

Mutaciones en el gen *GATA4* en pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica.

Diana Carolina Orjuela Quintero¹, Federico Núñez², Víctor Caicedo², Sonia Pachón² y Marleny Salazar Salazar¹.

¹Programa Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Facultad de Educación, Universidad del Quindío. Armenia, Quindío.

²Fundación Clínica Shaio. Bogotá, Colombia.

Palabras clave: *GATA4*, mutación, análisis bioinformático, secuencia.

Resumen. Las cardiopatías congénitas se definen como toda anomalía estructural del corazón o de los grandes vasos, y son consecuencia de las alteraciones del desarrollo embrionario normal del corazón, aproximadamente entre la tercera y la décima semana de gestación. En Colombia, constituyen la segunda causa de muerte en niños menores de un año, con una prevalencia entre 7,5 y 9,5 por 1.000 nacimientos, sin discriminación entre nacidos vivos y muertos. En este estudio se analizaron mediante bioinformática, 33 muestras de tejido cardíaco cercano al defecto y de sangre de pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica, de la Clínica Shaio Bogotá (Colombia). Se analizaron en sentido y antisentido cada uno de los seis exones que conforman el gen *GATA4*. Se identificaron 17 mutaciones, incluyendo cinco cambios no sinónimos en la secuencia, una variante sinónima, una variación de la secuencia en la región 5'UTR, tres cambios intrónicos y siete deleciones. No se encontraron evidencias de variantes somáticas para el gen *GATA4*, en ninguna de las muestras de la población de estudio.

Mutations in the GATA4 gen in patients with non-syndromic congenital heart disease.

Invest Clin 2014; 55(3): 207 - 216

Key words: *GATA4*, mutation, bioinformatic analysis, sequence.

Abstract. Congenital heart diseases are defined as any heart or large vessel structural abnormality resulting from abnormal embryonic development, usually described between the 3rd and 10th week of gestation. They comprise the second cause of death in children under a year of age in Colombia, with a prevalence of 7.5-9.5 per 1,000 births, including live and still births. We analyzed 33 heart tissue samples collected at the Clínica Shaio (Bogotá, Colombia). Blood and tissue samples were collected from patients with non-syndromic congenital heart disease. Tissue was isolated near the defect. Electropherograms obtained from samples were analyzed using bioinformatic tools: ChromasPro and ClustalW. The whole gen covering its six exons was analyzed in forward and reverse orientation. We identified 17 mutations, including five non-synonymous sequence changes, one synonymous variant and one variation in the 5' UTR, three intronic changes and seven deletions. We found no evidence of gene *GATA4* somatic sequence variants in any of the samples analyzed.

Recibido: 30-09-2013. Aceptado: 15-05-2014

INTRODUCCIÓN

Se define como cardiopatía congénita (CC), toda anomalía estructural del corazón o de los grandes vasos. Las cardiopatías congénitas son consecuencia de las alteraciones del desarrollo embrionario del corazón, aproximadamente entre la tercera y décima semana de gestación (1).

En Colombia, las malformaciones congénitas constituyen la segunda causa de muerte en niños menores de un año (2). Los datos estadísticos reportados por el Ministerio de Salud en 1994 mostraron que las cardiopatías congénitas (CC) tienen una prevalencia entre 7,5 y 9,5 por 1.000 nacimientos, sin discriminar entre nacidos vivos y muertos (3). Los defectos cardíacos son las malformaciones congénitas más frecuentes, con una incidencia que se ha estimado entre 1 y 2% en nacidos vivos y en el

10% de los fetos abortados espontáneamente según Hoffman en 1990(4) y Hoffman y Kaplan en 2002 (5).

La CC es una de las principales causas de muerte infantil, y la alta susceptibilidad humana a desarrollar esta anomalía puede deberse en parte, a la complejidad del desarrollo embrionario, debido a la participación de varios eventos moleculares y morfológicos. La etiología de la CC en la mayoría de los casos es desconocida y se han asociado a factores genéticos, ambientales y de la interacción de estos como posibles causas. Se ha podido establecer que un 10% de las cardiopatías congénitas son causadas por alteraciones cromosómicas y el 90% restante tiene un origen multifactorial (6, 7).

En las últimas décadas, se ha observado un aumento gradual en el conocimiento sobre las causas genéticas de enfermedades

humanas. El estudio de las CC, ha permitido la identificación de algunos genes cuyas mutaciones son responsables o predisponen a la aparición de estas enfermedades en los seres humanos (6).

En el mundo se llevan a cabo varios programas de vigilancia epidemiológica de las malformaciones; el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Cardiopatías Congénitas (ECLAMC), cubre la mayor parte de Suramérica, la filial para Colombia es el Programa de Vigilancia Epidemiológica del Malformaciones Congénitas (VIDEMCO), este es un programa encargado de hacer vigilancia epidemiológica por medio de estudios que cuantifican las malformaciones congénitas de la población.

En Colombia hay datos reportados al Ministerio de Salud, para el año 1994, que muestran una prevalencia de CC entre 7,5 y 9,5% por cada 1.000 nacimientos. Un último estudio para Colombia realizado en el año 2006, que incluyó 44.985 neonatos nacidos entre junio 1 del 2001 y abril 30 de 2005, en 11 hospitales Colombianos, reportó 55 casos (1,2 por cada 1.000 nacidos vivos) de los cuales 36, es decir, el 65,5% fueron defectos severos y 18, que corresponde al 32,7%, tenían malformaciones extracardíacas asociadas y que entre un 5 a 10% de las cardiopatías congénitas no sindrómicas eran de origen monogénico (8).

El grupo de Reamon-Buettner y Borlak, ha informado que la mayoría de las enfermedades cardíacas, son de origen somático y están relacionadas con mutaciones en los genes *NKX2.5*, *TBX5*, *GATA4*, *HEY2* y *HAND1* (9, 10). Estos investigadores trabajaron con una colección de corazones malformados propiedad de la Universidad de Leipzig (Alemania) (9-11, 12), que estaban fijados en formalina por más de 20 años, a los cuales les extrajeron el ADN. En varios pacientes identificaron diferentes mutaciones en el mismo gen (9-10). La abundancia de las mutaciones somáticas relatadas por

el grupo de Reamon-Buettner y Borlak contrasta con el número limitado de mutaciones encontradas en otros estudios. Por esta razón en el presente trabajo se planteó un análisis del gen *GATA4* en 33 muestras de tejido fresco cercano al defecto cardíaco y de sangre del mismo paciente, con la finalidad de observar si las mutaciones eran de origen somático o germinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

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

A los padres de los niños que participaron en el estudio se les preguntó en la consulta, si tenían historia familiar de cardiopatías. Si no presentaban antecedentes familiares, todos los pacientes fueron evaluados por un grupo de especialistas en cirugía cardiovascular, médicos cardiólogos y médicos genetistas de la Fundación Clínica Shaio de Bogotá-Colombia. Igualmente, se les realizó el diagnóstico cardíaco, el cual fue confirmado por una o más de las siguientes pruebas: ecocardiografía, cateterismo cardíaco y una intervención quirúrgica. Fueron excluidos del estudio pacientes con síndrome de Down, síndromes genéticos relacionados con cardiopatías y antecedentes familiares de cardiopatía congénita, malformaciones extracardíacas y/o con dismorfias faciales, cromosómicas, síndromes mendelianos, y pacientes con microdelección 22q11.2. Se incluyeron pacientes con cardiopatía congénita no sindrómica, con fenotipo normal. El proyecto fue aprobado por el comité de ética de la Clínica Shaio.

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

Las regiones codificantes completas, incluidos los límites intrón-exón, de GATA4, se amplificaron mediante PCR. Los "primers" fueron diseñados usando el software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) Primer3 (v. 0.4.0), basado en las secuencias de cDNA disponibles en el GenBank GATA4

(NM_002052.3) y las regiones genómicas correspondientes (Tabla I). Los productos de la PCR se secuenciaron siguiendo el protocolo para BigDye Terminator v1.1 *Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) utilizando un secuenciador de cuatro capilares *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

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

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

El gen *GATA4* tiene 6 exones; por conveniencia metodológica, se dividió el exón número 1 en 1.1, 1.2, 1.3.

RESULTADOS

La frecuencia de los defectos cardíacos encontrados en la población de estudio fueron coartación de la aorta (CoA) 30,3%; de-

TABLA I
TEMPERATURA Y "PRIMERS" EMPLEADOS

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

defecto septal ventricular (DSV), 27,2%; defecto septal atrial (DSA), 21,2%; *ductus* arterioso persistente (DAP), 12,1%; transposición de grandes vasos (TGV), 3,03%; insuficiencia mitral (IM), 3,03%; *truncus* arterioso, 3,03%; canal aurículoventricular, 3,03%; interrupción del arco aórtico (AAI), 3,03% y drenaje venoso anómalo total, 3,03%. Las alteraciones reportadas en este estudio, se encontraron en sangre y tejido afectado cerca del defecto cardíaco.

Diez variaciones en la secuencia del gen GATA4 fueron observadas en nueve pacientes no relacionados, tanto en sangre como en tejido cardíaco, incluyendo 5 cambios no sinónimos en la secuencia, una variante sinónima, una variación de la secuencia en la región 5'UTR, y tres cambios intrónicos. Todos los cambios se observaron en heterocigosis. Además, se encontraron siete deleciones en cuatro individuos.

El cambio no sinónimo p.Ser377Gly (c.1129A>G) ha sido reportado previamente en la base de datos de SNPs (rs3729856). Este se encontró en un paciente con comunicación interauricular (paciente 1) y en un

individuo con coartación de la aorta (paciente 14), mientras que la variante p.Val380Met no sinónima (c.1138G>A) fue identificada en un paciente con diagnóstico de defecto septal atrial (paciente 27). Además de cambios no sinónimos en la secuencia, se identificaron tres nuevas variantes intrónicas (c.IVS3-17T>C, c.IVS6-20G>A y c.IVS1-64G>C,) en tres pacientes: dos con comunicación interventricular (pacientes 1 y 30) y en uno (paciente 27) con *ductus* arterioso persistente. Se observó un cambio sinónimo (c.543C>T, p.Ala181Ala) (Fig. 1), en un individuo con transposición de grandes arterias con tabique ventricular intacto (paciente 3), y una nueva sustitución de nucleótidos en la región 5' no traducida de GATA4 en un paciente con coartación de la aorta (paciente 17) (Fig. 2).

Las deleciones se encontraron en la sangre y el tejido en cuatro pacientes. Un individuo con defecto septal ventricular (paciente 1) con dos deleciones (*del152-155* CCG, *del160-161-172*-CTTCATGTAGA); dos casos (pacientes 19 y

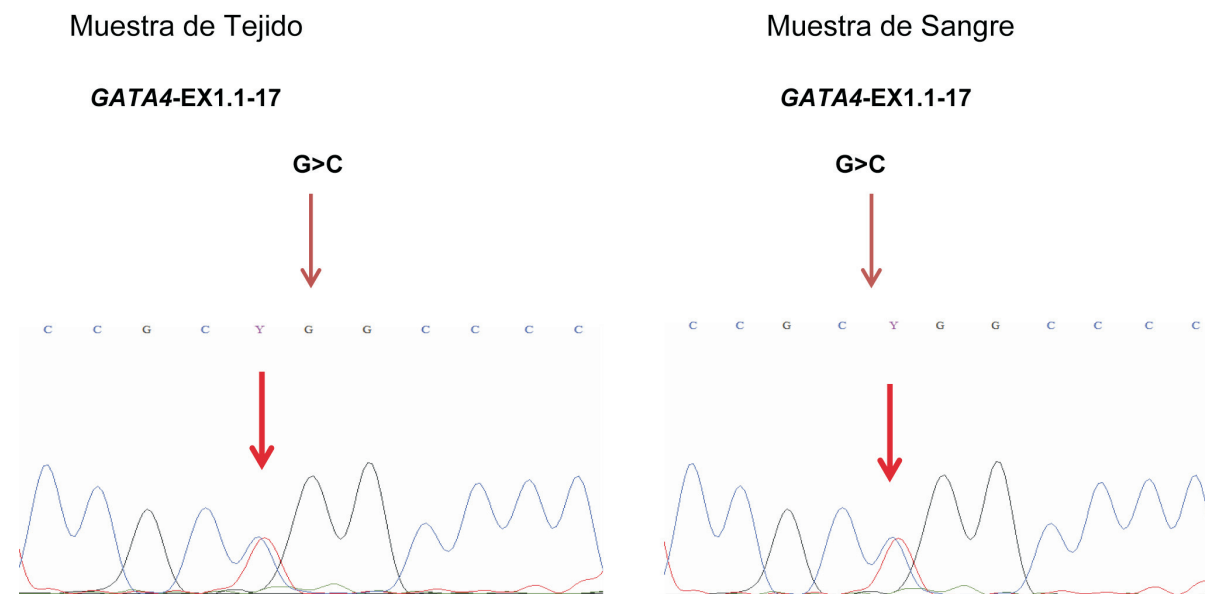


Fig. 1. Electroferograma del paciente 3 con transposición de grandes vasos de muestras de tejido y sangre del exón 1.2, donde se identifica un c. 543C>T-Ala181Ala.

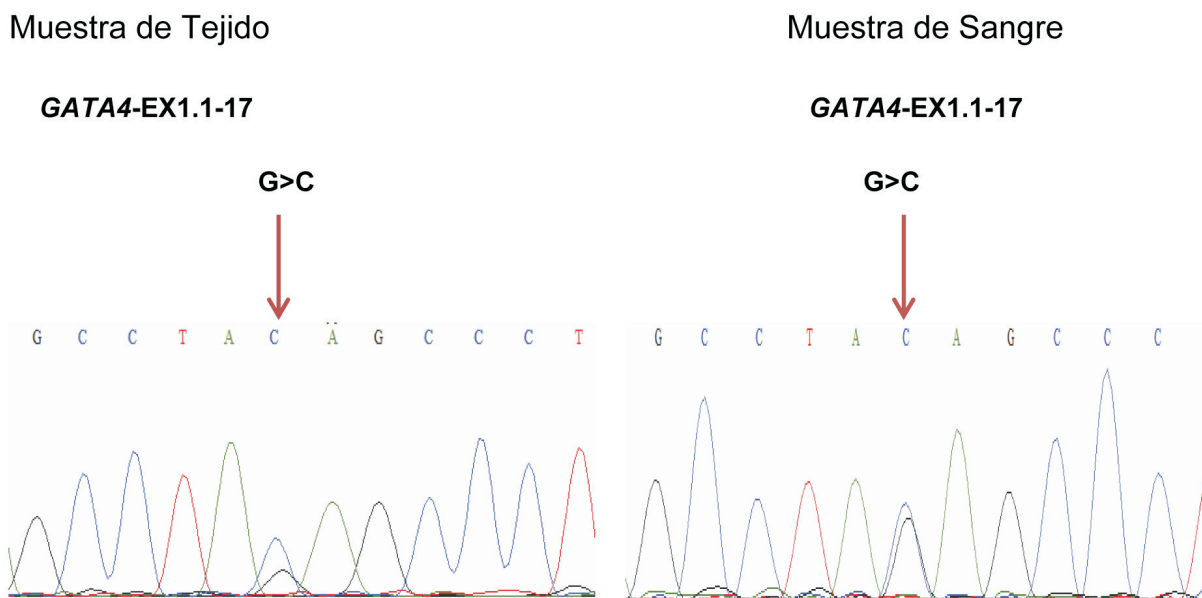


Fig. 2. Electroferograma de la muestra del paciente 17 con coartación de la aorta de muestras de tejido y sangre del exón 1.1 del gen *GATA4*, donde se observa un c. 5'UTR-48G>C.

24) con insuficiencia mitral y defecto auriculo-ventricular presentaron la misma delección (*del996-1005-CTCCTTCAGG*); y en el paciente 27 con *ductus* arterioso persistente se identificaron tres delecciones (*del202-204-GGG*, *del248TCCGC*, *del276-GATTGGGGTGTCCGGCGG*). Estas delecciones no han sido reportadas anteriormente (Tabla II).

El análisis de mutaciones de los tejidos normales y muestras de sangre reveló que todas las variantes de la secuencia de nucleótidos encontradas en muestras de tejido patológico, también estuvieron presentes en el tejido normal y en las muestras de sangre tomadas del mismo paciente lo que indicó que se trataba de variantes de la línea germinal. No se identificaron mutaciones en el exón 3 del gen *GATA4*.

DISCUSIÓN

El factor de transcripción *GATA4* es de vital importancia en el desarrollo cardíaco. Pequeñas alteraciones en el nivel de expresión de la proteína de *GATA4* pueden cam-

biar dramáticamente la morfogénesis cardíaca y la supervivencia embrionaria. Además, la expresión de *GATA4* en el miocardio es necesaria para la proliferación de los cardiomiocitos, la formación de los cojines endocárdicos, el desarrollo del ventrículo derecho, y la tabicación del tracto de salida (13).

Las mutaciones en *GATA4*, se identificaron por primera vez en los casos familiares de los defectos septales cardíacos (14). Estudios de Zhang y col. (15) han reportado mutaciones de la línea germinal en el gen *GATA4*, en algunos tipos de enfermedad cardíaca congénita. Sin embargo, la prevalencia de las mismas y la correlación entre el genotipo y el fenotipo no han sido ampliamente estudiadas (16).

La frecuencia de la delección entre los pacientes con cardiopatía congénita conotruncal aislada, es en promedio de un 10%. Las delecciones se presentan por pérdida de un fragmento del cromosoma, esta pérdida puede resultar como consecuencia de una ruptura del cromosoma y la posterior pérdida del fragmento y su información genética (17). En este estudio se encontraron pa-

TABLA II
ALTERACIONES DE LOS EXONES DEL GEN *GATA4*, ENCONTRADOS EN SANGRE Y TEJIDO CERCA DEL DEFECTO CARDÍACO DEL MISMO PACIENTE

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

cientes que presentaron entre una y tres deleciones. Posiblemente estas deleciones generan alteraciones en tejido cardíaco, que provocan anomalías asociadas a diferentes patologías. Las grandes deleciones cromosómicas también han sido implicadas en las malformaciones estructurales y de

desarrollo del corazón, como las anomalías conotruncales, los defectos del canal auriculoventricular y los defectos septales ventriculares y auriculares (18). Estas deleciones no han sido reportadas en las bases de datos. En la población estudiada la frecuencia de deleciones fue de 21%.

El DSV y el DSA son las anomalías cardíacas más comunes encontrada en niños; el DSV se ha estimado en una gama etaria aproximada de 1,5 a 2 por cada 1.000 nacidos vivos, y en el reporte de Atlanta en 1980, se consideró que la incidencia era de 2,6 en 1.000 nacidos vivos (18). Este defecto, puede presentarse solo o en combinación con otras malformaciones cardíacas. Los DSV grandes dan lugar a insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar, síndrome de Eisenmenger, retraso en el desarrollo del cerebro fetal, arritmias e incluso la muerte súbita cardíaca (19). En el presente estudio el defecto más común en la población evaluada fue la CoA, con un 30%, mientras que el DSV lo presentó 27% del total de los pacientes. Las anomalías asociadas más frecuentes a la CoA son las anomalías de la válvula aórtica, especialmente la bicúspide, oscilando entre el 15% y 85% de acuerdo a los diferentes estudios (19). En este estudio los pacientes que presentaron CoA, no presentaron ninguna anomalía estructural asociada.

La forma autosómica dominante de enfermedades congénitas cardíacas presenta múltiples tipos de defectos (18), tres pacientes de este estudio presentaron al menos dos complicaciones cardíacas, dos con una DSV + DAP otro, con DSV + membrana subaórtica.

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

Otra variante, el c.1138 G>A fue detectado en el paciente con DSV. Este cambio resultó en una secuencia de valina por metionina (V380M) localizado en el exón 5. Este resultado está relacionado con los resultados hallados en muestras de sangre en individuos chinos con DSV (15) y en pacientes alemanes (20).

Estos hallazgos corroboran lo reportado por Salazar y col. (21) y Draus y col. (22), quienes hallaron alteraciones en las muestras de tejido cardíaco y sangre del mismo paciente no sindrómico y sin antecedentes familiares, lo que ratifica que estas mutaciones cardíacas son de origen germinal y no somático.

Molketin y col. (23), Watt y col. (24) y Reamon-Buettner y Borlak (26), encontraron que las mutaciones en el gen GATA4 se presentan predominantemente en pacientes con familiares que tienen defectos del tabique cardíaco. En este estudio, se analizaron pacientes sin antecedentes familiares de cardiopatías y que no obstante presentaron patologías cardíacas, lo que difiere de los autores referenciados.

Las cardiopatías congénitas tienen riesgo de recurrencia en hermanos futuros de un 2 a 6% y riesgo de transmisión a los hijos, cuando uno de los dos padres posee una cardiopatía, que se estima de 1 a 10%, presentando un riesgo mayor en el caso de que la portadora sea la madre. Por este motivo es de prever que la incidencia de cardiopatías tienda a aumentar en los próximos años como consecuencia de la mayor expectativa de vida de cardiopatas que llegan a la edad reproductiva (4). Es importante anotar que las cardiopatías se pueden presentar en individuos cuyos padres y familiares no hayan presentado antecedentes de enfermedades cardíacas, pero estas pueden ser mutaciones de novo; los padres presentan la enfermedad y ésta se hace sintomática entre los 30-40 años, por factores ambientales, multifactoriales y genéticos (26).

El factor de transcripción GATA4 participa en la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción (8). Los hallazgos de este estudio permiten ampliar el conocimiento relacionado con estas patologías y la predisposición genética enfocada al gen GATA4, como también dilucidar la

relación genotipo fenotipo en las cardiopatías congénitas.

Se tomaron muestras de sangre y tejido de individuos con alteraciones cardíacas para identificar si éstas eran de origen germinal o somático y este estudio permitió identificar mutaciones en el *GATA4* en la cohorte de pacientes con cardiopatía congénita, pero los resultados difieren de lo reportado por Reamon-Buettner y col. (10), quienes encontraron un gran número de mutaciones somáticas pero en tejidos fijados en formalina, lo que contrasta con el número limitado de las encontradas en el presente estudio, donde se utilizó tejido cardíaco fresco y sangre del mismo paciente. Esta observación también es contraria al papel que cumplen las mutaciones somáticas en la patogénesis de los defectos cardíacos, especialmente en el caso de los defectos de la tabicación. Dada la baja frecuencia de mutaciones en todos los genes conocidos hasta la fecha, que se pueden asociar a cardiopatía coronaria, y las complejas interacciones y vías de señalización implicadas en la formación del corazón, sigue siendo posible, y de hecho probable, que la mayoría de las CC tienen una etiología multifactorial. Son necesarios estudios futuros para desentrañar las bases genéticas de los defectos cardíacos.

En conclusión, todos los tejidos utilizados en el presente análisis, se tomaron dentro o muy cerca de los defectos cardíacos y en muestras de sangre del mismo paciente. Es de destacar que, aunque no se encontraron pruebas de mutaciones somáticas, se identificaron ocho variantes nuevas, cinco corresponden a deleciones y tres variantes intrónicas en el gen de *GATA4*, demostrando que el protocolo de escaneo para identificar las mutaciones es lo suficientemente sensible para identificar variaciones en la secuencia de este gen. Podría ser posible que algunas de estas variantes representan cambios no aleatorios; sin embargo, ni los

familiares ni los controles pareados por motivos étnicos estaban disponibles para aumentar las pruebas de patogenicidad de estos cambios en la secuencia. Este estudio constituye una aproximación para conocer el origen de las enfermedades cardíacas no sindrómicas y abre las puertas para el estudio genético en el que se pueda demostrar la presencia de mutaciones cardíacas.

AGRADECIMIENTOS

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

REFERENCIAS

1. **Durán P. RM.** Cardiopatías congénitas más frecuentes. *Pediatr Integral* [Internet]. 2008 [citado 12 enero 2013]; XII (8):807-818. Disponible en: [http://www.sepeap.org/secciones/documentos/pdf/Cardiopatias congénitas mas frecuentes.pdf](http://www.sepeap.org/secciones/documentos/pdf/Cardiopatias%20congenitas%20mas%20frecuentes.pdf)
2. **Estadísticas Vitales:** Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). 2001.
3. **Baltaxe E, Zarante I.** Prevalencia de malformaciones cardíacas congénitas en 44,985 nacimientos en Colombia. *Arch Cardiol Méx* 2006; 76:263-268.
4. **Hoffman JIE.** Congenital heart disease: Incidence and inheritance. *Pediatr Clin North Am* 1990; 37:25-42.
5. **Hoffman FI, Kaplan S.** The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1890-1900.
6. **Chuaqui B, Chuaqui F R, Duarte GI, González BS, Etchart KM, Rosenberg GH.** Lecciones de Anatomía Patológica [Monografía en Internet]. Santiago de Chile: Universidad Católica de Chile; capítulo 2. 2008. [citado 26 febrero 2013] Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/publ/AnatomiaPatologica/10Dermatopatologia/10neoplasias.html>
7. **Icardo J.** Malformaciones cardíacas, heterotaxia y lateralidad. *Rev Esp Cardiol* 2002; 9: 962-974.

8. **Zarante I, Baltaxe E.** Prevalencia de malformaciones cardíacas congénitas en 44.985 nacimientos en Colombia. *Arch Cardiol Mex* 2006; 76:263-268.
9. **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.
10. **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.
11. **Reamon-Buettner SM, Borlak J.** HEY2 mutations in malformed hearts. *Hum Mutat* 2006; 27:118-225.
12. **Reamon-Buettner SM, Borlak J.** Somatic mutations in cardiac malformations. *J Med Genet* 2006; 43(8): e45.
13. **Zeisberg EM, Ma Q, Juraszek AL, Moses K, Schwartz RJ, Izumo S, Pu WT.** Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of GATA4. *J Clin Invest* 2005; 115:1522-1531.
14. **Tomita-Mitchell A, Maslen CL, Morris CD, Garg V, Goldmuntz E.** GATA4 sequence variants in patients with congenital heart disease. *J Med Genet* 2007; 44: 779-783.
15. **Zhang W, Li X, Shen A, Jiao W, Guan X, Li Z.** GATA4 mutations in 486 Chinese patients with congenital heart disease. *Cardiac Eur J Med Genet* 2008; 51:527-535.
16. **McElhinney DB, Geiger E, Blinder J, Woodrow BD, Goldmuntz E.** NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42:1650-1655.
17. **Marino B, Digilio MC.** Congenital heart disease and genetic syndromes: specific correlation between cardiac phenotype and genotype. *Cardiovasc Pathol* 2000; 9: 303-315.
18. **Gumbiner CH, Atsuyoshi T.** Ventricular septal defect. En: *The Science and Practice of Pediatric Cardiology*. Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR. 2nd ed. Baltimore, Maryland, Williams and Wilkins 1998: 1119-1137.
19. **Morris MJH, McNamara DG.** Coartation of the aorta and interrupted aortic arch. En: Garson A, Bricker JT, Fisher DJ, Neish SR, (eds.). *The science and practice of pediatric cardiology*. Baltimore, Maryland: Williams and Wilkins 1998:1317-1346.
20. **Benson D.W, Silberbach G.M, Kavanaugh-McHugh A, Cottrill C, Zhang Y, Riggs MS, Smalls O, Johnson MC, Watson MS, Seidman JG, Seidman CE, Plowden NJ, Kugler JD.** Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999; 104: 1567-1573.
21. **Salazar M, Consoli F, Villegas V, Caicedo V, Maddoloni V, Dallapicola B, De Luca A, Maino B, Nuñez F, Bernal J.** Search of somatic GATA4 and NKX2.5 gene mutations in sporadic septal heart defects. *Eur J Med Genet* 2011; 54:306-309.
22. **Draus JM, Hauck MA, Goetsch EH, Austin III, Tomita M, Mitchell ME.** Investigation of somatic NKX2.5 mutations in congenital heart disease. *J Med Genet* 2009; 46:115-122.
23. **Molkentin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN.** Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 2000; 11: 1061-1072.
24. **Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA.** GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:12573-12578.
25. **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: 38-50.
26. **Baño Rodrigo A, Van Praagh R.** Etiología y Clasificación de las Cardiopatías Congénitas. En: Hernández Rodríguez M. *Pediatría*. 2ª ed. Madrid: Díaz de Santos, 1994; 735-742.