



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
UMAE HOSPITAL DE PEDIATRÍA**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN:**

**GENÉTICA MÉDICA**

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.94C>G DEL GEN DELTA  
SARCOGLICANO COMO FACTOR DE RIESGO PARA  
CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA EN PACIENTES DEL I.M.S.S.**

**Presenta:**

**DR. RAMÓN ARÍSTIDES PÉREZ MARTÍNEZ**

**TUTOR:**

**Dra. Rosa María Ordoñez Razo**

UIM Genética Humana, Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS.



**MÉXICO, D. F.**

**AGOSTO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

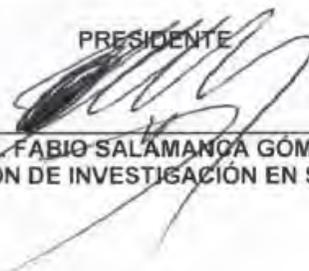
**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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.

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.94C>G DEL GEN DELTA SARCOGLICANO COMO  
FACTOR DE RIESGO PARA CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA EN PACIENTES DEL I.M.S.S.

PRESIDENTE



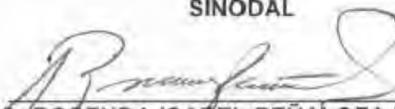
DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ  
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD I.M.S.S.

SECRETARIA



DRA ANA CAROLINA SEPÚLVEDA VILDÓSOLA  
DIRECTORA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACION EN SALUD  
UMAE, HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SIGLO XXI I.M.S.S.

SINODAL



DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA  
UMAE, HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SIGLO XXI I.M.S.S.

SINODAL



DRA. HAYDEE ROSAS VARGAS  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA  
UMAE, HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SIGLO XXI I.M.S.S.

SINODAL



DR. FERNANDO MINAURO SANMIGUEL  
UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA  
UMAE, HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SIGLO XXI I.M.S.S.

**ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO c.94C>G DEL GEN DELTA SARCOGLICANO COMO  
FACTOR DE RIESGO PARA CARDIOMIOPATÍA HIPERTRÓFICA EN PACIENTES DEL I.M.S.S.**

**TUTOR**



---

**DRA ROSA MARÍA ORDOÑEZ RAZO  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN GENÉTICA HUMANA  
UMAE DEL HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN S. XXI I.M.S.S.**

## **DEDICATORIAS**

A mi esposa por su amor, apoyo y compañía brindados a cada momento, como mi gran compañera.

A mis hijos porque me dan el ánimo para seguir adelante y me hacen sentir orgulloso.

A mi madre que me ha brindado siempre su apoyo y su cariño.

A mi padre que me enseñó con su ejemplo que el trabajo es la llave del éxito.

## **AGRADECIMIENTOS.**

**A la Dra. Rosa María Ordoñez por su apoyo, enseñanza y dirección de este proyecto.**

### **EN LA COLABORACION DEL PROYECTO:**

**Al Dr. Martín Horacio Garrido Garduño por su apoyo en el envío de pacientes**

**Al Dr. Esteban Herrera Tepatlán por su apoyo en el envío de pacientes.**

**A la Dra. Maricela Rodríguez**

### **EN LA FORMACION COMO ESPECIALISTA:**

**Al Dr. Fabio Salamanca Gómez por su apoyo a lo largo de mi formación como especialista**

**A la Dra. María Antonieta Araujo Solís y al Dr. Juan Carlos Huicochea por su dedicación a la enseñanza y formación de médicos especialistas**

**A todos los integrantes del servicio de Genética Médica del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI, así como a mis compañeros residentes.**

**A los integrantes del laboratorio de Investigación en Genética Humana del Hospital de Pediatría del CMN S. XXI**

## ÍNDICE GENERAL

I. Resumen	7
II. Antecedentes	8
III. Justificación	16
IV. Planteamiento del Problema	17
V. Hipótesis	17
VI. Objetivos	17
VII. Materiales y Métodos	18
VIII. Consideraciones Éticas	22
IX. Resultados	22
X. Discusión	25
XI. Perspectivas y Recomendaciones	26
XII. Conclusiones	27
XIII. Bibliografía	28
XIV. Anexos	37

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** La cardiomiopatía hipertrófica es una de las cardiopatías hereditarias más frecuentes en una proporción de hasta 1-2 pacientes por cada 500 individuos, se hereda de manera autosómica dominante. Diversas mutaciones se han descrito como causa genética de la misma, entre las que se incluyen al gen delta sarcoglicano *SGCD*. El presente estudio analiza la asociación de esta patología con el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) c.94C>G como marcador genético de riesgo para cardiomiopatía hipertrófica en pacientes atendidos en el IMSS.

**Objetivo:** Determinar la asociación del polimorfismo c.94C>G del gen delta sarcoglicano como factor de riesgo en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica atendidos en el I.M.S.S.

**Material y métodos:** Se realizó un estudio de casos y controles, observacional, analítico, transversal, retrospectivo en la UIM en Genética Humana del Hospital de Pediatría CMN Siglo XXI del IMSS. El período de estudio fue de octubre de 2008 a abril 2010. Se incluyeron en el estudio 32 pacientes con cardiomiopatía hipertrófica atendidos en el Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional S. XXI, así como 100 individuos sanos sin cardiomiopatía hipertrófica quienes acudieron al servicio de genética para recibir asesoramiento genético. Se tomaron 5 ml de sangre periférica para extracción de DNA y mediante PCR en tiempo real se identificó el polimorfismo tanto en el grupo de casos como en el grupo control.

**Resultados:** La frecuencia alélica para el alelo C en el grupo control fue de 54.5% (109/200) y en los casos de 72%(46/64). En tanto, la frecuencia para el alelo G en el grupo control fue de 45.5%(91/200) y para los casos de 28%(18/64). El riesgo de presentar cardiomiopatía hipertrófica fue 1.13 mayor (OR = 2.13; CI = 1.157-3.93). Además, al comparar la frecuencia del genotipo CC contra el genotipo GG el riesgo fue aún mayor de presentar cardiomiopatía hipertrófica (OR = 3.845; p=0.043).

**Conclusiones:** El alelo C se asocia como factor de riesgo para cardiomiopatía hipertrófica (OR =2.134; IC = 1.157-3.934; p = 0.014). El genotipo CC también se asocia con un mayor riesgo (OR = 3.845; p=0.043) para la enfermedad, en relación con el genotipo GG. Debido a que el alelo C presentó un riesgo atribuible porcentual del 53% y el genotipo CC del 74%, este polimorfismo puede ser utilizado como marcador genético para cardiomiopatía hipertrófica.

## II. ANTECEDENTES.

La cardiomiopatía (CM) es una enfermedad degenerativa primaria del miocardio que se divide en hipertrófica (CMH) y dilatada (CMD). En la CMH el músculo cardíaco presenta un incremento en la masa del ventrículo izquierdo que puede progresar a dilatación, insuficiencia cardíaca y tanto las miofibrillas, como los cardiomiocitos se encuentran desorganizados<sup>1, 2, 3, 4, 5</sup>. Una consecuencia de este desarreglo, es que los impulsos eléctricos corran anómalamente y se presenten arritmias. En general, la CMH se presenta en dos formas; la obstructiva (CMHO) y la no obstructiva (CMHNO). En pacientes con CMHO los síntomas son más severos y ocurren más tempranamente; el índice de mortalidad anual total en estos pacientes se estima en aproximadamente 2% al año, en tanto que para los pacientes con CMHNO es del 1%<sup>6</sup>.

El diagnóstico clínico de los pacientes con CMH se basa en la demostración de hipertrofia ventricular sin factores cardíacos o sistémicos que lo justifiquen. El estándar de oro en su diagnóstico es la ecocardiografía con la demostración del proceso de hipertrofia en ausencia de una causa estructural primaria. Hay algunos datos clínicos, como la disnea en presencia de una buena función sistólica o angor con coronarias angiográficamente normales, que pueden orientar el diagnóstico. La mortalidad para pacientes con CMH es de 1-2% al año, y en niños cerca del 6%<sup>7</sup>. El curso clínico de la enfermedad varía desde pacientes totalmente asintomáticos, hasta aquellos con síntomas de falla cardíaca y muerte súbita.

La CMH familiar es probablemente la enfermedad cardiovascular hereditaria más común, se hereda de manera autosómica dominante<sup>8</sup> y afecta a 1 de cada 500 individuos (0.2%), esto supone una enorme carga y un elevado costo para las

familias, el sistema de salud y la sociedad en general. De hecho, es la causa más común de muerte súbita entre adultos jóvenes y una causa importante de morbilidad y mortalidad entre los ancianos <sup>7, 9, 10</sup>.

El conocimiento de las bases genéticas de la cardiomiopatía es muy reciente y se ha relacionado con mutaciones en distintos genes (tabla 1) que codifican principalmente para proteínas del citoesqueleto y sarcoméricas (50-70% de los casos)<sup>11,12,13,14</sup>. Otras mutaciones importantes se encuentran en genes involucrados en el metabolismo energético (Fratixina, AMPK y COX15)<sup>15,16,17</sup> y en la bioenergética mitocondrial (genes para tRNAs y ATPasa) (tabla 1)<sup>18</sup>.

Dentro de las proteínas del citoesqueleto implicadas en el desarrollo de cardiomiopatías se ha mencionado a algunas que forman parte del complejo de proteínas asociadas a distrofina (DAPC, por dystrophin associated protein complex), tales como la distrofina, los sarcoglicanos y otras no asociadas al DAPC como la vinculina y la metavinculina<sup>4,19,20,21,22,23,24</sup>.

El DAPC es un grupo de proteínas periféricas e integrales inicialmente descrito en la membrana celular del músculo estriado. Si bien no se conoce con precisión la función de este complejo, se propone que cumple un papel estructural en la protección del sarcolema al daño inducido por la contracción<sup>25</sup> y que participa en mecanismos de transducción de señales<sup>26</sup>.

El complejo DAP consta de tres sub-complejos de proteínas bien caracterizados; 1) el complejo de proteínas citoplasmáticas; dentro de las cuales se encuentran la distrofina, las sintrofinas  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  y  $\beta 2$  y las distrobrevinas  $\alpha$  y  $\beta$ . 2) el complejo distroglicano (DG); formado por los distroglicanos  $\alpha$  y  $\beta$ ; y finalmente, 3) el

complejo sarcoglicano-sarcospan; formado por las proteínas transmembranales sarcospán<sup>27</sup> y los sarcoglicanos (SG)  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\delta$ .

TABLA 1. DEFECTOS GENÉTICOS EN LA CARDIOMIOPATÍA

PRODUCTOS GENÉTICOS AFECTADOS	FENOTIPO CARDIACO
<b><u>Proteínas estructurales/contráctiles</u></b>	
Cadena pesada beta de la miosina ( $\beta$ -MHC)	CMH
Cadena pesada alfa de la miosina ( $\alpha$ -MHC)	CMH
Cadena ligera esencial de la miosina (MYL3)	CMH
Cadena ligera reguladora de la miosina (MYL2)	CMH
Actina	CMD, CMH
Tropomiosina alfa ( $\alpha$ -TM)	CMH
Troponina T cardíaca (TNNT2)	CMH
Troponina I cardíaca (TNN13)	CMH
Desmina	CMD
Delta sarcoglicano ( $\delta$ -SGC)	CMH, CMD
Distrofina	CMD (DMD/DMB)
<b><u>Metabolismo y bioenergética</u></b>	
Proteína tri-funcional mitocondrial (MTP)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, CMD
Palmitoiltransferasa II de la carnitina (CPTII)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, CMD
Deficiencia de la translocasa de carnitina acilcarnitina(CACT)	Arritmias cardíacas, muerte súbita, CMD
Transporte de carnitina (OCTN2)	CMH, CMD
Tafazzina (G4.5)	CMD (Barth)
Metabolismo del Fe <sup>++</sup> mitocondrial (frataxina)	CMH (Ataxia de Friedreich)
Acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD)	CMH, muerte súbita, Pre-excitación ventricular.
Glucosidasa alfa lisosomal (maltasa acida/almacenamiento de glucogeno)	CMH (Pompe)
Enzima desramificadora del glucogeno (AGL)	CMH (Cori)
Galactosidasa alfa (GLA)	CMH (Fabry)
Metabolismo mitocondrial de heme (COX15)	CMH fatal precoz.
Subunidad delta-2 de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK)	CMH, defectos de la conducción (Wolff-Parkinson-White)
<b><u>ADN mitocondrial</u></b>	
tRNA <sup>Leu</sup> , tRNA <sup>Lys</sup> , tRNA <sup>Ile</sup> , tRNA <sup>Gly</sup>	CMH (MELAS, MERRF)
ATP-asa-6	CMH (Leigh)
Deleciones esporádicas del DNA mitocondrial	CMH defectos de la conducción (KSS)
<b>HCM: miocardiopatía hipertrofica DCM: miocardiopatía dilatada DMD: distrofia muscular de Duchenne. DMB: distrofia muscular de Becker</b>	

Tomada de Marín-García J., 2004

En el DAPC, la distrofina y los sarcoglicanos son los más relacionados con las CM. Las mutaciones en el gen de distrofina provocan la distrofia muscular de Duchenne/Becker<sup>28</sup>, este tipo de pacientes frecuentemente desarrollan cardiomiopatía dilatada (CMD)<sup>29</sup>, sin embargo, hay casos de CMD ligada al X, en los que la enfermedad del músculo esquelético no existe o es muy leve<sup>29,30</sup>. Por otra parte las mutaciones en los genes SG  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  también causan distrofias musculares de cintura autosómicas recesivas (LGMD2D al 2F, por Limb-Girdle Muscular Dystrophy), denominadas sarcoglicanopatías<sup>31,32</sup>, las cuales frecuentemente se encuentran asociadas con CMD.

Los SG's  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , y  $\delta$  tiene pesos moleculares de 50, 43, 35, 35, 50 y 40 kDa, respectivamente<sup>28,33</sup>; se encuentran formando un complejo heterotetramérico que se encarga de dar estabilidad a la membrana plasmática del citoesqueleto y soporte a la asociación entre la distrofina y los distroglicanos. Es posible que la asociación de los sarcoglicanos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ , funcione como un receptor para un ligando desconocido, por lo que podrían parecerse a otras moléculas receptoras en la superficie celular y ser parte de una ruta de señalización. Por otra parte, el SG  $\alpha$ , que se une con menor fuerza al complejo sarcoglicano, podría ser un efector secundario en la cascada de señalización<sup>34</sup>.

Los SG  $\alpha$  y  $\epsilon$  presentan una homología genómica del 63% y 43% de identidad proteica<sup>35</sup>, mientras que los SG's  $\gamma$  y  $\delta$  la presentan 70% a nivel genómico y 55% a nivel de proteína<sup>31</sup>. Por su parte  $\delta$ -SG posee el 57% y 55.7% de homología en sus aminoácidos con los SG's  $\delta$  y  $\gamma$ , y un 74.8% y 74.2% de similitud a nivel genómico respectivamente<sup>33</sup>. Adicionalmente, los SG tienen el mismo número de

residuos (231) en el extremo carboxilo terminal, esta porción es extracelular y es rica en residuos de cisteína que forman puentes disulfuro y los mantienen juntos. Esta porción es altamente conservada en los SG's  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ <sup>31</sup>, por lo que la presencia de mutaciones en alguna de estas cisteínas son causa de LGMD, como en el caso de SG- $\gamma$  donde se origina la LGMD tipo 2C (LGMD2C)<sup>36</sup>.

En modelos animales deficientes en los SG's  $\beta$  y  $\delta$  se demostró que la ausencia de cualquiera de estos provoca distrofia muscular grave progresiva, similar a las LGMD descritas en pacientes e igual que en estos, también se desarrolla cardiomiopatía dilatada<sup>37,38,39,40</sup>. Así mismo, se ha propuesto que la CMD es causada por la pérdida completa del complejo SG-SPN en el músculo liso vascular<sup>31</sup>, ya que, la formación del complejo sigue una ruta de ensamblaje específica, en la que los SG's  $\beta$  y  $\delta$  parecen ser muy importantes, puesto que son los primeros en unirse para formar el complejo. Por lo tanto, la deficiencia de alguno de los SG's, deriva en una disminución o pérdida total del resto de los miembros del complejo SG. La pérdida del complejo SG-SPN genera la presencia de zonas de constricción vascular que provoca una lesión isquémica y da como resultado, la aparición de áreas de necrosis, el inicio de la cardiomiopatía y el agravamiento de la distrofia muscular. Esto sugiere que la biosíntesis y ubicación de estas proteínas en la membrana está estrechamente ligada<sup>37,38,40</sup>.

La proteína del SG- $\delta$  se codifica por el gen *SGCD* que posee 8 exones y se encuentra en el cromosoma 5 (5q33-q34). En el humano, el mRNA sufre un procesamiento en el cual se originan dos variantes: delta sarcoglicano 1 ( $\delta$ -SG1) y delta sarcoglicano 2 ( $\delta$ -SG2), las cuales comparten una similitud a nivel de

proteína del 95% con ratón<sup>21,41</sup>. Recientemente se reportó una tercera variante en ratón denominada  $\delta$ -SG3<sup>42</sup>. La variante más común es  $\delta$ -SG1, la cual es similar al SG- $\gamma$  y codifica una proteína de 35 kDa con 290 aminoácidos y con una sola región transmembranal<sup>41</sup>. En el ratón se compone de 289 aminoácidos y ambas comparten un 95% de identidad a nivel de proteína<sup>21</sup>, además de encontrarse en el sarcolema, el SG- $\delta$  también se localiza en la cisterna terminal del retículo sarcoplásmico de músculo esquelético de manera independiente a distrofina. A partir de esta información se ha sugerido que esta proteína podría participar en la regulación del calcio<sup>42,43</sup>.

Algunas variaciones en la secuencia de los alelos del gen delta sarcoglicano (SGCD) se han asociado con LGMD-2F, con CMD y con CMH<sup>44,45,46</sup>. Hasta el momento se reportan 27 variaciones en el gen SGCD (tabla 2; [http://www.dmd.nl.sgcd\\_seqvar.html](http://www.dmd.nl.sgcd_seqvar.html)), de las cuales 3 son mutaciones que se consideran causantes de CMD (c.212G>C)<sup>47</sup>; c.(451T>G y c.699+13\_699+15del) y el polimorfismo c.94C>G que se asocia con CMH<sup>14</sup>.

Este polimorfismo también se denomina 5'UTR G/C, debido a que se encuentra ubicado en el nucleótido 94 del primer exón, en la región no traducida (UTR) del gen SGCD. Los nucleótidos implicados en este polimorfismo son guanina (G) y citosina (C), donde el alelo C se ha identificado como un factor de riesgo en pacientes con CMH<sup>46</sup>.

A diferencia de las mutaciones, los polimorfismos son variantes alélicas que existen de forma estable en una población, presentan una frecuencia de al menos 1% (una mutación tiene una frecuencia menor) y habitualmente se les considera

factores de riesgo para enfermedades hereditarias. Existen varios tipos de polimorfismos, sin embargo, los más frecuentes son los de variación de una sola base SNP (Por Single Nucleotide Polymorphism). Aproximadamente 1 cada 200-300 bases del DNA del humano podría ser un SNP<sup>48</sup>. Los SNP's pueden encontrarse en las regiones codificadoras (exones), en las no codificadoras (intrones y promotores) y en las que no se traducen a proteína (5' y 3' UTR). Muchos de los SNP's pueden producir susceptibilidad a enfermedades como cáncer de mama<sup>49</sup>, cáncer de colon<sup>50</sup>, etc.

Se ha descrito que las regiones 5'UTR tiene papeles cruciales en muchos aspectos de la regulación postranscripcional de la expresión génica, como el transporte núcleo-citoplasma, la eficacia de la traducción, la localización subcelular y la estabilidad del RNA mensajero (mRNA)<sup>51,52,53,54,55</sup>. Por lo tanto, los cambios en el UTR pueden afectar cualquiera de los pasos de la regulación postranscripcional y conducir a varias patologías como el cáncer de próstata<sup>56</sup>; leucemia<sup>57</sup>, ataxia telangiectasia<sup>58</sup> y melanoma familiar<sup>59</sup> por mencionar algunos.

El polimorfismo c.94C>G (5'-UTR C/G) del gen *SGCD* se analizó en distintos bancos de DNA que contienen muestras de distintas poblaciones y se encontró que la frecuencia alélica de la población Japonesa presenta una frecuencia del alelo G mucho mayor (0.844) con relación al alelo C (0.156) y que en las poblaciones del norte y oeste de Europa, así como en la Africana la frecuencia es mayor para el alelo C (0.828) que para el alelo G (0.172). El alelo C de este polimorfismo se ha reportado como factor de riesgo en pacientes japoneses con CMH y angina espástica (OR, 3.1; 95% intervalo de confianza, 1.0 a 9.5; p= 0.045)<sup>46</sup>.

**TABLA 2. VARIACIONES REPORTADAS PARA LA SECUENCIA DEL GEN SGCD.**

EXÓN	CAMBIO	NÚMERO DE IDENTIDAD	FRECUENCIA	ENFERMEDAD
1	c.94C>G	SGCD_00027	-	CMH
2	c.43-44A>C	SGCD_00024	2/454	-
3	c.84T>C	SGCD_00022	0.4	-
3	c.89G>A	SGCD_00003	-	DMDL
3	c.192+39267T>C	SGCD_00012	0.62	-
3	c.192+76044A>G	SGCD_00013	0.03	-
4	c.193-14304A>T	SGCD_00014	0.79	-
4	c.193-13512C>T	SGCD_00015	0.22	-
4	c.193-13439G>T	SGCD_00016	0.08	-
4	c.212G>T	SGCD_00026	-	CMD
4	c.277G>T	SGCD_00006	-	LGMD-2F
4	c.290G>A	SGCD_00023	0.06	-
5	c.295-498A>G	SGCD_00017	0.063	-
5	c.295-38T>A	SGCD_00010	1/200	-
5	c.309C>T	SGCD_00011	-	-
5	c.382+2036 <sup>a</sup> >G	SGCD_00018	0.345	-
6	c.383-171A>G	SGCD_00019	0.138	-
6	c.383-21C>G	SGCD_00025	2/454	-
6	c.451T>G	SGCD_00007	-	CMD-1L
6	c.493C>T	SGCD_00002	-	DMDL
7	c.575+54942C>T	SGCD_00020	0.9	-
8	c.576-48913_576-48912insTTGT	SGCD_00021	0.874	-
8	c.593G>C	SGCD_00009	-	DMDL
8	c.657delC	SGCD_00005	-	-
9	c.784G>A	SGCD_00004	-	LGMD-2F

### III. JUSTIFICACIÓN.

La presencia e integridad del complejo SG-SPN en el tejido muscular es de gran importancia, puesto que, la deficiencia o ausencia del mismo puede provocar el desarrollo de cardiomiopatías que pueden o no estar asociadas a alteraciones en el sistema musculo-esquelético. No obstante lo anterior, son pocos los estudios en donde se asocian a mutaciones específicas de los SG's con el desarrollo de cardiomiopatías en humanos. En particular, se ha mencionado que las modificaciones en el gen *SGCD*, pueden ser causantes de CMH y CMD familiar o esporádica sin afección a sistema musculo-esquelético<sup>14,63</sup>, o bien, ser un factor predisponente para el desarrollo de CMH<sup>46</sup>.

Se ha reportado que la prevalencia de CMH en la población general es de 1 en 500 y se dice que es la enfermedad cardíaca más frecuente (0.2%) transmitida genéticamente con una mortalidad de 3-4% al año.

Recientemente, se encontró que el alelo C del polimorfismo c.94C>G es un factor de riesgo significativo para complicaciones de isquemia en pacientes con CMH en población Japonesa<sup>46</sup>. Por ello es clara la importancia del análisis del polimorfismo c.94C>G en nuestra población, a fin de conocer si este podría servir como marcador genético de riesgo para CMH. Nuestro grupo reportó la frecuencia del polimorfismo c.94C>G en población amerindia y mestiza de México, con una frecuencia en amerindios de 0.47 para el alelo C, y en mestizos de 0.54; en relación a la frecuencia del genotipo CC para población amerindia se encontró de 0.24 y para población mestiza de 0.28, y, en este contexto, es claro entonces que el polimorfismo c.94C>G del gen *SGCD* puede contribuir a la patogénesis de la CMH<sup>65</sup>, misma que se considera un problema de salud. Por todo lo anterior

resulta importante reconocer la frecuencia de este polimorfismo en la población con cardiomiopatía en México a fin de analizar si la presencia del mismo es un factor de riesgo para CMH en población mexicana.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

La identificación y el análisis del polimorfismo c.94C>G en nuestra población podría servir como marcador genético de susceptibilidad para el desarrollo de CMH. El establecimiento de esta relación nos permitiría aportar información relevante para el manejo de estos pacientes.

En consecuencia las preguntas de investigación que se plantearon son: a) ¿Existe alguna asociación entre el polimorfismo y el desarrollo de CMH? Y, b) ¿Puede este polimorfismo servir como marcador genético de riesgo para el desarrollo de CMH?

#### **V. HIPOTESIS.**

HIPOTESIS GENERAL: El polimorfismo c.94C>G se encuentra asociado como factor de riesgo en pacientes con CMH atendidos en el IMSS.

#### **VI. OBJETIVOS.**

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

Determinar la asociación del polimorfismo c.94C>G del gen delta sarcoglicano como factor de riesgo en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica atendidos en el I.M.S.S.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Determinar la frecuencia del polimorfismo c.94C>G en individuos sanos y en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, mediante PCR en tiempo real.
- 2.- Analizar las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias obtenidas para cada grupo y compararlas entre sí para obtener la asociación del polimorfismo con la cardiomiopatía hipertrófica.
- 3.- Realizar el cálculo del OR para predecir el riesgo existente.

### **VII. MATERIALES y METODOS.**

Este estudio se desarrolló en el laboratorio de Investigación en Genética Humana de La Unidad Médica de Alta Especialidad del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional siglo XXI. En coordinación con el Hospital de Cardiología del mismo Centro de atención.

**Diseño.** Este protocolo corresponde a un estudio observacional, analítico, transversal y retrospectivo. Este trabajo intenta responder a preguntas de investigación concretas planteadas en el apartado correspondiente.

**Criterios de inclusión.** Se analizaron 32 casos que correspondieron a individuos nacidos en México (al igual que sus padres y abuelos) referidos al servicio de ecocardiografía del Hospital de Cardiología del CMN Siglo XXI por las clínicas u hospitales de zona del IMSS con diagnóstico clínico y/o electrocardiográfico de CMH. El diagnóstico de CMH se corroboró por ecocardiografía doppler, modo M y bidimensional, todo paciente con 2 criterios mayores o 1 mayor y 1 menor se consideraron portadores de CMH en ausencia de otra alteración estructural. Los criterios mayores y menores son los siguientes:

### **Criterios Mayores:**

#### Ecocardiográficos:

- 1.- Hipertrofia ventricular  $>13\text{mm}$  en el septo anterior o pared posterior o  $>15\text{mm}$  en el septo posterior o la pared lateral.
- 2.- Movimiento sistólico anterior (SAM) con contacto septal.

#### Electrocardiográficos:

- 1.- Criterios de hipertrofia ventricular con alteraciones de la repolarización (Romhilt & Estes).
- 2.- Ondas T negativas (3mm en cara anterior o 5mm en cara inferior).
- 3.- Ondas Q patológicas ( $>40\text{ ms}$  o  $>25\%$  de la onda R)

### **Criterios Menores:**

#### Ecocardiográficos:

- 1.- Hipertrofia ventricular 12mm en septo anterior o pared posterior o 14mm en el septo posterior o la pared lateral.
- 2.- SAM incompleto.
- 3.- Válvula mitral redundante.

#### Electrocardiográficos:

- 1.- Bloqueo completo de rama o alteraciones de la conducción intraventricular en precordiales.
- 2.- Alteraciones leves repolarización en precordiales.
- 3.- Onda S en V2  $>25\text{mm}$ .
- 4.- Síntomas (síncope, dolor precordial o disnea) no explicadas.

**Grupo Control:** Se analizaron 100 controles que fueron individuos adultos nacidos en México (al igual que sus padres y abuelos) en los que no existe

diagnóstico ni tienen antecedentes familiares de CMH. Estos fueron seleccionados de los individuos que llegan a asesoramiento genético a la consulta externa del servicio de Genética del Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI, enviados a la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del mismo hospital en donde se les realizó la obtención de datos, se firmó el consentimiento informado (Anexo 1) y se realizó la toma de muestra.

## VARIABLES.

<b>VARIABLES DEMOGRÁFICAS</b>				
	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN Y UNIDADES DE MEDICIÓN
Edad	Tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento	Suma que resulta de la fecha actual a la fecha de nacimiento	Cuantitativa	Discontinua En número de años
Sexo	Constitución orgánica que distingue entre mujer y hombre		Cualitativa	Nominal Dicotómica: Femenino Masculino
<b>VARIABLES DE RESULTADO</b>				
Dependiente Cardiomiopatía hipertrófica	Alteración estructural con engrosamiento de las paredes del corazón incluyendo septo ventricular en el que se afecta músculo cardiaco	Se toman en cuenta los criterios mayores y menores mencionados para establecer el diagnóstico de cardiomiopatía hipertrófica	Cualitativa	Nominal dicotómica Tiene cardiomiopatía hipertrófica No tiene cardiomiopatía hipertrófica
independiente SNP alelo C	Polimorfismo de un solo nucleótido; en el cual hay una sustitución de una guanina por una citosina	Detección de una variante alélica encontrada por PCR en tiempo real, con sustitución de una guanina por una citosina.	cualitativa	Nominal dicotómica Tiene el alelo C No tiene el alelo C.

**Material Biológico.** Se utilizaron 5 ml de sangre periférica de todos los individuos incluidos en el estudio, las cuales se tomaron en tubos con anticoagulante (EDTA).

**Obtención del DNA de las muestras.** Se realizó la extracción del DNA genómico de las muestras de sangre mediante la técnica de sales en la cual, la sangre se centrifugó a 3500 rpm por 15 minutos para separar leucocitos y se realizó de 2-3 lavados con solución de lisis (Tris 10mM pH 7.6, MgCl<sub>2</sub> 5mM y NaCl 10mM) las células blancas se resuspendieron en 60 µl de NaCl 5mM y se le agregaron 90 µl de SDS al 10%. Se agitó vigorosamente en el vortex y se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, agregamos 600 µl de NaCl saturado, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifugó a 15000 rpm por 15 minutos, se recuperó el sobrenadante y se precipitó el DNA con 2 volúmenes de etanol absoluto. El DNA obtenido se lavó en dos ocasiones con etanol al 75%, se dejó secar y después se resuspendió en agua desionizada estéril. Se cuantificó el DNA y se revisó su integridad por electroforesis en un gel de agarosa. Todas las muestras se ajustaron a una concentración final de 10 ng/µl.

**Análisis del polimorfismo c.-94C>G.** El análisis del polimorfismo fue realizado usando discriminación alélica por PCR tiempo real. El polimorfismo c.94C>G fue genotipificado mediante el ensayo TaqMan (C\_26840118\_10; ensayo de genotipificación de polimorfismo de un solo nucleótido TaqMan; applied Biosystems) y utilizando un equipo ABI Prism 7900HT (applied Biosystems). La PCR en tiempo real se realizó a través de los siguientes ciclos: preincubación por 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 92°C y un minuto a 60°C.

**Análisis estadístico.** Se analizaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el análisis de chi-cuadrada y las diferencias significativas se consideraron con valores de  $p < 0.05$  (<http://igh2.helmoltz-muenchen.de>)

## **VIII. CONSIDERACIONES ÉTICAS.**

El presente estudio se apegó a los lineamientos éticos contemplados para la investigación en seres humanos de la declaración de Helsinki y a la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud Mexicana. De acuerdo al artículo 17 del capítulo I del título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud corresponde a un estudio de riesgo mínimo, donde se requirió la toma de muestra de sangre periférica, con la autorización de los pacientes y controles participantes, toda vez que se mostró, leyó, explicó y se firmó el consentimiento informado. Todos los resultados fueron manejados en forma confidencial.

Esta Investigación no involucró intervenciones ni modificó la atención médica del paciente. El protocolo fue aprobado por la Comisión Nacional de Investigación Científica de la Coordinación de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social con No. de Registro 2008-785-032.

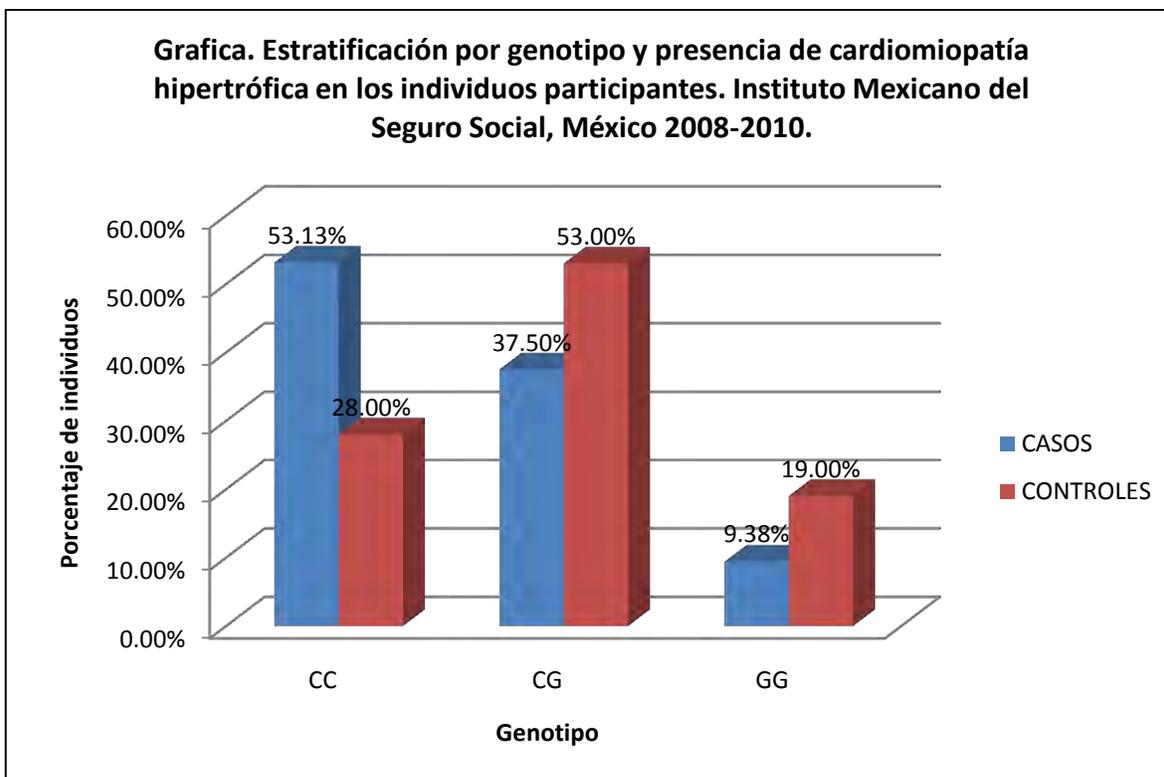
## **IX. RESULTADOS**

En el presente estudio se incluyeron 132 muestras de ambos sexos, divididos en dos grupos, un grupo de casos compuesto por 32 individuos con diagnóstico corroborado de cardiomiopatía hipertrófica, y un grupo control compuesto por 100 individuos sin evidencia clínica de la enfermedad.

Se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo c.94C>G en cada uno de los grupos (casos y controles), mediante PCR en tiempo real (Anexo 2). La frecuencia alélica para el alelo C resultó ser de 54.5% (109/200) para los controles y de 72% (46/64) para los casos. La frecuencia del alelo G fue de 45.5 % (91/200) para los controles y de 28% (18/64) para los controles. Por lo que el alelo C fue más frecuente en los casos que en los controles con una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.0014$ , Tabla 3) y un riesgo 1.13 mayor (OR = 2.13; CI = 1.157-3.93) de presentar CMH en comparación con el alelo G (Tabla 3).

**Tabla 3.** Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo c.-94C>G en los controles y los casos de CMH.

	<i>n</i>	Frecuencia Genotípica			Frecuencia Alélica		C vs G (C.I. 95%)	CC vs GG (C.I. 95%)
		<i>n</i> (%)			<i>n</i> (%)			
		CC	CG	GG	C	G		
<b>CONTROL</b>	100	28 (0.28)	53 (0.53)	19 (0.19)	109 (0.545)	91 (0.455)	OR = 2.134 C.I.=[1.157-3.934]	OR = 3.845 <b><i>p</i> = 0.043</b>
<b>CMH</b>	32	17 (0.531)	12 (0.37)	3 (0.094)	46 (0.72)	18 (0.28)	<b><i>p</i> = 0.014</b>	



El grupo control estuvo conformado por 73 individuos de sexo femenino y 27 de sexo masculino. En los casos se conformó por 13 mujeres y 19 hombres. Se realizó una comparación entre el sexo en cada grupo con la frecuencia alélica del polimorfismo y no se encontró diferencia estadística en ambos grupos, como se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Riesgo de padecer cardiomiopatía hipertrófica en los individuos participantes según su sexo y genotipo, Instituto Mexicano del Seguro Social, México 2008-2010.

Sexo	Alelo y genotipo	Casos	Controles	Razón de momios	P
Mujeres	C	19	81	2.178 (0.863-5.5)	p=0.09379
	G	7	65	0.459 (0.182-1.16)	p=0.09379
	CC/GG	6/0	20/12	-	-
Hombres	C	27	28	2.279 (0.944-5.50)	p=0.06441
	G	11	26	0.439 (0.182-1.06)	p=0.06441
	CC/GG	11/3	8/7	3.208 (0.63-16.38)	p=0.15305

FUENTE: Original.

Las celdas canceladas por guiones significan ausencia de datos o insuficiencia de estos para calcular los riesgos.

La edad promedio en años en el grupo de casos (n = 32) fue de 53.85 años, con una desviación estándar de 14.97 años. La edad promedio en el grupo de controles (n = 100) fue de 42.78 años, con desviación estándar de 8.41 años. Se realizó comparación estadística y no se encontró diferencia significativa.

El riesgo atribuible porcentual en los individuos que presentaron el genotipo CC, fue 74% con lo cual, si se detectara el genotipo antes de que la enfermedad se haga evidente, se podría realizar un diagnóstico y vigilancia oportunos en los casos de cardiomiopatía hipertrófica antes de la aparición de los síntomas y signos clínicos de la enfermedad en ese mismo porcentaje. El riesgo atribuible para el alelo C fue de 53.13%

## **X. DISCUSIÓN.**

Las mutaciones en el gen *SGCD* se han reportado asociadas al desarrollo de distrofia muscular de cintura, CMD y CMH. Por lo que en este estudio se analizó la frecuencia del polimorfismo c.94C>G del gen *SGCD* en casos y controles con la finalidad de conocer si este se asocia como factor de riesgo para CMH.

Los resultados mostraron que el alelo C se encuentra asociado como factor de riesgo para CMH, con un OR = 2.13 y p = 0.014. Debido a que la asociación de este polimorfismo solo ha sido asociada como factor de riesgo para angina en pacientes japoneses con CMH, este sería el primer estudio en donde se encuentra una asociación como factor de riesgo de este polimorfismo para CMH.

Los datos para el alelo C son consistentes con los reportados en pacientes japoneses con CMH, en donde se consideró a este alelo un factor de riesgo para angina coronaria <sup>46</sup>. Como dato novedoso, en este trabajo se encontró que el

homocigoto CC se asocia a un riesgo aún mayor (OR = 3.85; p = 0.043), en comparación con el homocigoto GG.

Como ya se mencionó anteriormente, el polimorfismo de estudio se encuentra ubicado dentro de la región 5'-UTR del gen *SGCD*, la cual se sabe que es muy importante en la regulación de la expresión génica del mismo. Esta regulación puede ser a nivel postranscripcional lo cual puede generar disminución en los niveles de la proteína codificada. El mecanismo molecular involucrado en la regulación a través del extremo 5'-UTR del gen *SGCD* no se conoce, sin embargo, es probable que esté relacionado a nivel postranscripcional por alteraciones en el procesamiento del mRNA, situación que sería conveniente estudiar posteriormente a nivel molecular para entender el mecanismo que lleva a la alteración proteica.

## **XI. PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

Aunque estos resultados parecen ser contundentes, es importante aumentar el número de casos a fin de eliminar cualquier duda al respecto. Se recomienda, en un futuro, ampliar la línea de investigación a una cohorte, y realizar estudio a nivel molecular para analizar exactamente el mecanismo por el que se llega a la enfermedad.

Este estudio arroja indicios importantes para el uso del polimorfismo como un marcador de predicción para la cardiomiopatía hipertrófica. Para lo cual se desarrollaría una prueba diagnóstica.

## **XII. CONCLUSIONES**

1.- El alelo C se asocia con cardiomiopatía hipertrófica con un riesgo de 2.134 (IC = 1.157-3.934  $p = 0.014$ ).

2.- El genotipo CC se asocia con un mayor riesgo (OR = 3.845  $p = 0.043$ ) para cardiomiopatía hipertrófica en relación con el genotipo GG.

3.- El polimorfismo c.94C>G puede ser utilizado como marcador genético para cardiomiopatía hipertrófica.

### **XIII. BIBLIOGRAFÍA.**

1. Roberts R, Sigwart U. New concepts in hypertrophic cardiomyopathies, *árt I Circulation* 2001; 104: 2113-2116.
2. Maroon B, Bonow R, Leon M, Hepstein S. Hypertrophic cardiomyopathy: interrelations of clinicals manifestations, patophysiology, and therapy. *N Eng J Med* 1987; 16: 780-789.
3. Maron B. Hypertrophic Cardiomyopathy. *Lancet* 1997; 350: 127-133.
4. Towbin JA. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Current Opinion in Cell Biology* 1998; 10: 131-139.
5. Jay D. Aspectos moleculares y genéticos en cardiología. *Arch Inst Cardiol Mex* 1999; 69:157-162.
6. Maron MS, Olivotto I, Betocchi S, Casey SA, Lesser JR, Losi MA, Cecchi F, Maron BJ. Effect of left ventricular outflow tract obstruction on clinical outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J. Med.* 2003; 348: 295-303.
7. Maron BJ, Gardin JM, Flack JM, Gidding SS, Kurosaki TT, Bild DE. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults: echocardiographic análisis of 4111 subjects in the CARDIA study. *Circulation* 1995; 92: 785-789.
8. Marian AJ. Modifier genes for hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin cardiol* 2002; 17:242-252.
9. Richardson P, Mckenna W. Bristow M Maisch B, Mautner B O'Connell J, Olsen E, Thene G, Goddwin J, Gyarfás I, Martin I, Nordet P. report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation Of Cardiology Task Force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 841-842.

10. Malik MS, Watkins H. The molecular genetics of hypertrophic cardiomyopathy. *Curr Opin Cardiol* 1997; 12:295-302.
11. Spirito P, Seidman CE, McKenna WJ, Maron BJ. The management of hypertrophic cardiomyopathy. *N Engl J Med* 1997; 336: 775-785.
12. Arad M, Seidman JG, Seidman CE. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet* 2002; 20:2499-506.
13. Bonne G, Carrier L, Richard P, Hainque B, Schwartz K. Familial hypertrophic cardiomyopathy : from mutations to functional defects. *Circ Res* 1998; 83:580-93.
14. Tsubata S, Bowles KR, Vatta M, Zintz C, Titus J, Muhonen L, Bowles NE, Towbin JA. Mutations in the Human delta-sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 2000; 106: 655-662.
15. Gollob MH, Green MS, Tang AS, Gollob T, Karibe A, Ali Hassan AS, Ahmad F, Lozado R, Shah G, Fananapazir L, Bachinski LL, Roberts R. Identification of a gene responsible for familial Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med* 2001; 344: 1823-1831.
16. Palau F. Friedreich's ataxia and frataxin: molecular genetics, evolution and pathogenesis. *Int J Mol Med* 2001; 7: 581-589.
17. Antonicka H, Mattman A, Carlson CG, Glerum DM, Hoffbuhr KC, Leary SC, Kennaway NG, Shoubridge EA. Mutations in Cox 15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 102-114.
18. Marín-García J, Goldenthal M. La mitocondria y el corazón. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55: 1293-1310.

19. Ohlendieck R. Towards an Understanding of the dystrophinglycoprotein complex: linkage between the extracellular matrix and the membrane cytoskeleton in muscle fibers. *Eur J Cell Biol* 1996; 69: 1-10.
20. Bies RD, Maeda M, Roberds SL, Holder E, Bohlmeier T, Young JB, Campbell KP. A 5' dystrophin duplication mutation causes membrane deficiency of alpha-dystroglycan in a family with X-linked cardiomyopathy. *J mol Cell Cardiol.* 1997; 29(12):3175-88
21. Nigro V, Piluso G, Abbodanza C, Medici N, Molinari AM, Nigro G, Puca GA. Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum. Mol Gen.* 1996a; 5(8):1179-1186.
22. Cox GF, Kunkel LM. Dystrophies and heart disease. *Curt Opin An Cardiol* 1997; 12:329-343.
23. Maeda M, Holder E, Lowes B, Valent S, Bies RD. Dilated cardiomyopathy associated with deficiency of the cytoskeletal protein metavinculina. *Circulation* 1997; 95: 17-20.
24. Bowles KR, Gajarski R, Porter P, Goytia V, Bachinski L, Roberts R, Pignatelli R, Towbin JA. Gene mapping of familial autosomal dominant dilated cardiomyopathy to chromosome 10q21-q23. *J clin Invest.* 1996; 98(6): 1355-60.
25. Straub V, Campbell KP. Muscular dystrophies and the dystroglyconprotein complex. *Curr. Opin. In Meurl.* 1997;10:168-175.
26. Rando TA. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 2001; 24: 1575-1594.

27. Crosbie RH, Heighmay J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP. Sarcospan the 25kDa transmembrana component of the dystrophin-glycoprotein complex J. Biol. Chem. 1997; 272: 31221-31224.
28. Campbell KP. Three muscular dystrophies: loss of cytoeskeleton-extracelular matrix linkage. Cell 1995;80:675-679.
29. Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. Circ. Res. 2004; 94: 1023-1031.
30. Feng, J Yan, J Buzin CH, Towbin JA, Sommer SS. Mutations in the dystrophin gene are associated with sporadic dilated cardiomyopathy. Mol Genet Metab. 2002; 77(1-2): 119-126.
31. Hack AA, Lam MY, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadazy MR, Sweeney HL, McNally EM. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the distrophin-glycoprotein complex. J Cell Sci. 2000; 113: 2535-2544.
32. Melacini P, Fanin M, Duggan DJ, Freda MP, Berardinelli A, Daniela GA, Barchitta A, Hoffman EP, Dalla Volta S, Angelini C. Heart involvement in muscular dystrophies due to sarcoglycan gene mutations. Muscle Nerve. 1999; 22:473-479.
33. Wheeler MT, Zarnegar s, McNally EM. δ-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduce in muscular dystrophy. Hum. Mol. Gen. 2002; 18: 2147-2154.

34. Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HGW, Kunkel LM. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 1998;143:2033-2044.
35. Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR. Epsilon-sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutate in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 32534-32538.
36. Piccolo F, Jeanpierre M, Leturcq F, Dodé C, Azibi K, Toutain A, Merlini L, Jarre L, Navarro C, Krishnamoorthy R, Tomé F, Urtizberea JA, Beckmann J, Campbell K, and Kaplan J. A founder mutation in the  $\gamma$ -sarcoglycan gene of Gypsies possibly predating their migration out of India. *Hum Mol Genet.* 1996; 5(12): 2019-2022.
37. Duclos F., Straub V., Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, Van Der Meulen J, Holt KH, Campbell KP. Progressive muscular dystrophy in  $\alpha$ -sarcoglycan deficient mice. *J. Cell Biol.* 1998; 142: 1461-1471.
38. Durbeej M., Cohn RD, Hrstka F, Moore SA, Allamand V, Davidson BL, Williamson RA, Campbell KP. Disruption of beta-sarcoglycan gene reveals pathogenetic complexity of limb-girdle muscular dystrophy type 2E. *Mol. Cell. Biol.* 2000; 5:41-151.
39. McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, Desa Moreira E, Lidon HG, Othame KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM. Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J. Hum. Genet.* 1996; 59: 1040-1047.

40. Coral-Vazquez, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davidson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R and Campbell KP. Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular. *Cell* 1999, 99: 465-474.
41. Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, Venzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crawford TO McPherson JD, Campbell KP. Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in the limb-girdle muscular dystrophy. *JBio Chem.* 1996; 271(50): 32321-32329.
42. Estrada F.J., Mornet D., Rosas-Vargas H., Angulo A., Hernández M., Becker V., Rendón A., Ramos-Kuri M., Coral-Vázquez R.M. A novel isoform of delta-sarcoglycan is localized at the sarcoplasmic reticulum of mouse skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 340(3): 865-871.
43. Ueda H, Ueda K, Baba T, Ohno S. Delta and gamma-sarcoglycan localization in the sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. *J. Histochem & Cytochem.* 1999; 49: 529-537.
44. Nigro V, Desa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M. Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat. Genet.;* 1996b;14(2):195-198.
45. Moreira ES, Vainzof M, Susuki OT, Pavanello RC, Zatz M, Passos-Bueno MR. Genotype-phenotype correlations in 35 Brazilian families with sarcoglycanopathies including the description of three novel mutations. *J Med Genet.* 2003; 40(2): E12.

46. Honda T., Sugiyama S., Sakamoto T., Kaikita K., Ogawa H. Impact of Delta-Sarcoglycan Gene Polimorphism on the Occurrence of Coronary Spastic Angina in Japaneses Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *Circ J* 2007;71:1263-1267.
47. Kärkkäinen M, Toivonen L, Nieminen MS, Kuusisto J, Laakso M, Peuhkurinen K. A novel mutation, Arg71thr, in the delta-sarcoglycan gene is associated with dilated cardiomyopathy. *J Mol Med.* 2003; 81(212): 795-800.
48. Salisbury BA, Pungliya M, Choi JY, Jiang R, Sun XJ, Stephens JC. SNP y haplotype variation in the human genome. *Mutation Research.* 2003; 526:53-61.
49. Gochhait S., Bukhari S., Bairwa N., Vadhera S., Darvishi K., Raish M., Guota P., Husain S., Bamezai R. Implication of BRCA2 -26GA 5' untranslated region polymorphism in susceptibility to sporadic breast Cancer *Research* 2007; 9: 1-8.
50. Curtin K., Ulrico C., Samowitz W., Bigler J., Caan B., Potter J., Slaterry M. Thymidylate synthase polymorphisms and colon cancer: Associations with tumor stage, tumor characteristics and survival. *Int. J. Cancer* 2007; 120:2226-2232.
51. Sonenberg N. mRNA translation: influence of the 5' and 3' untranslated regions. *Curr Opin Gen Dev.* 1994; 4: 310-315
52. McCarthy, J. E. G., Kollmus, H., 1995. Cytoplasmic mRNA-prtotein intercatons in eukaryotic gene expresion. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20: 191-197.
53. Pesole G, Liuni S. Grillo G, Saccone C. Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Gene* 1997; 205: 95-102.
54. Van Der Velden AW, Thomas AA. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999; 31: 87-106.

55. Pesole G, Grillo G, Larizza A, Liuni S. The untranslated regions of eukeriotic análisis. *Brief. Bioinform.* 2000; 1: 236-249.
56. Mizokami A, Chang C. Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA. *J Biol. Chem.* 269(1994); 22: 25655-25669.
57. Bamford R.N., Battiata A.P., Burton J.D., Sharma H., Waldmann T.A. Interleukin (IL) 15/IL-T production by the adult T-cell leukemia cell line Hut-102 is associated with a human T-cell lymphotropic virus type IR region/IL-15 fusion message that lacks many upstream AUGs that normally attenuate IL-15 mRNA translation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996;93) 2897-2902.
58. Savitsky K, Platzer M, Uziel T, Gilad S, Sartiel A, Rosenthal A, Elroy-Stein O, Shilo Y, Rotman G. Ataxia-teleangiectasia: structural diversity of untranslated sequences suggests complex post-transcriptional regulation of ATM gene expression. *Nucl Acids Res.* 25(1997);25: 1678-1684.
59. Liu L, Dilworth D, Gao L, Monzon J, Summers A, Lassam N, Hogg D. Mutation of the CDKN2A 5' UTR creates an aberrant initiation codon and predisposes to melanoma. *Nature Genet.* 1999; 21: 128-132.
60. Gamboa R., Hernández.Pacheco G., Hesiquio R. Apolipoprotein E polymorphism in the Indian and Mestizo populations of México. *Hum. Biol.* 2000; 62:975-981.
61. Lisker R, Pérez-Briceño R, Ramírez E, Aizpuru E. Gene frequencies and admixture estimates in four Mexican urban centers. *Hum. Biol.* 1990; 62: 791-801.
62. Cavalli-Sforza, L. Genes, peoples, and languages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:7719-7724.

63. Sakamoto A, Ono K, Abe M, Jasmin G, Eki T, Murakami Y, Masaki T, Toyooka T, Hanaoka F. Both hypertrophic and dilated cardiomyopathies are caused by mutation of the same gene, delta-sarcoglycan, in hamster: an animal model of disrupted dystrophin-associated glycoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(25): 13873-13878.
64. Díaz P., Fernández P. Cálculo del tamaño muestral en estudios de casos y controles. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A. Coruña. *Cad. Aten Primaria* 2002; 9: 148-150.
65. Ordoñez-Razo R.M., Canizalez –Quintero S., Rosenda Peñaloza, et. al. Delta-Sarcoglicano Gene Polimorphism Frequency in Amerindian and Mestizo Populations of Mexico. *Genetic testing and molecular biomarkers*. 2010;14(2):237-240.

## XIV. ANEXOS.

### Anexo 1

#### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

México D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Se me ha informado que en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de pediatría y en colaboración con la Clínica de insuficiencia Cardíaca del Hospital de Cardiología, se realiza un proyecto de investigación titulado:

**ASOCIACION DEL POLIMORFISMO c.-94C>G DEL GEN DELTA SARCOGLICANO COMO FACTOR DE RIESGO PARA CARDIOMIOPATIA HIPERTROFICA**, en el cual se pretende analizar si este polimorfismo del Gen delta sarcoglicano puede ser un nfactor de riesgo para cardiomiopatía hipertrófica.

**Procedimiento:** Me han explicado claramente la importancia y los objetivos de este estudio y que para lograrlo se requiere de pruebas especiales que no se realizan de rutina. Estas pruebas no representan ningún riesgo para mi salud, ni ninguno de los miembros de mi familia, por lo cual estoy dispuesto a autorizar se me tomen 5 mililitros de sangre de una vena utilizando una jeringa y aguja estériles así como a permitir en caso de ser necesario, se me realice una ecocardiografía para corroborar o descartar el diagnóstico de Cardiomiopatía Hipertrófica. También se me ha informado que de la muestra sanguínea únicamente se utilizarán los leucocitos para la obtención del ADN y que el resto de la misma no será utilizada para nada más y por lo tanto se desechará.

**Información al paciente.** Al término del estudio el investigador responsable, la Dra. Rosa María Ordoñez Razo proporcionará la información completa de acuerdo a los resultados.

**Beneficios.** Se me informa que el estudio puede constituir en un futuro una herramienta diagnóstica para Cardiomiopatía Hipertrófica, pero que no representa un beneficio directo para mi tratamiento.

**Confidencialidad.** El estudio sobre la búsqueda del polimorfismo, incluyendo registros clínicos y/o del hospital serán manejados en forma confidencial, se podrán presentar en congresos y revistas estrictamente de interés médico y no será revelada la identidad del paciente y su familia a ninguna persona sin su consentimiento.

**Potenciales daños secundarios al estudio.** Debido a que en el estudio se requiere de la extracción de una muestra de sangre, se me ha informado que puedo presentar molestia secundaria al piquete de la aguja, que puede ser necesario más de un intento en la toma de muestra y que me puede aparecer un moretón que desaparecerá por sí solo.

**Participación/suspensión.** Estoy consciente que la participación en el estudio es completamente voluntaria, pudiendo elegir en cualquier momento abandonarlo, sin afectar la calidad ni la disponibilidad de la atención médica requerida por mí y el resto de mi familia.

**Dudas y aclaraciones.** La Dra Rosa María Ordoñez Razo, se encargará de explicarle personalmente cualquier información que no esté bien atendida por usted y contestará cualquier pregunta que surja durante el estudio.

#### **Consentimiento.**

Al firmar este documento, usted accede voluntariamente a participar en este estudio.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Relación del testigo con el paciente y su familia: \_\_\_\_\_

Nombre del testigo: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Relación del testigo con el paciente y su familia: \_\_\_\_\_

## Anexo 2

Genotipificación de los alelos C y G del polimorfismo c.-94C>G mediante PCR tiempo Real. En el panel a) se muestra un ejemplo de una curva obtenida para el alelo C. En el b) para el alelo G y en el c) las curvas de ambos que representan a un heterocigoto CG.

