

DELECCIONES EN EL GEN GATA4 EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA CONGÉNITA NO SINDRÓMICA

GEN GATA4 DELETIONS IN PATIENTS WITH CONGENITAL NO SYNDROMIC HEART DISEASE

Marleny Salazar Salazar¹ y Diana Carolina Orjuela Quintero²

^{1,y2} Docente Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental Facultad de Educación Universidad del Quindío

Recibido: Octubre 31 de 2014

Aceptado: Noviembre 5 de 2014

*Correspondencia del autor. Proviteq Unidad 4 Boloque 3 Apto 3A, Armenia Quindío. Email: masasa@uniquindio.edu.co

RESUMEN

Las cardiopatías congénitas CC son las malformaciones congénitas más frecuentes, comprometiendo el desarrollo y funcionamiento normal del corazón, la alta susceptibilidad humana a desarrollar esta anomalía puede deberse a la complejidad de las interacciones durante desarrollo embrionario, debido a la participación de varios eventos moleculares, morfogénéticos y multifactoriales. Es principal causa de muerte no infecciosa alrededor del mundo. La incidencia global de cardiopatías congénitas está entre 4 y 9 casos por cada 1.000 recién nacidos vivos. En general, aparecen 1,5 millones de casos nuevos al año en todo el mundo. En este estudio se analizaron mediante bioinformática, 33 muestras de tejido cardíaco cercano al defecto y de sangre de pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica, de la Clínica Shaio Bogotá (Colombia). Se analizaron en sentido y antisentido cada uno de los seis exones que conforman el gen GATA4. Se identificaron 17 mutaciones, incluyendo cinco cambios no sinónimos en la secuencia, una variante sinónima, una variación de la secuencia en la región 5'UTR, tres cambios intrónicos y siete deleciones. No se encontraron evidencias de variantes somáticas para el gen GATA4, en ninguna de las muestras de la población de estudio.

Palabras claves: GATA4, Mutación, Análisis Bioinformático, Secuencia

ABSTRACT

Congenital heart defects (CHD) are the most frequent congenital malformations, compromising the development and normal functioning of the heart. High human susceptibility to this anomaly may be due to the complexity of the interactions during embryonic development due to the involvement of several molecular events, morphogenetic and multifactorial, it is noninfectious leading cause of death worldwide. The overall incidence of congenital heart disease is between 4 and 9 cases per 1,000 live births. Overall, 1.5 million new cases occur annually worldwide. In this study, 33 tissue samples near the defect and blood of patients from Shaio Bogota Heart Hospital with non-syndromic congenital heart disease were analyzed by bioinformatics. They were analyzed in sense and antisense each of the six exons comprising the GATA4 gene. Seventeen mutations were identified, including five non-synonymous changes in the sequence, a synonymous variant, a variation of the sequence in the 5'UTR region, seven three intronic changes and deletions. No evidence for somatic GATA4 gene variants in any of the samples of the study population was found.

Keywords: GATA4, Mutation, Bioinformatic Analysis, Sequence.

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, el primer órgano en formarse es el corazón (1, 2). A los 15 días de gestación las células cardíacas progenitoras ya se han especializado y se agrupan formando una estructura conocida como creciente cardíaca. Las células de la creciente cardíaca comienzan a expresar genes característicos de miocardio, como los *Nkx2.5* y *GATA4*. La expresión del primer gen depende de proteínas secretadas por el endodermo subyacente tales como cerberus, la proteína morfogenética ósea (BMP) y el factor de crecimiento fibroblástico tipo 8 (3, 4). A las 3 semanas de desarrollo las células de este primordio cardíaco migran hacia la línea media formando un tubo cardíaco, que para entonces ya posee dos capas de tejido: una capa interna de tejido endotelial y una capa externa de células miocárdicas. Este corazón primitivo sufre una torsión y rotación hacia la derecha alrededor de la semana 4 de gestación, lo cual posiciona a las aurículas por encima de los ventrículos, asimismo a partir del tracto de salida comienzan a emerger las arterias del arco aórtico (III, IV y VI). Alrededor de las semanas 5 y 6 de desarrollo embrionario, se forman los septos cardíacos para dividir al corazón en cuatro cámaras cardíacas (2 atrios y 2 ventrículos) y el tracto de salida o conducto arterioso se divide en la arteria pulmonar y la aorta, lo que resulta en la división de la circulación en pulmonar y sistémica, respectivamente (5, 6). Más tarde ocurre un remodelamiento valvular intensivo junto con el crecimiento de los ventrículos para completar la maduración del corazón. El establecimiento de la simetría izquierda-derecha es muy importante para el desarrollo normal del corazón.

Las cardiopatías congénitas CC son las malformaciones congénitas más frecuentes, es la principal causa de muerte no infecciosa alrededor del mundo potencialmente tienen el riesgo comprometer el funcionamiento normal del corazón o de los grandes vasos. Su incidencia se estima entre el 6,2 y 14, 5% de los recién nacidos vivos con malformaciones y el 2% de la población en general (7), aunque otros autores como Hoffman y cols., afirman que la incidencia en las cardiopatías cianóticas y no cianóticas se mantienen estables en la población con un porcentaje de 7% independientemente del lugar y tiempo (8). Las cardiopatías más comunes son: DSV defecto septal ventricular, DSA defecto septal atrial, CPA Conducto arterioso persistente, TGV Transposición de grandes vasos, Tetralogía de Fallot, CoA coartación de la aorta, DAP *ductus* arterioso persistente,

TGV transposición de grandes vasos, IM insuficiencia mitral, AAI interrupción del arco aórtico (9).

La CC es una de las principales causas de muerte infantil, y la alta susceptibilidad humana a desarrollar esta anomalía puede deberse en parte, a la complejidad del desarrollo embrionario, debido a la participación de varios eventos moleculares y morfogenéticos. La etiología de la CC en la mayoría de los casos es desconocida y se han asociado a factores genéticos, ambientales y de la interacción de estos como posibles causas. Se ha podido establecer que un 10% aun 25% de las cardiopatías congénitas son causadas por alteraciones cromosómicas entre ellas las delecciones, 3 a 5% pueden ser causadas por factores ambientales y entre el 80 y 85% restante tiene un origen multifactorial (10, 11).

En Colombia, las malformaciones congénitas constituyen la segunda causa de muerte en niños menores de un año (12). Los datos estadísticos reportados por el Ministerio de Salud en 1994 mostraron que las cardiopatías congénitas (CC) tienen una prevalencia entre 7,5 y 9,5 por 1.000 nacimientos, sin discriminar entre nacidos vivos y muertos. La incidencia global de cardiopatías congénitas está entre 4 y 10 casos por cada 1.000 recién nacidos vivos. En general, aparecen 1,5 millones de casos nuevos al año en todo el mundo (13).

Según plantea el registro de malformaciones Cardiacas de la Unión Europea, se ha observado un aumento del riesgo de cardiopatías congénitas cuando se usan técnicas de reproducción asistida. El aumento del riesgo varía según la técnica de reproducción asistida y el tipo de anomalía cardíaca. Tararbit y cols., especulan que esto puede ser debido a la tecnología reproductiva utilizada o a la causa de base en cuanto a la infertilidad de la pareja (10).

Con el trabajo continuo de varias décadas, ya se cuenta con mejores elementos para el diagnóstico, clasificación y tratamiento de las CC. La sobrevida de los niños afectados sigue en aumento y el cálculo de la prevalencia de CC en el adulto crece, actualmente es estimada en 4.09/1,000. Este progreso en la sobrevida de los pacientes con CC ha sido posible gracias al perfeccionamiento del abordaje morfológico, tanto en su clasificación como en su tratamiento quirúrgico (2).

Los genes expresados en la placa cardiogénica como *NKX2.5*, el factor de transcripción de unión al factor de respuesta sérica c-fos (SRF), *GATA4*, *TBX5* y *HAND2*

forman el centro regulador de la red de morfogénesis cardíaca, la cual controla la rotación del tubo cardíaco, la simetría izquierda-derecha y la formación de las cámaras cardíacas (14, 15). Diferentes tipos de células contribuyen al crecimiento cardíaco. Las células del primer campo del corazón (FHF) contribuyen únicamente a la formación del ventrículo derecho y del canal atrioventricular, mientras que las aurículas, ventrículo izquierdo y gran parte del tracto de salida provienen de precursores mesenquimales que residen en el segundo campo del corazón (SHF) (16, 17). De esta manera se da la formación normal y el desarrollo de un corazón sano.

Es notable el conocimiento actual de la importancia que tienen en este grupo de CC los factores de transcripción *NKX2.5*, *TBX5* y *GATA4*. Estos tres factores de transcripción, que comienzan a expresarse desde temprano en las células de linaje cardíaco, también regulan la expresión de los genes de proteínas contráctiles en cardiocitos. En etapas tardías del desarrollo cardíaco, las mutaciones en *NKX2.5*, *TBX5* y *GATA4* impiden que se desarrolle normalmente el proceso de septación atrial y ventricular (15, 18).

El *GATA4* es un factor de transcripción con motivos de «dedos de zinc». Este factor de transcripción trabaja conjuntamente con *NKX2.5*. El modelo mutante para este gen presenta defectos en el plegamiento anterior del embrión: no hay fusión del tubo cardíaco, y se presenta la muerte, quizá debido a la importancia de *GATA4* en la señalización para la migración ventral. Estudios en familias con defectos de la septación han relacionado a *GATA4* con defectos interauriculares e interventriculares sin la presencia de defectos de conducción. Además, se ha relacionado con defectos de doble salida del ventrículo derecho (DSVD) y ventrículo izquierdo hipoplásico (18, 19).

Son pocos los genes blanco descritos para *TBX5*. Sin embargo, se le asocia directamente con *NKX2.5* y *GATA4*, así como con los activadores transcripcionales Tip60 (acetiltransferasa de histonas) y Baf60C (un componente del sistema de remodelamiento de cromatina adenosina trifosfato [ATP] dependiente *Swi/Snf* tipo BAF) (20).

Mutaciones en los factores *TBX5*, *NKX2.5* y *GATA4* están fuertemente asociadas con defectos en la septación, tanto auricular como ventricular, ya que se ha postulado que dichas mutaciones interrumpen la interacción entre

estos tres factores transcripcionales. El *MYH6* es activado por *GATA4* y *TBX5*, y ha sido relacionado con defectos del septo ventricular. El *Tbx20* fue relacionado con CC por primera vez en 2007 (21). Este factor de transcripción interactúa con *NKX2.5*, *GATA4* y *TBX5*, los cuales habían sido previamente asociados a CC. Mutaciones en la caja T (*T-box*) de este gen se asocian con distintas anomalías, incluyendo defectos de septación, valvulogénesis y cardiomiopatía dilatada en adultos. También se han asociado mutaciones de este gen a la TF y conexión anómala de vena pulmonar (22), aunque esta asociación parece débil.

Muy recientemente se ha encontrado relación del gen *GATA6* con defectos en el tracto de salida, específicamente, con la persistencia del conducto arterioso (PCA) (23, 24) y *TF34*. *GATA6* es un miembro de la familia GATA de factores de transcripción. Su expresión y función empalma frecuentemente con la de *GATA4*. Este último ya ha sido relacionado con distintas CC. Sin embargo, el papel de **GATA6** en estas apenas se está dilucidando. El estudio de Kodo, et al., en Japón (23, 25), reveló que este factor de transcripción regula la expresión de los genes que codifican la proteína guía neurovascular semaforina 3C y su receptor plexina A2.

La frecuencia de la deleción entre los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada es en promedio de un 105% (26). Las deleciones se presentan por pérdida de un fragmento del cromosoma o de una o varias bases de un fragmento de ADN está perdida puede resultar como consecuencia de una ruptura del cromosoma y la posterior pérdida del fragmento y su información genética (26). Las deleciones provocan graves alteraciones del código genético y en ocasiones se manifiestan en graves patologías, como las cardiopatías.

No existe una correlación exacta uno a uno (un gen, un defecto) entre los mecanismos moleculares y los defectos morfológicos de las CC. Esto sucede porque muchas veces la formación adecuada de una estructura anatómica implica el correcto funcionamiento de varias vías que pueden involucrar el producto de distintos genes. En este sentido, suele haber un mismo defecto para distintos mecanismos/distintos genes (27).

El grupo de Reamon-Buettner y Borlak, ha informado que la mayoría de las enfermedades cardíacas, son de origen somático y están relacionadas con mutaciones en los genes *NKX2.5*, *TBX5*, *GATA4*, *HEY2* y *HAND1* (28) (29). Estos investigadores trabajaron con una co-

lección de corazones malformados propiedad de la Universidad de Leipzig (Alemania) (28, 29, 30), que estaban fijados en formalina por más de 20 años, a los cuales les extrajeron ADN. En varios pacientes identificaron diferentes mutaciones en el mismo gen (28, 29). La abundancia de las mutaciones somáticas relacionadas por el grupo de Rea-mon-Buettner y Borlak contrasta con el número limitado de mutaciones encontradas en otros estudios. Por esta razón en el presente trabajo se planteó un análisis del gen *GATA4* en 33 muestras de tejido fresco cercano al defecto cardíaco y de sangre del mismo paciente, con la finalidad de observar si las mutaciones eran de origen somático o germinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desde mayo de 2011 hasta diciembre 2012, se analizaron las mutaciones y polimorfismos del gen *GATA4*, asociado a cardiopatías congénitas no síndrómica en 33 individuos (21 mujeres, 12 hombres) no relacionados con, con una gama etaria de 1 día y 14 años con una mediana de 2 años, promedio de 4 años, predominando el diagnóstico de defectos septales cardíacos y malformaciones obstructivas del lado izquierdo.

A los padres de los niños que participaron en el estudio

antecedentes familiares de cardiopatía congénita, malformaciones extracardíacas y/o con dismorfias faciales, cromosómicas, síndromes mendelianos, y pacientes con microdelección 22q11.2. Se incluyeron pacientes con cardiopatía congénita no síndrómica, con fenotipo normal. El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Clínica Shaio.

A cada paciente, antes de iniciar la cirugía y previo consentimiento informado, se le solicitó una muestra de sangre de 5mL tomada por venopunción en tubos con EDTA previamente marcados, para extraer el ADN. Esta muestra se tomó antes de que el paciente fuera sometido a transfusión. Además, durante el procedimiento quirúrgico indicado, se realizó la toma de una muestra de tejido de aproximadamente de 0,5 a 1,5 mcg para biopsia del área del defecto primario, específicamente del borde de los defectos septales ventricular y auricular o de áreas con evidente alteración macroscópica y de tejido valvular en el caso de no existir defectos septales. Se tuvo especial cuidado en tomar las muestras de los sistemas de conducción, tejido valvular o paredes libres de las cavidades, que por su grosor implicasen riesgo de perforación. Estas muestras fueron adquiridas durante el proceso quirúrgico e inmediatamente llevadas a congelación a -80°C. El consentimiento informado, se obtuvo

Tabla 1
Temperatura y primeros empleados

Exón	Pb	Primer sentido	Primer antisentido	Tm
1.1	277	GTCTTCTGCCCCAATAGGT	CATGGCCAAGCTCTGATACAT	58°C
1.2	269	GGCCGCGTCTGGTGCGGGG	GGTAGGGGCTGGAGTAGGAG	61°C
1.3	348	GGGAAGCTGCGGCCTACA	AGCCCTCGCGCTCCTACTC	62°C
2	330	GCGCTCTAGATTCTCAGATG	CACGTAATCCCCGATGCACAC	58°C
3	370	GCGAGGTGGAAGGGCAGTG	CAATGTAAAGGACGGAAGAGGC	60°C
4	221	GTGGAGAGATTGCTTAGGTGTT	ATGATTCTTAGGCACTCTGAGG	58°C
5	303	GGTGTGCTGACTCTGCTTCAT	CAGAGGGTAGCTCACTGCTTG	60°C
6	313	ATCCTGGGGACATCTGCATAG	GGAATTTGAGGAGGGAAGAGG	62°C

se les preguntó en la consulta, si tenían historia familiar de cardiopatías. Si no presentaban antecedentes familiares, todos los pacientes fueron evaluados por un grupo de especialistas en cirugía cardiovascular, médicos cardiólogos y médicos genetistas de la Fundación Clínica Shaio de Bogotá-Colombia. Igualmente, se les realizó el diagnóstico cardíaco, el cual fue confirmado por una o más de las siguientes pruebas: ecocardiografía, cateterismo cardíaco y una intervención quirúrgica. Fueron excluidos del estudio pacientes con síndrome de Down, síndromes genéticos relacionados con cardiopatías y

de todos los padres en la consulta de cardiología.

Las regiones codificantes completas, incluidos los límites intrón-exón, de *GATA4*, se amplificaron mediante PCR. Los primers fueron diseñados usando el software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) Primer3 (v. 0.4.0), basado en las secuencias de cDNA disponibles en el GenBank *GATA4* (NM_002052.3) y las regiones genómicas correspondientes (Tabla I). Los productos de la PCR se secuenciaron siguiendo el protocolo para BigDye Terminator v1.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied

Biosystems) utilizando un secuenciador de cuatro capilares *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

Los electroferogramas obtenidos, en representación de la secuencia fueron analizados con el software ChromasPro y CLUSTALW para la lectura simultánea de varias secuencias y por (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>).

La herramienta que se utilizó para analizar el nivel de conservación de las variantes de la secuencia de genes ortólogos, fue NCBI HomoloGene http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=homologene&Cmd=Retrieve&list_uids=4117. Las muestras que indicaron cambios de bases en el ADN se amplificaron por PCR y se secuenciaron en dos ocasiones

El gen *GATA4* tiene 6 exones; por conveniencia metodológica, se dividió el exón número 1 en 1.1, 1.2, 1.3. Se analizaron las muestras de tejido cercano al defecto, y sangre.

RESULTADOS

En este estudio se analizaron las mutaciones y polimorfismos del gen *GATA4*, asociado a cardiopatías congénitas no sindrómica, para determinar si alguna de las variaciones de la secuencia identificadas en el tejido afectado era de la línea germinal o somática, se examinaron también en cada paciente, las muestras de sangre y tejidos fenotípicamente normales.

Fueron encontrados los siguientes defectos cardiacos en la población de estudio: Coartación de la aorta CoA (30,3%), defecto septal ventricular DSV (27,2%), defecto septal atrial DSA (21,2%), ductus arterioso persistente DAP (12,1%), transposición de grandes vasos TGV (3,03%), insuficiencia mitral IM (3,03%), truncus arterioso (3,03%), canal auriculoventricular (3,03%), interrupción del arco aórtico AAI (3,03%), drenaje venoso anómalo total (3,03%). Las alteraciones reportadas en este estudio, se encontraron en sangre y tejido afectado cerca del defecto cardiaco.

Diez variaciones en la secuencia del gen *GATA4* fueron observadas en nueve pacientes no relacionados, tanto en sangre como en tejido cardiaco, incluyendo 5 cambios no sinónimos en la secuencia, una variante sinónima, una variación de la secuencia en la región 5'UTR, y tres cambios intrónicos. Todos los cambios se obser-

varon en heterocigosis. Además, se encontraron siete deleciones en cuatro individuos.

El cambio no sinónimo p.Ser377Gly (c.1129A>G) ha sido reportado previamente en la base de datos de SNPs (rs3729856). Se encontró en un paciente con comunicación interauricular y en un individuo con coartación de la aorta, mientras que la variante p.Val380Met no sinónima (c.1138G>A) fue identificada en un paciente con diagnóstico de defecto septal atrial. Además, de cambios no sinónimos en la secuencia, se identificó tres nuevas variantes intrónicas (c.IVS3-17T>C, c.IVS6-20G>A y c.IVS1-64G>C), en tres pacientes: dos con comunicación interventricular y un paciente con ductus arterioso persistente se observó un cambio sinónimo (c.543C>T, p.Ala181Ala), (Figura 1), en un individuo con transposición de grandes arterias con tabique ventricular intacto, y una nueva sustitución de nucleótidos en la región 5' no traducida de *GATA4* en un paciente con coartación de la aorta (Figura 2).

Figura 1: Electroferograma

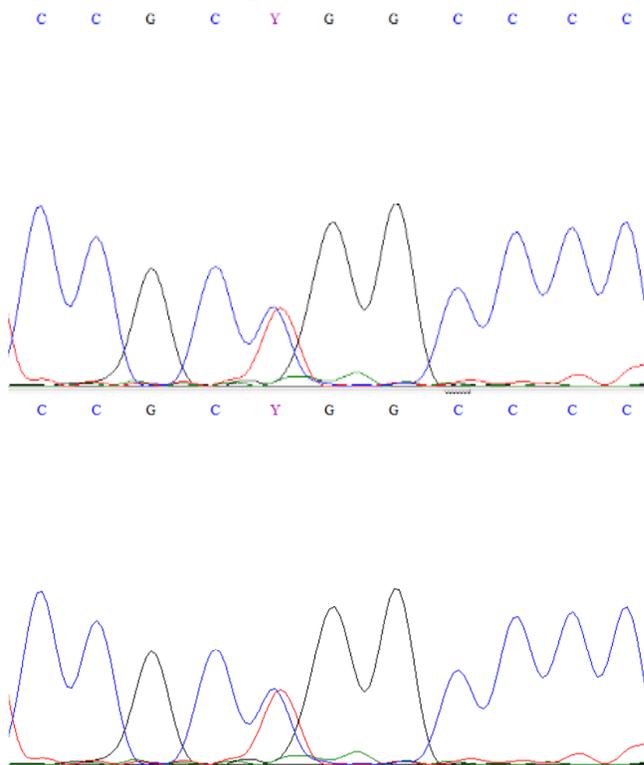


Figura 1. Electroferograma del paciente 3 con transposición de grandes vasos, T (Tejido) y S (Sangre) del exón 1.2, donde se identifica un c. 543C>T-Ala181Ala. Muestra de Tejido. *GATA4*EX 1.2-3 C>T. muestra de Sangre *GATA4*-EX1.2-3 C>T

Las delecciones se encontraron en la sangre y el tejido en cuatro pacientes. Un individuo con defecto septal ventricular con dos delecciones (del152-155 CCG, del160-161-172- *CTTCATGTAGA*), dos pacientes con insuficiencia mitral y defecto auriculo-ventricular presentaron la misma delección (del996-1005-*CTCCTTCAGG*). En el paciente con ductus arterioso persistente se identificó tres delecciones (del202-204-*GGG*, del248*TC-CGC*, del276-*GATTGGGGTGTCTCGGGCGG*). Estas de-

lecciones no han sido reportadas anteriormente (Tabla II).

El análisis de mutaciones de los tejidos normales y muestras de sangre reveló que todas las variantes de la secuencia de nucleótidos encontradas en muestras de tejido patológico, también estuvieron presentes en el tejido normal y en las muestras de sangre tomadas del mismo paciente lo que indicó que se trataba de variantes de la línea germinal. No se identificaron mutaciones

Tabla 2. Alteraciones en los de los exones del gen GATA4, encontrados en sangre y tejido cerca al defecto cardiaco del mismo paciente.

Paciente/ Defecto	Exón	Referencia	Variante	Tipo	Cambio de aminoácido	Status (refSNP)
		T	C	Variante intrónica	IVS3-17T>C	No reportada
1DSV	4	----	----	Delección	del152-155 CCG	No reportada
		----	----	Delección	del160-161-172-CTTCATGTAGA	No reportada
3 TGA	1.2	C	T	sinónima	Ala181Ala-543C>T	Salazar y cols., 2011
11 DSA	5	A	G	No sinónima	Ser377Gly-1129A>G	rs3729856
14 CoA	5	A	G	No sinónima	Ser377Gly-1129A>G	rs3729856
17 CoA	1	G	C	No sinónima	5'UTR-48G>C	rs14729856
19 IM	4	----	----	Delección	del996-1005 **CTCCTTCAGG	No reportada
24 DVA	4	----	---	Delección	del996-1005**CTCCTTCAGG	No reportada
26 DSA	5	G	A	No sinónima	Val380Met-1138G>A	Schluterman 2007, Salazar y cols., 2011
27 DAP	1.2	----	----	Delección	del68G c.202_204delG	Salazar y cols., 2011
		—	—	Delección	c. 248TCCGC	No reportada
		UCC	GUA	No sinónima	(UCC>GUA) - S341V	rs117390145
27 DAP	2	GCC	AGC	No sinónima	(GCC>AGC) - A342S	rs281863312
		G	C	Variante intrónica	IVS1-64 G>C	No reportada
		----	----	Delección	del276. GATTGGGGTGTCTCGGGCGG	No reportada
30 DSV	6	G	A	Variante intrónica	IVS6-20G>A	Salazar y cols., 2011

Figura 2: Electroferograma

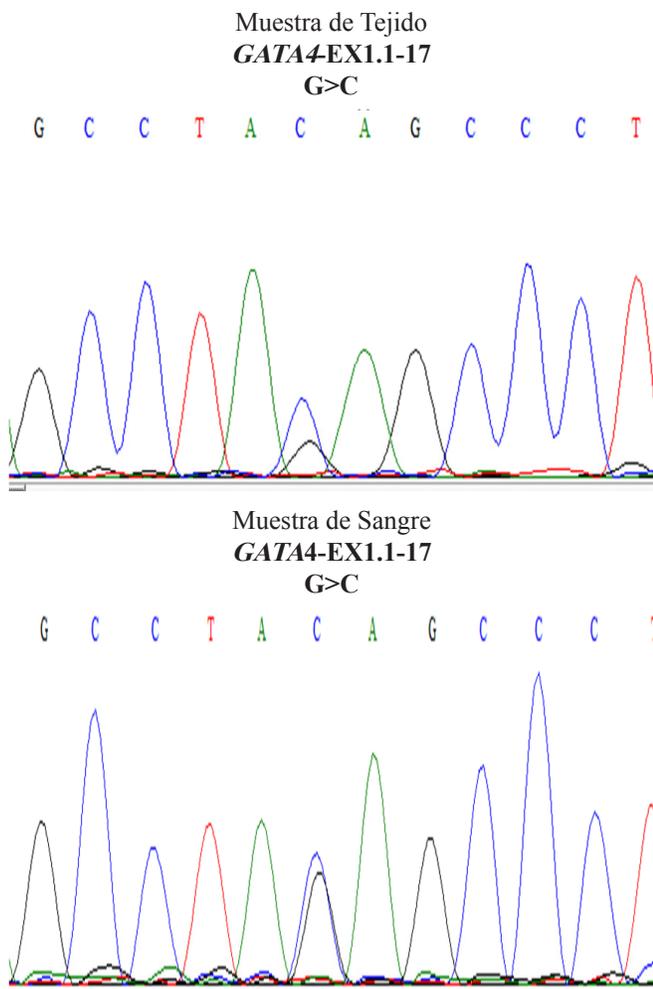


Figura 2. Electroferograma de la muestra del paciente 17 con coartación de la aorta, T (Tejido) y S (Sangre) del exón 1.1 del gen *GATA4*, donde se observa un c. 5'UTR-48G>C.

en el exón 3 del gen *GATA4*.

DISCUSIÓN

El factor de transcripción *GATA4* es de vital importancia en el desarrollo cardíaco. Pequeñas alteraciones en el nivel de expresión de la proteína de *GATA4* pueden cambiar dramáticamente la morfogénesis cardíaca y la supervivencia embrionaria. Además, la expresión de *GATA4* en el miocardio es necesaria para la proliferación de los cardiomiocitos, la formación de los cojines endocárdicos, el desarrollo del ventrículo derecho, y la tabicación del tracto de salida (31).

Las mutaciones en *GATA4*, se identificaron por primera vez en los casos familiares de los defectos septales cardíacos (32). Estudios de Zhang W y col. (33) han reportado mutaciones de la línea germinal en el gen *GATA4*, en algunos tipos de enfermedad cardíaca congénita. Sin

embargo, la prevalencia de las mismas y la correlación entre el genotipo y el fenotipo no han sido ampliamente estudiadas (34).

La frecuencia de la delección entre los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada, es en promedio de un 10%. Las delecciones se presentan por pérdida de un fragmento del cromosoma, ésta pérdida puede resultar como consecuencia de una ruptura del cromosoma y la posterior pérdida del fragmento y su información genética (35). En este estudio se encontraron pacientes que presentaron entre una y tres delecciones. Posiblemente estas delecciones generan alteraciones en tejido cardíaco, que provocan anomalías asociadas a diferentes patologías. Las grandes delecciones cromosómicas también han sido implicadas en las malformaciones estructurales y de desarrollo del corazón, como las anomalías conotruncuales, los defectos del canal auriculoventricular y los defectos septales ventriculares y auriculares (36). Estas delecciones no han sido reportadas en las bases de datos, en la población estudiada la frecuencia de delecciones fue de 21%.

El defecto septal ventricular (DSV) y el defecto septal auricular (DSA) son las anomalías cardíacas más comunes encontrada en niños; el defecto septal ventricular se ha estimado en una gama etaria aproximada de 1,5 a 2 por cada 1.000 nacidos vivos, y en el reporte de Atlanta en 1980, se consideró que la incidencia era de 2,6 en 1.000 nacidos vivos (36). Este defecto, puede presentarse solo o en combinación con otras malformaciones cardíacas. Los DSV grandes dan lugar a insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar, síndrome de Eisenmenger, retraso en el desarrollo del cerebro fetal, arritmias e incluso la muerte súbita cardíaca (37). En el presente estudio el defecto más común en la población evaluada fue la coartación de la aorta (CoA) con un 30%, mientras que el DSV lo presentó el 27% del total de los pacientes. Las anomalías asociadas más frecuentes a la CoA son las anomalías de la válvula aórtica, especialmente la bicúspide, oscilando entre el 15% y 85% de acuerdo a los diferentes estudios (37). En este estudio los pacientes que presentaron coartación de la aorta, no presentaron ninguna anomalía estructural asociada.

La forma autosómica dominante de enfermedades congénitas cardíacas presenta múltiples tipos de defectos (36), tres pacientes de este estudio presentaron al menos dos complicaciones cardíacas, uno con una DSV + *Ductus* arterioso persistente, otro, con DSV + Membrana

subaórtica y un tercer paciente con DSV + *Ductus* arterioso persistente.

El polimorfismo c.1129 A>G rs3729856- S377G es común en la población y se ha encontrado en la base de datos dbSNP, con un valor de heterocigosis de 0,49. En la población estudiada se encontró en dos individuos con DSA y CoA.

Otra variante, el c.1138 G>A fue detectado en el paciente con DSV. Este cambio resultó en una secuencia de Valina por Metionina (V380M) localizado en el exón 5. Este resultado está relacionado con los resultados hallados en muestras de sangre en individuos chinos con DSV (33) y en pacientes Alemanes (38).

Estos hallazgos corroboran lo reportado por Salazar y cols. (39) y Draus y cols. (40), quienes hallaron alteraciones en las muestras de tejido cardíaco y sangre del mismo paciente no síndromico y sin antecedentes familiares, lo que ratifica que estas mutaciones cardíacas son de origen germinal y no somático.

Molketin (41), Watt (25), Reamon-Buettner y Borlak (27), encontraron que las mutaciones en el gen *GATA4* se presentan predominantemente en pacientes con familiares que tienen defectos del tabique cardíaco. En este estudio, se analizaron pacientes sin antecedentes familiares de cardiopatías y que no obstante presentaron patologías cardíacas, lo que difiere de los autores referenciados.

Las cardiopatías congénitas tienen riesgo de recurrencia en hermanos futuros de un 2 a 6% y riesgo de transmisión a los hijos, cuando uno de los dos padres posee una cardiopatía, que se estima de 1 a 10%, presentando un riesgo mayor en el caso de que la portadora sea la madre. Por este motivo es de prever que la incidencia de cardiopatías tienda a aumentar en los próximos años como consecuencia de la mayor expectativa de vida de cardiopatas que llegan a la edad reproductiva (42). Es importante anotar que las cardiopatías se pueden presentar en individuos cuyos padres y familiares no hayan presentado antecedentes de enfermedades cardíacas, pero estas pueden ser mutaciones de novo; los padres presentan la enfermedad y esta se hace sintomática entre los 30-40 años, por factores ambientales, multifactoriales y genéticos (27).

El factor de transcripción *GATA4* participa en la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (4). Los hallazgos de este estudio permiten ampliar el conocimiento relacionado con estas patologías y la

predisposición genética enfocada al gen *GATA4*, como también dilucidar la relación genotipo fenotipo en las cardiopatías congénitas.

Se tomaron muestras de sangre y tejido de individuos con alteraciones cardíacas para identificar si éstas eran de origen germinal o somático y este estudio permitió identificar mutaciones en el *GATA4* en la cohorte de pacientes con cardiopatía congénita, pero los resultados difieren de lo reportado por Reamon-Buettner (29), quienes reportaron un gran número de mutaciones somáticas en tejidos fijados en formalina, que contrasta con el número limitado de las encontradas en el presente estudio, donde se utilizó tejido cardíaco fresco y sangre del mismo paciente. Esta observación es contraria al papel que cumplen las mutaciones somáticas en la patogénesis de los defectos cardíacos, especialmente en el caso de los defectos de la tabicación. Dada la baja frecuencia de mutaciones en todos los genes conocidos hasta la fecha, que se pueden asociar a cardiopatía coronaria y las complejas interacciones y vías de señalización implicadas en la formación del corazón, sigue siendo posible, y de hecho probable que la mayoría de las CC tienen una etiología multifactorial. Estudios futuros son necesarios para desentrañar las bases genéticas de los defectos cardíacos.

En conclusión todos los tejidos utilizados en el presente análisis, se tomaron dentro o muy cerca de los defectos cardíacos y en muestras de sangre del mismo paciente. Es de destacar que, aunque no se encontraron pruebas de mutaciones somáticas, se identificaron ocho variantes nuevas cinco corresponden a delecciones y tres variantes intrónicas en el gen de *GATA4*, demostrando que el protocolo de escaneo para identificar las mutaciones es lo suficientemente sensible para identificar variaciones en la secuencia de este gen. Podría ser posible que algunas de estas variantes representan cambios no aleatorios. Sin embargo, ni los familiares ni los controles pareados por motivos étnicos estaban disponibles para aumentar las pruebas de patogenicidad de estos cambios en la secuencia. Este estudio constituye una aproximación para conocer el origen de las enfermedades cardíacas no síndromicas y abre las puertas para el estudio genético en el que se pueda demostrar la presencia de mutaciones cardíacas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Quindío y a los pacientes y médicos de la Clínica About Shaio de Bogotá.

BIBLIOGRAFÍA

1. Srivastava D. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:199-213.
2. Sander TL, Klinkner DB, Tomita-Mitchell A, Mitchell ME. Molecular and cellular basis of congenital heart disease. *Pediatr Clin North Am.* 2006;53:989-1009.
3. Alsan BH, Schultheiss TM. Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development.* 2002;129:1935-43.
4. Laverriere AC, Macneill C, Mueller C, Poelmann RE, Burch JB, Evans T. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J Biol Chem.* 1994;269:23177-84.
5. Hoffman JI, Kaplan S, Liberthson RR. Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J.* 2004;147:425-39.
6. Marín-García J. Advances in molecular genetics of congenital heart disease. *Rev Esp Cardiol.* 2009;62:242-5.
7. Martínez Olorón P, Romero Ibarra C, Alzina de Aguilar V. Incidence of congenital heart disease in Navarra (1989-1998). *Rev Esp Cardiol.* 2005;58(12):1428-34
8. Hoffman FI, Kaplan S. The Incidence of Congenital Heart Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39:1890-1900.
9. Durán P. RM. Cardiopatías congénitas más frecuentes. *Pediatr Integral* [Internet]. 2008 [citado 12 enero 2013]; XII (8):807-818. Disponible en: [http://www.sepeap.org/secciones/documentos/pdf/Cardiopatías congénitas más frecuentes.pdf](http://www.sepeap.org/secciones/documentos/pdf/Cardiopatias%20congenitas%20mas%20frecuentes.pdf)
10. Tararbit K, Houyel L, Bonnet D. Risk of congenital hearts defects associated with assisted reproductive technologies a population-based evaluation. *Eur Heart J.* 2011; 32:500-8.
11. Icardo J. Malformaciones cardíacas, heterotaxia y lateralidad. *Rev Esp Cardiol.* 2002; 9: 962-974.
12. Estadísticas Vitales: Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2001.
13. Baltaxe E, Zarante I. Prevalencia de malformaciones cardíacas congénitas en 44,985 nacimientos en Colombia. *Arch. Cardiol. Méx.* 2006; 76:263-268
14. Hoffman JI, Kaplan S, Liberthson RR. Prevalence of congenital heart disease. *Am Heart J.* 2004;147:425-39.
15. Garg V. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol Life Sci.* 2006;63:1141-8.
16. Greulich F, Rudat C, Kispert A. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc Res.* 2011;91:212-22.
17. Nemer M. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovasc Pathol.* 2008;17:48-54
18. Bruneau BG. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature.* 2008;451:943-8.
19. Clark KL, Yutzey KE, Benson DW. Transcription factors and congenital heart defects. *Annu Rev Physiol.* 2006;68:97-121.
20. Stennard FA, Harvey RP. T-box transcription factors and their roles in regulatory hierarchies in the developing heart. *Development.* 2005;132: 4897-910.
21. Kirk EP, Sunde M, Costa MW. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet.* 2007;81:280-91.
22. Liu C, Shen A, Li X, Jiao W, Zhang X, Li Z. T-box transcription factor TBX20 mutations in Chinese patients with congenital heart disease. *Eur J Med Genet.* 2008;51:580-7.
23. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M. GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:13933-8.
24. Maitra M, Koenig SN, Srivastava D, Garg V. Identification of GATA6 sequence variants in patients with congenital heart defects. *Pediatr Res.* 2010;68:281-5.
25. Kodo K, Yamagishi H. GATA transcription factors in congenital heart defects: a commentary on a novel GATA6 mutation in patients with tetralogy of Fallot or atrial septal defect. *J Hum Genet.* 2010;55:637-8.
26. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Woodrow BD, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients

- with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1650–1655
27. Monroy-Muñoz E, Pérez-Hernández N, Vargas-Alarcón G, Ortiz-San Juan G, Buendía-Hernández A, Calderón-Colmenero J, Ramírez-Marroquín S, Cervantes-Salazar J, Curi-Curi P, Martínez-Rodríguez N y Rodríguez Pérez J M. Cambiando el paradigma en las cardiopatías congénitas: de la anatomía a la etiología molecular. Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F.; Servicio de Cardiología Pediátrica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F. Departamento de Cirugía Cardíaca Pediátrica y Cardiopatías Congénitas, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México, D.F. 149:212-9.
 28. Reamon-Buettner SM, Borlak J. Somatic NKX2-5 mutations as a novel mechanism of disease in complex congenital heart disease. *J Med Genet* 2004; 41:684-690.
 29. Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spänel-Borowski K, Craatz S, Kuenzel E, Borlak J. Novel NKX2-5 mutations in diseased heart tissues of patients with cardiac malformations. *Am J Pathol* 2004; 164:2117-2125.
 30. Sunagawa YT, Morimoto T, Takaya S, Kaichi H, Wada T, Kawamura V, Fujita M, Shimatsu A, Kita T, Hasegawa K. Quinasa dependiente de ciclina-9 es un componente del complejo de p300/GATA4 requerido para fenilefrina inducida por hipertrofia de los cardiomiocitos. 2010. PubMed, Europa PMC. *Biol.Chem.* 285:9556-9568.
 31. Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, Moses K, Schwartz RJ, Izumo S, Pu WT. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest.* 2005; 115:1522-1531.
 32. Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V, Goldmuntz E. GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *J Med Genet* 2007; 44: 779-783.
 33. Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, LI Z. GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease. *Cardiac Eur J Med Genet.* 2008; 51:527-535.
 34. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Woodrow BD, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1650–1655.
 35. Marino B, Digilio MC. Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol.* 2000; 9:303-15.
 36. Gumbiner CH, Atsuyoshi T. Ventricular septal defect. En: *The Science and Practice of Pediatric Cardiology.* Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR. 2nd ed. Williams and Wilkins. Baltimore Maryland 1998; 1:1119-37.
 37. Morris MJH, McNamara DG. Coarctation of the aorta and interrupted aortic arch. En: *Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR, (eds.). The science and practice of pediatric cardiology.* Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins 1998:1317-1346.
 38. Benson D.W, Silberbach G.M, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs M.S, Smalls O, Johnson M.C, Watson M.S, Seidman J.G, Seidman C.E, Plowden N.J, Kugler J.D. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways, *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1567-1573.
 39. Salazar M, Consoli F, Villegas V, Caicedo V, Maddoloni V, Dallapiccola B, De Luca A, Maino B, Nuñez F, Bernal J. Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene Mutations in Sporadic Septal heart defects. *Eur J Med Genet* 2011; 54:306-309.
 40. Draus JM, Hauck MA, Goetsch EH, Austin III, Tomita M, Mitchell ME. Investigation of somatic NKX2.5 mutations in congenital heart disease. *J Med Genet* 2009; 46:115-122.
 41. Molkenstein JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev.* 2000; 11: 1061-1072.
 42. Hoffman JIE. Congenital heart disease: Incidence and inheritance. *Pediatr Clin North Am,* 1990; 37:25-42