

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

**CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN EL
GEN *CRELD1* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON
SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA:
ESTUDIO PRELIMINAR EN 5 PACIENTES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA

Rosa María Alvarez Gómez

TUTOR DE TESIS

Dra. Ariadna E. González Del Ángel

MÉXICO DF

2011



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.

CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y
POLIMORFISMOS EN EL GEN *CRELD1* EN UNA
MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON
SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN
CARDIACA: ESTUDIO PRELIMINAR EN 5 PACIENTES

DR. JOSÉ N. REYNES MANZUR
DIRECTOR DE ENSEÑANZA

DRA. MIRELLA VÁZQUEZ RIVERA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUIZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE GENÉTICA MÉDICA

DRA. ARIADNA E. GONZÁLEZ DEL ÁNGEL
TUTOR DE TESIS

“Caracterización de mutaciones y polimorfismos en el gen *CRELD1* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y defectos de septación cardiaca: Estudio preliminar en 5 pacientes”

AUTORES:

Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza	Investigador Responsable del Proyecto Jefe del Laboratorio de Biología Molecular, INP.
Dra. Ariadna Estela González Del Ángel	Subdirección Investigación Clínica, INP Tutora de Tesis.
Dr. Jesús de Rubens Figueroa	Servicio de Cardiología Pediátrica, INP
Biol. Victor Martínez Cruz	Laboratorio de Biología Molecular, INP
Dra. Bernardette Estandia	Laboratorio de Biología Molecular, INP
M. en C. Bertha Molina Álvarez	Laboratorio de Citogenética, INP
M. en C. Luisa Díaz García	Departamento de Metodología de la Investigación, INP
Dra. Rosa María Alvarez Gómez	Médico Residente. Tesista para obtener el grado de Especialista en Genética Médica.
Dra. Sandra Villagómez Martínez	Unidad de Apoyo a la Investigación Clínica, INP
Dra. Marcela Guerrero Lara	Médico Residente de la Subespecialidad en Cardiología Pediátrica.
Dra. Gabriela Pereira	Médico Pasante en Servicio Social, Laboratorio de Biología Molecular, INP

AGRADECIMIENTOS

A cada uno de los integrantes del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, por toda la paciencia, trabajo y cariño invertido en este trabajo de tesis. En especial, al Biol. Víctor Martínez Cruz, muchas gracias por todo.

A la Dra. Ariadna E. González Del Ángel, mi tutora de tesis y maestra incansable. Gracias por dirigirme en esta empresa y guiarme durante el camino de la residencia. Ha sido una experiencia enriquecedora e inimaginable aprender de usted.

Al Dr. Miguel Ángel Alcántara Ortigoza por ser fuente de inspiración para los que queremos aprender y enseñar. No he olvidado que “la enseñanza sin afecto no trasciende”. Gracias por ser un maestro ejemplar.

A todos mis profesores en el curso de Genética Médica en el Instituto Nacional de Pediatría. Mil gracias por todo su esmero y excelencia. La semilla que han sembrado crecerá acorde a su ascendencia. Un agradecimiento especial a la Dra. Sara Frías, por su confianza plena y retroalimentación; a la Dra Victoria Del Castillo, por su disposición y confianza; a la M. en C. Bertha Molina, por todo su trabajo y paciencia, y a la M. en C. Sandra Ramos, por su oído atento y amistad invaluable.

A mis queridas compañeras y maestras de residencia: Mariana, Paola, Astrid, Benilde y Bernardette, gracias por brindarme su amistad. A mis irremplazables Liliana, Vianney y Ximena, ya que sin ustedes nada hubiera sido igual. A MaJo, por tener siempre el comentario oportuno. A Karla, Alma y David, fue un privilegio compartir con ustedes este trayecto.

A mis padres, Leonor y T. Rolando, por ser mi pilar y fuerza. Por practicar con el ejemplo y ser congruentes en cada uno de sus pasos. Gracias por soportar mis malos ratos y mis humores; por siempre dar y por siempre estar. A Rolando, mi hermano, con todo lo que la palabra significa; te he aprendido mucho y lo agradezco.

A mi familia, por brindarme la confianza y el amor para emprender cualquier camino. Son mi “sitio seguro” y a donde siempre puedo volver. A mis tíos Mary, Pepe y Ramón (†), por llenar mi vida de hermosos recuerdos. Gracias

A ti, D.A.G., mi ayer y mí hoy. Nuestros pasos son paralelos y el camino es prometedor. Somos cómplices y hombro a hombro andamos. Gracias por construir conmigo y permitirme reflejarme en tu mirada... No lo olvides, *soy en ti*.

CONTENIDO

RESUMEN ESTRUCTURADO.....	1
1. ANTECEDENTES.....	2
1.1 Antecedentes Históricos.....	2
1.2 El síndrome de Down como cromosomopatía.....	5
1.3 Etiopatogenia.....	7
1.4 Epidemiología del síndrome de Down.....	8
1.5 Diagnóstico postnatal del síndrome de Down.....	10
1.6 Manifestaciones clínicas en síndrome de Down.....	11
2. MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Cardiopatías congénitas en síndrome de Down.....	14
2.1.1 Distribución geográfica de los distintos tipos de cardiopatía congénita en síndrome de Down.....	15
2.2 Defecto de canal atrioventricular (AVSD/CAV).....	17
2.3 Genes relacionados con la presentación del canal atrioventricular.....	19
2.4 Gen <i>CRELD1</i>	22
2.5 <i>CRELD1</i> y su implicación en defectos cardíacos del tipo canal atrioventricular.....	24
2.6 Implicación del gen <i>CRELD1</i> en los defectos cardíacos en síndrome de Down.....	27
3. JUSTIFICACIÓN.....	29
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	30
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Objetivo General.....	30
5.2 Objetivos Específicos.....	31
5.3 Objetivos Secundarios.....	31
6. HIPÓTESIS.....	31
7. MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 Clasificación de la Investigación.....	32

7.2	Universo de estudio.....	32
7.2.1	Población elegible.....	32
7.2.2	Tamaño de la muestra.....	32
7.3	Criterios de inclusión.....	32
7.4	Criterios de exclusión.....	33
7.5	Ubicación del estudio.....	33
7.6	Definición de las variables estudiadas.....	34
7.7	Descripción general del estudio.....	37
7.7.1	Extracción de DNA.....	38
7.7.2	Búsqueda de mutaciones en el gen <i>CRELD1</i> mediante amplificación por PCR con subsecuente secuenciación automatizada.....	38
a)	Amplificación por PCR de las secuencias codificantes, las regiones no traducidas y los bordes intrón-exón del gen <i>CRELD1</i>	38
b)	Secuenciación automática y clasificación como mutación ó polimorfismo de los cambios caracterizados.....	40
c)	Estudio molecular en los padres y asesoramiento genético.....	41
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
9.	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	42
10.	RESULTADOS.....	43
11.	DISCUSIÓN.....	53
12.	ANEXOS.....	64
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMEN ESTRUCTURADO

El síndrome de Down (SD) es la anormalidad cromosómica más frecuente del ser humano, con una incidencia de 1 en 750 recién nacidos vivos. Se le considera la principal causa genética de cardiopatía congénita (CHD). El 40 a 60% de los pacientes con SD presentan algún tipo de CHD. En población caucásica con SD, la CHD predominante son los defectos tipo canal atrioventricular (CAV). En tanto, en población latinoamericana predomina la persistencia del conducto arterioso (PCA) y los defectos de septación. Dentro de los genes relacionados al CAV se encuentra *CRELD1*, que codifica para una proteína de adhesión celular vinculada a la formación de las almohadillas cardíacas. El objetivo de este trabajo fue realizar el análisis molecular de *CRELD1* en cinco pacientes mexicanos con Síndrome de Down por Trisomía 21 regular y cardiopatía congénita del tipo CAV.

Material y Métodos: Se obtuvo DNA de sangre periférica de los cinco pacientes, para realizar amplificación por PCR de cada uno de los 11 exones de *CRELD1*, con posterior secuenciación directa automatizada de los mismos.

Resultados: En los cinco pacientes analizados, se identificó un polimorfismo de un solo nucleótido (rs3774207) en el exón 11 previamente descrito, no se identificaron mutaciones patológicas.

Conclusiones: La incidencia en la literatura de mutaciones en *CRELD1* en pacientes con SD y CAV es del 4.8% (3/63), en el presente estudio del gen *CRELD1*, vinculado al defecto de CAV, en 5 pacientes mexicanos con síndrome de Down, no evidenció la presencia de mutaciones; lo cual puede deberse al tamaño de muestra analizado, por lo que es necesario incrementar el número de pacientes para determinar el papel de este gen como factor de susceptibilidad al

desarrollo de cardiopatía en pacientes con síndrome de Down de origen mexicano. El estudio de los genes que contribuyen a la morfogénesis cardíaca y su relación con las cardiopatías congénitas, permitirá ofrecer un abordaje integral y multidisciplinario a los pacientes afectados, resaltando los pacientes con Síndrome de Down, ya que las cardiopatías congénitas constituyen su principal causa de muerte en la infancia.

1. ANTECEDENTES

El síndrome de Down (SD) constituye la alteración cromosómica más frecuente en recién nacidos vivos. Es la principal causa genética de retraso mental, constituyendo el padecimiento más antiguo relacionado con discapacidad.¹ La Organización Mundial de la Salud la contempla en la X Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10) bajo el rubro de Malformaciones congénitas, deformidades y alteraciones cromosómicas (apartado Q90.0).²

1.1 Antecedentes Históricos

En el afán de delimitar un punto de partida donde situar los primeros hallazgos relacionados al síndrome de Down (SD), se encuentra el hallazgo antropológico de un cráneo con características morfológicas sugerentes del mismo, cuya antigüedad se remonta al siglo VII d.C.⁴

Se ha intentado correlacionar las manifestaciones artísticas de algunas culturas precolombinas como la olmeca, con la representación de personas con este padecimiento debido a los rasgos étnicos compartidos; constituyen un ejemplo las cabezas colosales ó distintas figurillas de barro. Sin embargo la evidencia es insuficiente, por lo que difícilmente se apoya esta hipótesis.⁵

Previo al siglo XIX, algunos pintores retrataron a personas, encarnadas principalmente en niños, con dismorfias sugerentes de SD como en “*La virgen con el niño en brazos*” (Figura 1.), de Andrea Mantegna (1430-1506) o “*Lady Conckburn y sus hijos*” (Figura 2.), de Sir Joshua Reynolds (1723-1792), por citar algunos ejemplos.⁶



Figura 1. “Virgin and Child”
Andrea Mantegna (1431–1506)
Museum of Fine Arts, Boston

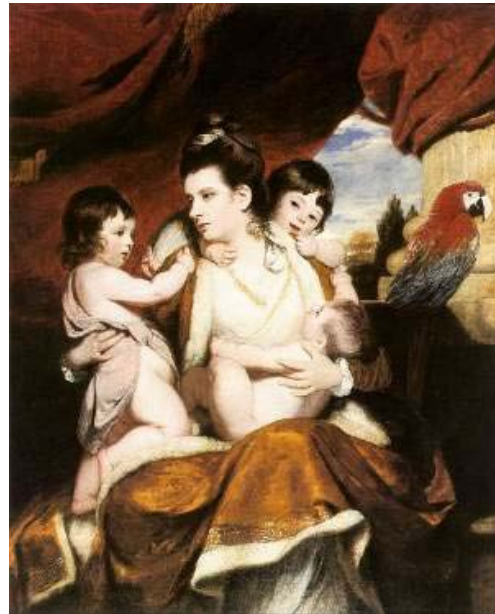


Figura 2. “Lady Cockburn and her three eldest sons”
Sir Joshua Reynolds (1773)
National Gallery, Londres

A pesar de existir descripciones previas de pacientes que probablemente padecieron SD, el crédito a la descripción de la entidad nosológica como actualmente la conocemos se atribuye al médico inglés John Langdon Hayden Down (1828-1896), quién con base al estudio de una serie de pacientes con retraso mental titulado “*Observations on an Ethnic Classification of Idiots*”, detallo las características faciales en asociación a perímetro cefálico pequeño alteraciones neuromusculares, dificultad en el lenguaje y un distintivo buen sentido del humor.⁷ Debido a las fisuras palpebrales con similitud a las personas de origen oriental, encontró parecido a los mongoles, personas nómadas de la región central de Asia. Influenciado por la obra

evolutiva de Charles Darwin, el Dr. Down consideró a estos pacientes como evidencia de “un retroceso hacia una raza primitiva menos evolucionada”. En reportes posteriores supuso que enfermedades, como la tuberculosis durante el embarazo, podrían trasgredir “la barrera de las razas”, explicando porque padres de origen caucásico podrían tener descendencia con apariencia oriental.⁷

El concepto etiológico descrito por Down en 1866 perduró por más de 50 años. En 1909, Shuttleworth, enfatizó que la edad materna durante el embarazo constituía un factor de riesgo, ya que los hijos de madres cercanas al climaterio frecuentemente padecían SD. Tal observación le permitió concluir que la etiología más probable se debía a una disminución de la capacidad reproductiva.⁸

Waardenburg, en 1932, sugirió que la causa podría residir en “un reparto anormal” del material genético.⁹ En 1956, Tjio y Levan, establecieron el número de 46 cromosomas como normal en el ser humano.¹⁰ Así, marcaron el precedente para que en 1959, Lejeune, Gautrier y Turpin descubrieran que los pacientes con SD son portadores de 47 cromosomas.^{11,12} Posteriormente se identificó al cromosoma adicional como un acrocéntrico pequeño, correspondiente al par 21. Dado lo anterior, el término de “mongolismo” fue abandonado en 1961 mediante un consenso mediado por científicos y humanistas.¹³

Mediante mapas genéticos y físicos de alta resolución en el cromosoma 21, Nebuhr en 1974, define la región crítica para SD en 21q22.¹⁴

A partir de la década de los 70's, el enfoque hacia los pacientes con SD está encaminado a implementar el diagnóstico temprano, como es el diagnóstico preimplantación y prenatal, siendo un avance crucial para ello, la introducción de la técnica de Hibridación in situ por

Fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés) a finales de los 80's y otras técnicas de biología molecular.

El otro punto cardinal lo constituye el conocer la historia natural de la evolución de los pacientes con SD ya que de esta manera se han podido establecer guías de seguimiento y tratamiento, con el propósito de disminuir las complicaciones inherentes a la entidad, mediante la prevención y detección oportuna de las mismas. Tal enfoque ha llevado a que la esperanza de vida de los pacientes con SD en países del primer mundo se acerque a la sexta década de la vida¹⁵ y que la calidad de vida para los pacientes y sus familias sea más satisfactoria.

1.2 El Síndrome de Down como cromosomopatía

La denominación alternativa de Trisomía 21, conlleva el conocimiento de la alteración cromosómica a la cual se atribuye el cuadro clínico de SD. Las variantes citogenéticas responsables de la patología son:

- Trisomía 21 regular: Todas las células contienen 47 cromosomas, con el cromosoma 21 de forma adicional. Se trata de la presentación más frecuente reportada hasta en el 95% de los pacientes.¹⁶ La presencia de un cromosoma adicional es consecuencia de un evento de no-disyunción, que se define como un error en la separación de los cromosomas durante la división celular, en este caso, durante la meiosis.¹⁰ La edad materna es el factor de riesgo más conocido para SD; dado que el error meiótico ocurre en el 90% de los casos en meiosis materna, predominantemente en meiosis I y sólo el 10% ocurre durante la meiosis paterna.

- Mosaicismo: El mosaico se define como la presencia de dos ó más líneas celulares distintas provenientes de un mismo cigoto¹⁰. Así, los pacientes con SD por trisomía 21 en mosaico, presentan una línea celular con trisomía 21 en distintas proporciones y una línea celular diploide normal de 46 cromosomas. Esta presentación se debe a un evento de no-disyunción y posterior a este un evento de rescate trisómico postcigótico. Se presenta en el 2% de los pacientes con SD.¹⁶
- Traslocación robertsoniana: En el 2-3% de los pacientes con fenotipo de SD, la fórmula cromosómica reporta 46 cromosomas con el desbalance cromosómico resultante en un cromosoma derivativo consecuencia de la ruptura de los brazos cortos de dos cromosomas acrocéntricos con fusión posterior; a este evento se le denomina translocación robertsoniana. Cualquiera de los cromosomas acrocéntricos (13,14,15,21 y 22) se pueden fusionar al cromosoma 21, sin embargo la frecuencia de presentación es mayor para los cromosomas 13,14 y 21.¹⁰
- Isocromosoma de brazos largos del 21: Se observa en menos del 1% de los pacientes con SD como consecuencia de la división transversal del centrómero lo cual origina la pérdida del brazo corto con duplicación del otro brazo.¹⁰
- Duplicación de la región 21q22: Se trata de la presentación cromosómica más rara en SD, en donde la fórmula cromosómica se reporta con material cromosómico de 46, atribuyéndose el fenotipo de SD al efecto de dosis de la región considerada como crítica.¹⁰

1.3 Etiopatogenia

En el 2000, Hattori et al.¹⁷, publicaron la secuencia del brazo largo del cromosoma 21 (21q), lo cual marca un hito en la identificación de los genes y secuencias no codificantes en dicho cromosoma. Actualmente se conoce que el cromosoma 21 tiene un tamaño de 48 Mb, con 425 genes identificados.¹⁸ Se estima que menos del 5% de la secuencia total, codifica para proteínas con distintas funciones, como factores de transcripción; reguladores; proteasas e inhibidores de proteasas; elementos de la vía de ubiquitinización; interferones y mediadores de la respuesta inmune; cinasas; intermediarios en el procesamiento de RNA; moléculas de adhesión; canales iónicos; receptores, así como proteínas involucradas en el metabolismo energético.¹⁹

La identificación y caracterización de los genes localizados en el cromosoma 21 ha permitido el mejor entendimiento de las bases moleculares de la enfermedad. La existencia por triplicado de estos genes se ha postulado como la etiología del SD.²⁰ Sin embargo, sólo algunos de estos genes son sensibles a dosis, por lo que la sobreexpresión de su función aunado a otros factores aún no bien delimitados podrían constituir la explicación no sólo al retraso psicomotor, sino también a las más de 80 manifestaciones clínicas asociadas a SD, como la cardiopatía congénita, las malformaciones intestinales, la deficiencia inmunológica, el riesgo incrementado para leucemia en la infancia y la enfermedad de Alzheimer de inicio temprano, por citar aquellas que mayor campo de investigación han tenido.²¹

Los genes localizados en la región crítica de síndrome de Down (RCSD), que va de 21q21 a 21q22.3 (aproximadamente 5.4 Mb), han sido los más extensamente estudiados con la finalidad de delimitar su potencial contribución en el SD. En este contexto, los genes que se han vislumbrados como importantes en la etiología por su sobreexpresión son *CAFIA* (OMIM

601245) *CBS* (OMIM 236200) y *GART* (OMIM 138440), con repercusión en la síntesis y reparación del ADN. La dosis adicional de *COL6A1* (OMIM 120220) puede causar defectos cardíacos, en tanto *CRYA1* (OMIM 123580) puede contribuir a la formación de cataratas; la expresión aumentada de *DYRK1A* (OMIM 600855), se ha relacionado al desarrollo de retraso mental; en tanto el aumento de expresión de *ETS2* (OMIM 164740) puede ser la causa de leucemia y alteraciones esqueléticas; también se ha implicado a este gen en apoptosis al sobreexpresarse así como se ha asociado al desarrollo de un timo hipoplásico y anormalidades en los linfocitos T. La expresión de *INFAR* (OMIM 107450) se ha relacionado a alteraciones del sistema inmune al igual que *SOD1* (OMIM 147450), también implicado en el envejecimiento prematuro presente en estos pacientes. Otros posibles candidatos que podrían inducir uno o más aspectos de la patogenia de la trisomía 21 son *APP* (OMIM 104760), *GLUR5* (OMIM 138245), *S100B* (OMIM 176990), *TIAMI* (OMIM 600687), *SYNJI* (OMIM 604297), *PFKL* (OMIM 171860) y *KCNJ6* (OMIM 600877). Dentro de estos genes, se ha relacionado a *APP* y *SYNJI*, en la aparición de enfermedad de Alzheimer y otras características del desarrollo psicomotor alterado.⁸

1.4 Epidemiología del Síndrome de Down

Las malformaciones congénitas se presentan en el 3-4% de los recién nacidos vivos. En menos del 10% de los neonatos en quienes se identifican alguna malformación, el hallazgo es parte de una cromosomopatía. El síndrome de Down es la aneuploidía compatible con la vida más frecuente, con una incidencia de 1 en 732 recién nacidos vivos en Estados Unidos de Norteamérica.²³ Se ha propuesto que existen diferencias en la frecuencia de SD a través de los

distintos grupos étnicos así Canfield et al. (2006) evidenció un aumento en la prevalencia de SD en aquellas madres de origen hispánico, en comparación con las de origen afroamericano o africano.²³

Se estima que el 3% de todas las concepciones son trisómicas para alguno de los autosomas. Aproximadamente el 25% de las pérdidas fetales son consecuencia de trisomías.²⁴ En México, la existencia del Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externa (RYVEMCE) permitió el reporte de una incidencia de 1 en 735 recién nacidos vivos con SD para 1982,²⁵ similar a la incidencia encontrada a nivel mundial. Un estudio posterior de 10 años realizado en el Hospital General de México (1987-1996), demostró una frecuencia de 1 en 909, lo cual se atribuyó a una población de mujeres más jóvenes que se atienden en dicho nosocomio y al sub-registro que pudiese existir ante falta de diagnóstico al nacimiento.²⁶

El factor de riesgo mejor caracterizado para SD es la edad materna ya que existe un aumento de la incidencia directamente proporcional al aumento de la edad en la madre, cuando esta rebasa los 35 años. Datos recientes a nivel internacional (International Clearinghouse for Birth Defects Surveillance and Research) arrojan que la proporción de mujeres mayores a 35 años que se embarazan cambio del 10.9% al 18.8%, en el transcurso de 10 años (1993-2004). También ha existido una modificación de la prevalencia de SD durante el embarazo (de 13 a 18 por cada 10,000 embarazos), sin que se refleje un aumento de la incidencia en recién nacidos vivos (8 de cada 10,000 recién nacidos vivos), lo anterior se ha explicado por el hecho de que hay un incremento en la terminación electiva del embarazo, posterior al diagnóstico prenatal en varios países.²⁷

Los mecanismos implicados en constituir a la edad materna como factor de riesgo aún no son del todo conocidos. Sin embargo, la edad materna tiene influencia en errores de no-disyunción tanto en meiosis I como en meiosis II, por lo que se ha propuesto que un sistema de control de calidad más laxo en la detección de óvulos con aneuploidías, relacionado el tiempo de vida de la ovogénesis, sería un contribuyente importante. Así mismo, la acumulación de efectos tóxicos ambientales para el ovocito durante su arresto meiótico y el cambio en la función ovárica por una señalización hormonal subóptima, podrían contribuir a eventos de no disyunción relacionados a la edad materna.²⁹

Otros datos como la consanguinidad, la edad paterna o factores ambientales como el tabaquismo materno y variaciones en el metabolismo materno de los folatos, no han mostrado evidencia suficiente para ser considerados como factores de riesgo en SD.²⁸

1.5 Diagnóstico postnatal del síndrome de Down

Posterior al nacimiento, el diagnóstico se realiza por el fenotipo característico de las personas afectadas, así como por las malformaciones asociadas más frecuentes. La confirmación de la sospecha clínica se lleva a cabo mediante la realización de un cariotipo en por lo menos 30 metafases para descartar hasta en un 10% la presentación en mosaico.¹⁰

En 1966, Hall,³⁰ reportó las manifestaciones más frecuentes en 48 neonatos con SD, encontrando seis ó más características de las descritas en el 89% de los pacientes. Hasta la fecha, dichos criterios se usan como referencia para sospechar el diagnóstico (Tabla 1.)

Tabla 1. MANIFESTACIONES MÁS FRECUENTES EN SD (Hall B ³⁰)	
Manifestaciones	Frecuencia (%)
1. Hipotonía	80
2. Reflejo del Moro disminuido	85
3. Hiperlaxitud	80
4. Piel nugal redundante	80
5. Hipoplasia medio-facial	90
6. Fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba	80
7. Pabellones auriculares displásicos	60
8. Displasia congénita de cadera	70
9. Clinodactilia del 5º dedo	60
10. Pliegue palmar único	45

1.6 Manifestaciones clínicas en SD y problemas médicos asociados

Las personas con SD tienen mayor incidencia de trastornos en múltiples órganos y sistemas, por lo que el conocimiento de dichas manifestaciones repercutirá en su detección y manejo temprano.

Las manifestaciones con sus respectivas frecuencias y manejos recomendados³¹⁻³⁷, se enlistan en la siguiente tabla (Tabla 2.)

Tabla 2. MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN SÍNDROME DE DOWN ³¹⁻³⁷

<u>Órgano / Prevalencia</u>	<u>Manifestaciones Clínica</u>	<u>Seguimiento y Manejo</u>
Neurológicos y Conducta	Retraso mental de leve a moderado, con seguimiento adecuado (coeficiente intelectual entre 37-70). Los menos, con retraso mental severo. Hipotonía (80-100%). Problemas conductuales y psiquiátricos (18-38%). Epilepsia (8%), especialmente espasmos infantiles. Enfermedad de Alzheimer en edad adulta.	Rehabilitación psicomotora temprana y durante la infancia. Integración a programas de educación especializada. Seguimiento y manejo específico a trastornos psiquiátricos.
Ojo 38-80%	Cataratas (4-7%); estrabismo (20-47%); nistagmus (11-29%); dacriostenosis; blefaroconjuntivitis (7-41%); alteraciones de la refracción (43-70%); ametropía; blefaritis seborreica; conjuntivitis primaveral; glaucoma (0.7%); pseudopapilema secundario; colobomas retinianos. Manchas de Brushfield. Queratocono en edad adulta.	Al nacimiento y de forma continua durante el primer año de vida. Seguimiento posterior cada tres años.
Oídos, nariz y garganta 38-78%	Otitis media de repetición. Sinusitis. Nasofaringitis. Problemas obstructivos respiratorios (30-36%). Apnea obstructiva del sueño (57%). Pérdida de la audición (sensorial, conductiva ó mixta). Retraso en el desarrollo del lenguaje	Evaluación por otorrinolaringología (ORL) durante los primeros tres meses de vida y de forma periódica durante el primer año de vida. Valoración audiológica al nacimiento. Polisomnografía entre los 3-4 años. Seguimiento integral anual.
Cavidad oral	Erupción dental retardada; hipodoncia. Enfermedad periodontal. Protrusión lingual, lengua y labios fisurados. Alteraciones en la estructura, forma y tamaño dental. Procesos maxilares deficientes. Bruxismo. Úvula bífida. Hipotonía muscular	Valoración anual odontológica.

	peribucal. Cambios de pH en saliva.	
Corazón 44-58%	<p>Cardiopatía congénita</p> <p>Adolescentes y adultos pueden presentar disfunción valvular mitral o aórtica</p> <p>Hipertensión arterial pulmonar</p>	<p>Ecocardiograma al nacimiento y durante el primer año de vida (semestral). Seguimiento de acuerdo al defecto cardíaco encontrado.</p> <p>Valoración cardiológica periódica en edad adulta.</p>
Gastrointestinal 4-10%	<p>Páncreas anular. Atresia/estenosis duodenal (1-5%). Atresia esofágica/fístula tráqueo-esofágica (0.3-0.8%). Estenosis pilórica (0.3%). Enfermedad de Hirschsprung (1-3%). Estenosis/atresia anal (1-4%). Enfermedad celiaca (5-7%)</p>	<p>Revisión intencionada al nacimiento y vigilancia mensual en el 1er año de vida. Dieta adecuada para cada etapa de la vida. Genotipificar para HLA-DQ2 y 8b, si son negativos, no es necesario más seguimiento. Si son positivos, anticuerpos contra transglutaminasa cada 3 años como detección de enfermedad celiaca.</p>
Vías urinarias	<p>Mayor riesgo de alteraciones en el tracto urinario (3.2%): hidronefrosis, hidroureter, agenesia renal, hipospadias. Retraso y dificultad en continencia de esfínteres.</p>	<p>No se realiza ultrasonido de forma rutinaria. Vigilancia y referencia oportuna, en caso necesario</p>
Desarrollo Sexual	<p>Mujeres: Inicio de la pubertad similar al resto de la población. Capacidad reproductiva sin alteraciones.</p> <p>Hombres: Características sexuales primarias y secundarias así como concentraciones de hormonas testiculares e hipofisarias, similares a otros adolescentes varones. Capacidad reproductiva disminuida</p>	<p>Contracepción y educación sexual accesible.</p> <p>Cuidados y medidas para evitar el abuso sexual.</p>
Piel y Anexos	<p>Alopecia areata (2.9-20%). Vitiligo (1.9%). Eczema seborreico (8-36%). Foliculitis (10-26%). Siringoma (12-39%) Piel seca.</p>	<p>Observación pediátrica durante la infancia y referencia en caso necesario. Vigilancia con énfasis en la</p>

	Susceptibilidad a dermatitis atópica (1-4-3%).	adolescencia.
Músculo-esquelético	Hiperlaxitud ligamentaria. Hipermovilidad articular. Inestabilidad atlanto-axoidea (10-30%). Pie plano. Luxación congénita de cadera y adquirida (30%). Inestabilidad patelofemoral (10-20%). Alteraciones en la marcha.	Valoración intencionada al nacimiento. Seguimiento ortopédico periódico.
Endocrinológicos	Problemas tiroideos (28-40%): hipotiroidismo, tiroiditis autoinmune, hipertiroidismo; hipotiroidismo subclínico. Diabetes mellitus (1%). Crecimiento con patrón propio. Obesidad (30-35%)	Tamiz neonatal. Seguimiento anual con pruebas de función tiroidea. Vigilancia de crecimiento de forma rutinaria. Dieta y ejercicio adecuados para evitar obesidad.
Hematológicas y Oncológicas	Recién nacidos: Trombocitopenia (66%) y policitemia (33%). Desórden mieloproliferativo transitorio (10%), 20% de los cuáles desarrollará leucemia mieloide antes de los 5 años. Leucemia linfoblástica. Linfopenia de células T y B, susceptibilidad infecciones. Menor riesgo a alergias.	Biometría hemática al nacimiento. Vigilancia específica de datos de leucemia en los primeros 5 años de vida.

Tabla 2. Manifestaciones Clínicas en SD

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Cardiopatías congénitas en SD

Se define a la cardiopatía congénita como el grupo de alteraciones estructurales y funcionales presentes al nacimiento, aunque se manifiesten o diagnostiquen posteriormente,

resultado del desarrollo cardíaco anormal. Las cardiopatías congénitas se encuentran dentro de las malformaciones más frecuentes en el ser humano al reportarse hasta en el 1% de todos los recién nacidos vivos, constituyendo un importante problema de salud pública a nivel mundial.³⁸

Las malformaciones cardíacas son altamente prevalentes en el SD, afectando entre el 44 a 58% de los pacientes. El espectro de defectos cardíacos que pueden presentarse abarca desde alteraciones en la separación de las cámaras cardíacas a malformaciones complejas que afectan múltiples aspectos de la anatomía cardíaca (por ejemplo, la Tetralogía de Fallot).³⁹

La cardiopatía congénita es una condición con repercusión directa en el pronóstico y supervivencia en SD, constituyendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los primeros 2 años de vida.⁴⁰

En Latinoamérica, la tasa de mortalidad durante el primer año de vida de los infantes con SD sin cardiopatía, se reportó en 21%; el 10% falleció en el período neonatal. Cuando el SD se asocia a cardiopatía, la probabilidad de supervivencia en el primer año desciende al 66%. Las causas de muerte más comunes incluyen la falla cardíaca congestiva, neumonía y enfermedad vascular pulmonar obstructiva; la última complicación se encuentra asociada a la presencia de canal atrioventricular.⁴¹ En comparación, países de primer mundo tienen una tasa de supervivencia promedio del 90%, incluyendo a los pacientes con cardiopatía congénita y SD.⁴⁰

2.1.1 Distribución geográfica de los distintos tipos de cardiopatía congénita en Síndrome de Down

El tipo de cardiopatía congénita en SD varía de acuerdo a la localización geográfica. En población caucásica, el defecto de canal atrioventricular (CAV) constituye la alteración cardíaca más frecuente, encontrándose en 54% de los pacientes.⁴¹ En tanto, en la población general se trata de un defecto raro como cardiopatía aislada al presentarse en sólo el 2.8%.⁴² En segundo lugar se ubican los defectos de septación cardíaca ventricular (DSV) en un 33%, seguidos de otros tipos como la persistencia de conducto arterioso (PCA), la tetralogía de Fallot, entre otros.⁴³

En contraste, en Asia el defecto ventricular septal aislado se reporta como el más frecuente en un 40% de los pacientes SD con cardiopatía.⁴⁴

En Latinoamérica, De Rubens et al.⁴⁵ (2003) estudio a una población pediátrica mexicana con SD y cardiopatía, donde el tipo más frecuente de defecto cardíaco fue la Persistencia de Conducto Arterioso (PCA), tanto en forma aislada como asociada a otras cardiopatías. El Defecto Septal Atrial (DSA) fue el defecto aislado más frecuente (33%), mientras los Defectos Septales Ventriculares (DSV) se encontraron en 29% de los pacientes. Diferente a lo reportado en población caucásica, sólo el 9% presentó el Defecto de Canal Atrioventricular.⁴¹

Vida et al.⁴⁶ (2005), reportaron una serie de 349 pacientes con SD guatemaltecos, en quienes en el 54% se diagnóstico cardiopatía congénita. El defecto aislado más frecuentemente encontrado fue la persistencia del conducto arterioso (29%), seguido por el defecto ventricular septal (27.5%) y el defecto atrial septal (12.7%). Similar a lo reportado en la muestra de pacientes de origen mexicano descrita por De Rubens et al.⁵⁸ Difiere a lo anterior que en 2009, Vilas et al.⁴⁷, publicó que la comunicación interauricular y el defecto de canal atrioventricular eran las cardiopatías más comunes, con una frecuencia de 36.3%, al estudiar la prevalencia y tipos de cardiopatías congénitas en pacientes con SD en la población brasileña de Pelotas.

Debido a la alta incidencia de cardiopatía congénita en niños con SD, la detección temprana es crucial para un manejo médico y quirúrgico óptimo así como para la prevención del desarrollo de hipertensión pulmonar. El examen neonatológico normal no excluye la existencia de una cardiopatía seria en pacientes con SD, por lo que todo paciente con SD debe contar con un ecocardiograma por personal experimentado durante el primer mes de vida.⁴⁸ La corrección quirúrgica de los defectos cardíacos que así lo ameritan ocurre entre los 2 a 4 meses, en hospitales de países de primer mundo pero algunas cardiopatías, como la Tetralogía de Fallot, son indicación para un tratamiento quirúrgico más temprano.⁴⁹

Recientemente se ha reportado que la persistencia de la hipertensión pulmonar del neonato (PHPN) constituye una complicación asociada a cardiopatía frecuente en los pacientes con SD (5.2-13.7%), por lo que se debe brindar interés a su vigilancia en todo paciente con SD y cardiopatía.³¹

2.2 Defecto de canal atrioventricular (AVSD/CAV)

Los términos "defectos de almohadillas endocárdicas", "defecto de septación atrio-ventricular" (AVSD) y "canal atrio-ventricular" (CAV) son términos indistintos que describen una formación incompleta de las válvulas mitral y tricúspidea, la porción anterior del tabique auricular (defecto *ostium primum*) y la parte posterior del tabique ventricular⁵⁰, lo cual condicionan una válvula común atrio-ventricular y una deficiencia variable en el flujo de entrada ventricular⁵¹. Alrededor del día 32-33 de gestación, se lleva a cabo el desarrollo del tejido mesenquimatoso que conforma las 4 almohadillas endocárdicas necesarias para la formación de un corazón de 4 cámaras. La formación del CAV puede ser resultado del arresto ó interrupción del desarrollo de dicho tejido.⁵⁰

El CAV puede distinguirse en parcial y transicional o completo, este último es la forma más severa y consiste en una gran comunicación interauricular tipo *ostium primum*, un defecto septal interventricular grande y una válvula común atrio-ventricular conformada por 5 valvas.^{50,52} El CAV completo puede clasificarse de acuerdo a la morfología del tracto de salida de la válvula atrioventricular común en tres grupos (Clasificación Anatómica de Rastelli): en el tipo A, el puente anterior de la valva se relaciona con el ventrículo izquierdo, con numerosas cuerdas adheridas entre la valva y el septum. En el tipo B, la valva anterior es grande y cabalga el septum interventricular, con un músculo papilar medial en el ventrículo o banda moderadora. En el tipo C, la valva anterior es mayor y cabalga el septum más que los tipos A y B; el músculo papilar medial se une al músculo papilar anterior tricuspídeo, por lo que se forman 5 valvas y el tracto de salida del ventrículo izquierdo es más largo y estrecho de lo normal, dando la apariencia de “cuello de ganso”.⁵¹

En cuanto a su epidemiología, el CAV representa del 3 al 7% del total de los defectos cardíacos congénitos, esto es, 2 a 3 de cada 10,000 recién nacidos vivos presenta esta cardiopatía congénita.^{51,53}

El diagnóstico de CAV es eminentemente clínico, al encontrar datos de insuficiencia cardíaca sin cianosis, presencia de un soplo holosistólico en mesocardio, murmullo de regurgitación atrio-ventricular, 2º ruido intenso secundario a hipertensión arterial pulmonar.⁵¹ A nivel radiológico, la telerradiografía de tórax demuestra cardiomegalia e hiperflujo pulmonar. El electrocardiograma muestra un eje de AQRS desviado a la izquierda, generalmente a -30 grados, lo cual se debe a la unión atrio-ventricular anormal que conduce a un desplazamiento del

nodo atrio-ventricular. Lo anterior predispone a bloqueos atrio-ventriculares.⁵¹ Así mismo, también es posible encontrar un crecimiento biventricular en el cuadrante superior.⁵⁰

La evaluación por ecocardiografía se considera el estándar de referencia para confirmar el diagnóstico de CAV, ya que además permite su correcta clasificación de acuerdo a los datos anatómicos al demostrar con detalle el defecto interatrial *ostium primum* característico del canal atrio-ventricular completo, los datos anatómicos de las 5 valvas que conforman la válvula atrio-ventricular común y el defecto interventricular en la porción de entrada.⁵³

La pronta corrección quirúrgica del CAV es imperativa para prevenir secuelas irreversibles derivadas de las severas alteraciones hemodinámicas, que conllevan al deceso del 50% de los pacientes no tratados quirúrgicamente durante el primer año de vida.⁵¹

2.3 Genes relacionados con la presentación del canal atrioventricular (CAV)

La formación del CAV resulta de la compleja interacción de los componentes de la matriz extracelular que se localiza entre el epitelio interno del tubo cardíaco primitivo y el miocardio externo.⁶⁴ En las últimas dos décadas se ha demostrado que la morfogénesis del CAV está bajo el control de grupos de redes transcripcionales. La mayoría de los factores transcripcionales involucrados, están altamente conservados en la evolución, por lo que el conocimiento del desarrollo cardíaco humano se ha logrado a través de estudios en otras especies de invertebrados y vertebrados.⁵³ En la tabla 3, se resumen los principales eventos de la morfogénesis cardíaca en asociación a los genes y su respectiva función en la misma:

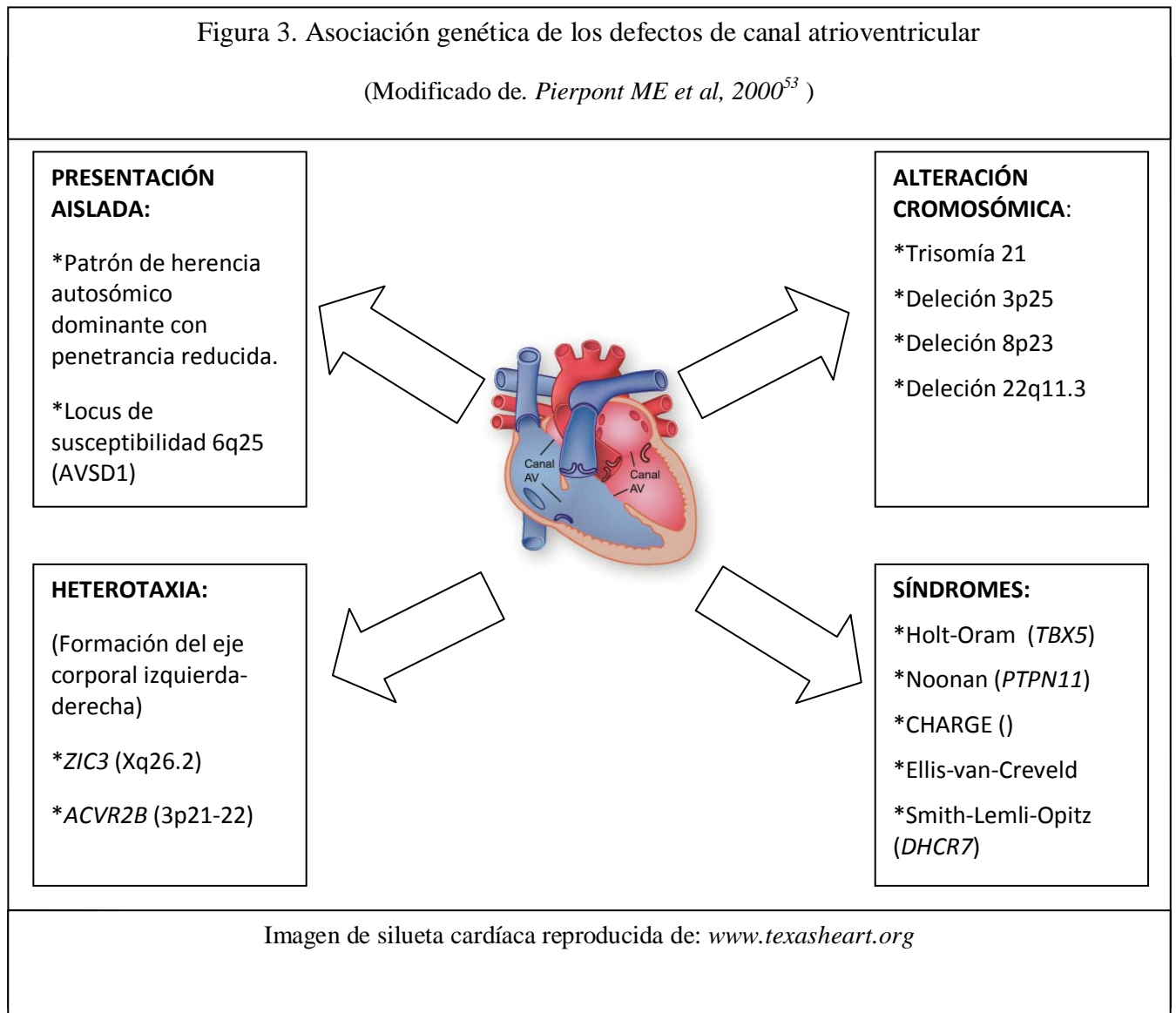
Tabla 3. DESARROLLO ATRIOVENTRICULAR / VALVULOSEPTAL ^{53,55,56}
(Modificado de Pierpont ME et al, 2000)

ETAPA	LOCALIZACIÓN	ACCIÓN	GEN / PROTEÍNA REGULADORA
I. Gastrulación	Estría Primitiva (línea media)	Coalescencia de células precardiacas en el mesodermo esplácnico para formar una bicapa.	<i>MESP-1</i> ; <i>GATA4,6</i> ; <i>SHH</i> ; <i>FURINA</i>
II. Etapa embrionaria 4-7	Campo cardíaco lateral	Diferenciación de las células mesodérmicas	<i>TGF-β</i> , <i>NEUROCAN</i> , <i>VEGF</i> , <i>PITX2</i> , receptor de activina β
III. Etapa embrionaria 8-16	Fusión de los campos cardíacos	El tubo cardíaco primario se desarrolla de las células mesenquimatosas, en dos capas distintas	<i>GATA6</i> , <i>MEF2C</i> , <i>BMP2</i> y 4. <i>COL6A1</i>
IV.	Tubo cardíaco primario	Expansión de la gelatina cardíaca entre las dos capas	<i>FGF</i> , <i>TGF-B2</i> , <i>TGF-β3</i> , <i>IGF1</i> , <i>COL6A1</i> ; hialuronato. <i>CRELD1</i> , <i>CRELD2</i>
V.	Tubo cardíaco primario	Expresión segmental de moléculas del miocardio. Expresión moléculas de adhesión	<i>TGF-β2</i> , <i>BMP-4</i> , <i>MSX2</i> ; <i>COL6A1</i> fibronectina. <i>CRELD1</i> , <i>CRELD2</i>
VI.	Matriz extracelular del tubo cardíaco primario	Trasformación de células del endocardio a células mesenquimatosas de los cojinetes/almohadillas	<i>TGFβ1-3</i> , <i>BMP2</i> y 4; <i>COL6A1</i> ; endotelina. <i>CRELD1</i> , <i>CRELD2</i>
VII.	Migración de las células de los cojinetes/almohadillas	Regulación a la baja de moléculas de adhesión celular	<i>TGF-β3</i> , <i>COL6A1</i> ; citoactina. CRELD1 , <i>CRELD2</i>
VIII.	Edema de los cojinetes/almohadillas	Trasformación del mesénquima de las almohadillas en las válvulas y tabiques embrionarios	<i>TGF-B1</i> , <i>FBN2</i> , <i>SOX4</i>

MESP-1: Homólogo mesodérmico posterior 1. *GATA4*: proteína de unión a GATA 4. *SHH*: sonic hedgehog. *TGF-β*: Factor de crecimiento trofoblástico β. *VEGF*: Factor de crecimiento del endotelio vascular. *PITX2*: Homeodominio similar al pareado 2. *IGF1*: Factor de crecimiento similar a la insulina. *COL6A1*: Colágeno tipo VI. *MEF2C*: Factor potenciador de miocitos 2C. *BMP*: Proteína morfogénica de hueso. *CRELD1* y 2: Proteína rica en cisteína con dominios similares a EGF, 1 y 2. *FBN2*: Fibrilina 2. *SOX4*: Región determinante del Y, caja 4.

El origen genético del CAV es heterogéneo; puede presentarse de forma aislada ó asociado a síndromes, alteraciones cromosómicas y heterotaxia. En las formas aisladas, se ha reportado el tipo de herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta.⁵³

El CAV puede ser parte de entidades sindrómicas, algunas de ellas se mencionan en la siguiente figura (Figura 3.)



El defecto del canal atrioventricular se ve frecuentemente asociado al síndrome de Down, así, se conoce que el 65% de los diagnósticos postnatales de canal atrioventricular completo corresponden a pacientes con síndrome de Down así como el 40% de los CAV detectados por diagnóstico prenatal. Se ha postulado que en el cromosoma 21 se encuentran uno o más genes que aumentan significativamente la susceptibilidad para presentar CAV. Sin embargo, no todos los pacientes con Síndrome de Down presentan cardiopatía, incluyendo el CAV cuya frecuencia de presentación varía de acuerdo al origen étnico del paciente. Por lo tanto, deben existir factores ambientales y modificadores genéticos, no sólo en el cromosoma 21 sino también en otros cromosomas, que contribuyan al fenotipo.

Estudios experimentales demuestran que teratógenos ambientales (ácido retinoico)⁵⁷ y metabolitos endógenos (superoxido dismutasa miocárdica)⁵⁸, pueden interferir en el crecimiento y desarrollo del tejido mesodérmico de los cojinetes endocárdicos postero-inferior y antero-superior.

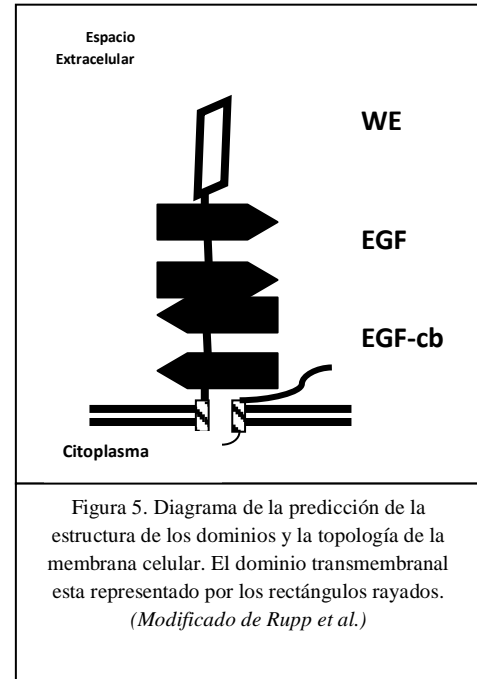
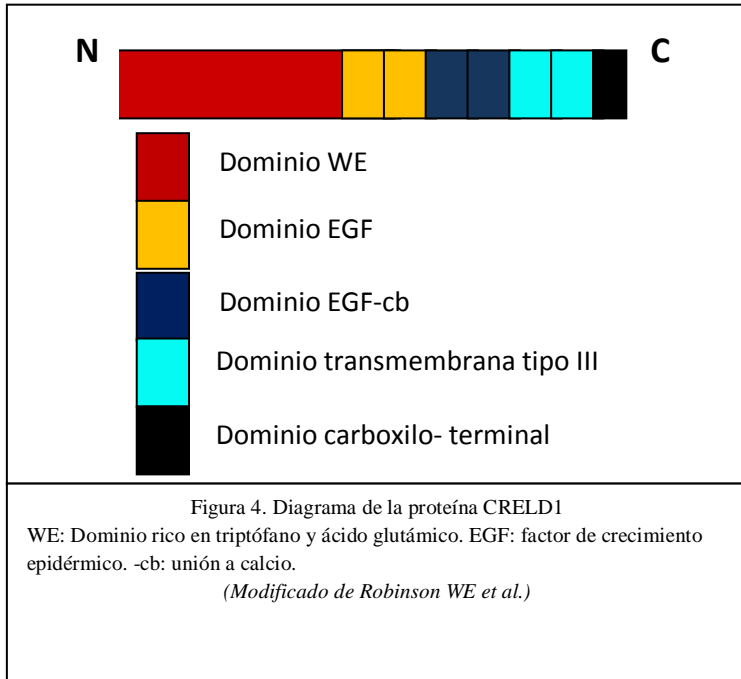
La identificación de otras alteraciones cromosómicas asociadas a la presentación de CAV, en particular, la deleción en el brazo corto del cromosoma 3 (deleción 3p25), permitió la identificación de un gen candidato para el CAV: el gen *CRELD1*.

2.4 Gen *CRELD1*

El gen *CRELD1* (Cysteine-Rich with EGF-Like Domains 1) codifica para una molécula de adhesión celular, perteneciente a la recientemente delineada superfamilia de factores de crecimiento epidérmico (EGF). En el 2002, Rupp y cols.⁵⁹, lograron su identificación y

caracterización en el ser humano, concluyendo que se localiza en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25.3), con una longitud de 2.1 kilobases, comprendida en 11 exones.

La proteína sintetizada se compone de 420 aminoácidos (45440 Da), organizados en 8 dominios⁵⁹, a continuación esquematizados:



La proteína CRELD1 se expresa constitutivamente en todos los tejidos embrionarios tempranos, con posterior predominio en el corazón en desarrollo, las extremidades, mandíbula y el sistema nervioso central. El transcrito principal de *CRELD1* de 2.1 kb, se ha identificado en prácticamente todos los tejidos en el ser humano adulto.

Así mismo, se han identificado otras dos isoformas de *CRELD1*, consecuencia del empalme de exones (splicing) alternativo que presenta este gen. Así, además del transcrito principal de 2.1 kb compuesto por los exones 1 al 10, también se han identificado otros dos transcritos; el de 2.3 kb, producto de la inclusión del exón 9b (exón localizado en el intrón 9 al

formarse el transcrito de 2.1kb) y el de 2.5 kb, resultado de la inclusión de la totalidad de los exones 1 al 11. La detección de estos dos transcritos ha predominado en el período fetal; sin embargo, el transcrito de 2.3 kb también se ha identificado en el corazón adulto, principalmente en aurículas, ventrículos, ápex y en la aorta, mientras que la isoforma de 2.5 kb se ha logrado localizar en el cerebro adulto.⁵⁹

2.5 *CRELD1* y su implicación en defectos cardíacos del tipo Canal Atrioventricular (CAV)

Robinson *et al*⁶⁰ (2003), realizó el estudio molecular de *CRELD1* en 50 individuos no relacionados con CAV y cariotipo normal. En tres de estos pacientes se identificaron mutaciones en sentido erróneo en los exones 3 y 9, dos de ellos con CAV parcial (p.R329C; p.T311I). En el tercero se encontró una mutación en el exón 3 (p.R107H), con un fenotipo complejo con dextrocardia, atresia pulmonar y arco aórtico derecho. Al extender el estudio mutacional a los familiares de primer grado del paciente con la mutación p.R329C, única familia disponible para el análisis clínico y molecular, se identificó que el padre, una hermana y un hermano, también presentaban la mutación. Se les realizó un estudio ecocardiográfico a dichos familiares, encontrando un corazón estructuralmente sano. El hallazgo anterior, sugirió a los autores que podrían tratarse de mutaciones con penetrancia incompleta.⁶⁰

Posteriormente, Zatyka *et al*⁶¹ (2005) publicaron los resultados encontrados al realizar el estudio mutacional a 49 pacientes caucásicos con CAV esporádico, donde lograron identificar una mutación de sentido erróneo en el exón 5 (c.484C > G) en un paciente con CAV parcial; la

mutación también estuvo presente en 7 miembros de la familia del paciente, cardiológicamente sanos pero ausente en 200 controles sanos.⁶¹

Combinando los resultados de estos dos estudios del gen *CRELD1*, únicos hasta el momento en pacientes con CAV esporádico, se logró la identificación de 4 mutaciones de sentido erróneo en 99 pacientes no relacionados, con la evidencia de un tipo de herencia con penetrancia incompleta, al encontrarse también en familiares sin cardiopatía.

Sarkozy *et al*⁶² (2005) analizaron los genes *CRELD1* y *GATA4* en una cohorte de 42 pacientes italianos con diferentes subtipos de CAV, que incluían 26 casos esporádicos y 16 pacientes con presentación familiar. Previamente, se había reportado por Garg *et al*⁶³ (2003) mutaciones en *GATA4* asociadas a defectos atrioventriculares y en un individuo a CAV, por lo que se decidió su inclusión en este estudio. Sin embargo, no se encontraron mutaciones patogénicas en las secuencias codificantes de ambos genes, por lo que se concluyó que mutaciones en *CRELD1* y *GAT*, raramente se identifican en pacientes con CAV aislado.⁶²

En el 2007, Posch *et al*⁶⁴, reportaron los resultados del estudio de las regiones codificantes de los genes *GATA4*, *NKX2.5*, *BMP4* y *CRELD1* en 205 pacientes con cardiopatía congénita, de los cuales 110 presentaban un defecto atrial tipo *ostium secundum* aislado (ASDII) y 95 padecían otros defectos septales (60 ASDII; 22 con defecto septal ventricular perimembranoso y 13 con CAV) asociados a otras malformaciones cardíacas menores (coartación de la aorta, persistencia del conducto arterioso y retorno venoso parcial anómalo). Posterior al tamizaje de dichos genes mediante SSCP (Análisis de polimorfismos en la conformación de cadena única) y secuenciación de los cambios encontrados, lograron la identificación de una mutación en estado heterocigoto en *GATA4* (c.1750C>T), en un paciente caucásico con ASDII multiperforado y retorno venoso parcial anómalo.

En *CRELD1* se identificaron 7 variantes genéticas (Tabla 4.), para determinar si estas variantes, clasificadas como polimorfismos de nucleótido único del tipo no sinónimo (nsSNPs), podrían condicionar una susceptibilidad para el desarrollo de defectos congénitos septales, se genotipificaron 360 alelos de individuos sanos; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre las frecuencias alélicas entre los casos y controles.

TABLA 4. VARIANTES GENÉTICAS EN <i>CRELD1</i> IDENTIFICADAS EN 205 PACIENTES CON DEFECTOS SEPTALES CONGÉNITOS					
<i>Modificado de Posch et al (2007) ⁶⁴</i>					
GEN	EXÓN/INTRÓN	cDNA	PROTEÍNA	NUM. CASOS CON EL CAMBIO (n=205)	FENOTIPO
<i>CRELD1</i>	5'UTR	c.-103G>T		1	ASDII
	Ex1	c.654G>A	p.V13M	11	ASDII (10); VSD/PDA (1)
	Ex5	c.1217T>C	p.F200F	1	ASDII
	Int5	c.628-16C>T		1	ASDII
	Ex9	c.1628G>A	p.K336K	1	ASDII
	Int10	c.1048+23G>T		1	ASDII
	Exón 10	c.1721G>A	p.Q368Q	9	ASDII (9)
ASDII: Defecto septación atrial tipo ostium secundum. VSD: Defecto septación ventricular. PDA: Persistencia del conducto arterioso.					

El último estudio reportado es el de Guo Y *et al* ⁶⁵ (2010) en donde se estudiaron 133 pacientes de origen Chino con CAV y 200 controles sanos en búsqueda de mutaciones en *CRELD1*. De los 133 pacientes, 24 contaban con el diagnóstico clínico de síndrome de Down; 2

tenían síndromes de heterotaxia y poliesplenia; 6 presentaban síndromes de heterotaxia y asplenia, y 101 con CAV aislado. Mediante secuenciación directa del gen encontraron dos mutaciones, previamente no reportadas. La primera, en estado heterocigoto en el exón 8 (c.857C>T), la cual se identificó en un paciente con CAV parcial; al realizar el estudio molecular en los padres, se identificó la misma mutación en la madre, quien tenía un corazón sano. La segunda fue una mutación en estado heterocigoto en el exón 9 (c.973G>A), la cual se identificó en un paciente con Síndrome de Down y CAV. Ambas mutaciones afectan el dominio EGF de unión a calcio de *CRELD1*.⁶⁵

2.6 Implicación del gen *CRELD1* en los defectos cardíacos en SD

Dada la incidencia de CAV en pacientes caucásicos con SD⁴¹ y la asociación de *CRELD1* como gen de susceptibilidad para la presentación de CAV⁶⁰⁻⁶³, Maslen *et al*⁶⁶ (2006) investigaron la frecuencia de mutaciones en una población de 39 pacientes con SD por trisomía 21 regular y CAV completo, mediante secuenciación directa del gen. Reportaron el hallazgo de dos mutaciones: una mutación de sentido erróneo en estado heterocigoto en el exón 9 (c.985C>T), previamente reportada por Robinson *et al*⁶⁰ en un paciente adulto joven con CAV parcial aislado. La presentación cardiológica del paciente con SD del presente estudio consistía en un CAV completo asociado a un defecto septal atrial secundario, persistencia del conducto arterioso, regurgitación tricuspídea, hipertensión pulmonar y drenaje anómalo de la aurícula derecha al hígado. Al ampliar el estudio molecular en sus padres, se identificó que era una mutación heredada de la madre, quién clínicamente era sana. Así mismo, no se encontró la

mutación en 400 controles sanos, con el mismo origen étnico ni en 30 individuos (60 alelos) con trisomía 21 pero sin cardiopatía congénita documentado por ecocardiograma.

La segunda mutación se observó en un paciente con SD y CAV completo con regurgitación tricuspídea, sin otra alteración sistémica asociada. La mutación se identificó en el exón 10 (c.1240G>A) que resulta en una sustitución de lisina por ácido glutámico en la posición 414 (p.E414K). Posteriormente, se realizó una búsqueda intencionada en 400 alelos de controles sanos de la misma etnicidad así como en 60 alelos cromosomas de individuos con SD y sin defectos cardíacos, sin encontrar la mutación. También se realizó el estudio en ambos padres, los cuales no portaban la mutación y clínicamente eran sanos.

Las dos mutaciones descritas se encuentran en regiones altamente conservadas en mamíferos. La mutación c.985C>T se encuentra en el segundo dominio del factor de crecimiento epidérmico con unión al calcio (dominio EGF-cb). La naturaleza recurrente de esta mutación (previamente reportada por *Robinson et al*⁶⁰, en un paciente euploide) podría atribuirse a que ocurre en un dinucleótido CpG, el cual se sabe son secuencias propensas a mutación durante la recombinación.^{60,66}

Con base a lo anterior, Maslen et al.⁶⁶, reportaron una frecuencia mutacional en *CRELD1* del 5.1% (2/39), en pacientes con SD y CAV completo. Los autores concluyen que las mutaciones en *CRELD1* incrementan el riesgo de desarrollar CAV, junto a otros factores, como la trisomía 21 y factores ambientales aún no identificados, siguiendo el modelo del umbral descrito para las cardiopatías congénitas. También se indica que estas mutaciones pueden presentarse de forma heredada u ocurrir como eventos de *novus*.⁶⁶

En el estudio previamente citado de Guo Y *et al*⁶⁵ (2010), se incluyeron 133 pacientes con CAV, de los cuales 24 presentaban el diagnóstico clínico de síndrome de Down (no se refiere

que el diagnóstico clínico se haya corroborado con cariotipo). En este trabajo no se detalla el tipo de CAV (completo ó parcial), tipo de presentación (aislada ó asociada a otras cardiopatías) ni otras características clínicas de estos 24 pacientes. Como se menciono anteriormente, una de las dos mutaciones identificadas en el estudio fue en un paciente con síndrome de Down, tratándose de una mutación en estado heterocigoto en el exón 9 (c.973G>A), lo cual conlleva una sustitución de lisina por ácido glutámico en el aminoácido 325 (p.E325K), en el segundo dominio EGF-cb. Los padres se negaron a realizarse el estudio molecular, por lo que no fue posible determinar el origen de la misma. La mutación no fue encontrada en 100 controles sanos de la población China. En este estudio se refiere que existe una diferencia en la frecuencia mutacional de *CRELD1* entre los pacientes con CAV y Síndrome de Down y aquellos con CAV sin síndrome de Down, al encontrarse mutaciones más frecuentemente en los pacientes con Síndrome de Down y CAV ($\chi^2 = 1.586$, p=0.208).⁶⁵

Combinando la información detallada en los dos estudios existentes (Maslen et al., 2006; Guo et al., 2010) que asocian mutaciones en *CRELD1* y defectos de CAV en pacientes con SD se obtiene que la incidencia de mutaciones en *CRELD1* en pacientes con SD y CAV es del 4.8% (3/63).

3 JUSTIFICACIÓN

El síndrome de Down (DS) es la aneuploidía más frecuente del ser humano, compatible con la vida. El Instituto Nacional de Pediatría (INP) es un centro especializado donde se realiza el diagnóstico y la atención de pacientes con DS y cardiopatía congénita (CHD). Las CHD son el principal factor que determina la sobrevida de los pacientes con DS en los primeros años de vida.

Los mecanismos genéticos y ambientales asociados a la CHD en DS se desconocen hasta el momento. A pesar de que varios genes candidatos han sido descritos en la etiopatogenia de las CHD por defectos de septación, en la actualidad dos estudios han reportado mutaciones asociadas a una CHD y DS, reportando un 4.8% de mutaciones de sentido erróneo en el gen *CRELD1* en una muestra de 63 pacientes (39 de origen caucásico y 24 de origen chino) con DS y CAV. A pesar de la baja frecuencia de mutaciones identificadas en este gen, consideramos importante realizar el presente trabajo, para determinar si la presencia de mutaciones en el gen *CRELD1* explican la etiología de algunos casos de DS con CHD en población mexicana. Así mismo, se desconocen los factores genéticos y ambientales asociados a las diferencias encontradas en población mexicana/hispana y caucásica respecto a la frecuencia y tipo de CHD (particularmente AVSD y VSD/ASD) en pacientes con DS, por lo que este estudio forma parte del Proyecto de Investigación Num. 013/09, autorizado por los comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Pediatría, en el cual se estudiarán también los genes *GATA4* y *NKX2.5*, cuya función es relevante para una adecuada septación cardíaca.

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Cuáles son los polimorfismos y mutaciones existentes en el gen *CRELD1* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y defectos del canal atrioventricular?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Caracterizar las mutaciones y polimorfismos en el gen *CRELD1* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y cardiopatía congénita del tipo canal atrio-ventricular (completo e incompleto).

5.2 Objetivos Específicos

1. Describir las características demográficas y clínicas generales de los pacientes con síndrome de Down y canal atrio-ventricular.
2. Describir los hallazgos ecocardiográficos reportados en los pacientes con síndrome de Down y canal atrio-ventricular.
3. Caracterizar las mutaciones y polimorfismos en el gen *CRELD1* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y cardiopatía congénita del tipo canal atrio-ventricular (completo e incompleto).

5.3 Objetivos Secundarios

1. Determinar si las mutaciones patogénicas encontradas son heredadas u originadas como eventos *de novo*, mediante el estudio molecular en los padres.

6 HIPÓTESIS

Existen polimorfismos y/o mutaciones en el gen *CRELD1* en por lo menos el 5% de los pacientes de la muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y cardiopatía congénita por defectos de septación cardíaca del tipo CAV.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Clasificación de la Investigación

Estudio prospectivo, descriptivo y transversal.

7.2 Universo de estudio

7.2.1 Población elegible

Pacientes con diagnóstico de síndrome de Down (SD) canalizados a través de los servicios de Cardiología, Clínica del Niño con Síndrome de Down y Genética, del Instituto Nacional de Pediatría (INP), México.

7.2.2 Tamaño de muestra

Dada la baja frecuencia de pacientes con trisomía 21 regular con CAV en nuestra Institución, lo cual está descrito por De Rubens et al,⁵⁸ el tamaño de muestra para el presente trabajo fue a conveniencia.

7.3 Criterios de Inclusión

- 1.** Pacientes con síndrome de Down por trisomía 21 regular (confirmado por cariotipo en sangre periférica mediante la lectura de 25 metafases con tinción de bandas G)
- 2.** Ambos géneros y de cualquier edad.

3. Que hayan nacido en México, cuyos padres y abuelos paternos y maternos también hayan nacido en México.
4. Pacientes con SD de la población objetivo cuyos padres o representantes legales autoricen su inclusión en el estudio mediante firma de carta de consentimiento informado para la realización del cariotipo y del estudio molecular.
5. Pacientes con diagnóstico de síndrome de Down y con cardiopatía congénita por defecto de almohadillas endocárdicas o canal atrio-ventricular parcial, transicional o completo confirmada por evaluación cardiológica y ecocardiográfica.
6. Pacientes con síndrome de Down cuya madre no tenga antecedentes de exposición a teratógenos durante la gestación.
7. Padres biológicos de los pacientes con DS incluidos en el estudio y los cuales autoricen su participación en el estudio mediante firma de carta de consentimiento informado

7.4 Criterios de Exclusión

1. Pacientes con cardiopatías congénitas complejas donde coexistan ASD, VSD o AVSD con otro tipo de CHD conotroncales.
2. Temporalmente, pacientes con DS que hayan sido transfundidos en un periodo menor a tres meses.

7.5 Ubicación del Estudio

Los pacientes elegibles con SD se captaron a través de los servicios de Genética, Clínica del Niño con Síndrome de Down y Cardiología Pediátrica, del Instituto Nacional de Pediatría,

Secretaría de Salud, México. Posteriormente, fueron evaluados por el Servicio de Cardiología Pediátrica, para una exploración cardiológica detallada y la realización de ecocardiograma bidimensional transtorácico en tiempo real para definir clasificación de CHD.

En el servicio de Genética se realizó un abordaje integral mediante historia clínica completa y genealogía, así como referencia a otros estudios paraclínicos ó especialidades médicas involucradas en la atención de todo paciente con SD. Se solicitó cariotipo en sangre periférica a todo paciente con datos clínicos de síndrome de Down que fueron captados en los servicios mencionados, independientemente de la edad materna al nacimiento.

El estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica en la población elegible con SD se realizó en el Laboratorio de Citogenética del Instituto Nacional de Pediatría, de acuerdo a la técnica convencional.¹⁰

El estudio molecular de las familias se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría.

El servicio de secuenciación automatizada se realizó como un servicio externo solicitado por el Laboratorio de Biología Molecular del INP en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

7.6 Definición de las variables estudiadas

Se analizaron las siguientes variables:

- Sexo: Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas.⁶⁷

Variable: Cualitativa, categórica nominal dicotómica. 0= Masculino 1= Femenino

- Edad: Cada uno de los períodos en que se considera dividida la vida humana.⁶⁷

Variable: Cuantitativa numérica discreta.

- Edad materna al nacimiento del paciente: Edad cronológica de la madre, al momento del nacimiento del paciente.

Variable: numérica continua

- Trisomía 21 regular: Presencia anormal de un cromosoma 21 extra (total: 3 cromosomas 21) que condiciona un número de 47 cromosomas totales por célula. Este hallazgo deberá ser documentado mediante la técnica de citogenética convencional de bandas G (GTG) en todas las metafases analizadas (de 15 a 20 metafases) de una muestra de linfocitos de sangre periférica. El resultado se expresa a través de la fórmula 47,XX+21 (mujeres con DS) o 47,XY+21 (varones con DS).¹⁰

Variable cualitativa, categórica nominal y dicotómicas. 0= Sin trisomía 21 regular 1= Presente.

- Canal atrio-ventricular completo: Cardiopatía congénita consistente en un defecto primario de las 4 almohadillas o cojinetes endocárdicos (superior, inferior, lateral izquierda y lateral derecha), el cual condiciona una anomalía en la separación y ubicación de la unión atrio-ventricular, atribuible a una formación incompleta de las valvas tricúspide y mitral, además de una tabicación incompleta a nivel del septum secundum interauricular (tipo ostium primum) e interventricular. Lo anterior condiciona un canal atrio-ventricular que consiste en una gran comunicación interauricular tipo ostium primum, un defecto septal interventricular grande y una válvula común atrio-ventricular conformada por 5 valvas (superior, izquierda mural, inferior, inferior derecha y antero-

superior derecha). La unión atrio-ventricular anormal puede producir un desplazamiento del nodo atrio-ventricular que se manifiesta por una desviación del eje a la izquierda en el electrocardiograma.⁵¹

- Canal atrio-ventricular parcial: Cardiopatía congénita consistente en un defecto primario de las almohadillas o cojinetes endocárdicos, el cual condiciona una anomalía en la separación de la unión atrio-ventricular, atribuible a una separación y formación incompleta de las válvulas tricúspide y mitral, además de una tabicación incompleta a nivel del *septum primum* interauricular. Lo anterior condiciona una unión atrio-ventricular común, dos válvulas atrio-ventriculares separadas, pero con una válvula mitral hendida o trivalva y una comunicación interauricular tipo *ostium primum* cuya ubicación característicamente en la base del septo interauricular. El ecocardiograma revelará las dos válvulas atrio-ventriculares, la hendidura mitral y el ASD tipo *ostium primum* (en el tabique interatrial bajo).⁵¹
- Polimorfismo: Variante en la secuencia del DNA que se observa en por lo menos el 1% de la población sana.¹⁶

Variable cualitativa, dicotómica y nominal

- Mutación: Cambio fijo y heredable que ocurre en la secuencia nucleotídica de un cromosoma, el cual a su vez puede ubicarse en los segmentos codificantes o regulatorios de un gen, ocasionando una alteración en el nivel de expresión, la regulación, la transcripción o procesamiento del RNA o la traducción de éste, y cuyos efectos en el

fenotipo pueden llegar a ser deletéreos. Debido a lo anterior, este tipo de cambios no suelen observarse en la población sana.¹⁶

Variable cualitativa, dicotómica y nominal.

7.7 Descripción General del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría en los Laboratorios de Biología Molecular y Citogenética, del Departamento de Genética Humana así como en los servicios de Cardiología Pediátrica y Genética Humana. Se realizó una historia clínica completa en los pacientes con SD y se canalizaron a ecocardiograma y cariotipo a aquellos pacientes de la población elegible. El servicio de Cardiología Pediátrica realizó una exploración cardiológica clínica y por ecocardiografía en tiempo real, en un aparato de ultrasonido Modelo tipo iE33 (Philips), en modo M, bidimensional, Doppler, continuo, pulsado, espectro en color, transtorácico y con transductores de 1-5 y 8-3 MHZ, para definir la presencia de CHD del tipo CAV y clasificar de forma correcta en parcial ó completo.

Los casos con CAV que no contaban con estudio citogenético, se enviaron al Laboratorio de Citogenética para la realización de cariotipo por técnica convencional de bandas GTG en linfocitos de sangre periférica. Así, de cada paciente se obtuvo por venopunción, bajo técnica aséptica, una muestra de 2.5-3 ml. de sangre periférica con heparina como anticoagulante. Se realizó la lectura de 15-20 metafases por paciente con una resolución de 450-550 bandas. Una vez obtenido el cariotipo, se brindó asesoramiento genético a los padres del paciente con base a la fórmula cromosómica encontrada. Se incluyeron en el presente trabajo sólo aquellos pacientes que tenían un estudio citogenético con trisomía 21 regular y CAV. Para el estudio molecular, se obtuvo una muestra de 3-5 ml. de sangre periférica con lo cual se llevo a cabo la extracción del

ADN (ácido desoxirribonucleico) genómico para el análisis mediante secuenciación directa del gen *CRELD1*. Con la finalidad de otorgar asesoramiento genético a la familia al determinar si la mutación o polimorfismo documentado en el gen *CRELD1* en el caso índice, fue un cambio heredado u originado *de novo*, se obtuvo de manera paralela y con previa obtención del consentimiento informado, una muestra de sangre periférica para extracción del ADN genómico de cada uno de los padres biológicos del paciente con DS incluido en el estudio.

7.7.1 Extracción de ADN

El ADN genómico de cada paciente y de sus padres biológicos, se obtuvo a partir de leucocitos totales de 3-5 ml. de sangre periférica colectada en tubos Vacutainer® con EDTA como anticoagulante. Las muestras se procesaron mediante la técnica de sales caotrópicas y adsorción de ADN en membrana de sílica (QIAamp DNA Blood Midi Kit, QIAGEN) de acuerdo al protocolo recomendado por el fabricante. La cantidad, pureza e integridad del ADN obtenido se analizó a través de espectrofotometría y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

7.7.2 Búsqueda de mutaciones en el gen *CRELD1* mediante amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con subsecuente secuenciación automática.

a) Amplificación por PCR de las secuencias codificantes, las regiones no traducidas (UTR) y los bordes intrón-exón del gen *CRELD1*

Se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores para la PCR con *Tm* similares (58-60° C) con base a la secuencias genómicas de referencia disponibles en el GenBank (GenBank accession number

AF452623 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para el gen *CRELD1* (NC_000003.11) mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Primers para la amplificación de los exones de <i>CRELD1</i>			
Exón	Primer Forward	Primer Reverse	Producto Esperado
1	5'-TTTCTCGCGTGGGGCCTGAC-3'	5'-GCAGATTTGCATCCCAGAGTTCCCC-3'	323 pb
2	5'-GCCCTAGGCAGGTTGCCTTTCT-3'	5'-GCAGAGATTTGGCGGGGAGGG-3'	246 pb
3	5'-ACCGCACGAGGAAGGGTGGA-3'	5'-TCCAGGGAAGGCCCTTTGCCA-3'	225 pb
4	5'-TCCCCACCTCCCTCCACCCT-3'	5'-GCGAACTAGGGACAGAGCCAGGA-3'	205 pb
5	5'-GTCTTCCCACAGCCTGTCCTGGG-3'	5'-AGGATGGGCAGGCAGGTGCC-3'	250 pb
6	5'-GGCACTGGGCAGGGCAGAT-3'	5'-ACCAAGCCCAGGCCCTGAC-3'	214 pb
7	5'-CCCCAACGGCTCTGGCTTCAG-3'	5'-GGGACAGGTGTGGAGCAGCTC-3'	223 pb
8	5'-GCGTGGCTCCCCTGGGCCTA-3'	5'-GTGAGGCACTCCCAGGTGCC-3'	200 pb
9	5'-CCCTAGCAGGACTCTGACCCT-3'	5'-GGGGCTTGCTGCCTTCTCTTT-3'	228 pb
10	5'-AGGTGTGTGGGAGTTCTGGGGA-3'	5'-AGCGTGGGTGGGAGGAGGTC-3'	287 pb
11 ^a	5'-GGCAGGGACCATTCCCCAGC-3'	5'-TGCCAAGGCCATGTGGTGGA-3'	339 pb

Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron para amplificar la totalidad de las secuencias codificantes, las 5' y 3' UTR y los bordes intrón-exón del gen *CRELD1* con el programa PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>), que además permite una máxima especificidad del amplicón generado, gracias al análisis exhaustivo de los oligonucleótidos con la base de datos de secuencias genómicas humanas del programa.

La amplificación por PCR, se realizó bajo las siguientes condiciones generales: 0.3 µl [5 UI/µl] de *Taq* DNA polimerasa (HotStart *Taq* DNA Polymerase, QIAGEN) y 3 µl de buffer

[10x] de PCR recomendado por el fabricante; 3 mmol de cloruro de magnesio, 100 µmol de dNTPs, 100-200 pmol de cada oligonucleótido y 20-50 ng de DNA genómico en un volumen de reacción de 25 µl. Las reacciones de PCR se llevaron al cabo en un termociclador Applied Biosystems modelo Gene Amp PCR system 2720, bajo los siguientes parámetros: Desnaturalización inicial durante 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos a 95°C por 20 segundos, alineación a 61°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 40 segundos. Posteriormente se sometieron a una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR se verificaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3 % teñido con GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (Lonza Rockland Inc., USA), visualizado y fotografiado bajo luz ultravioleta.

b) Secuenciación automatizada y clasificación como mutación ó polimorfismo de los cambios caracterizados.

Se secuenciaron de forma automatizada las hebras sentido y antisentido de cada amplicon. Cuando se identificaron variaciones a nivel de secuencia, se determinó si previamente habían sido descritas como polimorfismos o mutaciones en *CRELD1*, de acuerdo a la literatura, a la base de datos de SNP del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp/>) y del Human Mutation Genome Database del Instituto Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>). Los cambios no reportados se analizaron *in silico* a través de los programas on-line [https://splice.cmh.edu](https://splice.cmh.edu;); <http://blocks.fhcrc.org/sift/sift.html> y <http://www.bork.embl-heidelberg.de/polyphen/> para definir con ello si se trata de un polimorfismo en nuestra población o de cambios con efectos deletéreos (mutaciones). De igual forma, todas las mutaciones o polimorfismos caracterizados en los pacientes se correlacionaron con el efecto en la síntesis de proteína (por ejem. codones de paro

premature) o en los dominios afectados (por ejem. mutaciones de sentido erróneo en homeodominio, dominios de transactivación, de tipo EGF-1, NK, etc.) a través de los programas BLAST de alineamiento de secuencias con el gen parólogo de otros organismos (por ejem. *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Rattus norvegicus*, *Gallus gallus*, *Caenorhabditis elegans*, etc.).

Los datos generales, cardiológicos y los resultados del estudio molecular del grupo de estudio y de sus padres, se asentaron en la hoja de captación de datos (Anexo 1).

c) Estudio molecular en los padres y asesoramiento genético

Se brindó asesoramiento genético a los padres de todos los pacientes incluidos en el presente trabajo. Los cambios a nivel de secuencia identificados como mutaciones patogénicas en los pacientes con SD, se buscaron de manera dirigida por secuenciación automática directa del segmento génico involucrado en el DNA de ambos padres para determinar si es un cambio heredado u originado como evento *de novo*. En caso de identificar una mutación patogénica heredada, se brindó asesoramiento genético a la familia y se extenderá en un futuro el estudio molecular a otros integrantes de la familia en riesgo de ser heterocigotos para el cambio para brindar asesoramiento genético y en su caso, indicar medidas de detección oportuna de CHD en su descendencia.

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

- a) Univariado. En el caso de las variables cualitativas, se determinaron las frecuencias alélicas de las mutaciones o polimorfismos del gen *CRELD1*. Las frecuencias alélicas de las mutaciones y/o polimorfismos encontrados se compararon con los datos descritos en la literatura utilizando la prueba de χ^2 .

9. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se solicitó el consentimiento informado de los padres, tutores o representantes legales de los todos los pacientes con SD que cumplieron con los criterios de inclusión, para la obtención de 3-5 ml. de sangre venosa periférica para realizar el cariotipo (Anexo 2) y de otros 3-5 ml. de sangre venosa periférica para la obtención del ADN genómico (Anexo 2A) que se sometió al estudio molecular del gen propuesto; lo anterior representó un riesgo mínimo para el paciente. Así mismo, se solicitó a ambos padres biológicos del paciente con SD, el consentimiento informado (Anexo 3) para obtener de cada uno de ellos 3-5 ml. de sangre venosa periférica para la extracción del ADN y así realizar el estudio molecular para definir si el cambio en la secuencia identificado en el paciente con DS, es heredado u originado como evento *de novo*. Lo anterior, permitió, en caso de identificar mutaciones patogénicas, otorgar asesoramiento genético y riesgos de recurrencia de una CHD en la descendencia de otros integrantes de la familia en riesgo.

10. RESULTADOS

Para la presentación del presente trabajo de tesis, se estudiaron a 5 pacientes con SD por trisomía 21 regular y CAV que forman parte del protocolo “Caracterización de mutaciones y polimorfismos en los genes *CRELD1*, *NKX2.5* y *GATA4* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y defectos de septación cardíaca”.

De los cinco pacientes estudiados, 3/5 corresponden al sexo femenino y 2/5 al sexo masculino (Figura 6.) Las edades de los pacientes oscilan entre los 7 meses y los 4 años de edad, al momento de la inclusión al protocolo (Figura 7.).

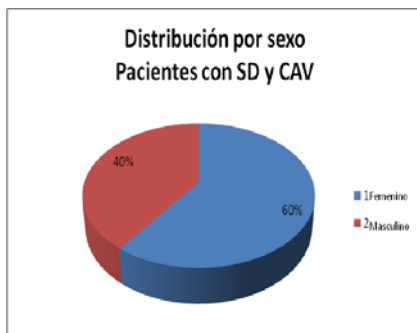


Figura 6. Distribución por sexo en muestra de pacientes con SD y CAV

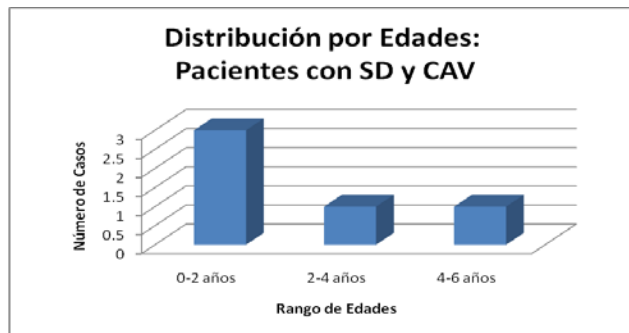
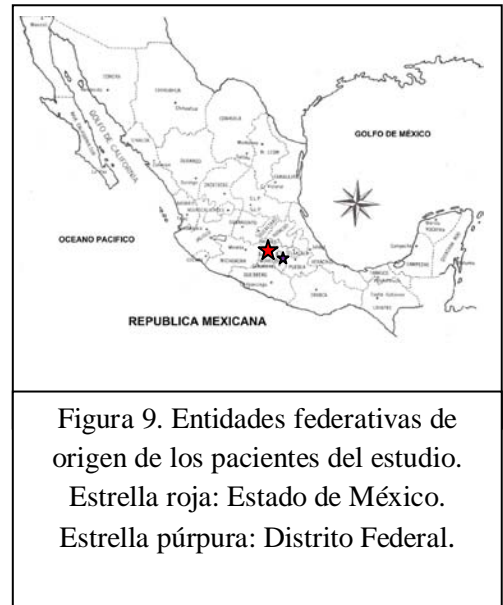
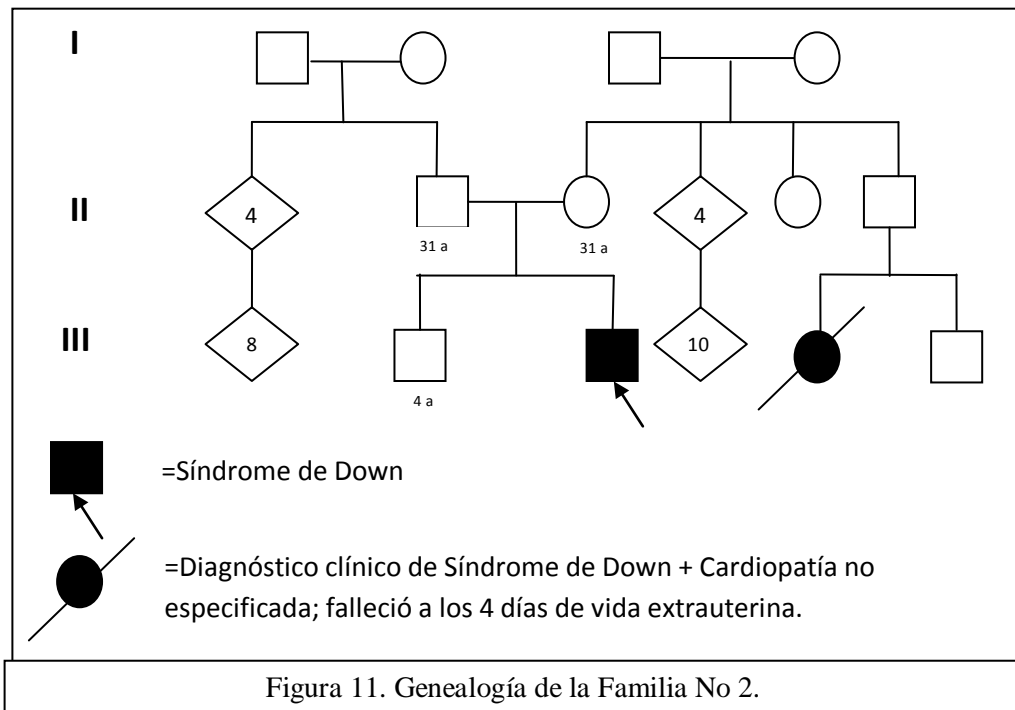
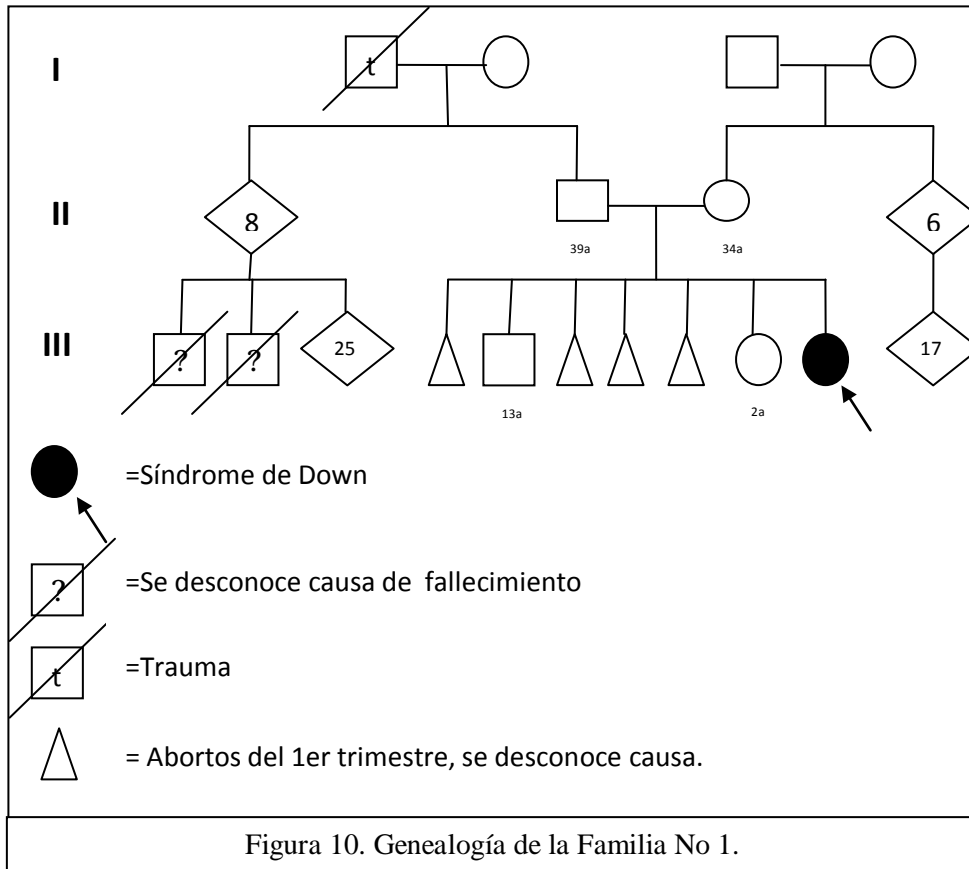


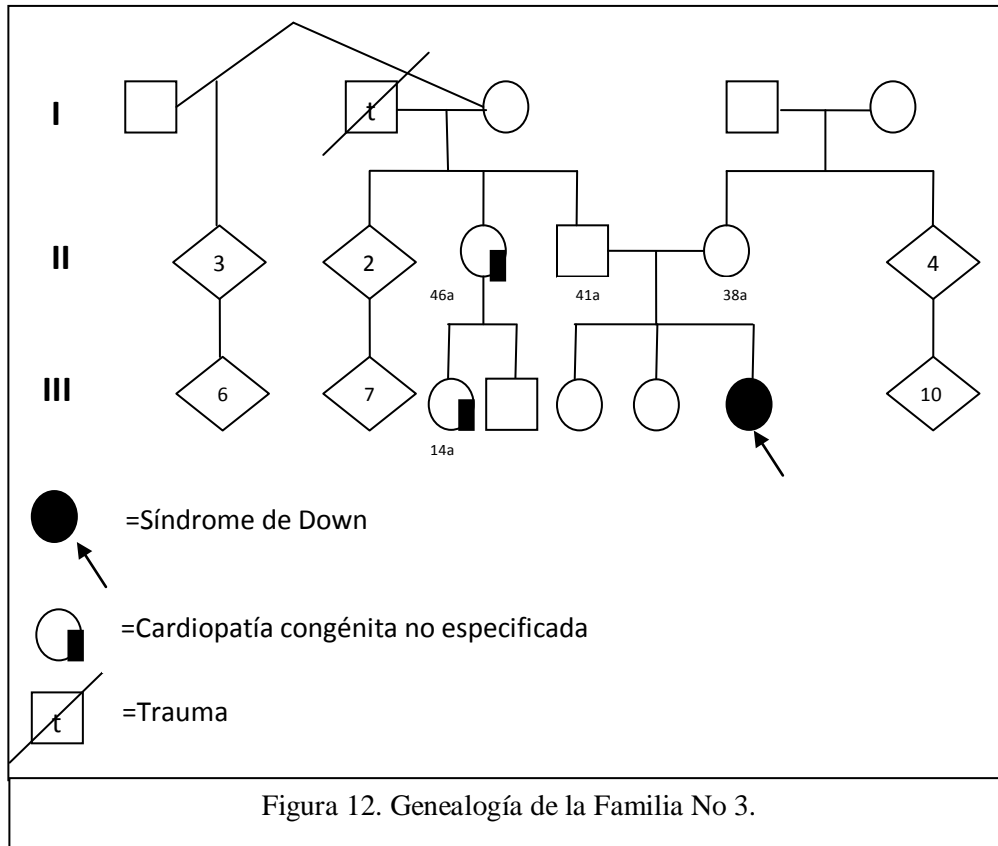
Figura 7. Distribución por edad al momento de inclusión al protocolo de la muestra de pacientes con SD y CAV

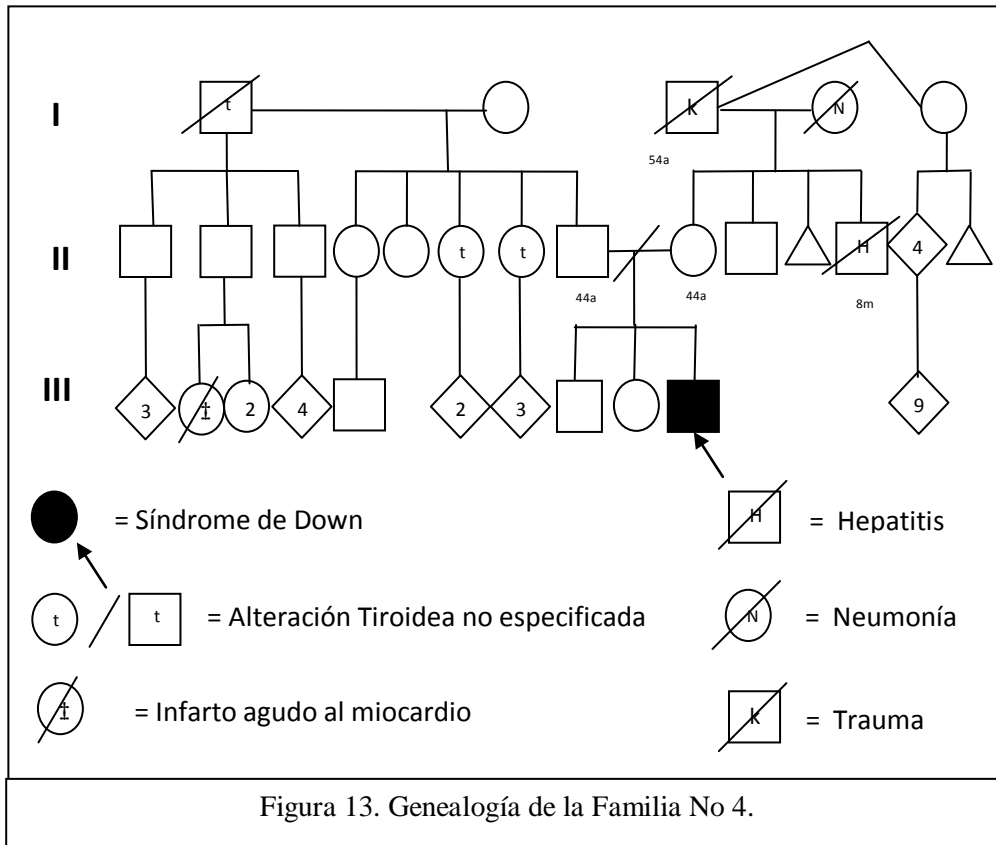
La edad materna al nacimiento oscila entre los 24 y 44 años, con un promedio de 34.2 años. En tanto, la edad paterna fluctúa entre los 26 a 44 años, con un promedio de 36.2 años (Figura 8). En cuanto al lugar de origen, la totalidad de los casos índice y sus padres son mexicanos (criterio de inclusión al protocolo). Las entidades federativas de origen de los casos índice fueron el Estado de México (3/5) y el Distrito Federal (2/5), lo cual se ilustra en la figura 9.

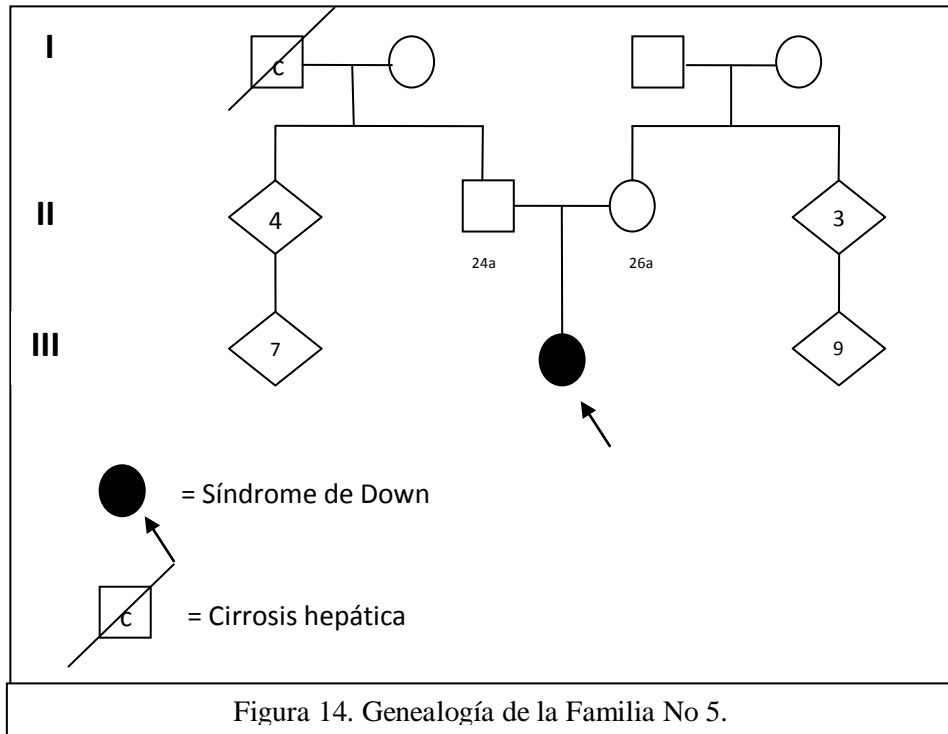


Los antecedentes familiares se recopilaron mediante la construcción de genealogías (Figura 10 a 15). Dentro de los antecedentes familiares patológicos, resalta el antecedente de cardiopatía congénita en 2/5 de las genealogías analizadas, afectando a familiares en segundo grado y tercer grado. En el caso de la Familia No 2, se trato de una prima hermana por rama materna, con diagnóstico clínico de Síndrome de Down, finada a los 4 días de vida por una cardiopatía congénita no especificada (Figura 11). En la Familia No. 3, se refiere una tía y prima hermana en rama paterna con cardiopatía congénita no especificada. No fue posible conocer el tipo de cardiopatía congénita al ser un dato desconocido por los padres del paciente, al momento de la inclusión al estudio.









Respecto al tipo de cardiopatía congénita presente en los pacientes incluidos, 5/5 presentaron CAV completo. En cuanto a su clasificación, 3/5 corresponde al tipo A de la clasificación de Rastelli, 1/5 se clasificó como Rastelli tipo B y 1/5 con clasificación de Rastelli tipo C. El resto de las características evaluadas por ecocardiograma se describen en la Tabla 6. El 100% de los pacientes presenta de forma concomitante al CAV, otros defectos cardíacos, resaltando los defectos interauriculares en 4/5 de los casos.

Tabla 6. Características cardiológicas encontradas en 5 pacientes con CAV completo			
Identificación Paciente	Cardiopatía Congénita	Defectos cardíacos asociados	Presión de la arteria pulmonar
Paciente 1.	CAV completo	CIA <i>ostium primum</i> . CIA <i>ostium secundum</i> . Dilatación de cavidades derechas. Derrame pericárdico leve.	Hipertensión pulmonar severa
Paciente 2.	CAV completo	Ninguno	Hipertensión pulmonar moderada (57 mmHg)
Paciente 3.	CAV completo	Insuficiencia tricuspídea ligera a moderada. Insuficiencia mitral ligera a moderada. Coartación de la aorta leve. CIA <i>ostium secundum</i> pequeña	Hipertensión pulmonar leve (42 mmHg)
Paciente 4.	CAV completo	CIA tipo <i>ostium secundum</i>	Hipertensión pulmonar (35 mmHg)
Paciente 5.	CAV completo	CIA <i>ostium primum</i>	Hipertensión pulmonar (35 mmHg)
CAV: Canal atrio-ventricular. CIA: comunicación interatrial.			

Los resultados del estudio molecular, evidenciaron la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en el exón 11: rs3774207, en estado heterocigoto (g.15132C>T; c.1119C>T) en todos los pacientes. El polimorfismo citado se encuentra reportado en la base de datos de SNPs del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp/>) y del Human Mutation Genome Database del Instituto Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>).


A. 90 100


B. 90 100


C.

```

10081 ggtgcattcc ccattttaac tgatttaacc cctgaaacaa cccgacgctg gaagttgggt
10141 tctcatcccc aTctacata tgtaaaaatg aagatgcaga gagatgaagc tactttccca
10201 gggctatatg gcaagcaagt cgcaaagctg ggatcccaat ccagacagtc tgaccgtgga
10261 acgagactca tacacgtaat aaatgctctg cccccaactt gtccaccaca tggccttggc
  
```

 = Secuencia del exón 11 de *CRELD1*


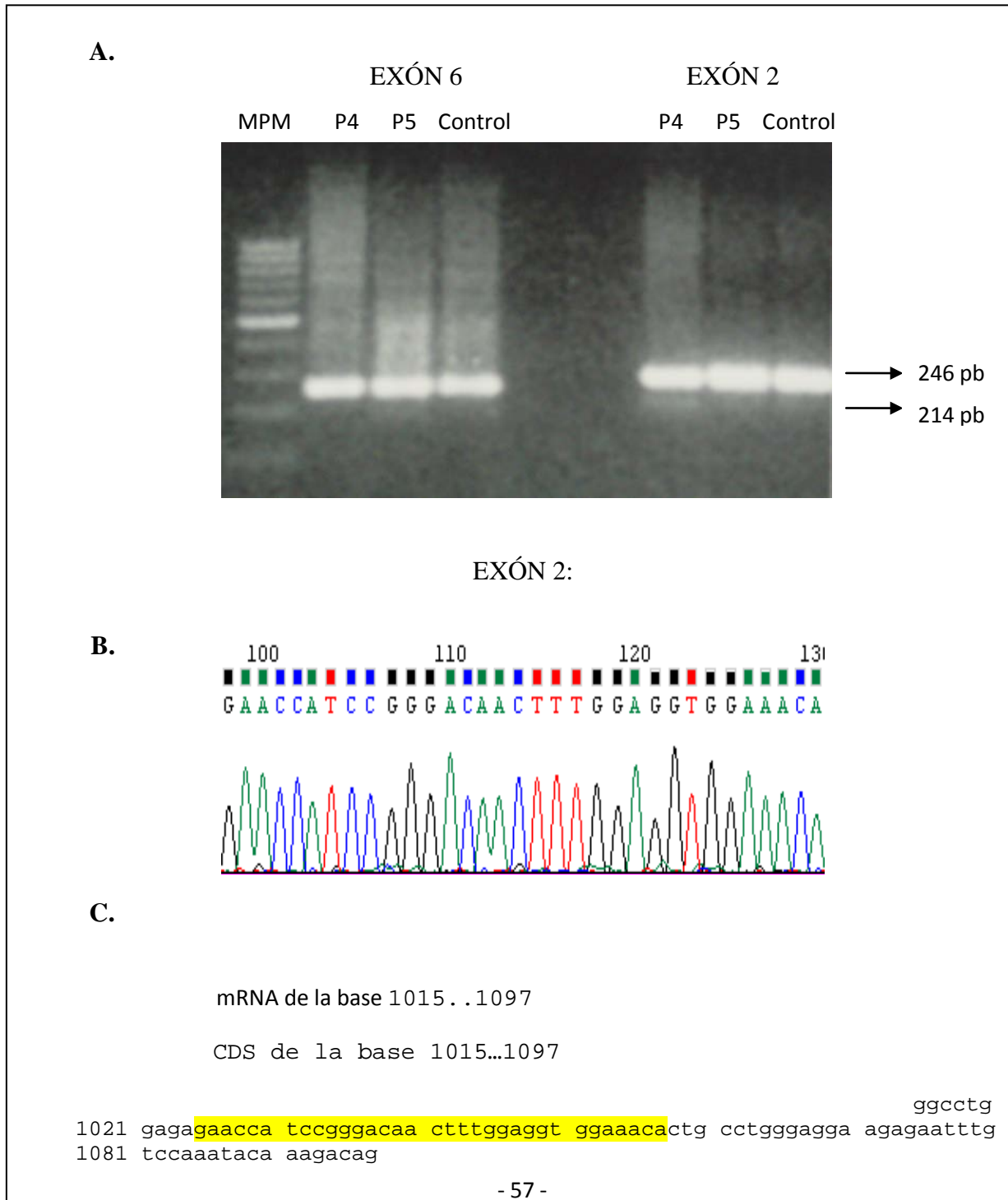
 = Citosina, presente en secuencia de referencia *CRELD1*

Figura 15. SNP rs3774207 en el exón 11 de *CRELD1*. A. Secuencia original, donde se resalta la presencia original de C –citosina-. B. Secuencia del paciente 1 (P1) como ejemplo de la presencia del polimorfismo en estado heterocigoto rs3774207 (C>T), señalado por una flecha. C. Secuencia de referencia (NG_017069.1) del exón 11.

No se encontraron cambios deletéreos (mutaciones) en la secuencia de los exones 1 al 11 del gen *CRELD1*, mediante la técnica de secuenciación automatizada en los cinco casos incluidos



Secuencia FASTA

```
GGGGA ACTCTGGGATGCAAATCTGCGTGGATTTAAGTTTCATCTTGGTCTCTTACTAGTTGTATGGCCCT  
AGGCAGGTTGCCTTTCTGTGCCTCAGTTTCCTAGTCAGTAGAACAGTGAAGTGCTAGCATGTGCCAGGCA  
CTGTACTTAGCTATTACTAATTTTCTGTTTCCAGGGCCTGGAGA GAACCATCCGGGACAAC TTTGGAGGT  
GGAAACA CTGCCTGGGAGGAAGAGAATTTGTCCAAATACAAAGACAG GTAAGGGGCTGCTGGGGGAAGGG  
GTGTATATTTCCCCTCCCCGCCAAATCTCTGCTCTGCTGGTGTAGGGCTAGGAACTCTTGGGGAGCACTTA  
TTCATTCAACAAATAGCACTGAACATCTATAGTATAGCAGTAAACAAGGCAAGCAAAATGCCCCCTTCCT  
GGAGCTCACATTCTAGTAGAGAAGACAAGCAGTGAATGAGTAAGTGAATAATATTATGTCAGATGAAGAA
```

AG: Sitio aceptor de splicing

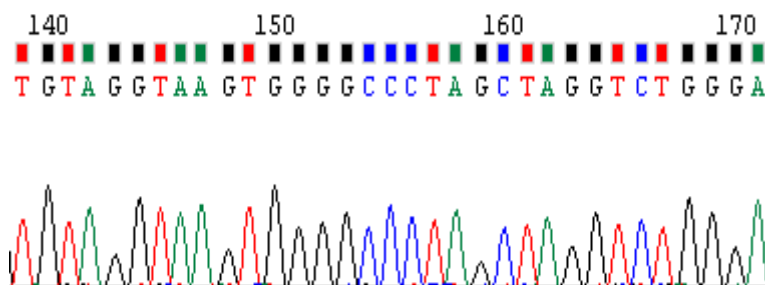
GT: Sitio donador de splicing

█: Secuencia del exón 2

▬: Fragmento de la secuencia ejemplificada en el electroferograma

D.

EXÓN 6



E.

mRNA de la base 7291..7386

CDS de la base 7291..7386

```
cttgttttgg ccctgtgcc cgatgctcag  
7321 gacctgagga atcaaactgt ttgcaatgca agaagggctg ggcctgcat cacctcaagt  
7381 gtgtag
```

Secuencia FASTA:

```
CAGTGTGAAGGAGAAGGGACACGAGGGGGCAGCGGGCACTGTGACTGCCAAGCCGGCTACGGGGGTGAGG  
CCTGTGGCCAGTGTGGCCTTTGGCTACTTTGAGGCAGAACGCAACGCCAGCCATCTGGTATGTTTCGGGTAG  
GTAGCCAAAAGGTGTGGCACTGGGCAGGGCAGATGGGGCACCTGCCTGCCCATCCTCATGCTGCCCCCA  
TTCCACCCAGCTTGTTTTGGCCCTGTGCCCGATGCTCAGGACCTGAGGAATCAAAC TTTGCAATGCA  
AGAAGGGCTGGGCCCTGCATCACCTCAAGTGTGTAGGTAAGTGGGGCCCTAGCTAGGTCTGGGAAGATGG  
TCAGGGGCTGGGCTTGGTCCTTTATTTCTCTCAACACAAGCCTGGGCTAGACTAGCCTAGTCTCCACCTT  
CATGGAGATCTCAACCTGGCTGGGAAGGCAGAAAAGTAACCAGATACTTACAGTCCAGTACACAGGTACT  
GTGTAGTATAGTCCCTGTGTACAGTGAGAGATGCCTCTGATCTAGTTTCAGTGGAAAGTGGTGTATGGGAAT
```

AG: Sitio aceptor de splicing
GT: Sitio donador de splicing
■: Secuencia del exón 6
▬: Fragmento de la secuencia ejemplificada en el electroferograma, mostrando los bordes intrón-exón incluidos en la secuenciación.

Figura 16. Ejemplo del análisis realizado en el estudio molecular de *CRELD1*, donde no se encontraron cambios deletéreos (mutaciones). **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 3%, donde se muestra la amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los exones 2 y 6, en dos de los pacientes estudiados (Paciente 4 -P4- y 5 -P5-); las flechas indican el tamaño esperado de los productos de PCR para el exón 2 de 246 pares de bases y para el exón 6 de 214 pares de bases. **B.** Fragmento del electroferograma del exón 2 (P4). **C.** Secuencia de referencia del exón 2 (NG_017069.1), resaltando la comparación con la secuencia del electroferograma correspondiente. **D.** Fragmento del electroferograma de la secuenciación del exón 6 (P6). **E.** Secuencia de referencia del exón 6 (NG_017069.1), resaltando la comparación con la secuencia del electroferograma correspondiente y ejemplificando la inclusión de los bordes exón-intrón en el análisis de la secuencia.

11. DISCUSIÓN

El Síndrome de Down (SD) es la aneuploidía más frecuente en recién nacidos vivos (RNV) en el ser humano, con una frecuencia de 1 en 700 RNV²³. El conocimiento de los mecanismos biológicos y fisiopatológicos implicados en su origen e historia natural repercutirá en las opciones terapéuticas y de seguimiento que han de brindarse a los pacientes con esta cromosomopatía. Lo anterior constituye un claro ejemplo de la medicina traslacional como vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica.

El presente trabajo de tesis tuvo como principal objetivo caracterizar las mutaciones y polimorfismos en el gen *CRELD1* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y cardiopatía congénita del tipo canal atrio-ventricular (completo e incompleto).

El SD es la principal causa genética de cardiopatía congénita (CHD) y en particular, de canal atrioventricular⁵⁰. Las cardiopatías congénitas constituyen la principal causa de mortalidad durante los primeros dos años de vida en los pacientes con SD⁴⁰. El estudio de los mecanismos

etiológicos adyacentes a la cardiopatía presente en estos pacientes, implica un acercamiento al entendimiento del efecto del cromosoma 21 adicional sobre la embriología cardíaca. Se ha propuesto la existencia de genes en el cromosoma 21⁶⁸, directamente relacionados en la morfogénesis cardíaca. Para identificar las regiones genómicas que contienen genes críticos asociados al fenotipo de SD, diversos grupos de investigación han examinado trisomías segmentarias en humanos, con el fin de crear mapas genómicos que permitan delimitar la región crítica para presentar defectos cardíacos⁶⁹. Sin embargo, algunos de los pacientes con trisomías segmentarias tienen anomalías cromosómicas adicionales, que complican la interpretación de la correlación fenotipo-genotipo. Por lo tanto, el esfuerzo por identificar este conjunto de genes se ha concentrado en el uso de modelos murinos (por ejemplo: TS65Dn y TC1), mediante los cuales se ha podido delimitar una región crítica de 5.43 Mb, con 52 genes candidatos⁷⁰, sin que alguno de ellos se haya identificado contundentemente como directamente relacionado a la cardiopatía congénita en el SD⁷¹.

El mecanismo propuesto en la génesis de los defectos cardíacos en los pacientes con SD tiene como fundamento el efecto de dosis de la copia adicional condicionada por la trisomía 21⁷². Sin embargo, se conocen otros genes que brindan susceptibilidad a pacientes sin cromosopatías y con cardiopatía congénita aislada que también podrían intervenir en la presencia de cardiopatías en SD⁷³. Por lo anterior, el modelo de herencia multifactorial parecería ser una explicación plausible para los pacientes con alteraciones cardíacas y SD⁷⁴. El hecho de que el 40 al 60% de los pacientes con SD, independientemente del mecanismo que generó su fenotipo, presenten cardiopatía congénita y no el 100%, refuerza la parcialidad de los factores genéticos que influyen en su presentación⁷¹.

Dentro de los genes identificados hasta el momento en el desarrollo de corazón fetal, se encuentran un grupo de factores de transcripción altamente conservados que incluye a *NKX2.5*, *TBX5*, *GATA4*, *TBX1*, *CRELD1*, *ZIC3*, *TFAP2B* y *FOG2*, entre otros⁷³.

El estudio de los factores ambientales que intervienen en las CHD en los pacientes con SD se ha centrado en la influencia de los factores parentales, en específico, los factores maternos que influyen en el metabolismo de los folatos⁷⁵. La premisa surge de la acción terapéutica de brindar ácido fólico preconcepcional y periconcepcional con el fin de disminuir la incidencia de malformaciones, entre ellas, las cardíacas⁷⁵. La respuesta a la intervención con ácido fólico esta directamente influida por las variantes genotípicas en distintas enzimas del metabolismo de los folatos, resaltando la metilentetrahidrofolatoreductasa (*MTHFR*), enzima crucial en dicha vía metabólica. Los polimorfismos en *MTHFR* mejor estudiados son C677T y A1298C, cuya presencia modifica la actividad de *MTHFR* y son reconocidos como factores de riesgo en las CHD aisladas no asociadas a síndromes⁷⁶. Recientemente, se señalaron ambos polimorfismos como factor de riesgo para defectos congénitos cardíacos en pacientes con SD⁷⁷.

Otras características que apoyan el componente multifactorial de las CHD en SD, son las diferencias en la presentación clínica de CHD en distintas poblaciones. Diversos estudios epidemiológicos han permitido distinguir un patrón diferencial en la distribución del tipo CDH entre caucásicos y latinoamericanos. Los pacientes caucásicos tienen una clara predominancia por los defectos del canal atrioventricular^{41,43}, lo cual no es evidenciado en las poblaciones latinoamericanas, por lo menos en México y Guatemala, donde su frecuencia es muy baja. En cambio, la presencia de otras CHD predomina en latinoamericanos, como la persistencia del conducto arterioso (PCA) y los defectos septales, tanto ventriculares como atriales⁴⁵⁻⁴⁷.

Dentro de las opciones para explicar la diferencia en presentación de las cardiopatías congénitas entre las poblaciones caucásicas y latinoamericanas, resaltan la diversidad genotípica. Distintos proyectos internacionales como el Proyecto del Genoma Humano (PGH) y el Proyecto de Mapeo de Haplotipos (HapMap) nos han permitido conocer más las diferentes frecuencias de algunas variantes a nivel genómico las cuales determinan las características fenotípicas que distinguen a los diversos grupos humanos⁷⁸.

Es así que el gen *CRELD1* se considera relevante en la génesis de defectos de canal atrioventricular (CAV) aislados no asociados a entidades sindromáticas⁶⁰⁻⁶⁴ como en los pacientes con SD⁶⁵⁻⁶⁶. Este gen, al codificar para una proteína con función en la adhesión celular, interviene en la unión y comunicación intercelular así como en la migración celular, necesaria en la morfogénesis cardíaca, en específico de las almohadillas cardíacas^{55,56,59}. Al tener una mutación que impacte en la estructura ó función de la proteína, esta no podría actuar en la forma esperada lo que repercutiría en la embriogénesis cardíaca⁶⁰⁻⁶⁶.

De acuerdo a la información detallada en los dos estudios existentes (Maslen et al., 2006; Guo et al., 2010) que asocian mutaciones en *CRELD1* y defectos de CAV en pacientes con SD se obtiene que la incidencia de mutaciones en *CRELD1* en pacientes con SD y CAV es del 4.8% (3/63), sin embargo, en el presente estudio no se identificó un cambio deletéreo en el gen *CRELD1* al realizar el análisis de secuenciación de los 11 exones, en los cinco pacientes incluidos, lo cual puede ser explicado por el tamaño pequeño de la muestra analizada. El contar con sólo cinco casos se debe al hecho de que en la población con SD que acude a nuestro Instituto y como previamente se ha reportado, es más común que presenten defectos septales y

no CAV, por lo que la identificación de casos con SD y CAV es difícil por su muy baja frecuencia⁴⁵.

En los cinco casos estudiados en este trabajo se identificó un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), previamente reportado en las bases internacionales correspondientes (Base de datos de SNPs del NCBI -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/snp/>- y del Human Mutation Genome Database del Instituto Cardiff -<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>-). El SNP rs3774207 (g.15132C>T; c.1119C>T) encontrado en el exón 11, corresponde a una variante sinónima en estado heterocitogo de la isoforma 1 de *CRELD1*, en donde el cambio de una citosina (C) por una timina (T), no repercute a nivel proteico (p.His373His) al continuar codificando para una histidina (CAC-CAT)⁷⁹.

Hasta la fecha, se han reportado 23 SNPs en *CRELD1*, 11 de los cuales se encuentran referidos en la Base de Datos de SNPs del NCBI ⁷⁹ (Tabla 7.). En dicha base, 7 de los SNPs reportados son no sinónimos (6 de sentido erróneo y 1 sin sentido), mientras los 4 restantes son sinónimos (3 codificantes; 1 ubicado en el marco de lectura).

Tabla 7. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), reportados en el gen *CRELD1*⁷⁹

Identificación del SNP	Función	Posición del Nucleótido y Cambio	Cambio de Aminoácido	Frecuencia Alélica		Población
				Alelo Mayor	Alelo Menor	
rs279552	No sinónimo (sentido erróneo)	c.37G>A	V13M	G= 0.991	A= 0.009	HapMap. Ceu (n=226)
rs2302787	No sinónimo (sentido erróneo)	c.383C>G	P128R	C= 0.962	G= 0.038	752 japoneses sanos
rs115049151	No sinónimo (sin sentido)	c.407C>G	S136X	C= 0.995	G= 0.005	Proyecto 1000 genomas
rs34832990	Sinónimo (en marco de lectura)	c.870_871insA	K290K	ND	ND	ND
rs116780838	No sinónimo (sentido erróneo)	c.910C>G	L304V	C= 0.995	G= 0.005	Proyecto 1000 genomas
rs79223485	Sinónimo (secuencia codificante)	c.912C>T	L304L	C= 0.870	T= 0.130	Preliminar Proyecto 1000 genomas (n=216)
rs76764016	Sinónimo (secuencia codificante)	c.945G>A	P315P	G= 0.983	A= 0.017	Preliminar Proyecto 1000 genomas (n=176)
rs3774207	Sinónimo (secuencia)	c.1119C>T	H373H	C= 0.748	T= 0.252	HapMap-Ceu

	codificante)			0.744	0.256	(n=226) Hap Map- Jpt (n=172)
				0.801	0.199	HapMap. Yri (226)
				0.590	0.410	HapMap- Mex (n=100)
rs73118372	No sinónimo (sentido erróneo)	c.1136T>C	M379T	T= 0.720	C= 0.280	Preliminar Proyecto 1000 genomas (n=118)
rs41276501	No sinónimo (sentido erróneo)	c.1213C>G	Q405E	ND	ND	ND
rs113304197	No sinónimo (sentido erróneo)	c.1255T>C	S419P	T= 0.500	C= 0.500	Población Bantu, Sudáfrica (n=2)
HapMap-Ceu: Proyecto de Mapeo de Haplotipos en población caucásica. HapMap-Jpt: Proyecto de Mapeo de Haplotipos en población de origen japones. HapMap-Yri: Proyecto de Mapeo de Haplotipos en población africana. HapMap-Mex: Proyecto de Mapeo de Haplotipos en población de origen mexicano residente en Los Angeles, Estados Unidos. ND: Información no disponible.						

Los 12 SNPs restantes se han reportado en estudios de *CRELD1* y CHD congénitas sindromáticas y no sindromáticas⁶⁰⁻⁶⁶ (Tabla 8.) Tres polimorfismos (V13M; P315P y H373H) se encontraban previamente reportados en las Bases Internacionales⁷⁹.

Tabla 8. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), reportados en el gen <i>CRELD1</i> en estudios previos de pacientes con CDH sindrómicas y no sindrómicas ⁶⁰⁻⁶⁶					
Estudio	Tipo de defecto	Posición del nucleótido y cambio	Posición del Exón	Cambio del aminoácido	No. de sujetos con el cambio de nucleótido
Robinson et al., 2003 Casos (50)/Controles (200)	CAV parcial y heterotaxia	c.320G>A	Exón 3	R107H	1/11
	CAV parcial (CIA ostium primun)	c.932C>T	Exón 9	T311I	2/22
	CAV parcial (CIA ostium primun)	c.985C>T	Exón 9	R329C	2/22
Zatyka et al., 2005 Casos (49)/Controles (200)	CAV completo	c.484C>G	Exón 5	P162A	1/492*
	CAV parcial	c.945G>A	Exón 9	P315P	1/49
	CAV	c.1194G>A	Exón 10	A398A	1/49
Maslen et al., 2006 Casos(39)/Controles (400)	CAV parcial, CIA <i>ostium secundum</i> , PCA, regurgitación tricúspidea	c.985C>T	Exón 9	R329C	1/39
	CAV completo	c.1240G>A	Exón 9	E414K	1/39
Posch et al., 2008 Casos (205)/Controles (600)	CIA	c.-103G>T	5'UTR		1/205
	CIA(10)/CIV/PCA(1)	c.37G>A	Exón 1	V13M	11/205
	CIA	c.1217T>C	Exón 5	F200F	1/205
	CIA	c.1628G>A	Exón 9	K336K	1/205

	CIA (9)	c.1721G>A	Exón 10	Q368Q	9/205
Guo Y et al., 2010 Casos (133)/ Controles (200)	CAV-ND	c.383C>G	Exón 4	P128R	18/133
	CAV-ND	c.1119C>T	Exón 11	H373H	39/133
Kusuma L et al., 2011 Casos(100)/ Controles(50)	CIV	c.985C>T	Exón 9	R329C	1/100
	HPP	c.985C>T	Exón 9	R329C	1/100
CAV: Canal atrioventricular; CIA: comunicación interauricular; CIV: comunicación interventricular; PCA: persistencia del conducto arterioso; ND: no se dispone de información para detallar el tipo de CAV. HPP: Hipertensión pulmonar persistente. *El polimorfismo se busco intencionadamente en 492 controles adicionales.					

En específico, el polimorfismo rs3774207 (c.1119C>T) se había reportado previamente por Guo Y y cols.⁶⁵ en una muestra de 133 pacientes de origen chino con CAV, 24 con diagnóstico clínico de síndrome de Down. Se refiere una frecuencia del SNP de 39:133 (29%) en los casos, mientras los controles presentaron una frecuencia de 41:200 (20.5%), sin que se describa si había significancia estadística entre los dos grupos en frecuencias así como mas datos para correlacionar la presencia del SPN con algún tipo de CAV en particular (parcial ó completo; aislado ó sindromático; asociado a otras cardiopatías, etc.) ó algún otro antecedente clínico.

De acuerdo a lo reportado en la base de datos internacional de SNPs⁷⁹, el SNP rs3774207 (H373H) ha sido genotificado dentro del HapMap⁷⁸ en distintas poblaciones (caucásicos, asiáticos, africanos y mexicanos). La frecuencia del polimorfismo en las poblaciones de origen caucásico, asiático y africano, se encuentra en relación a lo reportado en el estudio de Guo Y y cols.⁶⁵, con un promedio del 23.5%, mientras que en la población de origen mexicano residente

en Estados Unidos de Norteamérica (n=100) la frecuencia del alelo T fue del 41% (Tabla 7), esta frecuencia puede explicar porque en este estudio los cinco pacientes, considerados mexicanos, presentaron el polimorfismo.

El hecho de ser una variante sinónima (H373H), en una de las isoformas de *CRELD1*, hace poco probable que tenga un impacto sobre la estructura y funcionalidad de la proteína de adhesión celular involucrada en la formación de las almohadillas cardíacas⁵⁹.

En cuanto a los antecedentes clínicos en los pacientes incluidos en esta muestra, sobresale la existencia de antecedentes familiares de CDH en 2/5 de las genealogías analizadas en este estudio, en familiares en 2° ó 3er grado de parentesco, lo anterior apoyaría en estas familias que la CDH se presenta acorde al modelo de la herencia multifactorial.

El número reducido de pacientes presentados en este estudio, limita la formulación de conclusiones ya que se trata de una muestra de una población de pacientes con SD y CAV parte de un proyecto en el que se pretende incluir un mayor número de casos. Sin embargo es importante resaltar que el hallazgo de un SNP (rs3774207) en *CRELD1* resulta relevante ya que no se dispone de información de su frecuencia en la población mexicana y aporta un antecedente directo para el estudio de las CDH y en particular, en las CDH en los pacientes con SD.

Por lo tanto, la evidencia actual permite inferir la participación de *CRELD1* dentro del modelo de herencia multifactorial para CDH y en específico, para CAV. El presente trabajo, aunque no permite brindar mayor evidencia para conocer su impacto como factor de riesgo, reporta la presencia del SNP rs3774207 en 5 pacientes con SD por trisomía 21 regular y CAV completo, polimorfismo conocido en la base de datos internacional, pero sin reporte previo en la población mexicana. Resulta fundamental ampliar la información preliminar obtenida, lo cual se

continuará como parte del Protocolo “Caracterización de mutaciones y polimorfismos en los genes *CRELD1*, *NKX2.5* y *GATA4* en una muestra de pacientes mexicanos con síndrome de Down y defectos de septación cardíaca”, para acrecentar el conocimiento y futuras aplicaciones del mismo en pacientes con CDH, sindrómica ó no sindrómica.

12. ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS POBLACIÓN OBJETIVO Y PADRES:

I. Datos Generales.

1. Nombre del Paciente: _____ 2. Exp. INP _____

3. Num. de Registro Interno para muestra de DNA: _____

4. Nombre de la madre: _____

5. Num. de Registro Interno para muestra de DNA: _____

6. Nombre del padre: _____

7. Num. de Registro Interno para muestra de DNA: _____

* Telefono de contacto madre/padre: _____

*Dirección: _____

8. Edad del padre y la madre al nacimiento del caso índice (en años):

Padre _____ (años) Madre _____ (años)

9. Sexo del paciente: 1.M 2.F

10. Edad actual _____ (años)

11. Resultado del cariotipo (fórmula) _____

12. Lugar de origen:

Caso índice _____ Madre _____ Padre _____

Abuelo Materno _____ Abuela Materna _____

Abuelo Paterno _____ Abuela Paterna _____

II. Antecedentes familiares y árbol genealógico.

Indicar familiares con malformaciones congénitas y/o cardiopatías congénitas:

III. Tipo de cardiopatía documentada por valoración cardiológica con ecocardiograma bidimensional, transtorácico, bidimensional en tiempo real.

1) si = presente, 0) no = ausente.

13. Defecto septal interventricular (VSD) o
- comunicación interventricular (CIV) membranoso o perimembranoso:
14. Defecto septal interauricular (ASD) o
- comunicación interauricular (CIA) tipo *ostium secundum*:
15. Canal atrio-ventricular completo:
16. Canal atrio-ventricular parcial:
17. Hipertensión arteria pulmonar 0=ausente 1=presente
18. Presión de la arteria pulmonar (en mmHg): _____
17. Persistencia de conducto arterioso permeable o PCA:
18. Otras cardiopatías congénitas:
- Tipo _____
19. Sin cardiopatía congénita:
20. Presencia de otras dismorfias mayores: Tipo: _____

21. GRUPO DE ESTUDIO (I, II o III): _____

V. Genotipos (a nivel de c.DNA y proteína):

Del paciente con DS:

. Gen *CRELD1*: Mutación:_____ Genotipo:_____
Polimorfismo:_____

Del padre:

. Gen *CRELD1*: Mutación:_____ Genotipo:_____
Polimorfismo:_____

De la madre:

. Gen *CRELD1*: Mutación:_____ Genotipo:_____
Polimorfismo:_____

ANEXO 2

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. POBLACIÓN OBJETIVO: CARIOTIPO.

México, D. F., a ___ de _____ de 20___.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo de que a mi hijo(a) _____ se le realice la prueba de cariotipo en linfocitos de sangre periférica; prueba que fungirá como parte de la evaluación médica de mi hijo (a) en este Instituto y para determinar si mi hijo (a) cumple con los requisitos para participar de manera voluntaria y siempre y cuando yo lo autorice por escrito, en el proyecto de Investigación “CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del cariotipo, se requiere de una muestra de sangre periférica de 3-5 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes. Así mismo, en caso de que mi hijo tenga un resultado de trisomía 21 regular en el estudio de cariotipo, estaré en posibilidad de aceptar su inclusión al proyecto, mediante la autorización por escrito de una segunda carta de consentimiento informado para obtener de mi hijo (a) una segunda toma de sangre periférica bajo las mismas condiciones antes descritas, con la finalidad de obtener el material genético (ADN) a utilizarse con fines exclusivamente destinados al desarrollo del trabajo de investigación. Además, entiendo que la participación de mi hija(o) es total y absolutamente voluntaria, y que puede abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo en cualquier servicio de la Institución.

De igual forma, me han informado que independiente de que quiera participar en el proyecto y con base a los resultados del cariotipo, recibiré asesoramiento genético por parte de las Dras. Ariadna Estela González del Angel (tel. 10 84 09 00 ext. 1306) y Rosa María Álvarez

Gómez, donde se me explique el riesgo de recurrencia del síndrome de Down en mi familia, además de que ninguno de los estudios que se le realicen a mi hijo (a) tendrán costo para mí.

Se me ha indicado que toda información derivada del análisis citogenético y molecular de mi hijo (a) en este estudio, es absolutamente confidencial y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hija(o) participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica y además es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución.

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

Investigador responsable: Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Alberto Olaya Vargas. Servicio de Oncología Pediátrica,
Tel. 10 84 09 00 ext. 1342 o 1343.

ANEXO 2A

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. POBLACIÓN OBJETIVO: OBTENCIÓN DE DNA.

México, D. F., a ____ de _____ de 20____.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo(a) _____ participe en el proyecto “CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere y una muestra de sangre periférica de 3-5 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (ADN) de mi hijo (a) el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en un mayor o menor riesgo de presentar malformaciones cardíacas asociadas al padecimiento de base de mi hijo (síndrome de Down por trisomía 21 regular). Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer mejor las causas genéticas que contribuyen a nacer con esta malformación frecuentemente encontrada en pacientes mexicanos con síndrome de Down.

Entiendo que los datos personales de mi hijo (a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA de mi hijo (a) quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de la trisomía 21 y las malformaciones congénitas presentes en este síndrome hasta que mi hijo (a) cumpla la mayoría de edad y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Se me ha

asegurado que toda información derivada del análisis de la muestra de DNA de mi hijo (a) para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al desarrollo del trabajo de investigación. Además, en el entendido que la participación de mi hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, podemos abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo (a) participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre	Fecha
--------	-------

Investigador responsable: Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Alberto Olaya Vargas. Servicio de Oncología Pediátrica, Tel. 10 84 09 00 ext. 1342 o 1343.

ANEXO 3.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. PADRES DE LOS PACIENTES DE LA POBLACIÓN OBJETIVO.

México, D. F., a ____ de _____ de 20 ____

Por medio de la presente, yo _____, padre (madre) de _____ hago constar que estoy de acuerdo en participar en el proyecto “CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere de 3 a 5 ml. de sangre periférica, la cual será obtenida por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá mi material genético (DNA) el cual determina mis características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en un mayor o menor riesgo de presentar malformaciones cardiacas asociadas al síndrome de Down por trisomía 21 regular. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer mejor las causas genéticas que contribuyen a nacer con esta malformación frecuentemente encontrada en los pacientes mexicanos con síndrome de Down y que dicho estudio posiblemente podría ayudar a prevenir la ocurrencia de una malformación cardiaca en otro miembro de mi familia. Se me ha explicado que los resultados del estudio genético se me explicarán a través de un asesoramiento genético por parte de las Dras. Ariadna Estela González del Angel (tel. 10 84 09 00 ext. 1306) y Rosa María Álvarez Gómez, donde se me explique el riesgo de recurrencia del síndrome de Down y/o una cardiopatía congénita en otro miembro de mi familia. También se me ha explicado que ninguno de los estudios que se me realicen tendrán un costo para mí,

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y éstos no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo,

autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi persona recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado también que mi muestra de DNA quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y los datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de la trisomía 21 y las malformaciones congénitas presentes en este síndrome, siempre y cuando se preserve la confidencialidad de la información derivada. Se me ha asegurado que toda información derivada del análisis de mi muestra de DNA para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al desarrollo del trabajo de investigación. Además, en el entendido que mi participación es total y absolutamente voluntaria, puedo abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este proyecto de investigación. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el consentimiento: _____	_____	_____
	Nombre	Fecha

Investigador responsable: Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Alberto Olaya Vargas. Servicio de Oncología Pediátrica, Tel. 10 84 09 00 ext. 1342 o 1343.

ANEXO 4.

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. GRUPO NIÑOS SANOS.

México, D. F., a ___ de _____ de 20____

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo(a) _____ participe en el proyecto “CARACTERIZACIÓN DE MUTACIONES Y POLIMORFISMOS EN LOS GENES *CRELD1*, *NKX2.5* Y *GATA4* EN UNA MUESTRA DE PACIENTES MEXICANOS CON SÍNDROME DE DOWN Y DEFECTOS DE SEPTACIÓN CARDIACA”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Pediatría. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere de un raspado de mucosa bucal tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá el material genético (DNA) de mi hijo(a) el cual determina sus características físicas y de éste se analizarán regiones que pueden estar implicadas en un mayor o menor riesgo de presentar malformaciones cardíacas asociadas al síndrome de Down por trisomía 21 regular. Se me ha explicado, que el presente estudio busca conocer mejor las causas genéticas que contribuyen a nacer con esta malformación frecuentemente encontrada en los pacientes mexicanos con síndrome de Down.

Entiendo que los datos personales de mi hijo (a) en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no será compartida con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente Proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa de mi hijo (a) recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de DNA de mi hijo (a) quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Pediatría, de la Secretaría de Salud por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio de la trisomía 21 y las malformaciones congénitas presentes en este síndrome hasta que mi hijo (a) cumpla la mayoría de edad y preservando siempre la confidencialidad de la información derivada. Se me ha asegurado que toda información derivada del análisis de la muestra de DNA de mi hijo (a) para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al desarrollo

del trabajo de investigación. Además, en el entendido que la participación de mi hijo (a) es total y absolutamente voluntaria, podemos abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención de mi hijo (a) en cualquier servicio de la Institución.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo (a) participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseamos no participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo (a) dentro de la Institución y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente,

_____	_____	_____
Padre, Madre o tutor	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
_____	_____	_____
Nombre Testigo	Dirección	Fecha y Firma
Obtuvo el consentimiento: _____	_____	_____
	Nombre	Fecha

Investigador responsable: Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza. Laboratorio de Biología Molecular, 9º Piso de la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Pediatría, S.S. Tel. 10840900 ext. 1306.

Presidente del Comité de Ética: Dr. Alberto Olaya Vargas. Servicio de Oncología Pediátrica, Tel. 10 84 09 00 ext. 1342 o 1343.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neri G, Opitz JM. Down syndrome: Comments and reflections on the 50th anniversary of Lejeune's discovery. *Am J Med Genet Part A* 2009; 149A:2647–2654.
2. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision (2007), consultado en The World Health Organization (WHO) <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>
3. Richard F, Dutrillaux B. Origin of human chromosome 21 and its consequences: a 50-million-year-old story. *Chromosome Res* 1998; 6(4):263-268.
4. López Morales PM, López Pérez R, Parés Vidrio G, Borges Yáñez S, Valdespino Echaury L. Reseña histórica del Síndrome de Down. *ADM* 2000; LVII (5): 193-199.
5. Martínez-Frías ML. The real earliest historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2005; 132A:231-238.
6. Ward OC. Further early historical evidence of Down syndrome. *Am J Med Genet Part A* 2004; 126A:220-231.
7. Down JLH. Observations on an ethnic classification of idiots. *London Hosp Rep* 1866; 3:259-262.
8. Megabarne A, Ravel A, Mircher C, Sturtz F, Grattau Y, Rethoré MO, Delabar JM, Mobley WC. The 50th anniversary of the discovery of trisomy 21: The past, present and future of research and treatment of Down syndrome. *Genet Med* 2009;11(9):611-6
9. Allen G. Aetiology of Down's syndrome inferred by Waardenburg in 1932. *Nature* 1974; 250:436–437.
10. McKinlar RJ, Sutherland GR. Chromosome abnormalities and genetic counseling. Oxford University Press. New York, 2004.
11. Lejeune J, Turpin R, Gautier M. Le mongolisme, maladie chromosomique. *Bull Acad Natl Med* 1959;143:256–265.
12. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children. *C R Hebd Seances Acad Sci.* 1959;248(11):1721-1722.
13. Zellweger H. Mongolismus–Down's syndrome. *Erg inn Med Kinderhkl NF* 1965; 22:268–363.

14. McCormick MK, Schinzel A, Petersen MB, et al. Molecular genetic approach to the characterization of the “Down syndrome region” of chromosome 21. *Genomics* 1989; 5:325–331.
15. Glasson EJ, Sullivan SG, Hussain R, Petterson BA, Montgomery PD, Bittles AH. The changing survival profile of people with Down’s syndrome: implications for genetic counselling. *Clin Genet* 2002; 62: 390–393.
16. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine* 7th edition. Saunders. Philadelphia, 2007.
17. Hattori M, Fujiyama A, Taylor TD, Watanabe H, Yada T, Park HS, Toyoda A, Ishii K, Totoki K, Choi DK, Soeda E, Ohki M, Takagi T, Sakaki Y, Taudien S, Blechschmidt K, Polley A, Menzel U, Delabar J, Kumpf K, Lehmann R, Patterson D, Reichwald K, Rump A, Shillnabel M, Schudy A, Zimmermann W, Rosenthal A, Kudoh , Shibuya K, Kawasaki K, Asakawa S, Shintani A, Sasaki T, Nagamine K, Mitsuyama S, Antonakaris SE, Minoshima S. The DNA sequence of human chromosome 21. *Nature* 2000; 405: 6784. 311-319
18. National Center of Biotechnology Information (NCBI): Genome of chromosome 21: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=chromosome%2021>
19. Gardiner K, Costa AC. The proteins of human chromosome21. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142C: 196–205.
20. Sommer CA, Henrique-Silva F. Trisomy 21 and Down syndrome-a short review. *Braz J Biol* 2008; 68(2): 447-452.
21. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VLJ, Fisher E. Down syndrome- recent progress and future prospects. *Hum Mol Genet* 2009; 18 (1): 75-83.
22. Chakrabarti L Best TK, Cramer NP, Carney RS, Isaac JT, Galdzicki Z, Haydar TF. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat Neurosci* 2010; 13: 927–934
23. Canfield MA, Honein MA, Yuskiv N, Xing J, Mai CT, Collins JS, Devine O, Petrini J, Ramadhani TA, Hobbs CA, Kirby RS. National estimates and race/ethnic-specific variation of selected birth defects in the United States, 1999–2001. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2006; 76:747–756.
24. Irving C, Basu A, Richmond S, Burn J, Wren C. Twenty-year trends in prevalence and survival of Down syndrome *Eur J Hum Genet* 2008;16(11):1336-40.

25. Mutchinick O, Lisker R, Babinsky V. Registro y Vigilancia Epidemiológica de Malformaciones Congénitas Externas. *Rev Med Hosp Gen Mex* 1982; 283-293
26. Valdés JM, Blanco ME, Kofman S, Mutchinick O. Defectos congénitos en el Hospital General de México. Frecuencia observada durante 10 años mediante el RYVEMCE. *Rev Med Hosp Gen Mex* 1997; 60 (4); 181-187.
27. Cocchi G, Gualdi S, Bower C, Halliday J, Jonsson B, Myrelid A, Mastroiacovo P, Amar E, Bakker MK, Correa A, Doray B, Melve KK, Koshnood B, Landau D, Mutchinick OM, Pierini A, Ritvanen A, Ruddock V, Scarano G, Sibbald B, Sípek A, Tenconi R, Tucker D, Annerén G. International trends of Down syndrome 1993-2004: Births in relation to maternal age and terminations of pregnancies. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2010; 88(6):474-9.
28. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology of Down syndrome. *Men Ret Dev Dis Res Rev* 2007; 13: 221-227.
29. Hultén MA, Patel S, Jonasson J, Iwarsson E. On the origin of the maternal age effect in trisomy 21 Down syndrome: the Oocyte Mosaicism Selection model. *Reproduction*. 2010; 139(1):1-9.
30. Hall B. Mongolism in newborn infants. *Clin Pediatr* 1966; 5:4.
31. Weijerman ME, Winter JP. Clinical Practice. The care of children with Down syndrome. *Eur J Pediatr* 2010; 169(12):1445-52.
32. Davidson MA. Primary care for children and adolescents with Down syndrome. *Pediatr Clin North Am* 2008; 55(5): 1099-1111.
33. Sato K, Shirakawa T, Niikuni N, Sakata H, Asanuma S. Effects of oral care in Down syndrome children with obstructive sleep apnea. *J Oral Sci* 2010; 52(1):145-7.
34. Caird MS, Wills BP, Dormans JP. Down syndrome in children: the role of the orthopaedic surgeon. *J Am Acad Orthop Surg* 2006; 14 (11): 610-9.
35. Madan V, Williams J, Lear JT. Dermatological manifestations of Down's syndrome. *Clin Exp Dermatol* 2006; 31 (5): 623-9.
36. Cohen WI. Current dilemmas in Down syndrome clinical care: celiac disease, thyroid disorders and atlanto-axial instability. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2006; 142C (3): 141-8.
37. Cassidy SB, Allanson JE. *Management of Genetic Syndromes*, 2nd edition. Wiley New York, 2005.

38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Racial differences by gestational age in neonatal deaths attributable to congenital heart defects—United States, 2003-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 24; 59 (37): 1208-11.
39. Dunvlevy L, Bennett M, Slender A, Lana-Elola E, Tybulewicz VL, Fisher E, Mohun T. Down's syndrome-like cardiac developmental defects in embryos of the transchromosomal Tc1 mouse. *Car Res* 2010; 88, 287-295.
40. Hayes C, Johnson Z, Thornton L, Fogarty J, Lyons R, O'Connor M. Ten-year survival of Down syndrome births. *Int J Epidemiol* 1997; 26:822-829.
41. Freeman SB, Taft LF, Dooley KJ, Allran K, Sherman SL, Hassold TJ et al. Population based study of congenital heart defects in Down syndrome. *Am J Med Genet* 1998; 80: 213–217.
42. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 1890–1900.
43. Castilla EE, Rittler M, Dutra MG, et al. Survival of children with Down's syndrome in South America. ECLAMC-Down's surv Group. Latin American Collaborative Study of Congenital Malformations. *Am J Med Genet* 1998; 79: 108–111
44. Jacobs EG, Leung MP, Karlberg J. Distribution of symptomatic congenital heart disease in Hong Kong. *Pediatr Cardiol* 2000; 21:148–157.
45. de Rubens Figueroa J, del Pozzo Magaña B, Pablos Hach JL, Calderón Jiménez C, Castrejón Urbina R. Heart malformations in children with Down's syndrome. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56: 894–895.
46. Vida VL, Barnoya J, Larrazabal LA, Gaitan G, Garcia FdM, Castañeda AR. Congenital cardiac disease in children with Down's syndrome in Guatemala. *Cardiol Young* 2005; 15: 286-290.
47. Vilas-Boas LT, Albernaz EP, Goncalves-Costa R. Prevalence of congenital heart defects in patients with Down syndrome in the municipality of Pelotas, Brazil. *J Pediatr (Rio J)*. 2009; 85 (5): 403-407.
48. Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003; 361:1281–1289.
49. Fudge JC, Shuang Li J, Jagers J, O'Brien SM, Peterson ED, Jacobs PJ, Welke KF, Jacobs ML, Li JS, Pasquali SK. Congenital heart surgery outcomes in Down syndrome: analysis of a national clinical database. *Pediatrics* 2010; 126 (2): 314-324.

50. Andelfinger G. Genetic factors in congenital heart malformation. *Clin Genet* 2008; 73:516-527.
51. Calabrò R, Limongelli G. Complete atrio-ventricular canal. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:8
52. Gruber PJ, Epstein JA. Development gone awry: Congenital heart disease. *Circ Res* 2004; 94:273-283.
53. Pierpont ME, Markwald RR, Lin AE. Genetics aspects of atrioventricular septal defects. *Am J Med Genet* 2000; 97: 289-296.
54. Espinola-Zavaleta N, Muñoz-Castellanos L, Kuri-Nivón M, Keirns C. Understanding atrioventricular: anatomoechocardiographic correlation. *Cardiovasc Ultrasound* 2008; 6: 33.
55. Maslen CL. Molecular genetics of atrioventricular septal defects. *Curr Opin Cardiol* 2004, 19:205-210.
56. Gelb BD. Genetics basis of congenital heart disease. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19: 110-115.
57. Bouman HG, Broekhuizen ML, Baasten AM, Gittenberger-de Groot AC, Wenink AC. Diminished growth of atrioventricular cushion tissue in stage 24 retinoic-treated chicken embryos. *Dev Dyn* 1998; 213:50-58
58. Santoro G, Ambrosio G, Formigari R, Marcelletti C, Chiariello M, Marino B: Low level of myocardial Superoxide Dismutase in patients with atrioventricular canal. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23: 306A.
59. Rupp PA, Gameil TF, Egelston CA, Reifsteck CA, Olson SB, Knosp WM, Glanville RW, Thornburg KL, Robinson SW, Maslen CL. Identification, genomic organization and mRNA expression of *CRELD1*, the founding member of a unique family of matricellular proteins. *Gene* 2002; 293: 47-57.
60. Robinson SW, Morris CD, Goldmuntz E, Reller MD, Jones MA, Steiner RD, Maslen CL. Missense mutations in *CRELD1* are associated with cardiac atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1047-1052.
61. Zatyka M, Priestley M, Ladusans EJ, Fryer AE, Mason J, Latif F, Maher ER. Analysis of *CRELD1* as a candidate 3p25 atrioventricular septal defect locus (AVSD2). *Clin Genet* 2005; 67: 526-528.

62. Sarkozy A, Esposito G, Conti E, Digilio MC, Marino B, Calabró R, Pizzuti A, Dallapiccola B. *CRELD1* and *GATA4* gene analysis in patients with nonsyndromic atrioventricular canal defects. *Am J Med Genet* 2005; 139: 236-238.
63. Garg V, Kathiriyala IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, Rothrock CR, Eapen RS, Hirayama-Yamada K, Joo K, Matsuoka R, Cohen JC, Srivastava D. *GATA4* mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with *TBX5*. *Nature* 2003; 424:443-447.
64. Posch MG, Perrot A, Schmitt K, Mittelhaus S, Esenwein E-M, Stiller B, Geier C, Dietz R, Geßner R, O'zelik C, Berger F. Mutations in *GATA4*, *NKX2.5*, *CRELD1*, and *BMP4* are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects. *Am J Med Genet Part A* 2008; 146A:251-253.
65. Guo Y, Shen J, Yuan L, Li F, Wang J, Sun K. Novel *CRELD1* gene mutations in patients with atrioventricular septal defects. *World J Pediatr* 2010; 6: 348-52.
66. Maslen CL, Babcock D, Robinson SW, Bean LJH, Dooley KJ, Willour VL, Sherman SL. *CRELD1* mutations contribute to the occurrence of cardiac atrioventricular septal defects in Down syndrome. *Am J Med Genet* 2006; 140A:2501-2505.
67. Diccionario de la Real Academia de la Lengua Española, 22ª edición, consultado en línea: www.rae.es
68. Barlow GM, Chen XN, Shi ZY, Lyons GE, Kurnit DM, Celle L, Spinner NB, Zackai E, Pettenati MJ, Van Riper AJ, Vekemans MJ, Mjaatvedt CH, Korenberg JR. Down syndrome congenital heart disease: a narrowed region and a candidate gene. *Genet Med* 2001; 3:91-101
69. Korbel JO, Tirosh-Wagner T, Urban AE, Chen XN, Kasowski M, Dai L, Grubert F, Erdman C, Gao MC, Lange K, Sobel EM, Barlow GM, Aylsworth AS, Carpenter NJ, Clark RD, Cohen MY, Doran E, Falik-Zaccai T, Lewin SO, Lott IT, McGillivray BC, Moeschler JB, Pettenati MJ, Puschel SM, Rao KW, ShaVer LG, Shohat M, Van Riper AJ, Warburton D, Weissman S, Gerstein MB, Snyder M, Korenberg JR. The genetic architecture of Down syndrome phenotypes revealed by high-resolution analysis of human segmental trisomies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:12031-12036
70. Liu C, Morishima M, Yu T, Matsui SI, Zhang L, Dawei F, Pao A, Costa AC, Gardiner KJ, Cowell JK, Nowak NJ, Parmacek MS, Liang P, Baldini A, Yu EY. Genetic analysis of Down syndrome-associated heart defects in mice. *Hum Genet* 2010
71. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Raymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and Down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 2004; 5:725-738.

72. Roper RJ, Reeves RH. Understanding the basis for Down syndrome phenotypes. *PLoS Genet* 2006; 2:e50.
73. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* 2008; 451:943–948.
74. Shapiro BL. Down syndrome – a disruption of homeostasis. *Am. J. Med. Gen* 1983;14:241-269.
75. van Beynum IM, Kapusta L, Bakker MK, et al. Protective effect of periconceptual folic acid supplements on the risk of congenital heart defect: a registry-based case-control study in the northern Netherlands. *Eur. Heart J* 2010; 31:464-471.
76. Hobbs CA, James SJ, Parsian A, et al. Congenital heart defects and genetic variants in the methylenetetrahydrofolate reductase. *J Med Genet* 2006; 43:162-166.
77. Bozovic IB, Vranekovic J, Cizmarevic NS, Mahulja-Stamenkovic V, Prpic I, Brajenovic-Milic B. *MTHFR* C677T and A1298C polymorphisms as a risk factor for congenital heart defects in Down syndrome. *Pediatr Int* 2010 [Epub ahead of print]
78. Musunuru K, Kathiresan S. HapMap and mapping genes for cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2008; 1: 66-71.
79. NCBI: Database of Single-Nucleotide Polymorphism (Short Genetic Variations) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=rs3774207>
80. Kusuma L, Dinesh SM, Savitha MR, Krishnamurthy B, Narayanappa D, Ramachandra NB. A maiden report on *CRELD1* single-nucleotide polymorphism association in congenital heart disease. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011 [Epub ahead of print]