



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Facultad de Medicina

División de estudios de Posgrado  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen *NKX2-5* en 12 pacientes con  
conexión anómala total de venas pulmonares

Tesis que para obtener el Título de Especialista en Genética Médica

Presenta:

Dra. Daniela Medina Castro.

Directora de Tesis:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso.

Asesores de Tesis:

Dra. Constanza García Delgado.

M en C Benjamín Antonio Rodríguez Espino.



México D.F. Febrero 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso.  
Jefe de Departamento Genética.  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Dra Constanza García Delgado.  
Médico adscrito al Departamento de Genética.  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M en C Benjamín Antonio Rodríguez Espino.  
Asistente de investigador "C"  
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr Jaime Nieto Zermeño.  
Director en Enseñanza y Desarrollo Académico.  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.

## **AGRADECIMIENTOS**

- ◇ *A mi familia por todo el amor que me dieron al comprenderme en los momentos difíciles y al levantarme cuando caí, y sobretodo a mi papá por su gran amor, paciencia y enseñanzas transmitidas para guiarme en esta meta. A mi mamá que aunque no esté presente, sé que me ayudó en este recorrido. Siempre estarás en mi corazón.*

*Ustedes hacen que valga la pena cada paso que doy:*

*Papá y Mamá*

*Gina*

*Mis hermanos: Néstor, Mariana, Gina Itzel y Valeria.*

- ◇ *A la Doctora Verónica Fabiola Morán Barroso por su comprensión, tiempo y esfuerzo en este largo camino.*
- ◇ *A la Doctora Constanza García Delgado por sus atenciones y por permitirme aprender de su experiencia.*
- ◇ *A la Doctora Rosa Isela Ortiz de Luna por su cariño, consejos y gran apoyo en lo académico y personal.*
- ◇ *Al Doctor Francisco Javier Flores Ramírez por sus enseñanzas y el tiempo que dedicó en ellas .*
- ◇ *Al Maestro en Ciencias Benjamín Antonio Rodríguez Espino por su enorme trabajo para alcanzar este objetivo.*
- ◇ *A la Maestra en Ciencias Alicia Cervantez Peredo por sus conocimientos, esfuerzo y apoyo invaluable.*

*A todo el equipo de Genética, compañeros y amigos, por las risas y lágrimas, por permitirme ser parte de ustedes.*

*Muchas Gracias.*

<b>I. INTRODUCCIÓN.</b>	1
1.1 Embriología.	2
1.1.2 Venas Pulmonares.	3
1.1.3 Bases embriológicas de la conexión anómala total de venas pulmonares.	4
1.1.4 Clasificación de la conexión anómala total de venas pulmonares.	6
1.2 Genes asociados a cardiopatías congénitas.	8
1.3 Mutaciones en <i>NKX2-5</i> y cardiopatías congénitas.	14
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.</b>	16
<b>III. HIPÓTESIS.</b>	16
<b>IV. JUSTIFICACIÓN.</b>	17
<b>V. OBJETIVO.</b>	18
5.1 Objetivo general.	18
5.2 Objetivos específicos.	18
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	19
6.1 Tipo de estudio.	19
6.2 Criterios.	19
6.3 Descripción de Variables.	19
6.4 Descripción metodológica.	20
<b>VII. RESULTADOS.</b>	28
7.1 Resultados del análisis clínico de los pacientes con conexión anómala total de venas pulmonares.	28
7.2 Resultados del análisis molecular.	30
<b>VIII. DISCUSIÓN.</b>	44
<b>IX. REFERENCIAS .</b>	56
<b>ANEXO I.</b>	59

## I. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CC) son una causa muy frecuente de mortalidad y morbilidad y tienen una prevalencia de 4-50:1000 nacidos vivos (dependiendo del grupo étnico)<sup>1</sup>, afectando cerca del 1% al 3% de todos los nacimientos<sup>2,3,4</sup>. En México las CC son la tercera causa de muerte en niños hasta el año de edad y la sexta hasta los tres años<sup>4</sup>. Las CC representan el 25% de todas las malformaciones congénitas<sup>5</sup> y aproximadamente 3 de cada 1000 nacidos vivos requerirá una intervención quirúrgica por este motivo durante el primer año de vida<sup>6</sup>. El 25% de las CC tienen alteraciones asociadas sugiriendo diagnósticos sindrómicos con causas cromosómicas o monogénicas. Rara vez se encuentran causas monogénicas en cardiopatías congénitas aisladas. La prevalencia de cardiopatía congénita aislada entre los miembros de una familia, es mayor (2-16%)<sup>7</sup>.

Las CC pueden presentarse de manera aislada o sindrómica y su etiología se considera que es multifactorial en la mayor parte de los casos (80-85% de los casos). Uno de los primeros estudios al respecto fue el realizado por Nora y colaboradores en 1968<sup>8</sup>, quienes analizaron agregación familiar, estudios de concordancia en gemelos y estudios citogenéticos en seis de las cardiopatías más frecuentes: comunicación interauricular (CIA), comunicación interventricular (CIV), PCA (persistencia de conducto arterioso), estenosis pulmonar (EP), estenosis aórtica (EA) y tetralogía de Fallot (TF)<sup>8</sup>. Otras causas asociadas a CC son alteraciones cromosómicas y enfermedades monogénicas que suman un 10-15% de los casos<sup>9,10</sup>. Algunos de los teratógenos y alteraciones cromosómicas, así como su frecuencia grupal y cardiopatías más frecuentemente asociadas se muestran en las tablas 1 y 2<sup>9,10</sup>.

**Tabla 1. Teratógenos y cardiopatías**

<b>Sustancia</b>	<b>Cardiopatía</b>
<b>Litio</b>	Enfermedad de Ebstein
<b>Anticonceptivos</b>	Transposición de Grandes Vasos
<b>Hidantoína</b>	Varias
<b>Hipervitaminosis A</b>	Varias
<b>Alcohol, tabaco</b>	Varias
<b>Rubeola, Citomegalovirus</b>	Varias
<b>Diabetes materna</b>	Transposición de Grandes Vasos
<b>PKU materna</b>	PCA
<b>LES</b>	Varias

Se muestra la relación entre enfermedades maternas y exposición potencial a teratógenos en el embarazo y su relación con CC, correspondiendo al 1% de las causas. PKU: fenilcetonuria, PCA: persistencia conducto arterioso<sup>9,10</sup>.

**Tabla 2. Alteraciones cromosómicas y cardiopatías**

<b>Alteración Cromosómica</b>	<b>Cardiopatía</b>
<b>Trisomia 21</b>	Canal atrioventricular, ductus, CIA, Fallot
<b>Trisomia 18</b>	Comunicaciones interventriculares, auriculares, etc.
<b>Trisomia 13</b>	Cardiopatías complejas
<b>5p- (cri du chat)</b>	CIV, CIA
<b>22q11</b>	Conotruncales
<b>Síndrome Turner (45,X), XXX, XXXX y otros</b>	Coartación de la aorta, estenosis pulmonar.

Las alteraciones cromosómicas asociadas a CC, corresponden al 6-12% de las causas<sup>9,10</sup>.

La Conexión Anómala Total de Venas Pulmonares (CATVP) es una cardiopatía rara en la que no se establece la conexión entre el seno venoso y la aurícula izquierda. Constituye el 1.5-3% de todas las cardiopatías congénitas<sup>11</sup> y tiene una incidencia de 6.8-9:100, 000 nacidos vivos<sup>12,13,14,15,16</sup>. Se presenta de forma aislada en el 67% de los casos<sup>13</sup> y es más frecuente en el sexo masculino que en el femenino (3.6:1)<sup>14</sup>. Aunque en los reportes de la literatura se considera una cardiopatía rara, en el Hospital Infantil de México Federico Gómez es una de las cardiopatías frecuentes presentándose entre 30 a 50 casos nuevos por año. Por tal motivo es importante su estudio clínico y genético.

### **1.1. Desarrollo embriológico del corazón.**

Las células que contribuyen al desarrollo cardíaco se localizan originalmente en la porción distal del epiblasto. Dichas células se condensan para formar dos acúmulos celulares que migran lateralmente hacia la porción cefálica de la línea primitiva; posterior a la gastrulación, los primordios cardíacos convergen a lo largo de la línea media para formar el tubo cardíaco, el cual sufre una serie de modificaciones en su morfología y posición, dando lugar al desarrollo del asa cardíaca y las cavidades primitivas mediante movimientos morfogenéticos específicos y la formación de tabiques que las separan así como de estructuras valvulares asociadas<sup>2</sup>.

Al inicio de la valvulogénesis se desarrollan dos poblaciones celulares extracardiacas que invaden al corazón en desarrollo, una derivada de la cresta neural y otra del proepicardio. Las primeras migran y contribuyen a la división del tracto de salida para formar las arterias aorta y pulmonar. Las células

del proepicardio migran a la superficie para formar el epicardio<sup>2</sup>. En todo este proceso intervienen patrones específicos de expresión génica condicionada por factores de transcripción cuyos gradientes espacio temporales dan lugar al desarrollo y función del corazón y consecuentemente su modificación podrá estar asociada a defectos congénitos<sup>2</sup>.

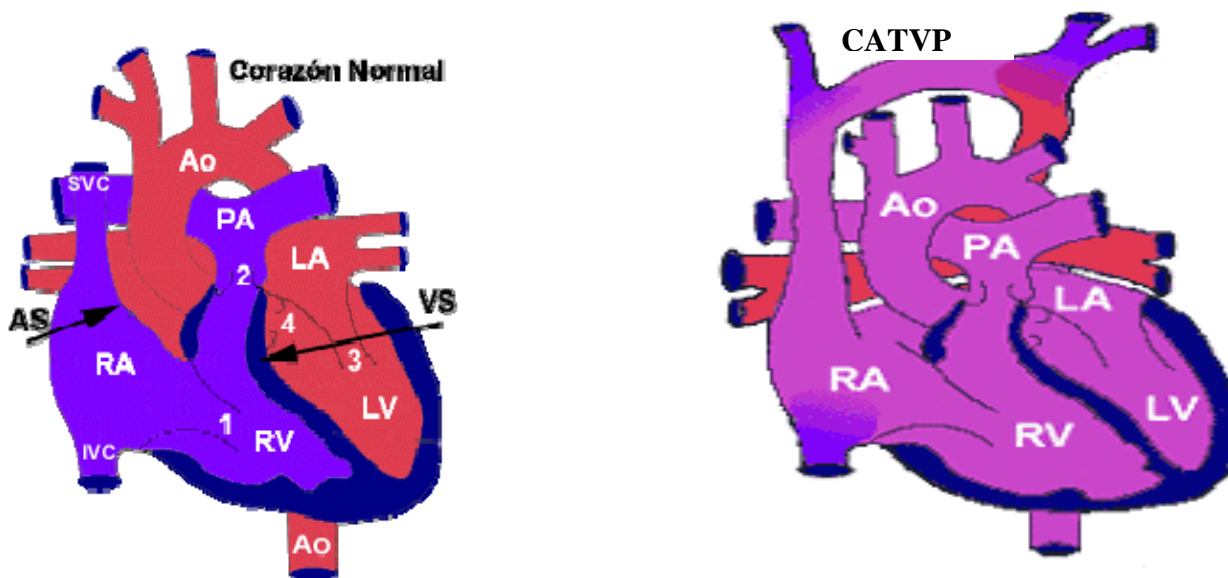
### **1.1.2 Desarrollo de las Venas Pulmonares.**

El desarrollo de las venas pulmonares se inicia con el esbozo pulmonar a los 25-27 días de vida intrauterina, como una evaginación endodérmica de la porción caudal de la faringe primitiva. Este esbozo se asocia al mesodermo esplácnico del cual se originan los angioblastos que más tarde formarán los vasos sanguíneos del plexo pulmonar. Al mismo tiempo en el techo de la aurícula izquierda, surge una evaginación endotelial que se constituirá en el primordio de la vena pulmonar común<sup>15,16</sup>.

Alrededor de los 27 a 29 días, los angioblastos que rodean los esbozos pulmonares aumentan en número y forman una extensa red capilar situada entre ambos pulmones; los extremos de esta red se conectan con el sistema vascular de cada pulmón, se fusionan y forman el seno de las venas pulmonares (SVP) que tiene origen extrapulmonar y extracardiaco. Este seno establece conexiones vasculares con las venas sistémicas bilaterales en desarrollo: cardinal anterior derecha, que origina la vena cava superior y el cayado de la vena álgos; cardinal anterior izquierda, de la que surgen las venas cava superior izquierda y vertical; vitelina derecha, que origina el segmento suprahepático de la vena cava inferior, venas hepáticas, suprahepáticas y porta, y los cuernos sinusales del corazón (el izquierdo al seno venoso coronario y el derecho a la porción sinusal de la aurícula derecha). En esta etapa la vena pulmonar común o primitiva crece hacia el SVP; la red venosa de los pulmones forma parte del plexo esplácnico y empieza a diferenciarse. El SVP y la vena pulmonar aún no se conectan (Fig.1)<sup>15,16</sup>.

Entre los 28 y 32 días la vena pulmonar común se une con el seno de las venas pulmonares. En esta etapa el plexo venoso pulmonar está parcialmente separado del plexo esplácnico. La vena pulmonar común lleva sangre que drena del seno de las venas pulmonares hacia la aurícula izquierda. Se inicia la involución de los pequeños vasos de la conexión venosa pulmonar primaria con los plexos esplácnico y pulmonar. Finalmente a los 32 a 37 días el seno de las venas pulmonares pierde la mayor parte de sus conexiones con los plexos esplácnico y cardinal, la vena pulmonar común conectada con el seno de las venas pulmonares se integra a la aurícula izquierda para constituir su porción sinusal en el cual penetran en forma separada las cuatro venas pulmonares<sup>15,16</sup>.

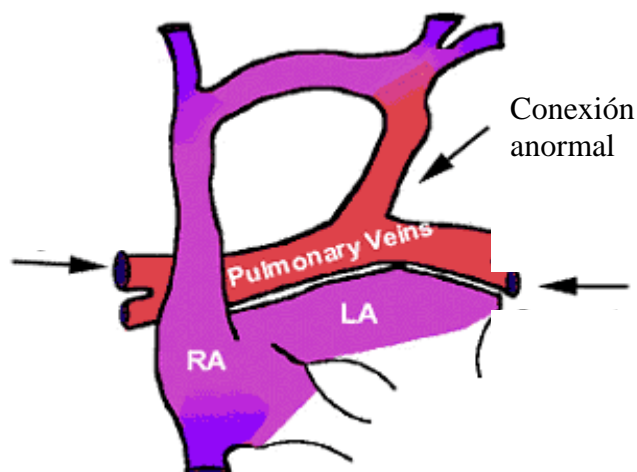




**Figura 1.** Derecha corazón normal. Izquierda CATVP. LV:Ventrículo Izquierdo, RV: Ventrículo Derecho, LA: Aurícula Izquierda, RA: Aurícula Derecha, AS: Tabique Interauricular, VS: Tabique Interventricular, 1: Válvula tricúspide, 2: Válvula Pulmonar, 3: Válvula Mitral, 4: Válvula Aórtica, Ao: Aorta, PA: Arteria Pulmonar, SVC: Vena Cava Superior, IVC: Vena Cava Inferior. Tomado de [http://www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi\\_cc00.htm](http://www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi_cc00.htm)

### 1.1.3 Bases embriológicas de la conexión anómala total de venas pulmonares.

La conexión anómala de venas pulmonares (CAVP) fue descrita por Winslow en 1739 al identificar una vena del lóbulo superior del pulmón derecho que drenaba a la vena cava superior. En 1798 Wilson describió la primera CATVP en un niño de 7 días con otros defectos asociados<sup>5</sup>. (Fig. 2)



**Figura 2.** Se muestra la región de la conexión anormal de las venas pulmonares. RA: aurícula derecha. LA: aurícula izquierda. La flecha derecha e izquierda muestran la llegada de sangre oxigenada proveniente de los pulmones. Tomado de [http://www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi\\_cc00.htm](http://www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi_cc00.htm)

Al analizar el desarrollo del sistema venoso pulmonar resulta evidente que las primeras conexiones del SVP se hacen con los sistemas venosos cardinal y umbilicovitelino y con los cuernos derecho e izquierdo del seno venoso; posteriormente se establece la conexión secundaria entre el SVP y la vena pulmonar común en la aurícula izquierda con la subsecuente atresia de las conexiones primarias<sup>15</sup>.

Se ha sugerido que el mecanismo más frecuente que origina los sitios de CAVP es la falta de crecimiento y desarrollo de la vena pulmonar común, lo que determina que puedan persistir cualquiera de los canales primitivos de la conexión venosa pulmonar primaria que drenan a los sistemas venosos cardinal derecho (que se transforma en la vena cava superior derecha y el cayado de la vena ácigos) e izquierdo (que se transforma en el seno venoso coronario y venas cava superior izquierda y vertical) y al sistema venoso umbilicovitelino (porción suprahepática de la vena cava inferior, conducto venoso hepático, vena porta, venas esplénica y mesentérica superior); estos canales se transforman en los colectores respectivos del SVP<sup>16</sup>.

El desarrollo del colector unido al cuerno derecho del seno venoso del corazón embrionario determina la conexión anómala al atrio derecho, ya que dicho cuerno se incorpora a esta cámara cardíaca para formar su porción sinusal y arrastra consigo al colector que en estos casos es muy corto<sup>16</sup>. Otro mecanismo patogénico propuesto para explicar el origen de la CAVP a la aurícula derecha considera el nacimiento ectópico de la vena pulmonar común que nace del techo de la aurícula derecha, por lo que la conexión venosa pulmonar secundaria se establece con el SVP que queda integrado a la aurícula derecha. Finalmente un tercer mecanismo sugerido por Wilson considera que la vena pulmonar común, queda integrada al atrio derecho debido a la formación ectópica del tabique interatrial desviado hacia la izquierda<sup>15,16</sup>.

### 1.1.4 Clasificación de la conexión anómala total de venas pulmonares.

La CATVP generalmente se establece en un solo sitio en cualquiera de los niveles que se proponen en la clasificación de Darling modificada (Tabla 3).

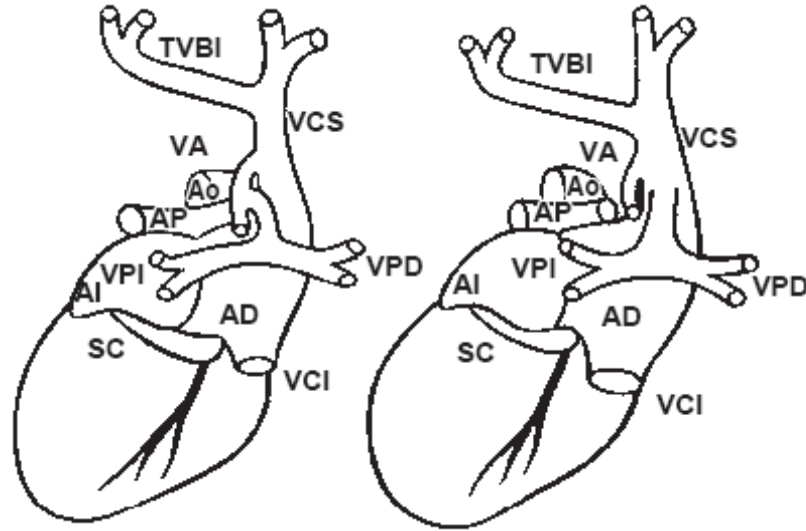
**Tabla 3. Clasificación de Darling modificada de la conexión anómala total de venas pulmonares.**

<b>I. Supradiaphragmático</b>	<b>A) Supracardiaco</b>	Vena Cava Superior Cayado Vena Acigos Vena Vertical
	<b>B) Cardíaco</b>	Seno Venoso Coronario Atrio Morfológico Derecho
	<b>C) Infracardiaco</b>	Porción suprahepática de la vena cava Inferior
<b>II. Infradiaphragmático</b>		Vena Porta y Tributarias
		Venas Suprahepáticas
		Conducto Venosos
<b>III. Mixto</b>		Combinación.

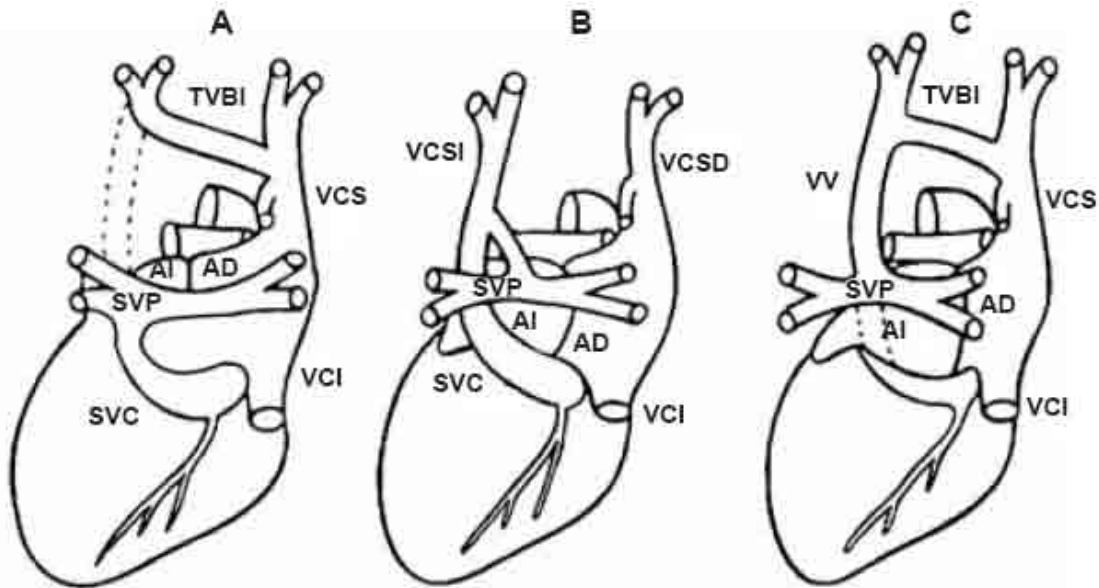
Modificado de Muñoz L et al 2007<sup>15,16</sup>.

La existencia de dos o más sitios de conexión anómala en un solo individuo es más rara, condición considerada dentro del grupo mixto; en general las venas pulmonares izquierdas frecuentemente se conectan con las venas derivadas del sistema venoso cardinal izquierdo, mientras que las venas del pulmón derecho lo hacen con las venas derivadas del sistema cardinal derecho. Sin embargo, debido a que el plexo venoso esplácnico del embrión tiene posición medial, a través de él se pueden establecer conexiones cruzadas, por ejemplo venas pulmonares izquierdas conectadas anormalmente con venas derivadas del sistema cardinal derecho y viceversa<sup>15</sup>.

Para la clasificación de Darling de la CATVP se toma en cuenta su sitio de drenaje, el cual es **supracardiaco** si drenan a la vena cava directamente o a la vena vertical (siendo el más frecuente, 40-50% de los casos), **infracardiaco** si drenan en la vena porta o la vena cava inferior (abarca el 10-20% e incluye la forma infradiaphragmática), **cardíaco** si drenan a la aurícula derecha o al seno coronario (representa un 20%) y las formas **mixtas** (10%)<sup>14,15,16</sup>. (Tabla 3, Figs. 3 y 4)



**Figura 3.** Esquemas en vistas posteriores que muestran los sitios de desembocadura anómala de las venas pulmonares en el sistema venoso cardinal derecho en el cayado de la vena ácigos y en la vena cava superior. VA = vena ácigos; SC = seno coronario; VCS = vena cava superior; Ao = aorta; VCI = vena cava inferior; VPI = venas pulmonares izquierdas; VPD = venas pulmonares derechas. Las demás abreviaturas iguales a las anteriores. Tomado de Muñoz L et al 2008<sup>15</sup>.



**Figura 4.** Esquemas en vistas posteriores que muestran los sitios de desembocadura anómala de las venas pulmonares en el sistema venoso cardinal izquierdo. A) seno coronario; B) vena cava superior izquierda persistente; C) vena vertical. La línea discontinua representa la reabsorción de la vena cardinal anterior izquierda. Abreviaturas: VCSI = vena cava superior izquierda. Las demás abreviaturas iguales a las anteriores. Tomado de Muñoz L et al 2008<sup>15</sup>.

La cardiopatía asociada con mayor frecuencia a CATVP es la CIA en 92% de los casos, seguida de PCA (22.37%), foramen oval permeable (7.89%), discordancia ventriculoarterial (6.58%), TF (5.26%), EA (5.26%), CIV (3.96%) y estenosis tricuspídea (1.32%)<sup>14,15,16</sup>. En México no existen publicaciones sobre las características de la CATVP, sin embargo una búsqueda bibliográfica de la base de datos de la UNAM ([www.facmed.unam.mx/](http://www.facmed.unam.mx/)) demostró al menos 10 tesis de posgrado enfocadas a este tema en donde se abordan los aspectos clínicos, diagnósticos, morfológicos y de tratamiento en diferentes grupos de pacientes, en ellas se coincide en que es una patología poco frecuente, aparentemente hay un mayor número de pacientes masculinos y la variedad predominante en nuestra población es la supracardiaca y la presencia de PCA como la segunda cardiopatía asociada más frecuentemente, después de la CIA<sup>17,18,19</sup>.

Dentro de las alteraciones genéticas asociadas a CATVP que se han descrito, existen diferentes tipos de alteraciones génicas y cromosómicas en casos familiares y aislados de CATVP, como por ejemplo: asociación de locus en 4p13-q12 en dos familias y alteraciones cromosómicas como t(10;21) y un anillo del 12p<sup>12,20,21,23,24</sup>.

## **1.2 Genes asociados a cardiopatías congénitas.**

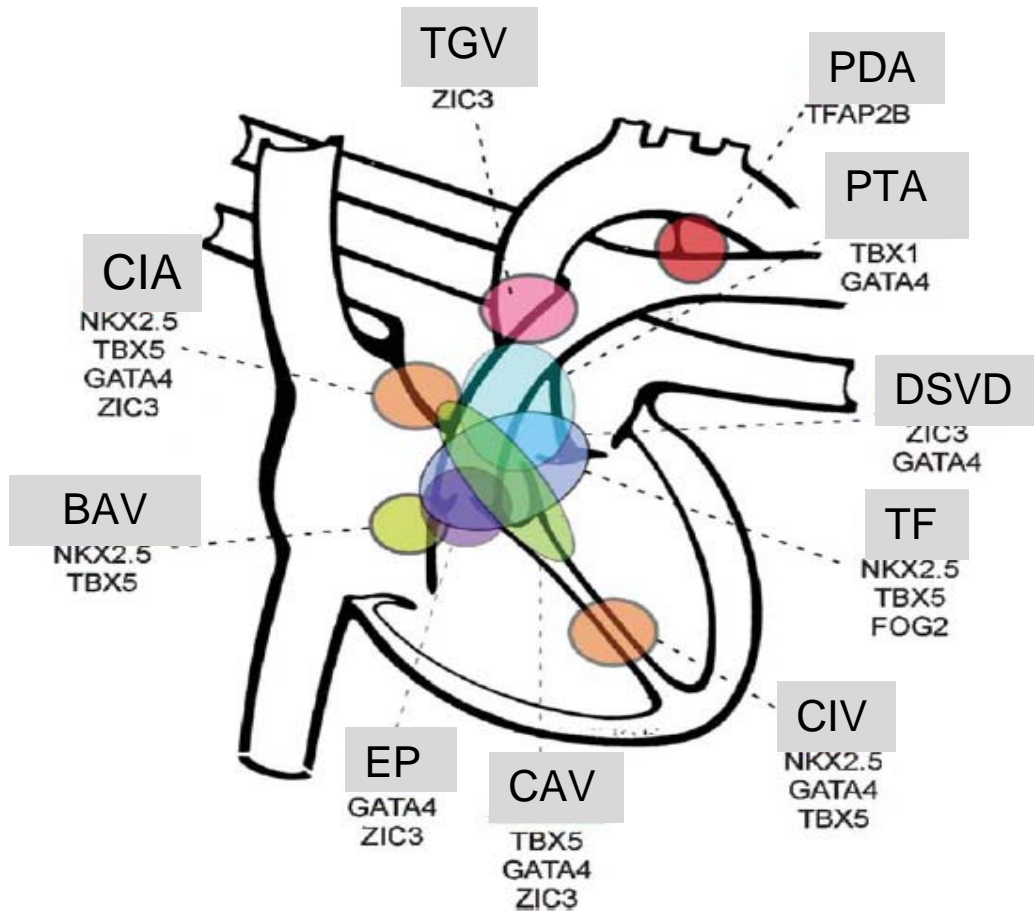
Existen varias familias de genes con un patrón específico de expresión en el corazón, entre ellas se engloba a las proteínas contráctiles, canales iónicos y factores de transcripción<sup>25</sup>. Si bien la mayoría de las CC son multifactoriales, en el caso de los estudios familiares se han identificado algunos genes con un patrón de herencia autosómico dominante. Muchos de estos genes codifican para factores de transcripción que regulan el desarrollo cardiaco y la expresión génica<sup>2</sup>. Estas investigaciones son de gran importancia ya que proveen información acerca de la influencia de estos genes en el desarrollo cardiaco normal, así como de su contribución en las patologías cardiacas. Los principales factores de transcripción que se han estudiado y asociado a CC se resumen en la Tabla 4 y Fig. 5. Estos son algunos de los genes estudiados en modelos animales como el ratón. Se ha calculado que los genes candidatos necesarios para el desarrollo cardiaco normal son más de 1700<sup>26</sup>.

**Tabla 4. Genes que codifican para factores de transcripción asociados a cardiopatías congénitas.**

<b>GEN</b>	<b>LOCUS</b>	<b>CARDIOPATÍAS ASOCIADAS</b>
<i>ZIC3</i>	Xq26.2	Heterotaxia Visceral
<i>NKX2-5</i>	5q35.2	CIA, CIV, TOF, DSVD, Estenosis subvalvular aórtica, Anomalía de Ebstein, Bloqueo AV
<i>TBX5</i>	12q24.1	Síndrome de Holt Oram (CIA, CIV, CAV, anormalidades de conducción)
<i>GATA4</i>	8p23.1	CIA, CIV, CAV, DSVD, dextrocardia, Estenosis Pulmonar.
<i>TFAP2B</i>	6p12	Síndrome de Char (PCA)
<i>TBX1</i>	22q11.2	Alteraciones conotruncales
<i>FOF2</i>	8q23	TF

Modificado de Krista L et al 2006<sup>2</sup>.

Dentro de los factores de transcripción involucrados en el desarrollo cardíaco se encuentran los genes homeobox, que se conservan en diferentes organismos y se caracterizan por poseer una secuencia de DNA particular, el homeobox o caja homeótica, que codifica para un dominio proteico (homeodominio). Estos genes son importantes para el desarrollo embrionario ya que por ejemplo los genes *HOX* especifican el eje antero-posterior durante el desarrollo temprano<sup>27</sup>. La mayoría de los homeodominios son de 60 aminoácidos y tienen un dominio de unión a DNA. Muchas proteínas con homeodominio son factores de transcripción que intervienen en el desarrollo y se han implicado en enfermedades y malformaciones congénitas<sup>28</sup>.



**Figura 5.** Genes asociados a distintas CC. CIA:comunicación interauricular; BAV, bloqueo auriculoventricular; CAV, canal auriculoventricular; DSVD, doble salida ventrículo derecho; PDA, persistencia ductus arteriosos; PTA: Persistencia tronco arterioso. EP: estenosis pulmonar ; TGV, transposición grandes vasos; TF, tetralogía de Fallot; CIV, canal interventricular. Modificado de Krista L et al 2006<sup>2</sup>.

Entre estas moléculas están los genes homeobox miembros de la familia génica NK4<sup>28</sup>. El primer miembro de esta familia reportado, involucrado en el desarrollo cardiaco, fue el gen *tinman* de *Drosophila*, seguido por su homólogo, el *Nkx2-5* en peces, aves, anfibios y mamíferos. El gen *NKX2-5* humano se encuentra en el cromosoma 5, tiene 2 exones y codifica para una proteína de 324 aminoácidos (Figs. 6 y 7). Este gen se expresa tempranamente durante la embriogénesis y a pesar de no encontrarse exclusivamente en regiones embrionarias destinadas al desarrollo cardiaco, ayuda a definir el campo cardiogénico. En muchos organismos su expresión persiste en el corazón durante todo el desarrollo<sup>29</sup>.



**Figura 6.** Ideograma del cromosoma 5. Se señala (flecha roja) el locus de *NKX2-5* (5q35.2)  
Modificado de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)



**Figura 7.** Se muestra la estructura del gen *NKX2-5*, con una longitud de 1,585 pb con 2 exones (cajas coloreadas).  
Modificado de [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

Las proteínas tinman, Nkx2-5 y otras proteínas relacionadas, comparten varios dominios comunes; los cuales son críticos para su función como factores de transcripción. En la región N- terminal de la proteína está el dominio TN, el homeodominio, el dominio NK y finalmente el dominio GIRAW se encuentra en el carboxilo terminal. La similitud de secuencia de aminoácidos entre todos los miembros de la familia tinman es sólo de 60% en el homeodominio y de 70-80% para los dominios NK-2 específicos<sup>29</sup>.

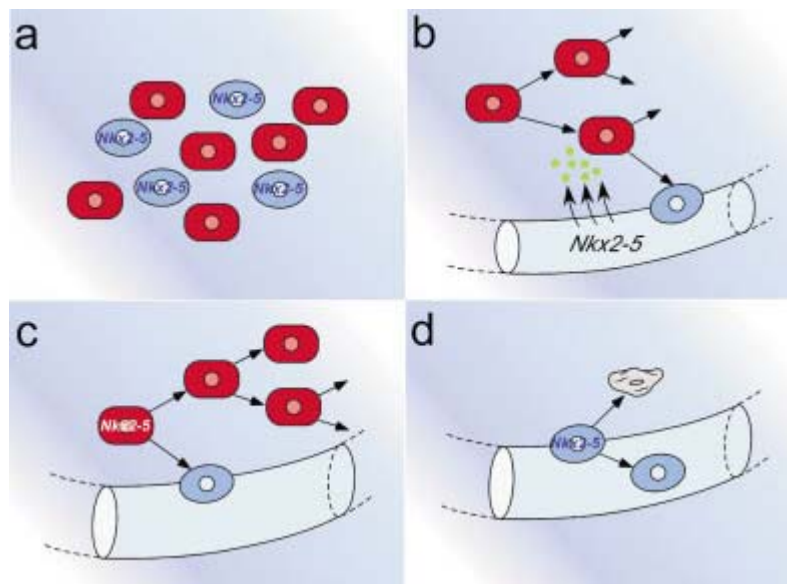
*NKX2-5* puede funcionar como homodímero o heterodímero con *GATA4* o *TBX5*. El dominio C-terminal, específicamente la región a partir del aminoácido 250, está involucrada en la heterodimerización. Schott y colaboradores (1998)<sup>7</sup> describieron cardiopatías no sindrómicas con herencia autosómica dominante caracterizadas por bloqueo AV y defectos cardíacos septales. Por



análisis de ligamiento se mapeó el locus responsable en el cromosoma 5q35, sitio donde se localiza *NKX2-5*<sup>29</sup>.

El análisis de este gen reveló mutaciones heterocigotas que originaron una disrupción en la función de unión a DNA del homeodominio. Las mutaciones heterocigotas en *NKX2-5* contribuyen al 4% de los pacientes con Tetralogía de Fallot y aproximadamente a 3-4% de todas las cardiopatías congénitas<sup>2,30</sup>. Las más comúnmente asociadas son los defectos septales CIA, CIV, DSVD, estenosis aórtica subvalvular y la anomalía de Ebstein de la válvula tricuspídea<sup>2</sup>.

Las manifestaciones tan variables de los defectos cardiacos asociados con *NKX2-5* indican la capacidad multifuncional de este gen durante el desarrollo cardiaco. Se ha llevado a cabo una relación genotipo-fenotipo entre el bloqueo AV y mutaciones específicas en este gen. Las mutaciones que afectan la unión al DNA están asociadas con defectos de conducción o bloqueo cardiaco (Fig. 8)<sup>2,31</sup>.



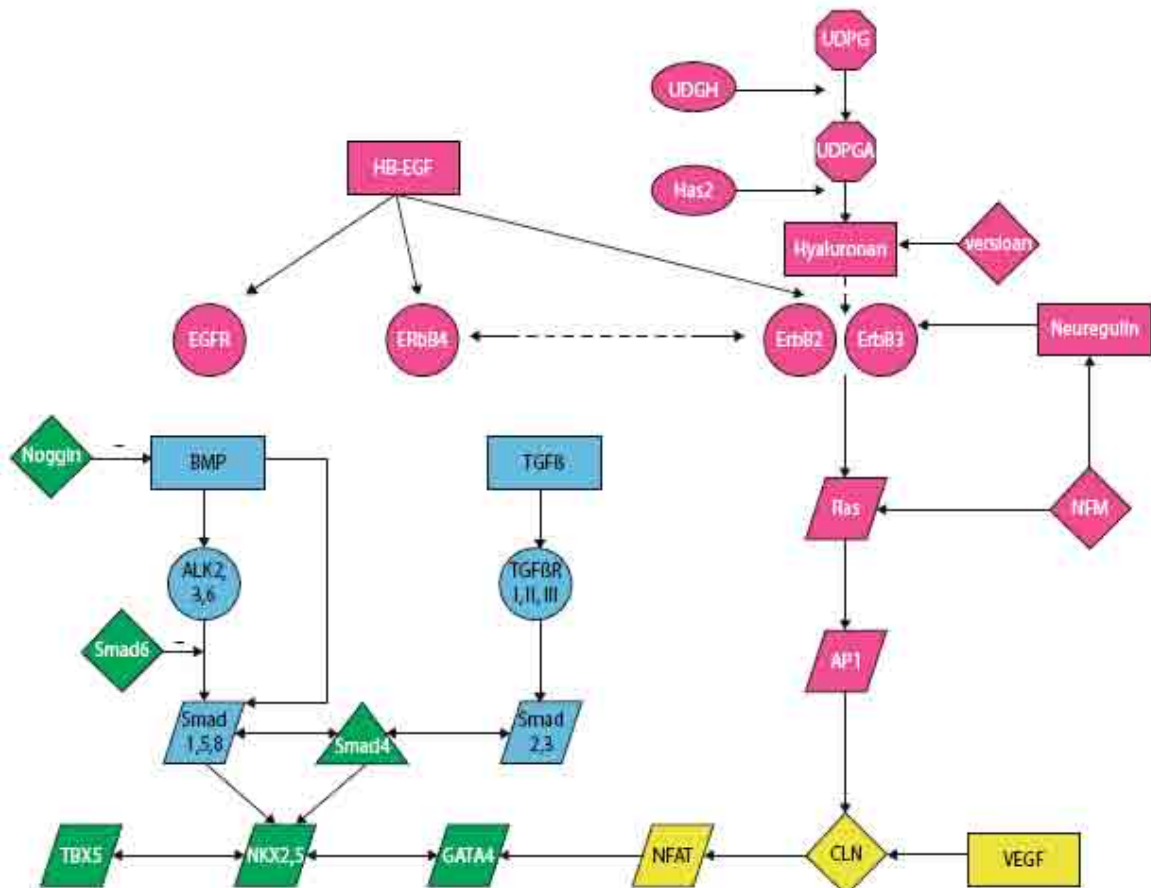
**Figura 8.** Modelo hipotético de la acción de Nkx2-5 en el desarrollo del sistema de conducción del ratón. A) Nkx2-5 especifica el número de células que sirven como nido para la formación del sistema de conducción. B) Nkx2-5 regula la expresión de una señal de inducción o C) la respuesta a la señal. D) Nkx2-5 estimula la supervivencia de las células en el sistema de conducción. Tomado y modificado de Jay P et al 2004<sup>32</sup>.

La transcripción del mRNA y la proteína de *NKX2-5* está transitoriamente aumentado durante la formación de las fibras de conducción<sup>33</sup>. Las mutaciones sin sentido o de cambio en el marco de lectura en cualquier localización del gen o mutaciones de sentido equivocado en el homeodominio, están asociadas con un fenotipo de bloqueo de conducción AV<sup>2</sup>. Estas mutaciones de sentido equivocado o sin sentido dentro del homeodominio y las mutaciones sin sentido que generan una proteína truncada sin homeodominio, alteran de forma severa o totalmente la capacidad de unión a DNA y el fenotipo encontrado en estos pacientes es secundario a la haploinsuficiencia de *NKX2-5*<sup>1,2</sup>.

Además de los estudios realizados en cardiopatías congénitas, en 2006 Dentice M y colaboradores<sup>22</sup> realizaron la búsqueda de mutaciones en *NKX2-5* en 241 pacientes con enfermedad tiroidea ya que observaron una mayor prevalencia de cardiopatías congénitas en pacientes con enfermedad tiroidea

que en la población general. Ellos encontraron 3 mutaciones en 4 individuos con hipotiroidismo. Este estudio demostró que las mutaciones encontradas exhibían una alteración funcional significativa con una reducción de las propiedades de transactivación y un efecto dominante negativo<sup>22</sup>.

El gen *NKX2-5* tiene una gran variedad de acompañantes transcripcionales, dentro de los cuales se incluyen *GATA4*, *GATA5*, *dHAND*, *TBX5* y *TBX20*. La interacción de las proteínas para las que codifican parece ser esencial en el desarrollo del corazón y del sistema de conducción<sup>30</sup>. Además estas proteínas participan en redes de señalización para conducción cardíaca (Fig 10)<sup>34,35</sup>.



**Figura 9.** Vías de señalización en la formación atrioventricular. Azul vías del Factor de crecimiento transformante B (TGFβ) y proteína morfogenética ósea (BMP) a través de las proteínas Smad. Rosa Vías de ErbB y Ras. Amarillo vías del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor nuclear de células T activadas (NFAT). Verde vías comunes de factores de transcripción. Círculos: receptores. Paralelogramas: factores de transcripción. Rectángulos: ligandos. Triángulos: proteínas transportadoras. Flecha punteada: efecto indirecto. Signo de menos efecto inhibitorio. HB-EGF: Factor de crecimiento endotelial de unión a heparina, EGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial, BMPR: Receptor de la proteína morfogenética ósea, TGFβR: Receptor del factor beta de crecimiento transformante, UDPG: UDPGlucosa, UDPGA: UDP-Acido glucurónico, UDGH: UDP-Glucosa dehidrogenasa, NFM: Neurofibromina, CLN: calcineurina. Nombres alternativos comunes: ALK2/ActR-I, ALK3/BMPR-IA, ALK5/TbR-I, y ALK6/BMPR-IB. Modificado de Joziase I et al 2004<sup>34</sup>.

Nkx2.5 también es importante en el control de la expresión de *ANF* el cual se expresa específicamente en la aurícula en desarrollo. Nkx2.5 interactúa con múltiples elementos de unión dentro del fragmento regulatorio de *ANF* y forman un complejo junto con *Tbx2* lo que reprime la actividad promotora de *ANF* en los corazones con *CAV* en ratones<sup>35</sup>.

La miocardina se expresa en los cardiomiocitos y células de músculo liso, es un cofactor transcripcional. La expresión de miocardina A, que es una isoforma de la miocardina, se encuentra muy disminuida en los corazones de ratones *Nkx2.5 knock out*<sup>35</sup>.

La función de *Nkx2-5* y las proteínas similares, se ha examinado en una variedad de vías. La pérdida de *tinman* en moscas previene el desarrollo de los vasos dorsales. Los ratones sin *Nkx2-5* funcional forman pequeños corazones que no pueden formar el asa cardiaca, ni el tabique cardíaco, presentan ventrículos poco desarrollados y canales auriculoventriculares malformados. Niveles aumentados de *Nkx2-5* generaban corazones grandes en etapas embrionarias tempranas<sup>35</sup>.

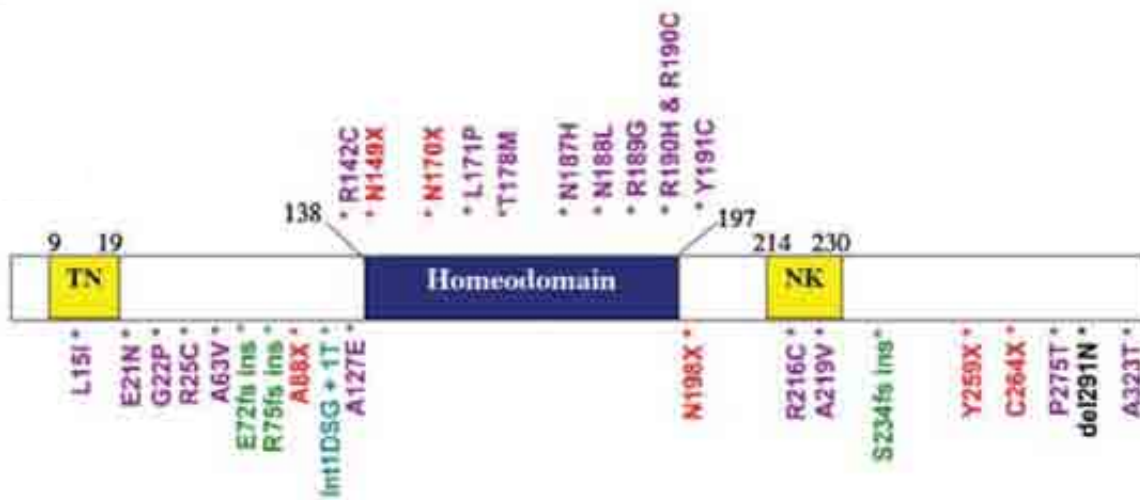
### 1.3 Mutaciones en *NKX2-5* y cardiopatías congénitas.

Se han reportado mutaciones en *NKX2-5* en humanos con cardiopatías congénitas. Los individuos son heterocigotos para las mutaciones y los fenotipos son variados. Se han encontrado alteraciones que incluyen defectos septales atriales, defectos del sistema de conducción, tetralogía de Fallot, defectos de válvula mitral, hipotrofia de ventrículo izquierdo, atresia pulmonar y defectos septales ventriculares<sup>29</sup>.

También se han investigado mutaciones somáticas en *NKX2-5* en cardiopatías congénitas. En el 2004 Reamon-Buettner y colaboradores<sup>36</sup> estudiaron *NKX2-5* en tejido cardíaco de 68 pacientes con cardiopatías congénitas complejas que involucraban *CIA*, *CIV* y *CAV*; encontraron mutaciones que incluían sustituciones no sinónimas en el homeodominio de *NKX2-5*, y también múltiples mutaciones por paciente. Observaron que estas mutaciones estaban ausentes en el tejido normal concluyendo un origen somático y mosaicismo de estas mutaciones<sup>36</sup>. Posteriormente en 2009 Draus y colaboradores<sup>4</sup> al investigar estas mutaciones somáticas observaron que el tejido cardíaco que habían estudiado en los reportes anteriores había sido fijado en formalina por más de 22 años por lo que intentaron reproducir los resultados en tejido congelado de 28 pacientes con defectos septales que fueron sometidos a cirugía cardíaca<sup>4</sup>.

A la fecha se han reportado 60 sustituciones germinales de un nucleótido de *NKX2-5*. La mayoría (61%) son sustituciones *G>A*. Las sustituciones *A<G* corresponden al 2% de estas variantes. Se han reportado seiscientos cinco variantes somáticas en las regiones codificantes y otras que flanquean regiones intrónicas de *NKX2-5*. Se analizó el espectro de estas variantes y se encontró, después de la amplificación del DNA extraído de tejido fijado con formalina, que las sustituciones *A>G* (58%) predominaban en estos estudios y solo 31% fueron *G>A*<sup>4</sup>.

Hasta ahora se han encontrado diversas mutaciones heterocigotas en *NKX2-5* en cardiopatías congénitas (Fig. 9) de las cuales la mayoría son de sentido equivocado pero también se han encontrado mutaciones sin sentido, deleciones, inserciones y mutaciones intrónicas. Sin embargo, sólo siete mutaciones se han encontrado en más de un paciente y no estaban relacionados entre sí<sup>4</sup>.



**Figura 10** .Mutaciones en *NKX2-5*. Letras en colores: Morado: sentido equivocado. Letras en colores. Rojo: sin sentido. Negro: deleciones. Verde: inserciones. Verde agua: mutaciones intrónicas. Modificado de Krista L et al 2006<sup>2</sup>.

*NKX2-5* presenta 11 polimorfismos reportados en distintas poblaciones. Cinco de ellos se localizan en el exón 1 y 6 en el exón 2. Tres se encuentran en regiones no traducidas. En la tabla 5 se describen estos polimorfismos.

**Tabla 5. Polimorfismos de *NKX2-5* reportados.**

	EXÓN 1					EXÓN 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ref SNP ID	rs703752	rs3729934	rs17052019	rs2277923	rs28936670	rs3729938	rs7728764	rs3729753	rs3729754	rs703752	rs11552707
Posición mRNA	134	197	223	239	249	712	770	782	808	1212	1486
Alelos	Y=C/T	M=A/C	M=A/C (C)	R=A/G	Y=C/T(T)	S=C/G (G)	Y=C/T	S=C/G	Y=C/T (T)	K=G/T	K=G/T
Aminoácidos	5'UTR	7Leu [L]	16 Asp [D] Ala [A]	21 Glu [E]	25 Arg [R] Cys [C]	179 Ser [S] Cys [C]	198 Gln [Q]	202 Leu [L]	211 Pro [P] Leu [L]	3'UTR	3'UTR

SNP (polimorfismo de nucleótido único). C: citosina; T: timina; G: guanina; A: adenina. Leu: leucina; Asp: aspartato; Ala: alanina; Glu: glutamato; Arg: arginina; Cys: cisteina; Ser: serina; Gln: glutamina; Pro: prolina. UTR: región no traducida. Ref. [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Entre los pacientes con CC atendidos en nuestra Institución están los que presentan CATVP. Esta patología se considera de etiología multifactorial con factores ambientales y genéticos involucrados. En los últimos años, se han reportado casos de CATVP que presentan mutaciones en *NKX2-5*, estos casos son pocos y no existen a la fecha series de pacientes con CATVP en que se haya estudiado este gen para confirmar o descartar su participación en esta patología. Con base a los antecedentes descritos se pretende confirmar o descartar que mutaciones en el gen *NKX2-5* en pacientes mestizos mexicanos con CATVP estén asociadas a la presentación de esta patología.

Ésta tesis forma parte del protocolo aprobado número CO/2007/15. En este protocolo participan los departamentos de Genética y Cardiología. El responsable del protocolo es el Dr. Francisco Flores Ramírez del departamento de Genética.

### **III. HIPÓTESIS.**

H1: Existen mutaciones en el gen *NKX2-5* en pacientes mestizos mexicanos con CATVP.

Ho: No hay mutaciones en el gen *NKX2-5* en pacientes mestizos mexicanos con CATVP.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN.**

Se ha reportado que mutaciones en el gen *NKX2-5* se han relacionado de manera general con el 3% de las cardiopatías congénitas. Sin embargo, no se ha determinado su participación específica en la CATVP en series grandes de pacientes en que se estudie específicamente esta cardiopatía. Por lo que este estudio establecerá si existen mutaciones en el gen *NKX2-5* en pacientes del HIMFG con CATVP, lo cual permitirá un mejor entendimiento de la función de *NKX2-5* en el desarrollo cardiaco y a futuro poder proporcionar consejo genético a los pacientes con esta patología.

## **V. OBJETIVO.**

### **5.1. Objetivo general.**

Identificar y describir el tipo y la frecuencia de mutaciones en el gen *NKX2-5* en 12 pacientes con CATVP aislada del HIMFG.

### **5.2. Objetivos específicos.**

Describir el fenotipo en base a las características clínicas presentes en los pacientes analizados.

Identificar y caracterizar las mutaciones que se encuentren en el gen *NKX2-5* en estos pacientes.

Establecer la relación que exista entre el genotipo encontrado y las características clínicas de los pacientes, como uno de los factores que pueden causar CC



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 6.1 Tipo de estudio.

- Descriptivo
- Transversal
- Observacional

### 6.2 Criterios.

- **Criterios de inclusión.**

- Pacientes con CATVP aislada (sin alteraciones asociadas).
- Pacientes con CATVP sin contraindicación de toma de muestra.
- Los pacientes que accedan a participar en nuestro estudio.

- **Criterios de exclusión.**

- Los pacientes que no accedan a participar en nuestro estudio.
- Pacientes que presenten CATVP con alteraciones concomitantes de tipo entidad sindrómica.

- **Criterios de eliminación.**

- Material biológico inadecuado para el análisis.
- Pacientes con alteraciones asociadas que no se hayan identificado previamente.

### 6.3 Variables.

- **Variables independientes:** presencia y tipo de mutación en el gen *NKX2-5*.
- **Variables dependientes:** Fenotipo presente en los pacientes con mutación en el gen *NKX2-5*.
- Se consideraron como:
  1. Polimorfismo: Variante normal que se encuentra en más del 1% de la población general que no se asocia directamente a enfermedad.
  2. Mutación: cualquier cambio en la secuencia de un nucleótido o en la organización del DNA.
  3. Mutaciones de sentido equivocado: cambio de un nucleótido que causa una sustitución de un aminoácido por otro.
  4. Mutaciones sin sentido: cambio de un nucleótido que causa la sustitución de un aminoácido por uno de los codones de terminación.
  5. Mutación sinónima: cambio de nucleótido que no cambia el aminoácido.

#### **6.4 Descripción de la metodología.**

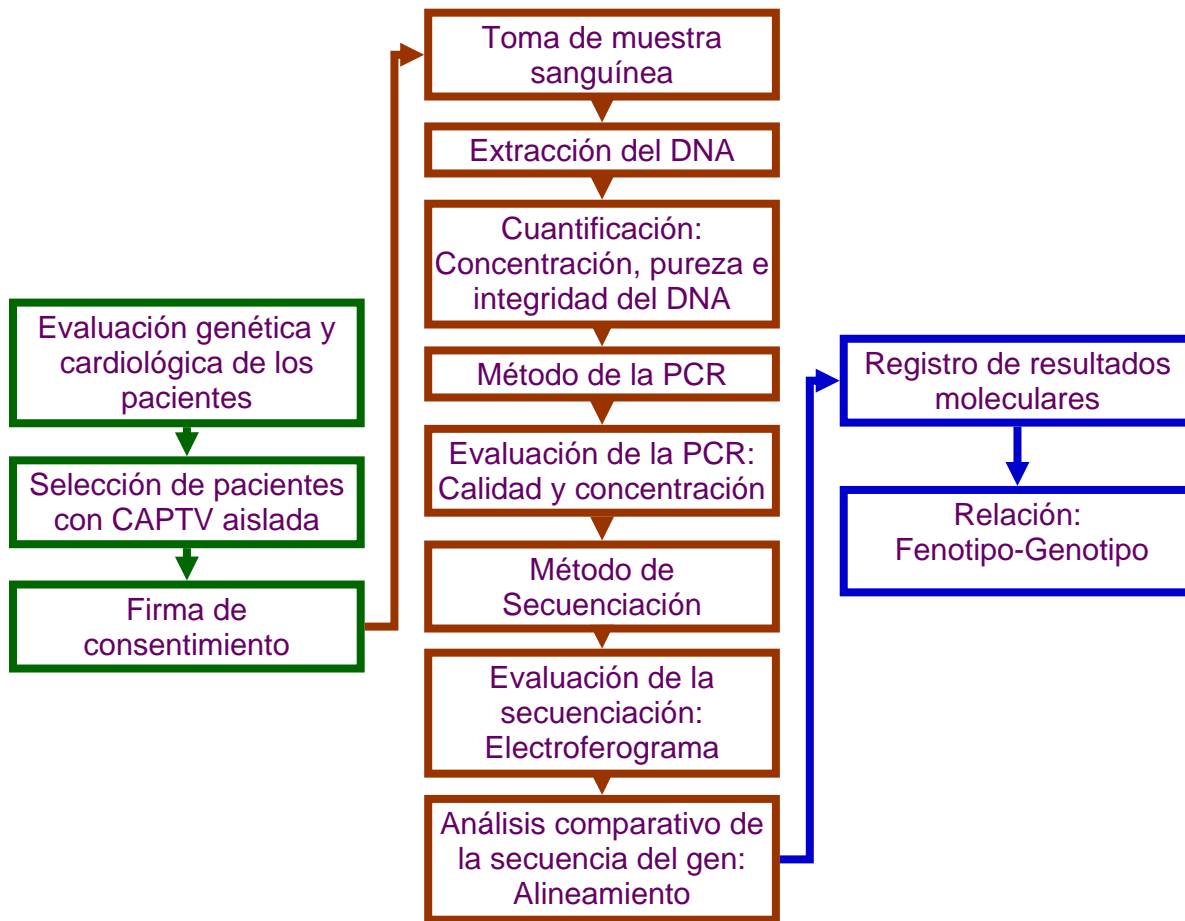
Previo consentimiento informado (ANEXO I) se incluyeron en el estudio 12 pacientes con diagnóstico de CATVP, el cual fue corroborado por ecocardiografía. Los pacientes se captaron tanto a partir de los pacientes hospitalizados como los que acudieron a consulta externa de los Departamentos de Cardiología y Genética y fueron evaluados por personal médico de ambos departamentos. De todos ellos se realizó historia clínica y exploración física. Los polimorfismos y mutaciones encontrados fueron analizados también en un grupo de 16 controles del Banco de DNA, del departamento de Genética del HIMFG.

Se diseñó una hoja de recolección de datos considerando el género del paciente, edad, lugar de origen, antecedentes heredofamiliares, variante de CATVP y estudios realizados. Las características clínicas fueron analizadas por estadística descriptiva y porcentajes.

Para el análisis molecular, se tomó una muestra de 3ml de sangre periférica para extracción de DNA la cual se procesó con el kit QIAamp DNA Blood MiniKit (QIAGEN©), se cuantificó la concentración y pureza del DNA en un Espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific© Inc.). La integridad del DNA se evaluó por el análisis de los geles de electroforesis empleando el sistema Gel Logic 440 Digital Imaging System (KODAK©).

Se diseñaron los pares de oligonucleótidos para cada uno de los dos exones del gen *NKX2-5*, se determinaron las  $T_m$  (temperatura de fusión) de los pares de oligonucleótidos (cebadores) para las PCR. La secuencia de referencia del gen se obtuvo de la base de datos de genes y genomas Ensembl dependiente del Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI) y el European Bioinformatics Institute (EBI). Este proceso fue realizado bajo la supervisión del M. en C. Benjamín Rodríguez Espino. Las secuencias de los oligonucleótidos, el tamaño esperado del producto de PRC y las  $T_m$  se muestran en la Tabla 6.

Finalmente, se aplicó un análisis de estadística descriptiva para determinar la frecuencia de las mutaciones y la información se comparó con bases de datos del genoma humano ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) como se muestra en la Fig. 11.



**Figura 11.** Diagrama de flujo de la metodología empleada para el estudio de los pacientes con CATVP para búsqueda de mutaciones en el gen *NKX2-5*.

En la Fig. 12 se muestra la secuencia de nucleótidos correspondientes a *NKX2-5* señalando cada una de sus regiones, polimorfismos reportados, localización de cebadores y mutaciones encontradas en este estudio.

1 GCCTGGTCCCCTCTCCTGCCCTTGTGCTCAGCGCTACCTGCTGCCCGACACATCCA  
.....  
.....

61 GAGCTGGCCGACGGGTGCGCGGGCGGGCGGCACCATGCAGGAAGCTGCCAGGGGCC  
.....  
.....

121 GTGGGCAGCGCCG<sup>Y</sup>CTTTCTGCCGCCACCTGGCGCTGTGAGACTGGCGCTGCCACCATGT  
.....ATGT  
.....-M--

181 TCCCAGCCCTGCTCT<sup>M</sup>CACGCC<sup>M</sup>ACGCCCTTCTCAGTCAAAG<sup>R</sup>ACATCCTAAACCTGGAAC  
5 TCCCAGCCCTGCTCTCACGCCACGCCCTTCTCAGTCAAAGACATCCTAAACCTGGAAC  
2 F--P--S--P--A--L--T--P--T--P--F--S--V--K--=D--I--L--N--L--E--

241 AGCAGCAG<sup>Y</sup>CGCAGCTGGCTGCCGCCGAGAGCTCTGCCCCGCTGGAGGGCACCCTGG  
65 AGCAGCAGCGCAGCTGGCTGCCGCCGAGAGCTCTGCCCCGCTGGAGGGCACCCTGG  
22 Q--Q--Q--=R--S--L--A--A--A--G--E--L--S--A--R--L--E--A--T--L--

301 CGCCCTCCTCCTGCATGCTGGCCGCCTTCAAGCCAGAGCC<sup>T</sup>ACGCTGGGCCCGAGGCGG  
125 CGCCCTCCTCCTGCATGCTGGCCGCCTTCAAGCCAGAGCC<sup>T</sup>ACGCTGGGCCCGAGGCGG  
42 A--P--S--S--C--M--L--A--A--F--K--P--E--A--Y--A--G--P--E--A--

361 CTGCGCCGGGCTCCAGAGCTGCGCGCAGAGCTGGGCGCGCGCCTTCA<sup>C</sup>CGGCCAAGT  
185 CTGCGCCGGGCTCCAGAGCTGCGCGCAGAGCTGGGCGCGCGCCTTCA<sup>C</sup>CGGCCAAGT  
62 A--A--P--G--L--P--E--L--R--A--E--L--G--R--A--P--S--P--A--K--

421 GTGCGTCTGCC<sup>T</sup>TTCCCGCCGCCCGC<sup>C</sup>CTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCCGACC  
245 GTGCGTCTGCC<sup>T</sup>TTCCCGCCGCCCGC<sup>C</sup>CTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCCGACC  
82 C--A--S--A--F--P--A--A--P--A--F--Y--P--R--A--Y--S--D--P--D--

481 CAGCCAAGGACCCTAGAGCCGAAAAGAAAG<sup>A</sup>AGCTGTGCGCGCTGCAGAAGGCGGTGGAGC  
305 CAGCCAAGGACCCTAGAGCCGAAAAGAAAG<sup>A</sup>AGCTGTGCGCGCTGCAGAAGGCGGTGGAGC  
102 P--A--K--D--P--R--A--E--K--K--E--L--C--A--L--Q--K--A--V--E--

541 TGGAGAA<sup>A</sup>GACA<sup>A</sup>SAGGCGGACAACGCGGAGCGGCCCGGGCGGACGCGGAGGAAG<sup>A</sup>CCGC  
365 TGGAGAAAGACAGAGGCGGACAACGCGGAGCGGCCCGGGCGGACGCGGAGGAAGCCGC  
122 L--E--K--T--E--A--D--N--A--E--R--P--R--A--R--R--R--R--K--P--

601 GCGTGCTCTTCTCGCAGGCGCAGGTCTATGAGCTGGAGCGGCGCTTCAAGCAGCAGCGGT  
425 GCGTGCTCTTCTCGCAGGCGCAGGTCTATGAGCTGGAGCGGCGCTTCAAGCAGCAGCGGT  
142 R--V--L--F--S--Q--A--Q--V--Y--E--L--E--R--R--F--K--Q--Q--R--

661 ACCTGTCGGCCCCGAACGCGAC<sup>S</sup>CAGCTGGCCAGCGTGTGAAACTCACGT<sup>S</sup>CACGCAGG  
485 ACCTGTCGGCCCCGAACGCGAC<sup>S</sup>CAGCTGGCCAGCGTGTGAAACTCACGT<sup>S</sup>CACGCAGG  
162 Y--L--S--A--P--E--R--D--Q--L--A--S--V--L--K--L--T--=S--T--Q--

721 TCAAGATCTGGTTCCAGAACC<sup>R</sup>GGCGCTACAAGTGCAAGCGGCAGCGGCA<sup>R</sup>GACCAGACTC  
545 TCAAGATCTGGTTCCAGAACC<sup>R</sup>GGCGCTACAAGTGCAAGCGGCAGCGGCA<sup>R</sup>GACCAGACTC  
182 V--K--I--W--F--Q--N--R--R--Y--K--C--K--R--Q--R--Q--D--Q--T--

781 T <sup>S</sup> GAGCTGGTGGGGCTGCCCGCCGCGC <sup>Y</sup> GCCGCGCCTGCCCGCAGGATCGCGGTGCCAG  
605 TGGAGCTGGTGGGGCTGCCCGCCGCGCCGCGCCTGCCCGCAGGATCGCGGTGCCAG  
202 L--E--L--V--G--L--P--P--P--P--P--P--P--P--A--R--R--I--A--V--P--

841 TGCTGGTGC GCGATGGCAAGCCATGCCTAGGGGACTCGGCGCCCTACGCGCCTGCCTACG  
665 TGCTGGTGC GCGATGGCAAGCCATGCCTAGGGGACTCGGCGCCCTACGCGCCTGCCTACG  
222 V--L--V--R--D--G--K--P--C--L--G--D--S--A--P--Y--A--P--A--Y--

901 GCGTGGG CCTSAATCCCTACGGTATAACGCCTACCCCGCCTATCCGGGTACGGCGGCG  
725 GCGTGGG CCTCAATCCCTACGGTATAACGCCTACCCCGCCTATCCGGGTACGGCGGCG  
242 G--V--G--L--N--P--Y--G--Y--N--A--Y--P--A--Y--P--G--Y--G--G--

961 CGGCCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACTGCCGCTTACCCCGCCGGGCCTTCCCCAGCGC  
785 CGGCCTGCAGCCCTGGCTACAGCTGCACTGCCGCTTACCCCGCCGGGCCTTCCCCAGCGC  
262 A--A--C--S--P--G--Y--S--C--T--A--A--Y--P--A--G--P--S--P--A--

1021 AGCCGGCCACTGCCGCCGCCAACAACA AACTTCGTGAACTTCGGCGTCGGGGACTTGAATG  
845 AGCCGGCCACTGCCGCCGCCAACAACA AACTTCGTGAACTTCGGCGTCGGGGACTTGAATG  
282 Q--P--A--T--A--A--A--N--N--N--F--V--N--F--G--V--G--D--L--N--

1081 CGGTT CAGAGCCCCGGGATTCCGCAGAGCAACTCGGGAGTGTCCACGCTGCATGGTATCC  
905 CGGTT CAGAGCCCCGGGATTCCGCAGAGCAACTCGGGAGTGTCCACGCTGCATGGTATCC  
302 A--V--Q--S--P--G--I--P--Q--S--N--S--G--V--S--T--L--H--G--I--

1141 GAGCCTGGTAG GGAAGGGACCCGCGTGGCGGACCCTGACCGATCCCACC TCAACAGCTC  
965 GAGCCTGGTAG .....  
322 R--A--W--\*-- .....

1201 CCTGACTCT <sup>K</sup> CGGGGGAGAAGGGGCTCCCAACATGACCCTGAGTCCCCTGGATTTTGCAT  
.....  
.....

1261 TCACTCCTGCGGAGACCTAGGAACTTTTTCTGTCCACGCGGTTTGTCTTGCGCACGG  
.....  
.....

1321 GAGAGTTTGTGGCGGCGATTATGCAGCGTGCAATGAGTGATCCTGC AGCCTGGTCTTA  
.....  
.....

1381 GCTGTC CCCCAGGAGTGCCCTCCGAGAGTCCATGGGCACCCCGGTTGGAAGTGGGACT  
.....  
.....

1441 GAGCTCGGGCAGCGAGGGCCTGAGATCTGGCCGCCATTCCGCGAG <sup>K</sup> CCAGGGCCGGGCGC  
.....  
.....

1501 CCGGGCCTTTGCTATCTCGCCGTCGCCCGCCACGCACCCACCCGTATTTATGTTTTTAC  
.....  
.....

.....  
1561 CTAT TGCTGTAAGAAATGACGATCC  
.....  
.....

**Figura 12.** Secuencia de nucleótidos del gen *NKX2-5* (ENSG00000183072). Secuencia señalada con letras negras corresponde al exón 1. Secuencia señalada con letras azules corresponde al exón 2. La secuencia correspondiente al UTR se encuentra con una extensa etiqueta amarilla. La posición de los pares de oligonucleótidos (etiquetas de color: azul 1AR, verde 1BF, rojo 2AR, rosa 2BF y 2BR, azul agua 2CF y 2CR y verde 2DF) son señalados en sus posiciones correspondientes y en pares. Las bases en azul agua son mutaciones encontradas en esta tesis y referidas posteriormente en este trabajo; las bases en colores representan SNPs reportados para el gen. Primer número a la izquierda representa la posición en la secuencia, el segundo número la posición en región codificante, el tercero se refiere a la posición de los aminoácidos. Ref. [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org).

**Tabla 6. Descripción de los cebadores empleados en PCR, su producto y Tm.**

<b>Cebador</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño Cebador (n)</b>	<b>Producto</b>	<b>Tamaño Producto (pb)</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>EXT1 F</b>	5´ tag gtg aca cga aac tgc tc 3´	20	EXÓN 1 Completo	800	57
<b>EXT1 R</b>	5´ gct tct gat cct ttc aat cc 3´	20			
<b>Exón 1 a F</b>	5´tag gtg aca cga aac tgc tc 3´	20	1 a	544	57
<b>Exón 1 a R</b>	5´tgt agg cac gtg gat aga ag 3´	20			
<b>Exón 1 b F</b>	5´acg ccc ttc tca gtc aaa 3´	18	1 b	376	57
<b>Exón 1 b R</b>	5´ctg gcc ctg agt ttc ttg 3´	18			
<b>EXT2 F</b>	5´acg agg atc cct tac cat tac 3´	21	EXÓN 2 Completo	1217	57
<b>EXT 2 R</b>	5´aag ctg aaa gaa gca cac g 3´	19			
<b>Exón 2 a F</b>	5´gta ggt caa gcc gct ctt 3´	18	2 a	470	55
<b>Exón 2 a R</b>	5´tat aac cgt agg gat tga gg 3´	20			
<b>Exón 2 b F</b>	5´cag cgt gct gaa act cac 3´	18	2 b	518	56
<b>Exón 2 b R</b>	5´aga gtc agg gag ctg ttg a 3´	19			
<b>Exón 2 c F</b>	5´gcc aac aac aac ttc gtg aac 3´	21	2 c	549	61
<b>Exón 2 c R</b>	5´ ggg atc gtc att tct tac agc a 3´	22			
<b>Exón 2 d F</b>	5´agc ctg gtg tct tag ctg tc 3´	20	2 d	271	57
<b>Exón 2 d R</b>	5´aag ctg aaa gaa gca cac g 3´	19			

Se describen la secuencia y tamaño de los cebadores, el tamaño del producto y la Tm a la que fueron sometidos en la PCR. EXT1F (extendido 1 forward) EXT1R (extendido 1 reverse) para la amplificación del exón 1 completo. EXT2F (extendido 2 forward), EXT2R (extendido 2 reverse) para la amplificación del exón 2 completo.

Se estandarizaron las concentraciones de los compuestos para cada reacción (Tablas 7 y 8). Se realizaron 3 reacciones de PCR para el exón 1 y 5 para el exón 2.

**Tabla 7. Concentración de MgCl2 para cada reacción de los exones 1 y 2.**

	EXT1	Exón 1 a	Exón 1 b	EXT 2	Exón 2 a	Exón 2 b	Exón 2 c	Exón 2 d
<b>MgCl2</b>	2mM	2mM	2.5mM	2mM	3.5mM	2.5mM	2.5mM	2.5mM

Concentraciones de MgCl2.EXT1F (extendido 1 forward) y EXT1R (extendido 1 reverse) para la amplificación de el exón 1 completo. EXT2F (extendido 2 forward) y EXT2R (extendido 2 reverse) para la amplificación del exón 2 completo.

**Tabla 8. Concentraciones de la reacción.**

	Concentración
<b>AMORTIGUADOR</b>	1X
<b>DNTP</b>	0.2mM
<b>MgCl2</b>	VARIABLE
<b>Taq polimerasa</b>	1U
<b>CEBADOR F</b>	3pm
<b>CEBADOR R</b>	3pm
<b>H<sub>2</sub>O</b>	VARIABLE

Concentración de los compuestos para cada reacción. MgCl2 es variable dependiendo del exón (ver tabla 7). El agua destilada es variable dependiendo los demás volúmenes. Cebador F (forward) Cebador R (reverse)

Se realizaron las reacciones a sus concentraciones correspondientes, se agregó 1ul del DNA (concentración DNA: 50ng/ul) en estudio y finalmente se agregó agua destilada a la mezcla para obtener un volumen final de reacción de 25ul. Estas muestras fueron procesadas para PCR de acuerdo al siguiente programa en termociclador (Tabla 9).



**Tabla 9. Programa para PCR.**

	<b>Desnaturalización Inicial</b>	94°C/2min
35 C I C L O S	<b>Desnaturalización</b>	94°C/30s
	<b>Alineamiento</b>	Tm
	<b>Extensión</b>	72°C/30s
	<b>Extensión final</b>	72°C/30s
		4°C

Diseño estándar de programas para PCR en el termociclador empleando *Platinum Taq DNA* polimerasa.

Se realizó purificación de los productos de PCR y se evaluó calidad y concentración.

Posteriormente se realizó secuenciación de los productos:

- Secuenciación: Sistema de secuenciación automatizada por capilar ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems©).

Se evaluó electroferograma: Para el análisis de los electroferogramas de secuenciación se empleó el programa FinchTV© v1.4.0 (Geospiza™, Inc.)

Se realizó análisis comparativo de la secuencia del gen:

- Alineamiento: Para el alineamiento comparativo de secuencias se empleó el programa DNAMAN v3.0 (Lynnon Biosoft©)

Se registraron los resultados y se realizó el análisis clínico, molecular y estadístico. El análisis estadístico fue realizado con la supervisión del M. en C. Alfonso Reyes López.

## VII. RESULTADOS.

Se incluyeron 12 pacientes con CATVP, en todos ellos fue posible realizar evaluación clínica y estudio por secuenciación del gen *NKX2-5*. Los resultados se presentan en dos partes, la primera corresponde a las características clínicas de los pacientes y la segunda al análisis de la secuenciación del gen.

### 7.1 Resultados del análisis clínico de los pacientes con conexión anómala total de venas pulmonares.

Dentro del análisis clínico se incluyeron 12 pacientes en total, 8 pacientes masculinos y 4 femeninos con rangos de edad a partir de un mes hasta los 8 años, todos con diagnóstico de CATVP no sindrómica. En 7 de ellos, las venas pulmonares desembocaron en la región cardiaca (seno coronario), 3 en la región supracardiaca, 1 en la región infracardiaca (infradiaphragmática) y 1 fue mixta. Dentro de las cardiopatías asociadas, en todos se encontró CIA y 3 de ellos presentaron además PCA. Ninguno de los pacientes presentaba antecedentes heredofamiliares relevantes ni patologías agregadas, así como tampoco exposición a teratógenos potenciales. (Tablas 10, 11, 12 y 13).

**Tabla 10. Clasificación clínica de los pacientes en estudio.**

Paciente	Sexo	Edad	Desembocadura	Cardiopatía Asociada	HF	Otras alteraciones
1	M	6m	Seno Coronario	CIA	No	No
2	M	1m	Seno Coronario	CIA	No	No
3	F	7m	Seno Coronario	CIA	No	No
4	M	11m	Supracardiaca	CIA, PCA	No	No
5	F	5a	Seno Coronario	CIA	No	No
6	M	1m15d	Infracardiaca	CIA, PCA	No	No
7	F	8a	Seno Coronario	CIA	No	No
8	M	10m	Supracardiaca	CIA	No	No
9	M	4a	Supracardiaca	CIA	No	No
10	M	8a	Mixta	CIA, PCA	No	No
11	M	2a3m	Seno Coronario	CIA	No	No
12	F	1a6m	Seno Coronario	CIA	No	No

Se describen los datos clínicos. M: Masculino. F: Femenino. CATVP: Conexión anómala total de venas pulmonares. CIA: Comunicación interauricular. PCA: Persistencia conducto arterioso. HF: Antecedentes heredofamiliares.

**Tabla 11. Relación por sexo.**

<b>SEXO</b>	<b>#</b>	<b>%</b>	<b>Relación</b>
<b>Masculino</b>	8	66.6	2
<b>Femenino</b>	4	33.3	1

Número (#), porcentaje (%) y relación entre masculinos y femeninos encontrados.

**Tabla 12. Variedad de CATVP.**

<b>Desembocadura Venas pulmonares</b>	<b>#</b>	<b>%</b>
<b>Supracardiaca</b>	3	25
<b>Cardiaca</b>	7	58.3
<b>Infracardiaca</b>	1	8.3
<b>Mixta</b>	1	8.3

Variedad de CATVP según su sitio de desembocadura. Número (#), porcentaje (%).

**Tabla 13. Cardiopatías asociadas.**

<b>Cardiopatía Asociada</b>	<b>#</b>	<b>%</b>
<b>CIA</b>	12	100
<b>PCA</b>	3	25

Cardiopatías asociadas a CATVP. Número (#), porcentaje (%). CIA: comunicación interauricular; PCA: persistencia de conducto arterioso.

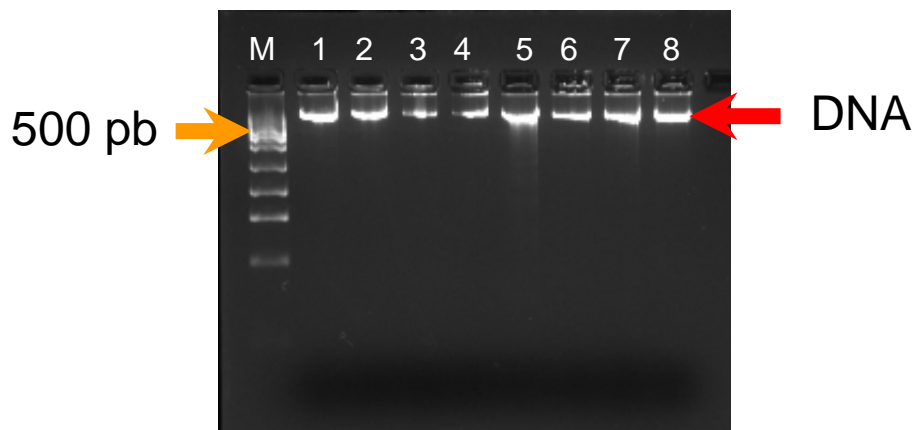
## 7.2 Resultados del análisis molecular.

Se extrajo DNA y se determinó su la concentración y pureza, se comprobó su integridad en geles de electroforesis (Tabla 14 y Fig. 13).

**Tabla 14. Concentración y pureza de las muestras de DNA.**

# (muestra DNA)	Concentración (ng/ul)	Pureza (260nm /280nm)
1	208	1.75
2	1148	2.18
3	286	1.81
4	225	1.77
5	887	3.37
6	454	1.85
7	152	1.67
8	66	1.91
9	171	1.76
10	142	1.88
11	243	1.85
12	477	1.76

Cuantificación de DNA de las 12 muestras incluidas en el estudio, concentraciones determinadas en el espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Thermo Fisher Scientific© Inc.).



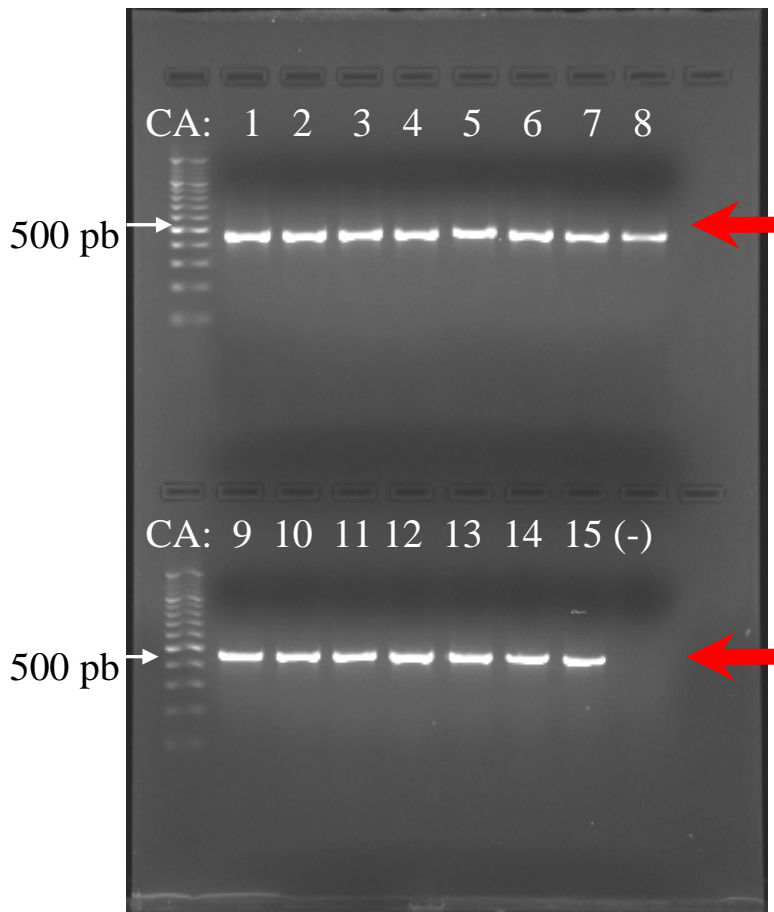
**Figura 13.** Electroforesis para comprobar la integridad del DNA de pacientes, se muestran como ejemplo las muestras 1 a 8. Gel de electroforesis con agarosa 2%.

Posteriormente se realizó estudio de PCR para amplificación de los dos exones con 3 reacciones para el exón 1 y 5 reacciones para el exón 2, se evaluó el tamaño de los productos por electroforesis en gel de agarosa (2%) por electroforesis, los tamaños esperados de los productos de PCR se muestran en la Tabla 15 y en la Fig. 14 se muestra un ejemplo representativo de los geles realizados, en este caso del producto 2 A.

**Tabla 15. Productos PCR**

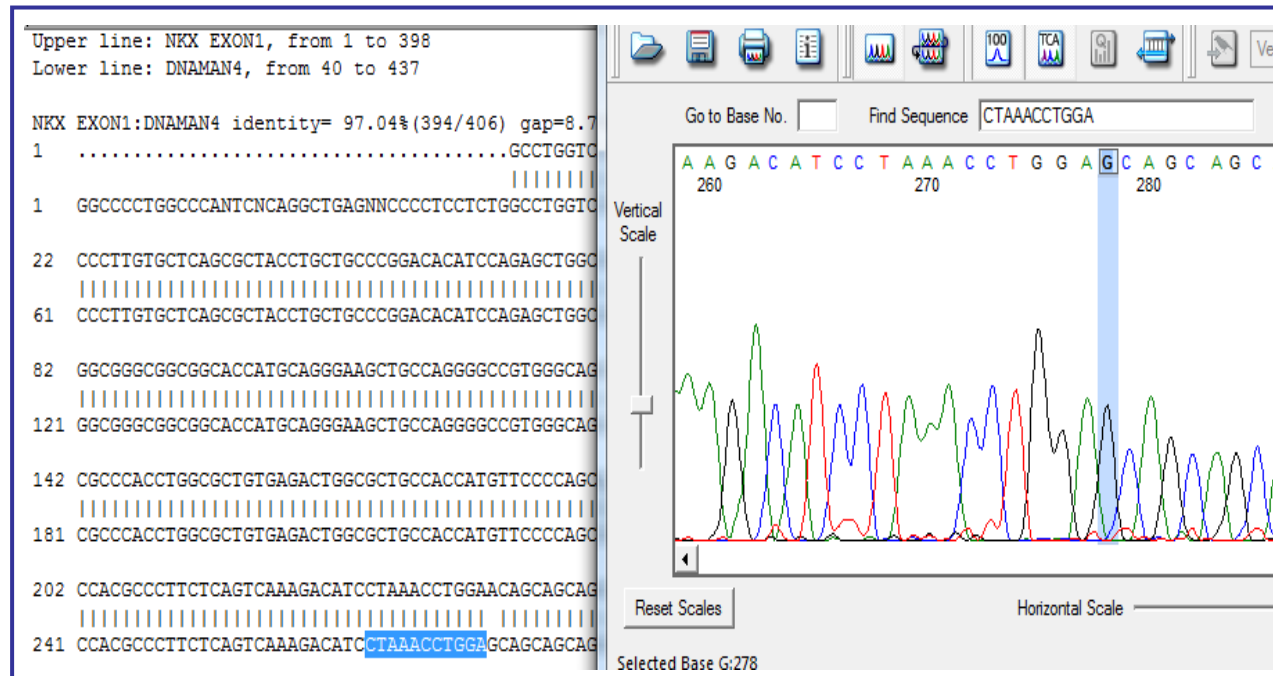
<b>Producto</b>	<b>Tamaño Esperado (pb)</b>
EXÓN 1 completo	800
EXÓN 1 A	544
EXÓN 1 B	376
EXÓN 2 completo	1217
EXÓN 2 A	470
EXÓN 2 B	518
EXÓN 2 C	549
EXÓN 2 D	271

Se muestra el tamaño esperado de los productos de PCR de los exones uno y dos completos y de sus fragmentos. Pb: pares de bases.



**Figura 14.** Electroforesis de los productos de la amplificación por PCR del fragmento 2A, con un producto esperado de 470pb, la flecha blanca señala el marcador de peso molecular a 500pb y los productos obtenidos de tamaño esperado (470pb) (flecha roja) de los pacientes 1 a 12 analizados en este estudio, los carriles 13 al 15 corresponden a otras muestras no incluidas en este análisis y el carril 16 es un control negativo. Gel de agarosa al 2%.

Se realizó secuenciación de los productos de PCR por el sistema de secuenciación automatizada por capilar ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems©) y se analizaron cada una de las secuencias en búsqueda de cambios y polimorfismos reportados mediante alineamiento y análisis en electroferograma con el programa DNAMAN y FinchTV© v1.4.0 (Geospiza™, Inc.) respectivamente. Se muestran dos ejemplos de electroferogramas y análisis de alineamiento de las secuencias de pacientes señalando un polimorfismo (Figs. 15 y 16).



**Figura 15.** Alineamiento y electroferograma del paciente número 1. A la izquierda se muestra el alineamiento de la secuencia de estudio (secuencia inferior) con la secuencia consenso (secuencia superior) del exón 1 con el programa DNAMAN. A la derecha se muestra electroferograma en el cual se analiza la secuencia en la región del cambio encontrado (polimorfismo rs2277923) marcado con sombra azul.





Se concentraron los resultados de los pacientes en 3 tablas, una con los polimorfismos identificados, otra con las mutaciones encontradas y una tercera concentrando todos los resultados. En la tabla 16 se muestran los polimorfismos encontrados. Se han reportado 11 polimorfismos en *NKX2-5*, de éstos, sólo se encontraron 2, el rs2277923 y el rs703752, tanto en los pacientes como en los controles. Para el polimorfismo rs2277923 cuatro pacientes muestran homocigocidad para G/G, 7 son heterocigotos para A/G y uno es homocigoto para el alelo silvestre (A/A). Para el polimorfismo rs703752, cinco pacientes son heterocigotos para G/T, cinco presentaron el alelo silvestre de manera homocigota (G/G) y uno no fue informativo ya que su secuenciación terminó de forma prematura, antes de la posición del polimorfismo mencionado.

**Tabla 16. Polimorfismos en pacientes.**

Ref SNP. ID	rs2277923	rs703752
Posición mRNA	239	1212
Alelos	R=A/G	K=G/T
Aminoácidos	21 Glu [E]	3'UTR
1	G/G	G/G
2	G/G	G/G
3	A/G	G/T
4	A/A	G/G
5	A/G	G/T
6	A/G	G/T
7	G/G	G/G
8	G/G	No informativo
9	A/G	G/T
10	A/G	G/G
11	A/G	G/T
12	A/G	G/G

Polimorfismos encontrados en pacientes. SNP: polimorfismo de nucleótido único. A: adenina; G: guanina; T: timina. Glu: glutamato. UTR: región no traducida. En el paciente número 8 el rs703752 no fue informativo por lo mencionado en el texto.

Se compararon los resultados obtenidos de los polimorfismos con 16 controles analizados previamente para este gen. Los controles correspondieron a sujetos sanos, mexicanos en tres generaciones, mayores de 18 años que con consentimiento informado, donaron una muestra de sangre para formar parte del banco de DNA del Departamento de Genética. Para el polimorfismo rs2277923, ocho de los controles son heterocigotos para A/G, siete son homocigotos para G/G y uno es homocigoto para el alelo silvestre (A/A). Para el polimorfismo rs703752 dos controles son heterocigotos para G/T y catorce son homocigotos para el alelo silvestre (G/G) (Tabla 17).

**Tabla 17. Polimorfismos en controles.**

Ref SNP. ID	rs2277923	rs703752
Posición mRNA	239	1212
Alelos	R=A/G	K=G/T
Aminoácidos	21 Glu [E]	3 UTR
1	A/G	G/T
2	A/G	G/G
3	A/G	G/G
4	A/G	G/G
5	A/G	G/G
6	A/G	G/G
7	G/G	G/G
8	G/G	G/G
9	G/G	G/G
10	G/G	G/G
11	A/G	G/T
12	G/G	G/G
13	G/G	G/G
14	A/A	G/G
15	A/G	G/G
16	G/G	G/G

Polimorfismos encontrados en controles. SNP: polimorfismo de nucleótido único. A: adenina; G: guanina; T: timina. Glu: glutamato. UTR: región no traducida.

Se compararon los polimorfismos encontrados en los controles y los pacientes con CATVP (Tabla 18).

**Tabla 18. Frecuencia de polimorfismos en controles y pacientes**

SNP	Alelos	México Controles (16)	México CATVP (12)
rs2277923	A/A	0.062	0.083
	A/G	0.5	0.58
	G/G	0.437	0.33
rs703752	G/G	0.875	0.5
	G/T	0.125	0.41
	T/T	-	-

Se describen la frecuencia de los polimorfismos encontrados en nuestra población en controles y pacientes.

Se analizaron también los cambios correspondientes a mutaciones tanto previamente reportadas como nuevas. En 5 de los 12 pacientes se encontraron mutaciones, todas ellas en el exón 2. En los cinco pacientes se presentaron por lo menos dos mutaciones.

La primera mutación encontrada está en la posición 548 mRNA y corresponde a un cambio de G/T, la cual está presente en los 5 pacientes (Fig. 17). En tres de estos mismos pacientes se encontró otra mutación en la posición 552 mRNA que corresponde a un cambio G/T (Fig. 18). Así mismo los cinco pacientes son heterocigotos para una mutación en la posición 596 mRNA con un cambio G/T (Fig. 19). Finalmente en un paciente se encontró una mutación en la posición 719 mRNA con un cambio A/G para la cual es heterocigoto (Fig. 20).

Se ponen como ejemplos representativos de los cambios en la secuencia (mutaciones) los electroferogramas de los pacientes Figs. 17 a 20. Todas las reacciones de secuenciación fueron realizadas en una sola cadena y con un cebador que cubriese la región de interés de los productos de PCR, ya fuese en dirección 5'-3' ó 3'-5' de la secuencia.

**Tabla 19. Mutaciones.**

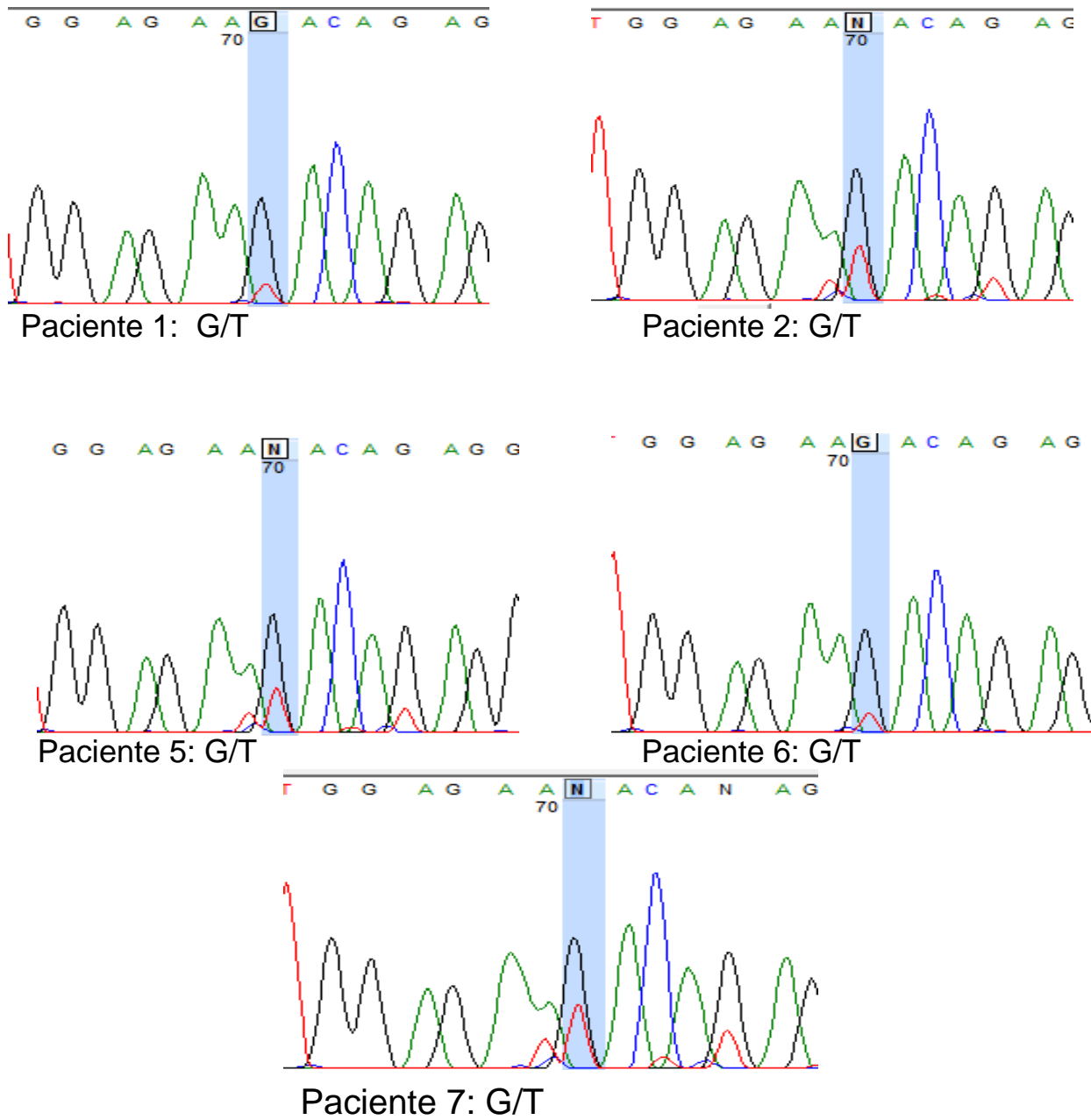
<b>Posición mRNA</b>	<b>548</b>	<b>552</b>	<b>596</b>	<b>719</b>
<b>Alelo silvestre</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>G</b>
<b>1</b>	G/T	G/G	G/T	G/G
<b>2</b>	G/T	G/T	G/T	G/G
<b>5</b>	G/T	G/T	G/T	G/G
<b>6</b>	G/T	G/G	G/T	G/G
<b>7</b>	G/T	G/T	G/T	A/G

Se describen las mutaciones encontradas en cinco pacientes, su posición en el mRNA y el alelo silvestre.

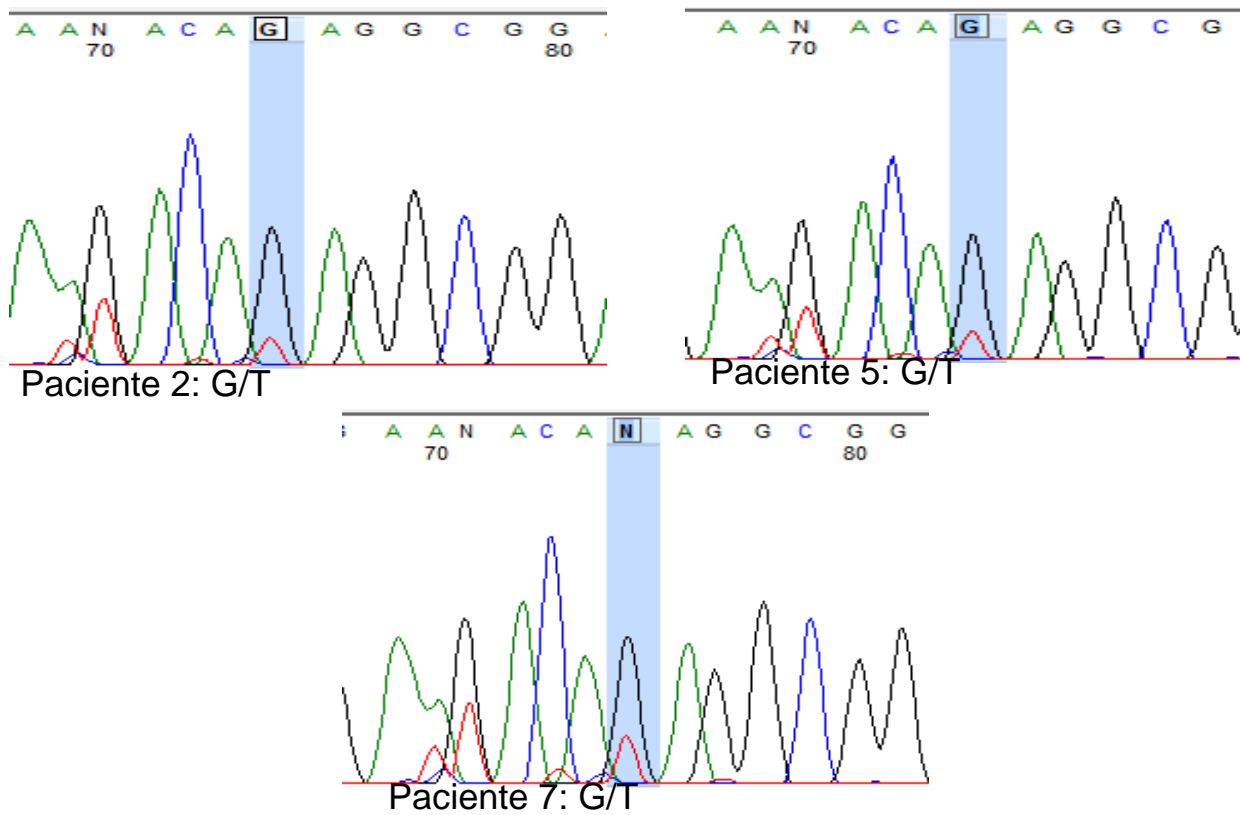
**Tabla 20. Polimorfismos y mutaciones.**

<b>SNP/Mut</b>	<b>rs2277923</b>	<b>rs703752</b>	<b>Mut</b>	<b>Mut</b>	<b>Mut</b>	<b>Mut</b>
<b>Posición mRNA</b>	<b>239</b>	<b>1212</b>	<b>548</b>	<b>552</b>	<b>596</b>	<b>719</b>
<b>Alelos</b>	<b>R=A/G</b>	<b>K=G/T</b>	<b>K=G/T</b>	<b>K=G/T</b>	<b>K=G/T</b>	<b>R=G/A</b>
<b>Aminoácidos</b>	<b>Glu</b>	<b>3'UTR</b>	<b>Lys/Asn</b>	<b>Glu/stop</b>	<b>Lys/Asn</b>	<b>Gln/Gln</b>
<b>Posición codón</b>	<b>21</b>	<b>UTR</b>	<b>124</b>	<b>126</b>	<b>140</b>	<b>181</b>
<b>1</b>	<b>G/G</b>	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	-	<b>G/T</b>	-
<b>2</b>	<b>G/G</b>	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	-
<b>3</b>	<b>A/G</b>	<b>G/T</b>	-	-	-	-
<b>4</b>	<b>A/A</b>	<b>G/G</b>	-	-	-	-
<b>5</b>	<b>A/G</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	-
<b>6</b>	<b>A/G</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	-	<b>G/T</b>	-
<b>7</b>	<b>G/G</b>	<b>G/G</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/T</b>	<b>G/A</b>
<b>8</b>	<b>G/G</b>	<b>No informativo</b>	-	-	-	-
<b>9</b>	<b>A/G</b>	<b>G/T</b>	-	-	-	-
<b>10</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>	-	-	-	-
<b>11</b>	<b>A/G</b>	<b>G/T</b>	-	-	-	-
<b>12</b>	<b>A/G</b>	<b>G/G</b>	-	-	-	-

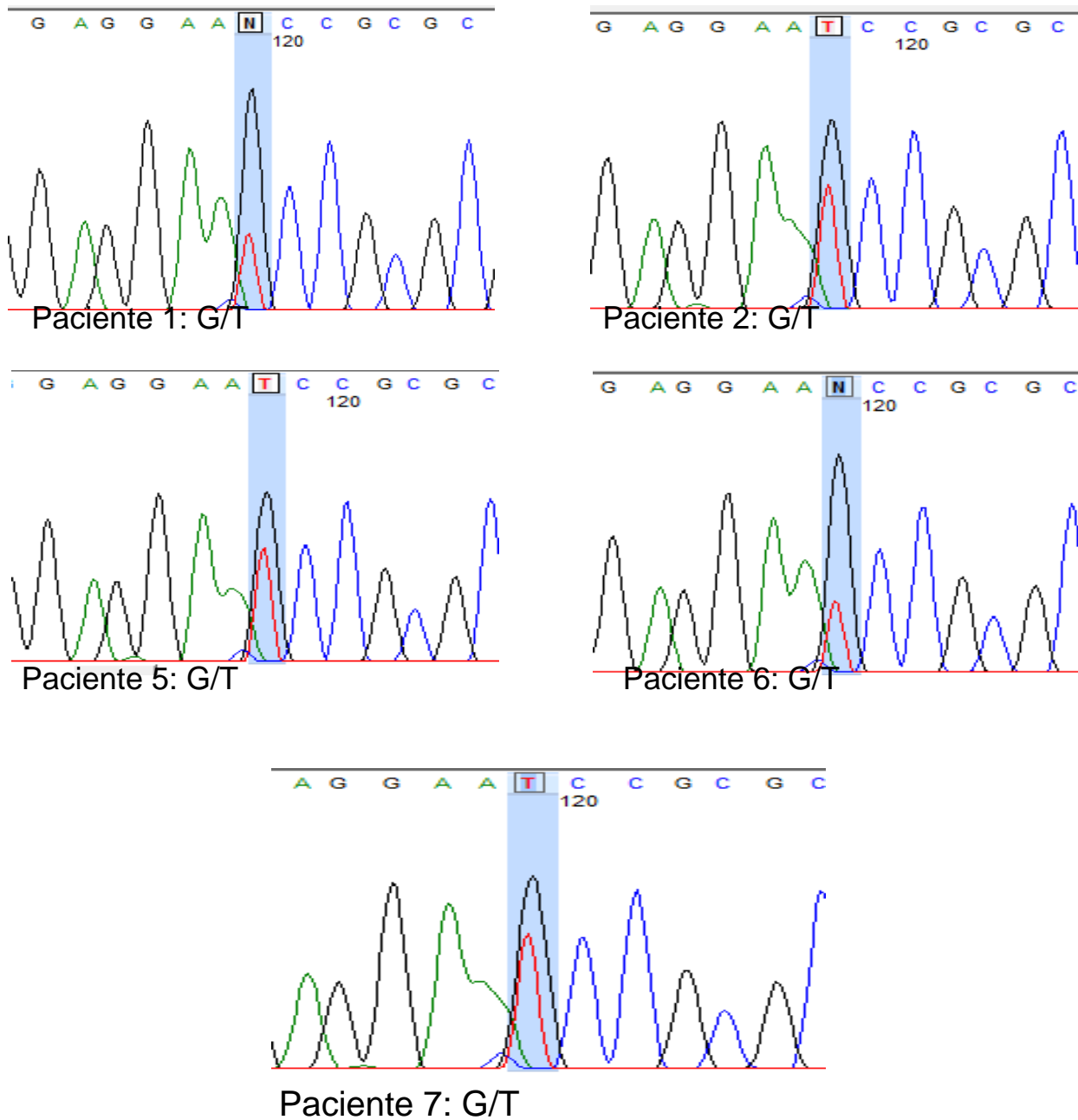
Mutaciones y polimorfismos de los 12 pacientes analizados. SNP (polimorfismo de nucleótido único). Mut: mutación. T: timina; G: guanina; A: adenina. Glu: glutamato; Gln: glutamina; Lys: lisina; Asn: asparagina; UTR: región no traducida. Los polimorfismos (SNP) son sinónimos, las mutaciones (Mut) que generan otro aminoácido son mutaciones de sentido equivocado y la que genera un codon de paro prematuro (stop) es una mutación sin sentido.



**Figura 17.** Electroferogramas correspondientes a las mutaciones encontradas en los pacientes 1, 2, 5, 6 y 7. Se muestra el lugar del cambio y las señales observadas corresponden a una roja (T: timina) y a una negra (G: guanina).

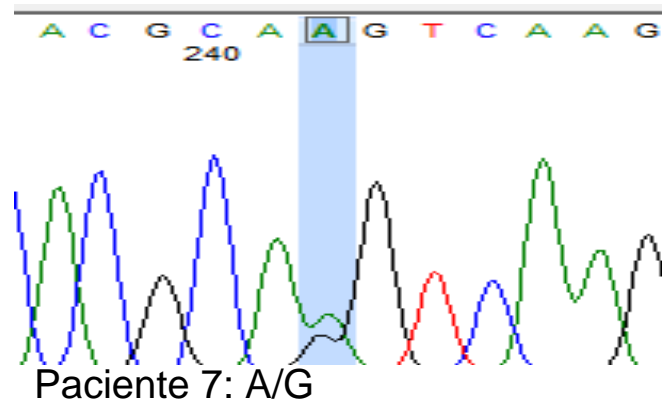


**Figura 18.** Electroferogramas correspondientes a las mutaciones encontradas en los pacientes 2, 5 y 7. Las señales observadas en el electroferograma corresponden a una negra (G:guanina) y una roja (T:timina).



**Figura 19.** Electroferogramas correspondientes a las mutaciones encontradas en los pacientes 1, 2, 5, 6 y 7. Señal negra corresponde a G: guanina y la señal roja corresponde a T: timina.





**Figura 20.** Electroferograma demostrando un cambio (mutación) en el paciente 7 con dos señales: verde A: adenina, negra G: guanina.

## VIII. DISCUSIÓN.

Las CC son las malformaciones congénitas más comunes, dentro de ellas la CATVP es una cardiopatía rara, que contribuye con el 1.5-3% de todas las CC<sup>3</sup> y la encontramos de forma aislada en el 67% de los casos. En el Hospital Infantil de México Federico Gómez es una de las cardiopatías con mayor número de consultas e intervenciones quirúrgicas. En este trabajo se estudiaron clínica y molecularmente a 12 pacientes con CATVP aislada.

Algunos de los datos clínicos de nuestros pacientes fue posible compararlos con la estadística reportada en 4 tesis de posgrado sobre el tema de CATVP, si bien estas tesis tienen enfoques diferentes al presente trabajo, ya que primordialmente están dirigidas al área de diagnóstico y morfología. Las referidas tesis recogen la experiencia en 4 Instituciones (HIMFG, Instituto Nacional de Pediatría, IPN e Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez y Hospital de Pediatría del CMNSXXI) en diferentes periodos y con diversas variables, si bien algunos de los datos son adecuados para considerarlos en nuestra población. Ninguna de estas tesis incluye análisis molecular<sup>17,18,19</sup>.

En relación a los antecedentes heredofamiliares, ninguno de los pacientes presentó antecedentes de importancia ni factores ambientales prenatales aparentes que pudieran identificarse por historia clínica registrada en el expediente. Esta circunstancia es similar a los reportado en la literatura<sup>8,9</sup> ya que no son comunes los casos familiares ni se han identificado teratógenos potenciales.

El análisis de las variables revisadas en los pacientes demostró que entre los 12 pacientes estudiados el género más frecuentemente afectado fue el masculino con una relación de 2:1 (M:F) la cual es menor a la observada en la literatura mundial de 3.6:1 (M:F)<sup>14</sup>. Esta situación de predominancia en masculinos fue corroborada con los datos encontrados en una de las tesis<sup>19</sup>.

En este estudio en relación a la clasificación de variedades de la CATVP, la desembocadura más frecuentemente encontrada fue la cardiaca (seno coronario), la cual se presentó con una frecuencia del 58%, lo cual se encuentra por encima de lo reportado en la literatura mundial que es del 20%, seguida de la supracardiaca con un porcentaje menor (25%) a la literatura (40-50%), la infracardiaca con el menor porcentaje (8.3% infradiafragmáticos) la cual es ligeramente menor a lo reportado (10-20%) y la mixta en la que se observó un porcentaje similar (8.3% vs 10%)<sup>14,15</sup> (Tabla 21).

La cardiopatía asociada con mayor frecuencia a la CATVP en estudios previos es la CIA (92%) seguida de la PCA (22%) y otras cardiopatías. Nuestros resultados fueron semejantes con un 100% y 25% respectivamente<sup>15</sup> (Tabla 21).

**Tabla 21. Comparación de la clasificación de la CATVP y cardiopatía asociada .**

<b>Poblaciones</b>	<b>INP (116)</b>	<b>HIMFG (61)</b>	<b>CMN (99)</b>	<b>Mundial</b>	<b>HIMFG CATVP (12)</b>
Supracardiaca	45%	34.4%	42%	40-50%	25%
Cardiaca	39%	47.5%	39%	20%	58%
Infracardiaca	6.7%	3.2%	12%*	10-20%	8.3%
Mixta	5%	14.7%	7.1%	10%	8.3%
Cardiopatía asociada	PCA	PCA	PCA	PCA	PCA

Se muestran los resultados de 3 tesis de posgrado sobre el tema, correspondiendo al INP (Instituto Nacional de Pediatría con 116 pacientes)<sup>17</sup>, HIMFG (Hospital Infantil de México Federico Gómez con 61 pacientes)<sup>18</sup>, CMN (Centro Médico Nacional Siglo XXI con 99 pacientes, \*no se contó con el dato de la variedad infracardiaca, el número mostrado es el inferido con la información presentada en este estudio)<sup>19</sup>; la quinta columna muestra lo reportado mundialmente y la última columna muestra lo reportado en este trabajo<sup>14,15</sup>.

Si bien parecería que para el presente estudio la variedad cardiaca es la más frecuente en nuestra población debemos considerar que esta aseveración no puede hacerse debido al tamaño pequeño de la muestra con solo 12 pacientes, mientras que el número mínimo de las demás series fue 99. Sin embargo llama la atención que en el estudio del HIMFG<sup>18</sup> fue encontrado el mismo resultado, por lo que no podemos descartar que esta variedad sea realmente la más frecuente en nuestra población.

Las CC en general son enfermedades con herencia multifactorial. Dentro de los factores genéticos se han encontrado una variedad de genes relacionados con el desarrollo y patología cardiaca. De estos, *NKX2-5* es uno de los factores de transcripción expresados muy tempranamente durante el desarrollo cardiaco, al cual se le atribuye una capacidad multifuncional dada la variedad de patología cardiaca asociada. *NKX2-5* contribuye con aproximadamente un 3-4% de mutaciones en todas las CC. Sin embargo, al menos en dos estudios en series de pacientes y tejido cardíaco se han detectado mutaciones de este gen. En particular en el estudio de Draus y colaboradores<sup>4</sup> se reportaron cambios heterocigotos en pacientes con CATVP en *NKX2-5*, encontrando 2 cambios sinónimos: Glu21Glu (exón 1), Ala284Ala (exón 2).

A pesar de diversas investigaciones sobre CC, la CATVP no se ha asociado hasta ahora con alguna causa genética específica, si bien se han reportado algunas familias en las cuales hay segregación de la enfermedad, así como algunos rearrreglos cromosómicos los cuales han permitido su relación con algunos loci<sup>12,20,21,23,24</sup>. Se insiste en que las CC son de etiología multifactorial principalmente, y que mutaciones en genes como *NKX2-5* serían uno de los factores precipitantes de esta situación al intervenir en las redes génicas de desarrollo, tal vez con un efecto sumativo o aditivo a la presentación de la patología, tomando en consideración otros factores tanto genéticos como ambientales<sup>9</sup>. Para determinar esta situación, en primer lugar es necesario establecer si hay alteraciones en la secuencia del gen en pacientes con CATVP.

En los 12 pacientes analizados, se identificaron 2 de los 11 polimorfismos reportados ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Los polimorfismos reportados fueron rs2277923 el cual corresponde a un cambio de A/G y el polimorfismo rs703752 que corresponde a un cambio G/T. El primer polimorfismo es sinónimo ya que el cambio de nucleótido no genera un cambio de aminoácido. El segundo polimorfismo se encuentra en la región UTR 3'. Ninguno de los 2 polimorfismo se ha relacionado directamente a alguna patología y también se han encontrado en controles normales.

Como se observa en la Tabla 22 los SNP encontrados en nuestra población tanto de controles como pacientes se reportan en otras poblaciones. El SNP rs2277923 lo encontramos muy frecuentemente en nuestra población. La frecuencia del homocigoto A/A (silvestre) en nuestra población es similar a lo reportado en africanos pero esta frecuencia es mayor en poblaciones europeas y asiáticas. La frecuencia del heterocigoto A/G es similar en todas estas poblaciones (nuestro estudio, europeos, asiáticos y africanos). Por otra parte, la frecuencia del homocigoto G/G de nuestra población es similar a la reportada en asiáticos, pero la frecuencia es mayor en africanos y significativamente menor en europeos.

El polimorfismo rs703752 con el cambio G/T lo observamos en cerca de la mitad de nuestros pacientes, lo cual es similar a lo reportado en la población europea y esta en menor proporción en nuestros controles, en asiáticos y ligeramente menor en africanos (Tabla 22).

**Tabla 22. Frecuencias de polimorfismos reportados en México y el mundo.**

SNP	Alelos	Europea HapMap CEU (116)	Europea HapMap CEU (120)	Europea AFF_EUR_PANEL (46)	Asiática HapMap JPT (88)	Asiática HapMap JPT (90)	Asiática HapMap HCB (90)	Asiática HapMap HCB (90)	Asiática AFD_EUR_PANEL (48)	África Subsahariana HapMap YRI (118)	África Subsahariana HapMap YRI (120)	Afroamericana AFF_EUR_PANEL (44)	México Control (16)	México CATVP (12)
<b>rs2277923</b>	A/A	0.448	-	0.435	0.114	-	0.2	-	0.125	0.068	-	0.045	<b>0.062</b>	<b>0.083</b>
	A/G	0.517	-	0.478	0.386	-	0.467	-	0.5	0.305	-	0.5	<b>0.5</b>	<b>0.58</b>
	G/G	0.034	-	0.087	0.5	-	0.333	-	0.375	0.627	-	0.455	<b>0.437</b>	<b>0.33</b>
<b>rs703752</b>	G/G	0.448	-	-	0.818	-	0.867	-	-	0.627	-	-	<b>0.875</b>	<b>0.5</b>
	G/T	0.466	1	-	0.159	1	0.133	1	-	0.322	1	-	<b>0.125</b>	<b>0.41</b>
	T/T	0.086	-	-	0.023	-	-	-	-	0.051	-	-	-	-

Se muestran los alelos encontrados en las distintas poblaciones así como en este estudio. SNP: polimorfismo de nucleótido único. A: adenina; G:guanina; T:timina. (n) número de pacientes analizados.

El polimorfismo rs2277923, de acuerdo a lo observado en nuestros controles y pacientes analizados, es muy frecuente en nuestra población. El análisis estadístico no demostró una p significativa (Tabla 23).

**Tabla 23. Análisis estadístico del polimorfismo rs2277923**

```
*positivos rspolimorfismo 2277923
. tabi 15 11 \ 1 1, cell chi2 column exact expected row
```

```
+-----+
| Key                                         |
+-----+
| frequency                                  |
| expected frequency                         |
| row percentage                             |
| column percentage                          |
| cell percentage                            |
+-----+
```

row	1	2	Total
1	15	11	26
	14.9	11.1	26.0
	57.69	42.31	100.00
	93.75	91.67	92.86
	53.57	39.29	92.86
2	1	1	2
	1.1	0.9	2.0
	50.00	50.00	100.00
	6.25	8.33	7.14
	3.57	3.57	7.14
Total	16	12	28
	16.0	12.0	28.0
	57.14	42.86	100.00
	100.00	100.00	100.00
	57.14	42.86	100.00

```
Fisher's exact = Pr= 1.000
1-sided Fisher's exact = 0.683
```

Prueba exacta de Fisher. Se muestra una p (Pr): 1 para el polimorfismo rs2277923 entre pacientes y controles.

En nuestros pacientes este polimorfismo se observa en su mayoría de forma heterocigota independientemente de su desembocadura y cardiopatía asociada. La forma homocigota se observó en formas cardíacas y supracardiacas y con CIA como única cardiopatía asociada (Tabla 24).

**Tabla 24. Polimorfismos en pacientes.**

Paciente	Sexo	Desembocadura	Cardiopatía asociada	rs2277923 Homoigoto (SNP-Silvestre)	rs2277923 Heterocigoto	rs703752 Homocigoto (SNP-Silvestre)	rs703752 Heterocigoto
1	M	Seno coronario	CIA	+		+	
2	M	Seno coronario	CIA	+		+	
3	F	Seno coronario	CIA		+		+
4	M	Supracardiaca	CIA, PCA	+		+	
5	F	Seno coronario	CIA		+		+
6	M	Infracardiaca	CIA, PCA		+		+
7	F	Seno coronario	CIA	+		+	
8	M	Supracardiaca	CIA	+		NI	NI
9	M	Supracardiaca	CIA		+		+
10	M	Mixta	CIA, PCA		+	+	
11	M	Seno coronario	CIA		+		+
12	F	Seno coronario	CIA		+	+	

Se muestran los polimorfismos encontrados en los pacientes, así como el fenotipo de estos. NI: No informativo.

El polimorfismo rs703752 no fue tan frecuente en nuestros pacientes como el polimorfismo anterior y se presentó en todos los casos de forma heterocigota independientemente de la desembocadura y la cardiopatía asociada. En este caso sí hubo una diferencia estadística entre la frecuencia del polimorfismo en los pacientes y en los controles (p=0.08). Es importante aclarar que debido a que en la secuencia génica de uno de los pacientes analizados, no fue posible revisar la región correspondiente al polimorfismo rs703752, se eliminó del análisis (Tabla 25).

**Tabla 25. Análisis estadístico del polimorfismo rs703552**

. \*positivos polimorfismo rs703752  
 . tabi 2 5 \ 14 6, cell chi2 column exact expected row

```

+-----+
| Key                                         |
+-----+
| frequency                                  |
| expected frequency                         |
| row percentage                             |
| column percentage                          |
| cell percentage                            |
+-----+
  
```

row	col 1	col 2	Total
1	2	5	7
	4.1	2.9	7.0
	28.57	71.43	100.00
	12.50	45.45	25.93
	7.41	18.52	25.93
2	14	6	20
	11.9	8.1	20.0
	70.00	30.00	100.00
	87.50	54.55	74.07
	51.85	22.22	74.07
Total	16	11	27
	16.0	11.0	27.0
	59.26	40.74	100.00
	100.00	100.00	100.00
	59.26	40.74	100.00

Fisher's exact = Pr= 0.084  
 1-sided Fisher's exact = 0.071

Prueba de Fisher exacta. Polimorfismo rs703552. Se muestra una p:0.084 que demuestra cierta dependencia entre las variables.

Si bien la presencia de polimorfismos se ha asociado a la presentación de diversas patologías complejas multifactoriales, como por ejemplo lo son las CC, no podemos concluir con este tamaño de muestra que se trate de esta situación. Además, estos polimorfismos han sido reportados con una alta frecuencia en al menos una población más que es la población alemana<sup>34</sup>.

Se encontraron 4 mutaciones distintas no previamente reportadas. Las nuevas mutaciones encontradas en este trabajo están en las posiciones 548, 552, 596 y 719 del mRNA de *NKX2-5*.



Las mutaciones corresponden a transversiones G/T para los tres primeros cambios y la mutación en la posición 719 mRNA es una transición A/G (Fig. 12). La mutación en la posición 548 del mRNA corresponde al aminoácido 124. Éste codifica una K (lisina) y cambia a una N (asparagina) la cual es una mutación de sentido equivocado. La mutación en la posición del nucleótido 552 corresponde al aminoácido 126, el cual codifica una E (glutamato) que cambia por un codon de paro prematuro, la cual es una mutación sin sentido. La mutación del nucleótido 596 corresponde al aminoácido 140. Éste codifica una K (lisina) y cambia a una N (asparagina) la cual es una mutación de sentido equivocado. La mutación del nucleótido 719 corresponde al aminoácido 181 que codifica una Q (glutamina) y es una mutación sinónima ya que no hay cambio de aminoácido (glutamina por glutamina) (Tabla 20).

Para determinar si estas mutaciones cambiaban aminoácidos evolutivamente conservados y por lo tanto presumiblemente importantes para la función de la proteína, la secuencia de aminoácidos de la proteína NKX2-5 fue comparada con la secuencia de aminoácidos de la proteína en los siguientes organismos cuyas secuencias proteicas fueron obtenidas de la base de datos de [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) y comparadas mediante el programa COBALT (*Constraint-based multiple alignment tool*): *Drosophila* (ABM87626, gi124000235), *Xenopus laevis* (AAG42363, gi11991859), *Canis familiaris* (ABC71311, gi85542661), *Rattus norvegicus* (NP446103, gi16758952), *Mus musculus* (NP032726, gi6679068), *Equus caballus* (XP001917241, gi194219591), *Pan Troglodytes* (XP518104, gi114603418) y finalmente la secuencia en humanos, *Homo sapiens* (P52952, gi1708211) Fig. 21. Se muestra la posición de los aminoácidos correspondientes a las mutaciones en la Fig. 22.

Accession	Description
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">ABM87626.1</a>	NK2 transcription factor related, locus 5 (Drosophila) [synthetic construct] >ref NP_004378.1  NK2 transcription fact
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">AAG42363.1</a>	Nlx2-5 [Xenopus laevis]
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">ABC71311.1</a>	NKX2-5 [Canis familiaris] >ref NP_001010959.1  NK2 transcription factor related, locus 5 [Canis lupus familiaris] >
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">NP_446103.1</a>	NK2 transcription factor related, locus 5 [Rattus norvegicus] >sp O35767.1 NKX25_RAT RecName: Full=Homeobo:
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">NP_032726.1</a>	NK2 transcription factor related, locus 5 [Mus musculus] >sp P42582.1 NKX25_MOUSE RecName: Full=Homeobo
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">XP_001917241.1</a>	PREDICTED: similar to transcription factor NKX2.5, partial [Equus caballus]
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">XP_518104.2</a>	PREDICTED: NK2 transcription factor related, locus 5 [Pan troglodytes]
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">P52952.1</a>	RecName: Full=Homeobox protein Nlx-2.5; AltName: Full=Homeobox protein NK-2 homolog E; AltName: Full=Can

**Figura 21.** Listado de organismos con los que se comparó la secuencia de aminoácidos humana de NKX2-5.

<a href="#">✓ ABM87626</a>	81	KCASAFPAAPAFYPRAYSDPDPADKPAEKKELCALQKAVLEKTELDNAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	160
<a href="#">✓ AAG42363</a>	70	KGPSPPFG-----	77
<a href="#">✓ ABC71311</a>	80	KCAPAFPGAPAFYPRAYGDPDTAKDPADKPKELCSLQKAVLEKPELDGAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	159
<a href="#">✓ NP_446103</a>	80	KCSPAFTAPTFFYPAYGDPDPADKPKELCALQKAVLDKAEVLDGAERRRPRRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	159
<a href="#">✓ NP_032726</a>	80	KCSPAFAAPTFFYPAYGDPDPADKPKELCALQKAVLDKAEVLDGAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	159
<a href="#">✓ XP_001917241</a>	38	KCAPAFP-APAFYTRAYGDPDPGKDFRGDKKELCALQKAVLEKPELDGAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	116
<a href="#">✓ XP_518104</a>	81	KCASAFPAAPAFYPRAYSDPDPADKPAEKKELCALQKAVLEKTELDNAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	160
<a href="#">✓ P52952</a>	81	KCASAFPAAPAFYPRAYSDPDPADKPAEKKELCALQKAVLEKTELDNAERPRARRRKPPEVLFSSQAQVYELERRFKQQ	160
<a href="#">✓ ABM87626</a>	161	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL-PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	239
<a href="#">✓ AAG42363</a>		-----	
<a href="#">✓ ABC71311</a>	160	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL--PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	237
<a href="#">✓ NP_446103</a>	160	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL----PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	235
<a href="#">✓ NP_032726</a>	160	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL----PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	235
<a href="#">✓ XP_001917241</a>	117	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL--PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	194
<a href="#">✓ XP_518104</a>	161	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGLPPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	240
<a href="#">✓ P52952</a>	161	RYLSAPERDQLASVLKLTQVFIWFQNRRYKCKRQRQDQITLVLGL-PPPPPPARRIAVFLVRDGGKPCLGDSAPYAP	239

**Figura 22.** Se muestra la secuencia de aminoácidos de NKX2-5 en humanos comparada con los organismos referidos en el texto. A la izquierda se muestra las claves de identificación de las secuencias de aminoácidos analizadas, la inferior correspondiendo a la proteína humana. En los recuadros de colores se muestra la posición de los aminoácidos involucrados: Naranja corresponde al 124 (K) y 126 (E), rojo al 140 (K) y azul al aminoácido 181 (Q).

La proteína NKX2-5 está formada por 324 aminoácidos, en relación a su estructura, los aminoácidos 9 al 19 forman el dominio TIN, los aminoácidos 138 al 197 conforman el dominio de unión a DNA y los aminoácidos 214 a 230 se relacionan al dominio NK-2 específico. Los aminoácidos 124 y 126 en los que se identificaron cambios en este estudio, no se encuentran en ninguno de estos dominios. Los cambios encontrados en los aminoácidos 140 y 181 se encuentran en el homeodominio y en particular la mutación en el aminoácido 140 corresponde a una mutación de sentido equivocado. La experiencia reportada en la literatura en relación con las mutaciones en esta región que son mutaciones de sentido equivocado o sin sentido dentro del homeodominio y las mutaciones sin sentido que generan proteínas truncadas con pérdida del homeodominio, alteran la capacidad de unión del DNA de la proteína y los fenotipos asociados a estas mutaciones son probablemente secundarios a haploinsuficiencia<sup>2</sup>. En relación a mutaciones de NKX2-5 e hipotiroidismo se ha propuesto tanto una reducción de las propiedades de transactivación como un efecto dominante negativo<sup>21</sup>.

En relación a las mutaciones reportadas en éste estudio y los fenotipos encontrados en los pacientes, las mutaciones de sentido equivocado (aminoácidos 124 y 140) se asociaron a pacientes con desembocadura a seno coronario (80%) e infracardiaca (20%) y con CIA (80%) como única cardiopatía asociada. La mutación sin sentido en el aminoácido 126 se asoció con pacientes con desembocadura en seno coronario (100%) y CIA (100%) como única cardiopatía asociada. La mutación sinónima (en el aminoácido 181) se presentó solamente en un paciente femenino con desembocadura a seno coronario y CIA quien presentaba los 4 cambios en la secuencia (Tabla 26).

**Tabla 26 . Mutaciones encontradas en los pacientes estudiados y su relación con la desembocadura de las venas pulmonares y la cardiopatía asociada.**

Paciente	Sexo	Desembocadura	Cardiopatía asociada	Mutación 548	Mutación 552	Mutación 596	Mutación 719
1	M	Seno coronario	CIA	+		+	
2	M	Seno coronario	CIA	+	+	+	
3	F	Seno coronario	CIA				
4	M	Supracardiaca	CIA, PCA				
5	F	Seno coronario	CIA	+	+	+	
6	M	Infracardiaca	CIA, PCA	+		+	
7	F	Seno coronario	CIA	+	+	+	+
8	M	Supracardiaca	CIA				
9	M	Supracardiaca	CIA				
10	M	Mixta	CIA, PCA				
11	M	Seno coronario	CIA				
12	F	Seno coronario	CIA				

M: masculino. F: femenino. CIA: comunicación interauricular. PCA: persistencia de conducto arterioso.

Sobre estos hallazgos deben hacerse varias consideración, la primera que fueron realizados en una sola cadena de DNA y de ser posible deben confirmarse con la secuencia complementaria correspondiente.

Con los resultados obtenidos en este estudio se corrobora que el gen *NKX2-5* es un gen polimórfico en nuestra población al igual que para otras poblaciones, en particular para dos polimorfismos (rs2277923 y rs703752), los cuales se encuentran, el primero en el exón 1 y el segundo en la región UTR del exón 2. También estos resultados demuestran que sí existen mutaciones en este gen en pacientes con CATVP, si bien hay reportes que identifican esta situación, este estudio correspondería a una de las series más extensas.

Llama la atención la presencia de más de una mutación o de un polimorfismo en un mismo paciente, pero no debemos perder de vista que se trata de una patología multifactorial y que por ello tenga un efecto sumatorio que sea importante para la presentación de la patología.

Ya que los pacientes con CATVP tienen varias mutaciones y polimorfismos, a futuro sería importante determinar haplotipos para saber si son heterocigotos compuestos o si todos los cambios están en un mismo alelo. Esto es importante para evaluar la actividad de la proteínas, aún cuando pueda haber dominancia negativa.

Finalmente queda la incógnita de cómo estas mutaciones podrían alterar la función de *NKX2-5* y contribuir a la alteración cardíaca del tipo CATVP, una consideración sería que las mutaciones de *NKX2-5* ocasionan una alteración de la función como factor de transcripción en las redes génicas que intervienen en el desarrollo cardíaco, por tanto, existen alteraciones tanto en el sistema de conducción como en la estructura normal del corazón por este factor de transcripción, lo que ocasiona falla en el reconocimiento del sitio de emergencia habitual de los grandes vasos, en particular de las venas pulmonares.

Sin embargo en este tipo de patologías multifactoriales no puede descartarse el impacto ambiental y seguramente también de otros genes de las redes mencionadas cuya acción aditiva modifica el desarrollo cardiaco normal.

## IX. REFERENCIAS

- 1-Pierpont ME, Basson CT, Benson DW et al. (2007) Genetic basis for congenital heart defects. *Circ* **115**:3015-1018.
- 2-Krista LC, Yuñzey KE, Benson DW (2006) Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol* **68**:97-121.
- 3-Sánchez R, Galaviz C, Sierra A et al. (2006) Trascendencia de los factores ambientales y genéticos en las cardiopatías congénitas: el caso de la enzima MTHFR. *Perinatol Reprod Hum* **20**:39-47
- 4- Draus J.M, Hauck MA, Goetsch M et al. (2009) Investigation of somatic NKX2-5 in congenital heart disease. *J Med Genet* **46**:115-122.
- 5-Nemer M (2008) Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovasc Pathol* **17**:48-54.
- 6-Gruber P, Epstein JA (2004) Development Gone Array. Congenital Heart Disease. *Circ Res* **94**:273-283.
- 7-Schott JJ, Benson DW, Basson CT (1998) Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* **281**:108-11.
- 8-Nora J (1968) Multifactorial inheritance hypothesis for the etiology of congenital heart disease. The genetic- environmental interaction. *Circ* **38**:604-617.
- 9-Roos-Hesselink J.W, Kerstjens-Frederikse WS, Meijboom FJ, et al. (2005) Inheritance of congenital heart disease. *Neth Heart J* **13**:88-91.
- 10-Klein E (1999). Genética de las cardiopatías congénitas. *Rev Per Card* **25**:1609-19.
- 11-Lorenzo G, Ramos MV (2005) Protocolos diagnósticos y terapéuticos en cardiología pediátrica. Anomalías de las venas pulmonares. *Protocolos de la Sociedad de Cardiología Pediátrica* **15**:1-13.
- 12-Bleyl S, Nelson L, Odelberg, et al. (1995) A gene for familial Total Anomalous Pulmonary Venous Return maps to chromosome 4q13-q12. *Am J Hum Genet* **56**:408-415.
- 13-Dimpna A, Girona J, Bonjoch C et al. (2007) Retorno venosos pulmonar total anómalo: ecocardiografía y cirugía precoz. *Rev Esp Cardiol* **53**:810-814.
- 14-Manzo-Ríos MA, Anaya-García JE, Ruíz-Gastelum E et al. (2007) Conexión Anómala Total de Venas Pulmonares Infracardiaca. Presentación de un caso. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son* **24**:42-47

- 15-Muñoz L, Kuri M, Sánchez CA et al. (2008) Conexión anómala de venas pulmonares. Correlación anatomoembriológica. *Arch Card Méx* **78**: 247-254.
- 16-Muñoz L, Sánchez CA, Kuri M et al. (2007) Estudio morfológico de la conexión anómala total de venas pulmonares. *Arch Card Méx* **77**:265-274.
- 17- Ferreiro A (2002) Conexión anómala total de venas pulmonares. Experiencia en el Instituto Nacional de Pediatría [tesis] Instituto Nacional de Pediatría.
- 18- García RM (2006) Cateterismos cardíacos en el manejo de la conexión anómala total de venas pulmonares. Experiencia en el hospital infantil de México Federico Gómez antes y después de la ecocardiografía bidimensional [tesis] Hospital Infantil de México Federico Gómez.
- 19- Castillo AM (2007) Aspectos epidemiológicos de niños con conexión anómala total de venas pulmonares atendidos en el hospital de pediatría del centro médico nacional siglo XXI [tesis] Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- 20-Bleyl SB, Botto LD, Carey JC (2006) Analysis of a Scottish founder effect narrows the TAVP-1 gene interval to chromosome 4q12. *Am J Med Genet Part A* **140A**:2368-2373.
- 21-Acquati F, Russ A, Taramelli R et al. (2000) Nonsyndromic Total Anomalous Venous Return Associates with a de novo translocation involving chromosomes 10 and 21 t(10;21)(q23.1;q11.2). *Am J Med Genet* **95**:285-286.
- 22-Dentice M, Cordeddu V, Rosica A et al. (2006) Missense mutation in the transcription factor NKX2-5; A novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J Clin Endocrinol Metab* **91**:1428–1433.
- 23-Harris D, Siu BL, Hummel M et al. (2004) Mosaic Ring 12p and total anomalous pulmonary venous return. *Am J Med Genet* **131A**:19-93.
- 24-Cinquetti R, Badi I, Camptone M et al. (2008) Transcriptional Deregulation and a Missense Mutation Define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return. *Hum Mut* **29**:468-474.
- 25-Franco D, Domínguez J, de Castro MP et al. (2002) Regulación de la expresión génica en el miocardio durante el desarrollo cardíaco. *Rev Esp Cardiol* **55**:167-84.
- 26-Bentham J, Bhattachara S (2008) Genetic mechanisms controlling cardiovascular development. *Ann N Y Acad Sci* **1123**:10-9.
- 27- Strachan T, Read AP (1999) Human Molecular Genetics 2. 3<sup>rd</sup> ed. New York and London. Garland Science.
- 28-Holland PW, Booth HAF, Bruford EA et al. (2007) Classification and nomenclature of all human homeobox genes. *BMC Biology* **5**:47.

29-Bartlett H, Sutherland L (2007) Transient Early Embryonic Expression of Nkx2-5 Mutations linked to congenital heart defects in human causes heart defects in *Xenopus laevis* **236**:2475-2484.

30-Akcaoy M, Cengiz FB, Inceoglu B et al. (2008) The effect of p.Arg25Cys alteration in *NKX2-5* on conotruncal heart anomalies: mutation or polymorphism? *Pediatr Cardiol* **29**:126-129.

31- Hirayama-Yamada K, Kamisaco M, Akimoto K et al. (2005) Phenotypes with *GATA4* or *NKX2-5* mutations in familial atrial septal defect. *Am J Med Genet* **135A**:47-52.

32-Jay P, Harris BS, Buerger A (2004) Function Follows Form: Cardiac Conduction System Defects in Nkx2-5 Mutation. *The anatomical Record Part A* **280A**:966-972.

33-Jay P, Harris BS, Maguire CT et al. (2004) Nkx2-5 mutation causes anatomic hypoplasia of the cardiac conduction system. *J clin invest* **113**:1130-1137.

34-Joziase IC, Van de Smygt JJ, Smith K et al. (2008) Genes in congenital heart disease: atrioventricular valve formation. *Basic Res Cardiol* **103**:216-227.

35-Ueyama T, Kasahara H, Ishiwata T (2003) Myocardin Expression is regulated by Nkx2.5, and its function is required for cardiomyogenesis. *Mol Cell Biol* **23**:9222-9232.

36-Reamon-Buettner SM, Heckertt, Spanel-Barowski K et al. (2004) Novel *NXX2-5* Mutations in diseases heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol* **164**:2117-2125.

37- Herlong J.R, Jagggers JM, Ungerleide M (2000) Congenital Heart Surgery Nomenclature and Database Project: pulmonary venous anomalies. *Ann Thorac Surg* **69**:56-69.

Referencias electrónicas.

[www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi\\_cc00.htm](http://www.hospitalposadas.gov.ar/asist/servicios/ccvi_cc00.htm)

[www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

[www.facmed.unam.mx/](http://www.facmed.unam.mx/)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)



## ANEXO I.



"2008, Año de la Educación Física y el Deporte"

### DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEPARTAMENTO DE CARDIOLOGÍA

**Carta de consentimiento para participar en el protocolo de investigación:**

**"Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen *NKX2-5* en pacientes mexicanos con conexión anómala total de venas pulmonares"**

#### INVESTIGADORES

Dr. Francisco Flores Ramírez,  
Investigador Principal  
Departamento de Genética

Dr. Alfredo Vizcaino Alarcón  
Investigador Suplente  
Departamento de Cardiología

Estimado paciente o tutor:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, el cual es una investigación que pretende conocer y entender mejor porque se presenta la enfermedad que tiene su hijo. Esta investigación estudia las características y los cambios que pudiera haber en el material hereditario que contiene la información para un desarrollo adecuado del corazón, y que tal vez, si se encuentran cambios puedan estos causar alteraciones en este desarrollo. Por ello esta investigación puede proporcionarnos conocimientos que ayuden a otras personas en un futuro.

Queremos que usted sepa que participar en esta investigación es totalmente voluntario y que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso, no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho en la atención a su hijo.

Si ustedes están de acuerdo en participar y dependiendo de la edad y condiciones de su hijo, además de explicarles a ustedes las características del estudio podemos también explicarle a él o a ella, las características del referido estudio y solicitar también su consentimiento.

INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN, AFILIADA A LA UNAM

Dr. Márquez 162 Col. Doctores 06720, México, D.F.  
Teléfono: .52 28 99 17 [www.himfg.edu.mx](http://www.himfg.edu.mx)

manera en que está arreglada esta información se le llama gen y en el caso de las enfermedades mencionadas se piensa que un gen llamado *NKX2-5* podría estar alterado o con cambios y esto haría que se presentara la enfermedad. El propósito de este estudio es buscar los posibles cambios en el material genético de su hijo y el de ustedes, y saber si este gen está alterado, lo que nos ayudará a saber si realmente este gen tiene alguna participación en causar este tipo de enfermedades.

#### **PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:**

Para este estudio, necesitamos tomarle a su hijo y en su caso a ustedes más adelante, una muestra de sangre, mediante el siguiente procedimiento:

- 1.- Con una jeringa desechable se le tomará a su hijo una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 1ml. Esta muestra será usada para el análisis de la molécula que contiene nuestros genes y se llama ADN.
- 2.- Queremos que sepa, que no daremos a conocer ninguna información acerca de usted ni de su familia que los pueda identificar, debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación y esta sí se publicará en revistas científicas de prestigio internacional.

**BENEFICIOS:** Se les dará a ustedes asesoramiento genético con toda la información que llegue a integrarse. Su colaboración permitirá obtener conocimiento que tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

**RIESGOS Y MOLESTIAS:** Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio por donde se le extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

**COSTOS:** Tanto la extracción de muestras de sangre como las pruebas y cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación, así como los resultados no tendrán ningún costo para usted.

Si surgiera algún problema o tuviese usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá usted comunicarse con los médicos del departamento de cardiología o genética o con el investigador principal, el Dr. Francisco Flores Ramírez al teléfono 52 28 99 17 ext. 1495. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede usted dirigirse a la Dirección de Investigación a la ext. 1482. Puede dirigirse a la Dra. Verónica Morán, Jefe del Departamento de Genética a la extensión 1495 o al celular 04455 3075 6732.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio de la siguiente manera.

México, D.F. \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_

Nombre y firma del paciente \_\_\_\_\_  
(De ser el caso)

Nombre y firma de la Madre  
Padre

\_\_\_\_\_

Nombre y firma del

\_\_\_\_\_

Nombre y firma de testigo 1  
Parentesco con el paciente  
Dirección

\_\_\_\_\_

Nombre y firma de testigo 2  
Parentesco con el paciente  
Dirección

\_\_\_\_\_

**EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO HA SIDO APROBADO  
PARA USARSE ENTRE LOS AÑOS 2007 AL 2009**