



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**“PARTICIPACIÓN DE LOS GENES *TBX* EN LA SUSCEPTIBILIDAD  
GENÉTICA AL DESARROLLO DE CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN  
MÉXICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:**

**M. en C. IRMA ELOISA MONROY MUÑOZ**

**TUTOR:**

**DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**MÉXICO, D.F., MAYO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ABREVIATURAS

A	Adenina o Alanina
AD	Aurícula derecha
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AI	Aurícula izquierda
AO	Aorta
AP	Arteria pulmonar
ARN	Ácido Ribonucleico
BMP	Proteína morfogenética ósea
C	Citosina
°C	Grados Centrígrados
CA	Conducto arterioso
CC	Cardiopatías Congénitas
CD	Arteria carótida derecha
CI	Arteria carótida izquierda
CIA	Cardiopatía Congénita de Comunicación Interauricular
CIV	Cardiopatía Congénita de Comunicación Interventricular
D	Ácido Aspártico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
<i>ELN</i>	Gen de la elastina
F	Fenilalanina
FGF-8	Factor de crecimiento fibroblástico tipo 8
FHF	Siglas en inglés de primer campo del corazón (First heart field)
G	Gravedades
G	Guanina o Glicina

GATA4	Proteína de unión a la secuencia GATA tipo 4
HAND2	Transcrito tipo 2 expresado en células derivadas del corazón y cresta neural
HRM	Siglas en inglés de la técnica de análisis de las Curvas de Desnaturalización de Alta Resolución (High Resolution Melting)
I	Isoleucina
KCl	Cloruro de Potasio
L	Leucina
M	Metionina
Mb	Megabases
μL	Microlitro
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minutos
miRNAs	Micro ARNs
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Asparagina
NaCl	Cloruro de Sodio
NCBI	Siglas en inglés del Centro Nacional de Información en Biotecnología de los Estados Unidos (National Center for Biotechnology Information)
NKX2.5	Factor de transcripción 5 de la familia NK2
NP-40	Nonidet-40
pb	Pares de bases
pmol/μL	Picomoles por microlitro
P	Prolina
PCA	Persistencia del Conducto Arterioso
PCR	Siglas en inglés de reacción en cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
R	Arginina

RNV	Recién nacidos vivos
s	Segundos
SCD	Arteria subclavia derecha
SCI	Arteria subclavia izquierda
SHF	Siglas en inglés de segundo campo del corazón (Second heart field)
SINAIS	Sistema Nacional de Información en Salud
SNP	Siglas en Inglés de polimorfismo de un solo nucleótido (Single Nucleotide Polymorphism)
SNV	Siglas en inglés de variante de un solo nucleótido (Single Nucleotide Variant)
SRF	Factor de respuesta sérica c-fos
T	Timina o Treonina
TBX	Familia de factores transcripcionales con dominio de unión a secuencia tipo caja T o T-box
TBX1	Factor transcripcional de la familia T-box tipo 1
TBX5	Factor transcripcional de la familia T-box tipo 5
TBX20	Factor transcripcional de la familia T-box tipo 20
Tm	Temperatura de alineamiento
uORF	Siglas en inglés de marco de lectura abierto río arriba (upper Open Reading Frame)
3'-UTR	Siglas en inglés de región no traducida en el extremo 3' (3'-Untranslated Region)
5'-UTR	Siglas en inglés de región no traducida en el extremo 5' (5'-Untranslated Region)
V	Valina
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
Y	Tirosina
WNT	Proteínas tipo wingless

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
A. RESUMEN .....	10
B. ABSTRACT.....	11
C. INTRODUCCIÓN.....	12
1. CARDIOGÉNESIS.....	12
1.1. Fase Premorfogenética .....	12
1.2. Fase Morfogenética .....	13
2. CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS.....	16
2.1. Epidemiología .....	16
2.2. Clasificación .....	17
2.3. Factores genéticos asociados.....	19
2.3.1. Familia T-box.....	20
TBX1.....	20
TBX5.....	22
TBX20.....	23
D. PREGUNTA A CONTESTAR .....	27
E. JUSTIFICACIÓN.....	27
F. HIPÓTESIS.....	28
G. OBJETIVOS.....	29
1. OBJETIVOS GENERALES .....	29
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
H. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
1. ESTUDIO GENÉTICO .....	30
1.1. Obtención de la muestra .....	32
1.2. Extracción de ADN .....	32
1.3. Escaneo de Variantes de un sólo nucleótido (SNV) y/o Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).....	33
Tabla 1. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen TBX1 .....	34

Tabla 2. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen TBX5 .....	35
Tabla 3. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen TBX20 ....	37
Figura 4. Esquema de amplificación empleado para estandarizar las PCRs punto final	38
Figura 5. Esquema de amplificación empleado para los HRMs.....	39
1.4. Secuenciación.....	39
1.5. Análisis bioinformático.....	41
1.6. Modelado in silico.....	42
I. RESULTADOS .....	43
1. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	43
2. ESCANEADO DE MUTACIONES Y/O SNPs POR HIGH RESOLUTION MELTING (HRM) .....	47
3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO .....	50
4. MODELADO in silico .....	61
J. DISCUSIÓN.....	63
1. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO .....	63
2. DETECCIÓN DE MUTACIONES Y/O SNPs .....	64
2.1. TBX1.....	65
2.2. TBX5.....	67
2.3. TBX20 .....	69
K. CONCLUSIONES .....	73
L. REFERENCIAS .....	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los estadios y factores transcripcionales involucrados en la morfogénesis cardíaca.....	15
Figura 2. Tendencia temporal de publicación y de interés sobre la investigación en Cardiopatías Congénitas, mutaciones de los genes TBX y desarrollo embrionario.....	25
Figura 3. Distribución de términos principales asociados con publicaciones en Cardiopatías Congénitas, mutaciones de los genes TBX y desarrollo embrionario.....	26
Figura 4. Esquema de amplificación empleado para estandarizar las PCRs punto final.....	38
Figura 5. Esquema de amplificación empleado para los HRMs.....	39
Figura 6. Esquema de temperaturas e incubación empleado para la purificación por ExoSAP-IT®.....	40
Figura 7. Esquema de amplificación empleado para la PCR de secuencia.....	41
Figura 8. Distribución de Cardiopatías Congénitas en la población de estudio.....	43
Figura 9. Distribución por Edad de la población de estudio.....	44

Figura 10. Distribución por Sexo de la población de estudio.....45

Figura 11. Distribución por padecimiento.....46

Figura 12. Curvas Normalizadas de Disociación de Exones Representativos de los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20*.....48

Figura 13. Análisis de la secuencia del Exón 5 del gen *TBX20* de la muestra 43CIA.....52

Figura 14. Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los SNPs de cambio de sentido del gen *TBX1*.....57

Figura 15. Análisis del SNP rs39999941 del gen *TBX20*.....58

Figura 16. Análisis de la variante con cambio de sentido en la posición 309 de la secuencia de aminoácidos de *TBX20*.....59

Figura 17. Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las mutaciones con cambio de sentido en las posiciones 370 y 395 de la secuencia de aminoácidos de *TBX20*.....59

Figura 18. Modelo por Homología de la proteína *TBX20* unida a una molécula de DNA, basado en la proteína *TBX3* humana.....61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen <i>TBX1</i> .....	33
Tabla 2. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen <i>TBX5</i> .....	34
Tabla 3. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen <i>TBX20</i> .....	36
Tabla 4. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen <i>TBX1</i> .....	48
Tabla 5. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen <i>TBX5</i> .....	48
Tabla 6. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen <i>TBX20</i> .....	49
Tabla 7. Análisis Bioinformático del gen <i>TBX1</i> .....	52
Tabla 8. Análisis Bioinformático del gen <i>TBX5</i> .....	53
Tabla 9. Análisis Bioinformático del gen <i>TBX20</i> .....	54
Tabla 10. Análisis <i>in silico</i> del efecto de las variantes de cambio de sentido, mediante el software Polyphen v. 2.0.23.....	56

## A. RESUMEN

Las cardiopatías congénitas son en conjunto la anomalía del desarrollo más común y principal causa de muerte no infecciosa en recién nacidos alrededor del mundo. Las cardiopatías congénitas más habituales en nuestro país son defectos en la comunicación interauricular y comunicación interventricular. Mutaciones en *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* se han asociado con síndromes clínicos que también involucran defectos cardíacos. A pesar de que se han realizado varios estudios genéticos que tratan de caracterizar a los genes *TBX* en modelos animales, en humanos la mayoría de ellos se han enfocado únicamente al papel que juegan estos genes en la susceptibilidad a padecer síndromes clínicos caracterizados por defectos cardíacos. Con la finalidad de complementar estudios anteriores, se realizó el análisis de variantes genéticas de *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* en cardiopatías congénitas aisladas de tipo comunicación interauricular y comunicación interventricular. Para ello, se analizó por High Resolution Melting y secuenciación capilar las regiones exónicas de estos tres genes en pacientes con comunicación interauricular y comunicación interventricular. Se encontraron tres variantes genéticas nuevas en el dominio activador transcripcional de *TBX20*, que generan cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Son las primeras variantes descritas en este dominio, en pacientes con defecto de comunicación interauricular. Se detectó un mayor número de variantes en el gen *TBX20* con respecto a los otros dos genes estudiados, y la mayor parte de estas se detectaron en pacientes con comunicación interauricular. Todo lo anterior, confirma la asociación del gen *TBX20* con el desarrollo de esta enfermedad.

## B. ABSTRACT

Congenital heart defects are the most common developmental defects in humans and the first cause of death in newborns after infectious diseases. In Mexico, the most common are the atrial and the ventricular septal defects. Mutations in *TBX1*, *TBX5* and *TBX20* genes have been associated with syndromic heart defects. Although the relevance of *TBX1*, *TBX5* and *TBX20* genes in heart development has been demonstrated in many animal models, in humans, most of them try to elucidate the effect of these genes in human syndromic heart defects. To determine the effect of *TBX1*, *TBX5* and *TBX20* genes in the development of non syndromic heart defects, we search for genetic variants in patients with atrial or ventricular septal defect, using the High Resolution Melting method and DNA sequencing. We report three missense mutations within the transcriptional activator domain of human *TBX20* that were associated with atrial septal defect. This is the first association of *TBX20* transcriptional activator domain missense mutations with atrial septal defect. We found more genetic variants in *TBX20* gene than in the other two studied genes. Most of them were found in patients with atrial septal defect. These findings, demonstrate the association between *TBX20* gene and atrial septal defect.

## C. INTRODUCCIÓN

### 1. CARDIOGÉNESIS

El corazón se divide en tres segmentos: auricular, ventricular y arterial. Los ventrículos a su vez constan de tres regiones anatómicas bien definidas: 1. Cámara de entrada, 2. Región trabeculada y 3. Cámara de salida.

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados, el primer órgano en formarse es el corazón, debido a los requerimientos de nutrientes y oxígeno del organismo, así como la necesidad de contar con un sistema de eliminación de desechos y sustancias tóxicas (Sander y col., 2006; Srivastava 2006). La cardiogénesis es un proceso secuencial, progresivo, ininterrumpido e irreversible y algunos autores la han dividido en dos fases para su estudio: premorfofenética y morfofenética.

#### **1.1. Fase Premorfofenética**

Al inicio de la fase premorfofenética no existe una estructura anatómica que identifique al corazón, ya que sólo están presentes células que paulatinamente son determinadas para transformarse en miocardio. A los 15 días de gestación, las células cardiacas progenitoras ya se han especializado y se agrupan formando una estructura conocida como creciente cardiaca (Figura 1A). Las células de la creciente cardiaca comienzan a expresar genes característicos de miocardio como los *NKX2.5* y *GATA4*. La expresión del primer gen

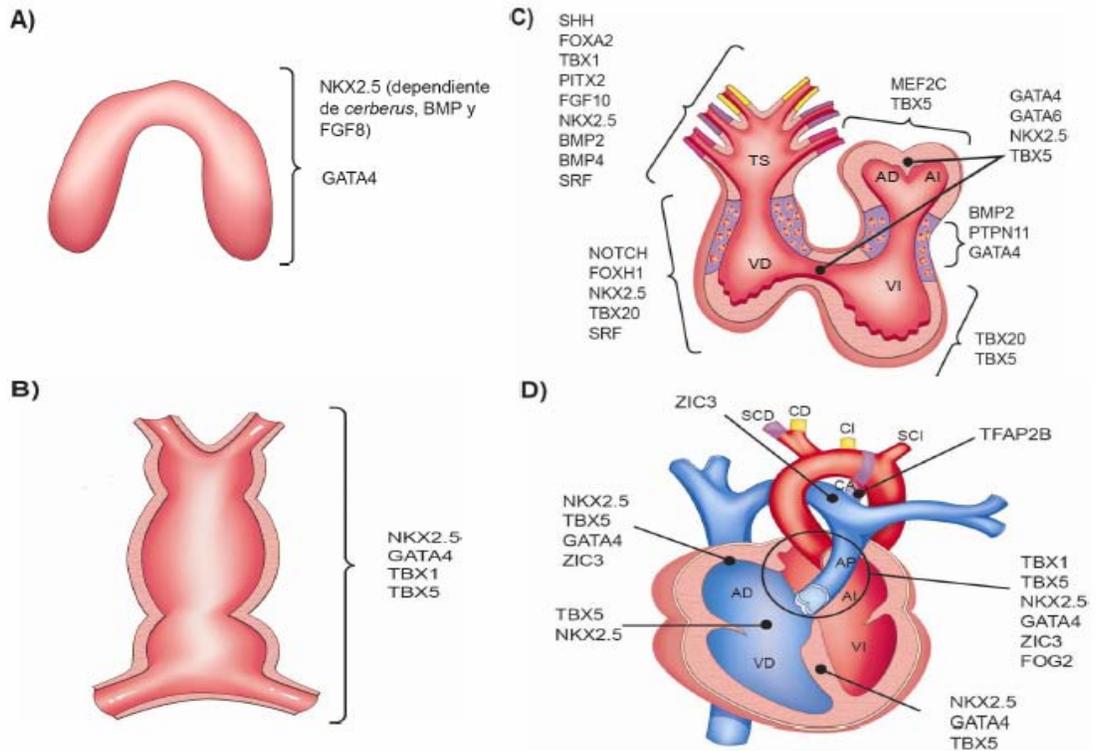
depende de proteínas secretadas por el endodermo subyacente tales como cerberus, la proteína morfogenética ósea (BMP) y el factor de crecimiento fibroblástico tipo 8 (FGF-8) (Alsan and Schultheiss, 2002; Laverriere y col., 1994).

## **1.2. Fase Morfogenética**

Esta fase se divide en tres períodos:

- a) Corazón en tubo recto:** A las tres semanas de desarrollo las células de este primordio cardiaco migran hacia la línea media formando un tubo cardiaco que ya posee dos capas de tejido, una capa interna de tejido endotelial y una capa externa de células miocárdicas (Figura 1B) (Hoffman y col., 2004; Marin-Garcia, 2009; Salazar, 2006).
  
- b) Proceso de torsión y rotación del tubo cardiaco:** Este corazón primitivo sufre una torsión y rotación hacia la derecha alrededor de la 4 semana de gestación, lo cual posiciona a las aurículas por encima de los ventrículos. También, a partir del tracto de salida comienzan a emerger las arterias del arco aórtico (III, IV y VI) (Figura 1C) (Hoffman y col., 2004; Marin-Garcia, 2009; Salazar, 2006).
  
- c) Inicio de la tabicación del corazón:** Alrededor de la quinta y sexta semana de desarrollo embrionario, se forman los septos cardiacos para dividir al corazón en cuatro cámaras cardiacas (2 aurículas y 2 ventrículos) y el tracto de salida o conducto arterioso se divide en la arteria pulmonar y la aorta, lo que resulta en la

división de la circulación en pulmonar y sistémica, respectivamente (Hoffman y col.,2004; Marin-Garcia, 2009). Más tarde ocurre, un remodelamiento valvular intensivo junto con el crecimiento de los ventrículos para completar la maduración del corazón. El establecimiento de la simetría izquierda-derecha es muy importante para el desarrollo normal del corazón. Los genes expresados en la placa cardiogénica como el que codifica para el factor de transcripción 5 de la familia NK2 (*NKX2.5*), para el factor de transcripción de unión al factor de respuesta sérica c-fos (*SRF*), el gen que codifica para la proteína de unión a la secuencia GATA tipo 4 (*GATA4*), el gen que codifica para el factor transcripcional de la familia T-box tipo 5 (*TBX5*) y el gen que codifica para el transcrito tipo 2 expresado en células derivadas del corazón y cresta neural (*HAND2*), forman el centro regulador de la red de morfogénesis cardiaca, la cual controla la rotación del tubo cardiaco, la simetría izquierda-derecha y la formación de las cámaras cardiacas (Figura 1D) (Garg, 2006; Hoffman y col.,2004; Salazar, 2006).



**Figura 1. Representación esquemática de los estadios y factores transcripcionales involucrados en la morfogénesis cardíaca. A)** Estadio de creciente a los 15 días de gestación. **B)** Estadio de tubo recto, formado por la fusión de las células mesodérmicas a los 21 días de gestación. **C)** Estadio de torsión y rotación del tubo cardíaco y surgimiento de las arterias del arco aórtico a partir del tracto de salida, a los 28 días de gestación. **D)** Estadio de remodelamiento y crecimiento de los ventrículos con la subsecuente maduración del corazón y la división de la circulación en sistémica (rojo) y pulmonar (azul), a partir de los 50 días de gestación hasta el nacimiento. AO, aorta; CA, conducto arterioso; AI, aurícula izquierda; CI, arteria carótida izquierda; VI, ventrículo izquierdo; SCI, arteria subclavia izquierda; AP, arteria pulmonar; AD, aurícula derecha; CD, arteria carótida derecha; SCD, arteria subclavia derecha; VD, ventrículo derecho (Monroy-Munoz et al. 2013).

Diferentes tipos de células contribuyen al crecimiento cardíaco; las células del primer campo del corazón (FHF, por sus siglas en inglés) contribuyen únicamente a la formación del ventrículo izquierdo y del canal atrioventricular, mientras que las aurículas, ventrículo derecho y gran parte del tracto de salida provienen de precursores mesenquimales que

residen en el segundo campo del corazón (SHF, por sus siglas en inglés) (Greulich y col., 2011; Nemer, 2008).

## **2. CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS**

### ***2.1. Epidemiología***

Las CC (cardiopatías congénitas) son en conjunto la anomalía del desarrollo más común y principal causa de muerte no infecciosa en recién nacidos alrededor del mundo. Su prevalencia a nivel mundial varía de 6-8/1,000 RNV (recién nacidos vivos) (Anon, 1980; Marelli y col., 2007; Martínez y col., 2005; Mitchell y col., 1971; Samanek, 2000). Asimismo, representan el 10% de todos los abortos espontáneos (Huang y col., 2010). El continente asiático presenta la mayor incidencia de cardiopatías congénitas a nivel mundial de 9.3 por cada 1 000 nacimientos, seguido por Europa con una incidencia de 8.2 por cada 1 000 nacimientos. En América Latina se ha reportado una incidencia de 6.9 por cada 1 000 nacimientos (Van der Linde y col., 2011). En nuestro país se estima una incidencia del 1% (10/1,000 RNV) y se estima, según datos del SINAIS (Sistema Nacional de Información en Salud) (Anon, 2014), que ocupa la segunda causa de mortalidad en menores de 1 año, con una tasa cercana a 1.4/1,000 RNV, encontrándose dentro de las tres primeras causas de muerte en niños entre 1-4 años de edad.

Las cardiopatías congénitas son enfermedades multifactoriales complejas, donde los factores ambientales y genéticos juegan un papel importante. Entre los factores

ambientales se encuentra la exposición durante el desarrollo fetal al virus de la rubeola; a teratógenos químicos como el ácido retinoico, litio o dilantina; hidrocarburos halogenados; y enfermedades como la diabetes y lupus eritematoso sistémico (Huang y col., 2010). En lo que respecta a la influencia de factores genéticos, se ha demostrado una asociación de anomalías cromosómicas como la trisomía 21 y la microdelección 22q11. A pesar de que las malformaciones cardíacas pueden ocurrir como parte de un síndrome, la mayoría se presentan como defectos aislados, por lo cual son consideradas como no-sindromática (Garg, 2006). Estudios epidemiológicos han demostrado un incremento en el riesgo de recurrencia de malformaciones cardíacas en embarazos secuenciales, lo cual confirma la existencia de una predisposición de tipo genético (Granados-Riveron y col., 2012; Huang y col., 2010). Aproximadamente en uno de cada cuatro casos, la cardiopatía congénita ocurre en asociación con otras anomalías congénitas. Sin embargo, una pequeña fracción presente como casos familiares, muestra una segregación de tipo Mendeliana con una penetrancia variable (Granados-Riveron y col., 2012).

## **2.2. Clasificación**

Con base en categorías anatómicas amplias, las cardiopatías congénitas se dividen en:

- a) Defectos de septación y de la conexión atrio-ventricular:** Los defectos de la septación son el tipo más común de cardiopatía congénita, representando el 50% de éstas. Se clasifican según las cámaras que dividen, en interventriculares (CIV), interauriculares (CIA) y aurículo ventriculares. La importancia clínica está en las posibles consecuencias de estas comunicaciones, tales como el aumento del flujo

pulmonar con el consecuente daño a la vasculatura pulmonar; crecimiento auricular con el riesgo aumentado de arritmias, y crecimiento ventricular por aumento de volúmenes sanguíneos (Granados-Riveron y col., 2012).

**b) Defectos del tracto de salida o defectos en las arterias del arco aórtico:** El

segundo grupo más común de CC son los defectos del tracto de salida y del arco aórtico que constituyen cerca del 20-30% de todas las CC. La etiología genética de algunas de estas CC comenzó a vislumbrarse al estudiar el síndrome de delección 22q11 que incluye el Síndrome de DiGeorge, velocardio-facial y la anomalía conotruncal-cara. La delección 22q11 es el tipo de delección más frecuente y es la segunda causa de cardiopatía asociada a síndrome, después de la trisomía 21. Dentro de esta clasificación se encuentra la persistencia del conducto arterioso (PCA). El conducto arterioso es una estructura importante para la circulación fetal que debe ocluirse y desaparecer poco tiempo después del nacimiento (Garg, 2006).

**c) Defectos obstructivos de la arteria pulmonar y aorta:** Los defectos

obstructivos, tanto de la arteria aórtica como pulmonar, varían en su intensidad y pueden llegar, en su peor extremo, a la hipoplasia del ventrículo. Al igual que otras malformaciones congénitas, las primeras pistas sobre la etiología genética de este grupo de malformaciones vinieron de síndromes que tuvieran el fenotipo buscado. El síndrome de Williams es un síndrome que se caracteriza desde el punto de vista cardiovascular por estenosis supra-avalvular de la aorta y periférica de las arterias pulmonares; tiene además varias características extravasculares como retraso mental, hipercalcemia neonatal, etc. La microdelección en este síndrome,

7q11, conllevaba haploinsuficiencia en el gen de la elastina (*ELN*), gen causante de las anomalías vasculares (Garg, 2006).

**d) Anomalías de la simetría derecha-izquierda (Síndrome de Heterotaxia):** La heterotaxia visceral es uno de los desórdenes congénitos más complejos. Constituye un síndrome caracterizado por una alteración severa del patrón de simetría derecha-izquierda y de la relación espacial de los órganos (Garg, 2006).

### **2.3. Factores genéticos asociados**

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), Nodal y proteínas tipo wingless (WNT) actúan como señales en el establecimiento de la simetría izquierda-derecha del corazón. Los factores NKX2.5, SRF, GATA4, TBX5 y HAND2, componen el núcleo de la vía de regulación de la morfogénesis cardiaca, el cual controla la rotación y torsión del corazón en formación, la simetría izquierda-derecha y la formación de las cámaras.

Los factores transcripcionales NKX2.5 y GATA4 fueron los primeros en ser involucrados con la segregación Mendeliana de cardiopatías congénitas aisladas, mediante estudios de asociación genética en una cantidad grande de familias (Granados-Riveron, 2012).

### 2.3.1. Familia T-box

Los miembros de la familia T-box son un grupo de factores transcripcionales que actúan como reguladores importantes del desarrollo cardiaco y se han implicado en humanos con síndromes genéticos caracterizados por malformaciones cardiacas congénitas (Plageman, Jr. & Yutzey, 2005). Comprenden aproximadamente el 0.1% de genomas de organismos tan diversos como nemátodos y los humanos y se han descrito al menos 17 genes T-box en humano (Minguillon & Logan, 2003). Los genes T-box sólo poseen efecto en la célula que los expresa e intervienen en el desarrollo tardío de tejidos específicos y entre estos genes se encuentran *TBX2*, *TBX3*, *TBX4* y *TBX5*. Se expresan en corazón, extremidades, tráquea, pulmones, riñones y retina y son requeridos para el desarrollo de múltiples tipos celulares en diversos organismos, tal y como se demostró en estudios genéticos realizados en moscas, gusanos, peces, ratones, perros y humanos (Minguillon & Logan, 2003). Las proteínas T-box poseen un tamaño que generalmente va de 50 a 78 KDa. Estudios realizados con un número de proteínas T-box han demostrado que poseen al menos dos dominios estructurales y funcionales, un dominio de unión a una secuencia específica de ADN (T-box) y un dominio que funciona como activador o represor transcripcional (Minguillon & Logan, 2003).

#### **TBX1**

TBX1 es un miembro de la familia T-box con dominios de unión a factores de transcripción. TBX1 es un activador transcripcional y la pérdida de esta actividad, se ha relacionado con alteraciones en la expresión de varios genes involucrados en la morfogénesis cardiovascular (Scambler, 2010).

El gen *TBX1* se encuentra en la región 22q11.2 (siglas en inglés 22q11DS) que cuando se encuentra deletada en humanos, conduce a desarrollar anomalías craneofaciales y malformaciones cardiovasculares (Funke y col., 2007).

La deleción 22q11.2, comúnmente asociada con el síndrome de DiGeorge o con el síndrome velocardiofacial, es una causa importante de enfermedad cardíaca congénita, lo que representa el 5% de todos los defectos congénitos del corazón en nacidos vivos. Sin embargo, la presencia de la deleción no permite predecir el fenotipo, ya que los pacientes con deleción 22q11.2 por lo general muestran un amplio rango de variación clínica a pesar de un tamaño de deleción común de 3 Mb. Estudios en ratones de *Df1/+*, cuyo modelo de deleción de 22q11.2 de *TBX1* mostró que la penetrancia de los defectos cardiovasculares varía considerablemente entre los antecedentes genéticos, lo que revela por primera vez la presencia de un control genético importante en la variabilidad del fenotipo de la deleción 22q11.2. Posteriormente, Vitelli y colaboradores, mostraron que las dobles mutantes *TBX1<sup>+/-</sup>; FGF8<sup>+/-</sup>* presentan una penetrancia significativamente más alta en la arteria aórtica con defectos de arco más que las mutantes *TBX1<sup>+/-</sup>; FGF8<sup>+/+</sup>*, mientras que los animales con *TBX1<sup>+/+</sup>; FGF8<sup>+/-</sup>* son normales. Sin embargo, el mecanismo en el humano, aún no es claro (Rauch y col., 2004; Vitelli y col., 2006). En el 2003, Yagi y colaboradores, encontraron 3 mutaciones en el gen *TBX1* en pacientes con síndrome velocardiofacial y en un paciente con síndrome de DiGeorge que no presentaban la deleción característica de 3 Mb. La primera mutación encontrada fue una transversión, un cambio de T por A en la posición 443; la segunda mutación fue una transición, un cambio de G por A en la posición 928; la tercera fue una deleción de una C en la posición 1223.

Estos resultados sugieren que el gen *TBX1* es responsable de los cinco genotipos más importantes en el síndrome del22q11.2 (Yagi y col., 2003).

## **TBX5**

El factor de transcripción TBX5 es necesario para la cardiogénesis normal, está codificado en la región 12q24.1 y las mutaciones en el gen *TBX5* en humanos causan defectos congénitos del corazón (Collavoli y col., 2003). Mutaciones en este gen también causan el síndrome de Holt-Oram (en el 70% de los casos), que se caracteriza por cardiopatías congénitas y deformaciones en las extremidades superiores (Fan y col., 2009; Granados-Riveron, 2012). En 1997, Basson y colaboradores, describieron 2 mutaciones en pacientes con síndrome de Holt-Oram. La primera, una mutación sin sentido, se originó por una transversión, un cambio de G por T en el residuo 205, la cual generó un cambio de glutamato por un codón de paro en la posición 69 de la proteína. La segunda, una mutación de cambio de sentido se originó por una transición, un cambio de G por A en el residuo 710, este cambio generó una sustitución de arginina por glutamina en la posición 237 de la proteína. Lo anterior sugiere que el gen *TBX5* es crítico en el desarrollo de las extremidades y del corazón (Basson y col., 1997).

Por otra parte en el 2000 se realizó un estudio, en el cual a través de técnicas inmunohistoquímicas se identificó y localizó la expresión de la proteína TBX5 durante la morfogénesis cardíaca. En corazones de embriones humanos (de 10 a 15 semanas de gestación) y en corazones de adultos humanos, encontraron que la proteína se expresaba en el epicardio y en el núcleo de los cardiomiocitos del miocardio en las cuatro cámaras

cardiacas. La expresión a nivel endocardio sólo se observó en el ventrículo izquierdo (Hatcher y col., 2000).

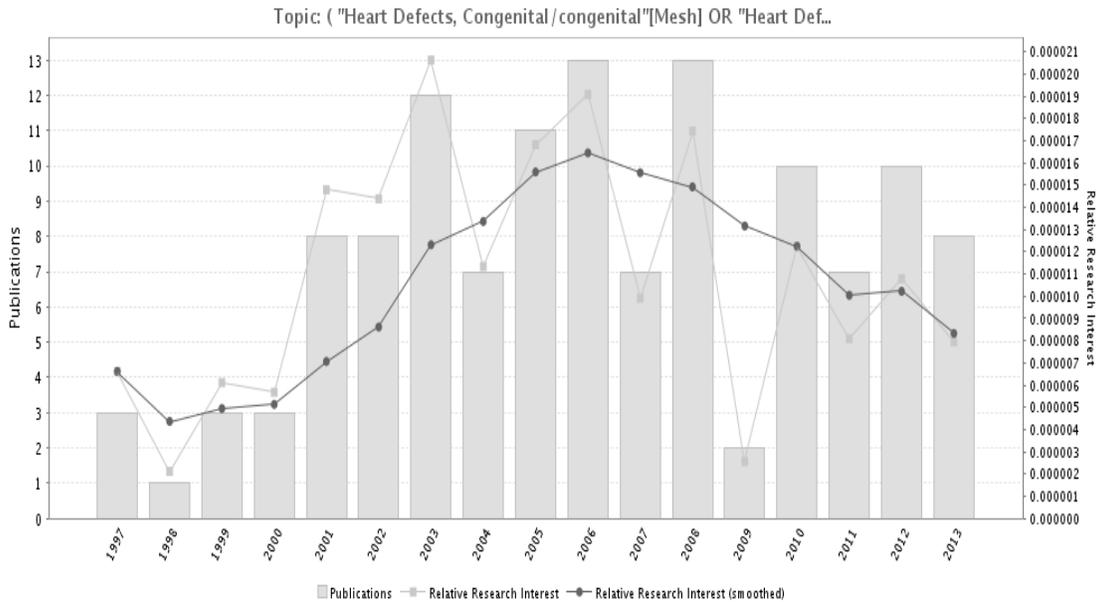
## **TBX20**

TBX20 es uno de los miembros más antiguos de la familia TBX y presenta una expresión elevada en el tubo cardiaco en formación y en los tejidos valvulares en desarrollo. Se encuentra codificado en la región 7p14.2. TBX20 interactúa en vías de regulación junto con NKX2.5, GATA4 y TBX5 durante el desarrollo embrionario del corazón, y también funciona como represor transcripcional de otros genes como el *TBX2*. En el 2002 Szeto y colaboradores demostraron que TBX20 es esencial para la formación de las cámaras cardiacas en el pez cebra (Szeto y col., 2002). En el 2007, Kirk y colaboradores, encontraron 2 mutaciones en el gen *TBX20* en más de 300 pacientes con varios tipos de cardiopatías congénitas, ambas mutaciones se relacionaron con defectos de septación atrial. La primera mutación consiste en una transversión heterocigota en la posición 456 (456C-G) que se traduce en un cambio de isoleucina por metionina en la posición 152, lo cual posee efectos sobre la estructura terciaria, la estabilidad térmica y la unión a ADN. La segunda mutación observada consiste en una transición en la posición 583 (583C-T) del gen *TBX20*, esto genera una proteína truncada en su dominio T-box, así como en los dominios de activación y represión en el extremo carboxilo terminal (Kirk y col., 2007). Este trabajo demostró por primera vez la relación entre las mutaciones en el gen *TBX20* y las cardiopatías congénitas. Más tarde en el 2010, Posch y colaboradores, encontraron una nueva mutación en un paciente con diagnóstico de CIA. La mutación se encontró en el exón 2 del gen (codifica para parte del dominio T-box de la proteína) y consistía en una

transversión, un cambio de C por G en el residuo 374, la cual generó un cambio de isoleucina por metionina en la posición 121 de la proteína. Estos resultados sugirieron que esta mutación provocaba que la proteína TBX20 adquiriera una mayor interacción con cofactores y una interacción más estable con complejos transcripcionales en las secuencias blanco (Posch y col., 2010). Estos resultados junto con los obtenidos por Kirk y colaboradores sugieren que la cardiopatía congénita de comunicación auricular esta relacionada con mutaciones que generan pérdida de función de ciertos factores así como ganancia de función de TBX20.

## **ANTECEDENTES**

En el año 1997 surgió el interés por investigar el efecto de los genes y o proteínas de la familia TBX, en el desarrollo de las cardiopatías congénitas, dicho interés alcanzó los niveles más altos en los años 2006 y 2008. Después del 2008 el interés en la investigación de la familia TBX y las cardiopatías congénitas ha ido en descenso (Figura 1). Hasta la fecha, son 126 los artículos de investigación y/o revisión relacionados con este tema, de los cuales 106 están relacionados con el término síndrome, es decir la mayor parte de estas publicaciones asocian de algún modo a algunos miembros de la familia TBX con el desarrollo de una cardiopatía de congénita de tipo sindromática (Figura 2). Es por ello que en este trabajo se escanearon tres miembros importantes de la familia TBX en busca de variaciones genéticas en pacientes con cardiopatía congénita de tipo no sindromático.



**Figura 2. Tendencia temporal de publicación y de interés sobre la investigación en Cardiopatías Congénitas, mutaciones de los genes TBX y desarrollo embrionario.** Análisis Bibliométrico mediante la Herramienta GoPubMed. Criterios de Búsqueda: ("Heart Defects, Congenital/congenital"[Mesh] OR "Heart Defects, Congenital/embryology"[Mesh] OR "Heart Defects, Congenital/genetics"[Mesh] ) AND TBX\* AND mutations NOT GATA\* NOT BMP\* NOT SHH NOT NKX\*.

Top Terms	Publications
M Syndrome	115
M Humans	108
M T-Box Domain Proteins	107
M Genes	98
M Mutation	92
M Phenotype	78
M Animals	74
M DiGeorge Syndrome	67
M Heart Defects, Congenital	65
M Mice	58
M Patients	58
P Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog	54
P T-box transcription factor TBX1	54
M Transcription Factors	49
M Female	44
M Male	44
P T-box transcription factor TBX5	41
P Tubulin beta-2B chain	41
M Chromosomes, Human, Pair 22	39
M Chromosomes	37

**Figura 3. Distribución de términos principales asociados con publicaciones en Cardiopatías Congénitas, mutaciones de los genes *TBX* y desarrollo embrionario.** Análisis Bibliométrico mediante la Herramienta GoPubMed. Criterios de Búsqueda: ("Heart Defects, Congenital/congenital"[Mesh] OR "Heart Defects, Congenital/embryology"[Mesh] OR "Heart Defects, Congenital/genetics"[Mesh]) AND TBX\* AND mutations NOT GATA\* NOT BMP\* NOT SHH NOT NKX\*.

#### D. PREGUNTA A CONTESTAR

¿La presencia de variantes genéticas en los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* se asocia con el desarrollo de cardiopatías congénitas en particular con CIA y CIV en población mexicana?

#### E. JUSTIFICACIÓN

Las cardiopatías congénitas, son el defecto de nacimiento más común y representa la causa de muerte más frecuente durante el primer año de vida, después de los padecimientos de tipo infeccioso. A nivel mundial, se calcula que existen 1.35 millones de casos nuevos de cardiopatías congénitas por año (Van der Linde y col., 2011). En México, a partir del año 2005, las cardiopatías congénitas ocupan el segundo lugar en causas de mortalidad en menores de 1 año y la tercera causa en niños de entre 1 y 4 años (Calderon-Colmenero y col., 2010). Las cardiopatías congénitas más habituales en nuestro país son defectos en la comunicación interauricular (CIA) y comunicación interventricular (CIV).

Los genes *TBX* codifican para una familia altamente conservada de factores transcripcionales que desempeñan un papel crucial en el desarrollo de los órganos. Mutaciones en *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* se han asociado con síndromes clínicos que también involucran defectos cardíacos (Posch y col., 2010). Aproximadamente en uno de cada cuatro casos, la cardiopatía congénita ocurre en asociación con otras anomalías congénitas (Granados-Riveron y col., 2012).

A pesar de que se han realizado varios estudios genéticos que tratan de caracterizar a los genes *TBX* durante el desarrollo normal y anormal del corazón en diversos modelos animales, en el humano la mayoría de ellos se han enfocado únicamente al papel que juegan estos genes en la susceptibilidad a padecer síndromes clínicos caracterizados por defectos cardiacos. Por lo tanto, para complementar los estudios anteriores, se realizará el análisis de variantes genéticas en cardiopatías congénitas aisladas de tipo CIA y CIV.

## **F. HIPÓTESIS**

Si los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20*, poseen un papel crucial en el desarrollo embrionario del corazón, variantes genéticas en estos genes, descritas para síndromes caracterizados por cardiopatías congénitas como Holt-Oram y DiGeorge, también estarán relacionadas con las cardiopatías congénitas de tipo aislado (CIA y CIV).

## G. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVOS GENERALES

- Detectar variantes genéticas en los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* y establecer si se encuentran relacionadas con la susceptibilidad genética al desarrollo de cardiopatías congénitas aisladas de tipo CIA y CIV en población mexicana.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar el análisis de las características demográficas de la población de estudio.
- Analizar la secuencia de aminoácidos de las variantes genéticas encontradas y realizar el análisis *in silico* correspondiente.

## H. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. ESTUDIO GENÉTICO

#### A) Tipo de estudio

Casos y controles

#### B) Sujetos de estudio

El estudio incluyó pacientes mexicanos, no relacionados entre sí, que ingresaron al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” con diagnóstico de cardiopatía congénita (comunicación interventricular o comunicación interauricular), del 2011 al 2013. Los diagnósticos de las cardiopatías congénitas los realizaron médicos cardiólogos pediatras apoyándose en la historia clínica y en los exámenes como rayos X, electrocardiograma, ecocardiografía y otros. El grupo control estuvo formado por individuos adultos, sin historia de enfermedad cardiovascular en particular algún tipo de cardiopatía congénita y sin relación entre sí.

### **C) Criterios de inclusión**

1. En el caso de los pacientes, ellos o sus padres (menores de edad) firmaron la carta de consentimiento informado, con previa lectura del protocolo y conocimiento de los posibles riesgos e implicaciones involucrados. El grupo control firmó el mismo consentimiento informado.
2. Ambos sexos.
3. Diagnóstico de cardiopatía congénita para el grupo de pacientes:
  - Comunicación interventricular
  - Comunicación interauricular
4. El grupo control no presentó alguna enfermedad cardiovascular y específicamente algún tipo de cardiopatía congénita.

### **D) Criterios de exclusión**

1. Enfermedad no relacionada con la cardiopatía congénita.
2. Algún tipo de padecimiento canceroso.
3. Insuficiencia cardiaca grave o terminal.
4. Enfermedad autoinmune.
5. Enfermedad pulmonar de importante repercusión clínica.

## 6. Inmunodeficiencia.

### **1.1. Obtención de la muestra**

Se tomaron de 5 a 10 mL de sangre periférica de cada individuo (pacientes y controles) por venopunción, en tubos vacutainer con EDTA como anticoagulante.

### **1.2. Extracción de ADN**

A partir de cada muestra de sangre periférica se extrajo el ADN genómico mediante la técnica de expulsión salina (Lahiri and Nurnberger, Jr. 1991).

Para ello se transfirieron 5 mL de sangre a un tubo de centrifuga de 15 mL y se les añadió 5 mL de buffer con baja concentración de sales que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 7.6, 10 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub> y 2 mM de EDTA (TKM1). Para lisar las células se agregó 125 µL de Nonidet P-40 (NP-40, Sigma) y se mezcló varias veces por inversión. Se centrifugó a 300g por 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, manteniéndose el pellet en el fondo del tubo. El pellet se lavó con 5 mL de buffer TKM1 y se volvió a centrifugar. Se resuspendió el pellet en 0.8 mL de buffer con alta concentración de sales, que contenía 10 mM de Tris-HCl pH 7.6, 10 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.4 M de NaCl y 2 mM de EDTA (TKM2). Se agregó 50 µL de SDS al 10%, se mezcló utilizando varias veces y se incubó por 10 min a 55°C. Se agregaron 0.30 mL de una solución 6 M de NaCl en un tubo y se mezcló bien. Se centrifugó a 23 000g por 5

min. Se guardó el sobrenadante que contenía el ADN. Al sobrenadante se le añadieron 2 volúmenes de etanol al 100% a temperatura ambiente y se invirtió el tubo varias veces hasta que el ADN precipitó. El precipitado de ADN se transfirió a un tubo de microcentrifuga que contenía 1mL de etanol frío al 70%. Se centrifugó por 5 min a 23 000g a 4°C. Se secó el pellet en el Speed-vac y se resuspendió 0.5 mL de una solución que contenía 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8.0 a 65°C.

### **1.3. Escaneo de Variantes de un sólo nucleótido (SNV) y/o Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)**

Por el método de High Resolution Melting o HRM se realizó el escaneo de mutaciones y/o SNPs en la región codificante de los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20*. Los primers empleados se diseñaron para abarcar por completo cada exón y parte de la región intrónica y de modo que los amplificados abarcaran entre 300 y 400 pb, a excepción de aquellos en los que la región a amplificar lo impidiera y aquellos que fueron tomados de trabajos reportados por otros grupos de investigación (Tablas 1, 2 y 3). Para el diseño de los primers se empleó el software Primer Select de DNASTAR y se evaluó su especificidad mediante la plataforma de Primer Blast del NCBI.

**Tabla 1. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen *TBX1***

Exón	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Tm Experimental (°C)
1	5'- CCTAGCCTTGCATCGA GCCCTGAG-3'	5'- AAGCGCGAGGCCGTCCC AGC-3'	465	No se obtuvo
2	5'- TCCCCGAGCCAGTGCG TT -3'	5'- TGCCCCAGAATCGCAGC CAGAA-3'	298	70
3 <sup>a</sup>	5'- GAGGGATCTAGTCCAT TGTCT -3'	5'- CGTTCTTCTTCACCGGC GCCTTGG -3'	536	No se obtuvo
3b	5'- CCAAGGCGCCGGTGAA GAAGAACG-3'	5'- CGGGACGGCGAACAGC GAAGGAG-3'	288	45.7
4	5'- GGAGCCCAAGGGCTG GGACG-3'	5'- GAGACCCGCCACTTTCC AGG-3'	391	65
5	5'- TCAATCTCACAGGTGG GAAACTT-3'	5'- CTCTCCTCATCGGCACA CCAG-3'	493	71.7
6	5'- AACTCAGACCTCAGCC CATTTCT-3'	5'- AGTTGCCGCTGGAGAGG TCA-3'	470	70
7	5'- GGCCCTTGGTGCGCTT CTCCTAAC-3'	5'- ACGACCCCGGCCCTACC TTTCTCC-3'	363	70.7
8	5'- AAAGGCTTCCGGGACT GTGACC-3'	5'- GGTGCCAGCGTGCCCGA GAC-3'	475	No se obtuvo
9	5'- TGGAGGCGCCCGGCG CAT-3'	5'- CCCGGGCTCGCTGTCCC GAAGATT-3'	500	57

**Tabla 2. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen *TBX5***

Exón	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Tm Experimental (°C)
1 <sup>a</sup>	5'- CGCAAGGCACATTACG GAGAACT-3'	5'- CCGGAGGAATGAGGG TGATGAAC-3'	370	62
1b	5'- GTTTCATCACCCCTCATTC CTCCGG-3'	5'- GGTCTTCTTCCAACGT CTGTCAA-3'	366	59.3
1c	5'- TTGACAGACGTTGGAA GAAGACC-3'	5'- GGGCCACCAAGCAAA ATAGGGA-3'	346	59.3
2 <sup>a</sup>	5'- AATGATTTGTGCAGGA GTTTTG-3'	5'- TTCCCGGATTCGAGG TAAGAGTCA-3'	268	No se obtuvo
2b	5'- TGACTCTTACCTCGAAT CCGGGAA-3'	5'- CATTACCACATCCTC TGCTGCTC-3'	398	64.1
2c	5'- GAGCAGCAGAGGATGT GGTGAATG-3'	5'- GTGCTTCTGCAAACC TCAATG-3'	252	58.6
3	5'- TTCTCCTCGTCCCTCTC TCTACACA-3'	5'- AGTTTGGGGAAGGAA TGCCCACTAC-3'	300	60
4	5'- AAGGAGGAGCAGTCTC TGTGTTTT-3'	5'- CTATATGTGAGGTGG GAGAAATG-3'	465	60
5	5'- ATCTTGCGGAGAGCGG AACG-3'	5'- TAATTGTTGTAGTTTC TTTGTCTG-3'	446	54
6	5'- ACCTGGTGCCTGAACT GAAGC-3'	5'- TGAGACGGAGGGGA GGAAAAGGAA-3'	439	60

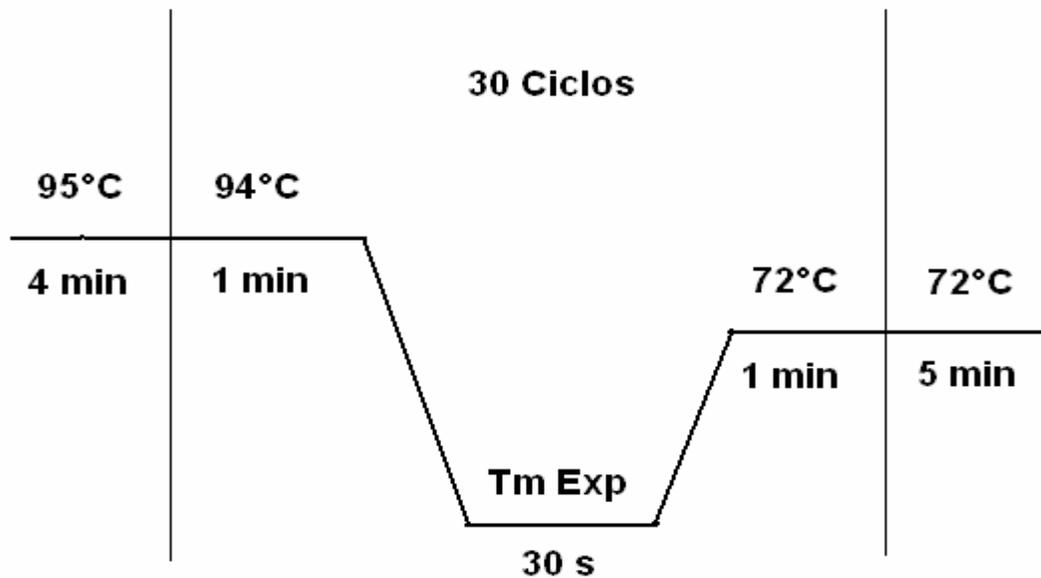
<b>Exón</b>	<b>Secuencia Primer Forward</b>	<b>Secuencia Primer Reverse</b>	<b>Tamaño del fragmento amplificado (pb)</b>	<b>Tm Experimental (°C)</b>
7	5'- ATTAGCTCATGTCCTGA GGTGGTCT-3'	5'- GTGGGGAGGAGAAAG TTGAGGAATC-3'	391	60
8	5'- CGTGACTGGCTTAATTT GCTTCTT-3'	5'- AGGTTATCAGAAAATG GGACAGAG-3'	394	63.8
9	5'- TATTCTGTGACTTTTCT GGTGGAT-3'	5'- ACTTTTTGTTTTAGCT GTTTGGTT-3'	504	57
10 <sup>a</sup>	5'- TACTTTGGCCAAATAAC TGTCTCC-3'	5'- TGAGAGTAGAGGAAC TCAGGGGGC-3'	572	61.3
10b	5'- GCCCCCTGAGTTCCTC TACTCTCA-3'	5'- CAAAGAAGGAATGG GGGAAGAGA-3'	435	60.7
10c	5'- TCTCTTCCCCATTCT TCTTTG-3'	5'- ATAGGATGCCAGGGA GCGTCAGTG-3'	432	66.9
10d	5'- CGCCCACACCAATGCC AACAC-3'	5'- CACACTCAGCCTCAC ATCTTACC-3'	359	64.1
10e	5'- TAATAAAGAGAACAGG GTAAGATG-3'	5'- TCACACTCAAGGACA ATGGAT-3'	369	52.6

Continuación Tabla 2

**Tabla 3. Secuencia de primers empleados y Tm experimentales para el gen *TBX20***

Exón	Secuencia Primer Forward	Secuencia Primer Reverse	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Tm Experimental (°C)
1a	5'- GATCGCCGCCGAGC AAAT-3'	5'- AGGAGAGGGCCCACC GAGCACTAC-3'	302	67.1
1b	5'- GTAGTGCTCGGTGGGC CCTCTCCT-3'	5'- GCGTTGGCCCGAGAG GAGAGTTGG-3'	298	65.8
1c	5'- CCAACTCTCCTCTCGG GCCAACGC-3'	5'- GCACATTCACAGCATT CAACAGAC-3'	292	56
2	5'- CATTTGGTTATGCTGTT CTTTCC-3'(Kirk y col., 2007)	5'- CTACCCAGGGAGTGT CCTG-3'(Kirk y col., 2007)	391	60
3	5'- GTTTGTGGACCGGATA GAGA-3'	5'- CAGGCTTGGAAATGCT CTCTT-3'	399	61
4	5'- ACTTATATATGGTTTAT GTGT-3'	5'- GGTCCCCTGAAGAAC ACATAAAAT-3'	373	48
5	5'- CACTGTAATTTGGCCTG TTTAGC-3'(Kirk y col., 2007)	5'- AATATAAGAACCTCCT AAATCCTTCTC-3'(Kirk y col., 2007)	289	60
6	5'- TTCCACCCTTCTCAGGA CAC-3'(Kirk y col., 2007)	5'- AGGCCTGCCTGATGT CTCT-3'(Kirk y col., 2007)	708	60
7	5'- AGTGGTTGCTTTTTGGC TGAGA-3'	5'- TCAAAGGCAAAATAAT GAAATCTG-3'	416	64
8	5'- CAGTGTTCAGTCTAA TGAGTGT-3'	5'- AGTCTGGCTCTCCTC TTTGAT-3'	520	52.6

Las condiciones de amplificación se estandarizaron empleando la Taq DNA Polymerase Recombinant de Thermo Scientific y el termociclador T Gradient de Biometra (Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de amplificación empleado para estandarizar las PCRs punto final

Para el HRM, la mezcla de reacción consistió en: 300ng de DNA, 20pmol/ $\mu$ L c/primer y SsoFast EvaGreen Supermix con un volumen final de reacción de 20 $\mu$ L. Se realizó la amplificación en tiempo real en el equipo CFX96 Touch™, Bio-Rad, empleando un esquema de amplificación específico para cada par de primer, agregando un ciclo de desnaturalización a 95°C por 30s + 78°C por 30s (Figura 5). Con lo cual se generaron las curvas de desnaturalización en un rango de temperaturas de 78 a 95°C (Incremento 0.1°C cada 10s).

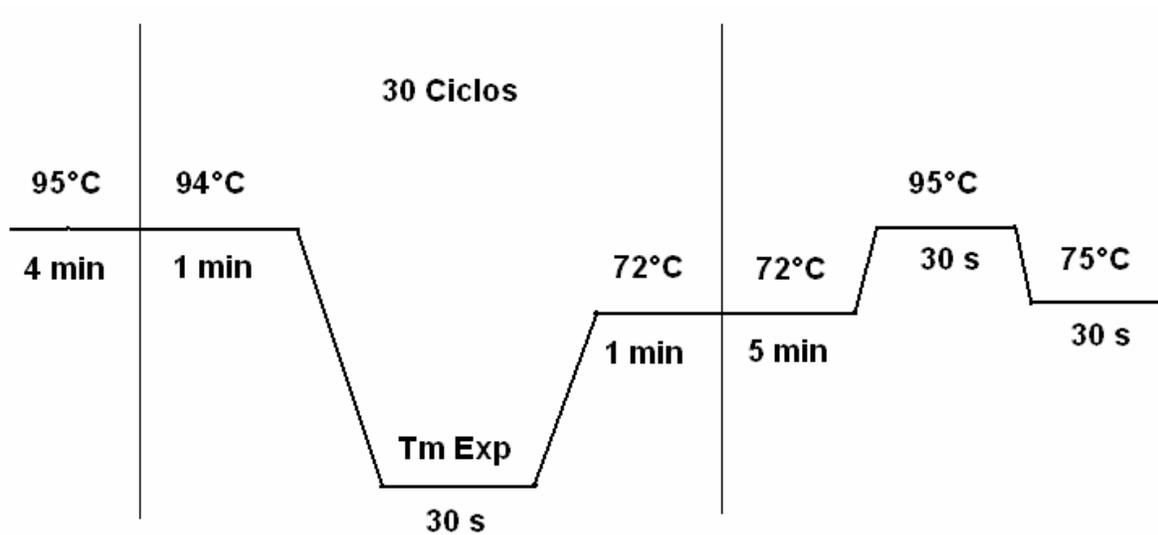


Figura 5. Esquema de amplificación empleado para los HRMs

Se analizaron las curvas de desnaturalización obtenidas, mediante el Precision Melt Analysis™ Software (Bio-Rad) y se secuenciaron las muestras representativas de cada cluster o grupo de muestras, debido a que cada cluster puede representar una secuencia diferente.

#### 1.4. Secuenciación

Los productos se purificaron mediante ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Ohio, E.U.A), a 2 µL de cada producto de PCR de interés se le añadieron 1 µL de ExoSAP-IT® y 4 µL de agua bidestilada. Se utilizó el esquema de temperaturas que se muestra en la Figura 6.

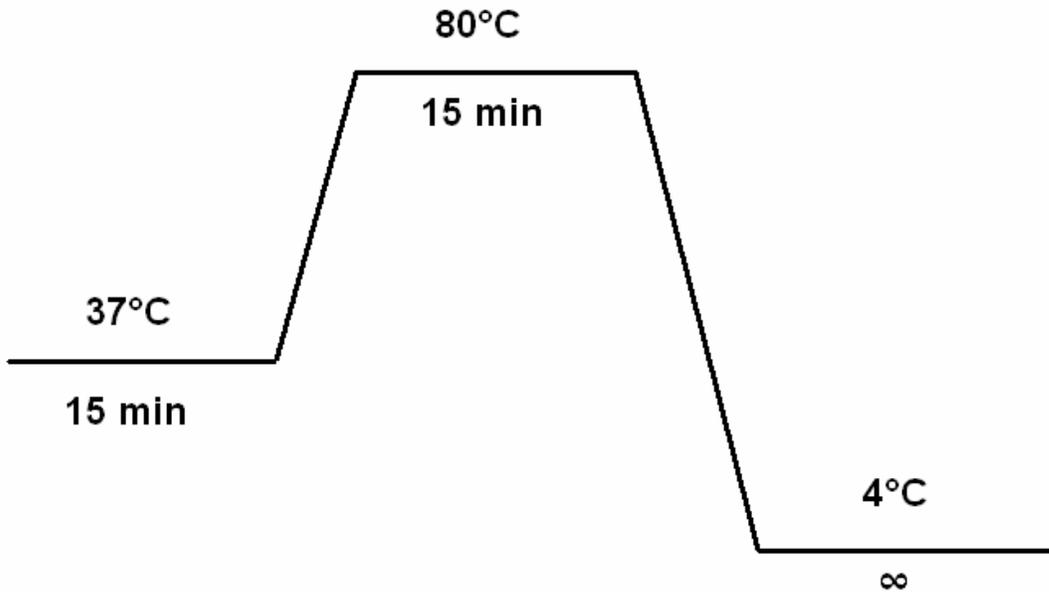


Figura 6. Esquema de temperaturas e incubación empleado para la purificación por ExoSAP-IT®.

Los productos purificados se secuenciaron empleando el kit BigDye® v1.1 y v3.1 Terminator Sequencing Cycle (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Inglaterra), para ello se añadieron 2 µL de BigDye® v1.1 y v3.1 Terminator Sequencing Cycle, 3 µL de Buffer, 1 µL de primer y 7 µL de agua bidestilada. Cada exón se secuenció con ambos primers, Forward y Reverse, a una concentración de 3.2 mM, y empleando el esquema de amplificación mostrado en la Figura 7.

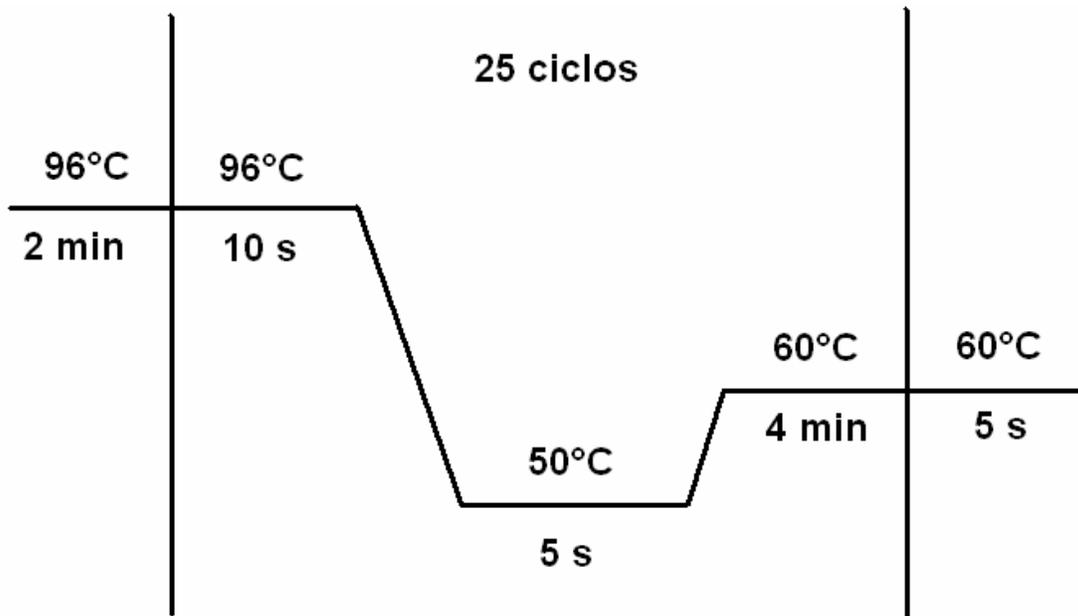


Figura 7. Esquema de amplificación empleado para la PCR de Secuencia

Las reacciones de secuenciación se purificaron empleando el kit Dye Ex 2.0 Spin kit (Qiagen, Crawley, W. Sussex, Inglaterra), centrifugándose a 1 250g por 3 min. Los productos de secuenciación purificados se secaron por 40 min en el Speed-vac, se les agregaron 15  $\mu$ L de Formamida y se incubaron a 95°C por 5 minutos. Los productos de secuenciación se corrieron en el secuenciador de capilares ABI 3130.

### 1.5. *Análisis bioinformático*

Se resolvieron las ambigüedades presentes en las secuencias obtenidas con los primers Forward y Reverse, y se obtuvo una secuencia consenso para cada región en estudio empleando el *software* BioEdit v.7.2 y el *software* EditSeq del paquete Lasergene de

DNASTAR. Las secuencias consenso se alinearon contra todas las secuencias presentes en la base de datos del NCBI utilizando la plataforma de Nucleotide Blast (nBlast).

Para aquellas secuencias en las que se encontraron diferencias contra la secuencia genómica de referencia del gen en estudio para la especie *Homo sapiens*, se obtuvieron los seis marcos de lectura posibles empleando la plataforma de Translate tool de ExPASy. Estos fueron evaluados mediante la herramienta de Protein Blast (pBlast) del NCBI, para elegir la secuencia de aminoácidos correcta y si existía cambio en la secuencia de aminoácidos con respecto a la de referencia (especie *Homo sapiens*).

Con la finalidad de obtener la nomenclatura correcta y el posible efecto de cada una de los cambios encontrados, se utilizaron las herramientas Name Checker del *software* Mutalyzer, Human Variation del NCBI y el *software* PolyPhen v2.0.23. Cuando las variaciones genéticas generaron un cambio en la secuencia de aminoácidos, se evaluó que tan conservado estaba este residuo entre otras proteínas de la familia TBX y entre diferentes especies, mediante el *software* BioEdit v.7.2.

### **1.6. Modelado *in silico***

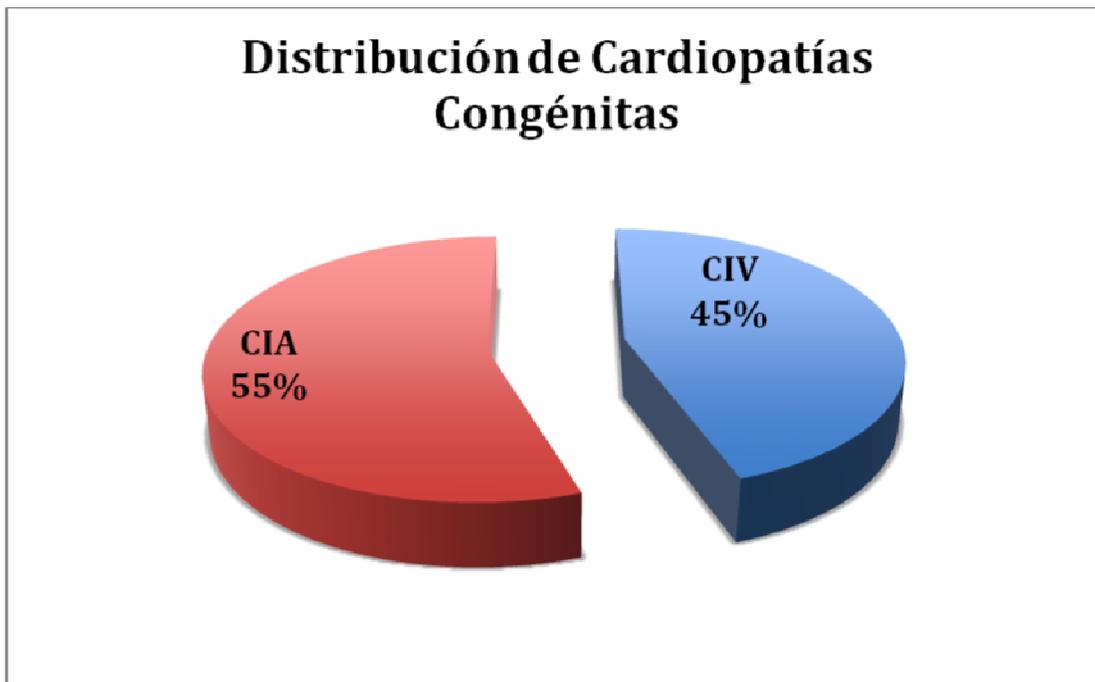
Aquellos cambios que resultaron en un cambio de aminoácido se modelaron mediante la técnica de modelado por homología, empleando la herramienta SWISS-MODEL y una estructura molde que presente más de 40% de identidad con la secuencia de interés.

## I. RESULTADOS

### 1. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

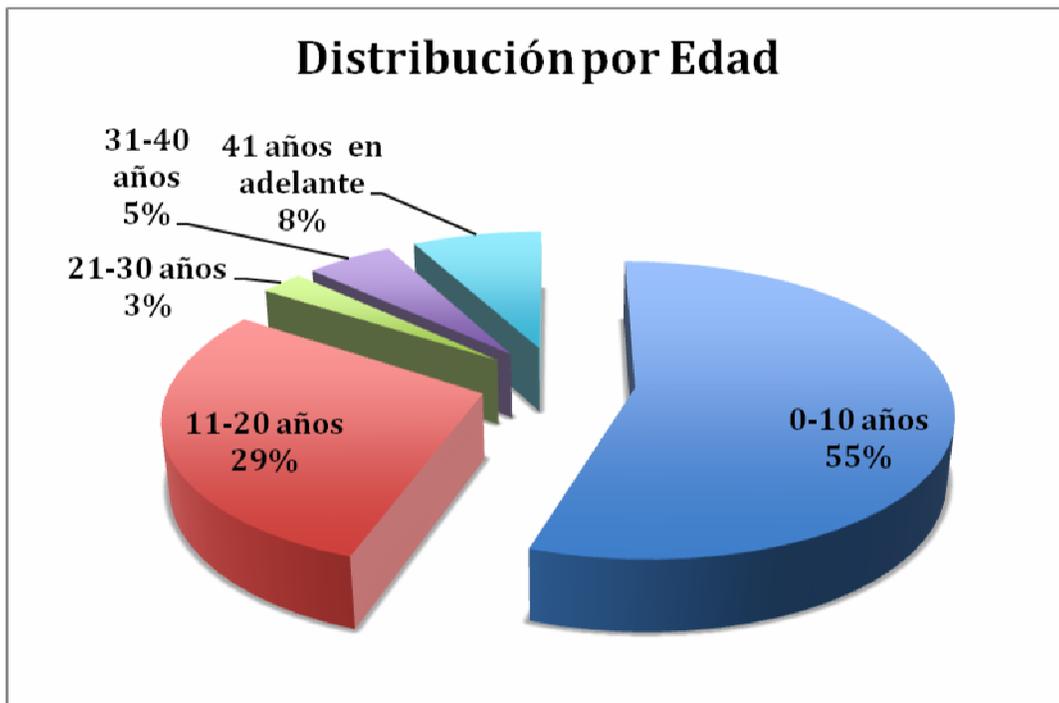
Para entender la distribución total de nuestra población, la analizamos con base en la cardiopatía congénita diagnosticada, edad y sexo. Asimismo analizamos la distribución por edad y sexo de las dos cardiopatías en estudio (CIA y CIV).

Al realizar el análisis de la población de pacientes con base a la cardiopatía congénita diagnosticada en cada caso, encontramos que la mayor parte de la población en estudio pertenece al grupo de CIA (55%), tal y como se observa en la Figura 8.



**Figura 8. Distribución de Cardiopatías Congénitas en la población de estudio.** Los porcentajes fueron calculados con base en una n=38 (CIA: 21/38; CIV: 17/38). CIA: Comunicación Interauricular, CIV: Comunicación Interventricular.

En la figura 9 se muestra la distribución de la población con respecto a rangos de edad y podemos observar que 22 de los 38 pacientes se encontraron en el rango de edad de 0 a 10 años (55 %), seguido por 11 a 20 años con un 29% (10/38) y que el grupo con menor frecuencia en la población fue el de 21 a 30 años (1/38).



**Figura 9. Distribución por Edad de la población de estudio.** Los porcentajes fueron calculados con base a una n=38 (0-10 años: 22/38; 11-20 años: 10/38; 21-30 años: 1/38; 31-40 años 2/38; 41 años en adelante: 3/38).

El análisis de la distribución de la población con base al sexo mostró que hay más pacientes femeninos con cardiopatía congénita (63%) que masculinos (37%), lo cual mostraría una tendencia mayor de las mujeres a padecer este tipo de enfermedades, pero no existen reportes de asociación de la enfermedad con el sexo del paciente (Figura 10).

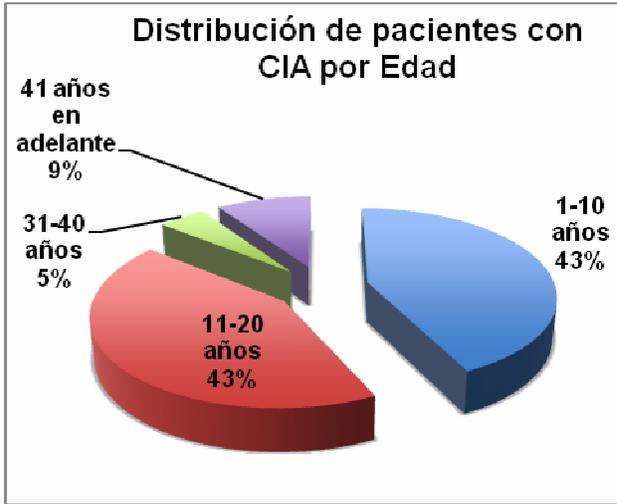


**Figura 10. Distribución por Sexo de la población de estudio.** Los porcentajes fueron calculados con base a una n=30 (Mujeres 23/38; Masculino: 15/38).

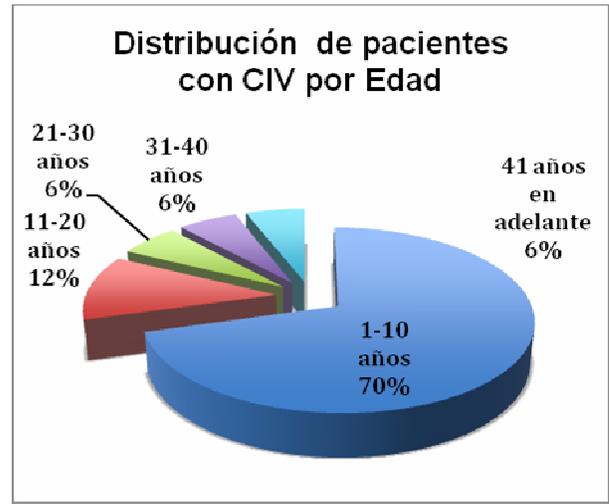
Al analizar la edad de los pacientes diagnosticados con CIA encontramos que existe un número igual de individuos pertenecientes al rango de edad de 0 a 10 años que de 11 a 20 años (9/21 ó 43% cada uno), y no se encontraron pacientes en el rango de 21 a 30 años (Figura 11A). En cuanto a los pacientes diagnosticados con CIV, la mayor parte se encontró en el rango de 1 a 10 años (70%) (Figura 11B).

El análisis por sexo demostró en ambos padecimientos que la mayor parte de la población es del sexo femenino, pero la diferencia más marcada se encontró para CIA, donde las mujeres representan el 71% de la población con CIA (Figuras 11C y 11D).

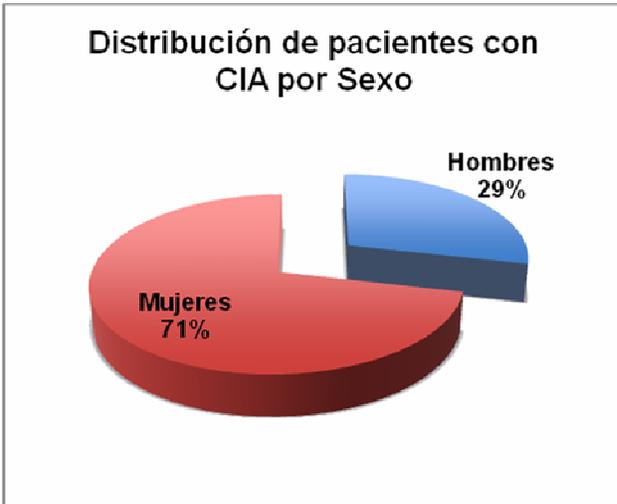
A.



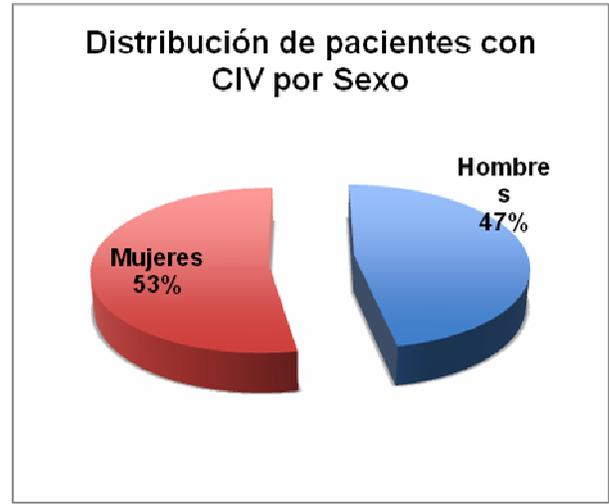
B.



C.



D.



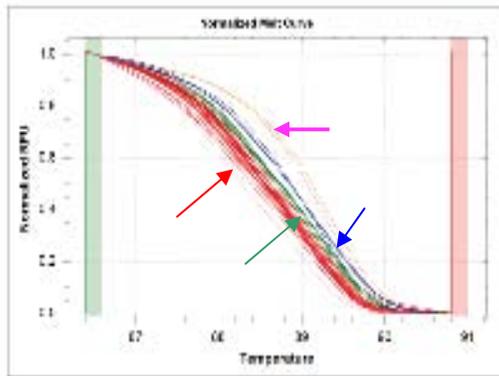
**Figura 11. Distribución por padecimiento.** A. Distribución de pacientes con CIA por Edad. B. Distribución de pacientes con CIV por Edad. C. Distribución de pacientes con CIA por Sexo. D. Distribución de pacientes con CIV por Sexo. Los porcentajes fueron calculados con base en una n=21 para CIA y con base en una n=17 para CIV

## 2. ESCANEADO DE MUTACIONES Y/O SNPs POR HIGH RESOLUTION MELTING (HRM)

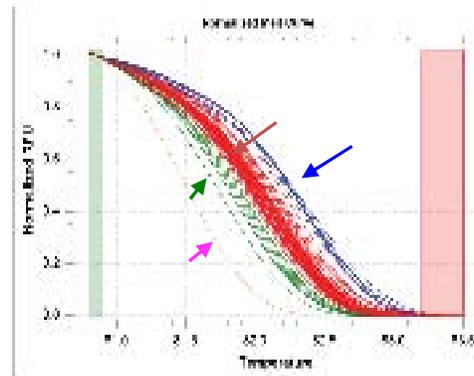
La búsqueda de mutaciones y/o SNPs en la secuencia codificante (exónica) de los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* se realizó mediante la técnica de HRM, con la cual se obtuvieron patrones diferenciales de secuencias o clusters. Mediante el análisis de los porcentajes de confianza que arroja el *software* Precision Melt Analysis™ (Bio-Rad), se determinaron las muestras representativas de cada cluster o grupo de secuencias. En las figuras 12A, 12B y 12C, se muestra un ejemplo de las curvas de desnaturalización normalizadas para un exón representativo de cada gen en estudio, así como los clusters determinados por el *software*.

Los resultados del escaneo de los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* mediante HRM se resumen en la Tablas 4, 5 y 6, respectivamente. Para cada gen se muestran los exones escaneados, la estandarización de la PCR punto final y el número de clusters encontrados para cada Exón. Para el gen *TBX1*, no se logró estandarizar la PCR punto final para los exones 1, 3a y 8; y la PCR punto final de los exones 3b y 6 no se pudieron escalar al HRM. Para el gen *TBX5*, únicamente para el exón 2a no se pudo estandarizar la PCR punto final. El gen *TBX20* fue escaneado por completo.

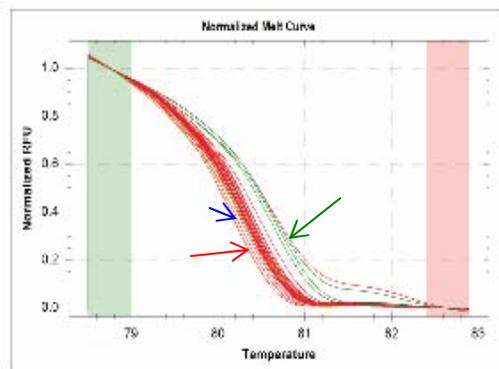
A.



B.



C.



**Figura 12. Curvas Normalizadas de Disociación de Exones Representativos de los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20*.** A. Del gen *TBX1*. Se encontraron 4 Clusters para el Exón 4. B. Del gen *TBX5*. Se encontraron 4 Clusters para el Exón 3. C. Del gen *TBX20*. Se encontraron 3 Clusters para el Exón 5. RFU: Unidades de Fluorescencia Relativa. Los clusters se señalan con las flechas de colores.

**Tabla 4. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen *TBX1***

Exón	Estandarización PCR	Muestras secuenciadas
1	No	
2	Si	2 (144CIA, 41CIA)
3 <sup>a</sup>	Si	
3b	No	
4	Si	4 (44CIA, 18CIV, 9CIV, 6 CIV)
5	Si	4 (81CIA, 50CIA, 125CIA, 45 CIA)
6	Si	
7	Si	4 (79CIA, 95 CIV, 252CIA, 255CIA)
8	No	
9	Si	4 (36CIA,95CIV, 122CIA, 6CIV)

**Tabla 5. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen *TBX5***

Exón	Estandarización PCR	Muestras secuenciadas
1 <sup>a</sup>	Si	5 (38CIV, 144CIA,18CIV, 45CIA, 125 CIV)
1b	Si	6 (163CIV, 144CIA, 1CIV, 48CIV, 9CIV, 7CIV)
1c	Si	5 (163CIV, 98CIV, 158CIV, 125CIV, 39CIA)
2 <sup>a</sup>	No	
2b	Si	4 (161CIA, 3 CIV, 160CIA, 125 CIV)
2c	Si	6 (147CIA, 9CIV, 160CIA, 39CIA, 18CIV, 125CIV)
3	Si	4 (48CIV, 89CIA, 43CIA, 82CIA)
4	Si	5 (144CIA, 3CIV, 41CIA, 160CIA, 125CIV)
5	Si	7 (79CIA, 21CIA, 41CIA, 76CIA, 44CIA, 43CIA, 3CIV)
6	Si	6 (127CIA, 45CIA, 122CIA, 48CIV, 18CIV, 39CIA)
7	Si	5 (42CIA, 81CIA, 22CIV, 9CIV, 3CIV)
8	Si	6 (147CIA, 79CIA, 45CIA, 163CIV, 125CIV, 18CIV)
9	Si	5 (130CIA, 127CIA, 158CIV, 39CIA, 255 CIA)
10a	Si	6 (42CIA, 98CIV, 166CIV, 36CIA, 1CIV, 50CIA)
10b	Si	5 (147CIA, 3CIV, 50CIA, 125CIV, 106CIA)
10c	Si	4 (161CIA, 7 CIV, 18CIV, 160CIA)
10d	Si	6 (122CIA, 106CIA, 41CIA, 18CIV, 39CIA, 125CIA)
10e	Si	6 (89CIA, 122CIA, 162CIA, 39CIA, 18CIV, 125CIV)

Tabla 6. Escaneo de Mutaciones y/o SNPs por HRM del gen *TBX20*

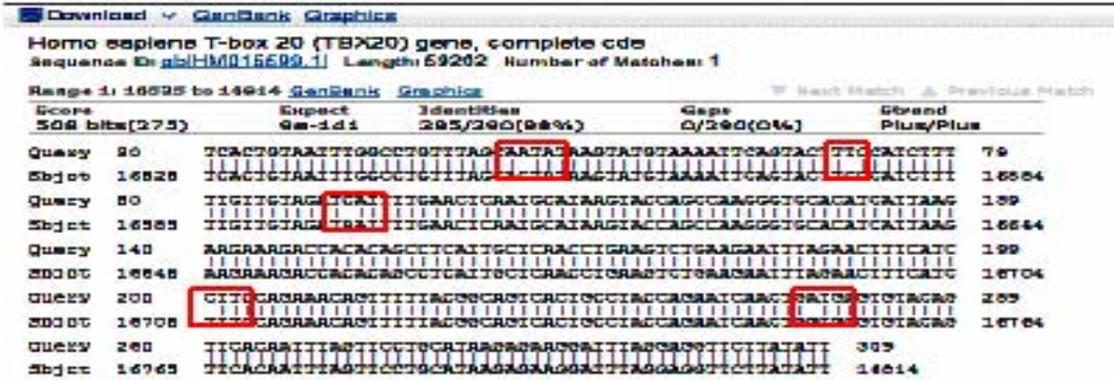
Exón	Estandarización PCR	Muestras secuenciadas
1a	Si	9 (95CIV, 122CIA, 160CIA, 162CIA, 7CIV, 48CIV, 3CIV, 125CIV, 18CIV)
1b	Si	9 (79CIA, 147CIA, 163CIV, 41CIA, 45CIA, 125CIV, 39CIA, 95CIV)
1c	Si	7 (162CIA, 122CIA, 50CIA, 42CIA, 76CIA, 89CIA, 125CIA)
2	Si	3 (3CIV, 1CIV, 44CIA)
3	Si	4 (43CIA, 7CIV, 50CIA, 40CIA)
4	Si	5 (43CIA, 44CIA, 147CIA, 160CIA, 18 CIV)
5	Si	3 (48CIA, 43CIA, 44CIA)
6	Si	3 (7CIV, 41CIA, 44CIA)
7	Si	2 (95CIV, 18CIV)
8	Si	6 /1CIV, 43CIA, 50CIA, 166CIA, 81CIV, 125CIA)

### 3. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

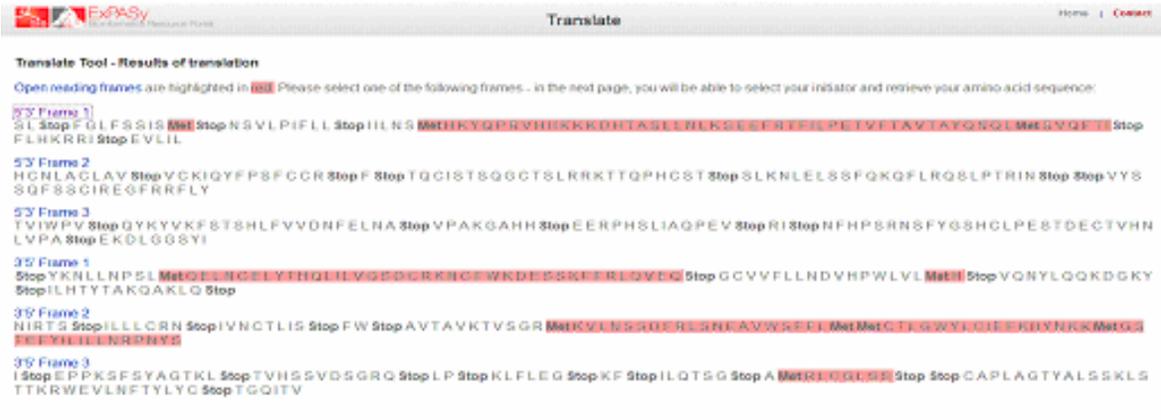
Las muestras con mayor valor de porcentaje de confianza para cada cluster fueron secuenciadas por electroforesis capilar y se analizaron las secuencias resultantes. En la Figura 13A, se muestra como ejemplo, el alineamiento resultante entre el fragmento correspondiente de la secuencia de referencia del gen *TBX20* y la secuencia para el exón 5 del gen *TBX20* de la muestra 43CIA, realizado con la herramienta nBlast del NCBI. En la Figura 13B, se ejemplifica la traducción de esta misma secuencia, empleando la herramienta de traducción de ExpASy. En cada caso la herramienta arrojó los seis marcos de lectura posibles para cada secuencia (3 en sentido 5' a 3' y 3 en sentido 3' a 5'). Se evaluaron los seis marcos de lectura (empezando por aquel marco de lectura que generara la secuencia de aminoácidos más larga), mediante la herramienta Blastp del NCBI. El análisis para el exón 5 del gen *TBX20* de la muestra 43CIA se ejemplifica en la Figura 13C.

A partir del alineamiento obtenido mediante la herramienta nBlast, se determinó la posición genómica de cada variante genética encontrada y dicha posición se utilizó para determinar la posición en la secuencia codificante de cada cambio empleando la herramienta Name Checker de Mutalyzer. Esta herramienta también permitió determinar el efecto que tenían las variantes sobre la secuencia de aminoácidos y/o el procesamiento de los transcritos. Con la herramienta Human Variation del NCBI pudimos determinar si los cambios encontrados ya habían sido reportados. Para aquellos casos en los que la variante encontrada resultaba en un cambio en la secuencia de aminoácidos se evaluó el efecto patogénico *in silico* mediante el *software* PolyPhen v2.0.23.

A.



B.



C.

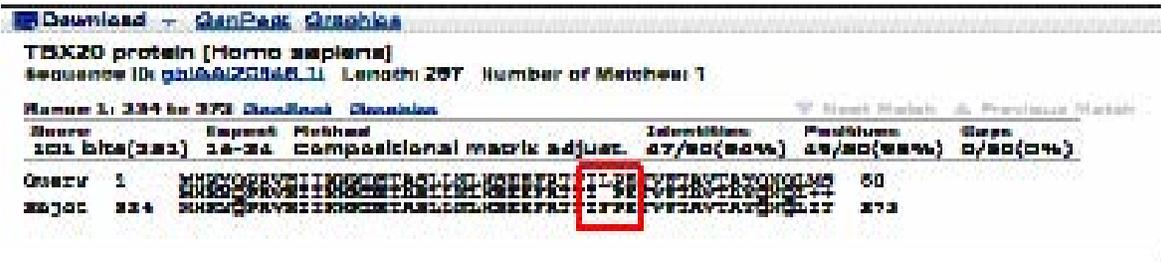


Figura 13. Análisis de la secuencia del exón 5 del gen *TBX20* de la muestra 43CIA. **A.** Alineamiento de por nBlast del NCBI la secuencia de nucleótidos. En los recuadros rojos se resaltan los cambios encontrados en la secuencia de nucleótido con respecto a la de referencia. **B.** Traducción de la secuencia de nucleótidos mediante la plataforma de ExPASy. En morado se resalta el marco de lectura elegido. **C.** Alineamiento por pBlast de la secuencia de aminoácidos. En el recuadro rojo se resalta el cambio encontrado en la secuencia de aminoácidos.

Los resultados del análisis bioinformático para los genes *TBX1*, *TBX5* y *TBX20* se resumen en las Tablas 7, 8 y 9, respectivamente. En negritas se resaltaron las variantes genéticas nuevas y aquellas que generaron un cambio en la secuencia de aminoácidos.

Para el gen *TBX1* se encontraron tres SNVs nuevas, una intrónica, una sinónima (G337G) y una en la región 3'-UTR; y dos SNPs que generaron cambio en la secuencia de aminoácido (rs140123922 y rs4819522) (Tabla 7).

**Tabla 7. Análisis Bioinformático del gen *TBX1***

EXÓN	MUESTRA	CAMBIO (NUCLEÓTIDOS)	EFEECTO
4	6CIV, 9CIV	c.420T>C	SNP rs41298814 / Sinónima F140F
	50CIA	c.410+877	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
7	79CIA	c.908+31C>A	SNP rs41298836 / Variante intrónica
10	3CIV	c.1010-29C>G	SNP rs376544585 / Variante intrónica
	3CIV	c.1011T>C	<b>SNV nueva / Sinónima G337G</b>
	3CIV	c.1019T>C	<b>SNP rs140123922 / Cambio de sentido V340A</b>
	79CIA, 122CIA	c.1049C>T	<b>SNP rs4819522 / Cambio de sentido T350M</b>
	3CIV, 79CIA, 98CIV, 122CIA	c.*121G>T	SNP rs5746826 / Afecta sitios de poliadenilación en 3'-UTR
3'UTR	45CIA, 106CIA	c. *16460A>G	<b>SNV nueva / Afecta sitios de poliadenilación en 3'-UTR</b>

En el caso de gen *TBX5* se encontraron tres SNVs nuevas intrónicas, una en la región 5'-UTR y el otra en la región 3'-UTR (Tabla 8).

**Tabla 8. Análisis Bioinformático del gen *TBX5***

Exón	Muestra	Cambio (nucleótidos)	Efecto
1 <sup>a</sup>	144CIA	c.-648C>G	SNP rs79465718 / 5'-UTR
1b	144CIA	c.-304G>T	<b>SNV nueva / Variante 5'-UTR</b>
1c	158CIV, 163CIV	c.39+113A>G	SNP rs1248046 / Variante intrónica
	158CIV	c.39+193T>A	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
4	3CIV, 144CIA	c.242+267dupC	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
7	3CIV	c.755-122A→C	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
10b	106CIA	c.*77A>G	SNP rs28730761 / Afecta los sitios de poliadenilación en 3'-UTR
	3CIV, 106CIA	c.*97G>A	SNP rs883079 / Afecta los sitios de poliadenilación en 3'-UTR
10c	18CIV, 161CIA	c.*383T>C	<b>SNV nueva / Afecta los sitios de poliadenilación en 3'-UTR</b>

Para *TBX20* se encontraron 14 SNVs nuevas, una en la región 5'-UTR, 4 intrónicas, 3 sinónimas (I219I, P399P y L397L), 3 de cambio de sentido (D309Y, T370P y M395R) y 3 en la región 3'-UTR; 2 SNPs que generaron cambio en la secuencia de aminoácidos (rs3999941 y rs201217462) (Tabla 9).

**Tabla 9. Análisis Bioinformático del gen *TBX20***

Exón	Muestra	Cambio (nucleótidos)	Efecto
1a	7CIV	c.-517C>T	<b>SNV nueva / 5'-UTR</b>
1b	41CIA, 79CIA, 147CIA	c.-187T>C	SNP rs73099190 / 5'-UTR
4	44CIA	c.546-1223dup	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
5	40CIA, 43CIA, 50CIA	c.655-18C>T	<b>SNVnueva/ Variante Intrónica</b>
	43CIA, 50CIA	c.655-44G>A	SNP rs2072434 / Variante intrónica
	43CIA, 50CIA	c.657A>C	<b>SNV nueva / Sinónima I219I</b>
	43CIA	c.766T>C	<b>SNP rs3999941 / Cambio de sentido L256F</b>
	43CIA	c.813+11G>A	SNP rs3999940 / Variante de sitio donador de splicing, variante de RNA no codificante
6	7CIV (HETERO), 41CIA	c. 890+128C>T	SNP rs2109090 / Variante intrónica
7	18CIV	c.891-55G>C	SNP rs111666016 / Variante intrónica
	18CIV	c.891-30C>G	SNP rs113178075 / Variante intrónica
	39CIA	c.925T>G	<b>SNV nueva / Cambio de sentido D309Y</b>
	39CIA	c.1003+99C>T	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
	39CIA	c.1003+129T> C	<b>SNV nueva / Variante intrónica</b>
8	50CIA	c.1108A>C	<b>SNV nueva / Cambio de sentido T370P</b>
	50CIA	c.1164A>C	<b>SNV nueva / Sinónima P388P</b>
	50CIA	c.1184T>G	<b>SNV nueva /Cambio de Sentido M395R</b>
	50CIA	c.1189C>T	<b>SNV nueva / Sinónima L397L</b>
	50CIA, 43 CIA	c.1194A>C	SNP rs2532122 / Variante sinónima
	50CIA, 43 CIA	c.1331C>T	<b>SNP rs201217462 / Cambio de sentido T444M</b>
	50 CIA	c.*12A>T	<b>SNV nueva / Afecta sitios de poliadenilación en 3'-UTR</b>

	<b>Muestra</b>	<b>Cambio (nucleótidos)</b>	<b>Efecto</b>
	50 CIA	c.*13T>A	<b>SNV nueva / Afecta sitios de poliadenilación en 3'-UTR</b>
	50 CIA	c.*48T>A	<b>SNV nueva / Afecta sitios de poliadenilación en 3'-UTR</b>

Continuación Tabla 9

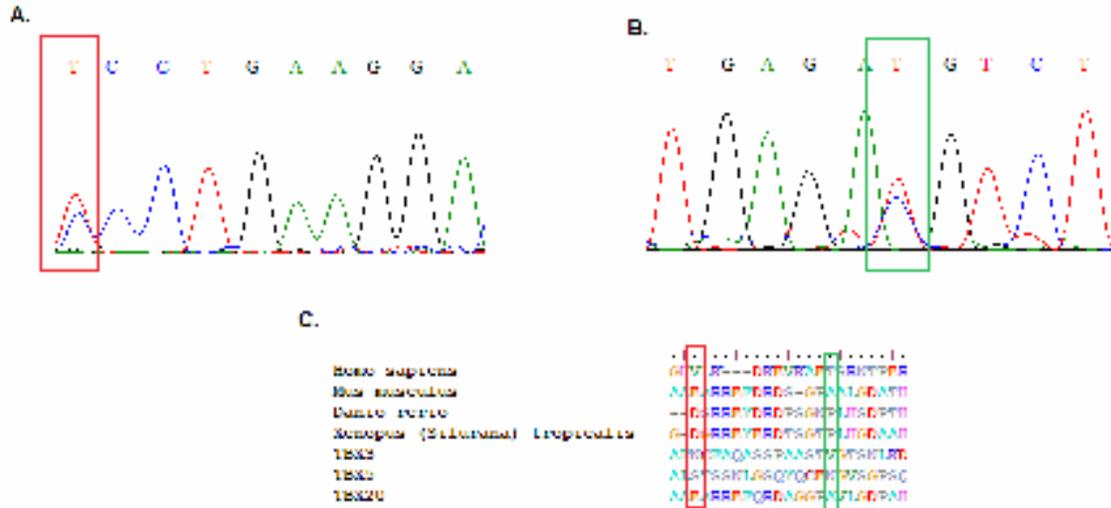
En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos del análisis realizado con el *software* Polyphen v. 2.0.23, a aquellos cambios en las secuencias de nucleótidos (SNVs o SNPs) que generaron cambio en la secuencia de aminoácidos de alguno de los tres genes estudiados. En el caso del gen *TBX1* observamos que un SNP, el rs4819522, es probablemente dañino. Para *TBX20* encontramos que los polimorfismos, rs3999941 y rs201217462 son probablemente dañinos; al igual que el SNV D309Y. Para el gen *TBX5* no encontramos polimorfismos ni mutaciones con cambio de sentido.

**Tabla 10. Análisis *in silico* del efecto de las variantes de cambio de sentido, mediante el software Polyphen v. 2.0.23**

GEN	CAMBIO	EFFECTO PATOGENICO <i>in silico</i>
TBX1	SNP rs140123922 / V340A	Benigna
	SNP rs4819522 / T350M	Probablemente Dañina
TBX20	SNP rs3999941 / L256F	Probablemente Dañina
	SNP rs201217462 / T444M	Probablemente Dañina
	SNV D309Y	Probablemente Dañina
	SNV T370P	Benigna
	SNV M395R	Benigna

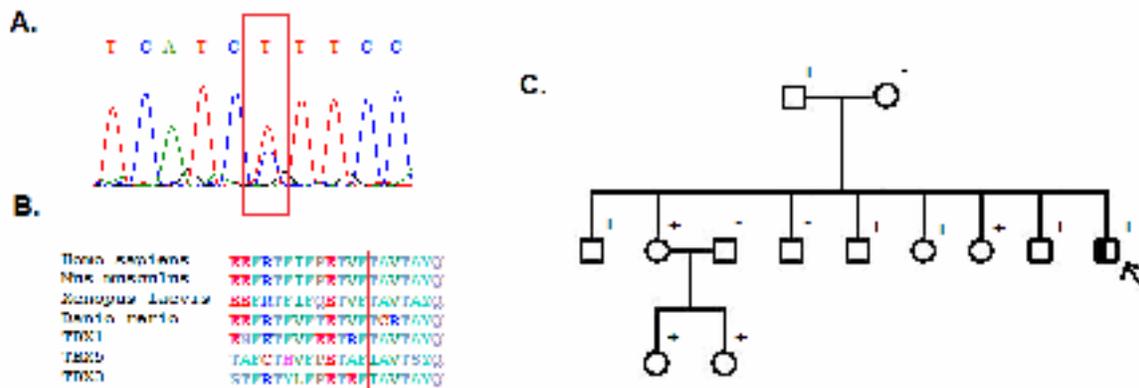
Para evaluar que tan conservados se encontraban estos residuos entre otras proteínas TBX y entre especies, se realizó un alineamiento múltiple empleando el *software* BioEdit v.7.2.

En el caso de TBX1, encontramos que los residuos de aminoácidos que son modificados por los SNPs rs140123922 (V340A) y rs4819522 (T350M), no están conservados ni entre especies, ni entre otros miembros de la familia TBX (Figura 14).



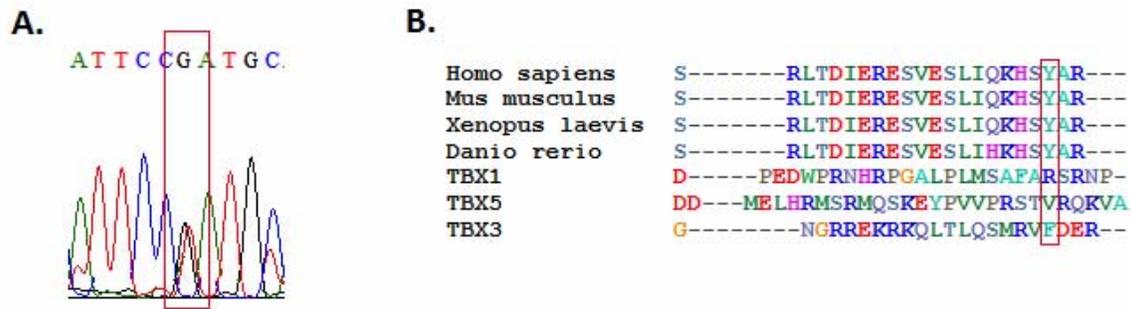
**Figura 14. Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de los SNPs de cambio de sentido del gen *TBX1*.** **A.** Electroferograma de la muestra 3CIV (Exón 10, *TBX1*), c.1019T>C (NM\_080646.1), SNP rs140123922 (V340A). **B.** Electroferograma de la muestra 79CIA (Exón 10, *TBX1*), c.1049C>T (NM\_080646.1), SNP rs4819522 (T350M). **C.** Alineamiento múltiple entre la secuencia isoforma A de *TBX1* (*Homo sapiens*), las proteínas *TBX1* de *Mus musculus*, *Danio rerio* y *Xenopus tropicalis* y las secuencias de las proteínas *TBX3*, *TBX5* y *TBX20*. En los recuadros rojos se resaltan los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del SNP rs140123922. En los recuadros verdes se resaltan los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del SNP rs4819522.

Para el SNP rs3999941 de *TBX20*, encontramos que la Leucina presente en el sitio 256 de la secuencia de aminoácidos está altamente conservada entre especies y entre proteínas de la familia *TBX*. Este residuo se encuentra dentro del dominio de unión a DNA o caja T-box. Se analizó el exón 5 del gen *TBX20* en la familia del individuo afectado en busca del SNP rs3999941, este se encontró en otros nueve miembros de la familia del individuo 43CIA. Ningún otro miembro de la familia ha sido diagnosticado con algún tipo de cardiopatía (Figura 15).

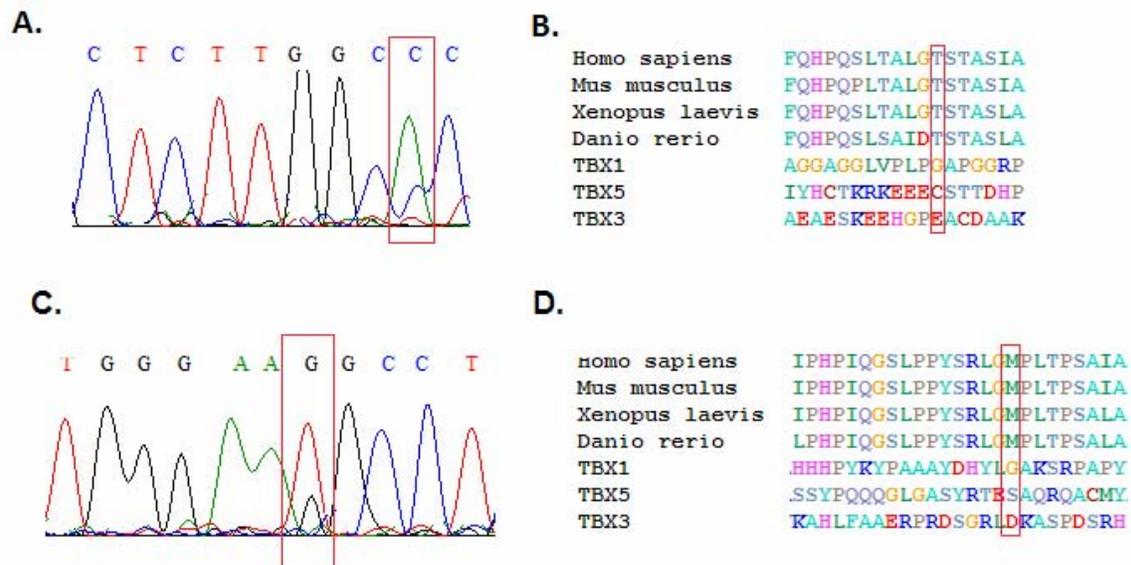


**Figura 15. Análisis del SNP rs39999941 del gen *TBX20*.** **A.** Electroferograma de la muestra 43 CIA (Exón 5 *TBX20*), c.766T>C (NM\_001077653.2), SNP rs39999941 (F256L). **B** Alineamiento múltiple entre la secuencia *TBX20* (*Homo sapiens*), las proteínas *TBX20* de *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Danio rerio* y las secuencias de las proteínas *TBX1*, *TBX3* y *TBX5*. Con los recuadros rojos se resaltan los cambios en la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del SNP rs39999941. **C.** Pedigree de la familia de 43CIA. Con el signo + se marcan los miembros que presentaron el alelo variante C, y con signo – los que presentaron el alelo silvestre T. Con una flecha se marcó el caso índice y las casillas de color negro indican los miembros que presentaron CIA.

Los residuos que son modificados por las SNVs Y309D (Figuras 16A y 16B), T370P (Figuras 17A y 17B) y M395R (Figuras 17C y 17D) son residuos altamente conservados entre especies, pero no entre proteínas de la familia TBX. Estos últimos cuatro residuos se localizan dentro del dominio que funciona como activador transcripcional.



**Figura 16. Análisis de la variante con cambio de sentido en la posición 309 de la secuencia de aminoácidos de TBX20.** **A.** Electroferograma de la muestra 39CIA (Exón 7 *TBX20*), c.925T>G (NM\_001077653.2), mutación con cambio de sentido Y309D. **B.** Alineamiento múltiple entre la secuencia *TBX20* (*Homo sapiens*), las proteínas *TBX20* de *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Danio rerio* y las secuencias de las proteínas *TBX1*, *TBX3* y *TBX5*. En el recuadro rojo se resaltan los cambios en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de esta variante genética.

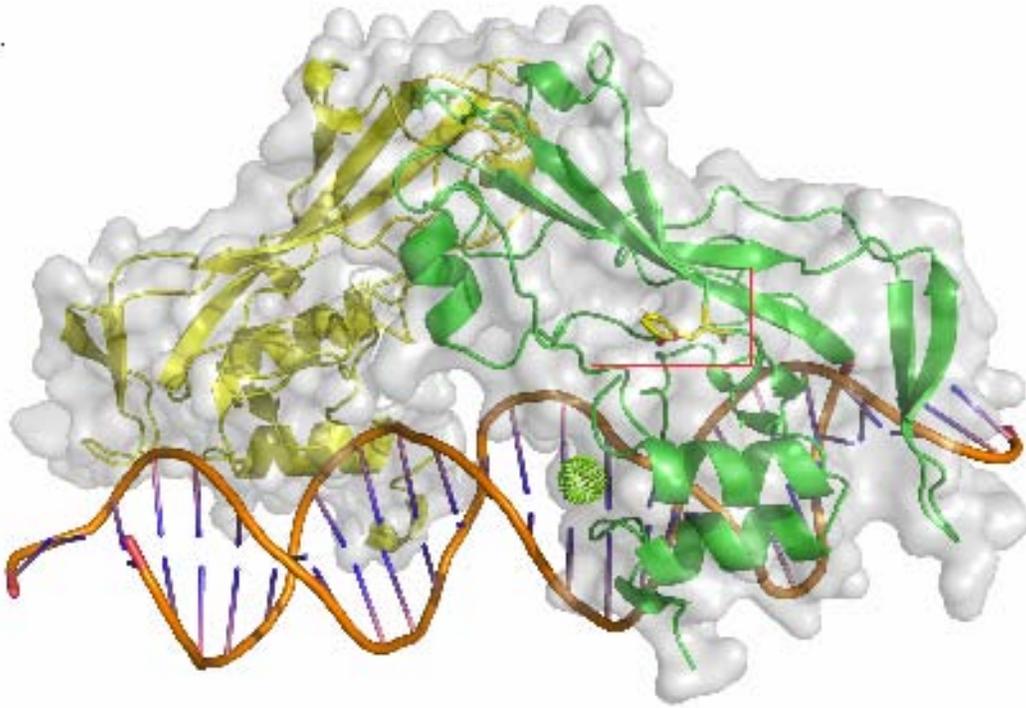


**Figura 17. Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las SNVs con cambio de sentido en las posiciones 370 y 395 de TBX20.** **A.** Electroferograma de la muestra 50CIA (Exón 8 *TBX20*), c.1108A>C (NM\_001077653.2), SNV con cambio de sentido T370P. **B.** Electroferograma de la muestra 50CIA (Exón 8 *TBX20*), c.1184T>G (NM\_001077653.2), SNV con cambio de sentido M395R. **C.** Alineamiento múltiple entre la secuencia *TBX20* (*Homo sapiens*), las proteínas *TBX20* de *Mus musculus*, *Xenopus laevis* y *Danio rerio* y las secuencias de las proteínas *TBX1*, *TBX3* y *TBX5*. En el recuadro rojo se resaltan los cambios en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de ambas variantes genéticas.

#### 4. **MODELADO *in silico***

Las secuencias de aminoácidos de las muestras que presentaron variaciones (mutaciones o SNPs) de cambio de sentido fueron modeladas por homología empleando la plataforma del Swiss Model, siempre y cuando existiera un molde de la longitud correcta y que presentará al menos un 40% de identidad con respecto a la secuencia de interés.

Para la proteína TBX1, existe un estructura cristalográfica en la base del Protein Data Bank (PDB ID: 4A04), pero esta posee una longitud de 203 aminoácidos, por tanto no se pudieron modelar las secuencias de aminoácidos para los SNPs rs140123922 (V340A) y rs4819522 (T350M). En cuanto a la proteína TBX20, sólo se pudo modelar la secuencia de aminoácidos del SNP rs3999941 (L256F), ya que el molde disponible con más del 40% de identidad con respecto a TBX20, fue TBX3 (1H6F), con una longitud de 291 aminoácidos. En la Figura 18 se muestra la estructura tridimensional de la secuencia.



**Figura 18. Modelo por Homología de la proteína TBX20 unida a una molécula de ADN, basado en la proteína TBX3 humana.** En amarillo y verde se muestra la estructura de las dos subunidades del homodímero. El círculo verde representa un átomo de Magnesio (cofactor). En el recuadro rojo se resalta el cambio de residuo de aminoácido y la pérdida de superficie hidrofóbica.

## J. DISCUSIÓN

Las cardiopatías congénitas (CC) son en conjunto la anomalía del desarrollo más común y principal causa de muerte no infecciosa en recién nacidos alrededor del mundo (Posch y col., 2010). Su prevalencia a nivel mundial varía de 6 a 8/1,000 recién nacidos vivos (RNV) (Marelli y col., 2007; Martinez y col., 2005; Mitchell y col., 1971; Samanek, 2000). En nuestro país se estima una prevalencia del 1% (10/1,000 RNV) y se estima, según datos del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), que ocupa la segunda causa de mortalidad en menores de 1 año, con una tasa cercana a 1.4/1,000 RNV, encontrándose dentro de las tres primeras causas de muerte en niños entre 1-4 años de edad (SINAIS, 2014). Las CC son enfermedades multifactoriales complejas, donde los factores ambientales y genéticos juegan un papel importante (Huang y col., 2010; Monroy-Munoz y col., 2013). Los miembros de la familia T-box son un grupo de factores transcripcionales que actúan como reguladores importantes del desarrollo cardiaco y han sido implicados en humanos con síndromes genéticos caracterizados por malformaciones cardiacas congénitas (Plageman, Jr. & Yutzey 2005).

### 1. DISTRIBUCIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO

En nuestra población en estudio encontramos que la mayoría había sido diagnosticada como CIA, lo cual es contrario a lo reportado a nivel mundial, donde se reporta que la cardiopatía congénita más frecuente es CIV (Bruneau, 2008). Lo cual nos podría estar hablando de que en nuestra población de estudio existe una distribución de cardiopatías congénitas diferente a lo reportado en otras partes del mundo. En cuanto a la distribución por edad encontramos que la mayor parte de la población se encontraba entre 0 a 10

años de edad, y prácticamente no se encontró diferencia en el análisis por separado de las dos cardiopatías congénitas en estudio (CIA y CIV). Lo anterior se puede deber a que cada vez es más frecuente el diagnóstico y corrección de este tipo de padecimientos desde temprana edad (Sander y col., 2006).

El análisis de la distribución de la población con base al sexo mostró que hay más pacientes femeninos con cardiopatía congénita que masculinos (lo mismo se observó al analizar a las cardiopatías por separado), lo cual mostraría una tendencia mayor de las mujeres a padecer este tipo de enfermedades, pero no existen reportes de asociación de la enfermedad con el sexo del paciente. Lo anterior puede deberse a un error de tipo muestral, pero existen trabajos que demuestran la expresión del receptor de andrógenos en estadios previos a la diferenciación sexual durante la embriogénesis, como en la formación de las válvulas cardíacas (Sajjad, Y y col., 2007). En el 2008 se demostró que la exposición a dosis pequeñas de testosterona y dihidrotestosterona promueve la formación de cardiomiocitos en ratones (Goldman-Johnson, D y col., 2008).

## **2. DETECCIÓN DE MUTACIONES Y/O SNPs**

Se encontró en varios casos que un paciente presentó una o más variantes (SNVs o SNPs) en un mismo gen o en dos de los genes estudiados. En algunos casos incluso se observó que un mismo paciente presentaba varias variantes genéticas en una misma región en estudio. Lo anterior puede deberse a que se ha visto en varios estudios que las mutaciones pueden generar potencialmente otras mutaciones; esto puede ocurrir indirectamente por una mutación en un gen involucrado en la replicación o reparación del

DNA, causando mutaciones en otros loci, o directamente por la influencia de una mutación segregativa en la estructura del DNA vecino. En el genoma humano se ha visto que la presencia de una mutación induce que aumente 6 veces la tasa de mutaciones puntuales (Hodgkinson & Eyre-Walker, 2011).

### **2.1. *TBX1***

El gen *TBX1* es un gen para el que se han descrito varias isoformas (por lo menos 5) resultantes de procesos de splicing alternativo y con un alto índice de complementariedad en su secuencias, por lo que resultó muy difícil diseñar primers que no generaran estructuras secundarias entre si o consigo mismos y que además fueran específicos para la región que se buscaba amplificar. Lo anterior se reflejó, en la incapacidad para estandarizar la PCR punto final de los exones 1, 3a y 8. Para los exones 3b y 6, se logró estandarizar la PCR punto final, pero al hacer el cambio de reactivos a los del HRM no se observó la amplificación correspondiente. Para estos 5 fragmentos se probaron concentraciones crecientes de DMSO hasta un máximo de 10% con respecto al volumen final de la reacción, ya que se ha reportado que el DMSO funciona como un adyuvante en la amplificación por PCR, pero los resultados fueron negativos.

Encontramos una SNv en el Intrón 4 del gen *TBX1* (c.410+877) y dos SNPs en regiones intrónicas, el SNP rs41298836 y el SNP rs376544585, los cuales a pesar de que no generan un cambio en la secuencia de aminoácidos, pueden afectar el procesamiento o splicing del exón, ya sea modificando los sitios aceptores o donadores de splicing, o modificando sitios que funcionan como enhancers o silenciadores de splicing en la región

intrónica (IES e ISS, por sus siglas en inglés). Estos cambios modifican la estructura primaria de la proteína (Lewandowska, 2013) y la función de la proteína se ve afectada ya sea positiva o negativamente.

También encontramos una SNV c.1011T>C (G337G) y un SNP, el rs41298814 (F140F), ambos sinónimos, que al igual que las anteriores no generan un cambio evidente sobre la proteína, pero se ha observado en años recientes, que afectan la expresión y la función de la proteína al controlar la eficiencia y velocidad de la traducción, así como la precisión con la que la proteína se pliega (Hunt y col., 2014).

Por otro lado, encontramos una SNV c. \*16460A>G y un SNP, el rs5746826, en la región 3'-UTR. Estos cambios o variantes genéticas pueden modificar los sitios de poliadenilación y otros elementos de secuencia necesarios para regular y controlar la iniciación del proceso de traducción, afectando por tanto la expresión de la proteína (Pichon y col., 2012).

Finalmente se encontraron dos SNPs que generaron cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína, el SNP rs140123922 (V340A) y el SNP rs4819522 (T350M). El análisis *in silico* de estos SNPs mostró que el segundo es el único que probablemente sea dañino. El software Polyphen v.2.0.23 es una herramienta de predicción que se basa en que tan conservada esta la secuencia de la proteína así como en su estructura (Yates & Sternberg, 2013). El análisis que realizamos mediante el alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de la proteína TBX1 entre especies y entre miembros de la

familia TBX, mostró que se trata de un residuo poco conservado entre las secuencias analizadas, pero quizá requerimos analizar un mayor número de secuencias para verificar el grado de conservación de este residuo, En algunos trabajos se ha demostrado al comparar herramientas de predicción *in silico*, que Polyphen es una herramienta capaz de discriminar entre una variante causante de una enfermedad de aquellos polimorfismos potencialmente neutrales (Shihab y col., 2014).

Ninguna de las mutaciones encontradas en este trabajo en el gen *TBX1*, corresponden a las reportadas por Yagi y colaboradores en el 2003 (c.443T>A, c.928G>A y c.delC1223, a pesar de que se emplearon los mismos primers y condiciones que ellos reportaron para analizar las regiones en las que encontraron dichos cambios (Yagi y col., 2003).

## **2.2. *TBX5***

Al igual que *TBX1*, *TBX5* es un gen que posee varias isoformas resultantes del proceso de splicing alternativo, pero el porcentaje de complementariedad de sus secuencias es mucho menor que en *TBX1*. El único fragmento que presentó problema en el diseño de primers específicos y sin valores altos complementariedad entre ellos o consigo mismos fue el fragmento 2a del exón 2 del gen. Esto se vio reflejado en los problemas que tuvimos para estandarizar la PCR punto final. También se probaron porcentajes crecientes de DMSO hasta el 10%, sin obtener amplificación alguna.

Localizamos 3 SNVs (c.39+193T>A, c.242+267dupC y c.755-122A→C) y un SNP, el

rs1248046 que se encuentran en regiones intrónicas. Estas variantes o cambios si se localizan en elementos de regulación en cis pueden afectar el procesamiento de los transcritos, ya que usualmente pueden inducir la pérdida de un exón, generar cambios en los límites exón/intrón o activar exones crípticos como resultado de alteraciones en los sitios donadores o aceptores de splicing. También se observó que estas variantes se relacionan con varios desórdenes genéticos (Lewandowska, 2013).

Asimismo, encontramos una SNV nueva (c.-304G>T) y el SNP rs79465718, en la región 5'UTR. Estas variantes genéticas podrían modificar los motivos TOP (necesario para su interacción con proteínas reguladoras), segmentos o sitios de entrada para los ribosomas, o los marcos de lectura ubicados río arriba (uORF, por sus siglas en inglés) (Pichon y col., 2012).

En la región 3'-UTR encontramos una SNV nueva c.\*383T>C y dos SNPs, el rs28730761 y el rs883079. Se ha observado que este tipo de cambios pueden afectar la longitud de la cola de Poli A, al elemento de poliadenilación citoplasmático y elementos específicos de unión a ARN o miRNAs. Lo cual puede generar un efecto general o específico sobre la traducción de la proteína (Pichon y col., 2012).

A diferencia del trabajo de Basson en 1997, donde encontraron dos mutaciones con cambio de sentido (c.205G>T y c.205G>A) en pacientes diagnosticados con el síndrome de Holt-Oram (Basson y col., 1997), en nuestro trabajo no se encontraron mutaciones o SNVs que generaran cambio en la secuencia de aminoácido.

### **2.3. TBX20**

Para *TBX20* se encontraron cuatro SNVs nuevas (c.546-1223dup, c.1003+99C>T, c.1003+129T>C y c.655-18C>T) y 4 SNPs previamente reportados (rs2072434, rs2109090, rs111666016 y el rs113178075), en regiones intrónicas. Asimismo se encontró un SNP, el rs3999940, que está descrito en la literatura como un cambio en el sitio donador de splicing del intrón 5. Las ocho variantes descritas al principio aunque se desconoce su efecto, podrían estar afectando el procesamiento de los transcritos al modificar los sitios donadores/ receptores de splicing o en su defecto podrían modificar las IES e ISS o podrían estar en los sitios de ramificación, los cuales generan la retención de regiones intrónicas. La última variante (rs3999940) se encuentra en un sitio esencial (región 3' o sitio donador) para el correcto procesamiento de los transcritos, y junto con las mutaciones en los sitios donadores de splicing, conforman el grupo de mutaciones de splicing más comunes. Este tipo de cambios genera la pérdida de exones, la activación de exones crípticos o la alteración de los límites exón/intrón (Lewandowska, 2013).

Se localizaron tres mutaciones SNVs (c.657A>C, c.1164A>C y c.1189C>T) y 2 SNPs (rs2532122 y rs201217462) de tipo sinónimo. Por mucho tiempo este tipo de variantes se consideraron neutrales, pero se ha visto que poseen un impacto crítico sobre elementos reguladores en cis como los potenciadores o silenciadores de splicing exónicos (ESE o ESS, por sus siglas en inglés), lo cual modifica la estructura primaria de la proteína. También podrían modificar los sitios de unión a miRNAs y factores transcripcionales, con lo cual afectarían los niveles de expresión del gen. Por otro lado, podrían generar un RNA mensajero inestable (lo cual lo volvería fácilmente degradable) (Hunt y col., 2014).

En la región 5'-UTR se identificaron una SNV nueva (c.-517C>T) y el SNP rs73099190; en la región 3'-UTR se identificaron 3 SNVs nuevas (c.\*12A>T, c.\*13T>A y c.\*48T>A). Estas variantes podrían afectar la expresión de la proteína, ya que cambios en la secuencia de estas regiones podría impedir la formación de la estructura secundaria necesaria o la formación de motivos que permiten la interacción con proteínas reguladoras, ARNs, y proteínas de unión a ARN (Pichon y col., 2012).

La mayoría de las mutaciones o variantes de cambio de sentido reportadas en *TBX20* se localizan en el dominio de unión a ADN o caja T-box (Plageman, Jr. & Yutzey 2005). Las únicas dos mutaciones descritas en el dominio activador transcripcional fueron reportadas en pacientes con cardiomiopatía dilatada (Qian y col., 2008), pero ninguna en CIA ni CIV. En este trabajo identificamos 3 SNVs de cambio de sentido nuevas en dos pacientes con CIA, lo cual consiste en el primer reporte de mutaciones en el dominio activador transcripcional de la proteína *TBX20* en pacientes con CIA. Estos cambios se generaron en residuos altamente conservados entre especies. Generalmente se ha visto, que entre más conservado este el residuo modificado por la mutación o variante, es más probable que esta sea deletérea (Bunger y col., 2007). Lo anterior se comprueba con el resultado del análisis *in silico* para la SNV Y309D (NM\_001077653.2:c.927G>T), en el cual esta SNV es probablemente dañina. No se observó el mismo resultado para las SNVs T370P y M395R, ya que el programa Polyphen hace sus predicciones basándose no solo en el grado de conservación de la secuencia, sino también en su estructura (Yates & Sternberg, 2013). El residuo 309 se encuentra en mayor proximidad al dominio de unión de DNA, por lo cual un cambio en este residuo puede resultar más dañino. Pero la importancia de las variantes en las posiciones 370 y 395 de la secuencia de aminoácidos, no debe ser subestimada. Estas SNVs podrían poseer un efecto sobre la actividad de la proteína *TBX20*, modificando la afinidad del dominio T-box por su sitio T, ya que estudios

cristalográficos e *in vitro* de proteínas, han revelado que algunas proteínas T se pueden unir al ADN como dímeros y que su dominio T forma un nuevo tipo específico de contacto con el ADN, en el que la hélice de la región carboxilo terminal se embebe profundamente en el surco menor del ADN, sin doblarlo (Muller & Herrmann, 1997; Papapetrou y col., 1997). También se ha observado, que los dominios activadores transcripcionales (región carboxilo terminal) de los factores transcripcionales son necesario para interactuar con la maquinaria transcripcional basal, y un cambio en este dominio, puede afectar su actividad, tal y como lo observaron en el 2007, Farin y colaboradores. Ellos realizaron un análisis molecular de las proteínas TBX15 y TBX18 y encontraron que las regiones amino y carboxilo terminales participan en la formación del complejo proteína-ADN (Farin y col., 2007).

Encontramos dos SNPs que generaron cambio en la secuencia de aminoácidos de la proteína TBX20, el rs3999941 (L256F) y el rs111862418 (N309Y). El análisis del efecto *in silico*, mostró que ambas variantes son probablemente dañinas. La segunda se localiza en el mismo residuo de la SNV nueva Y309D, por lo cual se podría considerar que posee un efecto similar a ésta. La variante F256L (c.766T>C), se encuentra en un residuo, que originalmente se consideraba como parte del dominio de unión a ADN o caja T-box (Posch y col., 2010), pero en el modelo por homología de la proteína TBX20 obtenido en este trabajo, sugiere que este residuo está localizado fuera del dominio T-box. F256L (c.766T>C) parece reducir la superficie hidrofóbica de la proteína. Análisis de mutagénesis sitio dirigida, en los que residuos hidrofóbicos voluminosos como la leucina son reemplazados por residuos más pequeños como la alanina, demostraron que estos cambios desestabilizan a la proteína, no sólo al reducir la estabilidad hidrofóbica sino también por el costo energético asociado con la creación de una cavidad en la proteína.

Entre más grande sea la cavidad, mayor es la desestabilización (Eriksson y col., 1992). A pesar de no formar parte del dominio de unión a ADN, el cambio de fenilalanina por leucina generado por este SNP, podría afectar a la proteína TBX20 al desestabilizarla.

En comparación con los otros dos genes, en *TBX20* fuimos capaces de detectar un mayor cantidad de variaciones genéticas, esto podría deberse en primer lugar a que al ser un gen con un menor número de variantes reportadas, resultó en general más fácil amplificar cada uno de los exones que lo componen, siendo el único gen que se pudo escanear en su totalidad. En segundo lugar puede deberse a lo que ya se ha comprobado en otros trabajos (Kirk y col, 2007; Posch y col., 2010), que *TBX20* es un gen asociado con CIA, ya que 22 de las 23 SNVs detectadas, fueron en pacientes con diagnóstico de CIA. Finalmente también podría ser reflejo de la tendencia muestral, ya que el 55% de las muestras pertenece al grupo de pacientes con diagnóstico de CIA.

Aunque en este trabajo no se demostró el efecto funcional de las SNVs encontradas en el gen *TBX20*, podemos confirmar por el gran número de variantes encontradas en pacientes con CIA, que si existe una asociación entre el gen *TBX20* y el desarrollo de CIA. En cuanto a los genes *TBX1* y *TBX5*, esta asociación no se pudo determinar.

## K. CONCLUSIONES

- ❖ La mayor parte del grupo de pacientes fue diagnosticada con CIA, presenta una edad entre 1 y 10 años, debido a que en años recientes el diagnóstico de este tipo de padecimientos se realiza desde temprana edad.
  
- ❖ Aunque existen trabajos que relacionan al receptor de andrógenos y a la testosterona en el desarrollo de órganos y tejidos extragenitales, no pudimos establecer una relación entre el sexo y la incidencia de CIA y CIV, debido al tamaño muestral.
  
- ❖ Las SNVs nuevas encontradas en el dominio activador transcripcional de *TBX20*, son las primeras variantes descritas en pacientes con cardiopatías congénitas de tipo CIA.
  
- ❖ La detección de un mayor número de SNVs en el gen *TBX20* con respecto a los otros dos genes estudiados, y que la mayor parte de estos SNVs se hayan detectado en pacientes con CIA, confirma la asociación del gen *TBX20* con el desarrollo de esta enfermedad

## L. REFERENCIAS

1980. Report of the New England Regional Infant Cardiac Program. *Pediatrics*, 65, (2 Pt 2) 375-461 available from: PM:7355042

Sistema Nacional de Información en Salud.  
[www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html](http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html). 2014. 25-2-2014.  
Ref Type: Online Source

Alsan, B.H. & Schultheiss, T.M. 2002. Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development*, 129, (8) 1935-1943 available from: PM:11934859

Basson, C.T., Bachinsky, D.R., Lin, R.C., Levi, T., Elkins, J.A., Soultz, J., Grayzel, D., Kroumpouzou, E., Traill, T.A., Leblanc-Straceski, J., Renault, B., Kucherlapati, R., Seidman, J.G., & Seidman, C.E. 1997. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat.Genet.*, 15, (1) 30-35 available from: PM:8988165

Bruneau, B.G. 2008. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature*, 451, (7181) 943-948 available from: PM:18288184

Bunger, M.K., Cargile, B.J., Sevinsky, J.R., Deyanova, E., Yates, N.A., Hendrickson, R.C., & Stephenson, J.L., Jr. 2007. Detection and validation of non-synonymous coding SNPs from orthogonal analysis of shotgun proteomics data. *J.Proteome.Res.*, 6, (6) 2331-2340 available from: PM:17488105

Calderon-Colmenero, J., Cervantes-Salazar, J.L., Curi-Curi, P.J., & Ramirez-Marroquin, S. 2010. [Congenital heart disease in Mexico. Regionalization proposal]. *Arch Cardiol Mex*, 80, (2) 133-140 available from: PM:21147578

Collavoli, A., Hatcher, C.J., He, J., Okin, D., Deo, R., & Basson, C.T. 2003. TBX5 nuclear localization is mediated by dual cooperative intramolecular signals. *J.Mol.Cell Cardiol*, 35, (10) 1191-1195 available from: PM:14519429

Eriksson, A.E., Baase, W.A., Wozniak, J.A., & Matthews, B.W. 1992. A cavity-containing mutant of T4 lysozyme is stabilized by buried benzene. *Nature*, 355, (6358) 371-373 available from: PM:1731252

Fan, C., Chen, Q., & Wang, Q.K. 2009. Functional role of transcriptional factor TBX5 in pre-mRNA splicing and Holt-Oram syndrome via association with SC35. *J.Biol.Chem.*, 284, (38) 25653-25663 available from: PM:19648116

Farin, H.F., Bussen, M., Schmidt, M.K., Singh, M.K., Schuster-Gossler, K., & Kispert, A. 2007. Transcriptional repression by the T-box proteins Tbx18 and Tbx15 depends on Groucho corepressors. *J.Biol.Chem.*, 282, (35) 25748-25759 available from: PM:17584735

Funke, B.H., Lencz, T., Finn, C.T., DeRosse, P., Poznik, G.D., Plocik, A.M., Kane, J., Rogus, J., Malhotra, A.K., & Kucherlapati, R. 2007. Analysis of TBX1 variation in patients with psychotic and affective disorders. *Mol.Med.*, 13, (7-8) 407-414 available from: PM:17622328

Garg, V. 2006. Insights into the genetic basis of congenital heart disease. *Cell Mol.Life Sci.*, 63, (10) 1141-1148 available from: PM:16568242

Granados-Riveron, J.T., Pope, M., Bu'lock, F.A., Thornborough, C., Eason, J., Setchfield, K., Ketley, A., Kirk, E.P., Fatkin, D., Feneley, M.P., Harvey, R.P., & Brook, J.D. 2012. Combined mutation screening of NKX2-5, GATA4, and TBX5 in congenital heart disease: multiple heterozygosity and novel mutations. *Congenit.Heart Dis.*, 7, (2) 151-159 available from: PM:22011241

Greulich, F., Rudat, C., & Kispert, A. 2011. Mechanisms of T-box gene function in the developing heart. *Cardiovasc.Res.*, 91, (2) 212-222 available from: PM:21498422

Hatcher, C.J., Goldstein, M.M., Mah, C.S., Delia, C.S., & Basson, C.T. 2000. Identification and localization of TBX5 transcription factor during human cardiac morphogenesis. *Dev.Dyn.*, 219, (1) 90-95 available from: PM:10974675

Hodgkinson, A. & Eyre-Walker, A. 2011. Variation in the mutation rate across mammalian genomes. *Nat.Rev.Genet.*, 12, (11) 756-766 available from: PM:21969038

Hoffman, J.I., Kaplan, S., & Liberthson, R.R. 2004. Prevalence of congenital heart disease. *Am.Heart J.*, 147, (3) 425-439 available from: PM:14999190

Huang, J.B., Liu, Y.L., Sun, P.W., Lv, X.D., Du, M., & Fan, X.M. 2010. Molecular mechanisms of congenital heart disease. *Cardiovasc.Pathol.*, 19, (5) e183-e193 available from: PM:19747853

Hunt, R.C., Simhadri, V.L., Iandoli, M., Sauna, Z.E., & Kimchi-Sarfaty, C. 2014. Exposing synonymous mutations. *Trends Genet.*, 30, (7) 308-321 available from: PM:24954581

Kirk, E.P., Sunde, M., Costa, M.W., Rankin, S.A., Wolstein, O., Castro, M.L., Butler, T.L., Hyun, C., Guo, G., Otway, R., Mackay, J.P., Waddell, L.B., Cole, A.D., Hayward, C., Keogh, A., Macdonald, P., Griffiths, L., Fatkin, D., Sholler, G.F., Zorn, A.M., Feneley, M.P., Winlaw, D.S., & Harvey, R.P. 2007. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am.J.Hum.Genet.*, 81, (2) 280-291 available from: PM:17668378

Lahiri, D.K. & Nurnberger, J.I., Jr. 1991. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.*, 19, (19) 5444 available from: PM:1681511

Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B., & Evans, T. 1994. GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J.Biol.Chem.*, 269, (37) 23177-23184 available from: PM:8083222

Lewandowska, M.A. 2013. The missing puzzle piece: splicing mutations. *Int.J.Clin.Exp.Pathol.*, 6, (12) 2675-2682 available from: PM:24294354

Marelli, A.J., Mackie, A.S., Ionescu-Ittu, R., Rahme, E., & Pilote, L. 2007. Congenital heart disease in the general population: changing prevalence and age distribution. *Circulation*, 115, (2) 163-172 available from: PM:17210844

Marin-Garcia, J. 2009. Advances in molecular genetics of congenital heart disease. *Rev.Esp.Cardiol.*, 62, (3) 242-245 available from: PM:19268067

Martinez, O.P., Romero, I.C., & Alzina, d.A., V 2005. [Incidence of congenital heart disease in navarra (1989-1998)]. *Rev Esp.Cardiol.*, 58, (12) 1428-1434 available from: PM:16371202

Minguillon, C. & Logan, M. 2003. The comparative genomics of T-box genes. *Brief.Funct.Genomic.Proteomic.*, 2, (3) 224-233 available from: PM:15239925

Mitchell, S.C., Sellmann, A.H., Westphal, M.C., & Park, J. 1971. Etiologic correlates in a study of congenital heart disease in 56,109 births. *Am.J.Cardiol.*, 28, (6) 653-657 available from: PM:4256258

Monroy-Munoz, I.E., Perez-Hernandez, N., Vargas-Alarcon, G., Ortiz-San, J.G., Buendia-Hernandez, A., Calderon-Colmenero, J., Ramirez-Marroquin, S., Cervantes-Salazar, J.L., Curi-Curi, P., Martinez-Rodriguez, N., & Rodriguez Perez, J.M. 2013. [Changing the paradigm of congenital heart disease: from the anatomy to the molecular etiology]. *Gac.Med Mex*, 149, (2) 212-219 available from: PM:23652188

Muller, C.W. & Herrmann, B.G. 1997. Crystallographic structure of the T domain-DNA complex of the Brachyury transcription factor. *Nature*, 389, (6653) 884-888 available from: PM:9349824

Nemer, M. 2008. Genetic insights into normal and abnormal heart development. *Cardiovasc.Pathol.*, 17, (1) 48-54 available from: PM:18160060

Papapetrou, C., Edwards, Y.H., & Sowden, J.C. 1997. The T transcription factor functions as a dimer and exhibits a common human polymorphism Gly-177-Asp in the conserved DNA-binding domain. *FEBS Lett.*, 409, (2) 201-206 available from: PM:9202145

Pichon, X., Wilson, L.A., Stoneley, M., Bastide, A., King, H.A., Somers, J., & Willis, A.E. 2012. RNA binding protein/RNA element interactions and the control of translation. *Curr.Protein Pept.Sci.*, 13, (4) 294-304 available from: PM:22708490

Plageman, T.F., Jr. & Yutzey, K.E. 2005. T-box genes and heart development: putting the "T" in heart. *Dev.Dyn.*, 232, (1) 11-20 available from: PM:15580613

Posch, M.G., Gramlich, M., Sunde, M., Schmitt, K.R., Lee, S.H., Richter, S., Kersten, A., Perrot, A., Panek, A.N., Al Khatib, I.H., Nemer, G., Megarbane, A., Dietz, R., Stiller, B., Berger, F., Harvey, R.P., & Ozcelik, C. 2010. A gain-of-function TBX20 mutation causes congenital atrial septal defects, patent foramen ovale and cardiac valve defects. *J.Med Genet.*, 47, (4) 230-235 available from: PM:19762328

Qian, L., Mohapatra, B., Akasaka, T., Liu, J., Ocorr, K., Towbin, J.A., & Bodmer, R. 2008. Transcription factor neuromancer/TBX20 is required for cardiac function in Drosophila with implications for human heart disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105, (50) 19833-19838 available from: PM:19074289

Rauch, A., Devriendt, K., Koch, A., Rauch, R., Gewillig, M., Kraus, C., Weyand, M., Singer, H., Reis, A., & Hofbeck, M. 2004. Assessment of association between variants and

haplotypes of the remaining TBX1 gene and manifestations of congenital heart defects in 22q11.2 deletion patients. *J.Med.Genet.*, 41, (4) e40 available from: PM:15060116

Salazar, M. S. C. C. A. C. B. R. M. a. P. M. Los segmentos cardíacos primitivos, su implicación en la cardiogénesis normal aplicada a la cardiología pediátrica. *Arch Cardiol Mex S4.*, 46-57. 2006.

Ref Type: Abstract

Samaneck, M. 2000. Congenital heart malformations: prevalence, severity, survival, and quality of life. *Cardiol.Young.*, 10, (3) 179-185 available from: PM:10824896

Sander, T.L., Klinkner, D.B., Tomita-Mitchell, A., & Mitchell, M.E. 2006. Molecular and cellular basis of congenital heart disease. *Pediatr.Clin.North Am.*, 53, (5) 989-1009, x available from: PM:17027620

Scambler, P.J. 2010. 22q11 deletion syndrome: a role for TBX1 in pharyngeal and cardiovascular development. *Pediatr.Cardiol.*, 31, (3) 378-390 available from: PM:20054531

Shihab, H.A., Gough, J., Mort, M., Cooper, D.N., Day, I.N., & Gaunt, T.R. 2014. Ranking non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on disease concepts. *Hum.Genomics*, 8, 11 available from: PM:24980617

Srivastava, D. 2006. Genetic regulation of cardiogenesis and congenital heart disease. *Annu.Rev.Pathol.*, 1, 199-213 available from: PM:18039113

Szeto, D.P., Griffin, K.J., & Kimelman, D. 2002. HrT is required for cardiovascular development in zebrafish. *Development*, 129, (21) 5093-5101 available from: PM:12397116

Van der Linde, D., Konings, E.E., Slager, M.A., Witsenburg, M., Helbing, W.A., Takkenberg, J.J., & Roos-Hesselink, J.W. 2011. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J.Am.Coll.Cardiol.*, 58, (21) 2241-2247 available from: PM:22078432

Vitelli, F., Zhang, Z., Huynh, T., Sobotka, A., Mupo, A., & Baldini, A. 2006. Fgf8 expression in the Tbx1 domain causes skeletal abnormalities and modifies the aortic arch but not the outflow tract phenotype of Tbx1 mutants. *Dev.Biol.*, 295, (2) 559-570 available from: PM:16696966

Yagi, H., Furutani, Y., Hamada, H., Sasaki, T., Asakawa, S., Minoshima, S., Ichida, F., Joo, K., Kimura, M., Imamura, S., Kamatani, N., Momma, K., Takao, A., Nakazawa, M., Shimizu, N., & Matsuoka, R. 2003. Role of TBX1 in human del22q11.2 syndrome. *Lancet*, 362, (9393) 1366-1373 available from: PM:14585638

Yates, C.M. & Sternberg, M.J. 2013. The effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) on protein-protein interactions. *J.Mol.Biol.*, 425, (21) 3949-3963 available from: PM:23867278