



**DESCRIPCIÓN CLINICO- DEMOGRAFICA Y ANALISIS MOLECULAR DEL GEN
FOG2 EN PACIENTES CON HERNIA DIAFRAGMATICA CONGENITA**

LUCY JOHANNA ESPINOSA MUÑOZ

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial para optar por al título de
BACTERIOLOGA**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA – BOGOTA –
INSTITUTO DE GENÉTICA HUMANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BACTERIOLOGÍA
BOGOTA D.C. 2010**



**DESCRIPCION CLINICO- DEMOGRAFICA Y ANALISIS MOLECULAR DEL GEN
FOG2 EN PACIENTES CON HERNIA DIAFRAGMATICA CONGENITA**

LUCY JOHANNA ESPINOSA MUÑOZ

APROBADO

Dr. Ingrid Schuler García, Ph.D.
Decana académica
Facultad de ciencias

Diana Patiño C. MSc.
Directora
Carrera de Bacteriología



**DESCRIPCION CLINICO- DEMOGRAFICA Y ANALISIS MOLECULAR DEL GEN
FOG2 EN PACIENTES CON HERNIA DIAFRAGMATICA CONGENITA**

LUCY JOHANNA ESPINOSA MUÑOZ

APROBADO

Ignacio Zarante Montoya. MD.MSc
Instituto de Genética Humana-PUJ
Vigilancia de Malformaciones Congénitas
DIRECTOR

Paola Ayala. Bact.
Instituto de Genética Humana- PUJ
Vigilancia de Malformaciones Congénitas
CODIRECTORA

Adriana Ordoñez. Bact. MSc. MPhil
Instituto de Genética Humana- PUJ
JURADO

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

*A Dios por permitirme llegar a este momento de mi vida.
A mi angelito que esta en el cielo porque tengo la certeza que
desde allí me acompaña cada día y se que esta orgulloso de
los logros que he obtenido.
A mi familia por estar en cada paso de mi camino,
especialmente a mi mamá y mi hermana por ser el motor que
me impulsa cada día.
Y a mi novio y amigos por su a apoyo incondicional.
Desde lo más profundo de mi corazón... Gracias.*

Lucy Johanna Espinosa Muñoz.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerle a Dios por llenar mi vida de hermosas bendiciones y haber puesto en mi camino la oportunidad de realizar este trabajo de grado.

A la Pontificia Universidad Javeriana particularmente al Instituto de Genética Humana y a cada uno de sus trabajadores por abrirme sus puertas y recibirme con el mayor afecto permitiéndome hacer uso de sus instalaciones y equipos brindándome toda su colaboración en todo este proceso.

Al Dr. Ignacio Zarante por la confianza depositada en mí dándome la oportunidad de hacer parte de este proyecto y por compartir sus valiosos conocimientos, durante todo el proceso.

A la doctora Paola Ayala por su dedicación, apoyo, constante acompañamiento, por todas sus enseñanzas e invaluable guía para culminar satisfactoriamente este proyecto.

A mi familia, novio y amigos por acompañarme en todas las fases de este proceso, por no dejarme desfallecer y porque en cada momento difícil me dieron una palabra de aliento que me fortaleció, siendo el motor que me impulso para culminar este mi sueño.

A la Doctora Luisa Gutiérrez porque en el momento más difícil de este proceso me brindo su invaluable ayuda y apoyo, claves para lograr la consecución de este objetivo.

Y a todas aquellas personas que de una y otra forma hicieron parte de este proceso brindándome su importante colaboración.

RESUMEN

La hernia diafragmática congénita (HDC) es una malformación común del neonato ocasionada por el cierre incompleto de la membrana pleuroperitoneal lo que ocasiona que los órganos abdominales entren en la cavidad pleural; dependiendo el grado de afectación en el cierre del diafragma y debido a la hipertensión arterial e hipoplasia pulmonar ocasionada por la invasión de las vísceras abdominales en la cavidad torácica la tasa de mortalidad es alta alcanzando hasta un 75% (Sadler., 2007). La etiología de la enfermedad aún no es bien conocida, sin embargo dentro de las posibles causas genéticas el gen FOG2 ha sido propuesto como gen candidato para esta patología por estar implicado en el desarrollo del diafragma y los pulmones.

El gen FOG2 codifica para una proteína de tipo factor de transcripción con dominios distintos de zinc, su función es ampliamente reconocida como un cofactor para la familia de factores GATA controlando su transcripción en el núcleo (Clugston R et al. 2008). Este gen se expresa en los tejidos del mesodermo incluyendo mesénquima pulmonar, mesotelio y pliegues pleuroperitoneales (Goumy C.2009).

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue realizar la descripción clínico-demográfica y evaluar mediante la técnica de secuenciación la presencia de variantes en la secuencia del exón 7 del gen FOG2 en pacientes con Hernia Diafragmática Congénita de 3 ciudades colombianas y una brasilera correspondiente a 12 muestras de sangre venosa de individuos con este tipo de malformación, con el fin de aportar datos que pueden contribuir acerca de la fisiopatología de la enfermedad y poder brindar una mejor asesoría genética.

Los resultados de la secuenciación en 6 de las 12 muestras analizadas de pacientes con diagnóstico de Hernia Diafragmática Congénita y en la muestra control mostraron el hallazgo del polimorfismo c.964+79G>A que se halla en la región del intrón 7 del gen FOG2, este polimorfismo ya se encuentra reportado en la literatura pero no hay estudios que demuestre su función.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	12
1. Justificación y Planteamiento del problema	14
2. Marco teórico	16
2.1 Malformaciones Congénitas	16
2.2 El diafragma	19
2.3 Hernia diafragmática Congénita	21
2.4 Gen FOG2	24
2.5 Polimorfismo	26
3. Objetivos	28
3.1 Objetivo general	28
3.2 Objetivos específicos	28
4. Metodología	29
4.1 Diseño de estudio	29
4.2 Población de estudio	29
4.3 Descripción General y demográfica de los casos	30
4.4 PROCEDIMIENTO	30
4.4.1 Recolección de la muestras	30
4.4.2 Extracción de ADN	30
4.4.3 Cuantificación de ADN	31
4.4.4 Amplificación de ADN	31
4.4.5 Secuenciación y análisis	31
4.5 Correlación genotipo- fenotipo	32
5. Resultados	33
6. Discusión	36
7. Conclusiones	39
8. Recomendaciones	40
9. Bibliografía	41
10. Anexos	45
10.1 Formato Ficha ECLAMC	45
10.2 Consentimiento informado	46

10.3 Extracción de ADN genómico (Método de Probé)	47
10.4 Extracción de ADN genómico a partir de papel filtro (Chelex-100)	49
10.5 Protocolo PCR (Exón 7) gen FOG2	50
10.6 Protocolo preparación de geles de agarosa	51
10.7 Protocolo purificación de ADN	52

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema del aumento del riesgo de anomalías congénitas durante la organomegália.	16
Figura 2. Esquema de la visión inferior del diafragma de un recién nacido que indica el origen embriológico de sus componentes	19
Figura 3. Desarrollo del Diafragma.	20
Figura 4. Herniación del contenido abdominal en la cavidad torácica	21
Figura 5. Representación esquemática de la estructura genómica de FOG2	24
Figura 6. Mutación en FOG2 encontrada en un paciente con anomalías en diafragma y pulmones.	26
Figura 7. Cromatograma mostrando el polimorfismo c.964+79G>A	35
Figura 8. Alineamiento genómico	38

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Variantes encontradas en la secuencia del gen FOG2 en pacientes con HDC.	25
Tabla 2. Descripción de características clínicas de pacientes con HDC.	33
Tabla 3. Frecuencias del polimorfismo reportadas para diferentes poblaciones.	37

INTRODUCCION

La hernia diafragmática congénita un defecto en el desarrollo del diafragma, su sello distintivo es un defecto en su porción muscular o tendinosa, lo que permite a las vísceras abdominales el paso hacia la cavidad torácica. El diafragma se forma gracias a la fusión de cuatro estructuras embrionarias: el septum transversum, el mesenterio del esófago, los pliegues pleuroperitoneales (PPF) y la pared corporal. Causa insuficiencia respiratoria grave en los recién nacidos, tiene una incidencia mundial aproximada de 1 en 2500 nacimientos y representa cerca del 8% de las anomalías congénitas mayores (Montedónico. 2008). En mayor proporción el defecto se da en la parte izquierda del diafragma, siendo esta localización aproximadamente el 80% de los casos, la mayoría ocurre de manera aislada, sin embargo también ha sido asociado a anomalías cromosómicas como la trisomías 13 y 18 u otras malformaciones como enfermedades cardíacas congénitas, espina bífida y anomalías urológicas entre otras.

Se han implementado estrategias en diagnóstico prenatal, reanimación, cuidados intensivos, y terapias postnatales para disminuir las altas tasas de morbilidad y mortalidad que son de aproximadamente del 40-50% (Peetsold M.2009), pero aun así siguen siendo elevadas debido a la hipoplasia pulmonar causada por el desarrollo anormal del lecho vascular pulmonar, motivo que ha estimulado el incremento en la investigación a nivel mundial con el objetivo de dilucidar la etiopatogenia exacta de la enfermedad

Estudios retrospectivos sugieren mutaciones de línea germinal en los genes de factores de transcripción, poniendo en manifiesto el importante papel de regulación transcripcional en la patogénesis de la enfermedad. La haploinsuficiencia de los factores de transcripción es una causa establecida de CDH, los factores de transcripción identificados regulan directa o indirectamente la expresión de genes críticos para la correcta función de células mesenquimales en el desarrollo del diafragma. FOG2 es un factor de transcripción dedos de zinc que se

expresa en el diafragma embrionario, esta ubicado en el brazo largo del cromosoma 8 y han sido observados cambios en su estructura en pacientes con HDC.

Finalmente con este estudio de tipo descriptivo experimental se pretende realizar la descripción clínico-demográfica y analizar mediante la técnica de secuenciación la presencia de variantes en la secuencia del exón 7 del gen FOG2 en pacientes con Hernia diafragmática congénita, haciendo su respectiva correlación genotipo-fenotipo con el fin de aportar datos que pueden aportar sobre la fisiopatología de la enfermedad y para brindar una mejor asesoría genética.

1. Justificación y Planteamiento del Problema

Las anomalías o también llamadas malformaciones congénitas hacen referencia a anormalidades estructurales, de la conducta, funcionales y metabólicas que ya se encuentran en el momento del nacimiento (Sadler., 2007) estas hacen parte de un problema de salud pública bastante significativo y que junto con las afecciones perinatales son la principal causa de muerte en niños menores de un año en la mayoría de países de Latinoamérica. La hernia diafragmática congénita (HDC) es una de las malformaciones más comunes en el neonato, a nivel mundial se estima que ocurre en aproximadamente 1 en 2000 a 3000 nacimientos, la supervivencia es baja debido a la hipoplasia pulmonar y la hipertensión arterial persistente que la acompañan en un grado variable, las cuales se asocian a una morbilidad y mortalidad significativa (Kantarci.,2007) aún con las diferentes modalidades de tratamiento que se han ido desarrollando para el mejor manejo de esta condición como la oxigenación membranar extracorpórea o inhalación de óxido nítrico que han conseguido aumentar las tasas de supervivencia hasta en un 90% en centros de atención de tercer nivel. (Van Loenhout.2009)

A pesar de los diferentes estudios realizados la etiología de la mayoría de los casos sigue siendo desconocida, sin embargo la evidencia recolectada apunta a causas genéticas, en aproximadamente el 60% de los casos. La Hernia Diafragmática Congénita es un defecto de nacimiento que puede ser clasificado como un defecto congénito aislado (No sindrómica o aislada) o puede asociarse con malformaciones adicionales (Sindrómica o No aislada) como lo son defectos cardiovasculares, alteraciones del sistema nervioso central, anomalías urogenitales, otros síndromes genéticos y diferentes anormalidades cromosómicas. (Poerber., 2008)

Las diferentes etiologías genéticas son complejas y posiblemente son resultantes de diferentes mutaciones en varias partes de las vías de desarrollo moleculares que se requieren para el desarrollo del diafragma (Ackerman et al). Diferentes estudios han sugerido que alteraciones en el gen FOG2, el cual es fundamental tanto para el desarrollo normal del diafragma como de los pulmones, se constituye como gen candidato causal de la malformación, puesto que según literatura este es la primera causa conocida del defecto diafragmático congénito no sindrómico, es por ello que

el estudio de mutaciones en este gen dentro de la población que padece la malformación puede contribuir con información substancial para dilucidar un poco mas el origen y desarrollo de la anomalía.

2. Marco teórico

2.1 Malformaciones congénitas

Las malformaciones congénitas (MC) son defectos del desarrollo, resultado muy temprano de alteraciones en el proceso de diferenciación en embriogénesis. La mayor parte de las mismas son de etiología multifactorial, producto de la interacción de una determinada predisposición genética con factores ambientales muy diversos (radiación, agentes químicos, infecciones etc.). En general se ignora cuales, y que tantos genes son responsables de la mencionada predisposición y que tipo de factores ambientales pudieran estar involucrados (Guisar J. et al. 2000). La mayor parte de las malformaciones congénitas se originan desde la tercera a la octava semana de la gestación que corresponde al periodo de sensibilidad máxima, ya que es el periodo durante el cual ocurre la formación de los órganos, como se muestra en la figura 1.

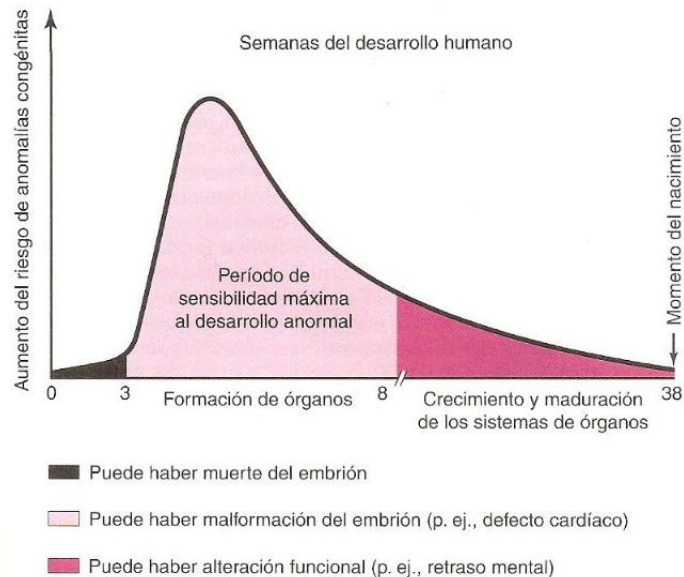


Figura 1. Esquema del aumento del riesgo de anomalías congénitas durante la organomegalia. Tomado de Moore K, Persaud T. V. N. 2008. Embriología Clínica. 8va edición. Barcelona. Pág. 475.

Se encuentran anomalías estructurales importantes en un 2 a 3 % de los recién nacidos vivos y otro porcentaje igual se reconoce en niños al llegar a los 5 años, lo que hace un total de 4 a 6 %, pueden darse anomalías menores en el 15% de los recién nacidos; Los bebés con una sola anomalía leve tienen un 3% de probabilidad de tener una malformación mayor, los que presentan dos anomalías tienen una probabilidad del 10% y aquellos con tres anomalías tienen una probabilidad del 20% (Gokhale S. 2009). Las anomalías congénitas son la causa principal de mortalidad infantil, ya que representan aproximadamente el 21% de todas las muertes en la infancia además de no tener un carácter discriminatorio. Desde 1982 cuando ocupó el primer lugar entre las causas de muerte infantil en los Estados Unidos de América, aumento el interés por estas enfermedades a nivel mundial. El mismo fenómeno ocurrió en varios países desarrollados donde disminuyó la incidencia de otras causas de morbi-mortalidad, como infecciones, bajo peso al nacer, etc. (Monsalve. 2007).

Las malformaciones congénitas también se suman a la morbilidad de los niños, ya que estas representan el 25% de los ingresos hospitalarios pediátricos y un tercio del total de días de hospitalización pediátrica anualmente en los Estados Unidos (Kase J. 2007). Aunque no existe una clasificación con aceptación universal las causas de las malformaciones congénitas comúnmente se dividen en causa desconocida en el 40 al 60% de los casos, los factores genéticos constituyen alrededor del 15%, los factores ambientales corresponden al 10%, influencias genéticas y ambientales (herencia multifactorial) es la causa de 20 a 25% y la gemelaridad produce del 0.5 al 1%. (Sadler., 2007)

En general, la frecuencia de los defectos congénitos de etiología genética tiene una distribución homogénea a escala mundial. En Colombia se estima que las malformaciones congénitas constituyen la segunda causa de muerte en menores de un año, contribuyendo con el 11% de los menores muertos; no obstante, si hubiera un conocimiento mas profundo y preciso de las causas de estas anomalías y de los grupos que tienen un mayor riesgo de padecerlas, se estima que podría ser posible lograr una prevención para al menos la mitad de ellas. (Zarante. 2009). Para el 2008 de las 10.517 defunciones en menores de un año, 2.396 corresponden a

malformaciones congénitas según las estadísticas vitales proporcionadas por el DANE (DANE., 2008).

El diagnóstico prenatal de defectos congénitos estructurales, ha permitido el mejor manejo del embarazo, posibilitando que muchas de estas patologías, que antiguamente desencadenaban muerte fetal o neonatal precoz, sean referidos a centros especializados mejorando su sobrevivencia en Unidades de Cuidados Especiales Neonatales. (Catalán.2005)

Todo ser humano tiene como derecho fundamental nacer sano, las repercusiones de una malformación congénita no son solo para el individuo que las padece sino también para quienes conviven con este y en general para toda la sociedad y es por esto mismo que la sociedad tiene una responsabilidad muy grande frente a esta problemática y el firme compromiso de buscar alternativas y soluciones que le permita formular alternativas para contrarrestar los efectos que estas acarrearán. Además de las razones éticas y morales que demandan que los gobiernos inviertan todo los recursos necesarios en salud pública para mejorar la calidad de vida de sus ciudadanos, hay que tener en cuenta los factores económicos debido a que claramente los gastos que se tengan en implementar medidas preventivas para las malformaciones congénitas no serán equiparables a los que se producirán cuando estas se produzcan.(Adler R. 1974)

Se ha estimado que el costo del tratamiento y manejo de las anomalías congénitas en Estados Unidos sobrepasa anualmente los US\$ 6 mil millones, sin incluir costos no médicos que cubren las familias; Es de vital importancia considerar la carga familiar de un niño con anomalías congénitas en nuestro medio desde un punto de vista médico y psicológico, puesto que la situación implica un miedo familiar a la estigmatización, a la falta de cobertura de la EPS y en algunos casos a la dificultad de entender adecuadamente la información acerca del menor afectado (García H. 2003), puesto que no todos los grupos familiares poseen el mismo nivel educativo que les facilitara el entendimiento de la situación y su manejo adecuado.

2.2 El Diafragma

El diafragma es un musculo plano y delgado, con forma de cúpula que separa las cavidades torácica y abdominal, que posee un tendón central e inserciones periféricas en el esternón, costillas y vertebras lumbares. Los nervios frénicos, ramas de las 3, 4 y 5 raíces cervicales comandan sus movimientos puesto que le proporcionan la inervación motora y sensitiva. El diafragma es una estructura mesodérmica que se forma entre la semana 4-10 del desarrollo embrionario. En su desarrollo participan cuatro componentes embrionarios (figura 2): El septum transversum ó tabique transverso, las membranas pleuroperitoneales, el mesenterio dorsal del esófago y el crecimiento muscular hacia el interior de las paredes corporales laterales. (Moore. 2008)

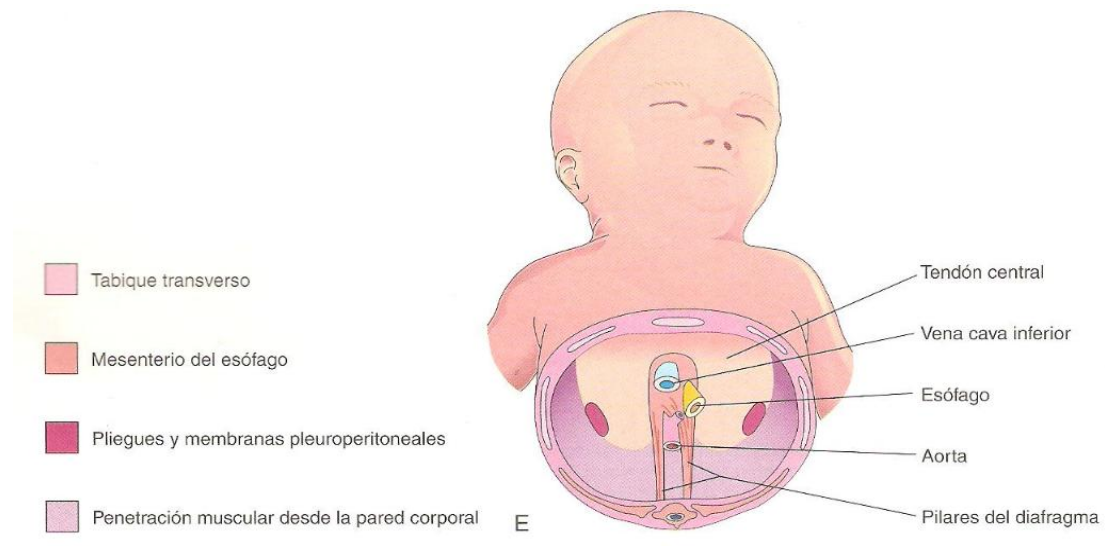


Figura 2. Esquema de la visión inferior del diafragma de un recién nacido que indica el origen embriológico de sus componentes. Adaptado de Moore K, Persaud T. V. N. 2008. Embriología Clínica. 8va edición. Barcelona. Pág. 152.

A pesar de que la cavidades pleural esta separada de la cavidad pericárdica, en las primeras etapas del desarrollo embrionario estas se mantienen comunicadas

directamente ya que el diafragma aun esta incompleto. Durante su desarrollo esa abertura que esta permitiendo la comunicación entre estas dos futuras cavidades se cierra gracias a pliegues en forma de media luna, los cuales se denomina pliegues pleuroperitoneales que se proyectan en el extremo caudal de los canales pericardioperitoneales (Figura 3 A). Este proceso sucede de manera progresiva extendiéndose medial y ventralmente, hasta que en la séptima semana se fusionan con el mesenterio del esófago en el cual se desarrollan los pilares del diafragma y con el septum transversum que forma su centro tendinoso (figura 3 B) terminando la conexión parcial existente entre estas dos cavidades. Posteriormente se produce la expansión de las cavidades pleurales en el mesénquima de la pared del cuerpo dando como resultado el agregado de un reborde periférico a las membranas pleuroperitoneales (figura 3 C), al estar ya formado el reborde, los mioblastos que tienen su origen en la pared del cuerpo irrumpen en las membranas y edifican la parte muscular del diafragma (Sadler. 2007). La región posterolateral del diafragma, la ultima en cerrarse, tiene la mayor incidencia en hernias congénitas. (Pérez., 1999)

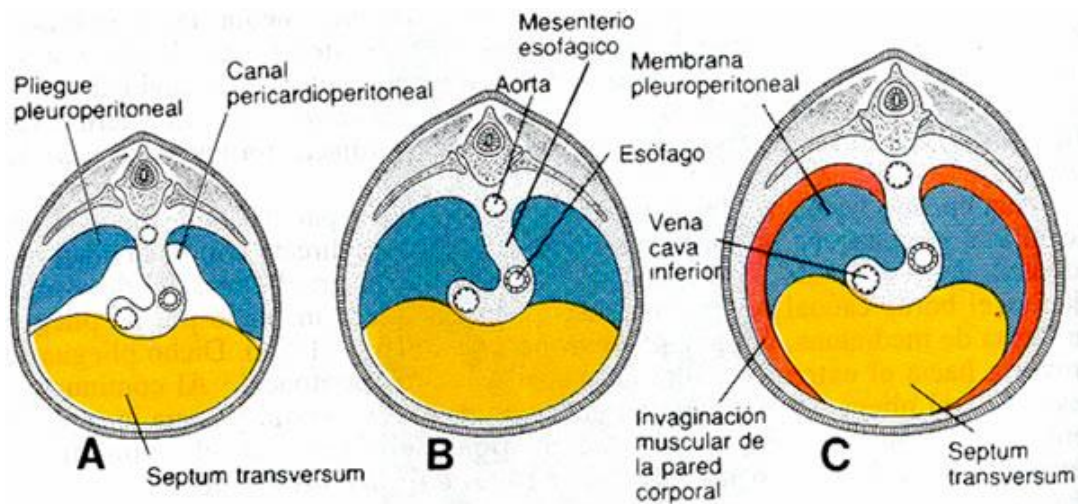


Figura 3. Desarrollo del Diafragma

Tomado de Sadler. L. 2007 Embriología medica con orientación clínica. Buenos Aires. Pág. 162

2.3 Hernia diafragmática congénita (HDC)

La Hernia diafragmática congénita corresponde a una alteración en el desarrollo normal del diafragma caracterizado por una ausencia de cierre de los canales pericardioperitoneales lo que va a permitir que haya un paso de las vísceras en desarrollo de la cavidad abdominal hacia la cavidad pleural (Figura 3). Si la masa visceral que se esta desplazando hacia esta cavidad es lo suficientemente grande llevara a que se entorpezca el adecuado desarrollo del pulmón de ese lado. (Larsen W. 2003)

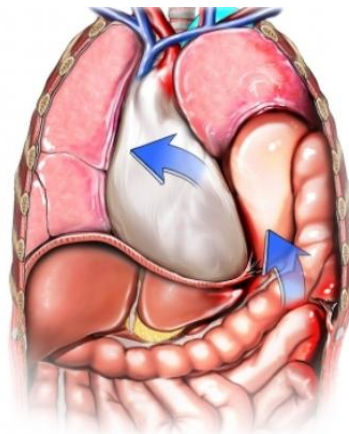


Figura 4. Herniación del contenido abdominal en la cavidad torácica

Tomado de Kohnle Diana. 2010. Hernia Diaframatica. Aurora Health Care. [en línea] Disponible en: <http://www.aurorahealthcare.org/yourhealth/healthgate/getcontent.asp?URLhealthgate=%22231248.html%22>.

Riverius fue el primero en describir la hernia diafragmática congénita en 1679, Morgagni describió diferentes tipos de hernia diafragmática en 1761 y en el siglo XIX Víctor Bochdalek describió sus autopsias de los niños con hernia diafragmática congénita. La Hernia diafragmática congénita ocurre en 1/2500 a 1/5000 nacidos vivos, estudios realizados en Colombia permitieron estimar que su incidencia en nuestro país es de 0.18 por cada 10000 nacidos vivos. No se han identificado defectos genéticos específicos causales en humanos y la mayoría de casos son

esporádicos. Algunos medicamentos tales como la piridoxina, la talidomida, la quinina y los fármacos antiepilépticos han sido implicados en la aparición de hernia diafragmática congénita. Sin embargo, su incidencia real es probablemente mayor debido a que algunos fetos con hernia diafragmática congénita severa mueren en el útero y son espontáneamente abortados. Ochenta y cuatro por ciento de la HDC están del lado izquierdo, el 14% del lado derecho, y el 2% bilaterales. La HDC esta a menudo asociada con enfermedades cardiacas, gastrointestinales, genitourinarias, anomalías esqueléticas o de los nervios y con trisomías. (De Buys Roessingh et. al 2009)

En mamíferos, el diafragma proporciona el soporte respiratorio ya que este se contrae induciendo así la expansión del tórax. De esta forma el diafragma induce una presión negativa para ayudar a entrar el aire a los pulmones. Por el contrario en la exhalación el diafragma ayuda a expulsar el aire de los pulmones por la relajación. Para evitar que los órganos abdominales se muevan de arriba abajo dentro del tórax durante la respiración, el diafragma físicamente separa el tórax del abdomen; siendo esta la característica alterada en la hernia diafragmática congénita. (Keijzer. 2010)

Las estructuras más comúnmente herniadas son: intestino delgado, estómago, parte del colon descendente, riñón izquierdo y lóbulo izquierdo del hígado ocupando el lado izquierdo del tórax provocando hipoplasia pulmonar. La severidad de ésta dependerá del momento de la vida fetal en que ocurrió la herniación y compresión, hay desviación del mediastino hacia la izquierda que puede provocar compresión e hipoplasia del pulmón contralateral. (Bolaños. 2005)

La hipoplasia pulmonar asociada con este defecto diafragmático causa una severa mortalidad y morbilidad. La relación entre la patogenia y el desarrollo entre los defectos del diafragma y la hipoplasia pulmonar aun no es comprendida. Aunque los avances en el tratamiento medico de la hipoplasia pulmonar pueden haber disminuido la mortalidad asociada con los pacientes que sobreviven a la HDC y reciben atención en centros de alto volumen, se ha reportado que la mortalidad de la población base puede ser tan grande como un 62% y hay un gran numero de

muerdes antes del nacimiento o del traslado a un centro de tercer nivel; Ya que estos pacientes suelen presentar insuficiencia respiratoria grave al nacer, la terapia se ha centrado en el desarrollo de mejores métodos para proporcionar soporte ventilatorio, mientras que no produzca más lesión pulmonar. La Oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) se utiliza en algunos centros para proporcionar un largo período de bypass cardiopulmonar, mientras que otros centros han éxito utilizando otras técnicas de soporte ventilatorio. La morbilidad en los que sobreviven es alta, y muchos pacientes sobreviven con insuficiencia respiratoria crónica, déficit cognitivo y neuromotor y pérdida de audición como consecuencia de las intervenciones intensivas necesarias y las anomalías estructurales irreversibles del desarrollo asociadas. (Ackerman et al. 2005)

La mayor parte de los individuos diagnosticados con HDC son el único miembro de sus familias con la afectación, por ello era visto típicamente como un defecto “esporádico” que erróneamente se comparaba con una alteración “no genética” (Pober BR. 2007).

Principalmente el diagnóstico de la HDC depende de la visualización del desplazamiento de los órganos abdominales dentro del tórax en una ecografía o en una resonancia magnética. Con el uso generalizado de la ecografía prenatal, las anomalías congénitas se diagnostican con una mayor frecuencia antes del nacimiento. En un estudio europeo se estima que hay una tasa del 59% de detección prenatal de la HDC, siendo la edad gestacional promedio del descubrimiento a las 24.4 semanas de gestación, es recomendable que luego de haber sido identificada la anomalía se remita a los pacientes a un centro de mayor nivel para que allí se le brinde un asesoramiento especializado y se le realicen pruebas más avanzadas ya que esto permitirá realizar predicciones del resultado postnatal del paciente ayudando al diseño de un plan de tratamiento. (Downard et.al 2003)

2.4 FOG 2

El gen FOG2 (De la familia de GATA 2) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 8, (8q23.1), esta compuesto por ocho exones y abarca 485 kb (Figura 5), codifica un proteína nuclear con dominios de dedos de zinc. La proteína de 1,151 aminoácidos que es ampliamente expresada por los miembros de la familia de factores de transcripción FOG, modulando la actividad de las proteínas de la familia GATA, que son importantes reguladores de la hematopoyesis y cardiogénesis en los mamíferos, y también juegan un papel en el desarrollo temprano gonadal, diferenciación sexual masculina, y la esteroidogénesis, de forma general en la embriogénesis temprana (Finelli., 2007); esta proteína es capaz de activar o regular una baja expresión de los genes blanco de los factores de transcripción GATA.

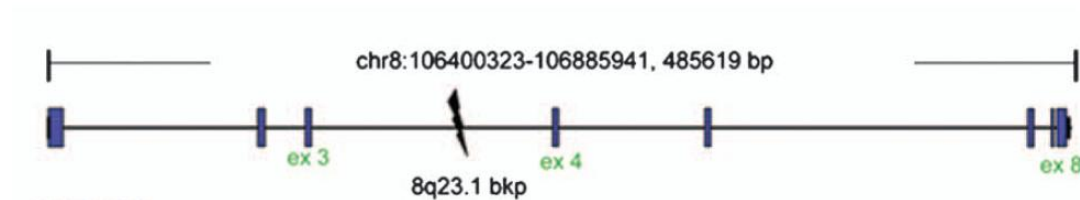


Figura 5. Representación esquemática de la estructura genómica de FOG2

Adaptado de Finelli P. Disruption of Friend of GATA 2 gene (FOG-2) by a de novo t(8;10) chromosomal translocation is associated with heart defects and gonadal dysgenesis. *Clinical Genetics* 2007. 71: 195–204

La proteína nuclear de la familia de GATA-2 (FOG2 también conocida como Zpfm2) es un represor transcripcional con dominios distintos de zinc que une a los miembros de la familia de factores transcripcionales GATA, este gen ha sido descrito por tener un papel importante en el desarrollo normal del diafragma tanto en humanos como en ratones; FOG2 se expresa en el septum transversum del diafragma durante la fase temprana de su desarrollo. En humanos este gen ha sido secuenciado en pacientes con defectos diafragmáticos encontrando mutaciones (tabla 1) que producen codones de parada prematuros (Bleyl SB. 2007).

Table 2 Sequence variants in the *FOG2* gene in patients with CDH

Gene	Exon	Nucleotide alteration	Amino acid substitution	Patient phenotype ^a	No. of patients ^b	Interpretation ^c	dbSNP	Het. score
<i>FOG2</i>	Exon 2	c.G292A	p.D98N	Bilateral CDH	1	SNP/in controls	–	–
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.C1231G	p.A403G	–	C = 0.91 G = 0.09	SNP	rs11993776	0.361
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.A1385G	p.P454P	–	A = 0.96 G = 0.04	Conservative substitution	rs920628	0.234
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.T1799C	p.P592P	–	T = 0.97 C = 0.03	Conservative substitution	rs16873732	0.117
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.A2107C	p.M703L	L CDH	1	Unknown	–	–
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.G2287A	p.V763I	R CDH	1	SNP/in controls	–	–
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.G2346C	p.E782D	–	C = 0.91 G = 0.09	SNP	rs2920048	0.075
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.C2385G	p.V795V	–	C = 0.97 G = 0.03	Conservative substitution	–	–
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.A2527G	p.T843A	R CDH	1	Unknown	–	–
<i>FOG2</i>	Exon 7	c.C2665G	p.Q889E	CDH+	C = 0.98 G = 0.02	SNP/in controls	–	–

No. of patients, number of patients; dbSNP = <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; Het. score, heterozygosity score; CDH, congenital diaphragmatic hernia; SNP, single nucleotide polymorphism; CDH+, congenital diaphragmatic hernia with additional anomalies.

^aPatient phenotypes have not been listed for the common sequence variants.

^bAllele frequencies have been listed for those sequence alterations found in more than one patient with CDH.

^cNon-conservative sequence variants were interpreted as SNPs if they were found in controls and/or dbSNP.

Tabla 1. Variantes encontradas en la secuencia del gen *FOG2* en pacientes con HDC Tomado de Bleyl SB. 2007. Candidate genes for congenital diaphragmatic hernia from animal models: sequencing of *FOG2* and *PDGFRa* reveals rare variants in diaphragmatic hernia patients. *European Journal of Human Genetics* 15, 950–958.

El primer indicio de que *FOG2* podría desempeñar un papel en el desarrollo normal del diafragma vino con el descubrimiento de un ratón mutante N-etil-N-nitrosourea con hipoplasia pulmonar y un diafragma anormal que carecía de muscularización de las regiones posterolateral y periférica, al hacer la secuenciación del gen *FOG2* en este ratón se reveló una mutación hipomórfica. Posteriormente en un bebé que falleció pocas horas después del nacimiento, debido a una eventración diafragmática y una grave hipoplasia pulmonar, se encontró una mutación de novo R112X (Figura 6) (Holder A.M 2007)

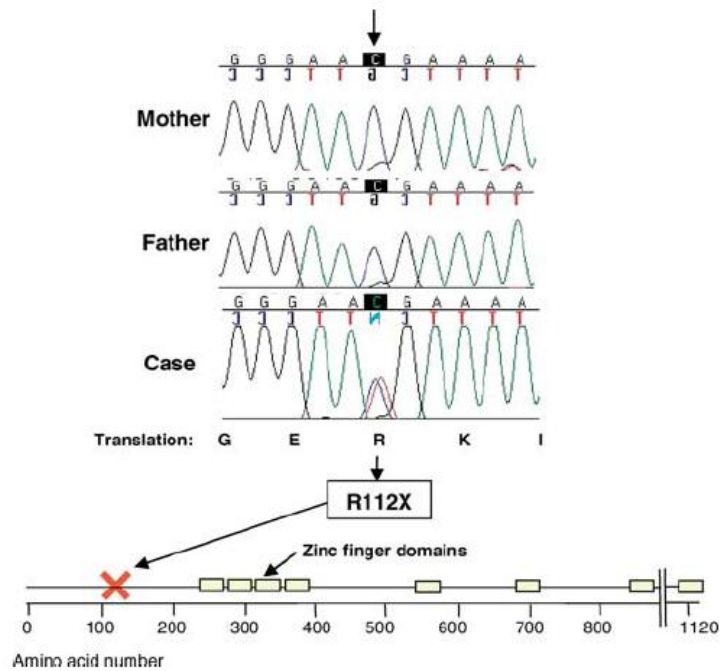


Figura 6. Mutación en FOG2 encontrada en un paciente con anomalías en diafragma y pulmones. Tomado de Ackerman. Fog2 Is Required for Normal Diaphragm and Lung Development in Mice and Humans. PLoS Genetics. July 2005 Volume 1 Issue 1.

2.5 Polimorfismo

El ADN del genoma humano no es una entidad estática. Por el contrario está sujeto a una variedad de cambios hereditarios (mutación). Las mutaciones a menor escala pueden agruparse en diferentes clases según el efecto en la secuencia del ADN, estas pueden ser deleciones, inserciones o sustituciones de bases, estas últimas incluyen el reemplazo de por lo general una base; en casos raros se reemplazan al mismo tiempo varias bases agrupadas como resultado de una forma de conversión génica. Por tradición la variación de la secuencia alélica suele describirse como un polimorfismo de ADN si más de una variante (alelo) en un locus se observa en una población humana con una frecuencia mayor a 0.01 (que es más alta de la que podría conservarse solo por mutación recurrente). (Strachan. 2006)

En ciertos casos, los alelos diferentes pueden producir fenotipos distintos; en otros casos la variación puede ser neutral y no reflejarse en el fenotipo. El estudio y caracterización de todos estos polimorfismos dentro y entre las poblaciones es importante por dos razones. En primer lugar, porque pueden utilizarse en la reconstrucción de la evolución humana reciente y reconstruir la historia de los movimientos de poblaciones desde la aparición de los seres humanos modernos. En segundo lugar porque la estructura génica de las poblaciones humanas tiene una relación directa con el diseño e interpretación de los estudios poblacionales en la búsqueda de alelos de riesgo en las enfermedades complejas comunes. (Sudbery.2004)

3. Objetivos

3.1 General

- Realizar la descripción clínico-demográfica y evaluar la secuencia del gen FOG2 en pacientes con Hernia Diafragmática Congénita de 3 ciudades colombianas y una brasilera.

3.2 Específicos

- Describir clínica y demográficamente los pacientes objeto de estudio.
- Analizar por métodos de secuenciación la presencia de mutaciones en el gen FOG2.
- Determinar la frecuencia de mutaciones o polimorfismos en el gen FOG2 dentro de la población en estudio.
- Describir la existencia de correlación entre el cuadro clínico de los pacientes y las mutaciones encontradas.

4. Metodología

4.1 Diseño del estudio

Estudio de tipo descriptivo experimental

4.2 Población de estudio

Para la realización de este estudio se llevó a cabo la revisión de las fichas que hacen parte de la base de datos del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones congénitas (ECLAMC) (Anexo 10.1) en el Instituto de Genética Humana de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Javeriana, correspondientes al periodo comprendido entre el 2000 y el 2010 de pacientes con diagnóstico de Hernia diafragmática Congénita; En base a la información consignada en las fichas ECLAMC de estos pacientes se seleccionaron los individuos que al momento del alta del hospital continuaban con vida, para posteriormente realizar por vía telefónica la convocatoria para su participación voluntaria en el estudio.

De esta convocatoria y de la vigilancia de recién nacidos se obtuvieron:

- Tres muestras de HDC no sindrómica recolectas en el Hospital Universitario San Ignacio de la Pontificia Universidad Javeriana.
- Una muestra proveniente del Hospital Infantil Universitario Rafael Henao Toro de Manizales.
- Tres muestras de HDC no sindrómica remitidas del Hospital Universitario del Valle.
- Seis muestras de las cuales tres corresponden a HDC sindrómica y la tres restantes a HDC no sindrómica, todas ellas provenientes de la Universidad Estatal de Campinas, Brasil.

Las muestras se obtuvieron mediante punción venosa posterior a la obtención del consentimiento informado por escrito de los padres. (Anexo10.2)

4.3 Descripción General y demográfica de los casos

A partir de las fichas de ECLAM de todos los pacientes con diagnóstico de Hernia Diafragmática Congénita, se tuvieron en cuenta los siguientes datos para su caracterización general y demográfica:

- Nacido (vivo o muerto)
- Estado al alta del hospital (vivo, muerto, sin alta)
- Sexo
- Peso al nacimiento
- Edad gestacional
- Evidencias diagnósticas
- Edad de diagnóstico
- Tipo de hernia (derecha o izquierda)
- Edad de las madres y padres
- Medicamentos a los que tuvo exposición
- Consumo de drogas, alcohol y/o cigarrillo
- Enfermedades agudas o crónicas en las madres
- Anomalías congénitas en los miembros de la familia

4.4 PROCEDIMIENTO

4.4.1 Recolección de la muestras

Se realizó la extracción de sangre venosa por punción en tubos con EDTA a 9 de los individuos afectados por HDC, las muestras de los 4 pacientes restantes fueron recolectadas en papel filtro, el control correspondía un individuo sano, sin diagnóstico de HDC, la cual fue obtenida por punción venosa en tubo con EDTA.

4.4.2 Extracción de ADN

La extracción de ADN de las muestras de sangre venosa en tubos con EDTA se llevo a cabo por el método de salting out (Anexo 11.3), y la extracción de ADN de

las muestras en papel filtro se realizo por el método Chelex-100 (Polski JM, 1998) (Anexo 11.4) técnicas estandarizadas por el departamento de Diagnostico Molecular del Instituto de Genética Humana de la Pontificia Universidad Javeriana.

4.4.3 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en el equipo GeneQuant™ mediante espectrofotometría para observar la calidad del producto extraído y se llevaron las muestras a una concentración final de 30 ng/ ul.

4.4.4 Amplificación de ADN

Para la amplificación del exón 7 del gen FOG2 se realizó la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), los primers fueron diseñados mediante el programa Primer3, estos fueron:

Exón	Secuencia
7	Forward:GAACCTGAGAGCGGAGTCTG
	Reverse: TCACACTGGTTGACCCAGAA

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (iCycler de Biorad) previamente programado para amplificar productos relacionados con el exón evaluado, en 35 ciclos con las siguientes condiciones de desnaturalización, anillamiento y elongación (Anexo 11.5). Para confirmar la amplificación del producto deseado se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido 7µl con bromuro de etidio, la corrida se realizó a 150 voltios por 30 minutos, los resultados se revelaron en una cámara de luz ultra violeta. (Anexo 11.6)

4.4.5 Secuenciación y Análisis

Se purificaron los productos amplificados mediante el protocolo del kit de

purificación de ADN Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega (Anexo 11.7). La secuenciación y análisis de los productos amplificados y purificados fue realizada con BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v3.1 (Applied Biosystems), en el secuenciador ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER (Applied Biosystems) equipo de propiedad de la Universidad de los Andes. La secuencia fue procesada y analizada con el Software ChromasPro versión 1.5 .

4.5 Correlación genotipo- fenotipo

Una vez se obtuvo la información y se realizó el análisis de la mutación encontrada se correlaciono el genotipo identificado con el respectivo fenotipo del paciente, los datos fenotípicos de los pacientes se obtuvieron de las fichas de ECLAM de cada uno.

5 Resultados

Descripción clínica y demográfica de los pacientes

Se obtuvo información de 32 pacientes con diagnóstico de Hernia Diafragmática Congénita proveniente de la base de datos del Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones congénitas (ECLAMC) durante el periodo comprendido entre 2000 y 2010. Las características clínicas y demográficas de los pacientes se encuentran descritas en la Tabla 2.

De estos pacientes 28 (87.5%) nacieron con vida y solo 1 muerto (3.1%), ya al momento del alta del hospital 14 (43.7%) de los pacientes habían muerto, 13 (40.6%) continuaban hospitalizados y 2 (6.2%) habían salido del hospital con vida.

Tabla 2. Descripción de características clínicas de pacientes con HDC

	Total pacientes (32)	%		Total pacientes (32)	%
Nacido			Edad de las madres		
Vivo	28	87.5	< 18	2	6.2
muerto	1	3.1	18-34	24	75
Sin información	3	9.3	35-39	4	12.5
			>40	1	3.1
			Sin información	1	3.1
Alta			Edad de los padres		
Vivo	2	6.2	< 18	0	
Muerto	14	43.7	18-45	27	84.3
sin alta	13	40.6	45-55	1	3.1
Sin información	3	9.3	>55	0	
			Sin información	4	12.5
Sexo			Medicamentos		
Masculino	16	50	Sulfato Ferroso	10	31.2
Femenino	13	40.6	Acido Fólico	13	40.6
Sin información	3	9.3	Calcio	8	25
			Metronidazol	6	18.7
Peso al nacimiento			Multivitaminicos	3	9.3
Macrosomía Fetal > 4000g	1	3.1	Otros	4	12.5
APN (2501- 4000g)	19	59.3			
BPN (menor o igual a 2500g)	6	18.7			
MBPN (<1500g)	3	9.3			

EBPN (menor o igual a 1000g)	0		Ninguno	5	15.6
Sin información	3	9.3	Sin Información	3	9.3
Edad gestacional			Consumo de sust. Psicoactivas		
< 37 semanas	6	18.7	Cigarrillo	5	15.6
37- 42 semanas	21	65.6	<i>Pre</i>	2	40
Sin información	5	15.6	<i>Pre y I Trimestres</i>	2	40
Evidencias			Drogas	1	3.1
U.S prenatal	15	46.8	<i>Pre y I Trimestres</i>	1	100
Clínica	6	18.7	Alcohol	6	18.7
Radiológica	4	12.5	<i>Pre</i>	3	50
Quirúrgica	2		<i>Pre y I Trimestres</i>	2	33.3
Sin información	5	15.6	Anomalías en la familia		
Edad de Dx			Si	2	6.2
Prenatal	15	46.8	No	23	71.8
Natal	7	21.8	Sin información	7	21.8
postnatal	1	3.1	Enfermedades Agudas o Crónicas en las Madres		
Sin información	9	28.1	Vaginosis	5	15.6
Tipo de Hernia			Infección Urinaria	4	12.5
Derecha	5	15.6	Amenaza de aborto	1	3.1
Izquierda	27	84.3	Asma	1	3.1

La edad de diagnóstico más frecuente fue la prenatal con 46.8% de los casos siendo el ultrasonido con igual porcentaje la principal técnica de detección entre las evidencias diagnósticas. El 50% de los casos de HDC fueron hombres y 40.6% mujeres, el 9% restante corresponde a pacientes de los cuales no se obtuvo esta información. La ubicación del defecto diafragmático fue más frecuente al lado izquierdo con 27 de los 32 casos, lo que corresponde a un 84.3%.

El 75% de las madres se encontraban en un rango de edad entre los 18 y los 34 años y la edad promedio de los padres estaba entre los 18 y los 45 años con un 84.3%. Los medicamentos de mayor consumo entre las madres durante la gestación fueron el ácido fólico y el sulfato ferroso con 40.6% y 31.2% respectivamente, las enfermedades agudas presentadas en las madres durante la gestación fueron Vaginosis con 5 casos, equivalente a un 15.6% y 4 casos de infección urinaria

correspondiente a 12.5%, el único caso de enfermedad crónica se dio en una madre con asma, una de las mamás presento una amenaza de aborto pero el bebé nació a termino (38 semanas), 25 de las 32 madres no presentaron enfermedades agudas o crónicas durante la gestación.

Secuenciación del exón 7 del gen FOG2

De las 13 muestras obtenidas inicialmente se debió descartar una de las muestras debido a que no se obtuvo amplificación del exón 7 de esta, por lo cual no fue posible realizar su análisis. Los resultados entonces de la secuenciación en 6 de las 12 muestras analizadas y en la muestra control mostraron el hallazgo del polimorfismo c.964+79G>A que se halla en la región intrónica 7 del gen FOG2. (Figura 7.)

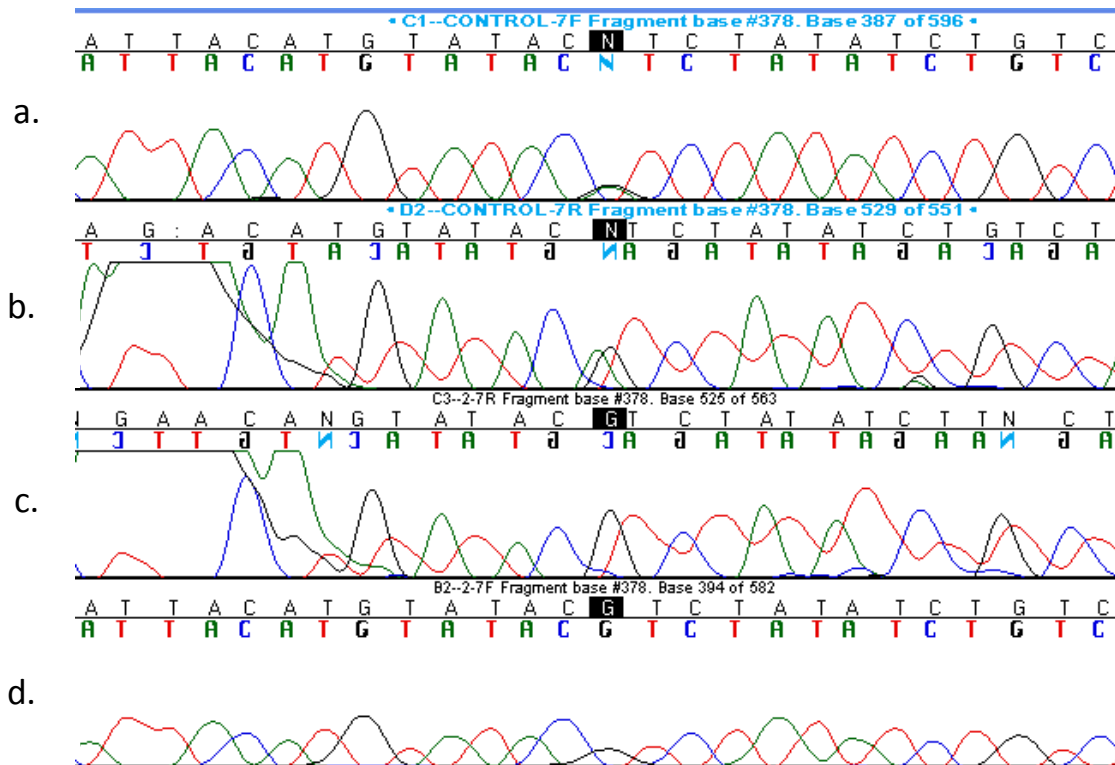


Figura 7. Cromatograma mostrando el polimorfismo **c.964+79G>A** a) muestra control forward. b) muestra control reverse. c) muestra paciente reverse. d) muestra paciente forward.

6 Discusión

Dentro de los resultados obtenidos en la descripción clínica y demográfica de los casos, la tasa de mortalidad desde el momento del nacimiento hasta el momento del alta del hospital fue de 43.7% encontrándose dentro del rango reportado por Pober BR que es de 30- 65%, solo un paciente correspondiente a un 3.2% al momento del parto ya había fallecido esto debido probablemente a un grado de severidad muy alto del defecto diafragmático. El mayor número de casos se presentó en pacientes de sexo masculino con un 50% que corresponde a 16 casos frente a un 40.6% correspondiente a 13 casos que se presentaron en pacientes de sexo femenino concordante con lo reportado en la literatura en donde la incidencia es mayor en hombres con un 58.7% (Lisi A.2005).

Respecto a la ubicación del defecto diafragmático, en 27 pacientes correspondiente a un 84.3%, el defecto se encontraba localizado en la parte izquierda y 5 casos correspondientes a un 15.6% en la parte derecha del diafragma, siendo esto concordante con la frecuencia reportada por Pober BR. 2007 que es de un 80 a 85% en localización izquierda y de un 10-15% en localización derecha. El diagnóstico por ultrasonido prenatal es la técnica con mayor número de detecciones con 15 casos (46.8%) cifra cercana a la reportada en la literatura que es de entre 51- 72% dependiendo del grado de afectación (Taylor. G. 2008).

Los pacientes que presentaron bajo peso al nacer y muy bajo peso al nacer murieron antes del alta con excepción de una sola paciente de sexo femenino la cual a pesar de tener bajo peso al nacimiento seguía hospitalizada, la tasa de mortalidad entonces concuerda con lo observado por Blank y colaboradores en donde reportan que cerca del 65% de los que fallecen tempranamente tienen un peso menor de 2500 g. En cuanto a características como las edades de las madres y padres, consumo de sustancias psicoactivas y enfermedades agudas o crónicas durante la gestación no hay ninguna relación reportada en la literatura que indique relación entre estas y la patología.

El polimorfismo **c.964+79G>A** encontrado en seis de los pacientes (lo que representa un 50% de frecuencia en nuestra población de estudio) y en la muestra control se encuentra reportado en población Europea, Asiática, Sub-Saharianos Africanos y Africanos Americanos teniendo una mayor frecuencia en Sub-Saharianos Africanos y Africanos americanos con 55 y 47.8% respectivamente (Tablas 3). No se encontró reportes del polimorfismo en población latinoamericana, además de no encontrarse estudios que demuestren cual es la función del polimorfismo.

Tabla 3. Frecuencias del polimorfismo reportadas para diferentes poblaciones

ss#	Sample Ascertainment			Genotype Detail ^{NEW}				Alleles		
	Population	Individual Group	Chrom. Sample Cnt.	Source	A/A	A/G	G/G	HWP	A	G
ss121733566	pilot.1.CEU		72	AF					0.014	0.986
	pilot.1.CHB+JPT		88	AF					0.102	0.898
	pilot.1.YRI		50	AF					0.640	0.360
ss165449407	YRI	Sub-Saharan African	2	IG	1.000				0.500	0.500
ss23545324	AFD_EUR_PANEL	European	48	IG	0.042	0.958	1.000	0.021	0.979	
	AFD_AFR_PANEL	African American	46	IG	0.174	0.609	0.217	0.294	0.478	0.522
	AFD_CHN_PANEL	Asian	48	IG	0.083	0.917	1.000	0.042	0.958	
	HapMap-CEU	European	120	IG	0.033	0.100	0.867	0.010	0.083	0.917
	HapMap-HCB	Asian	90	IG	0.178	0.822	0.527	0.089	0.911	
	HapMap-JPT	Asian	90	IG	0.022	0.222	0.756	0.133	0.867	
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	116	IG	0.293	0.517	0.190	0.752	0.552	0.448

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=rs16873705

Al realizar el análisis de predicción de splicing en el programa Splice Site Prediction by Neural Network no se encontró que el polimorfismo afectara el sitio de splicing (Reese MG, Eeckman, FH, Kulp, D, Haussler, D, 1997. "Improved Splice Site Detection in Genie". J Comp Biol 4(3), 311-23.). El alineamiento genómico (Figura 8) mostró que esta variante se encuentra altamente conservada en otras especies.

```

Homo sapiens -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Pan troglodytes -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Gorilla gorilla -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Pongo pygmaeus -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Macaca mulatta -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATG-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTAGCTATCT-ATAACATC-----
Callithrix jacchus -----TACATA-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTATTTATCT-ATAACATC-----
Ancestral sequences -----TACATA-----TATACATC-TATATCTGTCTATCTGTATTTATCT-ATAACATC-----
Mus musculus -----ACACATG-----CATACATA-CATACATA-----CTATCT-ATAATATATTCATATAGAAAAGAAATGCAATATGTGCATACATACATATGTACATATATACATA
Ancestral sequences -----ACACATG-----CATACATA-CATACATA-----CTATCT-ATAATATATTCATATAGAAA-----CATGCATATGTGCATACATACATATGTACATATATAC
Rattus norvegicus -----ACACGTG-----CATATATA-CAT-----AGTATGTTTCATATTTCTAA-----TATATTCATGGAGATACAGACATTTGTACACAGATCC-----
Ancestral sequences -----TACATA-----TATACATC-TATATCTATCCATCTATATCTATCT-ATAAAATC-----
Bos taurus -----TACA-TTCGTACATATTGGCGTACA---TTCATTTCATCGTCTCTCCGCGCT-ATAAAATC-----
Ancestral sequences -----TACA-TTCGTA-----ATACATACA---TACATCTATACATCTATATCTATCT-ATAAAATC-----
Canis lupus familiaris .....
Ancestral sequences .....
Equus caballus .....
Ancestral sequences .....
Sus scrofa -----CTACA-TTCGTA-----ATACATACT---TACATATAAACATA-----TATAT-ATACAATC-----
Ancestral sequences -----TACA-TACATA-----TATACATC-TACATCTATCCATCTATATCTATCT-ATAAAATC-----
Canis lupus familiaris -----TGTA-AATATA-----TATAATTC-TACATCTATCCAACTATATTTGATTT-TTAAAGTC-----
Ancestral sequences -----TACA-TACATA-----TATACATC-TACATCTATCCAACTATATCTATCT-ATAAAATC-----
Equus caballus -----TACA-TACATA-----TATACGTC-TATATCTGTCTAACTATATCTATCT-ATAAAATC-----

```

Figura 8. Alineamiento genómico.

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Compara_Alignments?align=494&db=core&g=ENSG00000169946&r=8%3A106330920-106816763

7 Conclusiones

- La descripción clínica de los casos se ajusta a lo descrito en la literatura por diferentes autores respecto a la tasa de mortalidad, la proporción de afectación en hombres y mujeres, localización del defecto, medidas de diagnóstico y relación entre el muy bajo peso al nacer con la mortalidad en las primeras horas de vida.
- Se encontró el polimorfismo **c.964+79G>A** en la región intrónica 7 del gen FOG2 en seis de las doce muestras analizadas y en la muestra control; al realizar en análisis de predicción de splicing se encontró que el polimorfismo no afecta el sitio de splicing.
- No hay reporte de la frecuencia del polimorfismo **c.964+79G>A** en población Latinoamericana además de no encontrarse descrita la función del mismo.
- No se encontraron mutaciones en el exón 7 del gen FOG2 en los pacientes objeto de estudio.
- Al no encontrarse mutaciones en el exón estudiado no es posible realizar la correlación genotipo-fenotipo.

8 Recomendaciones

- Resultaría interesante evaluar la presencia del polimorfismo c.964+79G>A encontrado en la región intrónica 7 de este gen en un tamaño de muestra mayor en población sana, para establecer en que frecuencia se presenta en este tipo de población.
- Se propone realizar estudios posteriores para identificar la función que pueda tener el polimorfismo **c.964+79G>A**.
- Se propone identificar mutaciones en otros exones del gen FOG2 en donde se hayan reportado mutaciones, como es el caso del exón 2.

9 Bibliografía

- Klaassens M., De Klein A., Tibboel D. 2009. The etiology of congenital diaphragmatic hernia: Still largely unknown?. *European Journal of Medical Genetics* 52, 281–286.
- Peetsold M. G, Heij H. A, Kneepkens C., Nagelkerke A. F., Huisman J., Gemke J. B. J. 2009. The long-term follow-up of patients with a congenital diaphragmatic hernia: a broad spectrum of morbidity. *Pediatric Surgery International* 25:1–17
- Goumy C., Gouas L., Marceau G., Coste K., Veronese L., Gallot D., Sapin V., Vago P., Tchirkov A. 2009. Retinoid Pathway and Congenital Diaphragmatic Hernia: Hypothesis from the Analysis of Chromosomal Abnormalities. *Fetal Diagnosis and therapy*.
- Montedonico S., Nakazawa N., Puri P. Congenital diaphragmatic hernia and retinoids: searching for an etiology. *Pediatric Surgery International* (2008) 24:755–761
- Clugston R, Zhang W, Greer J. 2008. Gene expression in the developing diaphragm: significance for congenital diaphragmatic hernia. *American Physiological Society*. 294: L665–L675.
- Sadler , T.W. 2007. *Embriología Médica con orientación clínica*. Decima edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires., Argentina.. 386 pág.
- Kantarci S., Donahoe P.K. 2007. Congenital Diaphragmatic Hernia (CDH) Etiology as Revealed by Pathway Genetics. *American Journal of Medical Genetics Part C (Seminars in Medical Genetics)* 145C:217–226.
- Van Loenhout R, Tibboel D., Post M., Keijzer R. 2009. Congenital Diaphragmatic Hernia: Comparison of Animal Models and Relevance to the Human Situation. *Neonatology* 96:137–149.
- Pober BR. 2008. Genetic aspects of human congenital diaphragmatic hernia. *Clinical Genetics*: 74: 1–15

- Ackerman K., Herron B. Sara O., Vargas S., Huang H., Tevosian S., Kochilas L., Rao C., Pober B., Babiuk R., Epstein J., Greer J., Beier D. 2005. Fog2 Is Required for Normal diaphragm and Lung Development in Mice and Humans. En: *Plast Genetics*.
- Guisar J., Zafra de la Rosa G.F. 2000. Atlas Diagnostico de síndromes genéticos. Primera edición. Ed. Manual Moderno México. 372 pág.
- Gokhale S. Explaining 'congenital malformations'. *The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, January 2009; 22(1): 81–82.
- Monsalve A., Londoño I., Ocampo J., Cruz D., Saldarriaga W., Isaza C. 2007. Distribucion Geografica en Cali, Colombia, de malformaciones congénitas. *Hospital Universitario del Valle*. Marzo de 2004-febrero de 2005. Colombia medica. Vol 38.
- Kase J., Visintainer P. 2007. The relationship between congenital malformations and preterm birth. *J. Perinat. Med.* 35 (2007) 538–542
- Zarante I., Palacios A.M., Henao J., Ayala P., Salazar M., Acosta J., Gordillo G., López C., Cadena P. Descripción de la muestra del banco de ADN de recién nacidos con malformaciones congénitas. En: *Univ. Med. Bogotá (Colombia)*, 50 (3): 302-310, julio-septiembre, 2009.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística. Estadísticas Vitales. Defunciones menores de un año. Año 2008 Fecha de consulta: Julio 2010]. Disponible en: http://www.dane.gov.co/daneweb_V09/index.php?option=com_content&view=article&id=788&Itemid=119
- Catalán M J, Nazer H J, Cifuentes L. Impacto de las malformaciones congénitas en una Unidad de cuidados Especiales Neonatales. *Rev. chil. pediatr.* [revista en la Internet]. 2005. 567-572. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062005000600003&lng=es. doi: 10.4067/S0370-41062005000600003.

- Adler R. 1974. Biología del desarrollo y malformaciones congénitas. Primera edición. Editorial El ateneo. Buenos Aires, Argentina. 185 pág.
- García H., Salguero G., Moreno J., Arteaga C., Giraldo A. 2003. Frecuencia de anomalías congénitas en el Instituto materno Infantil de Bogotá. *Biomédica* 23: 161-72
- Moore K. 2008. Embriología clínica. Octava edición. Elsevier Saunders, Barcelona, España. 522 pág.
- Pober BR. 2007. Overview of epidemiology, genetics, birth defects, and chromosome abnormalities associated with CDH. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet* 145C:158–171.
- Downard C., Wilson J.M. 2003. Current therapy of infants with congenital diaphragmatic hernia. *Seminars in Neonatology*, 8, 215–221
- De Buys Roessingh A., Dinh-Xuan A.T. 2009. Congenital diaphragmatic hernia: current status and review of the literature. *Eur J Pediatric*, 168:393–406
- Keijzer R., Puri P. 2010. Congenital diaphragmatic. *Seminars in Pediatric Surgery*, 19, 180-185.
- Bolaños I. 2005. Hernia diafragmática congénita. *Revista Mexicana de Anestesiología*. Vol. 28. Suplemento 1.
- Perez P., Amat J., Korn O. 1999. *Hernias Abdominales*. Primera edición. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago de Chile., Chile. 120 pág.
- Larsen WJ. 2003. *Embriología Humana*. Tercera edición. Elsevier Science. Madrid, España. 551 pág.
- Bleyl SB., Moshrefi A., Shaw GM., Saijoh Y., Schoenwolf GC., Pennaccchio LA., Slavotinek AM. 2007. Candidate genes for congenital diaphragmatic

hernia from animal models: sequencing of FOG2 and PDGFRa reveals rare variants in diaphragmatic hernia patients. *European Journal of Human Genetics* 15, 950–958.

- Strachan T., Read A. 2006. *Genética Humana*. Tercera Edición. Mc Graw Hill. México, D.F. 676 págs.
- Sudbery P. 2004. *Genética molecular humana*. Segunda Edición. Pearson, Prentice Hall. Madrid, España. 381 págs.
- Holder A. M, Klaassens, M. Tibboel, D. Klein A, Lee B. Scott A. 2007. Genetic Factors in Congenital Diaphragmatic Hernia. *The American Journal of Human Genetics* Volume 80.
- Finelli P, Pincelli AI, Russo S, Bonati MT, Recalcati MP, Masciadri M, Giardino D, Cavagnini F, Larizza L. 2007. Disruption of Friend of GATA 2 gene (FOG-2) by a de novo t(8;10) chromosomal translocation is associated with heart defects and gonadal dysgenesis. *Clinical Genetics*: 71: 195–204.
- Lisi A., Botto L., Rittler M, Castilla E., Bianchi F., Botting B., De Walle H., Erickson D., Gatt M., De Vigan C., Irgens L., Johnson W., Lancaster P., Merlob P., Mutchinick O., Ritvanen A., Robert E., Scarano G., Stoll C., Mastroiacovo P. 2005 Sex and Congenital Malformations: An International Perspective. *American Journal of Medical Genetics* 134A:49–57
- Taylor G., Atalabi OM., Estroff J. 2009. Imaging of congenital diaphragmatic hernias. *Pediatr Radiol*. 39:1–16

10 Anexos

Anexo 10.1

Formato Ficha ECLAMC

HOMBRES		DIRECCIÓN-calle		barrio:		ECLAMC							
Municipio: <input type="checkbox"/> este <input type="checkbox"/> otro=		Teléfono:		Municipio: <input type="checkbox"/> este <input type="checkbox"/> otro=		HOSPITAL		DIA		MES		AÑO	
<input type="checkbox"/> Malformado		<input type="checkbox"/> Control siguiente		<input type="checkbox"/> Control no siguiente DE		N° Hist. I		Dr. I		PESO		GESTA	
MÁLFORMACIONES						<input type="checkbox"/> PEG		<input type="checkbox"/> AEG		<input type="checkbox"/> GEG		EDAD GESTAC	
Estrato Socioeconómico:						<input type="checkbox"/> vivo		<input type="checkbox"/> muerto		<input type="checkbox"/> aborto			
Peso al inicio de este embarazo:						<input type="checkbox"/> masc		<input type="checkbox"/> femem		<input type="checkbox"/> intersexo			
Último Peso en este embarazo:						<input type="checkbox"/> vivo		<input type="checkbox"/> muerto		<input type="checkbox"/> sin alla		Edad I	
Talla:						<input type="checkbox"/> cefal		<input type="checkbox"/> podal		<input type="checkbox"/> otra			
Dirección actual:						<input type="checkbox"/> cesari		<input type="checkbox"/> cesar		<input type="checkbox"/> cesar			
Dirección periconcepcional:						<input type="checkbox"/> cesar		<input type="checkbox"/> cesar		<input type="checkbox"/> cesar			
CONSULTAS PRENATALES <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si						ULTIMA MENSTRUACION dia		mes		año			
NUMERO						PLACENTA: PESO		cm. Largo		N°			
LUGAR						GRUPOS SANGUÍNEOS		CORDON		Vasos			
US						Madre		Circulares		Nudos			
OTROS (Especificar):						Padre		Nudos					
RESULTADOS:						Padre							
DEJE EN BLANCO SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Si						P		R		E		TRIMESTRE	
ANTECEDENTES DEL EMBARAZO						1		2		3			
HIZO ESTUDIOS						1		2		3			
SIGNOS y SÍNTOMAS						1		2		3			
ENFERMEDADES						1		2		3			
FACTORES FÍSICOS						1		2		3			
MEDICAMENTOS						1		2		3			
METORRHAGIA						1		2		3			
FUMAR						1		2		3			
BEBER						1		2		3			
DIROGA: cocaína, etc						1		2		3			
¿SON TODOS HIJOS DEL MISMO PADRE?						1		2		3			
Gestación						1		2		3			
Producto (NVM AE)						1		2		3			
Sexo (M F I)						1		2		3			
Día de nacimiento						1		2		3			
Mes de nacimiento						1		2		3			
Año de nacimiento						1		2		3			
Lugar de nacimiento						1		2		3			
País Nac.						1		2		3			
MADRE						1		2		3			
FAJURE						1		2		3			
MÁLFORMADOS EN LA FAMILIA <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no						1		2		3			
CONSANGÜINIDAD PARENTAL <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no						1		2		3			
¿CONCIBE FACIL <input type="checkbox"/> si <input type="checkbox"/> no?						1		2		3			
ESCOLARIDAD						1		2		3			
OCUPACION						1		2		3			
ACTIVIDAD OCUPACIONAL DE LA MADRE						1		2		3			
Trabaja afuera? <input type="checkbox"/> no <input type="checkbox"/> si: Especificar=						1		2		3			
ANTEPASADOS						1		2		3			
Europeos latinos <input type="checkbox"/> Turcos <input type="checkbox"/>						1		2		3			
Europ. no latinos <input type="checkbox"/> Negros <input type="checkbox"/>						1		2		3			
Judíos <input type="checkbox"/> Orientales <input type="checkbox"/>						1		2		3			
Nativos <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/>						1		2		3			

Anexo 10.2

Consentimiento informado

INSTITUTO DE GENETICA HUMANA
FACULTAD DE MEDICINA
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas ECLAMC

TERMINO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO ECLAMC PARA FICHA Y DOCUMENTACIÓN INFORMACIÓN

La mayoría de las anomalías congénitas no tienen una causa conocida. Es posible que factores familiares y también del ambiente puedan en conjunto causar estos problemas. Usted está siendo invitado(a) a participar de esa investigación que tiene por objetivo saber mejor porque ocurren estos defectos. Para tal, recogemos algunos datos de usted y su familia, así como documentación fotográfica, radiográfica y otros procedimientos médicos si ello fuera necesario. Esta investigación podrá beneficiar a muchas personas porque el riesgo de ocurrencia de esos defectos podría ser mejor previsto y así tomar medidas para disminuirlo. Así, si usted quiere colaborar firme el Término de Consentimiento abajo, después de leerlo detenidamente y después de aclarar todas sus dudas sobre este asunto con el médico que lo(a) está atendiendo.

CONSENTIMIENTO

Declaro que después de haber sido convenientemente aclarada por el investigador consiento en participar en calidad de familiar responsable informante de la investigación sobre malformaciones congénitas en esta entidad, siempre que se resguarde mi identidad y la de mi hijo(a), así como tengo conocimiento de que podré solicitar informaciones sobre el desarrollo de la investigación, así como retirar mi consentimiento en participar de la misma.

Firma del Responsable

Firma del Testigo

Fecha y Lugar (

Anexo 10.3

Extracción de ADN genómico (Método de salting out)

1. En un tubo falcón de 15ml, medir 8 ml de buffer de lisis de glóbulos rojos y sobre este adicionar con una pipeta plástica 5 ml de sangre total. Mezclar muy bien preferiblemente con vortex.
2. Agitar fuertemente en una plataforma shaker durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 3000 r.p.m durante 8 minutos sin freno, descartar el sobrenadante y conservar el pellet.
4. Mezclar vigorosamente el pellet preferiblemente con vortex en el liquido residual.
5. Adicionar 2.5 ml de buffer de lisis celular y mezclar cuidadosamente con chupas plásticas varias veces. Dejar al menos 60 minutos a temperatura ambiente (en este paso se puede suspender el procedimiento incluso hasta el día siguiente dejando los tubos a 4°C).
6. Adicionar 800 µl de solución precipitante de proteínas (mezclar suavemente).
7. Centrifugar a 4000 r.p.m durante 20 minutos sin freno.
8. Adicionar 400 µl de solución precipitante de proteínas (mezclar suavemente).
9. Centrifugar a 4000 r.p.m durante 10 minutos sin freno.
10. Verter todo el sobrenadante en un tubo falcón que contenga 6 ml de Isopropanol frio. Dejar en reposo por lo menos 5 minutos.

11. Mezclar cuidadosamente por inversión hasta precipitar el ADN.

12. Envolver el ADN en una pipeta pasteur de vidrio. Resuspender en agua estéril dependiendo de la cantidad de ADN obtenido.

13. Colocar en una plataforma shaker toda la noche a temperatura ambiente para resuspender por completo el ADN.

Anexo 10.4

Extracción de ADN genómico a partir de papel filtro (Chelex-100) (Polski JM, 1998)

1. Con una perforadora de papel estéril, tomar discos de papel de filtro que contengan la muestra y poner directamente en tubos de microcentrífuga.
2. Añadir 500 µl de agua estéril a cada uno de los tubos que contienen los discos con la muestra y mezclar con vortex durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Después de la completa eliminación del sobrenadante (necesario para la amplificación fiable), añadir 200 µl de Chelex 100 al 5% (Biorad laboratorios Hercules, California USA); incubar los tubos en un termociclador durante 90 minutos a 56 ° C, seguido por una incubación de diez minutos a 99 ° C.
4. Después de enfriar las muestras, mezclar con vortex brevemente y centrifugar (el sobrenadante se utiliza como sustrato en la PCR).

Anexo 10.5

Protocolo PCR (Exón 7) gen FOG2

Master mix	1X
Buffer (μL)	7.5
MgCl₂ (μL)	4.5
dNTP's (μL)	1.5
Primer F (μL)	1.5
Primer R	1.5
Taq/Pol (μl)	0.75
Agua (μL)	48.75
ADN (μL)	9
Volumen Final (μL)	75

Programa Termociclador	°C	Tiempo
Denaturación inicial	95	2 min
Numero de ciclos	35	
Denaturación	95	10 seg
Anillamiento	65	25 seg
Elongación	72	30 seg
Elongación Final	72	5 min

Anexo 10.6

Protocolo preparación de gel de agarosa al 1%

1. Sellar con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y colocar el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
2. Tarar la balanza, pesar 1 gramo de agarosa y transferir a un erlenmeyer.
3. En una probeta agregar 10 ml de TBE 10X y añadir 90 ml de agua destilada, agregar al erlenmeyer que contiene la agarosa.
4. Mezclar bien y calentar por 1'10'' en el microondas.
5. Agregar 7 μ L de Bromuro de Etidio.
6. Verter la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte previamente sellado. Dejar polimerizar durante unos 30 minutos.

Anexo 11.7

Protocolo purificación de ADN Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System

1. Añadir un volumen igual de solución de unión a membrana, al volumen obtenido del producto amplificado de la PCR.
2. Colocar una minicolumna SV en un tubo de recolección para cada uno de los productos amplificados de PCR.
3. Transferir el producto de PCR a la microcolumna SV que esta puesta en el tubo de recolección e incubar 1 minuto a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a a 16.000 xg (14.000 rpm) durante un minuto. Retirar la minicolumna SV y desechar el liquido que se encuentra en el tubo de recolección. Volver a poner la minicolumna SV en el tubo de recolección.
5. Lavar la columna añadiendo 700µl de solución de lavado de membrana, previamente diluido con etanol al 95%.
6. Centrifugar durante 1 minuto a 16.000 xg (14.000 rpm). Retirar la minicolumna SV y desechar el liquido que de encuentra en el tubo de recolección. Volver a poner la minicolumna SV en el tubo de recolección.
7. Repetir el lavado con 500µl de solución de lavado de membrana y centrifugar 5 minutos a 16.000 xg (14.000 rpm).

8. Transferir cuidadosamente la minicolumna SV a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml limpio. Añada 50 μ l de nucleasa libre de agua directamente al centro de la columna sin tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

9. Centrifugar durante 1 minuto a 16.000 xg (14.000 rpm). Desechar la minicolumna SV y guardar el tubo de microcentrífuga que contiene el ADN eluido a 4 ° C o -20 ° C.