



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

Búsqueda de mutaciones en el gen *NPPB* en niños con corrección exitosa de coartación aórtica y su asociación con los niveles séricos del péptido natriurético tipo B, con la presión arterial ambulatoria de 24 horas y con las alteraciones persistentes del ventrículo izquierdo

TESIS

Que para optar por el grado de Doctor en Ciencias Médicas

Presenta

Norma Alicia Balderrábano Saucedo

TUTOR

Dr. Francisco Javier Puga Muñuzuri

Hospital Infantil de México Federico Gómez

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Manuel Sebastián Arteaga Martínez

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Alfredo Vizcaíno Alarcón

Hospital Infantil de México Federico Gómez

México, D.F. Octubre de 2015.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MANUSCRITO DE TESIS

ÍNDICE

	<i>Página</i>
1. Glosario	5
2. Lista de Figuras	7
3. Lista de Gráficas	9
4. Lista de Tablas	10
I. RESUMEN	11
II. INTRODUCCIÓN	13
III. PROYECTO DE TESIS	21
1. Título	21
2. Marco teórico	21
i. Anomalías en el desarrollo embriológico de la aorta torácica y troncos supra aórticos	
ii. Coartación aórtica	
iii. Seguimiento a largo plazo de los pacientes con coartación aórtica	
iv. El gen NPPB	
v. Péptido natriurético tipo B	
3. Planteamiento del problema	37
4. Pregunta de investigación	37
5. Hipótesis	37
6. Justificación	38
7. Objetivo general	39
8. Objetivos específicos	39

9. Material y métodos	39
i. Diseño del estudio	
ii. Unidad de análisis	
iii. Criterios de inclusión, exclusión y eliminación	
iv. Cálculo del tamaño de la muestra	
v. Clasificación de las variables	
vi. Definición operacional de las variables	
vii. Metodología	
- Análisis de la secuencia del gen NPPB	
- Determinación de los niveles séricos de NPPB	
- Monitoreo ambulatorio de la presión arterial de 24 horas	
- Evaluación de la función del ventrículo izquierdo	
10. Análisis estadístico	56
11. Aspectos éticos	56
12. Aspectos de bioseguridad	57
13. Resultados	58
14. Discusión	75
15. Conclusiones	79
16. Limitaciones del estudio	80
17. Referencias Bibliográficas	81

IV. ANEXO

87

Lista de artículos publicados en revistas indexadas y arbitradas

1. Función ventricular izquierda en niños después de la corrección exitosa de coartación aórtica.
 - i. Citas al artículo
2. Flujo de las venas pulmonares en niños con miocardiopatía dilatada por medio del ecocardiograma transtorácico.
 - i. Citas al artículo
3. Pentalogía de Cantrell: 42 años de experiencia en el Hospital Infantil de México Federico Gómez.
 - i. Citas al artículo
4. El polimorfismo 677C→T del gen MTHFR en madres mexicanas de niños con cardiopatía congénita compleja.
 - i. Citas al artículo.

Glosario

Coartación Aórtica (CoAo). Cardiopatía congénita caracterizada por la obstrucción de la aorta.

Corrección quirúrgica de CoAo. La resolución de la obstrucción aórtica por medio de cirugía cardiaca.

CoAo nativa. Es la coartación aórtica que no ha sido anteriormente tratada ni por cirugía cardiaca ni por cateterismo cardiaco.

CoAo aislada. Es la coartación aórtica que no se asocia a ningún síndrome genético ni a ninguna otra cardiopatía congénita.

Corrección temprana de CoAo. Es la coartación aórtica que se corrige antes de los 4 años de edad.

Corrección tardía de la CoAo. . Es la coartación aórtica que se corrige después de los 4 años de edad.

Corrección exitosa de CoAo. Es la CoAo que se resuelve, sin dejar obstrucción residual en el sitio estrecho, con un gradiente clínico y ecocardiográfico no mayor de 15 mmHg.

Índice de rendimiento miocárdico (IRM) o índice de Tei. Es una herramienta ecocardiográfica para evaluar la función ventricular izquierda, se considera superior a la fracción de eyección y fracción de acortamiento ya que es una medición menos dependiente de la geometría y de la precarga ventricular.

La evaluación de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas. Es una técnica ecocardiográfica que permite evaluar la función ventricular izquierda, menos operador dependiente que las

previamente descritas. Se rastrean las señales miocárdicas (Speckle-Tracking) y describe el grado de acortamiento que sufre la fibra miocárdica durante la contracción.

Flujo de las venas pulmonares (FVP). Es una metodología ecocardiográfica que permite evaluar con mucha precisión la función diastólica del VI al estudiar las ondas que genera el doppler a nivel del flujo de las venas pulmonares.

Pentalogía de Cantrell. Es un síndrome raro de mal pronóstico, en el que existen malformaciones congénitas en diferentes órganos de la línea media como son el diafragma, la pared abdominal, el pericardio, el corazón y parte del esternón.

Polimorfismo 677CT del gen MTHFR. En concordancia con otros investigadores, hemos encontrado que el polimorfismo 677CT de MTHFR presente en mujeres mexicanas en edad fértil les confiere mayor riesgo de tener un hijo con cardiopatías congénitas complejas.

Lista de Figuras

Figura 1. Aorta torácica y grandes vasos.

Figura 2. Desarrollo embriológico de la aorta torácica.

Figura 3. Variantes del arco aórtico.

Figura 4. Resonancia magnética cardíaca en 3 dimensiones de un arco aórtico bovino y disección aórtica.

Figura 5. Tomografía computada de tórax de arteria subclavia derecha aberrante.

Figura 6. Tomografía computada de tórax de origen común de la arteria carótida izquierda.

Figura 7. Cortes coronales de tomografía computada de tórax.

Figura 8. Tomografía computada de tórax de arco aórtico derecho.

Figura 9. Vías colaterales en la coartación de aorta.

Figura 10. Imagen axial de tomografía computada de tórax de un arco aórtico derecho.

Figura 11. Ecocardiograma bidimensional vista de cuatro cámaras.

Figura 12. Ecocardiograma bidimensional vista de tres cámaras.

Figura 13. Ecocardiograma bidimensional vista de dos cámaras.

Figura 14. “Bull eye” que muestra la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo normal.

Figura 15. “Bull eye” que muestra la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo anormal.

Figura 16. Electroferograma de un paciente que muestra variación en la secuencia del gen *NPPB*.

Figura 17. Electroferograma de un paciente que muestra variación en la secuencia del gen *NPPB*.

Figura 18. Electroferograma de un paciente 29 que muestra variación en la secuencia del gen *NPPB*.

Figura 19. Electroferograma de un control que muestra variación en la secuencia del gen *NPPB*.

Figura 20. Electroferograma de un control que muestra variación en la secuencia del gen *NPPB*.

Figura 21. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Figura 22. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Figura 23. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Figura 24. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Figura 25. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Figura 26. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*.

Lista de Gráficas

Gráfica 1. Niveles séricos del péptido natriurético tipo B (NPPB) en un grupo de niños con corrección exitosa de CoAo.

Gráfica 2. Niveles séricos del péptido natriurético tipo B (NPPB) en un grupo de niños con corrección exitosa de CoAo y en un grupo de niños sanos.

Gráfica 3. Resultados del análisis de la deformación longitudinal de los seis segmentos del ventrículo izquierdo de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos.

Gráfica 4. Resultados del análisis de la deformación longitudinal de las tres regiones del ventrículo izquierdo de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal.

Gráfica 5. Resultados del análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo analizados por promedios de vistas ecocardiográficas de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal.

Lista de Tablas

Tabla 1. Primers y condiciones de PCR para el gen *NPPB*.

Tabla 2. Frecuencias en porcentajes de niveles de presión arterial ambulatoria elevada en 32 niños con corrección exitosa de CoAo.

Tabla 2. Análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas en los 17 segmentos del ventrículo izquierdo de niños con corrección exitosa de CoAo.

Tabla 3. Comparación de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas en los 17 segmentos del ventrículo izquierdo de niños con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos.

I. RESUMEN

La coartación aórtica (CoAo) es una de las CC más frecuentes. Al tratarse de una obstrucción mecánica, después de la corrección exitosa, se esperaría que estos pacientes mostraran al seguimiento una evolución similar a la de la población general; sin embargo, su sobrevida estimada es menor, con un 80% de los pacientes vivos a los 40-50 años después de la reparación.

Hipótesis

Los niños con corrección exitosa de CoAo aún *sin tener otros factores de riesgo cardiovascular asociados tienen anormalidades* en el VI, en la PA y en los niveles de NPPB *y existe asociación* entre dichas anormalidades con la presencia de mutaciones en el gen *NPPB*.

Objetivo general

Explorar posibles mecanismos responsables de complicaciones cardiovasculares tardías frecuentemente observadas en pacientes con corrección exitosa de CoAo.

Resultados

Los valores de la deformación longitudinal en los 17 segmentos del VI fueron ligeramente menores en los pacientes en comparación con los niños sanos, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. Tampoco se registraron diferencias entre los niveles séricos de NPPB entre ambos grupos. La presión arterial ambulatoria de 24 horas fue elevada en 3 pacientes y en ningún niño sano. Los pacientes con la presión arterial más alta tuvieron los índices de deformación más bajos. Encontramos un polimorfismo raro en el gen NPPB que estuvo presente en dos pacientes y en 5 controles.

Conclusiones No encontramos diferencias significativas en la función ventricular izquierda en niños con corrección exitosa de coartación aórtica y en niños sanos. La

hipertensión arterial puede participar en la disfunción ventricular que presentan algunos pacientes al seguimiento. El hecho de haber encontrado el cambio en el gen tanto en pacientes como en controles hace probable que esta variación en la secuencia del gen no participe en el origen y comportamiento a largo plazo de la enfermedad.

II. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CC) consisten en la malformación de una o más estructuras cardíacas que incluyen a las cavidades intracardiacas, los aparatos valvulares y las válvulas, los tabiques interauricular e interventricular, las grandes arterias y a los sistemas venosos pulmonar y sistémico.

Las CC constituyen las malformaciones congénitas más comunes y representan un grave problema de salud pública a nivel mundial. La prevalencia reportada en otras partes del mundo oscila entre el 2.1 y el 12.3 por cada 1,000 recién nacidos vivos.¹⁻⁴ En México, no conocemos su prevalencia real. Con base en la prevalencia reportada en otros países y considerando la tasa de natalidad en nuestro país,⁵ se estima que alrededor de 10 mil a 12 mil niños nacen con algún tipo de CC cada año.

Las CC también son causa importante de mortalidad infantil y pediátrica. En México se posicionan como la segunda causa de muerte en menores de un año y la tercera en los niños entre uno y cuatro años desde 2005.⁶

La presentación clínica de las CC se tienen un amplio espectro de gravedad, desde defectos cardíacos simples en los que el corazón tuvo una formación normal en la vida intrauterina dejando únicamente pequeñas comunicaciones entre cavidades o vasos como sucede en la comunicación interauricular (CIA), la comunicación interventricular (CIV) y la persistencia del conducto arterioso (PCA), hasta CC muy complejas incompatibles con la vida como el síndrome de ventrículo izquierdo hipoplásico (SVIH) en el que existe hipoplasia o atresia de todas las estructuras del lado izquierdo del corazón o como la pentalogía de Cantrell en la que además de la

presencia de CC complejas existen malformaciones graves en otras estructuras de la línea media.

La etiología de las CC aún no está completamente bien definida. Se considera multifactorial debido a la participación de factores ambientales y genéticos. En relación al ambiente se han identificado un gran número de factores de riesgo asociados a su desarrollo, como la ingesta de alcohol, ciertos medicamentos y sustancias prohibidas durante la gestación, así como la exposición al tabaco, a la radiación ionizante y a ciertas patologías maternas como las enfermedades de la colágena, la fenilcetonuria y la diabetes mellitus por mencionar algunas.⁷

Los esfuerzos para entender de manera completa la etiología y la fisiopatología de las CC siguen siendo insuficientes. Aún desconocemos las causas de muchas enfermedades cardiovasculares que afectan a infantes, niños y adolescentes. Muchos esfuerzos se han realizado por identificar factores genéticos asociados al desarrollo de CC y en la actualidad se han reconocido un gran número de genes candidatos, mismos que participan en diferentes estadios del desarrollo cardiaco. Algunos factores de transcripción no solo participan en etapas cruciales del desarrollo del corazón sino que además regulan a otros importantes señalizadores. Mutaciones en genes específicos como *NKX2-5*, *GATA4* y *TBX5* se han logrado identificar como responsables de causar CC y de similar manera la presencia de ciertos polimorfismos se han asociado a un mayor riesgo cuando se conjuntan con otras condiciones ambientales e intrínsecas aún no del todo explicadas, tal es el caso del polimorfismo *677CT* del gen *MTHFR* que al estar presente, genera una enzima deficiente que condiciona niveles elevados de homocisteína en sangre y que impone un mayor riesgo de tener hijos con CC a mujeres en edad fértil.

Además del estudio de la etiología de las CC, otro aspecto relevante que requiere aún de investigación es el origen y las causas de las secuelas después de la corrección de CC y la respuesta adaptativa de los tejidos después de la cirugía cardíaca. Procesos de mala adaptación, de remodelación anormal y de disfunción vascular y miocárdica continúan afectando a muchos pacientes después de la cirugía “resolutiva”. Esto cobra relevancia en la actualidad debido a los numerosos logros y avances en la cirugía cardiovascular que han dado origen a un grupo de pacientes en crecimiento constante correspondiente al de los pacientes sobrevivientes de una corrección de CC.

En esta tesis se presenta una compilación de la producción científica relacionada con el proyecto de tesis.

El primer artículo de esta producción científica, es el que posteriormente generó la hipótesis de trabajo del proyecto de tesis. Se trata de un estudio en el que se evaluó la función ventricular izquierda en niños con corrección exitosa de Coartación Aórtica (CoAo). Con evidencias previas de que los métodos endocárdicos tradicionales para la evaluación de la función ventricular izquierda pueden no identificar anormalidades sutiles especialmente cuando existe afección en la geometría ventricular, decidimos estudiar la función del ventrículo izquierdo (VI) en niños con corrección exitosa de CoAo con una herramienta de medición menos dependiente de la geometría y de la precarga ventricular, ***el índice de rendimiento miocárdico (IRM) o índice de Tei***. Con esta metodología, encontramos anormalidades en la función ventricular izquierda en cerca de la mitad de los casos asintomáticos sin gradiente residual

significativo en el sitio de la coartación aún en presencia de índices endocárdicos como fracción de eyección ventricular izquierda (FEVI) y fracción de acortamiento (FA) normales. Este porcentaje desconcertantemente elevado de pacientes afectados condujo a nuestra hipótesis de que estas anomalías subclínicas en la función ventricular pudieran explicar al menos en parte la alta frecuencia de complicaciones cardiovasculares tardías que presentan estos pacientes. Siendo así y dado que se trata de pacientes con corrección exitosa de la enfermedad, este hecho apoyaría la teoría planteada por muchos expertos, que postulan a la CoAo como una enfermedad sistémica y progresiva más que una enfermedad caracterizada por una simple obstrucción mecánica.

Sin embargo, nuestros resultados no podían apoyar de manera definitiva esta teoría debido a que antes del estudio de la función ventricular nosotros no eliminamos previamente todos los posibles factores de riesgo asociados a causar anomalías cardiovasculares, aspecto metodológico fundamental que nuestro trabajo inicial, así como los previamente reportados por otros grupos, no cumplían. Así pues, nos dimos a la tarea de eliminar todos estos posibles factores de riesgo asociados a complicaciones cardiovasculares como son el sobrepeso, la obesidad, la presencia de gradientes limítrofes en el sitio de la CoAo (susceptibles de aumentar durante la actividad física), hipertensión arterial (HA), corrección tardía e incluso un remodelado del arco aórtico anormal, que sabemos puede condicionar flujos de alta velocidad en el sitio de la reparación y que pueden con el tiempo condicionar daño al endotelio aórtico.

El proyecto de esta tesis, consiste en una evaluación de la función ventricular izquierda en niños sin otros factores de riesgo, utilizando una metodología ecocardiográfica más reciente que consiste en **la evaluación de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas**. Determinamos además la presión arterial ambulatoria de estos casos aparentemente normotensos (normotensos durante el reposo) y los niveles séricos del péptido natriurético tipo B que aumenta en presencia de un incremento en el estrés de la pared ventricular ya sea por sobre carga de presión y/o de volumen.

Nosotros planteamos la hipótesis de que a pesar de una corrección exitosa temprana de CoAo persisten anomalías cardiovasculares sutiles que pueden pasar inadvertidas con los métodos de diagnóstico tradicionales y que pueden tener un efecto aditivo y deletéreo que expliquen al menos en parte, la aparición de complicaciones graves en la edad adulta.

Pero esta hipótesis no explica el hecho de que las complicaciones graves a largo plazo no se presentan en todos los casos sino solo en una proporción de pacientes lo que sugiere que además de los factores ambientales, también factores genéticos pueden participar.

Con este fundamento y debido a que el gen *NPPB* participa en la remodelación y función cardíaca y en la regulación de la presión arterial, analizamos la secuencia del gen *NPPB* en nuestros pacientes en búsqueda de mutaciones o polimorfismos que pudieran asociarse a las alteraciones cardiovasculares persistentes de la enfermedad a pesar de su corrección exitosa temprana.

Encontramos 1 polimorfismo raro en 2 pacientes y en 5 controles sanos en la secuencia del gen *NPPB*, esto es relevante ya que se trata de polimorfismos no

reportados previamente. Sin embargo al comparar la secuencia con 50 controles sanos también encontramos dichos polimorfismos por lo que no necesariamente se asocian a la enfermedad o a las complicaciones después de la corrección.

Otro hallazgo del estudio es el porcentaje de niños normotensos al reposo que presentaron hipertensión ambulatoria, que aunque bajo, es similar al porcentaje de adultos con complicaciones cardiovasculares tempranas después de la corrección exitosa.

Este proyecto y los resultados del mismo, se plasman de manera detallada en el capítulo correspondiente (*proyecto de tesis*).

En esta compilación se incluyen además otros tres artículos de la producción científica, que se relacionan, en cierto modo, con el proyecto de tesis.

En el segundo artículo, con base en nuestro interés constante de buscar mejores métodos para la evaluación de la función del VI, reportamos ***el estudio del flujo de las venas pulmonares (FVP)*** en niños con diagnóstico de miocardiopatía dilatada (MCD). El análisis del FVP es una metodología que se ha estudiado por muchos años y que evalúa con mucha precisión la función diastólica del VI; sin embargo, por razones no bien conocidas, entró en desuso temporalmente, dando prioridad al estudio de la función diastólica del VI por medio del análisis del flujo doppler de la válvula mitral y de otros métodos más recientemente descritos. En este artículo se reporta la función diastólica del VI de niños con MCD por medio del FVP y se pone de manifiesto como el análisis del FVP es un método más sensible que la evaluación aislada del flujo Doppler mitral, ya que todos los niños con MCD estudiados mostraron disfunción diastólica cuando se analizó el FVP, pese a que el 40% de los casos

tuvieron valores del flujo Doppler mitral aparentemente normales (patrón “pseudonormalizado”), y propusimos al estudio del FVP como una herramienta indispensable en la evaluación de la función ventricular izquierda en niños con MCD. En el tercer artículo, presentamos la serie de casos más grande reportada, con diagnóstico de ***pentalogía de Cantrell***. Se trata de la experiencia de 42 años en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Este trabajo es relevante debido a que enfatiza la gravedad de la enfermedad y la importancia de reconocer el problema y referirlo oportunamente a un hospital de tercer nivel en donde exista la posibilidad de un manejo multidisciplinario que permita la sobrevivencia de al menos algunos de estos casos como sucedió con el 27% de esta serie.

Por último, recientemente publicamos (*cuarto artículo*) nuestros resultados en relación a la búsqueda del ***polimorfismo 677CT del gen MTHFR*** en mujeres mexicanas en edad fértil. Se sabe que dicho polimorfismo afecta la funcionalidad de la enzima MTHFR condicionando niveles séricos de homocisteína elevados, lo que teóricamente condiciona un riesgo mayor de CC en los descendientes de mujeres portadoras del polimorfismo. Encontramos una asociación entre el genotipo materno ***677/TT MTHFR*** con la presencia de CC complejas en sus descendientes, con un OR de 5.9, mientras que no encontramos diferencias en la suplementación con ácido fólico, antes y/o durante la gestación, entre las madres de niños con CC complejas y las madres de niños sanos. El artículo fue publicado en enero de 2013 en la revista *Pediatric Cardiology* y actualmente, ha sido citado por 8 artículos publicados en revistas internacionales de alto impacto, tres de ellos correspondientes al diseño metodológico de meta-análisis (Anexo).

Los problemas cardiovasculares que afectan a los niños, corresponden en su gran mayoría a defectos congénitos del corazón y/o de los grandes vasos. Las CC continúan siendo causa importante de morbilidad y mortalidad en edades tempranas. Cuando las CC se asocian a otros defectos malformativos, el riesgo de muerte es aún mayor. El desarrollo de nuevas técnicas de tratamiento y la mejoría en los resultados de la cirugía cardiaca para el tratamiento de las CC, ha condicionado el surgimiento de una nueva especialidad, *la cardiología aplicada a los jóvenes y adultos sobrevivientes de CC*. Las secuelas derivadas del tratamiento de las CC son variadas y dependen del tipo de corrección o paliación. Este proyecto de tesis muestra que aún aquellos pacientes sobrevivientes de CC simples aparentemente sin secuelas, requieren un seguimiento estricto encaminado a la búsqueda de anomalías persistentes que pueden pasar desapercibidas con los métodos de diagnóstico habituales por lo que es de suma importancia indicar y guiar un estilo de vida orientado a eliminar otros posibles factores de riesgo cardiovascular con el objetivo de reducir al máximo la posibilidad de complicaciones graves durante el seguimiento de una corrección exitosa de la cardiopatía de base. Hasta el momento, esta estrategia debería aplicarse a todos los pacientes, ya que los esfuerzos por encontrar grupos de mayor riesgo, con base en su información genética, son insuficientes. No ha sido posible la demostración de la participación de genes y locus específicos en estos procesos. El uso de técnicas más sofisticadas de genética molecular como los microarreglos y la secuenciación masiva, podrá darnos información útil en el futuro que permita guiar el seguimiento personalizado de estos pacientes, el diagnóstico de portadores, el consejo genético y ejercer con ello una cardiología preventiva más eficiente.

III. PROYECTO DE TESIS

1. Título

Búsqueda de mutaciones en el gen *NPPB* en niños con corrección exitosa de coartación aórtica y su asociación con los niveles séricos del péptido natriurético tipo B, con la presión arterial ambulatoria de 24 horas y con las alteraciones persistentes del ventrículo izquierdo.

2. Marco teórico

i. Anomalías en el desarrollo embriológico de la aorta torácica y troncos supra aórticos

La aorta torácica comienza en el corazón, a nivel de la válvula aórtica, convirtiéndose en aorta abdominal al atravesar el diafragma (frecuentemente a nivel del cuerpo vertebral de D12); se divide en aorta ascendente, transversa y descendente; la aorta ascendente se extiende desde la válvula aórtica (en cuya proximidad nacen las arterias coronarias), hasta el origen del primer vaso (normalmente la arteria innominada); la aorta transversa o arco aórtico, contiene el origen de los troncos supra aórticos; la aorta descendente, comienza justo distal al origen de la arteria subclavia izquierda, finalizando a nivel del diafragma. El diámetro normal de la aorta ascendente en la edad adulta es de 3,6 cm (con un rango de 2,2 – 3.9 cm) y de la aorta descendente es de 2,4 cm (con un rango de 1,4 - 3,3 cm); la pared aórtica es de pocos milímetros y está constituida (de dentro a fuera) por la túnica íntima (endotelio), túnica media (membrana elástica interna, músculo liso y membrana elástica externa) y túnica adventicia.

Las principales arterias que se originan en la aorta torácica, lo hacen en el arco aórtico y son (en orden): La arteria innominada o tronco braquiocefálico, (que se subdivide en arteria subclavia derecha y carótida común derecha), la arteria carótida común izquierda y la arteria subclavia izquierda; las arterias vertebrales nacen a nivel de las arterias subclavias (Figura 1).

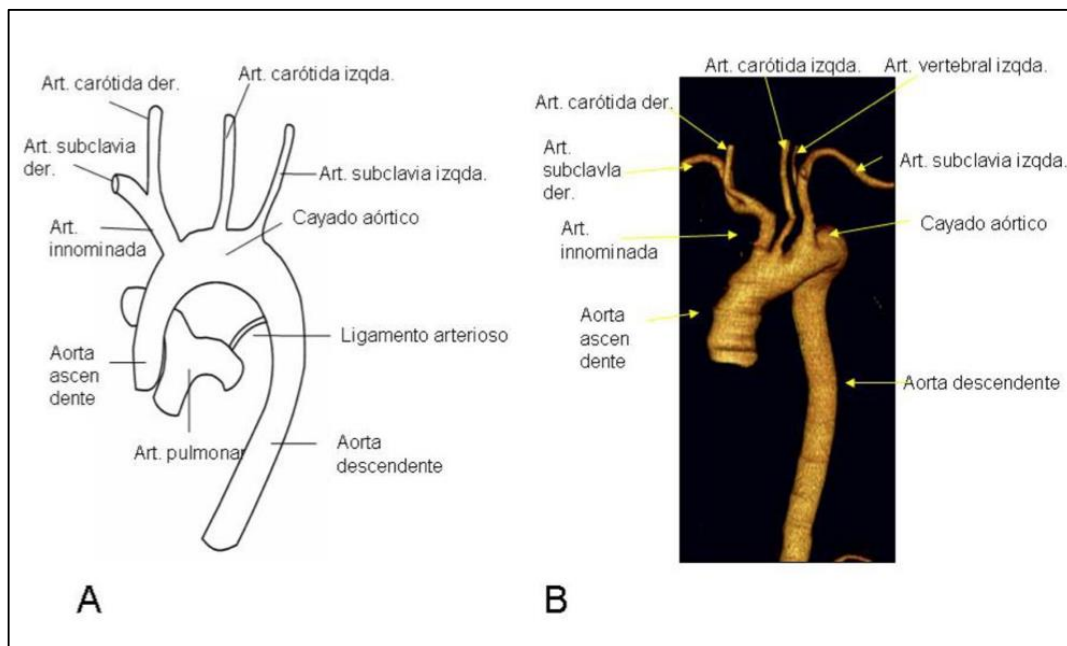


Figura 1. A: Aorta torácica y grandes vasos en situación normal. B: Tomografía computada multicorte; reconstrucción en tres dimensiones de la aorta torácica y los grandes vasos.

La aorta descendente proximal, con frecuencia tiene una pequeña protrusión en su margen interno-anterior, justo distal al origen de la arteria subclavia izquierda denominada "protuberancia ductal", ya que el conducto arterioso (la estructura que conecta la circulación pulmonar fetal con la aorta) se encontraba en este lugar, quedando

en el adulto como remanente el ligamento arterioso; raramente, una porción del conducto se queda permeable originando una pequeña bolsa a ese nivel denominada "divertículo del ductus".

La aorta descendente da origen a numerosas pequeñas ramas (arterias bronquiales, intercostales y medulares) que irrigan bronquios, esófago, musculatura intercostal y cordón medular.

Hay múltiples variantes a nivel del arco aórtico que suelen afectar tanto al origen de los grandes vasos como a la localización de la aorta torácica descendente con respecto a la columna vertebral; esto se debe a alteraciones durante el desarrollo embriológico. La aorta torácica deriva de una rama primitiva ventral y dorsal que está conectada con seis pares de arcos braquiales (Figura 2A); entre la 6^a y la 8^a semanas de vida, aparecen unos arcos selectivos y otros involucionan resultando en una única aorta con tres ramas principales; el primer arco forma las arterias carótidas externas y maxilar; el tercer arco forma la arteria carótida interna y el cuarto arco forma el arco aórtico y la arteria subclavia (Figura 2 B).

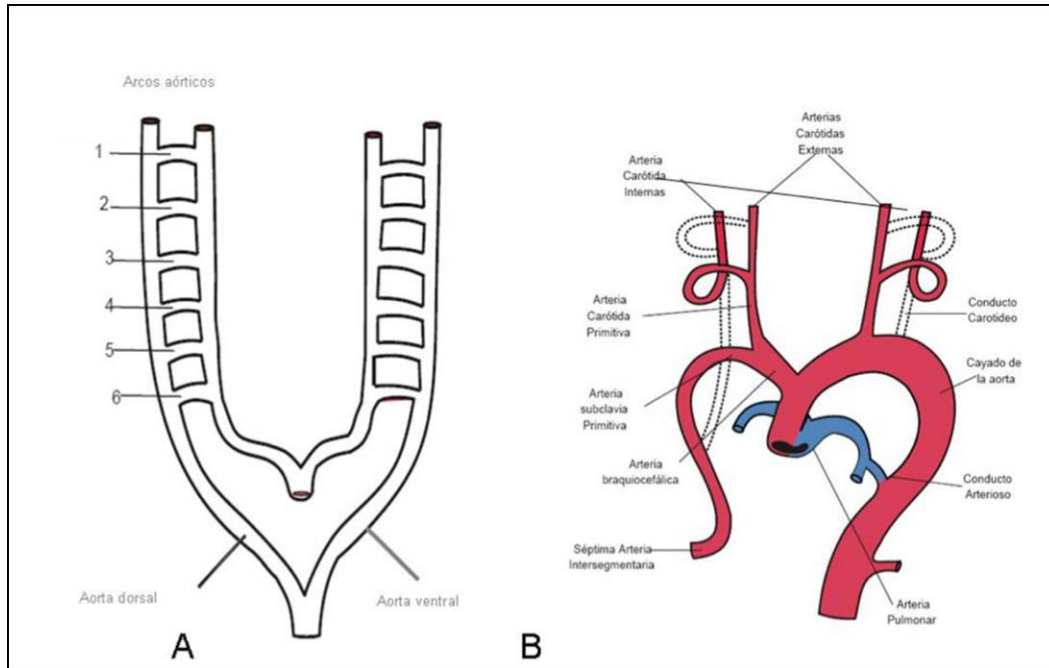


Figura 2. Desarrollo embriológico de la aorta torácica. A: Ramas primitivas ventral y dorsal que conectan con seis pares de arcos. B: Origen del cayado aórtico y de los troncos supra aórticos.

De las múltiples variantes (Figura 3), la más frecuente es el "arco bovino" que consiste en el origen de la arteria carótida común izquierda a nivel del tronco innominado (15%) (Figura 4).

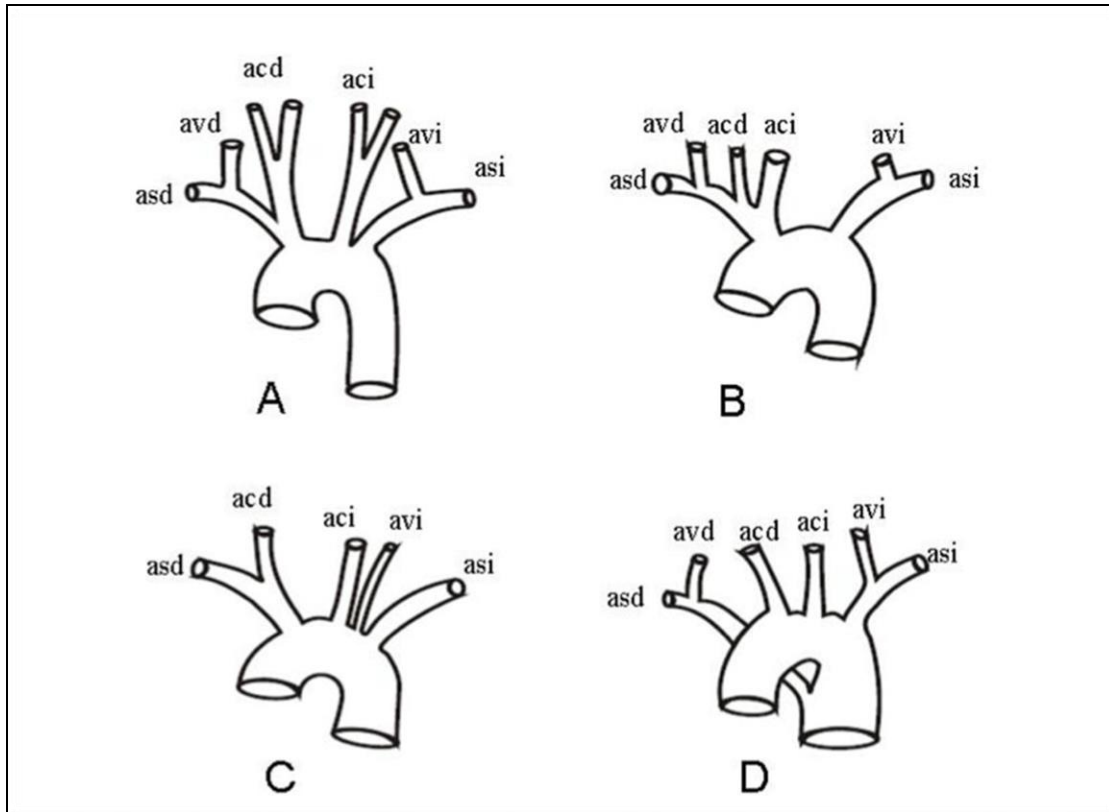


Figura 3. Variantes del arco aórtico. A: Normal, B: Arco aórtico bovino, C: Origen de arteria vertebral izquierda en arco aórtico, D: Arteria subclavia derecha aberrante. asd: arteria subclavia derecha; avd: arteria vertebral derecha; acd: arteria carótida derecha; aci: arteria carótida izquierda; avi: arteria vertebral izquierda, asi: arteria subclavia izquierda.

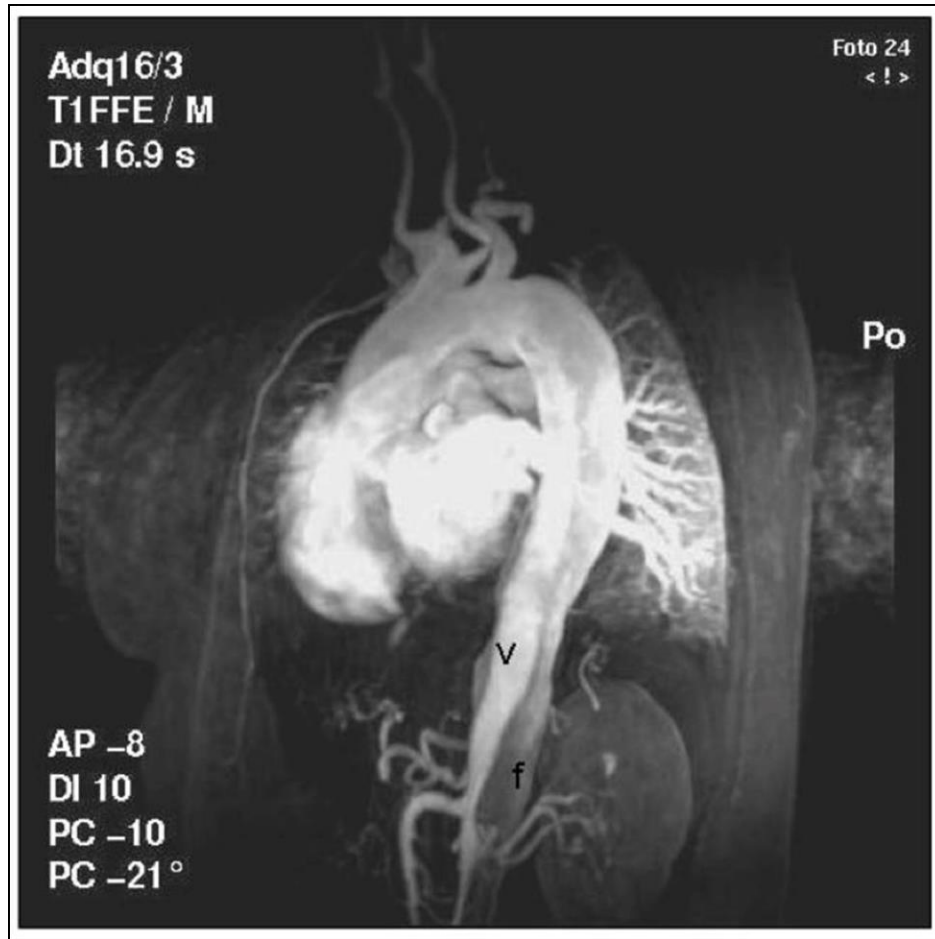


Figura 4. Resonancia magnética cardiaca en 3 dimensiones. Imagen en proyección oblicua sagital con gadolinio. Se observa un arco aórtico bovino y disección aórtica; v: luz verdadera; f: luz falsa.

Otra variante frecuente es el origen de la arteria vertebral a nivel del arco aórtico; la arteria subclavia derecha aberrante, nace distal a la arteria subclavia izquierda y está situada posterior al esófago en el 80% de los casos, entre el esófago y la tráquea en el 15% y anterior a la tráquea en el 5%. (Figura 5); menos frecuente es el origen de la arteria innominada en un tronco común con la arteria carótida izquierda, a la izquierda de la tráquea, pudiendo dar síntomas compresivos traqueales o masa pulsátil supraclavicular al cruzar la línea media (Figuras 6 y 7).

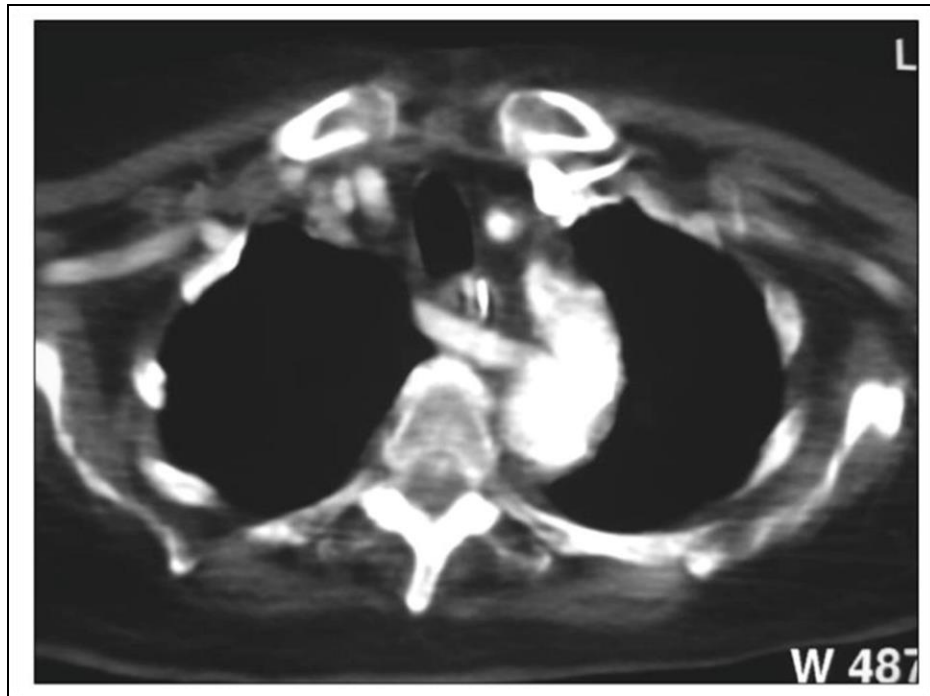


Figura 5. Tomografía computada de tórax con medio de contraste intravenoso. Imagen en proyección axial que muestra la arteria subclavia derecha aberrante; la arteria subclavia nace de la parte medial del cayado aórtico pasando por detrás del esófago.

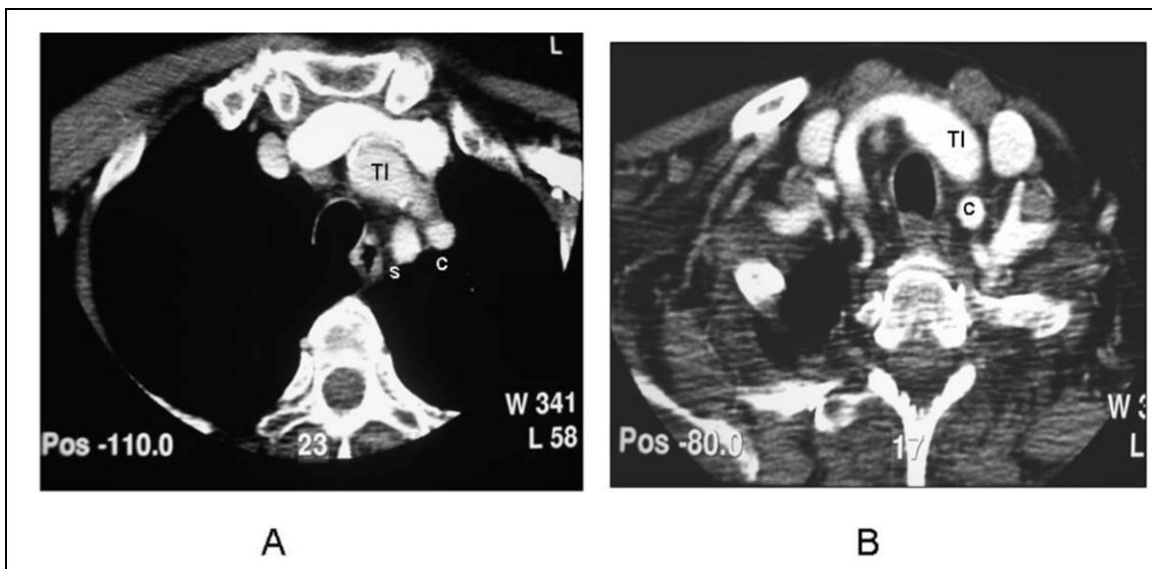


Figura 6. Tomografía computada de tórax con medio de contraste intravenoso. A: Imagen en proyección axial donde se visualiza el origen común de la arteria carótida izquierda (C) y del tronco innominado (TI); S: subclavia izquierda. B: Imagen en proyección axial a nivel superior donde se observa el tronco innominado que cruza la línea media a nivel del hueco supra-clavicular.

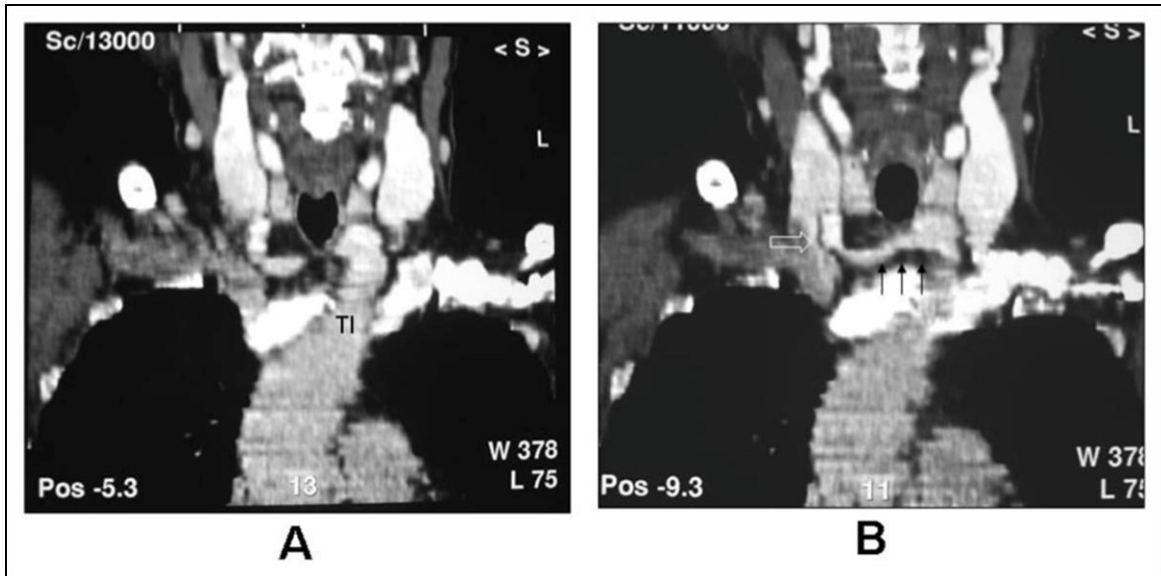


Figura 7. Tomografía computada de tórax. Reconstrucciones coronales que muestran el tronco innominado cruzando la línea media hacia la derecha (flechas negras) en situación anormalmente alta; se visualiza el origen de la arteria carótida común derecha (flecha blanca).

El arco aórtico y la aorta descendente pueden estar situados a la derecha de la columna vertebral en el 1% de los individuos (Figura 8), asociándose con frecuencia a arteria subclavia izquierda aberrante; nos podemos encontrar también un arco aórtico "doble" asociado en el 40% de los casos, a anillos vasculares torácicos.



Figura 8. Tomografía computada de tórax con medio de contraste endovenoso. Arco aórtico derecho. Imagen axial que muestra arco aórtico a la derecha de la tráquea.

ii. Coartación aórtica

La coartación aórtica (CoAo) es una de las CC más frecuentes. Constituye el 5 al 8% de todas las CC. Consiste en un estrechamiento fibroso distal al arco aórtico, principalmente a nivel del istmo aórtico (entre la arteria subclavia izquierda y el ductus); en el 50% de los casos existe hipoplasia tubular de la porción transversa del arco aórtico con dilatación de los vasos supra aórticos; se puede asociar a defecto septal ventricular, válvula aórtica bicúspide, aneurisma de la aorta ascendente, estenosis de arteria subclavia izquierda o arteria subclavia derecha aberrante. La estrechez de la aorta es producto de un pliegue de la capa media hacia la luz del vaso que genera obstrucción del flujo sanguíneo hacia la parte inferior del cuerpo.

La etiología de la enfermedad es desconocida. Las teorías más aceptadas son la alteración mecánica intrauterina que genera obstrucción (por bandas amnióticas o compresión por otras estructuras) y la reducción del flujo sanguíneo en la zona, que genera hipoplasia del tejido aórtico. La fisiopatología depende fundamentalmente del grado de constricción, de la presencia o no de circulación colateral y de la persistencia del conducto arterioso (PCA).

Al nacimiento se ponen en juego una serie de mecanismos compensadores para asegurar una perfusión sanguínea adecuada. Existe un aumento de la presión sistólica en el segmento aórtico proximal y vasoconstricción de las arteriolas sistémicas para mantener una presión diastólica elevada que permita, a través de la PCA y/o de las colaterales, mantener el flujo sanguíneo hacia la parte inferior del cuerpo.

La PCA juega un papel importante ya que al ocurrir su cierre fisiológico (entre la primera y tercera semanas de vida extrauterina), la sangre que pasaba a través de él, no lo hace

más y, si la obstrucción es grave y los mecanismos compensadores no son adecuados, se presenta la disfunción del ventrículo izquierdo (VI) que da lugar al cuadro clínico de insuficiencia cardiaca (IC).

La obstrucción del flujo sanguíneo a nivel de la estenosis, provoca el desarrollo de colaterales que pretenden salvar el obstáculo, siendo el origen habitualmente a nivel de la arteria subclavia (Figura 9).

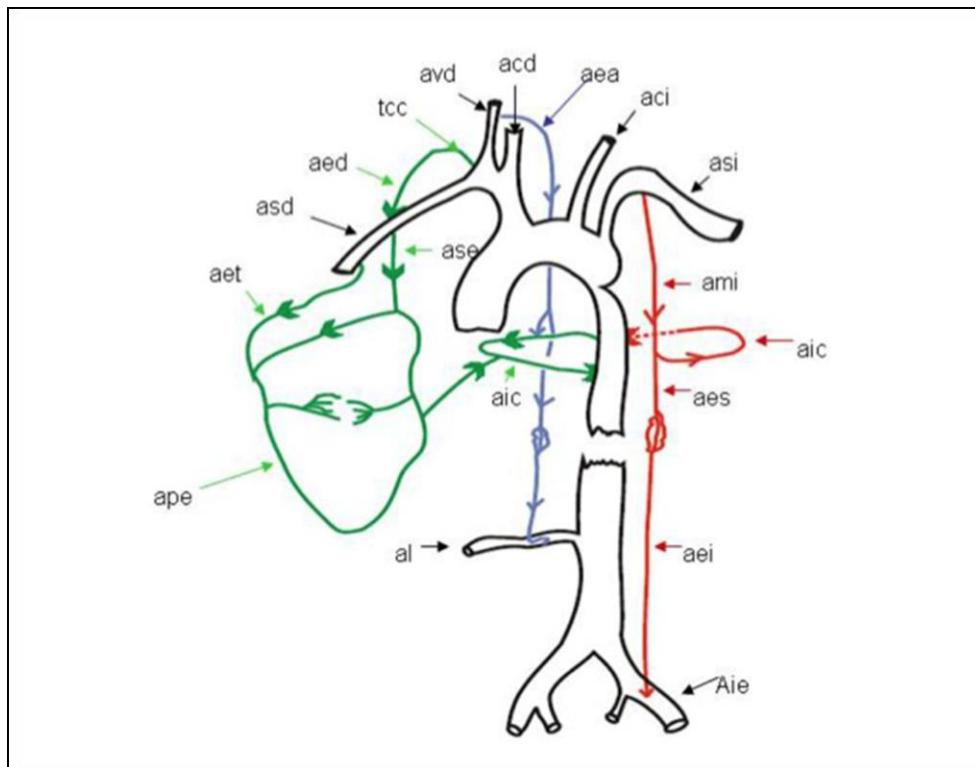


Figura 9. Vías colaterales en la coartación de aorta. acd: a. Carótida derecha; aci: a. Carótida izquierda; aea: a. Espinal anterior; aed: a. Escapular descendente; aei: a. Epigástrica inferior; aes: a. Epigástrica superior; aet: a. Escapular transversa; aic; a. Intercostal; aie: a. Iliaca externa; al: lumbar; ami: a. Mamaria interna; ape: a. Periescapular; asd: a. Subclavia derecha; ase: a. Subescapular, asi: a. Subclavia izquierda; avd: vertebral derecha; tcc: tronco costocervical.

Las principales vías para la formación de colaterales son:

- Arteria subclavia – arteria mamaria interna - (arterias intercostales - aorta torácica descendente post-coartación), o arteria epigástrica superior - arteria epigástrica inferior – arteria iliaca externa (Figura 9, rojo).
- Arteria subclavia - tronco tiro cervical y costo cervical - arteria toraco abdominal y escapular descendente – arterias intercostales - aorta torácica post-coartación (Figura 9, verde).
- Arteria subclavia – arteria vertebral - arteria espinal anterior - arterias intercostales o arterias lumbares - aorta torácica descendente post-coartación (Figura 9, azul).

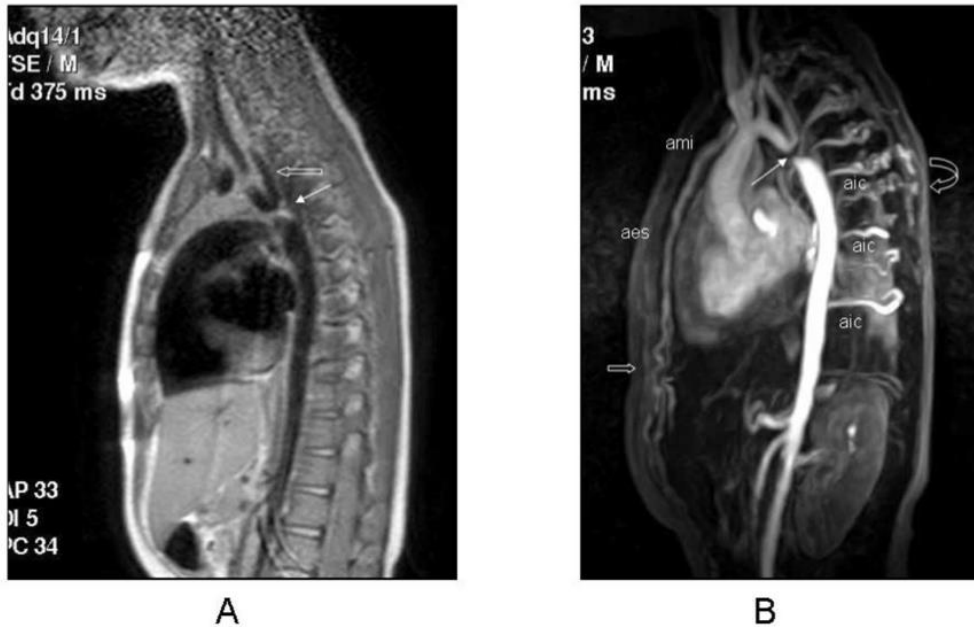


Figura 10. Arco aórtico derecho. Tomografía computada de tórax con medio de contraste endovenoso. Imagen axial que muestra arco aórtico a la derecha de la tráquea.

El tratamiento debe realizarse al nacimiento y consiste en liberar la obstrucción aórtica, ya sea con técnicas por cateterismo, como la dilatación con globo (angioplastia aórtica) o bien mediante cirugía cardíaca con corte de la zona estrecha y anastomosis de los cabos aórticos terminales (coartectomía termino-terminal). Se considera que la *corrección* ha sido *exitosa* cuando se liberó adecuadamente la obstrucción aórtica y la diferencia de presión entre las zonas pre-coartación y post-coartación es menor a 15 mm Hg.

iii. Seguimiento a largo plazo de los pacientes con coartación aórtica

Al tratarse de una obstrucción mecánica, después de la corrección exitosa, se esperaría que estos pacientes mostraran al seguimiento una evolución similar a la de la población general; sin embargo su sobrevida estimada es menor, con un 80% de los pacientes vivos a los 40-50 años después de la reparación⁸. Esta reducción en la sobrevida obedece a la emergencia de complicaciones durante el seguimiento como re-coartación aórtica (Re-CoAo), hipertensión arterial (HA), enfermedad aterosclerosa, disfunción ventricular, IC, accidentes cerebrovasculares precoces e incluso la muerte súbita cardíaca (MSC)⁸⁻¹⁰. Debido a la alta frecuencia de anomalías cardiovasculares persistentes, a la frecuente aparición de complicaciones tardías y a la reducción substancial en la sobrevida se ha sugerido que la CoAo más que una entidad aislada caracterizada por la simple obstrucción mecánica de la aorta es, en realidad, una enfermedad generalizada del sistema cardiovascular¹¹. Se desconocen las causas que predisponen a estos pacientes a complicaciones graves durante el seguimiento y a una sobrevida menor. Algunos factores que se han propuesto como predisponentes son: la corrección tardía^{10, 11}, anomalías elásticas de la aorta^{12, 13}, un umbral anormal del

sistema nervioso autónomo^{14, 15} y la HA¹¹. Nuestro grupo de investigación ha propuesto una remodelación anormal del VI, con alteración en su función, que persiste a pesar de una corrección exitosa y que predispone a estos pacientes a complicaciones cardiovasculares¹⁶.

Se especula que en la persistencia de anomalías en la estructura y función del VI, participa una remodelación anormal del VI después de la corrección de la CoAo. La obstrucción causada por la CoAo condiciona sobrecarga de presión del VI. Al liberar la obstrucción por la CoAo, el VI inicia un proceso de remodelación; sin embargo la geometría del VI y la hipertrofia no se normalizan completamente en todos los pacientes¹⁷ y se han descrito patrones anormales de remodelación con hipertrofia concéntrica en algunos casos e hipertrofia excéntrica en otros¹⁸.

En relación a la evaluación de la función ventricular izquierda en el seguimiento de estos pacientes, existe controversia. Utilizando los índices endocárdicos por ecocardiografía, como la fracción de eyección del VI (FEVI) y la fracción de acortamiento (FA), estudios previos han mostrado una función sistólica normal e incluso incrementada (hipernormal)^{19,20}. Sin embargo, estos estudios contrastan con modelos animales en los que se indujo sobrecarga de presión^{21,22} y con estudios en humanos con hipertensión^{23,24} en los que la hipertrofia del VI se asoció al deterioro gradual de la función y de la contractilidad ventricular, sugiriendo que en presencia de cierto grado de hipertrofia ventricular estos índices frecuentemente sobre-evalúan el acortamiento de la fibra²⁵ y algunos autores incluso postulan que índices endocárdicos normales o elevados, en presencia de hipertrofia del VI indican disfunción sistólica²³. En un estudio previo, nosotros utilizamos el índice de rendimiento miocárdico (IRM) o índice de Tei y demostramos una función

global del VI anormal en casi la mitad de 40 niños con corrección exitosa de CoAo¹⁶ (Anexo 1). En comparación con los índices endocárdicos, el IRM es una herramienta menos dependiente de la geometría y de la precarga ventricular. Nuestros hallazgos concordaron con un estudio que demostró anomalías en la deformación regional miocárdica del VI de pacientes, después de una reparación exitosa de CoAo, utilizando la resonancia magnética cardíaca (RMC)¹⁹. Pero otros estudios continúan enfatizando acerca de la función sistólica aumentada en niños, después de una corrección exitosa²⁰, así que si los pacientes con antecedente de corrección de CoAo muestran función y estructura del VI anormal, es una pregunta que continúa sin ser consistentemente resuelta.

Desconocemos cuáles son los factores que participan para que un número importante de casos con corrección exitosa de CoAo desarrollen complicaciones cardiovasculares graves, que los predispone a una reducción en la supervivencia y otros corregidos en circunstancias similares tienen una evolución más favorable. Se postula que factores genéticos pueden estar involucrados en los mecanismos de remodelación y adaptación vascular y miocárdica, pero hasta ahora ningún gen se ha asociado a participar en estos procesos después de la cirugía de CoAo.

iv. Péptido natriurético tipo B

Con el propósito de identificar marcadores para predecir el grado de IC y de disfunción ventricular, se han estudiado varias proteínas. Se ha encontrado que la proteína NPPB (péptido natriurético tipo B) juega un papel importante en el sistema cardiovascular. NPPB pertenece a la familia de los péptidos natriuréticos. Esta familia está constituida por cuatro moléculas estructuralmente relacionadas: el péptido natriurético auricular

(ANP), el péptido natriurético tipo B (NPPB), el péptido natriurético tipo C (CNP) y más recientemente descrito el péptido natriurético tipo D. NPPB constituye el de mayor relevancia clínica. Es una hormona cardiaca que es producida primariamente en los ventrículos por los miocitos miocárdicos en respuesta al incremento del estrés de la pared ya sea por sobre carga de presión y/o de volumen ventricular²¹. Es sintetizado como un pro-péptido de 108 aminoácidos, almacenado en los gránulos secretorios de los miocitos en la forma de pro- BNP y en el momento de su excreción se divide en dos moléculas: la porción N-terminal inactiva (NTproNPPB) y el NPPB que es la forma biológicamente activa de 32 aminoácidos²². NPPB se une a receptores específicos en las células endoteliales y en las fibras musculares lisas, activando la guanilato-ciclasa. La producción del GMPc intracelular regula sus efectos biológicos que incluyen natriuresis, diuresis, regulación negativa del crecimiento celular miocárdico y de los vasos sanguíneos, regulación de la presión arterial, del tamaño de los vasos sanguíneos, de la permeabilidad vascular y de la vasodilatación así como inhibición del sistema renina-angiotensina-aldosterona^{21, 22}. Por todas estas funciones, modula la respuesta neuro-hormonal de la IC, regula la *presión sanguínea* y la homeostasis de los fluidos y parece estar implicada en la regulación del crecimiento miocárdico y en la *remodelación ventricular*. Una alta concentración del péptido NPPB en sangre periférica es indicativa de IC. Tamura y cols.²³ generaron un ratón con disrupción de NPPB (Nppb-null mice) y observaron lesiones de fibrosis en los ventrículos. En respuesta a la sobrecarga de presión ventricular, las lesiones fibróticas incrementaron en tamaño y número. Este estudio demostró la función del NPPB como factor antifibrosis de los cardiomiocitos in vivo y puso en evidencia su papel regulador en la *remodelación ventricular*.

v. El gen *NPPB*

El gen *NPPB* (OMIM *600295) se encuentra en el cromosoma 1, en la región p36.2. Su nombre oficial es: precursor del péptido natriurético tipo B y se ubica en la posición 11, 917, 521 - 11, 918, 992. Es un gen pequeño constituido por 1468 pares de bases (pb), consta de tres exones de 230, 256 y 208 pb respectivamente. *NPPB* codifica para la proteína *NPPB*. (Variantes en *NPPB* se han asociado a varias enfermedades cardiovasculares como HA²⁵⁻²⁷, eventos vasculares cerebrales^{28, 29} y a infarto al miocardio³⁰. Un estudio reciente estableció también la asociación entre variantes del gen *NPPB* con el desarrollo de disfunción diastólica después de la cirugía de revascularización con circulación extracorpórea³¹. En este trabajo se incluyeron a 697 adultos que fueron sometidos a cirugía de revascularización cardiaca; 76 de los cuales desarrollaron disfunción diastólica en el postoperatorio; el mapeo de 7 genes que participan en la codificación de los péptidos natriuréticos mostró 7 polimorfismos de *NPPB/NPPA* (rs632793, rs6668352, rs549596, rs198388, rs198389, rs6676300, rs1009592) asociados con un riesgo menor de disfunción ventricular y 4 polimorfismos del gen *NPR3* (rs700923, rs16890196, rs765199, rs700926) asociados con riesgo incrementado de disfunción ventricular en estos pacientes.

3. Planteamiento del problema

La CoAo es una CC muy frecuente. Pese a una corrección exitosa, un importante número de casos desarrollan complicaciones tardías que afectan su calidad de vida y reducen substancialmente su sobrevida. Estudios previos han evidenciado anomalías cardiovasculares persistentes en adultos sobrevivientes de CoAo que pueden explicar dichas complicaciones, pero hasta el momento ningún estudio ha establecido si estas anomalías están presentes desde etapas tempranas después de la corrección y si mutaciones en el gen *NPPB* están asociadas a su desarrollo.

4. Pregunta de Investigación

Nos interesa conocer si niños con corrección exitosa de CoAo *y sin otros factores de riesgo cardiovascular asociados* tienen anomalías en el VI, en la PA y en los niveles de NPPB y si de existir estas anomalías, tienen asociación con mutaciones en el gen *NPPB*.

5. Hipótesis

Alternativa

Los niños con corrección exitosa de CoAo aún *sin tener otros factores de riesgo cardiovascular asociados* tienen anomalías en el VI, en la PA y en los niveles de NPPB *y existe asociación* entre dichas anomalías con la presencia de mutaciones en el gen *NPPB*.

Nula

Los niños con corrección exitosa de CoAo y sin *otros factores de riesgo cardiovascular asociados no tienen anormalidades* en el VI, en la PA, en los niveles de NPPB, *como tampoco tienen mutaciones* en el gen *NPPB*.

6. Justificación

Han pasado más de 60 años desde la primera corrección de CoAo y sin embargo, aún no es posible anticipar el pronóstico, a largo plazo, de un recién nacido con la enfermedad. Las técnicas de diagnóstico cardiovascular actual permiten identificar cambios y anormalidades incipientes antes de su presentación clínica. Si utilizando herramientas de diagnóstico más sensibles evidenciamos anormalidades cardiovasculares persistentes en niños con corrección exitosa de CoAo aún en ausencia de otros factores de riesgo cardiovascular asociados, estaremos en condiciones de sugerir la aplicación de dichos métodos de manera rutinaria en el seguimiento de niños con esta enfermedad y de ofrecer un tratamiento más oportuno a este grupo de pacientes que incidan en una mejor calidad de vida y en una mayor sobrevida a largo plazo.

Por otro lado, dado que la evolución clínica de pacientes con características similares es muy heterogénea, es posible que el perfil genético determine un mayor o menor riesgo de desarrollar complicaciones, por lo que la búsqueda de genes probablemente involucrados es indispensable. Ningún estudio previo ha analizado la posible influencia del gen *NPPB*, que participa en procesos de remodelación cardíaca y de regulación de la presión arterial.

7. Objetivo general

Explorar posibles mecanismos responsables de complicaciones cardiovasculares tardías frecuentemente observadas en pacientes con corrección exitosa de CoAo.

8. Objetivos específicos

- 1.- Determinar la frecuencia de anormalidades en la función del VI de niños con corrección exitosa de CoAo.
- 2.- Determinar la frecuencia de anormalidades en la PA ambulatoria de niños con corrección exitosa de CoAo.
- 3.- Determinar la frecuencia de anormalidades en los niveles séricos de NPPB en niños con corrección exitosa de CoAo.
- 4.- Determinar la frecuencia de mutaciones en el gen *NPPB* de niños con corrección exitosa de CoAo.
- 5.- Analizar la asociación entre la presencia de mutaciones en el gen *NPPB* con la frecuencia de anormalidades en el VI, la PA y los niveles séricos de NPPB en los niños con corrección exitosa de CoAo.

9. Material y métodos

i. Diseño del estudio

Estudio observacional, analítico, transversal comparativo.

ii. Unidad de análisis

Niños con corrección exitosa de CoAo *sin otros factores de riesgo cardiovascular asociados* y niños sanos.

iii. Criterios de inclusión

- a. Niños con corrección *exitosa* de CoAo que cumplan todos los siguientes criterios:
 - i. Corrección quirúrgica
 - ii. CoAo nativa
 - iii. CoAo aislada
 - iv. CoAo temprana
 - v. Tiempo de seguimiento mayor de 4 años desde la cirugía cardiaca.
 - vi. Anatomía normal del arco aórtico evaluada con resonancia magnética cardiaca RMC.

iv. Criterios de no inclusión

- a. Niños con corrección *exitosa* de CoAo con al menos uno de los siguientes factores de riesgo cardiovascular asociados:
 - i. Pacientes con alguna otra cardiopatía congénita incluida la válvula aórtica bicúspide.
 - ii. Pacientes que tuvieron algún tipo de tratamiento por cateterismo cardiaco para la CoAo antes o después de la cirugía cardiaca.
 - iii. Pacientes que tuvieron más de una cirugía cardiaca para el tratamiento de la CoAo.
 - iv. Pacientes con tratamiento farmacológico para HA o con diagnóstico de HA aún sin estar recibiendo tratamiento farmacológico.

- v. Pacientes con alguna anomalía en la geometría del arco aórtico documentada con RMC.
- vi. Sobrepeso.
- vii. Obesidad.

v. Criterios de eliminación

- a. Pacientes en los que, por cualquier razón, no se completó alguna de las evaluaciones consideradas en el protocolo de investigación.

vi. Cálculo del tamaño de la muestra

Utilizamos la fórmula para estudios transversales comparativos.

$$n = \frac{(p_1q_1 + p_2q_2) K}{(P_1 - P_2)^2}$$

$$n = \frac{(0.25)(0.75) + (0.45)(0.55) 6.2}{(0.25 - 0.45)^2}$$

$$\frac{n = 2.697}{0.04}$$

$$n = 67$$

$$k = (Z\alpha + Z\beta)^2$$

Con un valor de $\alpha=0.05$, un poder de 80% para una prueba de una cola, se calculó un tamaño de muestra de 67 pacientes por cada grupo de estudio.

vii. Clasificación de las variables

Variable independiente o predictora

Corrección exitosa de CoAo

Variables dependientes o de resultado

HA ambulatoria

Disfunción del VI

Niveles séricos de NPPB elevados

Para un sub-análisis

Variable independiente o predictora

Mutaciones en el gen *NPPB* en niños con corrección exitosa de CoAo.

Variables dependientes o de resultado

HA ambulatoria

Disfunción del VI

Niveles séricos de NPPB

Variables potencialmente confusoras

Tiempo de Evolución

Edad al momento de la corrección de CoAo

Tipo de CoAo

Fecha de corrección quirúrgica de CoAo

Tipo de corrección quirúrgica de CoAo

Complicaciones asociadas a la corrección quirúrgica de CoAo

HA después de la corrección de CoAo

Variables demográficas

Edad

Sexo

Peso

Talla

Índice de masa corporal

viii. Definición operativa de las variables

Edad

Definición operacional: Tiempo transcurrido del nacimiento al momento de la inclusión al estudio.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Sexo

Definición operacional: hombre o mujer

Escala de medición: nominal

Peso

Definición operacional: Se determinó mediante báscula marca ADE modelo M20812 de pie (precisión de 100 g.); con el paciente en el centro de la plataforma de la báscula distribuyendo el peso por igual en ambas piernas. La medida se realizó con el paciente en bata clínica y se registrará la décima de kilogramo más próxima.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Talla

Definición operacional: Distancia entre el vértex y el plano de sustentación; el paciente se coloca de pie, completamente estirado, con los talones juntos. Se coloca la cabeza del

paciente en el plano de Frankfurt y se realiza una tracción de la cabeza a nivel de las apófisis mastoides. Se desciende lentamente la plataforma horizontal del estadiómetro marca ADE modelo M20812 hasta contactar con la cabeza del paciente, se obtendrá la talla máxima y se ajustará al centímetro más próximo.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Índice de masa corporal

Definición operacional: medida de relación entre peso y talla. Se calculará utilizando la fórmula de Quetelet que es $(IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura (m}^2\text{)})$.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Corrección exitosa de CoAo

Definición operacional: El antecedente de haber tenido una cirugía cardíaca para la reparación de CoAo en la cual se logró eliminar el gradiente en el sitio de la obstrucción y por lo tanto no existe un gradiente mayor de 15 mmHg a nivel del arco aórtico evaluado por ecocardiograma.

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Niveles séricos de NPPB

Definición operacional: La cantidad del péptido identificada en el suero de los niños y adolescentes con CoAo y de los niños y adolescentes sanos.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Presión arterial ambulatoria

Definición operacional: El valor de la presión arterial identificada por el monitor de presión arterial ambulatoria en cada hora durante 24 horas continuas. El software entrega los valores de presión arterial durante el día y la noche de presión sistólica, diastólica y media.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Para el cálculo de Odds Ratio y el análisis multivariado se realizó su conversión en dicotómica; nivel de presión arterial diastólica elevado: si, no.

Deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales miocárdicas (Speckle Tracking)

Definición operacional: Es el porcentaje de acortamiento que sufre la fibra miocárdica durante la contracción y es entregado por el software del ecocardiógrafo como promedio global y de manera separada por cada uno de los 17 segmentos del ventrículo izquierdo, así como en sub-promedios por vistas ecocardiográficas de 4 cámaras, 3 cámaras y dos cámaras.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Secuencia normal del gen *NPPB*

Definición operacional: Secuencia esperada de acuerdo a la reportada en las bases de datos del GenBank/proyecto genoma humano.

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Mutación en el gen *NPPB*

Definición operacional: Variación en la secuencia del gen que está ausente en la población general (al menos en 100 individuos no relacionados sanos, 200 cromosomas) y que afecta la actividad funcional del gen.

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Polimorfismo en el gen *NPPB*

Definición operacional: Variación en la secuencia del gen que está presente en al menos el 0.5% de la población general (1/100 individuos no relacionados, sanos, 200 cromosomas).

Escala de medición: nominal, dicotómica.

Edad al momento de la corrección de CoAo

Definición operacional: Tiempo transcurrido del nacimiento al momento de la corrección de la CoAo.

Escala de medición: cuantitativa continua.

Tipo de CoAo

Definición operacional: El tipo de CoAo diagnosticado por ecocardiografía antes de la corrección quirúrgica.

Escala de medición: cualitativa, categórica.

Tipo de corrección quirúrgica de CoAo

Definición operacional: El tipo de CoAo diagnosticado por ecocardiografía antes de la corrección quirúrgica.

Escala de medición: cualitativa, categórica.

Complicaciones asociadas a la corrección quirúrgica de CoAo

Definición operacional: Complicaciones que se hayan presentado desde el ingreso a sala de operaciones hasta el alta hospitalaria en el ingreso para la corrección de CoAo.

Escala de medición: cualitativa, categórica.

HA después de la corrección de CoAo

Definición operacional: La presencia de hipertensión arterial documentada o la evidencia de haber recibido tratamiento antihipertensivo en cualquier momento antes de la corrección de CoAo.

Escala de medición: cualitativa, dicotómica.

ix. Metodología

- Estudio de la función del ventrículo izquierdo

Para el estudio de la función del VI utilizamos el ***Análisis de la deformación longitudinal del VI por medio del rastreo de las señales miocárdicas.***

Esta metodología ecocardiográfica de última generación es menos operador dependiente en comparación con las técnicas habituales para el análisis de la función del VI²¹⁻²³. Todos los estudios fueron realizados por un mismo ecocardiografista utilizando un ecocardiógrafo Vivid 7 (GE Medical Systems, Horten, Norway), siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Ecocardiografía. Se analizó la deformación longitudinal en los 17 segmentos del VI. Las señales miocárdicas (speckles) son visualizadas como pequeños elementos brillantes y corresponden a los marcadores acústicos que aparecen como resultado del ultrasonido reflejado por el miocardio. El rastreo de estas señales miocárdicas (Speckle-Tracking) permite delinear el grosor miocárdico desde el endocardio hasta el epicardio. Posteriormente se describe la deformación del miocardio generada por la tensión; el resultado se expresa como un valor negativo y describe el grado de acortamiento que sufre la fibra miocárdica durante la contracción que traduce el cambio en tamaño que experimentó la fibra y descrita como el cambio dividido entre el tamaño original. El valor se expresa en número negativo en relación al porcentaje del tamaño que la fibra se acortó. Se registra el valor global o promedio de los 17 segmentos y el valor para cada segmento. El estudio de la deformación miocárdica del VI utilizando el sistema de Speckle-Tracking, exige la obtención de imágenes ecocardiográficas de alta calidad, con una escala de grises elevada y homogénea durante todas las tomas.

Con el paciente en reposo y en posición decúbito lateral se obtienen imágenes en cortes de cuatro cámaras (Fig. 11), de tres cámaras (Fig. 12) y de 2 cámaras (Fig. 13).



Figura 11. Ecocardiograma bidimensional. La figura muestra una vista de cuatro cámaras para el análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas.

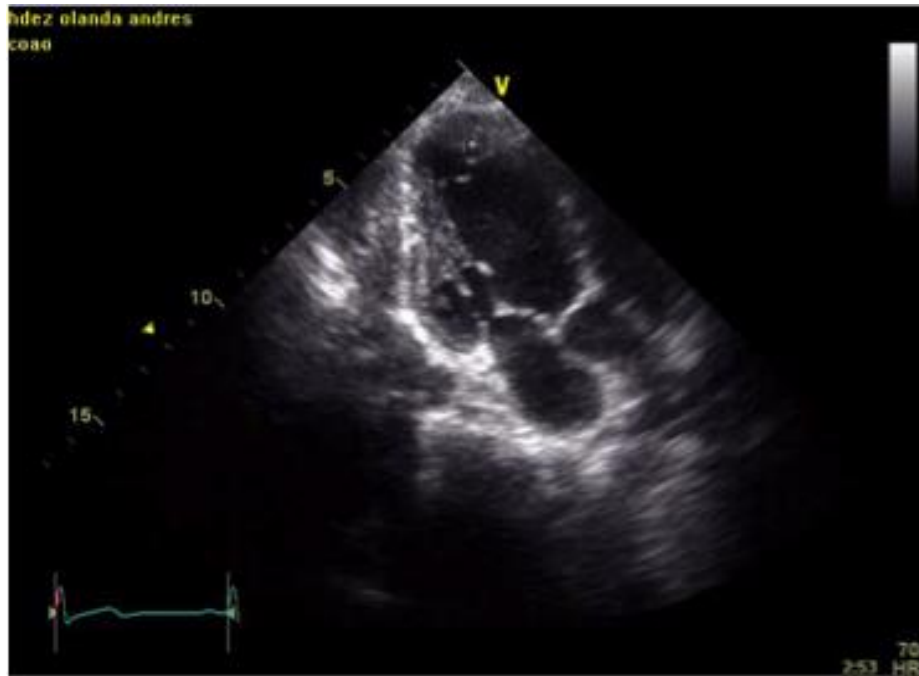


Figura 12. Ecocardiograma bidimensional. La figura muestra una vista de tres cámaras para el análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas.



Figura 13. Análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas. La figura muestra una deformación reducida en la pared lateral del ventrículo izquierdo en uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo.

El operador señala manualmente los puntos del endocardio correspondientes al anillo de la válvula mitral y al ápex ventricular para cada una de las tres imágenes. Al terminar la señalización de puntos, el sistema verifica la calidad de imagen y aprueba o rechaza la maniobra. Una vez aprobados los datos, los resultados se presentan en un diagrama conocido como “Bull eye” con el valor obtenido en cada uno de los segmentos. Los segmentos del “Bull eye” se muestran en color rojo intenso si la deformación es normal o en escalas de rojos claros a azul conforme se va alejando de la normalidad (Figuras 14 y 15).

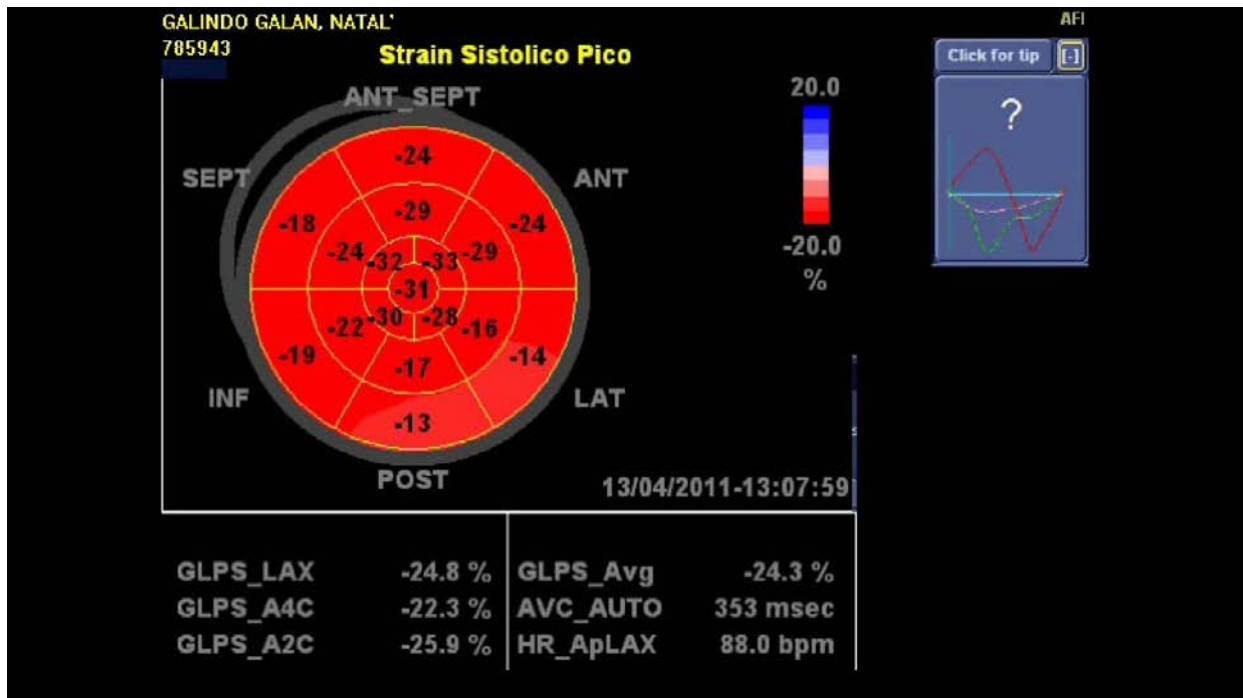


Figura 14. Análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas. La figura muestra una deformación longitudinal normal en los 17 segmentos del ventrículo izquierdo en uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo.

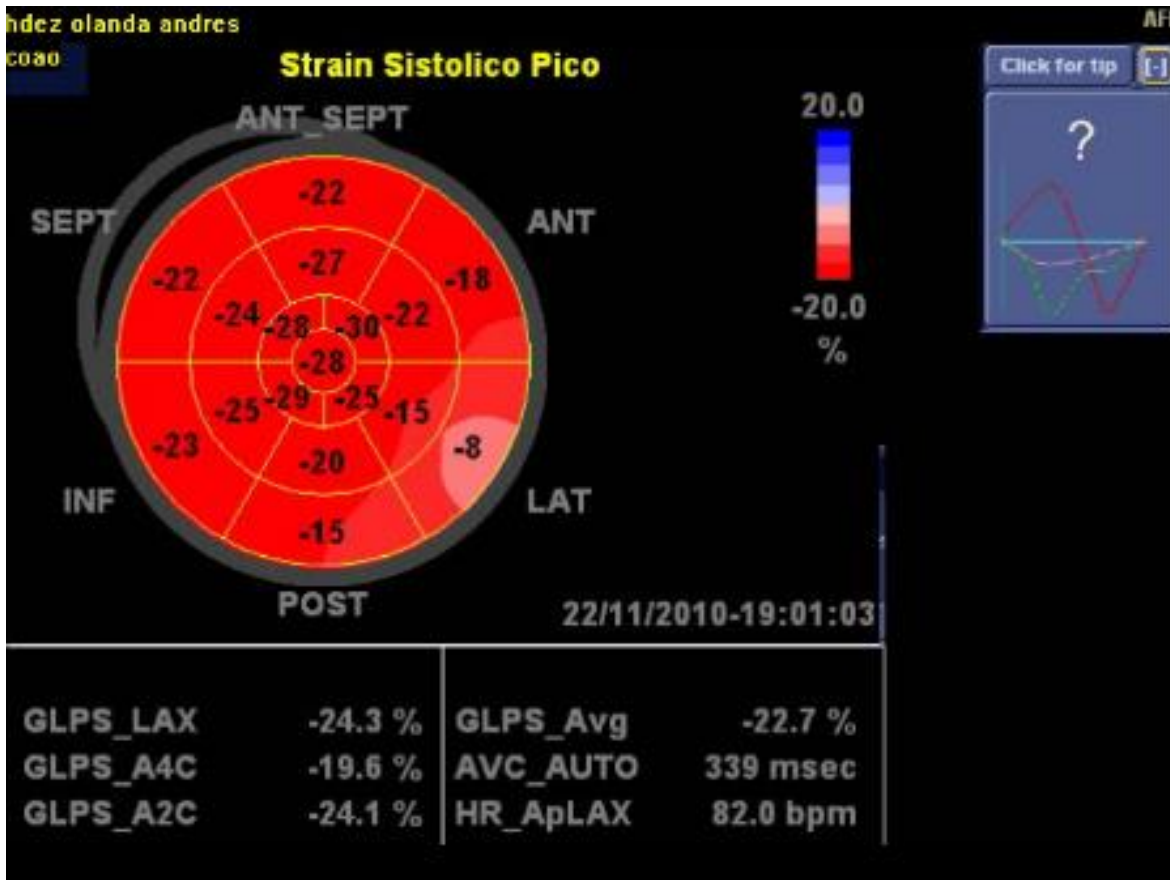


Figura 15. Análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas. La figura muestra una deformación reducida en la pared lateral del ventrículo izquierdo en uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo.

Los resultados también se pueden visualizar punto a punto en cada uno de los cortes obtenidos o bien en gráficas de distribución. También se muestran los resultados en promedios para cada una de las imágenes obtenidas entendiendo que cada una de estas vistas o cortes permite analizar con mejor precisión diferentes porciones del ventrículo. Finalmente el sistema entrega un valor promedio general o deformación global del VI o Speckle-Tracking global del VI.

Seis regiones, tres segmentos y diecisiete sub-segmentos ventriculares izquierdos

fueron estudiados en todos los pacientes. Los resultados fueron analizados por regiones y segmentos así como por promedios de regiones y segmentos y por promedios en las diferentes vistas ecocardiográficas (cuatro cámaras, tres cámaras, dos cámaras).

Los valores de la deformación longitudinal del VI de los pacientes con antecedente de CoAo se compararon con los obtenidos en el grupo de 32 niños sanos pareados por edad y sexo con nuestros pacientes.

- Monitoreo de la presión arterial ambulatoria de 24 horas

Se colocó un monitor ambulatorio de la presión arterial (MAPA) a todos los pacientes en el brazo izquierdo y se les envió a casa a realizar sus actividades habituales, incluida la actividad física. El MAPA se programó para realizar mediciones de presión arterial (PA) horaria durante 24 horas. Se obtuvieron los registros de las mediciones de PA ambulatoria. Los resultados se expresan en mmHg. Se consideró HA sistémica ambulatoria cuando se al menos un registro de la PA sistólica, diastólica y/o media resultó ser mayor al percentil 95 para la talla y peso durante el monitoreo ambulatorio continuo de 24 horas y en los adolescentes siempre que la PA superó los niveles de 120/80 mmHg independientemente del percentil para la talla y peso. Las mediciones de la PA se realizaron de acuerdo a las guías establecidas por el cuarto reporte de diagnóstico, evaluación y tratamiento de la HA en niños y adolescentes. Los valores de PA ambulatoria también se compararon con los obtenidos en un grupo de 32 niños sanos pareados por edad y sexo con los pacientes.

- Determinación de los niveles séricos de NPPB

Para la determinación de los niveles de NPPB en suero, se recolectaron 2 ml. de sangre periférica en tubos con EDTA. Se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. El plasma obtenido se separó y se almacenó en tubos eppendorf a -80°C hasta su posterior utilización. Las muestras se descongelaron gradualmente. Para la detección del NPPB, se utilizó el equipo Architect i1000 que utiliza la técnica de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). La técnica ELISA es un ensayo de bioquímica analítica que permite detectar y cuantificar cantidades muy pequeñas de analitos en solución, por medio de un anticuerpo conjugado a una enzima (por ejemplo, Horseradish Peroxidase HRP, fosfatasa alcalina AP, etc.). Existen distintos tipos de ELISA, que tienen la característica común de que todos ellos se basan en la interacción antígeno-anticuerpo, que es analizada a través del marcaje con una enzima (en la mayoría de los casos con HRP). Esta enzima cataliza una reacción en la que un sustrato se transforma generando un producto coloreado que puede cuantificarse mediante un espectrofotómetro. En este caso utilizamos un ELISA con la técnica de Sándwich que es un ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos. Se trata de un ensayo en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno (Anti-NPPB). Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. Los valores se

compararon con los obtenidos en un grupo de 100 niños sanos pareados por edad y sexo con nuestros pacientes.

- Análisis de la secuencia del gen *NPPB*

Para la secuenciación directa del gen *NPPB* se obtuvo una muestra de 3 ml. de sangre periférica que se colocó en un tubo de ensayo que contenía 0.1 ml de ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA). Se procedió a realizar:

- I. Extracción de DNA genómico a partir de una muestra de sangre periférica
- II. Amplificación del DNA con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
- III. Verificación de la calidad de amplificación del DNA por electroforesis en geles de agarosa al 1.5%.
- IV. Purificación de los productos de PCR para secuenciación
- V. Preparación de los productos de PCR para la reacción de secuenciación
- VI. secuenciación directa del gen *NPPB*

Los productos de PCR fueron analizados por medio de secuenciación automática mediante el método de Sanger, utilizando el kit de secuenciación comercial BigDye® Terminator V3.1 y un secuenciador de electroforesis capilar ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation®, California, United States). El método de secuenciación por dideoxinucleótidos, mejor conocido como el método Sanger se basa en el proceso biológico de la replicación del DNA. Este método está basado en el empleo de dideoxinucleótidos que carecen del grupo hidroxilo del carbono 3', de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de DNA en crecimiento, esta cadena no puede continuar elongándose. Esto es así ya que la DNA polimerasa necesita

un grupo terminal 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el dideoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. El método comienza una vez que se aísla y se clona el DNA que se desea secuenciar. Este DNA se desnaturaliza y se emplea una sola hebra para la secuenciación. En la secuenciación se utiliza un cebador o "primer" que se encarga de suministrar el grupo terminal 3'OH que necesita la DNA polimerasa para comenzar a elongar.

Tabla 1. Primers y condiciones de PCR para el gen *NPPB*.

Exón	Dirección	Primers secuencia 5'-3'	Condiciones de PCR
1	Forward	AGCAGCAGCAGAAGCA GCAG	(95°C 8') X 1
	Reverse	GGACCCTTTCATTGCTG CTGT	(95°C 40'', 64°C 40'', 72°C 40'') X 32 (72°C 5') X1
2	Forward	TTCACTTGGGTGCCATG AAG	(95°C 8') X 1
	Reverse	GTGTCACACACTGGAAT GGG	(95°C 40'', 62°C 40'', 72°C 40'') X 35 (72°C 5) X1
3	Forward	TAACAGGGTGGTGGGT GGCA	(95°C 8') X 1
	Reverse	TGAGGAAAAAGCCCCC TTGTGG	(95°C 40'', 65°C 40'', 72°C 40'') X 35 (72°C 5) X1

- Análisis de Secuencias por alineamiento

Se analizó la secuencia del gen de los pacientes y de 50 controles y los resultados se compararon con la secuencia estándar publicada en la página de NCBI (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB> (GI: 167882799)). Para el análisis de las secuencias se utilizó el programa CLC Genomics Workbench 6.5.1 y se verificó analizando las variaciones en la secuencia de manera manual.

10. Análisis estadístico

Los cálculos estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS.20 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, Estados Unidos). Se empleó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y dispersión para las variables demográficas. Las pruebas de distribución de normalidad se realizaron con la prueba de Shapiro-Wilk. Los resultados de las variables cuantitativas con distribución normal se muestran como media \pm desviación estándar. El análisis de las diferencias entre dos muestras independientes se realizó con la prueba de la t de Student (distribución normal). Se consideró significancia estadística el valor de $p < 0,05$.

11. Aspectos Éticos

El protocolo de investigación fue aprobado por los comités de investigación y ética del Hospital Infantil de México Federico Gómez y está apegado a los principios éticos de la Declaración de Helsinki. Se trató de un estudio con riesgo mayor al mínimo por lo que se obtuvieron cartas de consentimiento en todos los casos y en su caso, también se obtuvieron cartas de asentimiento informado.

12. Aspectos de Bioseguridad

El presente protocolo de investigación fue aprobado por el comité de bioseguridad del Hospital infantil de México y se realizó siguiendo todas las recomendaciones del comité.

13. Resultados

Un total de 40 pacientes reunieron los criterios de inclusión para el estudio, pero solo 35 aceptaron participar; tres de ellos fueron excluidos debido a dificultades técnicas en la obtención de imágenes ecocardiográficas o de resonancia magnética de alta calidad para el análisis.

Se incluye en el informe a 32 pacientes; 22 varones, de 5 a 15 años (9.02 ± 3.9 años) y 32 niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal. El tiempo de seguimiento después de la corrección exitosa de CoAo fue de 9.2 ± 3.06 años. La corrección quirúrgica a través de una toracotomía izquierda con resección de la zona estrecha y anastomosis termino-terminal se realizó en el 78% de los casos, la anastomosis ampliada con la interposición de un parche para el tratamiento de la CoAo asociada a cierto grado de hipoplasia del arco aórtico se utilizó en el 15% de los casos. En dos niños se utilizó la arteria subclavia para ampliar el arco aórtico (7%).

Evaluación de la función del ventrículo izquierdo mediante el análisis de la deformación longitudinal por medio del rastreo de las señales endocárdicas.

Los resultados del análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas de 32 niños con corrección exitosa de CoAo se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Frecuencias en porcentajes de niveles de presión arterial ambulatoria elevada en 32 niños con corrección exitosa de CoAo.

Segmento	Niños después de corrección de CoAo
Anteroseptal basal	22.33 ± 2.44
Anterior basal	22.14 ± 3.13
Lateral basal	21.80 ± 3.25
Posterior basal	24.10 ± 5.40
Inferior basal	20.71 ± 2.30
Septal basal	21.73 ± 2.00
Anteroseptal medial	22.80 ± 3.19
Anterior medial	23.00 ± 3.38
Lateral medial	22.44 ± 3.04
Posterior medial	24.45 ± 5.10
Inferior medial	23.77 ± 2.16
Septal medial	23.23 ± 1.78
Anterior apical	25.09 ± 3.93
Lateral apical	23.33 ± 3.67
Inferior apical	26.17 ± 3.56
Septal apical	23.40 ± 3.92
Ápex	24.00 ± 3.83

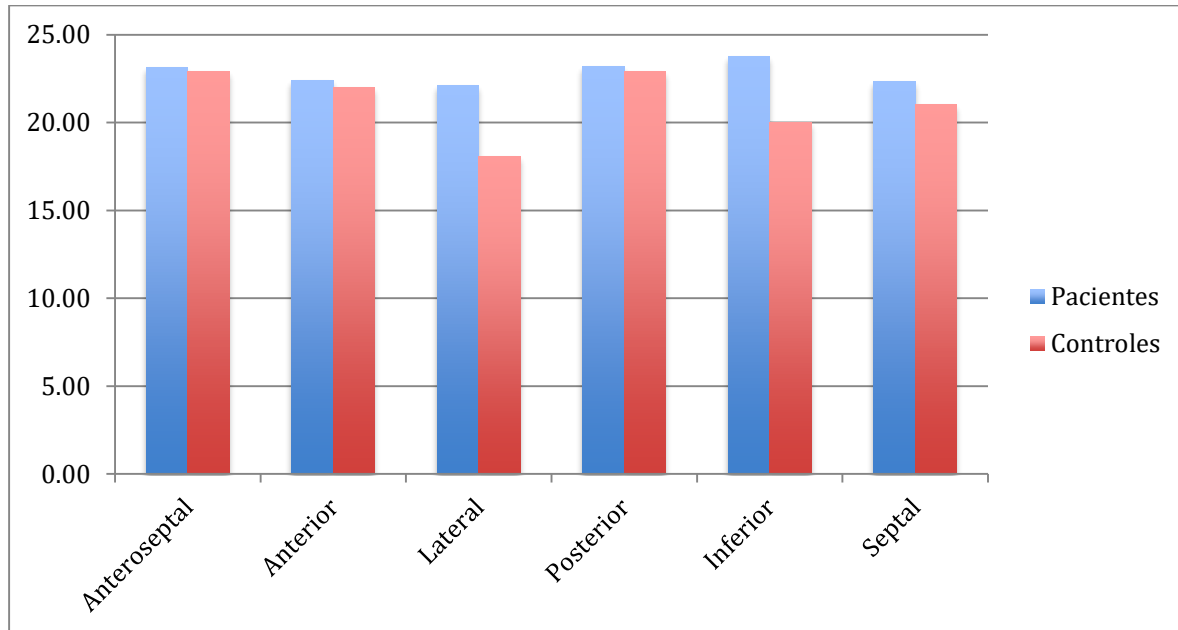
Los valores de la deformación longitudinal de 3 regiones, seis segmentos y 17 sub-segmentos del VI de los 32 niños con antecedente de CoAo exitosa no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con el grupo de 32 niños sanos pareados por edad y sexo, los resultados en ambos grupos y el valor de p se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo por medio del rastreo de las señales endocárdicas en los 17 segmentos del ventrículo izquierdo de niños con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos.

Segmento	Niños después de corrección de CoAo	Niños sanos	Valor de p*
Anteroseptal basal	22.33 ± 2.90	24.20 ± 2.44	0.10
Anterior basal	22.14 ± 2.45	24.10 ± 3.13	0.10
Lateral basal	21.80 ± 3.30	21.55 ± 3.25	0.19
Posterior basal	24.10 ± 4.10	20.80 ± 5.40	0.20
Inferior basal	20.71 ± 2.83	23.05 ± 2.30	0.22
Septal basal	21.73 ± 4.00	22.21 ± 2.00	0.23
Anteroseptal medial	22.80 ± 5.00	27.50 ± 3.19	0.33
Anterior medial	23.00 ± 1.38	23.56 ± 3.38	0.10
Lateral medial	22.44 ± 1.04	20.32 ± 3.04	0.10
Posterior medial	24.45 ± 2.10	21.89 ± 5.10	0.65
Inferior medial	23.77 ± 1.60	25.10 ± 2.16	0.30
Septal medial	23.23 ± 2.87	24.56 ± 1.78	0.63
Anterior apical	25.09 ± 3.30	27.01 ± 3.93	0.22
Lateral apical	23.33 ± 4.10	25.10 ± 3.67	0.29
Inferior apical	26.17 ± 3.50	29.70 ± 3.56	0.66
Septal apical	23.40 ± 4.95	28.10 ± 3.92	0.65
Ápex	24.00 ± 4.39	28.00 ± 3.83	0.76

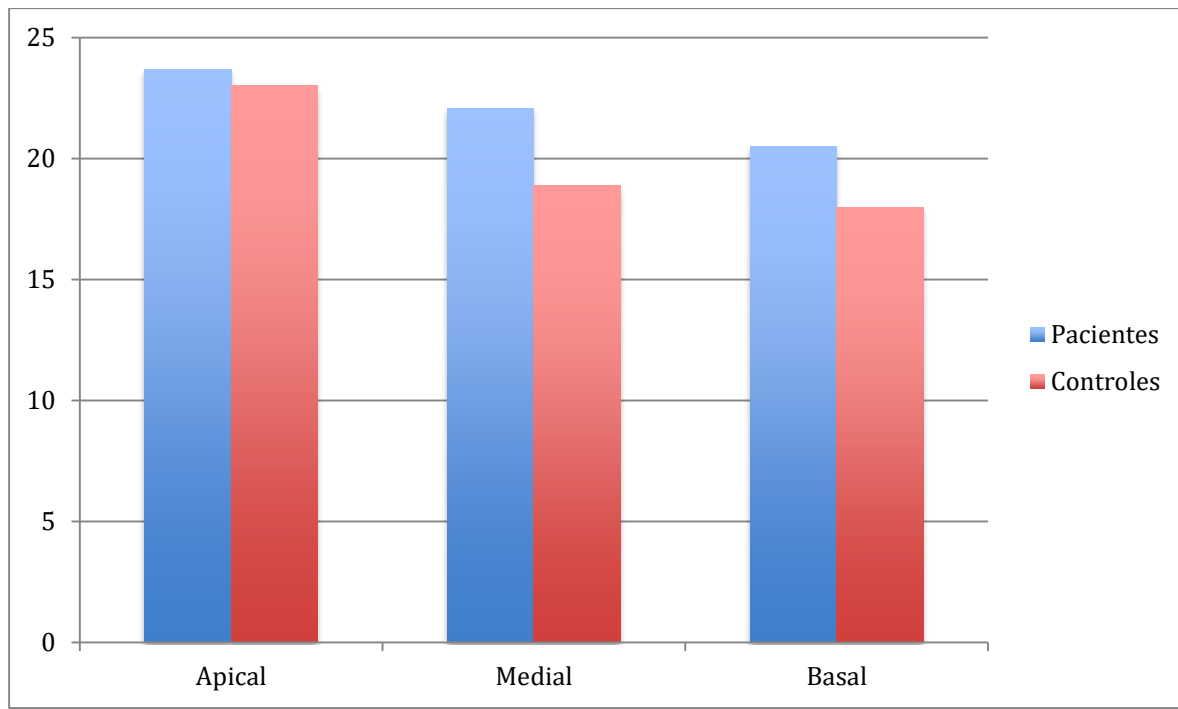
Los valores de la deformación longitudinal en las seis regiones del VI fueron ligeramente menores en los pacientes en comparación con los niños sanos, especialmente en las regiones medial y basal, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Gráfica 3).

Gráfica 3. Resultados del análisis de la deformación longitudinal de los seis segmentos del ventrículo izquierdo de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal.



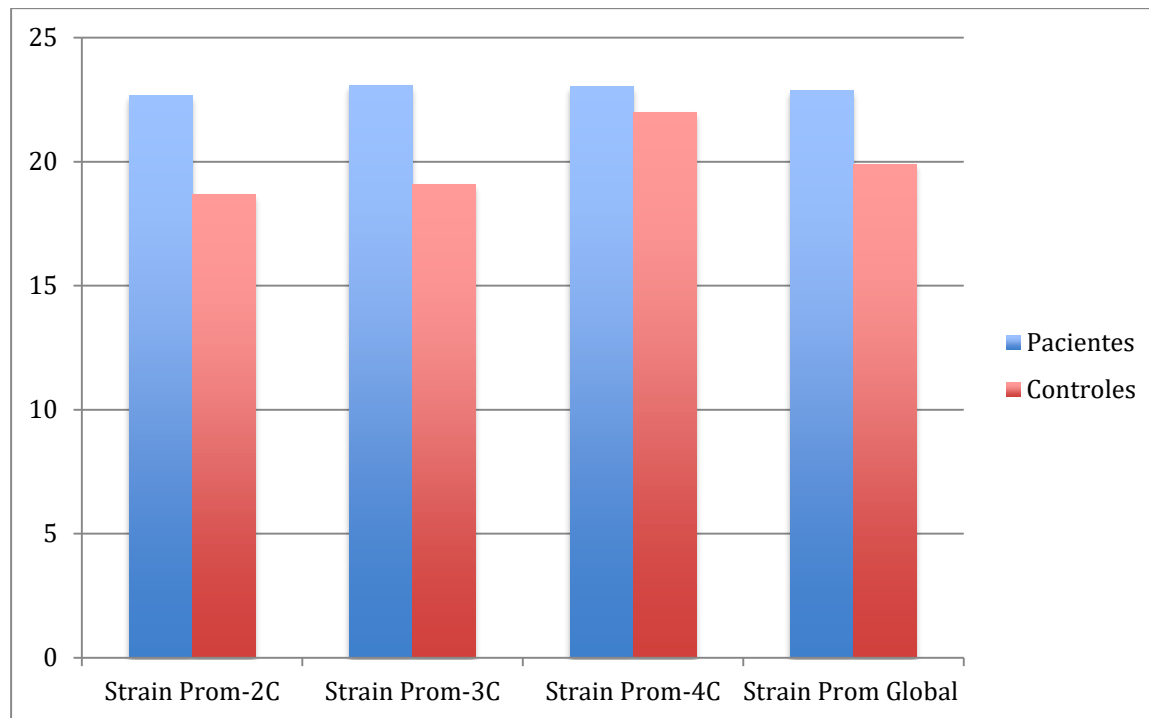
Los valores de la deformación longitudinal en los tres segmentos del VI fueron ligeramente menores en los pacientes en comparación con los niños sanos, especialmente en los segmentos inferior y basal, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Gráfica 4).

Gráfica 4. Resultados del análisis de la deformación longitudinal de las tres regiones del ventrículo izquierdo de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal.



Los valores promedios de la deformación longitudinal analizados por vistas ecocardiográficas (2C, 3C, 4C y global) fueron ligeramente menores en los pacientes en comparación con los niños sanos, especialmente en las vistas de 2C y 3C, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas (Gráfica 5).

Gráfica 5. Resultados del análisis de la deformación longitudinal del ventrículo izquierdo analizados por promedios de vistas ecocardiográficas de pacientes con corrección exitosa de CoAo y de niños sanos de la misma edad, sexo e índice de masa corporal.



Como lo muestra la tabla 3, los valores de la deformación longitudinal en los 17 segmentos del VI fueron ligeramente menores en los pacientes en comparación con los niños sanos, sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas.

Monitoreo continuo de la presión arterial ambulatoria de 24 horas

Cuatro de 32 pacientes (12.5%) mostraron HA durante el monitoreo ambulatorio de 24 horas a pesar de haber mostrado presión arterial normal al reposo en todas las determinaciones. Ninguno de estos cuatro pacientes tenía diagnóstico de hipertensión arterial ni habían recibido tratamiento farmacológico para hipertensión. Los cuatro pacientes tuvieron hipertensión arterial sistólica y uno de ellos, además tuvo hipertensión arterial diastólica y media (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencias en porcentajes de niveles de presión arterial ambulatoria elevada en 32 niños con corrección exitosa de CoAo.

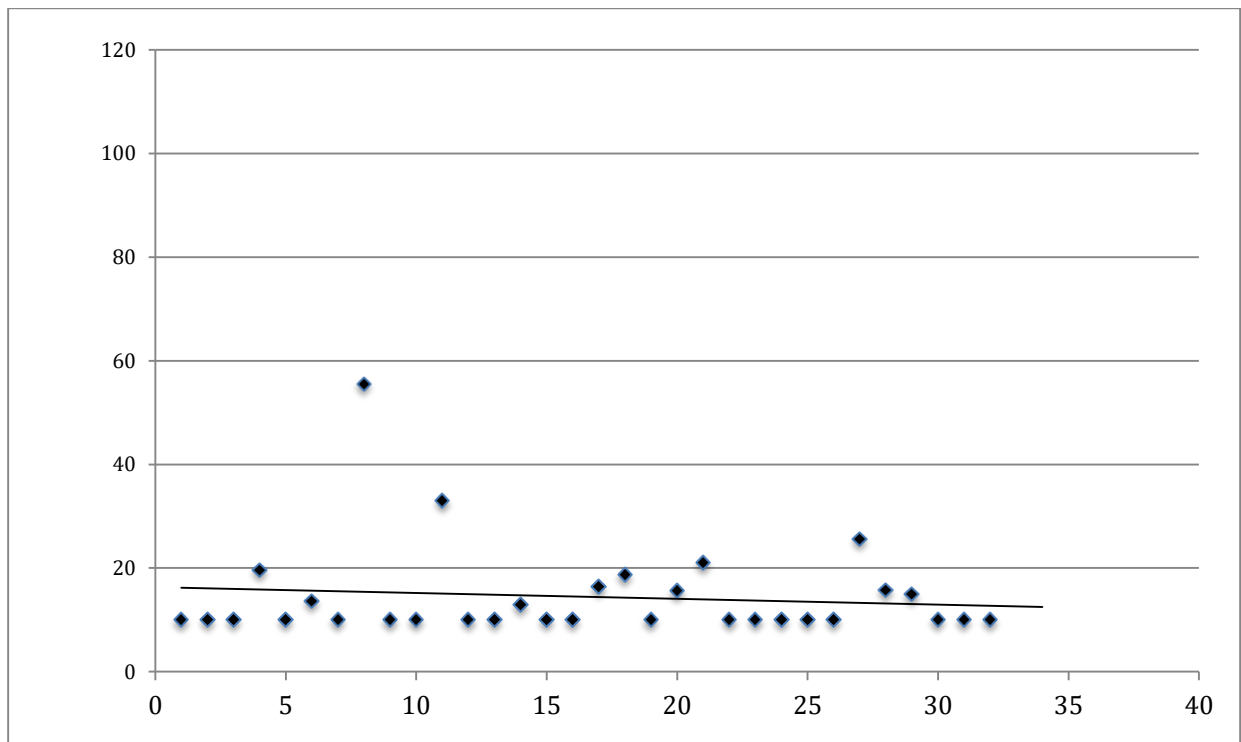
Parámetro medido	Número (porcentaje) de Pacientes con mediciones alteradas	% de Pacientes con mediciones normales
Promedio de presión arterial sistólica durante 24 hrs	4/12.5	28/87.5
Promedio de presión arterial diastólica durante 24 hrs	1/3	31/97
Promedio de presión arterial media durante 24 hrs	1/3	31/97
Promedio de presión arterial sistólica durante el día	4/12.5	28/87.5
Promedio de presión arterial diastólica durante el día	1/3	31/97
Promedio de presión arterial media durante el día	1/3	31/97
Promedio de presión arterial sistólica durante la noche	0/0	32/100
Promedio de presión arterial diastólica durante la noche	0/0	32/100
Promedio de presión arterial media durante la noche	0/0	32/100

Estos cuatro niños tuvieron valores de la deformación longitudinal del VI más bajos que el resto del grupo de niños postoperados con presión arterial ambulatoria normal, sin embargo debido al número reducido de pacientes hipertensos, no se puede establecer una diferencia estadísticamente significativa.

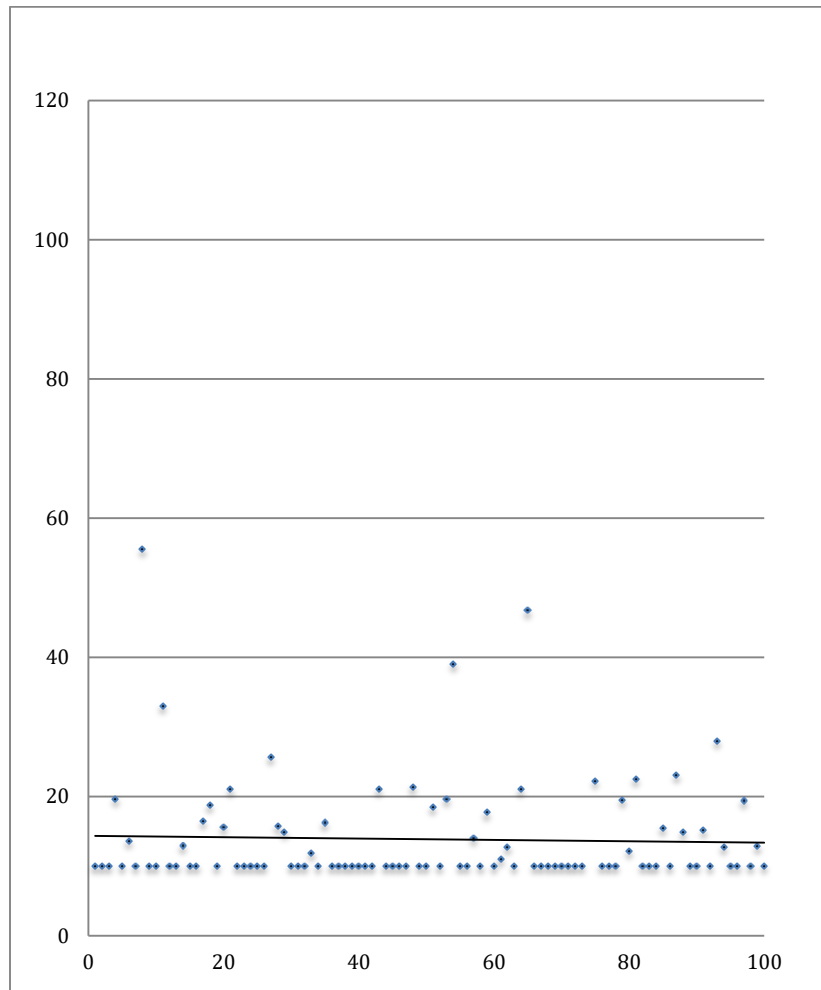
Determinación de los niveles séricos del péptido natriurético tipo B (NPPB)

Los valores de niveles séricos de NPPB de los 32 niños con antecedente de CoAo no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon con los valores encontrados en los 32 niños sanos. Los valores del NPPB en el grupo de pacientes fue de 10 a 58 mg/dl (12.79 ± 8.45) mientras que el grupo de niños sanos tuvo de 17 a 57 mg/dl (18.96 ± 8.99) ($p = <0.05$). Para este análisis realizamos la determinación de los niveles séricos de NPPB en 68 niños más para un total de 100 niños sanos; a pesar del incremento en el tamaño de la muestra, la comparación de los valores entre ambos grupos no mostraron diferencias significativas (Gráficas 1 y 2).

Gráfica 1. Niveles séricos del péptido natriurético tipo B (NPPB) en un grupo de niños con corrección exitosa de CoAo.



Gráfica 2. Niveles séricos del péptido natriurético tipo B (NPPB) en un grupo de niños y adolescentes sanos.



Los cuatro niños con hipertensión arterial en el monitoreo ambulatorio de 24 horas tuvieron valores del NPPB similares al resto de niños de ambos grupos.

Análisis de la secuencia del gen *NPPB*

El análisis en la secuencia del gen *NPPB* mostró una variación en 2 pacientes (3.1%) y 5 controles (5%). La variación consiste en el cambio heterocigoto de adenina (A) por guanina (G) en la posición 11,918 320, aminoácido 62 donde cambia el codón CAA por CAG. El aminoácido de residuo esperado es glicina (Gln); la variación a CAG no modifica el aminoácido de residuo. Esta variación no ha sido previamente reportada y podría corresponder con un polimorfismo raro en la población mexicana. (Figuras 16-20).

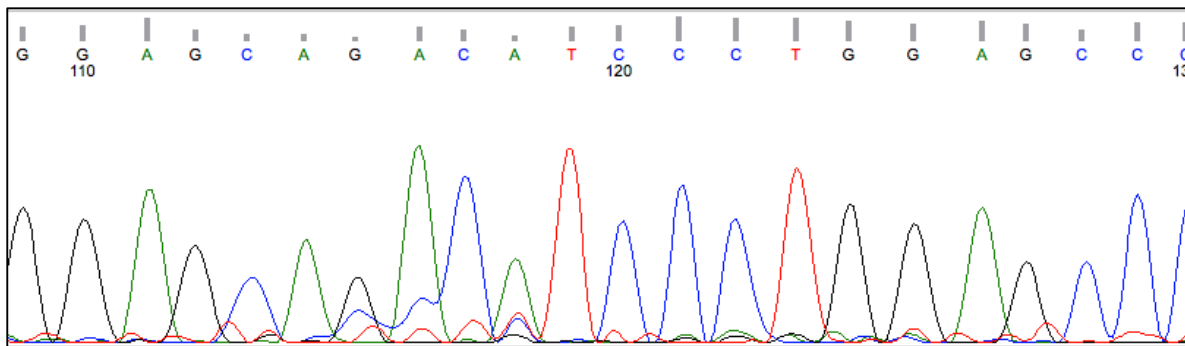


Figura 16. Secuenciación directa del exón 2 del gen *NPPB* de uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo. La figura muestra un fragmento del electroferograma de la secuenciación directa del exón 2 del paciente 16, con un “doble pico” en la posición 11, 918 320 que puede ser explicada por un cambio heterocigoto del codón CAG por CAC, no previamente reportado.

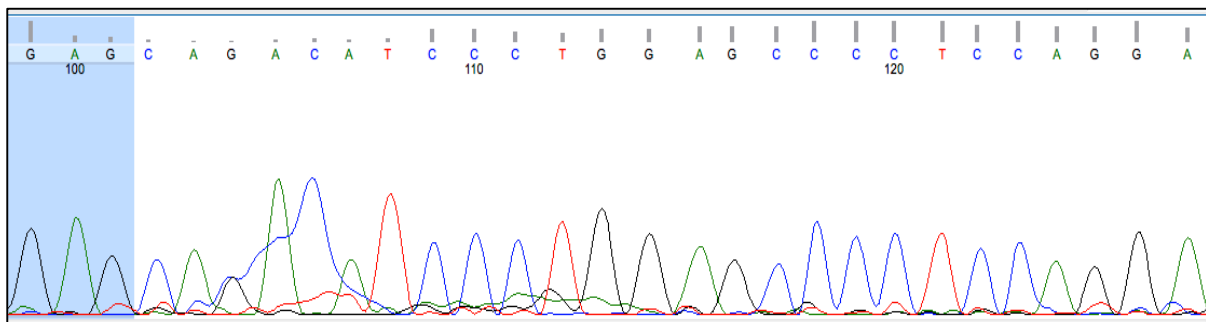


Figura 17. Secuenciación directa del exón 3 del gen *NPPB* de uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo. La figura muestra un fragmento del electroferograma de la secuenciación directa del exón 3 del paciente 19, con un “doble pico” en dos de las bases en la posición XXX que puede ser explicada por un cambio heterocigoto del codón GAC por CCC, no reportado hasta la fecha.

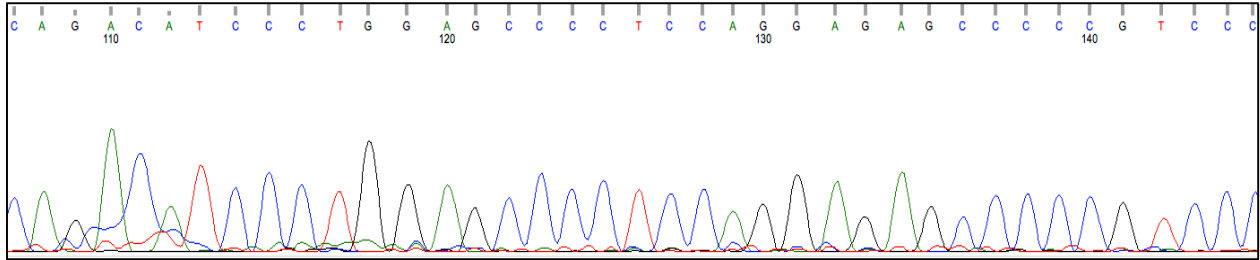


Figura 18. Secuenciación directa del exón 2 del gen *NPPB* de uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo. La figura muestra un fragmento del electroferograma de la secuenciación directa del exón 2 del paciente 29, con un “doble pico” en dos de las bases en la posición 281 y 282 que puede ser explicada por un cambio heterocigoto de los codones CAG y ACA por CAC y ACA respectivamente, no reportado previamente.

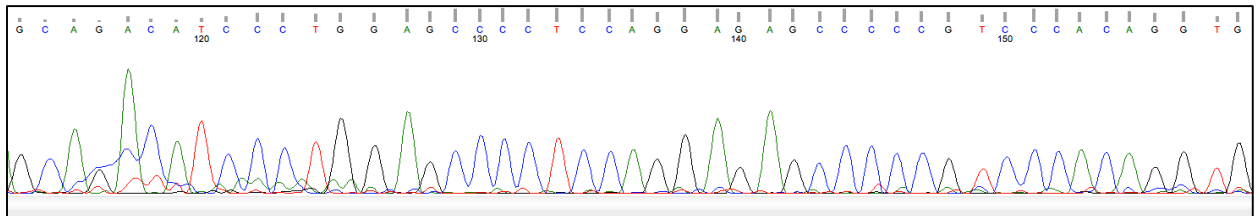


Figura 19. Secuenciación directa del exón 2 del gen *NPPB* de uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo. La figura muestra un fragmento del electroferograma de la secuenciación directa del exón 2 del control 43, con un “doble pico” en dos de las bases en la posición 281 y 282 que puede ser explicada por un cambio heterocigoto de los codones CAG y ACA por CAC y ACA respectivamente, no reportado previamente.

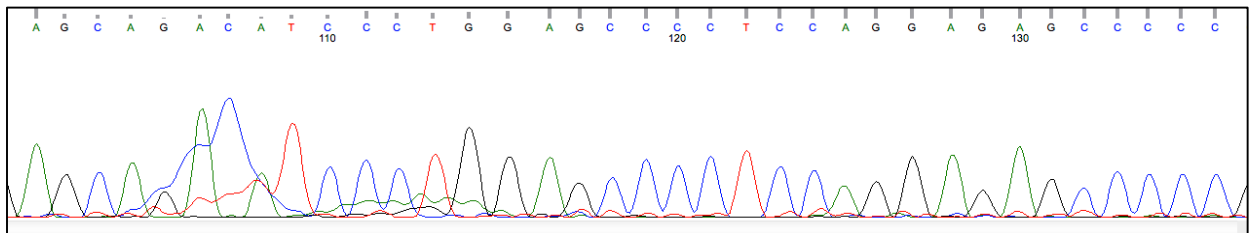


Figura 20. Secuenciación directa del exón 3 del gen *NPPB* de uno de los pacientes con corrección exitosa de CoAo. La figura muestra un fragmento del electroferograma de la secuenciación directa del exón 2 del control 47, con un “doble pico” en dos de las bases en la posición 281 y 282 que puede ser explicada por un cambio heterocigoto de los codones CAG y ACA por CAC y ACA respectivamente, no reportado previamente.

Las figuras 21-26 muestran ejemplos del análisis de alineamiento de las secuencias del gen de los pacientes y controles en relación a la secuencia reportada para el gen utilizando el programa CLC Genomics Workbench 6.5.1.

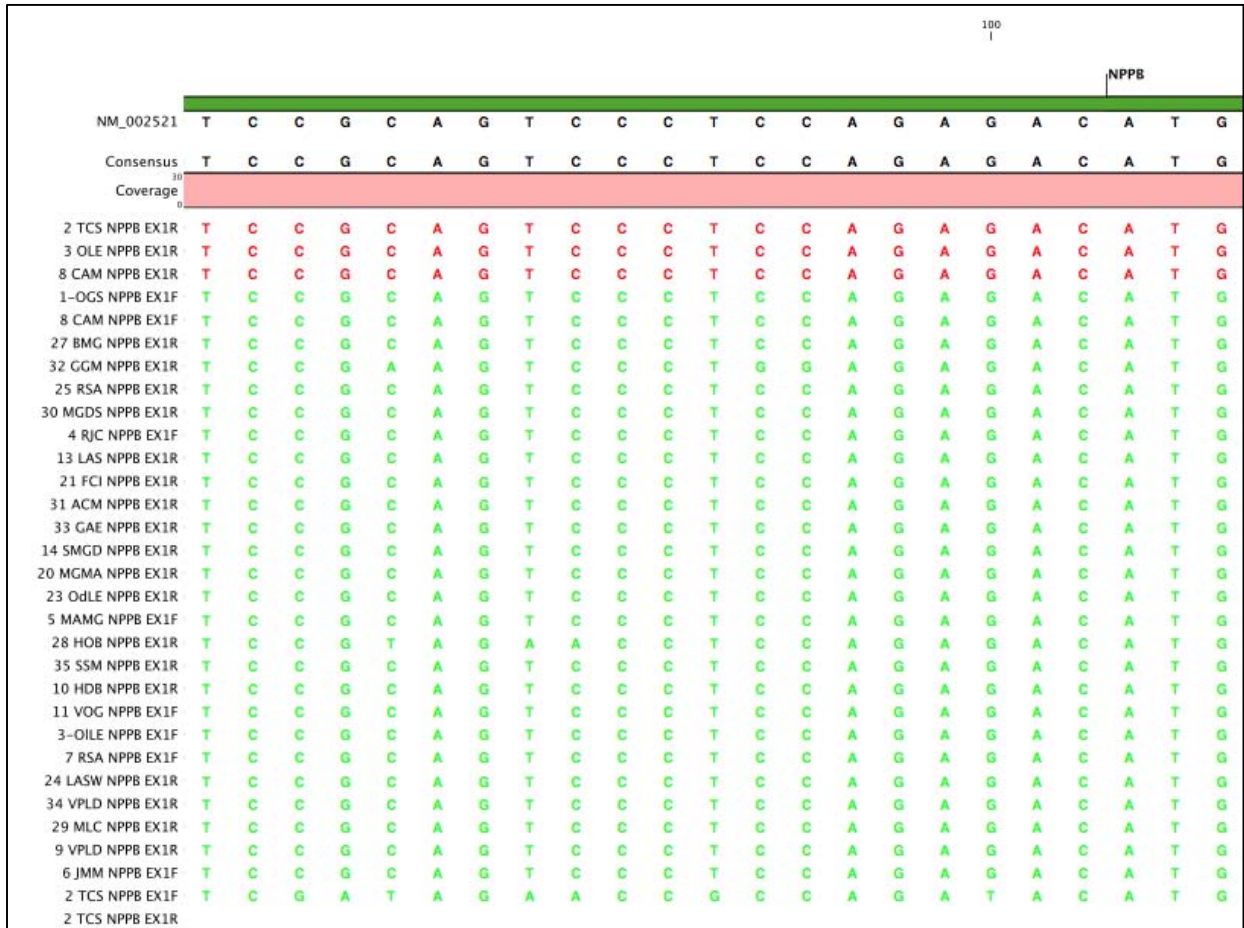


Figura 21. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa CLC Genomics Workbench 6.5.1. Se muestra una vista panorámica del alineamiento de las secuencias del exón 1 del gen *NPPB* en las dos direcciones 5' y 3' (forward y reverse) de un grupo de pacientes con corrección exitosa de CoAo comparando con la secuencia consenso del gen *NPPB* publicada en la página de NCBI <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB> (GI:167882799). La figura muestra ninguna diferencia entre la secuencia de los pacientes y la secuencia consenso.

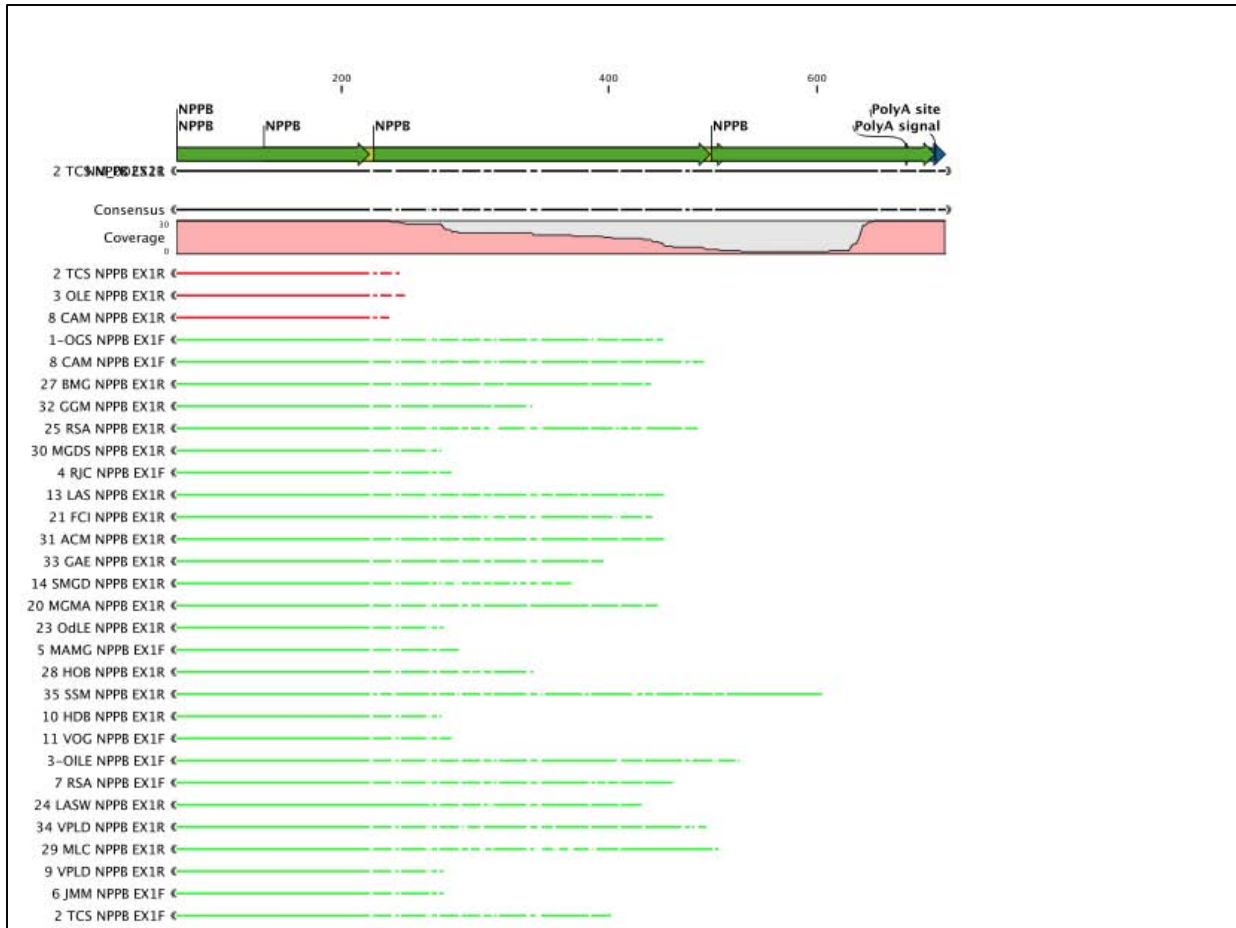


Figura 22. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench* 6.5.1. Se muestra una vista con acercamiento del alineamiento de las secuencias del exón 1 del gen *NPPB* en las dos direcciones 5' y 3' (forward y reverse) de un grupo de pacientes con corrección exitosa de CoAo comparando con la secuencia consenso del gen *NPPB* publicada en la página de NCBI <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB> (GI: 167882799). La figura muestra ninguna diferencia entre la secuencia de los pacientes y la secuencia consenso.

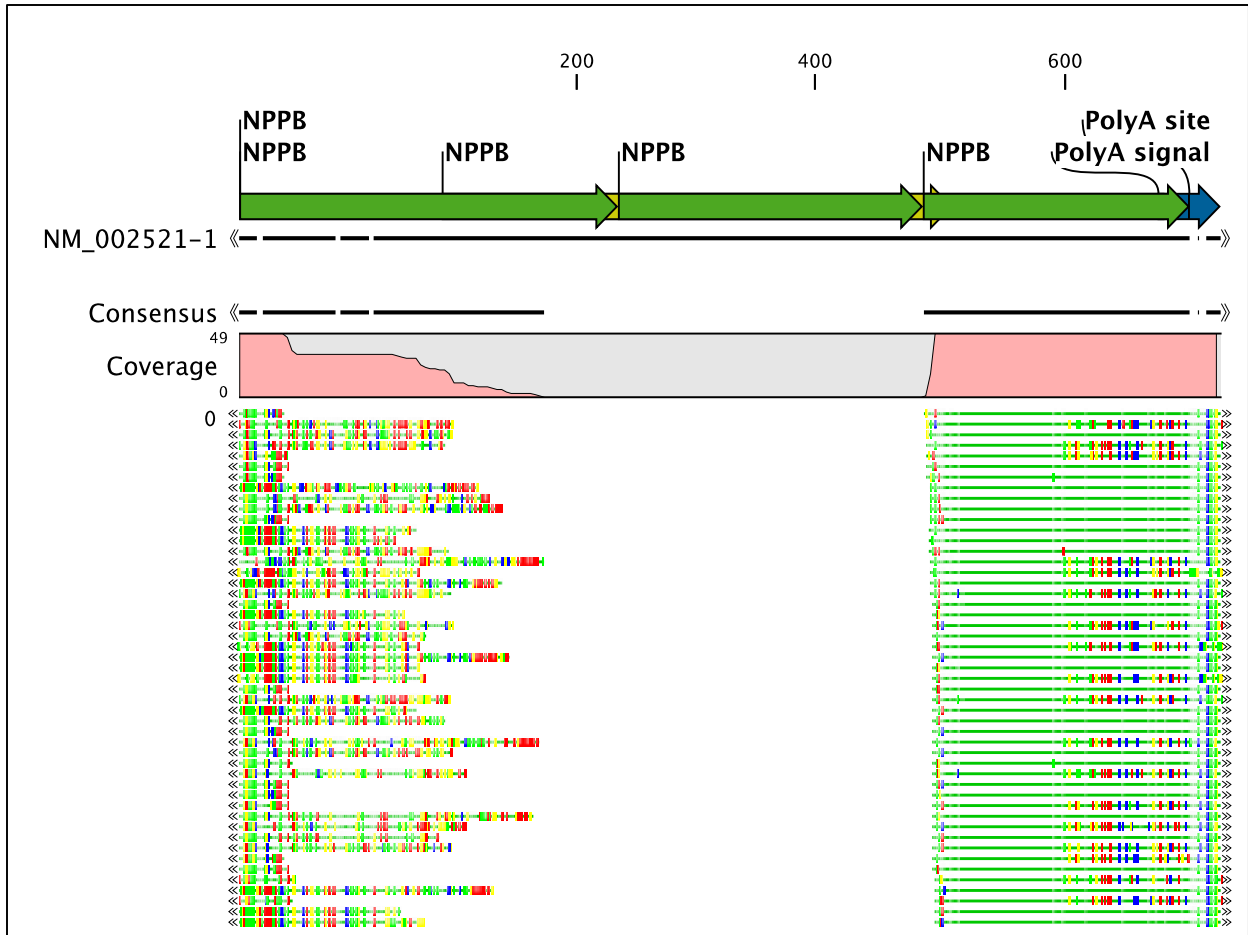


Figura 23. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*. Se muestra una vista panorámica del alineamiento de las secuencias del exón 3 en las dos direcciones 5' y 3' (forward y reverse) de un grupo de pacientes con corrección exitosa de CoAo comparando con la secuencia consenso del gen *NPPB* publicada en la página de NCBI <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB> (GI:167882799). La figura muestra ninguna diferencia entre la secuencia de los pacientes y la secuencia consenso.

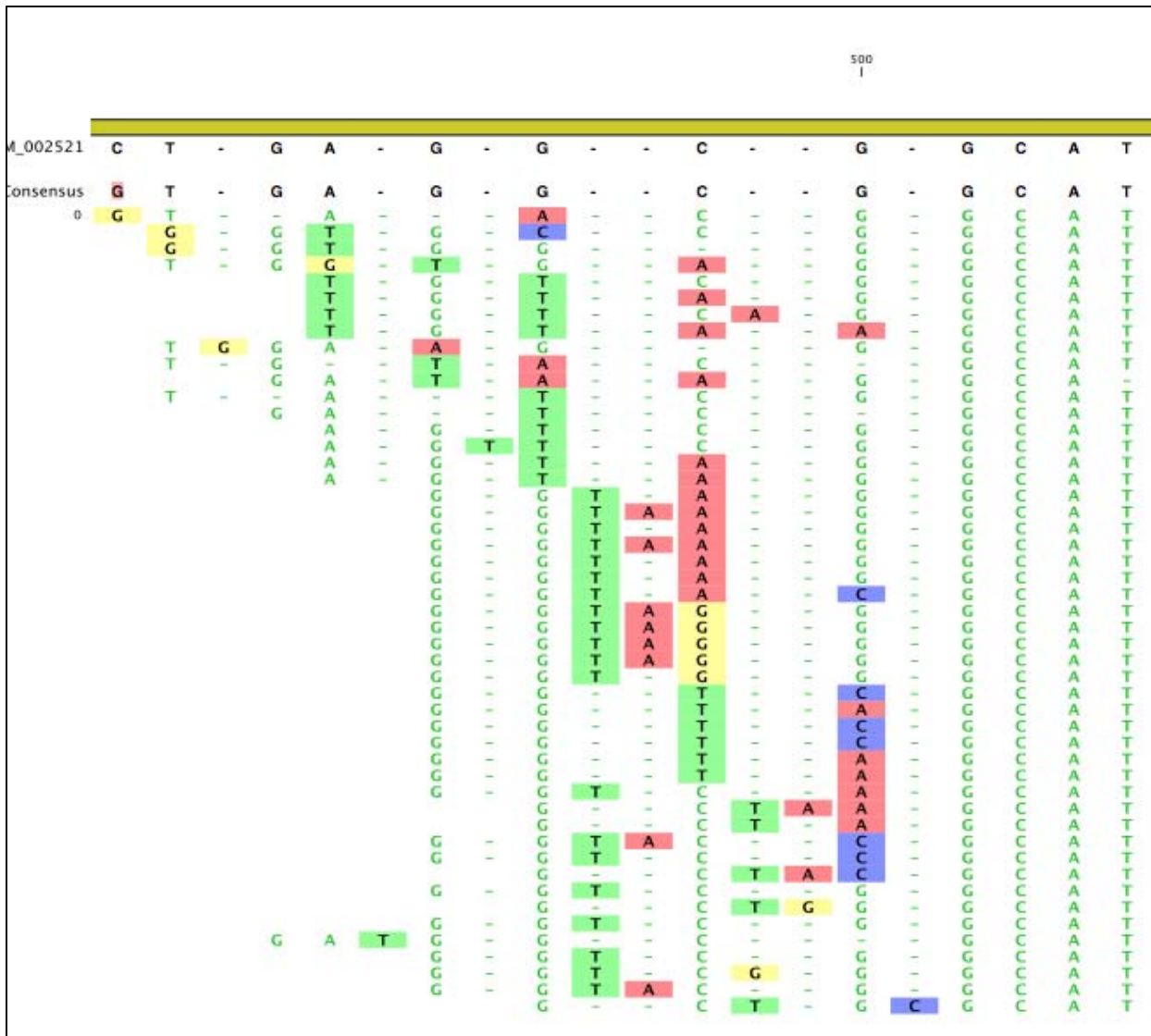


Figura 24. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench* 6.5.1. Se muestra una vista con acercamiento del alineamiento de las secuencias del exón 2 en las dos direcciones 5' y 3' (forward y reverse) de un grupo de pacientes con corrección de CoAo comparando con la secuencia consenso del gen *NPPB* publicada en la página de NCBI [http:// www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB) (GI: 167882799). La figura muestra el inicio de la secuencia delimitada por el cebador o "primer".

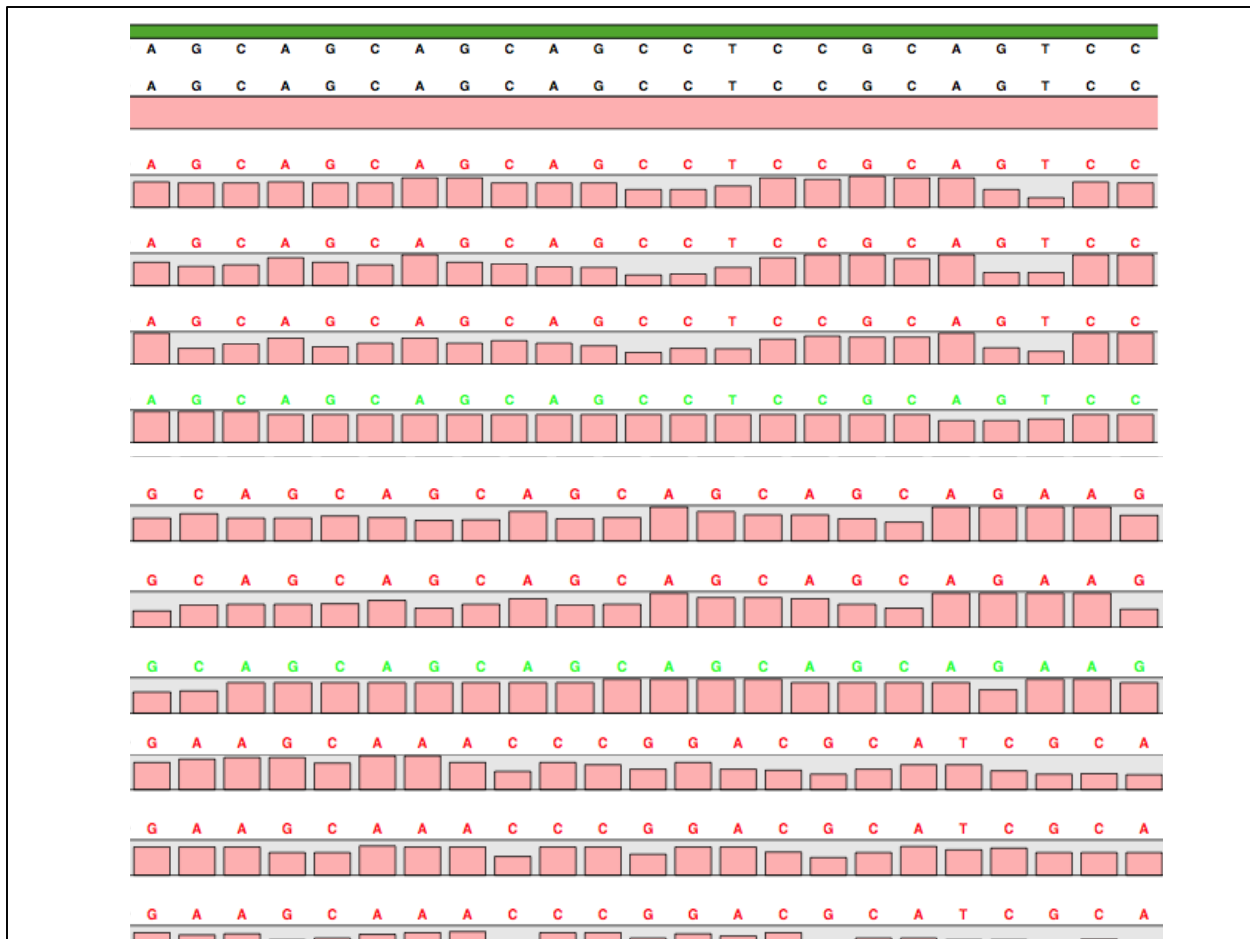


Figura 26. Análisis de las secuencias por alineamiento con el programa *CLC Genomics Workbench 6.5.1*. Se muestra una vista de análisis de calidad y amplitud de los electroferogramas de un grupo de pacientes con corrección de CoAo comparando con la secuencia consenso del gen *NPPB* publicada en la página de NCBI [http:// www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NPPB) (GI: 167882799). La figura muestra buena calidad y amplitud de los electroferogramas, sin diferencias entre la secuencia de los pacientes y la secuencia consenso.

Asociación entre los resultados del análisis de la secuencia del gen *NPPB* con los hallazgos del ventrículo izquierdo, de la presión arterial y de los valores de *NPPB*

No existió correlación entre la presencia o no de variaciones en la secuencia del gen de los pacientes con los niveles de presión arterial sistémica, con los valores séricos del *NPPB* o con el grado de deformación longitudinal del VI.

Uno de los 3 pacientes con la variación en la secuencia del gen tuvo la presión sistólica incrementada, pero los otros dos pacientes tuvieron presión arterial sistólica, diastólica y media dentro de los parámetros normales para la edad y la superficie corporal.

Los niveles séricos de *NPPB* y la deformación global del VI de los tres pacientes se encontraron dentro de parámetros normales.

14. Discusión

polimorfismo La variación encontrada en el gen *NPPB* no ha sido previamente reportada. A pesar de que la frecuencia de la variante es mayor en el grupo de niños con antecedente de CoAo y pese a que la variación afecta el aminoácido de residuo, al tratarse de una variante heterocigota, esta no guarda relación con la presencia de la enfermedad o con las anomalías cardiovasculares persistentes.

La evolución a largo plazo de los pacientes con antecedente de corrección quirúrgica de CoAo tiene un espectro clínico muy amplio, desde adultos sanos sin secuelas hasta la muerte súbita temprana secundaria a anomalías cardiovasculares persistentes. Varios factores se han asociado a una mala evolución. Se ha postulado que se trata de una enfermedad sistémica caracterizada por una función endotelial y vascular alterada, que aunada a patrones anormales de remodelación del músculo cardíaco condiciona la

afección cardiovascular, a pesar de la corrección exitosa de la obstrucción mecánica. Sin embargo, esta teoría no ha sido completamente probada y en muchos casos, dichas anomalías residuales no están presentes. Es probable que factores genéticos puedan estar involucrados en la evolución de la enfermedad. Hasta ahora algunos genes han sido asociados a jugar algún papel en la remodelación del VI como NYH, PPAR γ , TIM-4, TLR-4, CarMA y VDR pero hasta ahora ninguno se ha estudiado en el contexto de la CoAo. Para sugerir que un gen específico se asocie a alteraciones cardiovasculares persistentes en este grupo de pacientes se deberán encontrar una o más mutaciones en un grupo de pacientes con alteraciones habiendo eliminado previamente todos los posibles factores de riesgo asociados y demostrar que las mutaciones están ausentes en los pacientes portadores de la enfermedad sin secuelas así como en la población general. Más aún se debería probar la afección funcional de la proteína por la mutación y mostrar como la proteína disfuncional condiciona las anomalías cardiovasculares en el modelo animal.

Dado que se han observado niveles elevados del péptido NPPB en pacientes con HA y enfermedad cardiovascular además de que mutaciones en el gen *NPPB* se han asociado a disfunción ventricular diastólica, hipertrofia ventricular e HA, todas estas características comunes en pacientes con mala evolución después de la corrección de CoAo, propusimos al gen *NPPB* como candidato a causar anomalías cardiovasculares persistentes en niños con corrección exitosa de CoAo. Debido a que en el estudio previo encontramos disfunción ventricular en cerca de la mitad de los casos a pesar de una corrección exitosa, para este estudio planteamos la hipótesis de que mutaciones en el gen podían afectar la función de la proteína NPPB dando lugar a HA, niveles elevados de NPPB y disfunción del VI en el 50% de los casos de corrección exitosa de CoAo. Para

la inclusión de los pacientes al estudio hemos realizado, de manera exhaustiva, varios exámenes en la búsqueda de todos los factores de riesgo asociados a HA y disfunción ventricular. La geometría alterada del arco aórtico, secundaria a una remodelación anormal, ha mostrado generar flujos de alta presión en sitios específicos de la aorta y asociarse a la aparición de HA, por lo que utilizamos la RMC para analizar la geometría del arco aórtico y excluimos los casos con una geometría anormal. Excluimos también a los niños y jóvenes con sobrepeso y obesidad, ya que estudios recientes han mostrado que la obesidad en niños después de la coartectomía exitosa, tiene un efecto adicional negativo en la presión arterial, en la masa ventricular y en la función cardíaca.

Consistentes con nuestra hipótesis realizamos la secuenciación directa de los exones del gen *NPPB*, sin embargo, el análisis de la secuencia del gen *NPPB* solo mostró un polimorfismo raro en 2 de los 32 pacientes mismo que se repitió en 5 de 100 niños sanos. Por lo que las características cardiovasculares analizadas en este grupo de pacientes parecen no estar asociadas con dicho gen *NPPB*.

Este estudio brinda información relevante. Utilizando un método ecocardiográfico de más reciente introducción y más sensible para identificar anomalías miocárdicas sutiles, no hemos sido capaces de encontrar diferencias en la función del VI de estos pacientes comparándolos con un grupo control de niños sanos. La ocurrencia de disfunción del VI en pacientes después de la corrección de CoAo se ha estudiado ampliamente en el pasado, sin embargo, hasta donde tenemos conocimiento, el trabajo actual es el primero que analiza la función ventricular izquierda, con el análisis de la deformación longitudinal mediante el rastreo de señales endocárdicas después de un largo tiempo de la corrección de CoAo una vez que se ha excluido al grupo de pacientes con uno o más factores de riesgo para el desarrollo de hipertrofia miocárdica y disfunción ventricular. Es

probable que los resultados de estudios que mostraron anomalías miocárdicas en la función ventricular, incluido el nuestro, incurrieran en sesgo al no haber considerado otros aspectos posiblemente involucrados. El hecho de que los niveles séricos del péptido NPPB de este grupo de pacientes no difieren de un grupo control de 100 niños y jóvenes sanos es congruente con los hallazgos ecocardiográficos. Ya que el péptido NPPB es secretado por los miocitos cardiacos en respuesta a la sobre carga de presión y/o volumen ventricular.

Cuatro de 32 niños tuvieron al menos un pico hipertensivo durante el monitoreo ambulatorio de la presión arterial de 24 horas, pero los niveles séricos de NPPB ni los valores de la deformidad longitudinal del VI son diferentes en los niños con presión arterial ambulatoria normal en relación a este subgrupo de pacientes. De todos modos este 12.5% de un grupo muy selecto de pacientes pudiera corresponder con una proporción del grupo de pacientes que en el seguimiento a largo plazo presentan complicaciones cardiovasculares graves.

Un aspecto a considerar es que los estudios que sugirieron que la CoAo es una enfermedad sistémica y generalizada del sistema cardiovascular, más que la simple obstrucción mecánica de la aorta están basados en el análisis de pacientes operados en el pasado cuando el diagnóstico de las CC solía hacerse de manera tardía y la cirugía se realizaba en niños mayores, empleando técnicas quirúrgicas menos resolutivas tal como lo soporta el hecho de que en la actualidad la anastomosis ampliada para el tratamiento de la CoAo, asociada a cierto grado de hipoplasia del arco aórtico, se utiliza con mayor frecuencia. Además, en el análisis de estos estudios previos no se han excluido factores que pudieran explicar al menos en parte las alteraciones encontradas. Es posible que las anomalías tanto en la función del VI como otras en el sistema

cardiovascular que predisponen a estos pacientes a complicaciones graves se deban en gran medida a la presencia de otros factores como obstrucción residual, HA, obesidad, anomalías en el arco aórtico y corrección tardía más que a la propia enfermedad. Es probable que factores genéticos puedan participar en la evolución clínica a largo plazo de pacientes después de la corrección exitosa de CoAo, pero el gen *NPPB* no parece tener una participación importante. Se requieren más estudios que incluyan a un número mayor de pacientes y que analicen la participación de otros genes candidatos utilizando las técnicas moleculares de última generación.

15. Conclusiones

Una vez eliminados los factores conocidos de riesgo cardiovascular en un grupo pequeño de niños con antecedente de corrección exitosa de CoAo realizada en edades tempranas no hemos encontrado diferencias en la función del VI evaluada por el análisis de la deformación longitudinal mediante el rastreo de señales miocárdicas. En los niños con antecedente de CoAo sin gradiente residual y sin otros factores de riesgo, los niveles séricos de *NPPB* son similares a los encontrados en niños sanos a la misma edad. Buscando de manera intencionada, la frecuencia de HA en niños con corrección exitosa y sin otras anomalías cardiovasculares no es baja como se desearía; este 12.5% puede corresponder con una proporción del grupo de pacientes que evolucionan mal en el tiempo y que se presentan con complicaciones cardiovasculares graves en el seguimiento tardío. Ya que no encontramos mutaciones en *NPPB* en este grupo de pacientes, podemos sugerir que el gen *NPPB* no participa de manera importante en la génesis de la enfermedad por CoAo ni en las complicaciones cardiovasculares persistentes después de la corrección exitosa.

16. Limitaciones del estudio

Incluir al subgrupo de pacientes con hipertensión durante el reposo podría eliminar el posible sesgo de inclusión ya que existe la posibilidad de que las anomalías cardiovasculares incluídas los niveles séricos de NPPB y la disfunción del VI estén confinadas a estos pacientes.

17. Referencias bibliográficas

1. Samanek M. Congenital heart malformations: prevalence, severity, survival and quality of life. *Cardiol Young* 2000;10:179-185.
2. Mitchell SC, Korones SB, Berrendees HW. Congenital heart disease in 56,109 births. Incident and natural history. *Circulation* 1971;43:323-332.
3. Fyler DC. Report of the New England regional infant cardiac program. *Pediatrics* 1980; 65:suppl:S376-S461.
4. Martínez OP, Romero C, Alzina AV. Incidencia de las cardiopatías congénitas en Navarra (1989-1998). *Rev Esp Cardiol* 2005;58(12):1428-1434.
5. Venegas C, Peña AY, Lozano R, et al. Mortalidad por defectos al nacimiento. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2005 62:294-304.
6. Dirección General de Información en Salud, Secretaria de Salud. Estadísticas vitales en niños y adolescentes mexicanos. Mortalidad infantil. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2004;61:515-527.
7. The 19th meeting of European Network of Teratology Information Services [homepage on the internet]. Edinburgh, Scotland; 2008. en: <http://www.entis-org.com>
1. Toro-Salazar OH, Steinberg J, Thomas W, Rocchini AP, Carpenter B, Moller JH. Long term follow-up of patients after coarctation of the aorta repair. *Am J Cardiol* 2002;89:541-7.
2. Cohen M, Fuster V, Steele PM, Driscoll D and McGoon DC. Coarctation of the aorta: long-term follow-up and prediction of outcome after surgical correction. *Circulation* 1989;80:840-5.

3. Clarkson PM, Nicholson MR, Barratt-Boyes BG, Neutze JM, Whitlock RM. Results after repair of coarctation of the aorta beyond infancy: a 10 to 28 years follow-up with particular reference to late systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1983;81:1541-8. □
4. Meyer AA, Joharchi MS, Kundt G, Shuff-Werner P, Steinhoff G, Kienast W. Predicting the risk of early atherosclerotic disease development in children after repair of aortic coarctation. *Eur Heart J*. 2005;26:617-22.
5. Vogt M, Kühn A, Baumgartner D, Baumgartner C, Bush Raymundo, Kostolny M, et al. Impaired elastic properties of the ascending aorta in newborns before and early after successful coarctation repair. Proof of a systemic vascular disease of the prestenotic arteries? *Circulation* 2005;111:3269-73.
6. Kim GB, Kang SJ, Bae EJ, Yun YS, Noh ChL, Lee JR, et al. Elastic properties of the ascending aorta in young children after successful coarctoplasty in infancy. *Int J of Cardiol* 2004;97:471-7. □
7. Iso T, Arai M, Wada A, Kogure K, Suzuki T, Nagai R. Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol* 1997;273:H113-8.
8. Jonson D, Parrault H, Vobecky SJ, Trudeau F, Delvin E, Fournier A, et al. Resetting of the cardiopulmonary baroreflex 10 years after surgical repair of the coarctation of the aorta. *Heart* 2002;85:318-25. □
9. Balderrábano-Saucedo NA, Vizcaíno-Alarcón A, Reyes de la Cruz L, Espinosa-Islas G, Arévalo-Salas A, Segura-Stanford B. Función ventricular izquierda en niños después de

la reparación aórtica de coartación aórtica. *Rev Esp Cardiol*. 2008; 61(11):1126-33.

10. Crepaz R, Cemin R, Romeo C, Bonsante E, Gentili L, Trevisan D, et al. Factors affecting left ventricular remodelling and mechanics in the long-term follow-up after successful repair of aortic coarctation. *Cardiol Young*. 2005;15:160-7. □

11. Pacileo G, Pisacane C, Russo MG, Crepaz R, Sarubbi B, Tagliamonte E, et al. Left ventricular remodeling and mechanics after successful repair of aortic coarctation. *Am J Cardiol* 2001;87:748-52.

12. Carpenter MA, Dammann JF, Watson DD, Jedeikin R, Tompkins DG, Beller GA. Left ventricular hyperkinesia at rest and during exercise in normotensive patients 2 to 27 years after coarctation repair. *J Am Coll Cardiol* 1985;6:879-86. □

13. Kimball TR, Reynolds JM, Mays WA, Khoury P, Claytor RP, Daniels SR. Persistent hyperdynamic cardiovascular state at rest and during exercise in children after successful repair of coarctation of the aorta. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:194-200.

14. Aoyagi T, Fujii AM, Flanagan MF, Arnold LW, Brathwaite KW, Colan SD, et al. Transition for compensated hypertrophy to intrinsic myocardial dysfunction during development of left ventricular pressure overload-hypertrophy in conscious sheep. Systolic dysfunction precedes diastolic dysfunction. *Circulation* 1993; 88:2415-25.

15. Mirsky I, Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. The contractile state as a major determinant in the evolution of left ventricular dysfunction in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res* 1983; 53:767-78. □

16. De Simone G, Devereux RB, Celentano A, Roman MJ. Left ventricular chamber and wall mechanics in the presence of concentric geometry. *J. Hypertens* 1999;17:1001-6.
17. De Wolf D, Fourbert L, Suys B, Verhaaren H, Matthys D, Skuysmans T, et al. The midwall stress velocity relationship during manipulation of afterload. *Pediatr Cardiol* 2003;24:263-9. □
18. Gentles TL, Cowan BR, Occleshaw CJ, Colan SD, Young AA. Midwall shortening alter coarctation repair: the effect of through-plan motion on single-plane indices of left ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr* 2005;18:1131-6.
19. Di Salvo G, Pacileo G, Limongelli G, Verrengia M, Rea A, Santoro G, et al. Abnormal regional myocardial deformation properties and increased aortic stiffness in normotensive patients with aortic coarctation despite succesful correction: an ABPM, standard echocardiography and strain rate imaging study. *Clin Science* 2007;113:259-66.
20. Al-Naami GH. Torsion of young hearts: a speckle tracking study of normal infants, children, and adolescents. *Eur J Echocardiogr*. 2010 Jun 30. □
21. Levin FR, Gardner DG, Willis K. 1998. Mechanisms of disease: Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 339:321-328. □
22. Briguori C, Betocchi S, Manganelli F, Gigante B, Losi MA, Ciampi Q, Gotilla R, Violante A, Tocchetti CG, Volpe M, Chiariello M. 2001. Determinants and clinical signifance of natriuretic peptides and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 22:1328- 1336.
23. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, Kasahara M, Hashimoto r, Katsuura G, Mukoyama M, Ith H, Saito Y, Tanaka I, Otani H, Katsuki M. 2000.

Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci US* 97:4239-4244.

24. Cantinotti M, Clerico A, Murzi M, Vittorini S, Emdin M. Clinical relevance of measurement of brain natriuretic peptide and N-terminal pro-brain natriuretic peptide in pediatric cardiology. *Clinica Chimica Acta* 2008; 390: 12–22.□

25. Conen D, Glynn RJ, Buring JE, Ridker PM, Zee RY. Natriuretic peptide precursor a gene polymorphisms and risk of blood pressure progression and incident hypertension. *Hypertension* 2007; 50:1114–1119.

26. Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Salvi F, Serenelli M, Spagnolo D, Cola G, Pupita M, Giantomassi L, Rappelli A. A novel promoter variant of the natriuretic peptide clearance receptor gene is associated with lower atrial natriuretic peptide and higher blood pressure in obese hypertensives. *J Hypertens* 1999;17:1301–1305.

27. Pitzalis MV, Sarzani R, Dessi-Fulgheri P, Iacoviello M, Forleo C, Lucarelli K, Pietrucci F, Salvi F, Sorrentino S, Romito R, Guida P, Rappelli A, Rizzon P. Allelic variants of natriuretic peptide receptor genes are associated with family history of hypertension and cardiovascular phenotype. *J Hypertens* 2003;21:1491–1496.

28. Rubattu S, Ridker P, Stampfer MJ, Volpe M, Hennekens CH, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation* 1999;100:1722–1726.□

29. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, Zanda B, Evangelista A, Tarasi D, Gigante B, Pirisi A, Brunetti E, Volpe M. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of

ischemic stroke in humans. *Stroke* 2004;35:814–818.

30. Gruchala M, Ciecwierz D, Wasag B, Targonski R, Dubaniewicz W, Nowak A, Sobiczewski W, Ochman K, Romanowski P, Limon J, Rynkiewicz A. Association of the Scal atrial natriuretic peptide gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction and extent of coronary artery disease. *Am Heart J* 2003;145:125–131.

31. Fox A., Collard CH., Shernan S., Seidman C., Seidman J., Yu Liu K., Muehlschlegel J., Perry T., Aranki S., Lange C., Herman D., Meitinger T., Lichtner P., Body S. Natriuretic peptide system gene variants are associated with ventricular dysfunction after coronary artery bypass grafting. *Anesthesiology*. 2009 April ; 110(4): 738–747.

IV. ANEXO

Artículos publicados en revistas indexadas y arbitradas

1. Función ventricular izquierda en niños después de la corrección exitosa de coartación aórtica.

i. Citas al artículo

1. Vedide Tavli, Turkey Saritas, Baris Guven, Faik Okur, Berna Cevik Saylan, Talat Tavli, Bekir Sami Uyanik, Zeki Ari and Banu Isbilen (2010). **Myocardial performance after successful intervention for native aortic coarctation.** Cardiology in the Young, 20, pp 33-38.

<http://dx.doi.org/10.1017/S1047951109991259>

2. Liselotte M. Klitsie, Arno A.W. Roest, Irene M. Kuipers, Annelies E. Van der Hulst, Mark G. Hazekamp, Nico A. Blom, Arend D.J. Ten Harkel (2013). **Enhanced characterization of ventricular performance after coarctation repair in neonates and Young Children.** The Annals of Thoracic Surgery. 2013, 96; 2, pp 629-636.

[http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975\(13\)00878-3/abstract](http://www.annalsthoracicsurgery.org/article/S0003-4975(13)00878-3/abstract)

3. Liselotte M. Klitsie (2014). **Tissue Doppler and speckle tracking strain echocardiography, from evaluation in healthy Children to follow-up after surgery for congenital heart defect.**

<https://openaccess.leidenuniv.nl/bitstream/handle/1887/22985/Front.pdf?sequence=6>

4. J. Calderón-Colmenero, F Attie. **Aortic coarctation. Important considerations in long-term follow-up after correction.** Rev Esp Cardiol 2008;61(11):117-9.

<http://www.revespcardiol.org/en/coartacion-aortica-aspectos-importantes-evolucion/articulo/13128925/>

5. J Calderón-Colmenero, F Attie. **Coartación aórtica. Aspectos importantes en la evolución tardía después de la corrección.** Rev Esp Cardiol 2008;61(11):117-9.

<http://www.revespcardiol.org/es/coartacion-aortica-aspectos-importantes-evolucion/articulo/13127840/>

2. Flujo de las venas pulmonares en niños con miocardiopatía dilatada por medio del ecocardiograma transtorácico.

b. Citas al artículo

1. Medrano López, JM Guía Torrent (2009). **Actualización en cardiología pediátrica y cardiopatías congénitas.** Rev Esp Cardiol. 2009; 62 (Supl1):39-52.

<http://www.revespcardiol.org/es/actualizacion-cardiologia-pediatrica-cardiopatias-congenitas/articulo/13131717/>

3. Pentalogy of Cantrell: Forty-two years of experience in the Hospital Infantil de México Federico Gómez.

i. Citas al artículo

1. KR Bacardi, MSDIM Vidal, MSDCG Guevara, YM Nieves. **Diagnóstico prenatal de pentalogía de Cantrell.** Revista cubana de Pediatría. 2014; 86 (1).

http://www.bvs.sld.cu/revistas/ped/vol86_1_14/ped10114.htm

2. KR Bacardi, MSDIM Vidal, MSDCG Guevara, L de la C, G. Iglesias. **Diagnóstico prenatal de ectopia. Reporte de un caso.** Revista de la Federación Argentina de Cardiología. 2013. 42, 4:1-4.

<http://pcvc.fac.org.ar/1/revista/13v42n4/casclin/caclin01/reyes.php>

3. DA Suresh Chandran and Dineshi Ari. **Pentalogy of Cantrell: An extremely rare congenital anomaly.** J Clin Neonatol. 2013; 2 (2): 95-97.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3775145/>

4. CA Belotti, RD Stewart, AB Golden. **Pentalogy of Cantrell Surgical Resection of biventricular diverticulum.** World J Pediatr Congenit Heart Surg. 2012;3 (3): 402-5.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23804881>

5. KR Bacardi, MSDIM Vidal, MSDCG Guevara, L de la C, G. Iglesias. **Ectopia cordis diagnosed by prenatal ultrasound.** Revista de la Federación Argentina de Cardiología. 2013. 42, 4:1-4.

[http://moodle.fac.org.ar/1/revista/13v42n4/casclin/caclin01/reyes_ingles.ph](http://moodle.fac.org.ar/1/revista/13v42n4/casclin/caclin01/reyes_ingles.php)

[p](#)

Polymorphism 677C→T MTHFR Gene in Mexican mothers of Children with complex congenital heart disease.

i. Citas al artículo

1. W Wang, Y Wang, F Gong, W Zhu, S Fu. **MTHFR C677T polymorphism and risk of congenital heart defects: evidence from 29 case-control and TDT studies.** PloS One. 2013; 8 (3): e58041.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3594197/>

2. W Wang, Z Hou, C Wang, C Wei, Y Li, L Jiang. **Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and congenital heart disease: A meta-analysis.** Meta Gene. 2013 (1): 109-125.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221454001300011X>

3. T. E. Belokrinitskaya, N. I. Frolova, N. N. Strambovskaya, E. Y. Glotova. **Preconception screening for gene polymorphisms associated thrombophilia and hyperhomocysteinemia risk in healthy young women.** IJBM 2013;3 (3):177-79.

http://www.ijbm.org/articles/Article3_3_CR5.pdf

4. Q Wang, X Zhu, B Lv, X Li, J Zhang. (2014). **The association between c 1333C>T genetic polymorphism of MTHFR gene and the risk of congenital heart diseases.**

Biomarkers 2014. 19 (1): 77-80.

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/1354750X.2013.876099V>.