

# MUTACIONES EN LOS GENES NKX2.5 Y GATA4 EN PACIENTES CON CARDIOPATÍA CONGÉNITA ESPORÁDICA

Mutations of NKX2.5 and GATA4 Genes in Patients with Sporadic  
Congenital Heart Disease

Marleny Salazar<sup>1\*</sup>, Federica Consoli<sup>2</sup>, Victoria Villegas<sup>3</sup>, Victor Caicedo<sup>4</sup>, Federico Núñez<sup>5</sup>,  
Sonia Pachón<sup>6</sup>, Bruno Marino<sup>7</sup>, Jaime E Bernal<sup>8</sup>, Alessandro De Luca<sup>9</sup>, Bruno Dallapiccola<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Universidad del Quindío, Armenia, Colombia. masasa@uniquindio.edu.co

<sup>2</sup> Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy, f.consoli@css-mendel.it

<sup>3</sup> Universidad del Rosario, Bogotá, Colombia. victoriavillegas@urosario.edu.co

<sup>4</sup> Clínica Shaio, Bogotá, Colombia, victorcaicedo@hotmail.com

<sup>5</sup> Clínica Shaio, Bogotá, Colombia, fedenunez@hotmail.com

<sup>6</sup> Clínica Shaio, Bogotá, Colombia, sopago@hotmail.com

<sup>7</sup> Department of Pediatrics, "Sapienza" University, Rome, Italy, Bruno.Marino@uniroma1.it

<sup>8</sup> Instituto de Genética Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, jebernal@javeriana.edu.co

<sup>9</sup> Casa Sollievo della Sofferenza Hospital, IRCCS, San Giovanni Rotondo, Italy, a.deluca@css-mendel.it

<sup>10</sup> Bambino Gesù Children Hospital, IRCCS, Rome, Italy, bruno.dallapiccola@opbg.net

Recibido: Agosto 30 de 2010

Aceptado: Marzo 7 de 2011

\*Correspondencia del autor. Universidad del Quindío-Programa Licenciatura en Biología y Educación Ambiental Calle 12N carrera 15.

Marleny Salazar Salazar Armenia Quindio. Colombia. Teléfono 57-6- 7454556. Telefax 576-7460111E- mail: masasauniquindio.edu.co

## RESUMEN

**Introducción:** El mosaicismo somático ocupa un papel importante en la patogénesis de muchos cánceres, además, se ha demostrado que es la base en algunos casos de ciertos trastornos genéticos. Este mecanismo genético se ha planteado teóricamente que sea pertinente para los defectos cardíacos congénitos, sobre todo cuando están aisladas, y en los últimos años, muchas mutaciones somáticas se han limitado a los tejidos cardiovasculares afectados que han sido identificados en pacientes con cardiopatías congénitas. Sin embargo, todas las variantes de la secuencia somáticos reportados hasta ahora en los defectos congénitos del corazón se identificaron en el ADN extraído de un archivo de tejidos fijados en formalina. **Materiales y métodos:** Se analizó una cohorte de 62 pacientes con defectos cardíacos congénitos en tejido fresco congelado en busca de mutaciones de los genes NKX2.5 y GATA4. **Resultados:** La exploración de la mutación del gen NKX2.5 de muestras de tejido cardíaco normal, afectado y de sangre, permitió la identificación de tres cambios diferentes de nucleótido único en 34 pacientes, incluyendo una variación no sinónima, un cambio polimórfico sinónimo y una variante común del gen en la región 3'UTR. Se observaron ocho secuencias variantes en el gen GATA4 en 9 pacientes no relacionados, incluyendo 3 cambios en la secuencia no sinónima, una variante sinónima, una variación en la región 5'UTR, y tres cambios intrónicos. No se encontraron pruebas de variantes somáticas en las secuencias de los genes NKX2.5 y GATA4 en ninguna de nuestras muestras. **Conclusiones:** El estudio permitió identificar mutaciones en los genes NKX2.5 y GATA4 en la cohorte de pacientes con cardiopatía congénita, pero no se encontraron las mutaciones somáticas en la población de estudio.

## ABSTRACT

**Background:** Aside from occupying a major role in the pathogenesis of many cancers, somatic mosaicism has been shown to underlie some cases of certain genetic disorders. This genetic mechanism has been theoretically considered as critical for congenital heart defects, particularly when isolated. Over the last past years, many somatic mutations, that only take place in cardiovascular tissues affected, have been identified in patients with congenital heart defects. However, all the somatic sequence variants reported so far in congenital heart defects were identified in DNA extracted from an archive of formalin fixed tissues. **Methods:** We analyzed a cohort of 62 patients with congenital heart defects in fresh frozen tissue for mutations of Nkx2.5 and GATA4 genes. **Results:** Mutation scanning of the NKX2.5 gene of pathologic cardiac tissue specimens allowed the identification of 3 different single nucleotide changes in 34 patients, including one non-synonymous variation, one synonymous polymorphic change and one common variant in the gene 3' untranslated region. Eight separate GATA4 sequence variations were found in 9 unrelated patients, including 3 non-synonymous sequence changes, one synonymous variant, one variation in the 5' untranslated region, and three intronic changes. We found no evidence of NKX2.5 or GATA4 somatic sequence variants in any of our samples. **Conclusions:** This study allows us to identify NKX2.5 and GATA4 mutations in our CHD cohort, but no somatic mutations were found in our population study.

## INTRODUCCIÓN

El mosaicismo somático se refiere a la condición en la que una mutación surge después de la fertilización de tal manera que sólo un subconjunto de células o tejidos presentan el defecto. Además de ocupar un papel importante en la patogénesis de muchos cánceres, el mosaicismo somático se ha demostrado como la base de algunos casos de ciertos trastornos genéticos (1). Este mecanismo genético se ha planteado teóricamente para la cardiopatía coronaria, sobre todo cuando están aisladas, y en los últimos años más allá de las mutaciones somáticas, la primera se limita a los tejidos cardiovasculares afectados que han sido reportados en las cardiopatías congénitas (CC). Los genes en los que las mutaciones somáticas se han encontrado incluyen GJA1 (2), NKX2.5 (3), TBX5 (4), GATA4 (5,6), HEY2 (7) y HAND1 (8,9). El grupo de Reamon-Buettner y Borlak ha informado que la mayoría de mutaciones somáticas de la enfermedad coronaria, incluye mutaciones en los genes NKX2.5, TBX5, GATA4, HEY2 y HAND1 (3-11). Ellos trabajaron con una colección de corazones malformados de la Universidad de Leipzig (Alemania) (3-7,10,11), que estaban fijados en formalina por más de 20 años, a los cuales le extrajeron ADN. En varios pacientes identificaron diferentes mutaciones en el mismo gen (3-11). Aunque sólo un número limitado de estudios se han sido realizados, la abundancia de las mutaciones somáticas relatadas por el grupo de Rea-

mon-Buettner y Borlak contrasta con el número limitado de mutaciones en otros estudios. No hay mutaciones asociadas al gen NKX2.5 en pacientes portadores de aneurisma con bloqueo auriculo-pulmonar (BAV) (12), y delección 22q11.2 (13). No se ha evidenciado una relación para las mutaciones somáticas del gen NKX2.5 en muestras de tejidos cardiacos frescos tomada cerca del defecto septal de pacientes con CIA, CIV y DSV (14). Por lo tanto, el papel de las mutaciones somáticas en las CC espera una confirmación posterior. En el presente trabajo, hemos tratado de abordar la hipótesis de que un mosaicismo somático es importante en las CC aisladas para el análisis de mutaciones de los genes y GATA4 NKX2.5 en el tejido fresco obtenido de una serie de 62 pacientes con CHD sometidos a cirugía cardiaca.

## MATERIALES Y METODOS

Desde marzo 2008 hasta diciembre 2009, 54 pacientes (32 mujeres, 22 hombres) fueron evaluados en la consulta de cardiología de la Fundación AboodShaio, Hospital San Ignacio, Bogotá, Colombia y catorce pacientes del Hospital Monaldi, Universidad de Nápoles, Nápoles, Italia (4 mujeres, 10 hombres). En todos los pacientes, el diagnóstico cardiaco fue confirmado por uno o más de las siguientes pruebas: ecocardiografía, cateterismo cardíaco y una intervención quirúrgica. Los pacientes con malformaciones extracardiacas y/o con dismorfias faciales en el contexto de las anomalías cro-

**Tabla 1.** Lista de pacientes con Cardiopatía Congénita

Pacientes	Edad	Sexo	Diagnostico
1	3 meses	F	VSD (perimembranosa)
2	16 años	F	ASD (OS)
3	1 meses	M	TGA (IVS, DA)
4	7 años	F	ASD (OP)
6	27 días	M	CoA
7	10 días	F	CoA (DA)
8	4 años	M	SM
9	20 años	M	AVSD (partial AVCD, ASD, OP, MI)
10	10 años	F	ASD (OS)
11	4 años	F	VSD (Muscular)
12	4 años	F	VSD (perimembranosa)
13	10 años	M	CoA
14	2 años	F	ASD (OP)
15	1 años	M	VSD (perimembranoso)
16	10 años	F	VSD (SM) (Muscular)
17	4 años	F	ASD (OP)
18	17 años	F	ASD (OP)
19	2 meses	M	CoA
20	2 meses	F	CoA
22	4 años	M	CoA
24	11 m	F	TOF (AVCD) Parcial
25	6 años	F	VSD (DA) Tipo Ostiumsecundum
26	7 años	F	MI
27	1 año	M	VSD (Muscular)
29	29 años	F	ASD (OS)
30	35 días	F	CoA
31	2 meses	M	CoA
32	6 meses	F	AVSD (AVCD) (Parcial)
33	1 días	F	VSD (muscular)
34	4 días	F	CoA (ASD, DA)
35	4 años	F	TAVR
36	5 meses	F	AVSD (AVCD) _(Complete)
38	2 años	F	AVSD (AVCD) Complete)
39	4 años	F	ASD (OS)
41	10 años	M	VSD (muscular)
43	11 años	M	VSD (Perimembranoso)
44	10 años	F	VSD (Perimembranoso)
46	20 días	F	CoA
47	3 meses	F	CoA
48	14 años	M	BAV (AVI)
49	3 años	F	VSD (Supracristal)

Pacientes	Edad	Sexo	Diagnostico
50	3 años	F	VSD (Muscular)
51	10 años	F	ASD (OS)
52	13 años	M	CoA
53	6 meses	F	VSD (Muscular)
54	1 meses	M	CoA
55	6 meses	M	CoA
56	14 años	M	VSD (Supracristal)
HD1372	1 año	M	ASD (OS)
HD1374	2 años	F	CTGA (VSD, DXC)
HD1377	11 meses	M	TOF (RAA)
HD1462	3 meses	M	VSD (perimembranoso)
HD1463	10 años	M	ASD (OS, PS, PLSVC, PDA)
HD1464	4 meses	F	VSD (PVD, ASD FO-type, PDA)
HD1466	4 meses	F	TA (type I)
HD1468	3 meses	M	AVSD (complete AVCD)
HD1469	18 años	F	AS (subvalvular)
HD1470	17 años	M	Multiple VSD (subaortico)
HD1472	1 año	M	TOF
HD1473	4 meses	M	AS (BAV)
HD1474	28 meses	M	AVSD (AVCD)
HD1475	15 años	M	TOF

CHD defecto congénito del corazón; M, hombre; F, mujer; VSD defecto septal ventricular; ASD defecto septal atrial; OS ostium secundum; RA atrium derecho; TGA transposición de grandes arterias; IVS septum ventricular intacto; DA ductus arterioso; OP ostium primum; CoA coartación de la aorta; SM membrana subaórtica; AVSD defecto septal atrioventricular; AVCD canal del defecto atrioventricular; MI insuficiencia mitral; MV válvula mitral; TOF tetralogía de Fallot; AVCD defecto del canal atrioventricular; RV ventriculo derecho; TAVR retorno venoso anómalo total; BAV válvula de la aorta bicúspide; AVI insuficiencia de la válvula aortica; (CTGA); válvula corregida de transposición de grandes arterias; DXC dextrocardia; RAA arco aórtico derecho; IS septum infundibular; PS stenosis pulmonar; PLSVC vena cava superior persistente;

mosómicas, síndromes mendelianos, las asociaciones y los pacientes con una microdeleción 22q11.2 fueron excluidos del estudio. Todos los pacientes fueron diagnosticados con cardiopatías esporádicas. En todos los pacientes se tomó una muestra de tejido normal (sangre periférica y tejido cardíaco sin la enfermedad) y una muestra de tejido fenotípicamente anormal (una biopsia cardíaca de aproximadamente 0.5-1.5 ug ubicado (1-3 mm)) cerca del defecto. Las muestras de tejido fueron adquiridos durante el proceso quirúrgico e inmediatamente fueron congelados a -80 °C. Las muestras de sangre se recolectaron antes de la transfusión. El consentimiento informado, se obtuvo de todos los pacientes. El ADN genómico fue aislado a partir de tejido patológico cardíaco, la sangre y el tejido cardíaco no afectado mediante el procedimiento habitual.

Las regiones codificantes completas, incluidos los límites intrón-exón, de los genes NKX2.5 y GATA4, se amplificaron mediante PCR y el análisis de mutaciones por medio de de la Cromatografía Denaturante líquida de alta resolución (DHPLC) utilizando un sistema WAVE (Transgenomic, Omaha, NE). 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 elGenBank (Nkx2.5 [NM\_004387.3], GATA4 [NM\_002052 .3]) y las regiones genómicas correspondientes. Los productos de PCR que mostraron un perfil anormal en la DHPLC volvieron a ser amplificados y procesados a través de columnas de purificación de PCR (Qiagen, Hilden, Alemania) y secuenciados utilizando el secuenciador ABI BigDye Terminator Kit v.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y ABI 3130 Analyzer (Applied Biosystems). Las muestras que indicaron cambios de bases en el ADN se amplificaron por PCR y se secuenciaron en dos ocasiones.

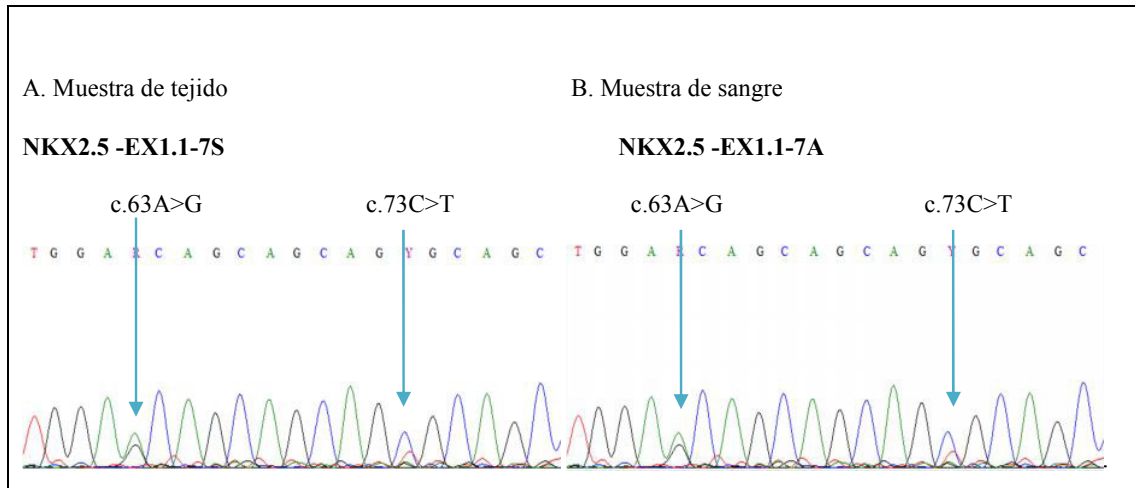
La herramienta que se utilizó para analizar el nivel de conservación de las variantes de la secuencia de genes ortólogos fue El NCBI HomoloGene [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=homologene&Cmd=Retrieve&list\\_uids=4117](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=homologene&Cmd=Retrieve&list_uids=4117).

## RESULTADOS

Los genes NKX2.5 y GATA4 se secuenciaron en 62 personas con diversas de enfermedades del corazón no sindrómica, predominando el diagnóstico de defectos septales cardíacos y malformaciones obstructivas del lado izquierdo (Tabla 1). Para determinar si alguna de

las variaciones de la secuencia identificados en el tejido afectado era de la línea germinal o somática, además de muestras de ADN del tejido cardíaco afectado, también se examinó en cada paciente las muestras de sangre y tejidos fenotípicamente normal. La secuenciación directa y DHPLC (exones 1,1, 1,2, 2,1 y 2,2) del gen de NKX2.5 de las muestras de ADN de tejidos y sangre, permitió la identificación de tres cambios de nucleótido único en 34 pacientes, incluyendo una variación no sinónimo, un cambio sinónimo polimórfico y una variación en la región 3 UTR. En el gen NKX2.5 se observó un cambio de sentido (c.73C>T; p.Arg25Cys) (15-21), fue identificado en heterocigosis en dos pacientes con coartación de la aorta (pacientes 7 y 52), el paciente 7 también, presentaba un cambio sinónimo del polimorfismo (63A> G). Figura 1 El cambio sinónimo de un polimorfismo de nucleótido único común (63A> G) (refSNP: rs2277923), se identificó en 34 de 62 pacientes, 11 de 18 (61%) con CIV, 4 de 11 (36%) con TEA, 8 de 14 (57%) con CoA, 2 de 4 (50%) con TOF, 2 de 2 (100%) con AS, uno con TGA, SM, DSVA, BAV, PS, y TA. La tercera secuencia variante (c.\* 61G>T) es otra forma común de SNP (refSNP: rs703752) situadas dentro de región no traducida 3'UTR del gen NKX2.5, se encontró en 20 de 62 pacientes, incluidos 4 de 18 (22 %) con CIV, 5 de 11 (45%) con ASD, 7 de 14 (50%) con CoA, 3 de 6 (50%) con DSVA, y uno con IM.

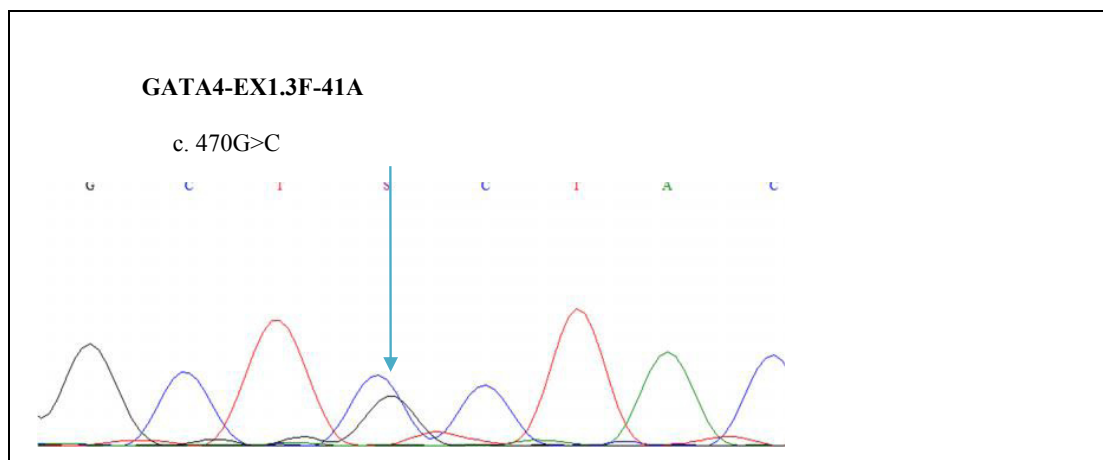
Ocho variaciones en la secuencia del gen GATA4 fue observada en 9 pacientes no relacionados, incluyendo 3 cambios en la secuencia no sinónima, una variante sinónima, una variación de la secuencia en la región 5'UTR, y tres cambios intrónicos. Todos los cambios se observaron en heterocigosis. Entre los cambios observados en el gen GATA4, la variante no sinónimos c.1129A>G (p.Ser377Gly) se encontró en dos individuos, mientras que los otros cambios en la secuencias fueron únicos. El p.Ser157Cys cambio no sinónimo (470C >G) se encontró en el tejido cardíaco afectado y la sangre de un paciente con CIV muscular (paciente 41) (Figura 2). El residuo Ser157 del gen GATA4 se conserva en el perro, vaca, ratón, rata, pollo, pez cebra y mosca de la fruta. Hasta donde sabemos, la variante c.470C>G no ha sido informado previamente. El cambio no sinónimo p.Ser377Gly (c.1129A>G) es un SNP que se informó anteriormente (refSNP: rs3729856) y se encontró en un paciente con comunicación interventricular subaórtica con membrana (paciente 16) y en un individuo con coartación de la aorta (el paciente 19), mientras que la variante p.Val380Met no sinónima (c.1138G> A) fue identificada en un paciente con diag-



**Figura 1.** Electroferograma de las muestras de tejido y sangre del paciente 7 con coartación de la aorta. Se observan dos cambios uno en la variante sinónima c. 63A>G y un cambio de sentido c.73C>T.

nóstico de defecto del canal atrioventricular (paciente 38). Se determinó previamente que p.Ser377Gly y alteraciones p.Val380Met son polimorfismos presentes en cromosomas control (22)]. Además, de cambios en la secuencia no sinónimos, se identificó tres nuevas variantes intrónicas (c.IVS2 23 C>T, c.IVS3-14T>C, y IVS5-20G>A) en tres pacientes con comunicación interventricular (pacientes 1, 50, y HD1470), una nuevo cambio sinónimo (c.543C>T, p.Ala181Ala) en un sujeto con transposición de grandes arterias con tabique ventricular intacto (paciente 3) y una nueva sustitución

de nucleótidos que ocurren en la región 5' no traducida de GATA4 en un paciente con Coartación de la aorta (paciente 22). No se encontraron pruebas de variantes somática en la secuencia de los genes NKX2.5 GATA4 en nuestros análisis de mutaciones de los tejidos normales o 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 o muestras de sangre tomadas del paciente que indicaban que se trataba de variantes de la línea germinal.



**Figura 2.** Electroferograma del paciente 41 donde se observa: c.470G>C (Ser157Cys) que presentaba defecto septal ventricular



## DISCUSIÓN

En una serie de documentos pertinentes, Borlak y sus colegas han tratado de abordar la hipótesis de que un mosaicismo somático es importante en la enfermedad coronaria aislada mediante la colección corazones de Leipzig, que incluye 68 corazones fijados en formalina de los pacientes con TEA, CIV, y AVSDs, algunos en el contexto de las complejas enfermedades del corazón, que fueron recogidos entre 1954 y 1982 (3-6,9,10). Los autores seleccionaron múltiples factores de transcripción pertinentes para el desarrollo cardíaco, tales como NKX2.5, TBX5, GATA4, HEY2 y HAND1 y encontraron muchas mutaciones en tejidos enfermos (3-6,9,10). Algunos pacientes presentaron múltiples mutaciones sin sentido, que eran sobre todo ausentes en el tejido cardíaco no afectado de los mismos pacientes. En el presente estudio, nos propusimos corroborar estos hallazgos importantes mediante la investigación de las mutaciones de GATA4 NKX2.5 en muestra congelada fresca de tejido cardíaco de los pacientes con enfermedad coronaria no sindrómica. Los diagnósticos predominantes en nuestra cohorte CHD fueron los defectos septales cardíacos porque representaban los mismos tipos de malformaciones cardíacas en los informes anteriores (3-8,10,11). A pesar de los extraordinarios resultados obtenidos por Borlak y sus colegas utilizando el ADN aislado de los tejidos de archivo, no se encontraron pruebas de variantes somáticas de los genes NKX2.5 y GATA4 en ninguna de las 62 muestras de CHD descritas en este estudio. Por el contrario, nuestros resultados son consistentes con los resultados obtenidos recientemente por Draus y sus colegas, quienes no encontraron ninguna mutación somática en NKX2.5 una serie de 28 tejidos cardíacos tomada cerca del defecto septal de pacientes con defectos del septo atrial, defectos del tabique ventricular y defectos septalesatrioventriculares (14). Al igual que nosotros, en lugar de utilizar ADN extraído de tejido fijado en formalina después de décadas de almacenamiento, Draus y sus colegas usaron tejido cardíaco fresco congelado. Dado que la formalina puede causar daños de forma aleatoria y afectar la fidelidad reacción en cadena de la polimerasa (23), se plantea la hipótesis de que la calidad del ADN es pobre en el tejido fijado en formalina usada por Reamon-Buettner y Borlak que podría haber influido en la gran cantidad de mutaciones somáticas en su estudio (14). Para reforzar su hipótesis analizó bases de datos disponibles con espectro mutacional y señaló que los espectros de mutación somática de los estudios Reamon-Buettner son significativamente diferentes de

las mutaciones de línea germinal NKX2.5 así como significativamente diferente de la enfermedad hereditaria y mutaciones asociadas, al tumor derivado de mutaciones somáticas, y las mutaciones mitocondriales (14). Puede haber explicaciones alternativas también por qué no hemos visto las mutaciones somáticas en nuestros tejidos. Podría ser posible que los mosaicos del corazón se limitaran a unas pocas células cardíacas y la DHPLC no fue capaz de detectarlos, o que se examinaron el tejido cardíaco equivocado. No obstante, esta hipótesis parece altamente improbable. Los datos de mutación somática de los estudios previamente publicados fueron obtenidos mediante la secuenciación convencional. Aquí usamos DHPLC, la cual se comprobó consistentemente como una técnica de detección de la mutación más robusta que la secuenciación directa en la identificación de un mosaicismo de bajo nivel (24). Además, todas las muestras de tejido del presente estudio fueron tomadas fenotípicamente de tejidos anormales dentro o muy cerca del defecto cardíaco específico, excepto que haya diferencias en la localización del tejido de muestreo entre los estudios que pueden dar cuenta de la discrepancia en los resultados.

Aunque no se encontraron pruebas de variantes somáticas mediante DHPLC, identificamos tres secuencias variantes en el gen NKX2.5 y ocho en el gen GATA4 en la línea germinal en nuestra cohorte CHD, demostrando que nuestra protocolo exploración para detectar mutaciones es bastante sensible para identificar las variaciones de la secuencia de estos genes. Dos pacientes afectados por CoA fueron heterocigotos para una variante de la secuencia conocida del gen NKX2.5, el c.73C>T, p.Arg25Cys. Esta variante ha sido asociada a diversas anomalías del corazón (15-19,21), así como disgenesia tiroidea sin defectos cardíacos (20). Sin embargo, la variante p.Arg25Cys también se ha observado en los controles no afectados de diferente origen étnico (15, 20) y se comprobó que no segregan con la enfermedad en ciertas familias (18, 21).

Se encontraron nueve pacientes con variantes en la secuencia en el gen GATA4. Un paciente con CIV muscular una secuencia variante sinónima heterocigota para del gen GATA4 no reportada previamente, p.Ser157Cys. Podría ser posible que este cambio representa un cambio de sentido variante de muestreo no probabilístico, en la medida en la cual modificó un amino ácido conservado evolutivamente. También se encontró en un caso una secuencia variante sinónima (p.Ala181Ala) en el gen GATA4. Estudios recientes también han iden-

tificado algunas enfermedades genéticas asociadas con la “ mutaciones silenciosa” (25]. Respecto a las dos otras variantes no sinónimas en GATA4 (p.Ser377Gly y p.Val380Met), aunque no se puede descartar por completo efectos deletéreos menores sobre la morfogénesis cardíaca, han sido previamente reportados en los controles no afectados y tienen más probabilidades de representar cambios benignos en las secuencia. Además, tres nuevas variantes intrónicas (c.IVS2 23 C>T, c.IVS3-14T> C, y c.IVS5-20G>A) y un cambio de secuencia 5'UTR (c.-193G>C) también fueron identificados en pacientes con CIV y puede dar lugar a productos alternativos, unidas longitudinalmente o posiblemente causar incremento / decremento de la eficacia de traducción del gen GATA4.

Nuestro estudio permitió identificar mutaciones en los genes NKX2.5 y GATA4 en nuestra cohorte de pacientes con cardiopatía congénita (CHD), pero no fuimos capaces de replicar los hallazgos publicados anteriormente por Reamon-Buettner. Ellos, 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 congelado. 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 cardíaca. 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.

## CONCLUSIONES

Las mutaciones en los genes NKX2.5 y GATA4 se encontraron en sangre, tejido cercano al defecto y en sangre. En 27/54 pacientes diagnosticados con cardiopatía congénita presentaron el polimorfismo Glu21Glu que representa el 50% del total de la población estudiada. Se identificaron 10 mutaciones en el gen NKX2.5 y 10 mutaciones en el gen GATA4. Se encontró un c.470G>C-Ser157Cys en el gen GATA4. Esta mutación no está reportada en la literatura. Además, se identificaron ocho pacientes con mutaciones en los genes NKX2.5 y GATA4, demostrando que estos genes actúan sinérgicamente para hacer su función, y estas mutaciones pueden alterar el normal funcionamiento del corazón.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los pacientes que donaron las muestras de sangre y tejido cardíaco para la realización del presente estudio.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* 2002; 3:748-758.
2. Dasgupta C, Martinez AM, Zuppan CW, Shah MM, Bailey LL, Fletcher WH. Identification of connexin43 (alpha1) gap junction gene mutations in patients with hypoplastic left heart syndrome by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Mutat Res* 2001; 479:173-186.
3. 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.
4. Reamon-Buettner SM, Borlak J. TBX5 mutations in non-Holt-Oram syndrome (HOS) malformed hearts. *Hum Mutat* 2004; 24:104.
5. Reamon-Buettner SM, Cho SH, Borlak J. Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD). *BMC Med Genet* 2007; 8:38.
6. Reamon-Buettner SM, Borlak J. GATA4 zinc finger mutations as a molecular rationale for septation defects of the human heart. *J Med Genet* 2005; 42:e32.
7. Reamon-Buettner SM, Borlak J. HEY2 mutations in malformed hearts. *Hum Mutat* 2006; 27:118.
8. Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Inga A, Borlak J. A loss-of-function mutation in the binding domain of HAND1 predicts hypoplasia of the human hearts. *Hum Mol Genet* 2008; 17:1397-1405.
9. Reamon-Buettner SM, Ciribilli Y, Traverso I, Kuhls B, Inga A, Borlak J. A functional genetic study identifies HAND1 mutations in septation defects of the human heart. *Hum Mol Genet* 2009; 18:3567-3578.
10. Reamon-Buettner SM, Borlak J. Somatic mutations in cardiac malformations. *J Med Genet* 2006; 43:e45.
11. Reamon-Buettner SM, Hecker H, Spanel-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.
12. Majumdar R, Yagubyan M, Sarkar G, Bolander ME, Sundt TM, 3rd. Bicuspid aortic valve and ascending aortic aneurysm are not associated with germline or somatic homeobox NKX2-5 gene polymorphism in 19 patients. *J ThoracCardiovascSurg* 2006; 131:1301-1305.
13. Rauch A, Hofbeck M, Cesnjevar R, et al. Search for somatic 22q11.2 deletions in patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A* 2004; 124A:165-169.
14. Draus JM, Jr., Hauck MA, Goetsch M, Austin EH, 3rd, Tomita-Mitchell A, Mitchell ME. Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease. *J Med Genet* 2009; 46:115-122.
- Goldmuntz E, Geiger E, Benson DW. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation* 2001; 104:2565-2568.
15. McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Benson DW, Goldmuntz E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am CollCardiol* 2003; 42:1650-1655.
16. Akcaboy MI, Cengiz FB, Inceoglu B, et al. The effect of p.Arg25Cys alteration in NKX2-5 on conotruncal heart anomalies: mutation or polymorphism? *PediatrCardiol* 2008; 29:126-129.
17. Gioli-Pereira L, Pereira AC, Mesquita SM, Xavier-Neto J, Lopes AA, Krieger JE. NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol* 2008.
18. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999; 104:1567-1573.
19. Dentice M, Cordeddu V, Rosica A, et al. Missense mutation in the transcription factor NKX2-5: a novel molecular event in the pathogenesis of thyroid dysgenesis. *J ClinEndocrinolMetab* 2006; 91:1428-1433.
- 20.

21. Esposito G, Grutter G, Drago F, et al. Molecular analysis of PRKAG2, LAMP2, and NKX2-5 genes in a cohort of 125 patients with accessory atrioventricular connection. *Am J Med Genet A* 2009; 149A:1574-1577.
22. Schluterman MK, Krysiak AE, Kathiriya IS, et al. Screening and biochemical analysis of GATA4 sequence variations identified in patients with congenital heart disease. *Am J Med Genet A* 2007; 143A:817-823.
23. Quach N, Goodman MF, Shibata D. In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC ClinPathol* 2004; 4:1.
24. Jones AC, Sampson JR, Cheadle JP. Low level mosaicism detectable by DHPLC but not by direct sequencing. *Hum Mutat* 2001; 17:233-234.
25. Bottillo I, De Luca A, Schirinzi A, et al. Functional analysis of splicing mutations in exon 7 of NF1 gene. *BMC MedGenet* 2007; 8:4.