



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN



INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS
SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL
ESTADO
CMN "20 DE NOVIEMBRE"

ESPECIALIDAD EN
GENÉTICA MÉDICA

**"MUTACIONES EN EL GEN *GATA1* EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE DOWN ASOCIADAS AL DESORDEN
MIELOPROLIFERATIVO TRANSITORIO DEL SERVICIO
DE GENÉTICA MÉDICA DEL CENTRO MÉDICO
NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE"**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN GENÉTICA
MÉDICA

P R E S E N T A

MIRIAM HIDALGO OSTOA

ASESORES DE TESIS
DRA. MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN
DRA. YURITZI SANTILLÁN HERNÁNDEZ
DRA. LILIANA GARCÍA ORTÍZ

NO. DE PROTOCOLO 069.2018

CIUDAD DE MÉXICO

AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA DEL CENTRO MÉDICO
NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE

DR. MAURICIO DI SILVIO LÓPEZ
SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN

DRA. YURITZI SANTILLÁN HERNÁNDEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO UNIVERSITARIO DE GENÉTICA
MÉDICA
ASESOR DE TESIS

DRA. MARÍA DEL CARMEN CHIMA GALÁN
PROFESOR ADJUNTO DEL CURSO UNIVERSITARIO DE GENÉTICA
MÉDICA
ASESOR DE TESIS

DRA. LILIANA GARCÍA ORTIZ
ADSCRITA A LA DIVISIÓN DE MEDICINA GENÓMICA
ASESOR DE TESIS

MIRIAM HIDALGO OSTOA
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

Mi mas profundo agradecimiento a la Dra. Yuritzi Santillán por haberme brindado la oportunidad de realizar la especialidad en esta sede a su cargo, que para mi ha sido la mejor experiencia, por su gran empatía hacia nosotros y por el aliento que me brindó durante estos 3 años.

Gracias a la Dra María del Carmen Chima por su apoyo constante, por sus enseñanzas y por escucharme, infinitamente gracias.

Gracias a la Dra. Liliana García, que siempre nos apoyó investigación de temas, siempre atenta a nuestras dudas e inquietudes.

Gracias a mis compañeros residentes de la especialidad: Viri, Lalo, Agustín, Paola, Samantha, Angélica, Dulce y Román, sin ustedes esta experiencia no habría sido la misma.
Agradezco haberlos conocido.

Agradezco la enorme ayuda que me brindaron los pasantes del Servicio Social del laboratorio de Medicina Genómica Karen Macías Lagunas y Ricardo Armenta Cano.

Gracias a mi familia, por haberme apoyado infinitamente todo este tiempo. Por su respaldo constante.

**DEDICADO AMI HERMOSA NINA, ERES MI FUERZA PARA
SEGUIR ADELANTE...**

**A MI ESPOSO CARLOS POR SU PACIENCIA Y POR APOYARME A
PESAR DE TODO...**

**DEDICADO A MI PADRE QUE A PESAR DE TODAS LAS
ADVERSIDADES SIEMPRE HA PERMANECIDO DE PIE...**

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| I.- INTRODUCCIÓN..... | 4 |
| Planteamiento del problema..... | 6 |
| Justificación..... | 7 |
| Objetivos..... | 8 |
| II.- MARCO TEÓRICO | |
| Capítulo 1: Desorden mieloproliferativo transitorio asociado a Síndrome de Down..... | 10 |
| Capítulo 2: Aspectos moleculares de <i>GATA1</i> | 30 |
| Capítulo 3: Mutaciones en <i>GATA1</i> | 36 |
| III.- MARCO METODOLÓGICO | |
| Material y métodos..... | 41 |
| Aspectos éticos..... | 50 |
| Consideraciones de bioseguridad..... | 53 |
| IV.- RESULTADOS..... | 62 |
| V.- DISCUSIÓN..... | 68 |

VI.- CONCLUSIONES.....72

ABREVIATURAS

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

- 1.- Extracción de DNA
- 2.- Purificación De Gel De Agarosa
- 3.- Consentimiento Informado
- 4.- Cédula De Recolección De Datos

RESUMEN

El Síndrome de Down (SD) debido a trisomía 21 es la anomalía cromosómica más común en humanos. Descrita por John Langdon Down en 1866, este desorden multisistémico fue reconocido en 1959 por Lejeune como resultado de la presencia de 3 copias del cromosoma 21.

Los niños con Síndrome de Down tienen un marcado incremento en el riesgo de desarrollar trastornos hematológicos, entre ellos desorden mieloproliferativo transitorio (DMT) y leucemia megacarioblástica aguda. Se calcula que aproximadamente 1-2% de todos los pacientes con SD desarrollarán leucemia, sobre todo en el transcurso de los primeros 5 años de vida y que aproximadamente 10-20% presentan DMT en el periodo neonatal, el cual esta asociado a mutaciones en el gen *GATA1*.

Recientes investigaciones de Wechsler, et al (2002), Mundschau, et al (2003) y Roberts et al (2013), han reportado que mutaciones en el gen *GATA1* en pacientes con Trisomía 21 confieren un riesgo del 5-10% de desarrollar leucemia mieloide, esto debido a que *GATA1* regula la expresión de genes de

involucrados en la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores eritroides y megacariocíticos.

Por tal motivo nos planteamos buscar mutaciones en el exón 2 de *GATA1*, donde se han reportado la mayoría de las mutaciones.

Para este estudio se realizó una revisión de expedientes que comprendió el periodo de 01 de marzo 2017 a 30 de junio 2018 de todos los pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Down de acuerdo a los criterios de Hall, que fueron atendidos en la consulta externa del Servicio de Genética Médica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre. Se seleccionaron 14 pacientes con alteraciones hematológicas, a quienes se les tomó una muestra sanguínea para la secuenciación del exón 2 de *GATA1*, no encontrándose cambios en el electroferograma (NCBI NG_008846.2).

Dentro de la población de estudio en este Centro Médico se detectó una incidencia de 12.5% para alteraciones hematológicas en pacientes con Síndrome de Down, siendo la leucopenia y anemia las más frecuentes, con un 33% y 26.6% respectivamente.

I INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El SD debido a trisomía 21 es la anomalía cromosómica más común en humanos.^{1,2} Primero descrito por John Langdon Down en 1866, este desorden multisistémico caracterizado por alteraciones faciales características, cardiopatía congénita, hipotiroidismo y retraso en el neurodesarrollo fue reconocido en 1959 como resultado de la presencia de 3 copias del cromosoma 21, usualmente en todas las células. Las anomalías hematológicas son comunes aunque no existe un porcentaje establecido en general, el espectro incluye una variedad de alteraciones benignas y malignas de la cuenta sanguínea, tales como neutrofilia (80%), trombocitopenia (66%), policitemia (34%) así como DMT y leucemia.^{3,4}

El DMT en el síndrome de Down (DMT-SD) se ha asociado con mutaciones somáticas en el gen *GATA1* de acuerdo con resultados de Wechsler, et al (2002)⁵, Mundschau, et al (2003)⁶ y Roberts, et al (2013)⁷.

El DMT implica la proliferación clonal de megacarioblastos inmaduros, lo cual ocurre en aproximadamente el 10-20% de los

pacientes con SD y se estima que entre el 20%-30%, de los sobrevivientes de DMT progresan a leucemia mieloide aguda (LMA) en el transcurso de los primeros 4-5 años.^{2,3,8,9}

La presencia de células blásticas en sangre periférica en un paciente con leucocitosis moderada después del nacimiento es significativo para el diagnóstico. En un paciente con SD las células blásticas observadas en DMT y aquellas en leucemia mieloide son similares en características morfológicas e inmunofenotípicas, dificultando la distinción entre estas dos enfermedades.

El tratamiento para un paciente con DMT es controversial, la mayoría de los pacientes sólo son observados sin indicarse ningún tratamiento.^{2,9}

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los pacientes con SD tienen 20 veces más posibilidades de padecer leucemia comparados con la población general. De acuerdo a reportes en la literatura se ha encontrado que mutaciones en el gen *GATA1* pueden estar presentes en el 10% de los pacientes con DMT y que del 20-30% de los pacientes con dicho diagnóstico progresarán a Leucemia Mieloide Aguda (LMA) dentro de los siguientes 4 años.

Hasta el momento no existen datos publicados de mutaciones del gen *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down en población derecho-habiente del ISSSTE así como tampoco en pacientes con Síndrome de Down en la población mexicana. Por lo que nos hemos planteado realizar un estudio para identificar mutaciones en *GATA1* en pacientes con SD y DMT.

Lo que permitirá conocer en primer lugar, la frecuencia con que se presenta el DMT en los pacientes con SD de esta institución. Conocer que proporción de estos pacientes presentan mutaciones en *GATA1*, los tipos de mutaciones presentadas y su relación con las características hematológicas.

De encontrarse resultados similares a los reportados en la literatura podría considerarse el análisis de *GATA1*, como parte del seguimiento de pacientes con Síndrome de Down y DMT.

JUSTIFICACIÓN

El factor de transcripción codificado por *GATA1* se considera esencial en el desarrollo eritroide; las mutaciones somáticas en el gen *GATA1* asociado a la trisomía 21, pueden ser suficientes para promover la expansión transitoria de megacarioblastos inmaduros vistos en DMT.

La identificación de mutaciones en *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down permitirá realizar un seguimiento estrecho de los pacientes con mayor riesgo de desarrollar LMA.

La ausencia de datos a nivel nacional y las escasas publicaciones de población latina acerca de mutaciones en el gen *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down y la frecuencia con que estas mutaciones se asocian con el Desorden Mieloproliferativo Transitorio, nos lleva a realizar esta investigación, para contribuir con datos relevantes en población mexicana que ayuden en el seguimiento de las complicaciones del síndrome de Down.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar cambios en la secuencia del exón 2 del gen *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down y Desorden Mieloproliferativo Transitorio en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Objetivos Específicos

- Describir las variantes en el Exón 2 del gen *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down y Desorden Mieloproliferativo Transitorio del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y comparar resultados con los datos publicados en el ámbito internacional.
- Determinar si los cambios encontrados en la secuencia del exón 2 del gen *GATA1* corresponden a variantes patogénicas.
- Calcular la proporción de pacientes con SD y DMT que presentan mutaciones en *GATA1*.
- Determinar si existe relación entre el tipo de mutación y las alteraciones hematológicas.

II

MARCO

TEÓRICO

CAPÍTULO 1. DESORDEN MIELOPROLIFERATIVO TRANSITORIO ASOCIADO AL SÍNDROME DE DOWN

ANTECEDENTES

El Síndrome de Down es la aneuploidía compatible con la vida más frecuente, con una incidencia de 1 caso por cada 600-1000 recién nacidos vivos.^{10, 11, 12} Las principales características de este síndrome incluyen cardiopatías congénitas, anomalías craneofaciales, alteraciones endocrinológicas, retraso en el neurodesarrollo, anomalías hematopoyéticas y neurodegeneración tipo Alzheimer.^{10,11}

A mediados del siglo XIX la mortalidad que predominaba en los pacientes con SD era muy elevada, quienes fallecían durante los primeros meses de vida debido principalmente a complicaciones cardíacas y/o hematológicas.

Actualmente debido a la mejoría en el manejo clínico de esta entidad nosológica se ha incrementado la esperanza de vida (que actualmente se considera cercana a los 60 años), por lo que los médicos a cargo de estos pacientes deben llevar una vigilancia estrecha durante los primeros 5 años de vida.

Además de las comorbilidades frecuentemente asociadas como hipotiroidismo (40%) y cardiopatías congénitas (40%)⁸ los niños con SD tienen de 10-20 veces más riesgo de desarrollar leucemia comparados con niños sin alteraciones cromosómicas dentro de los primeros 4-5 años de vida.^{2, 8, 9, 13}

Se ha estimado que 2-3% de los niños con SD desarrollarán leucemia mieloide y 10-20% desarrollan DMT.^{9, 11} Sin embargo la verdadera incidencia de este trastorno es desconocida pues se ha identificado en neonatos asintomáticos.

Una limitante es que los estudios de biometría hemática o frotis sanguíneos no son realizados de forma rutinaria en recién nacidos con SD en muchos centros de atención médica y aún no existe un consenso que haya definido los criterios específicos para su diagnóstico.

El DMT es considerado una fase preleucémica de LMA, con una transformación hacia leucemia mieloide en 20-30% de los casos.

^{7, 9, 14}

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define el DMT como un incremento en las células blásticas periféricas en neonatos con SD. ^{7,15}

El DMT se caracteriza por un aumento de las células blásticas circulantes que alberga mutaciones adquiridas en el extremo amino en el gen clave del factor de transcripción hematopoyético *GATA1*. ¹⁴

Aproximadamente 20-30% de los pacientes que presentan DMT desarrollarán Leucemia Mieloide Aguda (LMA) dentro de los siguientes 4-5 años. ^{12, 16, 17} Algunos autores consideran a ambas patologías dentro del mismo espectro. ¹²

El DMT se ha descrito únicamente en pacientes con trisomía 21, aunque algunos autores consideran que también puede presentarse en pacientes con fenotipo normal que presentan mosaicismo de trisomía 21 en células blasticas. ^{16, 17, 18}

Este desorden clonal está caracterizado por la presencia de blastos mieloides que expresan marcadores megacarioblásticos o bien antígenos de superficie asociados a plaquetas; generalmente

evoluciona a la remisión espontánea durante los 3-6 meses de vida, sin embargo en algunos casos puede ser fatal. ^{11, 16, 17}

El DMT puede manifestarse en etapa intrauterina y en periodo neonatal, algunos autores consideran que puede presentarse hasta los 2-3 meses de vida. ^{19, 20, 21}

En el periodo neonatal puede presentarse con anemia ó hidrops fetalis. Otros signos incluyen hepatoesplenomegalia, insuficiencia hepática, ictericia obstructiva, efusión pericárdica, leucocitosis (aunque en algunos pacientes el conteo de leucocitos puede ser normal), células blásticas en sangre periférica y erupciones en la piel. ^{9, 16, 22}

Alrededor del 10-15% de los neonatos con síndrome de Down tienen un diagnóstico de DMT con blastos > 10% y características clínicas típicas que requieren una estrecha vigilancia en el período neonatal ya que la tasa de mortalidad puede ser de hasta 20%. ^{7, 14} Otro 10-15% de los neonatos con síndrome de Down tienen una o más mutaciones *GATA1* adquiridas en asociación con un bajo número de células blásticas circulantes (<10%) y tienen una enfermedad clínica y hematológicamente silente (DMT silente). ¹⁴

En la mayoría de los casos de DMT clínico y DMT silente, la clona portadora de la mutación en *GATA1* entra en remisión completa y permanente sin necesidad de quimioterapia. Sin embargo, 20-30% de los recién nacidos con DMT y DMT silente desarrollan LMA en los primeros 4-5 años de vida.^{12, 14, 17, 21, 22} cuando las células con mutación en *GATA1* adquieren de manera adicional variantes patogénicas en oncogenes o por alteraciones epigenéticas.^{12, 14, 17}

Las mutaciones en *GATA1* son encontradas hasta en un tercio de los neonatos con SD y frecuentemente son clínica y hematológicamente "silentes". La mayoría de los casos de DMT presenta remisión espontánea.¹⁴

PATOGENIA

Se ha propuesto un modelo de tres pasos en la patogenia del DMT y LMA: se requiere la presencia de trisomía 21 en células troncales hematopoyéticas, una mutación adquirida en *GATA1* y al menos una mutación oncogénica adicional.^{14, 17, 23} Figura 1.

El modelo se describe a continuación:

1) Alteración en la hematopoyesis fetal inducida por trisomía 21.

Evento inicial. Al final del primer trimestre de gestación existe una hematopoyesis anormal inducida por la propia trisomía 21, considerándose un paso previo a la aparición de las mutaciones en *GATA1*. El DMT es considerado por algunos como una patología puramente fetal, donde el microambiente hematopoyético fetal puede también contribuir tanto a estos cambios como a la expansión y/o mantenimiento del clon mutante *GATA1s*. Publicaciones recientes indican que la trisomía de *RUNX1*, *ETS2* y *ERG* asociada a la presencia de *GATA1s* podría ser suficiente, para explicar algunas de las anomalías hematopoyéticas observadas en las células primarias de hígado humano y DMT. Aun no está totalmente claro porque la

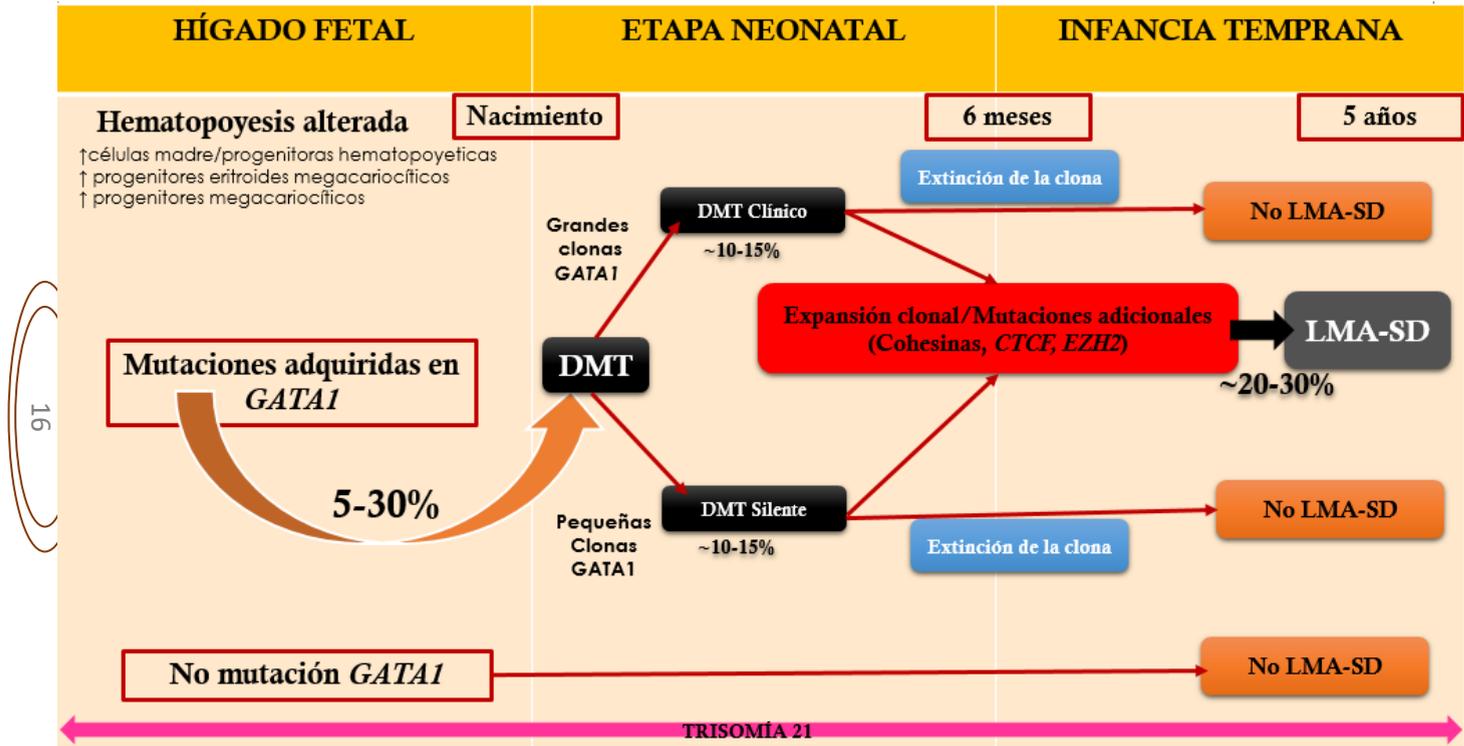


Figura 1. Patogénesis de DMT y LMA-SD. Modificado de Bhatnagar, et al., 2016

trisomía 21 causa cambios genómicos en la expresión génica que afectan directa o indirectamente a múltiples genes en la mayoría de los cromosomas. ^{10, 14, 17, 23}

2) Mutaciones en *GATA1* que favorecen la presencia de una proteína trunca en el extremo amino terminal. La asociación de mutaciones en *GATA1* con LMA-SD y DMT fue descrita por primera vez en el 2005 por John Crispino et al. Las mutaciones de *GATA1* que se pueden detectar en todos los casos desaparecen cuando el DMT o LMA entran en remisión, por lo que se considera que se trata de un evento somático adquirido. ^{14, 17}

Con el advenimiento de la tecnología de secuenciación de nueva generación se ha podido demostrar que las mutaciones *GATA1* están presentes en todos los casos de DMT y LMA-SD. Asimismo se ha encontrado que dichas mutaciones están presentes hasta en un 25-30% de todos los neonatos con Síndrome de Down. ¹⁴

Por lo que se considera que las mutaciones en *GATA1* son necesarias para el desarrollo de DMT y LMA, asimismo estas mutaciones son adquiridas en etapa intrauterina y dan una ventaja selectiva a las células progenitoras. Aproximadamente el 97% de las

mutaciones somáticas o adquiridas de *GATA1* se encuentran en el exón 2 y el 3% en el exón 3.^{7,14}

No existen mutaciones frecuentes reportadas; las variantes patogénicas incluyen inserciones, deleciones y mutaciones puntuales. Tampoco existe una correlación entre el tipo de mutación con mayor riesgo para desarrollar LMA-SD. Debido a que la proteína trunca *GATA1s* aumenta la producción anormal de progenitores hematopoyéticos, se considera que las mutaciones presentan un mecanismo de ganancia de función.^{14,17}

3) Mutaciones adicionales en LMA-SD. Se requieren mutaciones adicionales en otros genes que asociadas a la trisomía 21 y las mutaciones en *GATA1* favorezcan la transformación de células hematopoyéticas de un DMT a una LMA-SD. Entre los genes candidatos se encuentran *RAD21*, *STAG2*, *SMC3*, *SMC1A*, *CTCF*, *EZH2*, *KANSL1*.¹⁴

Otros genes propuestos son los de la vía Ras: *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *PTPN11* y *NF1*. La vía de señalización de IGF y TGF- β también se considera importante en la patogénesis de DMT y LMA.^{14, 22, 24}

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

El DMT tiene una expresividad variable: en el fenotipo más leve se detecta como un hallazgo incidental en un paciente aparentemente sano (10-25% recién nacidos) y en el otro extremo del espectro, los neonatos con DMT pueden presentar infiltración leucémica diseminada (10-20% de los recién nacidos) con hepatoesplenomegalia, derrames, coagulopatía, erupción cutánea y falla orgánica múltiple con un porcentaje de blastos >10%. ^{14, 22} (Ver Tabla 1)

La ictericia no es un dato clínico diagnóstico ya que puede presentarse en pacientes sin DMT, pero puede presentarse en el curso de fibrosis hepática progresiva, la cual se considera una complicación común, dentro de un cuadro clínico letal, por lo que siempre será necesario realizar biometría hemática. ^{7, 14, 22, 24}

**Tabla 1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS EN LOS PACIENTES CON
DMT**

| CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS (NEONATOS) | DMT* | DMT SILENTE** | SINDROME DE DOWN (SIN MUTACION EN GATA1) |
|-------------------------------------------|--------|---------------|------------------------------------------|
| HEPATOMEGALIA | 40% | <5% | 4% |
| ESPLENOMEGALIA | 30% | <1% | <1% |
| RASH EN LA PIEL | 11% | <1% | <1% |
| DERRAME PLEURAL/PERICARDICO | 9% | <1% | <1% |
| ICTERICIA | 70% | 60% | 50-60% |
| ANOMALIAS DE COAGULACION | 10-25% | ~5% | ~5% |
| TROMBOCITOPENIA (<100X10 ⁹ /L) | 50% | 50% | 50% |
| LEUCOCITOSIS (>26X10 ⁹ /L) | ~50% | 10% | 10-15% |
| ANEMIA (<13G/DL) | 5-10% | <5% | 1-5% |

*DMT: Blastos en sangre periférica >10% y una o más mutaciones adquiridas en GATA1. **DMT silente: blastos en sangre periférica ≤10% y una o más mutaciones adquiridas en GATA1. Modificado de Bhatnagar, et al., 2016.

DMT SILENTE

Al menos la mitad de todos los neonatos con SD con mutaciones *GATA1* tienen un porcentaje de blastos en sangre periférica que va del 1-10% y no presentan características clínicas que nos permitan sospechar DMT, por lo que se considera un cuadro silente (Tabla 1). En estos pacientes es importante detectar la presencia de mutación en *GATA1*, ya que esto implica que el paciente está en riesgo de desarrollar posteriormente LMA-SD si las células precursoras hematopoyéticas con la mutación de *GATA1* persisten. Aunque es posible que la ausencia de datos clínicos se deba a un clon mutante *GATA1* muy pequeño al nacer. Existe una fuerte correlación entre el tamaño de la clona mutante y el porcentaje de blastos de sangre periférica.¹⁴

Los estudios moleculares disponibles para el análisis de *GATA1* son la secuenciación Sanger y la metodología de NGS, con una sensibilidad que va del 10-30% y 0,3-2% respectivamente.^{7,14}

No está claro si debe realizarse una monitorización de las clonas *GATA1* mutantes después de que se realiza el diagnóstico, es importante señalar que un paciente puede tener más de una clona

mutante *GATA1*. Asimismo la LMA-SD puede desarrollarse a partir de una o más clonas *GATA1*.¹⁴

EVOLUCIÓN DEL DMT

El 80% de los pacientes con SD que desarrollan DMT presentarán una resolución espontánea dentro de los 3 meses de vida extrauterina, con una mortalidad del 20% debido a insuficiencia hepática por fibrosis e infiltración de células blásticas. La remisión inicia con la normalización de la biometría hemática y la desaparición de los blastos en sangre periférica, para posteriormente dar lugar a la resolución de los datos clínicos como la hepatomegalia.¹⁴

El 20-30% de los pacientes con DMT desarrollará LMA-SD. Los pacientes con SD y LMA que presentan la mutación de *GATA1* tienen mejor respuesta al tratamiento y mejor pronóstico que la población general.²⁵

La frecuencia de mutaciones *GATA1* se estima desde un 3-30% en los neonatos con síndrome de Down.^{7,14}

Las mutaciones *GATA1* se detectan en todos los casos de LMA-SD y, por lo tanto, son esenciales para la progresión de DMT a LMA-SD. Aún no se han identificado los factores que predicen de manera confiable la transformación de TAM a ML-DS.

El tipo de mutación *GATA1* no parece jugar un papel importante en el fenotipo. El tamaño de la clona mutante como predictor para el desarrollo de LMA-SD aun no es concluyente. El único factor clínico que se ha asociado con la transformación de DMT a LMA-SD es la presencia de derrame pleural en el período neonatal.

14, 26

HALLAZGOS DE LABORATORIO EN DMT

- Los principales son leucocitosis y la presencia de blastos en sangre periférica. Los blastos en el DMT clínico se han considerado >10%. Cuando son menores al 10% y existe mutación en *GATA1* se considera DMT silente.
- La leucocitosis se presenta en 30-50% de los casos de DMT e incluye elevación de neutrófilos, mielocitos, monocitos y basófilos.
- Trombocitosis y trombocitopenia. Aunque también se ha descrito que los pacientes pueden presentar un conteo normal de plaquetas.

- Anemia, se ha descrito que es poco frecuente, sin definirse un porcentaje en la mayoría de los estudios.
- Alteración en el perfil de coagulación (20-25%) en aquellos casos con insuficiencia hepática severa por infiltración blástica.
- Hiperbilirrubinemia conjugada y elevación de transaminasas, en caso de afección hepática. ^{7, 14}

Un dato específico de laboratorio para el diagnóstico de DMT es la presencia de un porcentaje elevado de células blásticas circulantes. Sin embargo aun no se establece el punto de corte para establecer si se trata de un DMT cuando no existe la posibilidad de realizar el análisis molecular de *GATA1*. Por lo que varios autores han considerado que debe ser >10% en sangre periférica como se ha indicado en párrafos anteriores. ^{7, 14, 15}

Kobayashi et al 2017, encontraron una expresión activa de la proteína MCP-1 (monocyte chemoattractant protein) en el tejido hepático en un paciente con DMT a quien se realizó un análisis completo de citosinas profibrogénicas, por lo que proponen su cuantificación como un biomarcador confiable no invasivo de fibrosis hepática asociada a DMT-SD.

Características de los blastos.

Aproximadamente el 98% de los neonatos con SD presentan blastos en sangre periférica. ^{7, 14}

Aun no existe un consenso internacional que defina el porcentaje de corte para establecer el diagnóstico clínico. En el OIDSC (Oxford Imperial Down Syndrome Cohort) se estableció el diagnóstico de DMT con un conteo de blastos >10% y la presencia de mutaciones en *GATA1* dentro de los primeros 14 días de vida extrauterina. En dicho estudio se encontró que el 8.5% presentaba un cuadro clínico reconocible de DMT; el 26% de los neonatos que presentaba blastos <10% en sangre periférica (Rango 1-10%) sin otros datos clínicos, presentaba mutación en *GATA1* por lo que fueron clasificados como DMT silente. Y que el 25% de los pacientes con blastos >10% no presentaron mutación en *GATA1*. ¹⁴

Por lo que se concluye que para un diagnóstico definitivo de DMT se requiere la presencia de blastos >10% asociado a mutación en *GATA1*. Esto es indispensable para identificar a todos aquellos pacientes en etapa neonatal que requieran una vigilancia muy estrecha en este periodo para el inicio de quimioterapia. ¹⁴

Aun así, el nivel de corte de blastos $>10\%$ no se considera ni específico ni sensible para identificar a la mayoría de los recién nacidos con mutaciones de GATA1. ¹⁴

Los blastos en DMT son megacarioblásticos con vesículas citoplasmáticas y citoplasma basófilo. Figura 2.

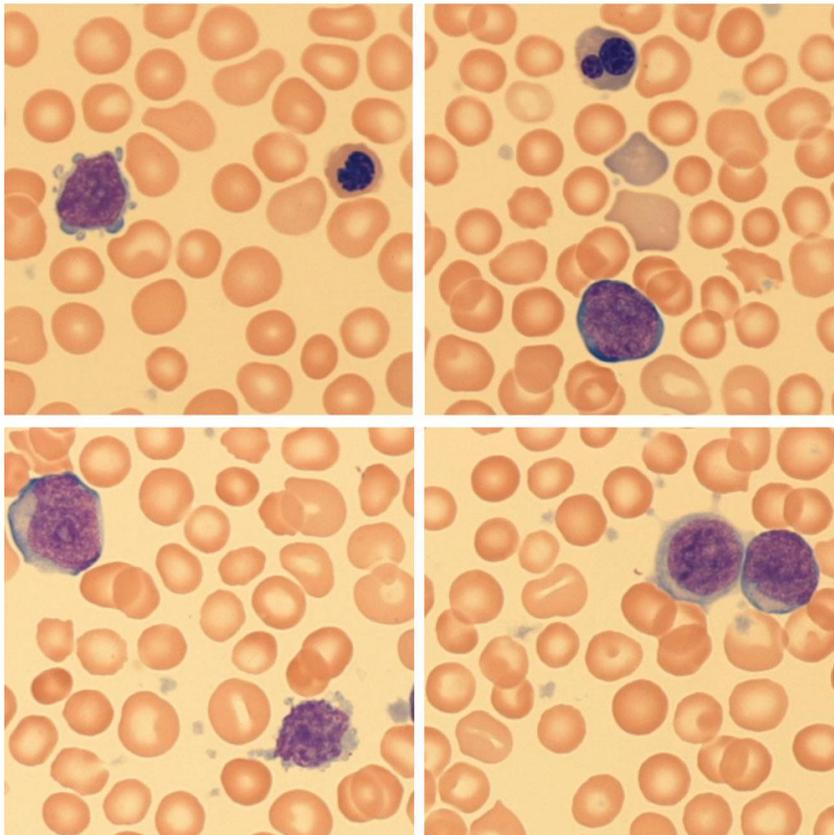


Figura 2. Blastos en sangre periférica en paciente con DMT. Tomado de Carruthers et al., 2017

El inmunofenotipo es muy variable, con un patrón característico de coexpresión de marcadores de células madre (CD34, CD117), marcadores mieloides (CD33/CD13), glicoproteínas plaquetarias (CD36, CD42, CD61) , así como CD38, CD56, CD71, CD42b y CD7. ^{1, 14, 24}

Actualmente no existe un perfil morfológico e inmunofenotípico que nos permita diferenciar con exactitud el DMT de los casos en los que hay blastos en sangre periférica sin mutaciones *GATA1*. ¹⁴

Tampoco existe una diferencia entre las características fenotípicas de los blastos en DMT y LMA-SD. ⁹

COMPLICACIONES DEL DMT

El DMT presenta una mortalidad de aproximadamente 20%, el 80% de los pacientes con SD presentará una resolución espontánea sin requerir ningún tipo de tratamiento.

Entre las complicaciones letales que se pueden presentar en DMT se ha descrito la falla respiratoria aguda, coagulopatía y fibrosis hepática.²⁴

TRATAMIENTO DEL DMT

Existen varias opciones terapéuticas, entre ellas: leucoféresis, esteroides, exanguinotransfusión y quimioterapia.^{14, 24}

En pacientes con leucocitosis, prematuridad y datos de alteración multiorgánica, el manejo recomendado de primera línea consiste en realizar exanguinotransfusiones repetidas, cuando no hay respuesta a este tratamiento se recomiendan dosis bajas de citarabine.^{9, 14, 18}

Hay pocos datos de los efectos tóxicos de quimioterapia con antraciclinas en productos prematuros. Von Donberg et al. Reportó el desarrollo de insuficiencia cardíaca después del uso de citarabina en un paciente prematuro con diagnóstico de LMA (M6). Aunque la causa más frecuente de fracaso del tratamiento es el desarrollo de toxicidad, especialmente mucositis e infección.^{9, 14}

En cuanto a las complicaciones dentro del DMT, Kobayashi et al 2018 consideran que la terapia con anticitoquinas dirigida a las citocinas fibrogénicas de la proteína MCP-1, podría proporcionar una nueva intervención terapéutica para la fibrosis hepática asociada con TMD-SD, ya que MCP-1 es responsable de la activación prolongada de las células estrelladas hepáticas (adipocitos hepáticos) productoras de colágeno, tanto de forma paracrina como autocrina, promoviendo la fibrosis hepática.

CAPÍTULO 2.-ASPECTOS MOLECULARES DE *GATA1*

EL GEN *GATA1*

La familia de proteínas GATA desempeña un papel fundamental en el desarrollo de muchos tipos celulares, incluyendo el linaje hematopoyético, cardiaco y endodérmico. ²⁷

El gen *GATA1* codifica una proteína que pertenece a la familia de factores de transcripción GATA. La proteína tiene un papel trascendental en el desarrollo de los eritrocitos al regular el cambio de la hemoglobina fetal a la hemoglobina adulta así como en la diferenciación de las líneas eritroides. ^{28, 29}

GATA1 se localiza en Xp11.23. ^{3, 28} Figura 3.



Figura 3. Locus *GATA1*: Xp11.23 (Tomado de:

<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GATA1&keywords=GATA1>)

GATA1 tiene 2 transcritos (debido a variantes en el proceso de corte y empalme), 98 ortólogos y 6 parálogos (*GATA2* es uno de los más importantes). El producto funcional de *GATA1* tiene 6 exones, 5 intrones.^{28, 30} Figura 4.

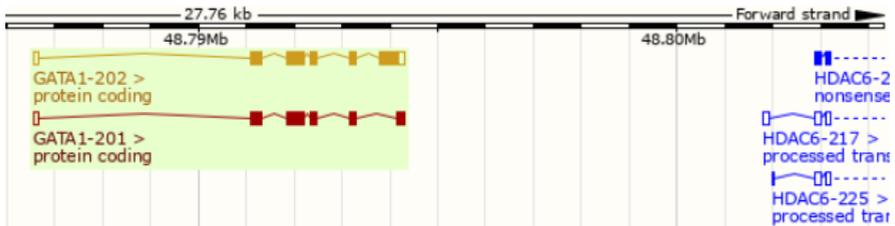


Figura 4. El gen *GATA1*. Tomado de

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000102145;r=X:48786554-48794311

ESTRUCTURA PROTEÍNICA DE GATA1

El gen *GATA1* codifica una proteína de 413 aminoácidos con una masa molecular de 42751 Da. El segundo transcrito con una proteína de 334 aminoácidos, sin embargo en la literatura no se ha documentado si ambas proteínas cumplen funciones diferentes. De acuerdo a datos de Gene Ontology las funciones de este gen incluyen la actividad de factor de transcripción y la unión a la cromatina.^{28, 30}

La proteína codificada presenta dominios de dedos de zinc y funciona como activador/represor de la transcripción de genes involucrados en el desarrollo de líneas celulares hematopoyéticas, se une a los sitios de DNA con la secuencia consenso 5'[AT]GATA[AG]3' dentro de las regiones reguladoras de los genes de globina y de otros genes expresados en células eritroides.^{12, 28, 30, 31, 32}

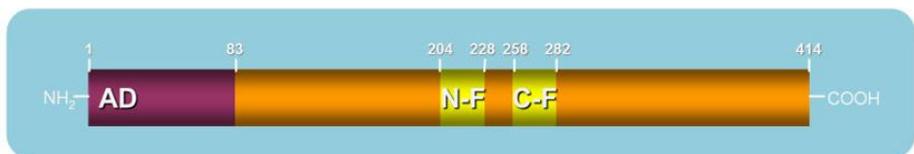


Figura 5. Dominios de GATA1: AD (dominio de activación), NF (dominio del extremo amino de dedos de zinc). CF (dominio del extremo carboxilo de dedos de zinc). (Tomado de <http://www.imbb.forth.gr/imbb-people/en/strouboulis-research>)

La proteína presenta un dominio de activación (AD), un dominio de dedos de zinc del extremo amino y un dominio de dedos de zinc del extremo carboxilo.³³

El dominio C-terminal de dedos de zinc tiene un papel fundamental en la unión al DNA, pues permite que GATA1 pueda asociarse con la secuencia consenso (A/T)GATA(A/G). El extremo amino aumenta la estabilidad de la unión de GATA1 al DNA y también facilita la unión de GATA1 a un subconjunto de sitios de unión que contienen secuencias palindrómicas. Además, el dominio N-terminal de dedos de zinc es crítico porque es el dominio que interactúa con el cofactor clave FOG1.²⁷

La proteína GATA1 presenta una estructura cuaternaria, formada por 413 aminoácidos, con una masa molecular de 42751 Da.²⁸

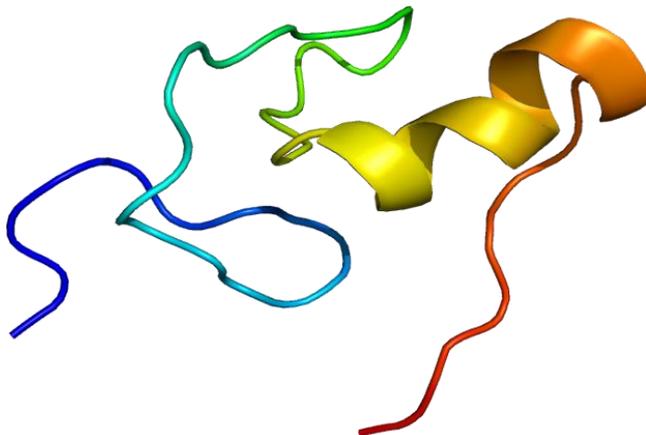


Figura 6. Estructura 3D de la proteína GATA1.

La proteína GATA1 puede formar homodímeros o heterodímeros con otras isoformas.²⁸

Interactúa (a través del dominio N-terminal de dedos de zinc) con *ZFPM1*, *GFI1B*, *PIAS4*, *LMCD1*, *BRD3*, *CREBBP*, *EP300*, *MED1*, *CCAR1* y *CALCOCO1* y *CEBPE*.³⁴ Figura 7.

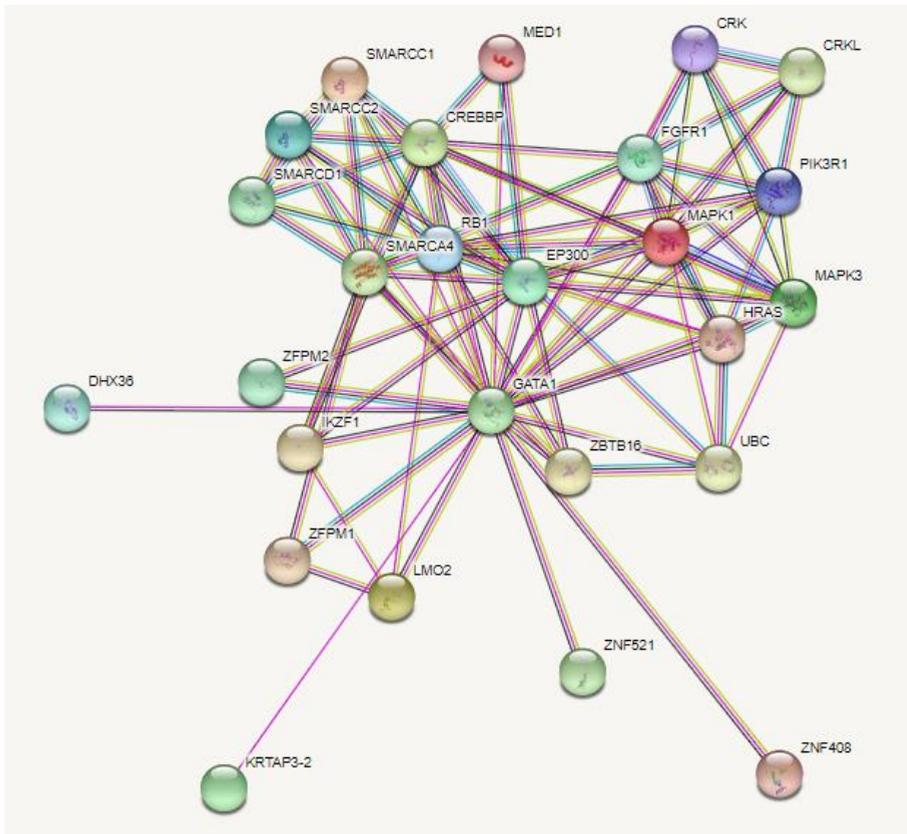


Figura 7. Esquema que muestra las proteínas que interactúan con GATA1.

GATA1 activa la transcripción de genes implicados en la diferenciación eritroide de células de eritroleucemia K562, que incluyen HBB, HBG1/2, ALAS2 y HMBS.³⁵

Estudios realizados en modelos murinos han mostrado que *gata1* es esencial para el desarrollo de células eritroides, megacariocitos, mastocitos, eosinófilos y basófilos.^{27, 36, 37}

Los ratones knock-out para *gata1* son incompatibles con la vida, Fujiwara, et al (1996) mostró que fallecen entre las 10 y 11SDG por anemia. Sin *gata1*, los progenitores eritroides entran a apoptosis, la cual se ha relacionado con una expresión reducida de Bcl-xL, considerada una molécula antiapoptótica.^{27, 38, 39}

El desarrollo de los megacariocitos en ausencia de *gata1* presenta múltiples anomalías; no regulan positivamente CD42, tienen una maduración deficiente asociado a un conteo bajo. El dominio de activación así como el dominio N-terminal de dedos de zinc son necesarios para la maduración normal y el control del crecimiento de los megacariocitos.^{27, 40}

CAPÍTULO 3. MUTACIONES EN *GATA1* ASOCIADAS AL DESORDEN MILOPROLIFERATIVO TRANSITORIO

Las mutaciones en este gen se han asociado con diversas patologías tales como la Trombocitopenia ligada al X con/sin anemia diseritropoyética, leucemia mieloide aguda en síndrome de Down (a nivel somático), anemia ligada al X con/sin neutropenia y/o anomalías de plaquetas, síndrome de trombocitopenia con beta talasemia ligada al X, anemia de Blackfan-Diamond, por mencionar algunos de los 54 fenotipos reportados en la literatura. ^{27, 28, 30}

Se teoriza que la trisomía 21 podría inducir altas tasas de mutación en determinados loci genómicos, entre ellos *GATA1*. Asimismo se ha comprobado en modelos murinos que regiones en el cromosoma 21 en triple dosis en resultan en anomalías en sangre periférica. ^{10, 23}

Roberts et al., 2013 en una cohorte de 200 neonatos con SD encontró que el 97.5% presentaba blastos en sangre periférica. Encontrando mutaciones en *GATA1* en el 8.5% de los pacientes.

Una copia extra de información genética contenida en una región de 4Mb en el cromosoma 21 (21q22.1-q22.2) puede tener un efecto acelerador en la producción de precursores hematopoyéticos precoces y posterior hematopoyesis multilinaje.^{17, 23}

Las variaciones patogénicas de *GATA1* en DMT-SD que han sido descritas incluyen mutaciones puntuales, inserciones, deleciones y duplicaciones,^{6, 7, 11, 26, 41, 42, 43, 44,45, 46} no existiendo hasta el momento mutaciones frecuentes. Tabla 2.

Tabla 2.- MUTACIONES EN *GATA1* REPORTADAS EN LA LITERATURA

| Autores | Paciente | Edad (días) | Sexo | Blastos | Mutación |
|-----------------------------------------|-----------------|--------------------|-------------|----------------|----------------------|
| <i>Rainis et al., 2003</i> NM_002049 | 1 | 17 | F | 84% SP | c.202delAG, p.Gly31 |
| | 2 | 22 | M | 24% SP | 296ins19 Ala61 |
| | 3 | 21 | F | 68% SP | IVS2_2T_C Pro73 |
| | 4 | 23 | M | 51% SP | 262delG Pro50 |
| | 5 | 13 | M | 8% SP | 297insA |
| | 6 | 23 | F | 24% MO | 272ins10 Ala53 |
| | 7 | 23 | M | 41% MO | 263del43 Pro50 |
| | 8 | 15 | F | 98% SP | 113A_G Met1Val |
| | 9 | 35 | F | 17% MO | 225C_T Pro38Leu |
| | 11 | 11 | M | 20% MO | 202delAG Gly31 |
| | 14 | 31 | F | >20% MO | 332G_T Pro73 |
| | 21 | 31 | F | 38% MO | 292ins11 Leu60 |
| | 24 | 11 | F | 33% MO | 115G_A Met1Ile |
| | 25 | 44 | M | 55% MO | 161C_T Pro16 |
| | 26 | 20 | F | 23% MO | 301del11,ins22 Tyr63 |
| 49 | 50 | M | 70% MO | 116G_T Met1 | |

| <i>Autores</i> | Paciente | Edad (días) | Sexo | Blastos* | Mutación |
|-------------------------------|----------|-------------|------|----------|--------------------------------------------|
| <i>Li et al., 2015</i> | 62B | 22 | M | 40% MO | 298dup289-298 Tyr62 |
| | 2 | ND | ND | ND | del6bp from IVS2p1 |
| | 5 | ND | ND | ND | 183 ins CC |
| <i>Hum et al., 2016</i> | 8 | ND | ND | ND | 194e267del74 bp |
| | TAM1 | ND | ND | 22% SP | c. 220G > T p.Val74Phe |
| | TAM3 | ND | ND | 26%SP | c.105_106insC p.Ser36Leufs*4 |
| | TAM4 | ND | ND | 1% SP | c.150delG p.Ser51Alafs*86 |
| | TAM5 | ND | ND | 79% SP | c.5_14delAGTTCCTGC p.Glu2Ala |
| | TAM6 | ND | ND | ND | c.183_187delCTACT p.Tyr62Glnfs*4 |
| | TAM7 | ND | ND | 55% SP | c.216_219delCCCAinsTG p.Pro73Gly |
| <i>Mundschau et al., 2003</i> | TMD-1 | 3 | M | 55% SP | 159-160ins20 |
| | TMD-2 | 13 | F | 25% SP | 174-175ins14 |
| | TMD-3 | 1 | M | 62% SP | 127-128ins1 |
| | TMD-4 | 2 | M | 26% SP | 173-174ins16 |
| | TMD-5 | 3 | M | 68% SP | 146-180del |
| | TMD-6 | 4 | M | 49% SP | 170-171ins14 |
| | TMD-7 | 0 | M | 64% SP | 205-218del |
| <i>Xu et al., 2003</i> | TMD 1 | 6 | F | ND | 1-239 del 239 bp (no 1st initiation codon) |
| | TMD 2 | 8 | F | ND | 1-239 del 239 bp (no 1st initiation codon) |
| | TMD 3 | 1 | M | ND | 9-52 del 44 bp |
| | TMD 4 | 9 | F | ND | 109-110delAG |
| | TMD 5 | 3 | F | ND | 64insC |
| | TMD 6 | 5 | M | ND | 56G_T (Glu13Stop) |
| | TMD 7 | 10 | M | ND | 188 ins 22 bp |
| | TMD 8 | 0meses | M | ND | 208C_A (Tyr63Stop) |
| | TMD 9 | 4 | M | ND | 20A_G (no start codon) |
| | TMD 10 | 5 | F | ND | 342-470 del 129 bp |
| | TMD 11 | 0 | M | ND | 55-56delAG |
| | TMD 12 | 8 | F | ND | 208C_A (Tyr63Stop) |
| | TMD 13 | 8 | M | ND | 109-110delAG |
| | TMD 14 | 4 | F | ND | 206insT |
| | TMD 15 | 4 | F | ND | 226C_G (Tyr69Stop) |
| | TMD 16 | 0 | F | ND | 218G_T (Glu67Stop) |
| | TMD 17 | 0 | F | ND | 68C_T (Gln17Stop) |
| | TMD 18 | 4 | M | ND | 208C_A (Tyr63Stop) |

| Paciente | Edad (días) | Sexo | Blastos | Mutación |
|----------|-------------|------|---------|--------------------------------------------|
| TMD 19 | 0 meses | F | ND | 135delA |
| TMD 20 | 0 | F | ND | IVS1 to IVS2 del 1415 bp |
| TMD 20 | 0 | F | ND | 1-239 del 239 bp (no 1st initiation codon) |
| TMD 21 | 0 | F | ND | 193 ins 19 bp |

*Blastos en porcentaje. SP: sangre periférica. MO: médula ósea. ND: información no disponible. F: género femenino. M: género masculino.

La presencia de la isoforma trunca (*GATA1s*) de la proteína codificada por *GATA1* y la ausencia de la proteína silvestre conducen a la supresión de la producción de megacariocitos normales, así como a un aumento de la producción y maduración de células megacarioblásticas aberrantes. Asimismo *GATA1s* modificaría la regulación normal de otros factores de transcripción, incluyendo *GATA2*, *MYB*, *MYC* e *IKZF1* en periodo fetal.^{10, 23, 45, 47}

Actualmente se considera que los pacientes con Trisomía 21 que presentan mutaciones somáticas en *GATA1* pueden tener un riesgo del 5-10% de desarrollar leucemia mieloide, esto debido a que el producto del gen mutado confiere una ventaja de crecimiento selectivo a las clonas mutantes, ya que se trata de un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores eritroides y megacariocíticos.^{7, 16}

III MARCO METODOLÓGICO

MARCO METODOLÓGICO

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, transversal y de serie de casos con muestreo no probabilístico.

Criterios de Inclusión:

- En el trabajo se incluyeron pacientes de ambos sexos, sin importar origen étnico, con diagnóstico de Síndrome de Down que cumplan con los criterios clínicos de Hall (8), menores de 5 años con diagnóstico de Desorden Mieloproliferativo Transitorio (48) o que presenten alguna alteración en la biometría hemática compatible con los cuadros clínicos reportados en la literatura por su relación con mutaciones en el gen *GATA1*.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes que hayan sido transfundidos recientemente.
- Pacientes con SD con leucemia linfoide.

Criterios de Eliminación:

- Pacientes en quienes la muestra biológica haya sido insuficiente y no haya sido posible acudir para toma de nueva muestra.
- Pacientes con expedientes incompletos.
- Pacientes que soliciten su retiro del protocolo de investigación.

Tipo de muestreo: muestreo no probabilístico

Los casos estudiados constituyen una muestra no probabilística, basada en el diagnóstico de Síndrome de Down y presencia del Desorden Mieloproliferativo Transitorio, así como aquellos pacientes que presenten alteración en la biometría hemática que sea compatible con los cuadros clínicos reportados en la literatura por su relación con mutaciones en el gen *GATA1*.

Tabla 3. Definición de las variables

| Variable. | Definición. | Tipo de variable. | Escala de medición. |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Síndrome de Down | Trastorno genético causado por la presencia de una copia extra del cromosoma 21 o una parte del mismo. | Cualitativa | Características clínicas |
| Desorden Mieloproliferativo Transitorio | Cuadro hematológico generalmente autolimitado que se caracteriza por la proliferación de mieloblastos en la sangre periférica y la médula ósea, y que afecta únicamente a pacientes con síndrome de Down. | Cuantitativa. | Porcentaje de blastos en médula ósea menor que en sangre periférica. Infiltración medular menor de 60%. |
| Mutaciones en el gen <i>GATA1</i> | Cambio patogénico en la secuencia de nucleótidos del gen <i>GATA1</i> . | Cualitativa | Secuencia nucleotídica del exón 2 con referencia a la encontrada en NCBI con número NG_008846.2 |

TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS A EMPLEAR.

1. Historia clínica genética.
2. Revisión de expediente clínico
3. Firma de carta de consentimiento informado
4. Toma de muestra de sangre periférica
5. Extracción de DNA
6. Reacción en Cadena de Polimerasa de Punto final para la amplificación del Exón 2 del gen *GATA1*.
7. Purificación de banda de gel de agarosa al 2%.
8. Reacción de secuencia.
9. Secuenciación automatizada del Exón 2 del gen *GATA1* y comparación con la secuencia de referencia NG_008846.2.
10. Recolección y análisis de datos mediante programas informáticos de Hojas de cálculo.
11. Revisión de la literatura para comparar el tipo de mutaciones encontradas en este tipo de pacientes.

Los pacientes fueron valorados en el Servicio de Genética del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, donde se realizó Historia Clínica Genética. Una vez confirmado el diagnóstico de Síndrome de Down y la alteración en la biometría hemática compatible con DMT se procedió a explicar a los padres o tutores el objetivo del estudio.

Si los padres o tutores aceptaban la participación del paciente se procedió a su autorización a través de la carta de consentimiento informado.

Posteriormente se procedió a la toma de muestra de sangre periférica para realizar la extracción de DNA en leucocitos T (Ver anexo 1).

Una vez obtenido el DNA se realizó la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) de Punto Final para la amplificación del Exón 2 del gen *GATA1*.

Tabla 4. CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA

PCR *GATA1*

| | 1X |
|----------------------------------------------|-----------------------|
| <i>H₂O</i> | 16.6 |
| <i>DMSO</i> | 1.0 |
| <i>BUFFER (1x)+ MgCl₂ (1.5mM)</i> | 2.5 |
| <i>MgCl₂ (0.5mM)</i> | 0.5 |
| <i>dNTPs</i> | 1.0 |
| <i>GATA1Fw (10mM)</i> | 0.6 |
| <i>GATA1Rv (10mM)</i> | 0.6 |
| <i>Taq (5U/microlitro) ROCHE</i> | 0.2 |
| <i>DNA (50 a 100 ng/microl)</i> | 2.0 |
| | (200 ng por reacción) |
| <i>Vol. Final</i> | 25 microlitros |

Se realizó PCR de punto final con las siguientes condiciones:

Tabla 5. Condiciones de PCR para el termociclador.

| | | |
|----------------------------------|-----------|-------------|
| <i>Desnaturalización inicial</i> | 95 °C | 5 minutos |
| | 35 ciclos | |
| <i>Desnaturalización</i> | 95 °C | 30 segundos |
| <i>Alineamiento</i> | 53 °C | 30 segundos |
| <i>Extensión</i> | 72 °C | 30 segundos |
| <i>Extensión final</i> | 72 °C | 7 minutos |
| | 04 °C | |

Se comprobó la amplificación del templado con Electroforesis en gel de Agarosa al 2% en cada una de las muestras.

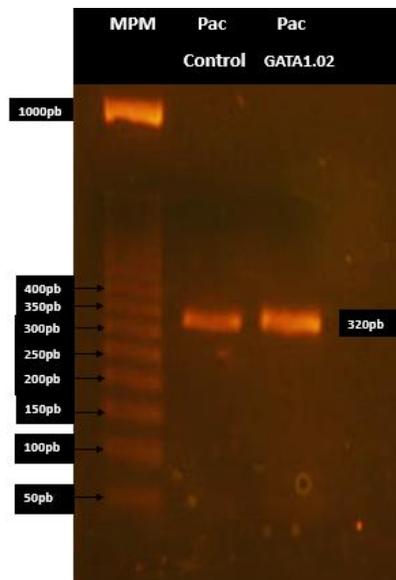


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Columna 1: Marcador de peso molecular 50 pb. Columna 2: Paciente control. Columna 3: Paciente GATA1.02.

Posteriormente se procedió a realizar purificación de la banda del gel de agarosa con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (ver anexo 2).

Se comprobó la concentración del templado para realizar la reacción de secuencia.

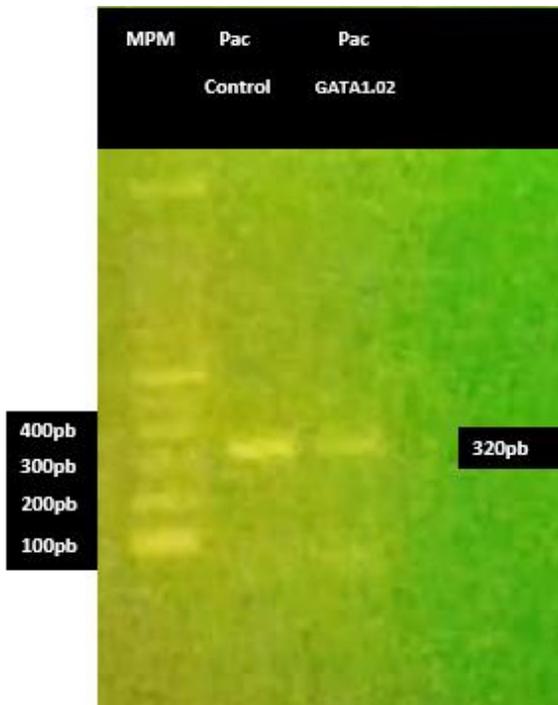


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 2%. Columna 1: Marcador de peso molecular 100 pb. Columna 2: Paciente control. Columna 3: Paciente GATA1.02.

La PCR de secuencia se calculó de la siguiente manera de acuerdo a la sugerencia del proveedor (Kit DTCS).

Tabla 6. Cálculo de reactivos para la reacción de secuencia.

| | 1x | nx |
|------------------------|--------|----|
| <i>H₂O</i> | 10 µl | |
| <i>DTC'S</i> | 8 µl | |
| <i>GATA1Fw</i> | 0.5 µl | |
| <i>Templado (4ong)</i> | 1.5 µl | |
| <i>Volumen final</i> | 20 µl | |

Al término de la PCR de secuencia se procedía a la purificación del segmento génico a estudiar (exón 2 de GATA1) de acuerdo al procedimiento señalado en el anexo 3.

Finalmente las muestras fueron sometidas a una electroforesis capilar automatizada en un secuenciador Beckman-Coulter C8000.

Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia de referencia de NCBI NG_008846.2.

Se conformó una base de datos clínicos, hematológicos y moleculares a partir de un interrogatorio directo, los expedientes electrónicos y los resultados de las pruebas moleculares los cuales fueron concentrados en hojas de recolección de datos. Ver Anexo 5.

Procesamiento y análisis estadístico.

Se realizó estadística descriptiva, con pruebas de medidas de tendencia central, apoyadas en tablas y gráficas.

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, destacando la parte correspondiente al Título Segundo, Capítulo 1 donde se establecen los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, se elaboró el consentimiento informado por escrito para cada uno de los participantes los cuales aceptaron ingresar al estudio de manera voluntaria, sin remuneración alguna y estricta confidencialidad del individuo.

El desarrollo de este protocolo implicó un riesgo mínimo, ya que la punción venosa para obtener la muestra sanguínea pudo eventualmente ocasionar un pequeño hematoma a los pacientes que participaron en el estudio, sin que esto se considere una complicación con potencial riesgo para la vida.

Se pretendió identificar si los pacientes con SD y diagnóstico de Desorden Mieloproliferativo Transitorio presentaban mutaciones en el Exón 2 del gen *GATA1* para poder determinar si estas variaciones pueden ser usadas como biomarcador diagnóstico y pronóstico.

Se resguardó la identidad de los pacientes en una base de datos independiente a la que solo tuvo acceso el investigador principal. No se identificó a ningún paciente en la presentación de resultados, así como tampoco se identificará en alguna publicación que a futuro derive del presente trabajo.

Este protocolo fue sometido para su autorización a los Comités de Investigación y de Ética en Investigación del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Toda la información y los datos recabados de los expedientes fue manejada de acuerdo a la Ley Federal de Protección de Datos Personales publicada el 5 de julio de 2010, cuyo artículo 3, fracción V establece como dato personal a toda aquella información que permita identificar a una persona.

Consentimiento informado

En base al Código de Núremberg, obtener el consentimiento informado y voluntario de los sujetos humanos es absolutamente esencial.

Debido a que la carta de consentimiento es un requisito indispensable para solicitar la autorización de un proyecto o protocolo de investigación de acuerdo al Artículo 11, numeral 11.3 de la Norma Oficial Mexicana que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos (NOM-012-SSA3-2012) en el apartado de anexos se agrega el formato de Consentimiento Informado que fue utilizado en el presente estudio.

Ver Anexo 4.

Conflicto de intereses

Los miembros de este estudio declaran no tener conflictos de intereses en el desarrollo de este trabajo.

CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

La parte experimental de la investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Medicina Genómica del CMN 20 de Noviembre, clasificado con un nivel de bioseguridad 2 para el manejo de agentes biológicos.

Se tomaron las medidas generales de dicho nivel de bioseguridad en el manejo de muestras biológicas (sangre humana), incluyendo el uso de barreras físicas como: bata de algodón, guantes, cubre bocas y lentes de protección.

Además, todo el personal del laboratorio adoptó las medidas preventivas para su protección en el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias tóxicas e infecciosas; tomando en cuenta los requisitos generales aplicables en la materia, en particular las Normas Oficiales Mexicanas:

- NOM-166-SSA1-1997. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
- NOM-087-ECOL-1995. Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica.

- NOM-005-STPS-1998. De las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.
- NOM-009-STPS-1993. Relativa a las condiciones de seguridad e higiene para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias corrosivas, irritantes y tóxicas en los centros de trabajo.
- NOM-018-STPS-2000. Que establece el sistema para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo.
- NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Relativa a la protección ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo.

Para las medidas del manejo de desechos biológicos y material contaminado se siguieron los lineamientos de la NOM-166-SSA1-1997, entre las que se incluyen:

- Sangre en contenedores fue desechada en: Bolsa de plástico color roja.
- Residuos no anatómicos: en Bolsa de plástico color roja.
- Objetos punzocortantes usados y sin usar: en Recipientes rígidos color rojo.

También se tomó en cuenta la normatividad interna emitida por el ISSSTE, para la protección al personal expuesto, derivados de la NOM-166-SSA1-1997.

Las muestras de sangre periférica se consideran material potencialmente peligroso en cuanto a la posibilidad de transmitir patógenos sanguíneos (virus de la hepatitis (HBV, HCV, HDV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), sífilis, etc.

Por lo tanto, la identificación, separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, se realizó conforme lo establece la: LEY GENERAL PARA LA PREVENCIÓN Y GESTIÓN INTEGRAL DE LOS RESIDUOS. Última reforma publicada DOF 22-05-2015. Es la máxima ley en el territorio de México en materia de gestión de residuos, esta ley abarca la gestión tanto de residuos no peligrosos sólidos urbanos como la gestión de los residuos peligrosos, considera además una tercera clasificación de residuos denominados residuos de manejo especial y está basada en el Artículo 4 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos y la Ley General del Equilibrio Ecológico y protección al ambiente.

Dado que el manejo y disposición final de los residuos peligrosos biológicos infecciosos se llevó a cabo de acuerdo a criterios de seguridad establecidos, este proyecto de investigación no implicó riesgo ambiental.

RECURSOS

Para esta investigación se requirió de recursos humanos, equipos de laboratorio, reactivos y consumibles.

RECURSOS HUMANOS

Dentro del área de recursos humanos estuvieron incluidos los médicos especialistas que seleccionaron a los pacientes candidatos al estudio de acuerdo a los criterios de inclusión.

Además se requirió de médicos especialistas con experiencia en el uso de técnicas moleculares para la identificación de mutaciones en el gen *GATA1*.

- Dra. María del Carmen Chima Galán, Médica Genetista. Asesora Principal del protocolo. Adscrita al Servicio de Genética Médica y a la División de Medicina Genómica.
- Dra. Yuritzí Santillán Hernández, Jefa de Servicio de Genética Médica.

- Dra. Liliana García Ortiz, Adscrita a la División de Medicina Genómica.
- Dra. Miriam Hidalgo Ostoa, Médico Residente que desarrolló el protocolo de tesis para obtener grado de especialidad.

RECURSOS MATERIALES

- Expedientes clínicos de pacientes del Servicio de Genética Médica con diagnóstico de Desorden Mieloproliferativo Transitorio o alteraciones hematológicas descritas en la literatura por su asociación con mutaciones en el gen *GATA1* en Síndrome de Down del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
- Transiluminador
- Secuenciador capilar
- Reactivos y consumibles.



Figura 10. Termociclador.



Figura 11. Equipo de electroforesis.



Figura 12. Secuenciador automatizado Beckman-Coulter CEQ 8000, utilizado durante la realización de este protocolo de investigación.

La compra de reactivos se realizó con recursos del equipo de trabajo.

IV

RESULTADOS

RESULTADOS

De acuerdo a registros en el sistema de expedientes del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre durante el periodo de los últimos 10 años (2009-2018) se ha otorgado un total de 3000 consultas (incluyendo valoración de primera vez y citas subsecuentes cada 6-8 meses) para pacientes con Síndrome de Down.

En un periodo que comprende los años 1996-2017 se ha revisado aproximadamente 1000 pacientes con Síndrome de Down desde etapa neonatal hasta una edad promedio de 10 años, hasta la fecha con sólo 1 paciente reportado con Desorden Mieloproliferativo Transitorio en periodo neonatal. Sin embargo no es posible establecer una incidencia de DMT ya que no contamos con datos de laboratorio de todos los pacientes en periodo neonatal, ya que muchos ingresan a este Centro Médico en etapa de lactante.

Para este protocolo se realizó una revisión de expedientes que comprendió el periodo de 01 de marzo 2017 a 30 de junio 2018 (16 meses) de todos los pacientes con diagnóstico clínico de Síndrome de Down de acuerdo a los criterios de Hall, que fueron atendidos en la

consulta externa del Servicio de Genética Médica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre.

Durante el periodo de 16 meses se atendió un total de 127 pacientes con Síndrome de Down, 59 del género femenino y 68 de género masculino. El rango de edad fue de: 2 meses hasta los 10 años, quienes acudieron a revisiones subsecuentes en promedio cada 6-8 meses.

De los 127 pacientes con SD solo 15 mostraban alteración en la biometría hemática (11.8%), 7 pacientes masculinos y 8 femeninos. Ver Tabla 6.

Se incluyó 1 paciente al protocolo por antecedente de DMT durante el periodo neonatal, quien durante el último año no presentó alteración en la biometría hemática, el cual se designó con el número GATA1.01

2 pacientes fueron eliminados del estudio ya que no se obtuvo DNA de la muestra de sangre periférica y no fue posible programar una segunda toma.

Se recabaron un total de 14 muestras, 1 muestra de DNA del paciente con antecedente de DMT y 13 muestras de DNA de pacientes con Síndrome de Down en un rango de edad entre 1 y 10 años, quienes presentaban alteraciones hematológicas.

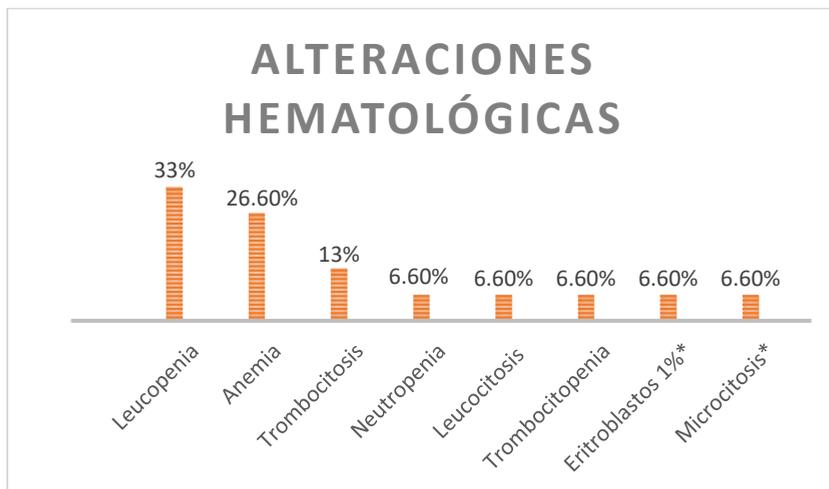
TABLA 7. ALTERACIONES HEMATOLOGICAS EN LOS PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN Y RESULTADO MOLECULAR

| PACIENTE | EDAD | SEXO | ALTERACIÓN HEMATOLOGICA | SECUENCIA GATA1 EXON 2 |
|----------------------|----------|-----------|--------------------------------|------------------------|
| GATA1.01 | 2 años | Masculino | DMT en periodo neonatal | NORMAL |
| GATA1.02 | 3 años | Masculino | Neutropenia moderada | NORMAL |
| GATA1.03 | 2 años | Femenino | Trombocitosis | NORMAL |
| GATA1.04 | 2 años | Masculino | Leucopenia | NORMAL |
| GATA1.05 | 2 años | Masculino | Trombocitosis | NORMAL |
| GATA1.06 | 4 años | Femenino | Leucopenia | NORMAL |
| GATA1.07 | 10 años | Masculino | Leucocitosis | NORMAL |
| GATA1.08 | 11 meses | Femenino | Anemia | NORMAL |
| GATA1.09 | 3 años | Masculino | Anemia | NORMAL |
| GATA1.10 | 4 años | Femenino | Trombocitopenia | NORMAL |
| GATA1.11 | 1 año | Masculino | Leucopenia | NORMAL |
| GATA1.12 | 4 años | Masculino | Anemia | NORMAL |
| GATA1.13 | 2 meses | Femenino | Eritroblastos 1%, microcitosis | NORMAL |
| GATA1.14 | 3 años | Femenino | Leucopenia | NORMAL |
| Paciente eliminado 1 | 2 años | Femenino | Leucopenia | NO DISPONIBLE |
| Paciente eliminado 2 | 3 años | Femenino | Anemia | NO DISPONIBLE |

Después de analizar cuidadosamente las secuencias de cada uno de los pacientes se determinó que ninguno presentaba mutación en el Exón 2 del gen *GATA1*.

Se enlista a continuación el porcentaje de las alteraciones hematológicas encontradas en nuestra población de estudio.

GRÁFICA 1. ALTERACIONES HEMATOLOGICAS MÁS FRECUENTES EN ESTE ESTUDIO.



*mismo paciente *GATA1.13*

n=15. No se incluye al paciente *GATA1.01* con antecedente de DMT, para no modificar la incidencia debido a que nuestra muestra fue pequeña.

Se realizó la secuenciación del exón 2 de GATA1 en 14 pacientes, no encontrándose cambios en la secuencia del paciente comparado con la secuencia de referencia NCBI (NG_008846.2).

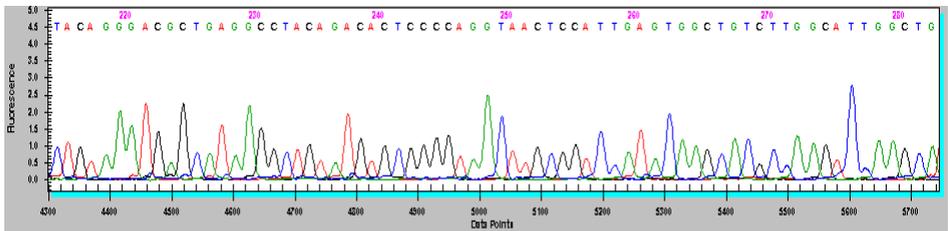


Figura 13. Electrograma paciente GATA1.o8, secuencia normal.

V DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Diversos autores consideran que la incidencia de mutaciones en *GATA1* va desde un 5-30%, de acuerdo a estimaciones en diversos protocolos. Y que el DMT es un proceso exclusivo del periodo neonatal asociado a alteraciones en la hematopoyesis fetal en pacientes con SD, que en ocasiones puede extenderse hasta los 2-3 primeros meses de vida extrauterina.

Tomando en consideración que el DMT se presenta en el periodo neonatal (hasta máximo 3 meses) y que las alteraciones hematológicas son transitorias, la recolección de los pacientes con posible mutación en *GATA1* resulta muy compleja.

Consideramos que la población de estudio de pacientes con Síndrome de Down del Centro Médico Nacional 20 de noviembre fue muy pequeña debido por una parte a que generalmente los pacientes que acuden a la consulta de Genética son referidos después de los 6 meses de edad debido al trámite administrativo y dada la naturaleza transitoria del DMT, la evaluación de los posibles casos puede no coincidir con la presencia de alteraciones hematológicas, lo que dificulta la selección de casos y la obtención de una muestra mas grande.

Ante la dificultad de encontrar pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión, decidimos incluir pacientes con otras alteraciones hematológicas ya que la literatura reporta algunos casos con anemia (Oztekin, et al., 2013).

El motivo de haber incluido pacientes desde periodo neonatal hasta los 5 años, fue que se esperaba encontrar pacientes con Síndrome de Down en fase preclínica de leucemia mieloide aguda, sin embargo de los pacientes analizados ninguno presentó mutación en *GATA1*.

Dentro de la población de estudio en este Centro Médico se detectó una incidencia de 12.5% para alteraciones hematológicas en pacientes con Síndrome de Down, siendo la leucopenia y anemia las mas frecuentes, con un 33% y 26.6% respectivamente.

Uno de los pacientes (*GATA1.01*) presentó DMT en etapa neonatal, al momento de realizar el estudio contaba con una edad de 2 años y no se detectó alteracion en la secuencia del exón 2 del gen *GATA1*, lo cual confirma lo establecido previamente por diversos autores respecto a la hipótesis de que una vez remitido el cuadro

clínico ya no es posible detectar mutaciones pues éstas se resuelven de forma espontánea.

Es importante destacar que tampoco se analizó el resto de los exones de *GATA1*, pero de acuerdo a la literatura la mayor parte de las mutaciones se presentan en el exón 2 (97%).

VI

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Se trata del primer estudio en población latina y específicamente población mexicana que intenta determinar la presencia de mutaciones en el gen *GATA1* en pacientes con Síndrome de Down y DMT.

La mayoría de los estudios reportados hasta el momento son de población caucásica y de origen asiático, por lo que no podemos definir actualmente si servirán como referencia para nuestra población.

Es indispensable ampliar el tamaño de la muestra de este protocolo de estudio, incluyendo únicamente pacientes con Síndrome de Down en periodo neonatal y como máximo hasta los 2-3 meses de vida extrauterina, ya que el DMT se considera un cuadro clínico provocado por una alteración en la hematopoyesis fetal aunado a la trisomía 21 y a la presencia de mutaciones somáticas transitorias asociadas en *GATA1*.

No fue posible estimar la incidencia del Desorden Mieloproliferativo Transitorio ya que la muestra es muy pequeña y

hasta el momento solo se ha encontrado 1 paciente en este Centro Médico. Tampoco podemos estimar la incidencia del DMT silente ya que ninguno de los pacientes presentó alteración en la secuencia de nucleótidos del exón 2 de dicho gen.

Sólo pudimos establecer que nuestra población presentó una incidencia de alteraciones hematológicas del 12.5%, siendo la leucopenia y anemia las mas frecuentes.

En etapas posteriores de este proyecto se modificará la estrategia para la selección de pacientes desde la etapa neonatal, con el apoyo del servicio de Neonatología, para obtener una muestra representativa que nos permita estimar la incidencia del DMT silente y el porcentaje de pacientes con blastos circulantes con o sin mutaciones en *GATA1* de población mexicana.

Hace falta mayor evidencia científica de la presencia de mutaciones en *GATA1* en pacientes con SD y DMT en distintas poblaciones que permitan considerar estas variaciones genéticas como un marcador pronostico de LMA-SD.

ABREVIATURAS

SD: Síndrome de Down

DMT: Desorden Mieloproliferativo Transitorio

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

LMA-SD: Leucemia Mieloide Aguda asociada al Síndrome de Down

LMKA: Leucemia Megacarioblástica Aguda

LMKA-SD: Leucemia Megacarioblástica Aguda asociada a Síndrome de Down

GATA1: gen de la familia de factores de transcripción GATA, regula la expresión de genes esenciales en la diferenciación eritroide y megacariocítica.

ISSSTE: Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado.

PCR: Reacción en cadena de polimerasa

OMS: Organización Mundial de la Salud

SDS: Dodecil sulfato de sodio, detergente aniónico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roy A, Roberts I, Norton A, Vyas P. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: a multi-step model of myeloid leukaemogenesis. *British Journal of Haematology*, 147, 3–12
2. Khan I, Malinge S, Crispino J. Myeloid leukemia in Down syndrome. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):25-36.
3. Andres, Fernandez, Fernandez-Delgado. Alteraciones hematológicas en las personas con síndrome de Down. *Rev Esp Pediatr* 2012; 68(6): 421-423.
4. Crombet Ramos, Svarch Guerchicoff. Alteraciones hematológicas en el síndrome de down. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1998;14(2):80-86.
5. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 2002; 32:148-52.
6. Mundschau G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, Arceci RJ, Crispino JD. Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*, 1 June 2003 Volume 101, Number 11.
7. Roberts, Alford K, Hall G, Juban G, Richmond H, Norton A, et al. GATA1-mutant clones are frequent and often unsuspected in babies with Down syndrome: identification of a population

at risk of leukemia. *Blood*, 5 December 2013 Volume 122, Number 24.

8. Del Castillo, Uranga, Zafra. 2012. *Genética Clínica*. México. Editorial Manual Moderno. Primera edición.
9. Oztekin, Kalay, Tezel, Tayfun, Kupesiz, Hangul, et al. Chemotherapy for transient myeloproliferative disorder in a premature infant with Down syndrome. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 2013, 38, 262–264. 8
10. Liu et al. Triplications of human chromosome 21 orthologous regions in mice result in expansion of megakaryocyte-erythroid progenitors and reduction of granulocyte-macrophage progenitors. *Oncotarget*, 2018, Vol. 9, (No. 4), pp: 4773-4786.
11. Lum, Choong, Krishnan, Mohamed, Ariffin. GATA1 mutations in a cohort of Malaysian children with Down syndrome-associated myeloid disorder. *Singapore Med J* 2016; 57(6): 320-324. doi: 10.11622/smedj.2016106.
12. Yin, et al. Distinct GATA1 Point Mutations in Monozygotic Twins With Down Syndrome and Transient Abnormal Myelopoiesis From a Triplet Pregnancy. *Am J Clin Pathol* October 2016;146:1-7.
13. Orozco-Gutiérrez AK, Ávila-Iglesias MC. Síndrome mieloproliferativo neonatal transitorio. Informe de dos casos. *Acta Pediatr Mex* 2011;32(2):87-92.

14. Bhatnagar, et al. Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: an Update. *Curr Hematol Malig Rep* (2016) 11:333–341.
15. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951
16. Carruthers, et al. Clinical implications of transient myeloproliferative disorder in a neonate without Down syndrome features. doi:10.1111/jpc.13628.
17. Gallagher-Lacey C, Afify Z, Yaish HM, Yoder BA, Christensen RD. An Instructive Case of Transient Myeloproliferative Disorder. *Clinical Pediatrics* 2017, Vol. 56(3) 288–289.
18. Lopez Escobar, et al. Manifestaciones cutáneas del trastorno mieloproliferativo transitorio asociado a síndrome de Down. *An Pediatr (Barc)*. 2008;68(1):70-82.
19. Tordecilla, Rodríguez, Álvarez, Velozo. Síndrome de Down, trastorno mieloproliferativo transitorio y fibrosis hepática. *Rev. chil. pediatr.* v.74 n.1 Santiago ene. 2003
20. Gamis AS, Smith FO. Transient myeloproliferative disorder in children with Down syndrome: clarity to this enigmatic disorder. *British Journal of Haematology*, 2012, 159, 277–287.
21. Dixon N, Kishnani PS, Zimmerman S. Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down

- syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006 Aug 15;142C(3):149-57.
22. Hon, Leung. Transient myeloproliferative disorder and non-immune hydrops fetalis in a neonate with trisomy 21. *Hong Kong Med J* 2014;20:78.e3-4.
 23. Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, et al. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep.* 2016 May 10;15(6):1228-41. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031.
 24. Kobayashi. Et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) as a Potential Therapeutic Target and a Noninvasive Biomarker of Liver Fibrosis Associated With Transient Myeloproliferative Disorder in Down Syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 2017;39:e285-e289.
 25. Montenegro, Campbell, Rodríguez. Leucemia linfoblástica aguda en pacientes portadores de síndrome de Down. *Rev Chil Pediatr* 2012; 83 (1): 58-67.
 26. Alford K, Reinhardt K, Garnett C, Norton A, Bohmer K, von Neuhoff C, et al. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood.* 2011 Aug 25;118(8):2222-38.

27. Crispino JD, Horwitz MS. GATA factor mutations in hematologic disease. *Blood*. 2017 Apr 13; 129(15): 2103–2110. doi: 10.1182/blood-2016-09-687889
28. Base de datos GeneCards-Human Genes:
<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GATA1&keywords=GATA1>
29. Calligaris R, Bottardi S, Cogoi S, Apezteguia I, Santoro C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 5;92(25):11598-602.
30. Base de datos Ensembl genome browser:
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000102145;r=X:48786554-48794311;t=ENST00000376670
31. OMIM Online Mendelian Inheritance in Man:
<https://www.omim.org/entry/305371?search=GATA1&highlight=gata1>
32. Hasegawa A, Shimizu R. GATA1 Activity Governed by Configurations of cis-Acting Elements. *Front. Oncol.* (2017) 6:269. doi: 10.3389/fonc.2016.00269
33. FORTH Institute of Molecular Biology & Biotechnology
<http://www.imbb.forth.gr/imbb-people/en/strouboulis-research>

34. Wada T, Akagi T, Muraoka M, Toma T, Kaji K, Agematsu K. A Novel In-Frame Deletion in the Leucine Zipper Domain of C/EBP ϵ Leads to Neutrophil-Specific Granule Deficiency. *J Immunol.* 2015 Jul 1;195(1):80-6.
35. Mizuta S, Minami T, Fujita H, Kaminaga C, Matsui K, Ishino R, et al. CCAR1/CoCoA pair-mediated recruitment of the Mediator defines a novel pathway for GATA1 function. *Genes Cells.* 2014 Jan;19(1):28-51. doi: 10.1111/gtc.12104.
36. Wada T, Kikuchi J, Nishimura N, Shimizu R, Kitamura T, Furukawa Y. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem.* 2009 Oct 30;284(44):30673-83. doi: 10.1074/jbc.M109.042242.
37. Lee WY, Weinberg OK, Pinkus GS. GATA1 Is a Sensitive and Specific Nuclear Marker for Erythroid and Megakaryocytic Lineages. *Am J Clin Pathol.* 2017 Apr 1;147(4):420-426.
38. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(22):12355-12358.
39. Gregory T, Yu C, Ma A, Orkin SH, Blobel GA, Weiss MJ. GATA-1 and erythropoietin cooperate to promote erythroid cell survival by regulating bcl-xL expression. *Blood.* 1999;94(1):87-96.

40. Muntean AG, Crispino JD. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood*. 2005;106(4):1223-1231.
41. Rainis L, Bercovich D, Strehl S, Teigler-Schlegel A, Stark B, Trka J, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*, 1 August 2003 Volume 102, Number 3.
42. Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*, 15 October 2003 Volume 102, Number 8.
43. Ahmed, Sternberg, Hall, Thomas, Smith, O'Marcaigh, et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood*, 1 April 2004 volume 103, number 7.
44. Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*. 2009 Mar 19;113(12):2619-28. doi: 10.1182/blood-2008-11-163501.
45. Mateos, Barbaric, Byatt, Sutton, Marshall. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl Pediatr* 2015;4(2):76-92.
46. Li, Lee, Yang, Yen, Chang, Chien, et al. Long-term outcome for Down syndrome patients with hematopoietic disorders.

Journal of the Formosan Medical Association (2016) 115, 94e99.

47. Malinge S, Thiollier C, Chlon TM, Doré LC, Diebold L, Bluteau O, et al. Ikaros inhibits megakaryopoiesis through functional interaction with GATA-1 and NOTCH signaling. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2440-51. doi: 10.1182/blood-2012-08-450627.
48. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405.
49. NOM-012-SSA3-2012: Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos.
50. NOM-166-SSA1-1997. Para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
51. NOM-087-ECOL-1995. Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica.
52. NOM-005-STPS-1998. De las condiciones de seguridad e higiene en los centros de trabajo para el manejo, transporte y almacenamiento de sustancias químicas peligrosas.

53. NOM-009-STPS-1993. Relativa a las condiciones de seguridad e higiene para el almacenamiento, transporte y manejo de sustancias corrosivas, irritantes y tóxicas en los centros de trabajo.
54. NOM-018-STPS-2000. Que establece el sistema para la identificación y comunicación de riesgos por sustancias químicas en los centros de trabajo.
55. NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Relativa a la protección ambiental-salud ambiental-residuos peligrosos biológico infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo.

ANEXOS

ANEXO 1

EXTRACCIÓN DE DNA POR MÉTODO SALINO

Primera Fase

1. Colocar 500 microlitros de sangre total en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Adicionar 500 microlitros de solución de lisis.
3. Vortexear.
4. Incubar 30 minutos a 4°C.
5. Centrifugar a 14 000 revoluciones por minuto (RPM) por 2 minutos.
6. Decantar el sobrenadante.
7. Lavar con 1 ml de solución de lisis.
8. Vortexear.
9. Centrifugar a 14 000 RPM por 2 minutos
10. Decantar el sobrenadante.
11. Adicionar 1 ml de solución salina (o puede ser solución de lisis).
12. Vortexear.
13. Centrifugar a 14 000 RPM por 2 minutos.
14. Decantar el sobrenadante.
15. Resuspender el botón en 570 microlitros de Cloruro de sodio 5.0 Mm (5 milimolar).
16. Vortexear.

17. Adicionar 40 microlitros de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%.
18. Vortexear durante 5 minutos.
19. Adicionar 200 microlitros de Cloruro de Sodio saturado.
20. Vortexear.
21. Centrifugar a 14 000 RPM por 10 minutos.
22. Recuperar la fase líquida.
23. Adicionar 600 microlitros de cloroformo-alcohol isoamílico 49:1
24. Vortexear por 2 minutos.
25. Centrifugar a 14 000 RPM por 6 minutos.
26. Transferir la fase superior a un frasco conteniendo 5 ml de etanol absoluto frío (-20°C).
27. Almacenar toda la noche (o dos horas) a -20°C

Segunda Fase

1. Con la micropipeta tomar cuidadosamente el DNA y transferirlo al tubo Eppendorf de 0.5ml conteniendo 400 microlitros de etanol al 70% frío.
2. Centrifugar a 14000 RPM por 6 minutos.
3. Decantar el etanol.
4. Dejar secar el DNA a temperatura ambiente.
5. Resuspender de acuerdo al botón con agua inyectable o con TE.

ANEXO 2

EXTRACCIÓN DE BANDA DE DNA EN GEL DE AGAROSA, QIAquick Gel Extraction Kit.

1. Cortar la banda de gel.
2. Agregar 300 microlitros de buffer QG.
3. Incubar a 50°C por 10 minutos.
4. Verificar que el color sea amarillo.
5. Agregar 100 microlitros de isopropanol a la muestra y mezclar.
6. Pasar a la columna QIAquick (morada) con un tubo colector de 2ml.
7. Aplicar la muestra en la columna y centrifugar 1 minuto a 13 000 RPM a 4°C.
8. Vaciar el tubo colector.
9. Agregar 0.5ml de buffer QG a la columna y centrifugar 1 minuto a 13 000 RPM a 4°C.
10. Vaciar el tubo colector.
11. Agregar 750 microlitros de buffer PE y centrifugar 1 minuto a 13 000 RPM a 4°C.
12. Vaciar el tubo colector.
13. Centrifugar por 1 minuto a 13 000 RPM a 4°C.

14. Pasar la columna QIAquick (morada) a un tubo colector nuevo.
15. Agregar 15 microlitros de buffer EB ó agua Grado Biología molecular en el centro (color blanco) de la membrana de la columna QIAquick.
16. Centrifugar a 13 000 RPM por 1 minuto a 4°C.
17. Cuantificar la concentración del templado.

ANEXO 3

PURIFICACIÓN DEL SEGMENTO GÉNICO A ESTUDIAR

1. Dar un spin al producto de reacción de secuencia, el cual está a una temperatura de 4°C.
2. Agregar a cada muestra 5 µl de solución de paro y vortexear
3. Pasar la muestra a un tubo de 0.5 mililitros
4. Agregar 60 µl de alcohol al 95% (-20°C) y vortexear
5. Centrifugar a 14 000 RPM por 15 minutos (a una temperatura de 4°C)
6. Decantar el sobrenadante ó con 1 punta sin llevarse el botón
7. Agregar 200 µl de alcohol 70% (-20°C). No mezclar.
8. Centrifugar a 14 000 RPM por 4 minutos (a 4°C)
9. Decantar cuidadosamente, observar el pellet.
10. Agregar 200 µl de alcohol 70% (-20°C). No mezclar.
11. Centrifugar a 14 000 RPM por 4 minutos (a una temperatura de 4°C)
12. Decantar cuidadosamente, observar el pellet.
13. Secar.
14. Al botón agregar 40 µl de LSI, esperar 10 minutos y resuspender.
15. Colocar en la placa de secuenciación
- 16.** Colocar sobre la muestra aceite mineral. Muestra lista para iniciar secuenciación.

ANEXO 4

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO



Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"
Subdirección Médica
Subdirección de Enseñanza e Investigación
Comité de Ética en Investigación

"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA
CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD.

NOMBRE DEL ESTUDIO: "MUTACIONES EN EL GEN *GATA1* ASOCIADAS AL DESORDEN MIELOIDE TRANSITORIO, EN PACIENTES CON SÍNDROME DE DOWN DEL SERVICIO DE GENÉTICA MÉDICA DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE"

Lugar y fecha: _____.

Por favor tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga, para decidir si participa o no deberá tener el conocimiento suficiente acerca de los beneficios y riesgos del presente estudio de investigación.

Estimado Señor (a) (padre, madre o tutor (a): _____,
se le invita a autorizar la participación de su hijo (a) _____
en el estudio arriba mencionado, que se desarrollará en el CMN "20 de Noviembre", cuyo objetivo será analizar si en pacientes con diagnóstico de Síndrome de Down y Desorden Mieloide Transitorio se presentan mutaciones en el gen *GATA1*. Lo anterior con la finalidad de contribuir a la posibilidad de definir este estado molecular como una herramienta pronóstica del desarrollo de leucemia mielóide en pacientes con Síndrome de Down.

Para realizar el estudio se tomará al paciente una muestra de sangre de 2-4 ml, de la que se obtendrá DNA (o ácido desoxirribonucleico, es el material hereditario en los humanos, localizado en casi todas las células en el cuerpo de una persona) y se buscará la presencia de mutaciones (cambios en la secuencia de DNA que pueden llevar a alteraciones en su función) en el gen *GATA1* (codifica un factor de transcripción que participa en el crecimiento celular y cáncer). Las muestras se almacenarán en el laboratorio de Medicina Genómica del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" bajo la responsabilidad del investigador responsable del proyecto, por un periodo de 5 años, existiendo la posibilidad de utilizarlas posteriormente en otros estudios relacionados con el Síndrome de Down y el Desorden mielóide Transitorio, posterior a lo cual serán destruidas.

BENEFICIOS: Los resultados del presente estudio permitirán por una parte conocer la proporción de pacientes con Síndrome de Down con Desorden Mieloide Transitorio, que presentan mutaciones del gen *GATA1* en la población mexicana; y por la otra, vigilar estrechamente la evolución de los pacientes. Ya que se ha reportado que del 20 al 30% de los pacientes que presentan mutaciones en *GATA1* desarrollan leucemia mielóide aguda.

Página 1 de 3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Zoé G. Soriano García.
Av. Pálte Cuernavaca 540, Col. Del Valle, C.P. 62226, Delegación de Benito Juárez, Ciudad de México.
Tel.: (55) 52 00 3544.



"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA
CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

RIESGOS: Se me ha dado a conocer que existe un riesgo mínimo de presentar un "moretón" y/o infección en el sitio de la punción venosa que se realizará para obtener la muestra sanguínea, sin embargo la realización de este estudio no pone en riesgo la integridad física y mental de mi familiar.

PARTICIPACIÓN

Su participación es **VOLUNTARIA**, usted puede decidir libremente autorizar la participación de su hijo, esto no afectará el derecho de su hijo para recibir atención médica en el CMN "20 de Noviembre", si participa, puede retirarse del estudio en el momento en que lo desee sin que esto influya sobre el tratamiento habitual que le ofrece el hospital para su enfermedad de base.

MANEJO DE LA INFORMACION.

En la recolección de datos personales se siguen todos los principios que marca la ley (art. 6): Licitud, calidad, consentimiento, información, finalidad, lealtad, proporcionalidad y responsabilidad. Se han implementado las medidas de seguridad, técnicas, administrativas y físicas necesarias para proteger sus datos personales y evitar daño, pérdida, alteración, acceso o tratamiento no autorizado. Los datos obtenidos serán manejados de forma confidencial y serán protegidos, las muestras biológicas no contendrán información personal y se codificarán con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Los códigos que identifican su muestra o información estarán solo disponibles a los investigadores titulares quienes están obligados por ley a no divulgar su identidad, de manera que toda la información y resultados personales no estarán disponibles a terceras personas como empleadores, organizaciones gubernamentales, compañías de seguros o instituciones educativas. Los resultados agrupados que deriven del estudio podrán ser presentados en publicaciones y foros médicos, protegiendo la identidad de cada paciente.

La información podrá estar disponible a miembros de su familia sólo bajo su autorización expresa.

PADRE, MADRE O REPRESENTANTE LEGAL.

Confirmando haber recibido información suficiente y clara sobre el estudio propuesto, doy mi autorización para que mi hijo sea incluido en este proyecto de investigación, reservándome el derecho de abandonarlo en cualquier momento si así lo decido.

Nombre del participante: _____

Domicilio: _____

Página 2 de 3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Zoé G. Sordán García.
Av. Félix Cuevas 540, Col. Del Valle, C.P. 03220, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México.
Tel.: (55) 52 00 3544.



ISSSTE

INSTITUTO DE SEGURIDAD
Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO

Centro Médico Nacional "20 de Noviembre"
Subdirección Médica
Subdirección de Enseñanza e Investigación
Comité de Ética en Investigación

"2017, AÑO DEL CENTENARIO DE LA PROMULGACIÓN DE LA
CONSTITUCIÓN POLÍTICA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS"

Nombre y firma del padre, madre o representante legal:

Parentesco: _____

Domicilio: _____

TESTIGOS:

(1) Nombre y firma _____

Parentesco: _____

Domicilio: _____

(2) Nombre y firma _____

Parentesco: _____

Domicilio: _____

INVESTIGADOR O MÉDICO QUE INFORMA: _____

Le he explicado al Sr (a) _____ (padre, madre o representante legal), la naturaleza y los propósitos de la investigación, así como los riesgos y beneficios que implica su participación. He dado respuesta a todas sus dudas, y le he preguntado si ha comprendido la información proporcionada, con la finalidad de que pueda decidir libremente participar o no en este estudio. Acepto que he leído, conozco y me apego a la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos, que pondré el bienestar y la seguridad de los pacientes sujetos de investigación, por encima de cualquier otro objetivo.

INVESTIGADORES RESPONSABLES:

Nombre y firma: Dra. María del Carmen Chima Galán

Dra. Miriam Hidalgo Ostoa

Teléfono de contacto: 5200 5003 ext. 86883 y 14507.

El documento se expide por duplicado, entregando una copia al familiar del participante.

Página 3 de 3

Presidente del Comité de Ética en Investigación: Dra. Zsó G. Sordón Garza.
Av. Pátula Corona 540, Col. Del Valle, C.P. 03229, Delegación Benito Juárez, Ciudad de México.
Tel.: (55) 52 00 3544.

ANEXO 5

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>"MUTACIONES EN EL GEN GATA1 ASOCIADAS AL DESORDEN MIELOPROLIFERATIVO TRANSITORIO EN PACIENTES CON SINDROME DE DOWN DEL SERVICIO DE GENETICA MEDICA DEL CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE"</p> |  |
| CÉDULA DE RECOLECCIÓN DE DATOS | | |
| Nombre del Paciente: _____ | | |
| Sexo: _____ | | |
| Número de expediente: _____ | | |
| Identificación de paciente: _____ | | |
| Edad: _____ Fecha de nacimiento: _____ | | |
| Teléfono de contacto: _____ | | |
| Procedencia: _____ | | |
| Cariotipo: _____ | | |
| Alteración en la Biometría hemática: | | |