismo VNTR repetición de 27 pb (I/D; 4a /b) del gen *eNOS* ha sido asociado con el riesgo de otras patologías vasculares. Se ha observado que el genotipo D/D está asociado con una actividad enzimática reducida ⁽⁶⁶⁾.

En el presente estudio, la frecuencia del alelo dilación (D) fue del 5% en los controles y 26% en pacientes con HPPRN, con lo cual se comportó como un factor de riesgo para el desarrollo de la HPPRN. Este resultado probablemente sugiera que este polimorfismo contribuye a la homeostasis vascular, que podría regular varios procesos fisiológicos endoteliales. La disfunción de estos procesos puede resultar en actividad promitogénica celular, hiperreactividad vascular y remodelación vascular ^(64,66). Después de una búsqueda exhaustiva no encontramos información en la literatura acerca de la asociación del polimorfismo I/D con el riesgo de desarrollar HPPRN; sin embargo existen estudios que demuestran que la alterada biodisponibilidad del óxido nítrico es un factor de riesgo alto para desarrollar la patología.

16.CONCLUSIONES:

- 1.- Se identificaron polimorfismos característicos de la Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN).
- 2.- Los polimorfismos identificados en el gen *eNOS*, explican en parte la vasoreactividad característica de esta grave patología.
- 3.- Existe asociación entre la presencia de la mutación identificada y la estimación de la presión sistólica de la pulmonar elevada ecocardiográficamente.
4. El profundo conocimiento de la fisiopatología de la HPPRN, impactará en el desarrollo de terapias específicas.
- 5.- Resulta deseable establecer correlación directa entre pacientes con HPPRN no respondedores a óxido nítrico inhalado y la presencia del polimorfismo.
- 6.- Según nuestro conocimiento no existen trabajos previos que exploren polimorfismos característicos en los pacientes con HPPRN.

17. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Wilson K,MD., Zelig C, MD., Harvey J, MD.,Cunningham B, MD.,Doloinsky B MD.,Napolitano B,MD. Persistent pulmonary hypertension of the newborn is associated with mode of delivery and not with maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors. American Journal of Perinatology.2011;28(1).
2. Byers H, Dagle J, Klein J, Ryckman K, McDonald E, Murray J, Borowsky K. Variation in CRHR1 are associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. Pediatr Res. 20012;71(2):162-167.
3. Konduri G, MD.,Kim U MD. Advances in the diagnosis and management of persistent pulmonary hypertension of the newborn. Pediatr Clin N Am 2009;56:579-600.
4. Porta N MD., Steinhorn R MD. Pulmonary vasodilator therapy in the NICU: Inhaled Nitric Oxide, Sildenafil and other pulmonary vasodilating agents. Clin Perinatol 2012;39
5. Gasques J. Hipertension pulmonar persistente Del recién nacido. Rev Mex Pediatr 2009; 76(5):220-230.
6. Rosenberg A, Lee NR, Vaver RN, Werner D, Fashaw L, Hale H, Waas N. School – age outcomes of newborns treated for persistent pulmonary hypertension. Journal of perinatology.2010;30:127-134.
7. Lakshminrusinha S, MD. The pulmonary circulation in neonatal respiratory failure. Clin Perinatol.2012;39:655-683.
8. Delaney C, Curnfield DN. Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. Pulm Circ.2012;2:15-20.

9. Aschner J MD, Fike CMD. New development in the patogenesis and management of neonatal pulmonary hypertension. THE NEWBORN LUNG: neonatology questions and controversies. Ed(1th). Cap.12: 241-300.
10. Hernandez-Diaz S, Van Marter LJ, Wele MM, Louik C, Mitchell AA. Risk factors for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics*.2007;120:272-82.
11. Checa-Caratachea MA. Polimorfismos genéticos: importancia y aplicación. *Rev Inst Enf Resp Mex*.2007;20:213-221.
12. Spalvieri MP, Rutemberg RG. Genomic medicine. Polymorphisms and microarray application. *Medicina (B.Aires)*.2004;64(6):533-42.
13. Yoon Y, Song J, Hong SH, Kim JQ. Plasma nitric oxide concentrations and nitric oxide synthase gene polymorphisms in coronary artery disease.*Clin Chem*.2000;46:1626-30.
14. Salimi S, Naghavi A, Firouzrai M, Zand H, Tavilani H, Nalehaez A, Mohebbi A. Association of plasma nitric oxide concentration and endothelial nitric oxide synthase T-786C gene polymorphism in coronary artery disease. *Pathophysiology*. 2012;19:157-62. doi: 10.1016/j.pathophys.2012.04.003.
15. Marcos E, Adnot S, Pham MH, Nosjean A, Raffestin B, Hamon M, Eddahibi S. Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 487-493.
16. Murphy DL, Fox MA, Timpano KR, Moya PR, Ren-Patterson R, Andrews AM, Holmes A, Lesch KP, Wendland JR. How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 2008; 55: 932–960.

17. Byers HM, Dagle JM, Klein JM, Rickman KK, McDonald EL, Murray JC, Borowski KS. Variations in CRHR1 are associated with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr Res* 2012; 71: 162-167
18. Teng RJ, Wu TJ. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. *J Formosan Med Association* 2013; 112: 177-184
19. Pearson DL, Dawling S, Walsh W, Haines J, Chistman B, Bazyk SN, Summar M. Neonatal Pulmonary Hypertension: Urea-Cycle Intermediates, Nitric Oxide Production, and Carbamoyl-Phosphate Synthetase Function. *N Engl J Med* 2001; 344: 1832-1838.
20. Maruyama K., Ye CL, Woo M, Venkaracharya H, Lines LD, Silver MM, Rabinovitch M. Chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats and increased elastolytic activity. *Am J Physiol* 1991; H1716-H1726.
21. Todorovich-Hunter L, Dodo H, Ye C, McCready L, Keeley FW, Rabinovitch M. Increased pulmonary artery elastolytic activity in adult rats with monocrotaline-induced progressive hypertensive pulmonary vascular disease compared with infant rats with nonprogressive disease. *Am Rev Respir Dis* 1992; 146:213-223.
22. Kobayashi J, Wigle D, Childs T, Zhu L, Keeley FW, Rabinovitch M. Serum-induced vascular smooth muscle cell elastolytic activity through tyrosine kinase intracellular signalling. *J Cell Physiol* 1994; 160:121-131.
23. Thompson K., Rabinovitch M. Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1996; 166:495-505.
24. Jones P, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the α v β 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 1997; 139: 279-293.

25. Kumar P, Kazzi NJ, Shankaran S. Plasma immunoreactive endothelin-1 concentration in infants with persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Am J Perinatol.* 1996; 13: 335-342.
26. Dakshinamurti S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatric Pulm* 2005; 39: 492-503.
27. D'Orleans-Juste P, Houde M, Semaan W. Function of the endothelin (B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology *Pharmacology Ther* 2002; 95: 221-238.
28. Parker TA, Roe G, Grover TR, Abman SH. Rho Kinase activation maintains high pulmonary vascular resistance in the ovine fetal lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006; 291: L976-L982.
29. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K, Takeshit A. Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2004; 94: 385-393.
30. Steinhorn RH. Neonatal Pulmonary Hypertension. *Pediatr Crit Care Med.* 2010; 11 (2 Suppl): S79–S84
31. Gorenflo M, Zheng C, Werle E, Fiehn W, Ulmerl HE. Plasma Levels of Asymmetrical Dimethyl-L-Arginine in Patients with Congenital Heart Disease and Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001; 37: 489-492
32. Lucke T, Kanzelmeyer N, Kemper MJ, Tsikas D, Das A.M. Developmental changes in the L-arginine/nitric oxide pathway from infancy to adulthood: plasma asymmetric dimethylarginine levels decrease with age. *Clin Chem Lab Med.* 2007; 45: 1525-1530.

33. Gómez S, Domínguez M. Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido, *Acta Pediatr Esp.* 2006; 64: 208-218.
34. Baquero H, Sola A. Patologías con hipoflujo pulmonar. En: Sola A, ed. *Cuidados Neonatales descubriendo la vida de un recién nacido enfermo.* Primera edición, Buenos Aires: Edimed, 2011; 16: 978-990.
35. Rabinovicht M. Desarrollo normal del lecho vascular pulmonar. En: Díaz G, Sandoval N, Vélez JF, ed. *Cardiología pediátrica.* Bogotá: Mc Graw Hill, 2003: 787-796
36. Silvera F, Mele A, Costas M. Hipertensión Pulmonar e hipoxemia grave en recién nacidos, *Arch Pediatr Urug.* 2007; 78:1-10.
37. Bland R. Formation on fetal lung liquid and its removal near birth. En: Polin R, Fox W, Abman S, ed. *Fetal and neonatal physiology.* Tercera edición, Filadelfia: Saunders, 2004; 75:782-789.
38. Lucas V, Ginsberg H. Aspectos cardiovasculares. En: Goldsmith JP, Karotkin EH, ed. *Cuarta edición,* Bogota: Distribuna, 2005; 581-604.
39. Victoria O, Mojarro J, Alva C, Villasis A, Cabrera I, Velazco J, Penagos A, et al. *Ecocardiografía Doppler en recién nacidos con riesgo de hipertensión arterial pulmonar,* *Rev Mex Cardiol,* 1996; 7(1): 25-31.
40. Parlakay A, Karagöz T, Ozkutlu S, Ozen S, Alehan D, Yigit S. Evaluation of diagnostic accuracy of portable echocardiography in newborns, *Anadolu Kardiyol Derg,* 2011; 11: 627-632
41. Fraisse A, Geva T, Gaudart J, Wessel D. Predictive factors of Doppler echocardiography in persistent pulmonary artery hypertension of the neonate, *Article in French DL Eur Respir Rev,* 2012 1; 21: 239-248.

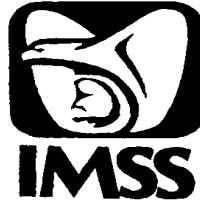
42. Howard LS, Grapsa J, Dawson D, Bellamy M, Chambers JB, Masani ND, et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure, *Eur Respir Rev*, 2012 Dec 1;21(126):370.
43. Rowley S, Kuschel C. Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn (PPHN),[en línea],January2001;citado en internet <http://www.adhb.govt.nz/newborn/guidelines/cardiac/PPHNManagement.htm>.
44. Jassal D, Lin E, Pulmonary Hypertension Imaging,[En línea] 2013,disponible en internet: emedicineMedscape.com.
45. Steinhorn R, Persistent Newborn Pulmonary Hypertension ,[En línea] 2013,disponible en internet : emedicinemedscape.com.
46. Kuschel C, Skinner J. Echocardiography Newborn Services Clinical Guideline, [En línea] 2002,disponible en internet :www.adhd.govt.nz/newborn/guidelines.
47. Kuschel C, Skinner J. Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn (PPHN)Echocardiographic Images, [En línea] 2002, disponible en internet:www.adhb.govt.nz/pphnandechocardiography.htm.
48. Fraisse A, Geva T, Gaudart J, Wessel DL. Source, Doppler echocardiographic predictors of outcome in newborns with persistent pulmonary hypertension, [En línea] 2004, disponible en internet:www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.
49. Sola A. Patologías con hipoflujo pulmonar. En Sola A, Rogido M, ed. Cuidados especiales del feto y el recién nacido. Hipertensión pulmonar persistente en el recién nacido. En: Sola A, Urman J. Cuidados especiales del feto y recién nacido. Ed. Buenos Aires: Científica Interamericana, 2001: Vol 1: 995-1023.
50. Kinsella JP. Hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (HTPPRN): terapia con óxido nítrico inhalado y ventilación oscilatoria de alta frecuencia. En: Diaz G, Sandoval N, Velez JF, ed. *Cardiología pediátrica*. Bogota: Mc Graw Hill, 2003: 797-805.

51. Whitsett JA, Pryhuber GS, Rice WR, Warner BB, Wert SE. Persistent pulmonary hypertension of the newborn. In: Avery's MacDonald MG, Mullett MD, Seshia MMK. Neonatology: pathophysiology and management of the newborn. 6th ed. Lippincott Williams &Wilkins. 2005: 565-9.
52. Aresman R, Short BL. Extracorporeal membrane Oxygenation. In Assisted ventilation of the neonate. (2011). Goldsmith J Karotkin E. Editors. 5th edition.
53. Tana YW, Adamson L, Forster C, Davies B, Sharkey D. Using serial oxygenation index as an objective predictor of survival for antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *Journal of Pediatric Surgery* 2012; 47: 1984–1989
54. Ortiz RM, Cilley RE, Bartlett RH. Extracorporeal membrane oxygenation in pediatric respiratory failure. *Pediatr Clin North Am.* 1987; 34: 39-46.
55. Barlet R; Toomasian J, Roloff D, Gazzaniga A; Corwin A; Rucker R. Extracorporeal Membrane Oxygenation. 100 Cases. *Ann Surg* 1986; 204: 3
56. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term *Finer NN, Barrington KJ. Cochrane Database of Systematic Reviews* 2006, Issue 4.
57. Mugford M, Elbourne D, Field D. Extracorporeal membrane oxygenation for severe respiratory failure in newborn infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2008, Issue 3.
58. Mann P, Morriss F, Klein J. Prediction of Survival in Infants with Congenital Diaphragmatic Hernia Based on Stomach Position, Surgical Timing, and Oxygenation Index. *Am J Perinatol* 2012; 29:383–390 .
59. Thameem F, Puppala S, Arar NH, Stern MP, Blangero J, Duggirala R, Abboud HE. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene polymorphisms and their association with type 2 diabetes-related traits in Mexican Americans. *Diab Vasc Dis Res.* 2008;5(2):109-13. doi: 10.3132/dvdr.2008.018.

60. Gustincich S, Manfioletti G, Del Sal G, Schneider C, Carninci P A fast method for high-quality genomic DNA extraction from whole human blood.. *Biotechniques*. 1991;11(3):298-300, 302
61. Miller, S.A., Dikes, D.D. y Polesky H,F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*1998; 16 (3):1215.
62. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA. 1989.
63. Ley General de Salud. Decimosexta edición. México: tomo I Editorial Porrúa; 2000: 6.
64. Farrow KN, Lakshminrusimha S, Reda Wj, Wedgwood S, Czech L, Gugino SF, Davis JM, Russell JA, Steinhorn RH. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*2008 Dec:295(6):L979-87.
65. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357:593-625.
66. Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 1998;32(1):3-8.
67. Zintaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension.*2006;48(4):700-10.Epub2006Aug28.

18. ANEXOS

18.1 CONSENTIMIENTO INFORMADO (anexo1)



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACION ESTATAL EN JALISCO
HOSPITAL DE PEDIATRIA, UMAE C.M.N.O.
DEPARTAMENTO DE NEONATOLOGIA
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

De acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki y con La Ley General de Salud, Título Segundo. De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos CAPITULO I Disposiciones Comunes. Artículo 13 y 14: En toda investigación en la que el ser humano sea sujeto de estudio, deberán prevalecer el criterio del respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y bienestar. Debido a que esta investigación se consideró como riesgo mínimo, de acuerdo al artículo 17 y en cumplimiento con los siguientes aspectos mencionados con el Artículo 21:

Su hijo (a) tiene una grave enfermedad pulmonar llamada Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido, por lo cual requiere de una máquina o respirador que haga las veces de los pulmones y oxigene su sangre para llevarla a todos sus órganos y recoja el bióxido de carbono el cual en exceso es dañino para el organismo, la causa de dicha enfermedad no es conocida del todo, existe la posibilidad que se asocie de alteraciones en los cromosomas

Procedimientos: Si decide aceptar que su hijo recién nacido participe en esta investigación, se tomara una muestra sanguínea del catéter umbilical de un volumen de 1.5 cc.

Por lo anterior y como padre, madre o responsable legal del recién nacido declaro lo siguiente:

- Se me ha asegurado que puedo preguntar hasta mi complacencia todo lo relacionado con el estudio y mi participación.
- Se me aclaró que puedo decidir no participar, sin que ello afecte la atención de parte del médico o del hospital a mi bebé. La decisión de que mi hijo participe en el estudio es voluntaria y puedo retirarlo de este estudio en cualquier momento que desee.

- Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará la identidad de mi hijo.
- Se me ha aclarado que los estudios necesarios para analizar la muestra tomada no tendrán ningún costo para mí ni para mi hijo recién nacido.

Con fecha _____, habiendo comprendido lo anterior y una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación en el proyecto, acepto que mi hijo participe en el estudio intitulado:

Identificación de polimorfismos en la HPPRN

DATOS Y FIRMA DEL PADRE O RESPONSABLE LEGAL

Nombre:	Firma o Huella Digital
Dirección	

DATOS Y FIRMA DEL TESTIGO 1

Nombre:	Firma o Huella Digital
Dirección	Relación que guarda con el paciente

DATOS Y FIRMA DEL TESTIGO 2

Nombre:	Firma o Huella Digital
Dirección	Relación que guarda con el paciente

Este documento se extiende por duplicado y un ejemplar queda en poder del sujeto de investigación o de su tutor y el otro en poder del investigador.

Responsable del Proyecto
Lemus Varela Ma. de Lourdes
Pediatra Neonatóloga
Doctora en Ciencias
Tel. 3668-3000 ext. 31730, Hospital de Pediatría UMAE
Tel. Cel. 0443334408054

18.2 FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS (anexo 2)

No. Afiliación	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Fecha ingreso a Neonatología	<input type="text"/>				
	día	mes	año		
Edad Postnatal	<input type="text"/>	<input type="text"/>			
Género	1 <input type="checkbox"/> F	2 <input type="checkbox"/> M			
Edad Gest.	<input type="text"/>				
	Semanas				
Peso en gramos: Madre años	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
	G	P	A	C	
Patología materna: Antecedentes:	_____				<input type="text"/>
1.- Corticoesteroides maternos					
2.- Enf. Hipertensiva aguda del embarazo					
3.- AINES prenatales					
4.- IRSS prenatales					
5.- Vía de nacimiento					
6.- Tabaquismo materno					<input type="text"/>
Diagnósticos de ingreso:	1.-				
	2.-				
	3.-				
	4.-				
Ecocardiograma:					
	PSP estimada			mmHg	
Datos indirectos:					
Fecha toma de muestra:					
Edad a la toma de muestra:					
Índice de oxigenación:					
Desenlace:	De				
Defunción, diagnósticos finales:					
Observaciones:	_____				<input type="text"/>
	_____				<input type="text"/>
	_____				<input type="text"/>
	_____				<input type="text"/>
	_____				<input type="text"/>