



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas  
Reproducción Humana INPer-Facultad de Química.

*“Búsqueda de variantes genéticas en el gen TFAP2B, en un caso familiar de Persistencia del Conducto Arterioso (PCA)”.*

## TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Diana Elena López Esparza

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Emilio Rojas del Castillo  
Instituto de Ciencias Biomédicas

Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz  
Instituto Nacional de Perinatología

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., 2017.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana INPer-Facultad de Química., UNAM y Departamento de Genética., Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

Bajo la Tutoría del Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes y la Co-Tutoría de la Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz del Laboratorio de Genómica Humana, Departamento de Genética., INPer.

Con apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## Dedicatoria

A Dios que me ha llevado por el maravilloso mundo de la ciencia, por prender la luz del conocimiento en mi oscuridad de ignorancia, por la fortaleza cuando me he sentido incapaz de seguir, por darme la gracia para realizar este proyecto, por todas las bendiciones recibidas a lo largo de mi vida y por tu infinito amor y bondad. Gracias Padre por mostrarme que la ciencia es la busca de la verdad en beneficio de mis hermanos.

A mis amados padres Javier López Rivas y María Elena Esparza Hernández por creer en mi aun cuando yo he dejado de hacerlo, por levantarme cuando me he caído, por acompañarme en cada paso de mi vida, por su aliento incansable, por soportar mi estrés con ternura y comprensión, y sobre todo, por su inigualable y magnifico amor.

## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por haberme dado la oportunidad de seguir creciendo académica y personalmente.

De todo corazón agradezco a mi tutor de Tesis el Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por todo su apoyo, paciencia, dedicación y motivación. Sin usted no hubiera sido posible realizar y finalizar este proyecto. Gracias por creer en mí, por ser un gran científico que busca y comparte el conocimiento y al mismo tiempo un ser humano extraordinario.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Emilio Rojas del Castillo (Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM) y la Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz (INPer) por haber querido ser parte de este proyecto, por su dirección, consejos y el valioso tiempo que se tomaron para guiarme, enseñarme y corregirme.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico.

Al Departamento de Genética del INPer, a su ex-jefa de departamento la Dra. Patricia Grether González y a la actual jefa de departamento la Dra. Mónica Aguinaga Ríos y a todo el personal que ahí labora por el apoyo y el uso de sus instalaciones durante la realización de este proyecto. Así como al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) y al director de investigación el Dr. Héctor Alfredo Baptista González.

Al Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez por todo su tiempo, apoyo y consejos que fueron sumamente valiosos en la realización de este proyecto.

A la Dra. Alejandra Cabrera Reyes por su tiempo y enseñanzas para el análisis bioinformático de este proyecto.

# Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas	9
Abreviaturas	10
Resumen	12
<i>Abstract</i>	13
Marco Teórico	14
1. Introducción	14
2. Conducto Arterioso	15
2.1. Descripción general . . . . .	15
2.2. Formación del Conducto Arterioso . . . . .	15
2.3. Histología . . . . .	16
2.4. Circulación fetal: función e importancia del Conducto Arterioso . . . . .	16
2.5. Mantenimiento del Conducto Arterioso en la vida fetal . . . . .	18
2.6. Cierre normal del Conducto Arterioso . . . . .	19
2.6.1. Remodelamiento del CA o cierre anatómico . . . . .	19
2.6.2. Contracción del Conducto Arterioso o cierre funcional . . . . .	21
2.6.3. Formación del ligamento arterioso . . . . .	23
3. Persistencia del Conducto Arterioso (PCA)	23
3.1. Descripción general . . . . .	23
3.2. Farmacoterapia para PCA. . . . .	25
3.3. PCA en México y el Mundo . . . . .	26
3.4. <i>TFAP2B</i> y PCA . . . . .	29
Justificación	32
Hipótesis	34
Características del estudio	34
Objetivos	34
Objetivo general . . . . .	34
Objetivos específicos . . . . .	34
Familia de estudio	35
Criterios de inclusión . . . . .	36
Criterios de exclusión . . . . .	37
Criterios de eliminación . . . . .	37

<b>Materiales y métodos</b>	<b>37</b>
<b>Resultados y Discusión.</b>	<b>44</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>54</b>
<b>Perspectivas</b>	<b>55</b>
<b>Referencias</b>	<b>56</b>
<b>Anexos</b>	<b>61</b>
<b>Anexo I: Wizard® Genomic DNA Purification Kit</b>	<b>64</b>
<b>Anexo I: Oligonucleótidos</b>	<b>65</b>

## Índice de figuras

1.	<b>Corazón fetal.</b> En el corazón fetal, el CA es una estructura vascular normal que une la arteria pulmonar con la aorta descendente, provocando un corto circuito de suma importancia en la circulación fetal. . . . .	15
2.	<b>Transformación de los arcos aórticos.</b> En este esquema se observa como el sexto arco aórtico da paso al CA ( Kliegman et al., 2011). . . . .	15
3.	<b>Histología del Conducto Arterioso.</b> El CA es una arteria elástica que posee una lámina media constituida por una gran cantidad de fibras musculares separadas por fibras elásticas de elastina. La lámina intima que se transformará en los cojinetes del CA esta compuesta por células endoteliales y posee una gran cantidad de mucosa de componentes de la matriz extracelular . Modificada de (Bökenkamp et al., 2009). . . . .	16
4.	<b>Circulación en el feto y en el recién nacido.</b> En la figura a) se observa el esquema de la circulación fetal, en la cual, el CA deriva el flujo sanguíneo de la arteria pulmonar a la aorta descendente. En la figura b) se se encuentra esquematizada la circulación del recién nacido, en esta etapa el CA ya no juega un papel importante y se transforma en ligamento arterioso. Los recuadros de color verde muestran los nombres de las estructuras de adaptación y su transformación en el recién nacido. Los vasos sanguíneos tienen un código de color dependiendo la oxigenación de la sangre que transportan: rojos: oxigenación alta; morados: oxigenación moderada; rosas: oxigenación baja y azules: muy baja oxigenación (Marieb and Hoehn, 2013). . . . .	17
5.	<b>Mantenimiento del Conducto Arterioso en la vida fetal.</b> El mecanismo más importante del mantenimiento del CA en la vida fetal se lleva a cabo mediante la inactivación de la MLCK por acción de la PGE <sub>2</sub> , evitando de esta manera la contracción de las CMLCA. Al mismo tiempo, los altos niveles de PGE <sub>2</sub> evitan el desarrollo de los cojinetes de la íntima. . . . .	19
6.	<b>Remodelamiento o Cierre Anatómico a) y b).</b> a) En el último trimestre de gestación el CA comienza a prepararse para el cierre. Inicia el desensamblaje de la lámina elástica y la pérdida de las fibras elásticas de la lámina media, (b para que células musculares indiferenciadas migren de la lámina media hacia la íntima y se comiencen a desarrollar los cojinetes del CA. Modificada de (Bökenkamp et al., 2009). . . . .	20
7.	<b>Remodelamiento o Cierre Anatómico c), d) y e).</b> c) Al momento del nacimiento la respiración del feto cambia y se incrementa la pO <sub>2</sub> promoviendo la contracción de las CMLCA. Al mismo tiempo, la pérdida de la placenta baja los niveles de PGE <sub>2</sub> , induciendo el crecimiento de los cojinetes del CA y perdiéndose el mecanismo más importante de mantenimiento del CA. d) La contracción mantenida de las CMLCA y el crecimiento de los cojinetes bloquean el flujo sanguíneo del CA, dejándolo en un estado de hipoxia que promueve los procesos de necrosis y apoptosis para la formación del ligamento arterioso e). Modificada de (Bökenkamp et al., 2009). . . . .	20
8.	<b>Contracción del Conducto Arterioso o cierre funcional.</b> El CA censa el nivel de O <sub>2</sub> mediante los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, generando a su vez H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , el cual, inactiva a los canales de K <sup>+</sup> despolarizando la membrana plasmática. L los canales de Ca <sup>+2</sup> se activan y re-polarizan la membrana, al mismo tiempo el Retículo Sarcoplásmico (RS) también libera [Ca <sup>+2</sup> ] vía inositol trifosfato (IP <sub>3</sub> ). El Ca <sup>+2</sup> intracelular se une a Calmodulina (CM) y activa a la MLCK permitiendo la contracción muscular, la cual es mantenida por sensibilización al calcio. . . . .	22
9.	<b>Persistencia del Conducto Arterioso (PCA).</b> La PCA provoca un corto circuito entre la arteria pulmonar y la aorta alterando el flujo normal, lo que provoca que se sobrecargue a los pulmones y se modifique el flujo sanguíneo que va hacia otros órganos. La gravedad de la PCA depende del diámetro y la morfología del CA. . . . .	24



10.	<b>Prevalencia de subtipos de Cardiopatías Congenitas en el Mundo</b> .Defecto septal ventricular ( <i>Ventricular septal defect</i> VSD), Comunicación interauricular ( <i>Atrial septal defect</i> ASD), Persistencia del Conducto arterioso ( <i>Patent Ductus Arteriosus</i> ), Estenosis pulmonar ( <i>pulmonary stenosis</i> PS), Tetralogía de Fallot ( <i>Tetrlogy of Fallot</i> TOF), Coartación de la aorta ( <i>Coarctation of the aorta</i> Coarc), Transposición de los grandes vasos ( <i>transposition of the great arteries</i> TGA) y Estenosis aórtica ( <i>aortic stenosis</i> AoS) (van der Linde et al., 2011). . . . .	27
11.	<b>Prevalencia de las Cardipatías Congénitas a través del tiempo a nivel mundial.</b> Defecto septal ventricular ( <i>Ventricular septal defect</i> VSD), Comunicación interauricular ( <i>Atrial septal defect</i> ASD), Persistencia del Conducto arterioso ( <i>Patent Ductus Arteriosus</i> ), Estenosis pulmonar ( <i>pulmonary stenosis</i> PS), Tetralogía de Fallot ( <i>Tetrlogy of Fallot</i> TOF), Coartación de la aorta ( <i>Coarctation of the aorta</i> Coarc), Transposición de los grandes vasos ( <i>transposition of the great arteries</i> TGA) y Estenosis aórtica ( <i>aortic stenosis</i> AoS) (van der Linde et al., 2011). . . . .	27
12.	<b>Principales causas de mortalidad infantil en México por Cardiopatías Congénitas a través del tiempo.</b> Persistencia del Conducto arterioso ( <i>Patent Ductus Arteriosus</i> ), Defecto septal ventricular ( <i>Ventricular septal defect</i> ), Conección ventrículo-arterial discordante ( <i>Discordant ventriculo-arterial connection</i> ), Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico ( <i>Hypoplastic left heart syndrome</i> ), Tetralogía de Fallot ( <i>Tetrlogy of Fallot</i> )(Torres-Cosme et al., 2016).	28
13.	<b>Localización de las mutaciones c.601 + 5G &gt; A y c.435_438delCCGG.</b> Representación del gen <i>TFAP2B</i> , los 3 primeros exones codifican para el dominio de transactivación y del 4-7 para el dominio de unión al DNA. La mutación c.601 + 5G > A que causa la pérdida del exón 3 se encuentra en el intrón 3 y la mutación c.435_438delCCGG se encuentra en el exón 2 y genera un codón de paro prematuro. Modificada de (Ji et al., 2014). . . . .	30
14.	<b>Familia en estudio.</b> La familia de estudio abarca tres generaciones (I-III). Los individuos afectados, un varón y tres mujeres, se encuentran resaltados en color negro. . . . .	36
15.	Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega®. Protocolo simplificado de aislamiento de DNA genómico de sangre completa. Modificada de Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Isolation of Genomic DNA from Whole Blood, Quick Protocol. Promega® EE.UU . . . . .	38
16.	<b>Oligonucleotidos utilizados para la secuenciación del gen <i>TFAP2B</i>.</b> Se observa cada par de oligonucleótidos utilizados, las regiones que abarcan y el tamaño del amplicón en pb . . . . .	39
17.	<b>Estandarización de las condiciones de PCR.</b> Marcador de peso Molecular (PM)= 1000pb (1Kb).Tamaño de los exones: Exón 1 (287 pb), Exón 2 (567 pb), Exón 3 (185pb), Exón 4 (386pb), Exón 5 (267pb), Exón 6 (336pb). Las temperaturas marcadas arriba de cada carril, son la rampa de temperaturas de alineamiento que se utilizó en cada PCR para encontrar las temperaturas óptimas de amplificación. .	40
18.	<b>Protocolo de PCR de punto final.</b> Protocolo utilizado para todas las PCR's de punto final de este proyecto. Paso 1: desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos. El paso 2: amplificación que abarca: 1) desnaturalización (95°C/1 minuto), 2) alineamiento (Temperatura optima (ver Tabla 2) /30 segundos y 3) extensión (72°C/ 1 minuto). El paso 3 : mejoramiento de la extensión (72°C/ 2 minutos) y la temperatura en termociclador hasta su almacenamiento ( 4°C). . . . .	41
19.	Variante NG_008438.1G.26673dup1 . . . . .	42
20.	<b>Variante rs886061570 y rs2982621</b> . . . . .	42
21.	<b>Variante rs886061572 y rs556444679</b> . . . . .	42
22.	<b>Variante rs2817419</b> . . . . .	43
23.	<b>Variante rs2861720</b> . . . . .	43
24.	<b>Esquema de la ubicación de las variantes encontradas variantes encontradas</b>	45

25.	<b>Frecuencias <i>rs2982621</i>.</b> Poblaciones: Todos ( <i>All</i> ), Africanos ( <i>AFR</i> ), Americanos ( <i>AMR</i> ), Asiáticos del Este ( <i>EAS</i> ), Europeos ( <i>EUR</i> ) y Asiáticos del Sur ( <i>SAS</i> ). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín ( <i>CLM</i> ), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos ( <i>MXL</i> ), Peruanos de Lima ( <i>PEL</i> ), Puertorriqueños ( <i>PUR</i> ) . . . . .	48
26.	<b>Frecuencias <i>rs2817419</i>.</b> Poblaciones: Todos ( <i>All</i> ), Africanos ( <i>AFR</i> ), Americanos ( <i>AMR</i> ), Asiáticos del Este ( <i>EAS</i> ), Europeos ( <i>EUR</i> ). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín ( <i>CLM</i> ), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos ( <i>MXL</i> ), Peruanos de Lima ( <i>PEL</i> ), Puertorriqueños ( <i>PUR</i> ) . . . . .	48
27.	<b>Frecuencias <i>rs2817420</i>.</b> Poblaciones: Todos ( <i>All</i> ), Africanos ( <i>AFR</i> ), Americanos ( <i>AMR</i> ), Asiáticos del Este ( <i>EAS</i> ), Europeos ( <i>EUR</i> ). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín ( <i>CLM</i> ), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos ( <i>MXL</i> ), Peruanos de Lima ( <i>PEL</i> ), Puertorriqueños ( <i>PUR</i> ) . . . . .	49
28.	<b>Correlación entre los alelos de las variantes <i>rs2982621</i>, <i>rs2817419</i> y <i>rs2817420</i></b> . . . . .	50
29.	<b>Frecuencia de los haplotipos de las variantes <i>rs2982621</i>, <i>rs2817419</i> y <i>rs2817420</i></b> . . . . .	51
30.	<b>Planteamiento de la prueba exacta de Fisher para la variante <i>rs886061572</i>.</b> Se muestra una tabla con los individuos sin PCA y con PCA que poseen la variante y los individuos con sin PCA y con PCA que no la poseen. Prueba realizada con RStudio (36) . . . . .	52
31.	<b>Resultados de prueba exacta de Fisher para la variante <i>rs886061572</i>.</b> Realizada con un 95% de nivel de confianza, la prueba exacta de Fisher demuestra que no hay asociación de la variable con la presencia de PCA no sindrómica, con un $p - value = 1 > 0,05$ se acepta la H0. prueba realizada con RStudio (36) . . . . .	52
32.	<b>Localización y estructura genómica de <i>TFAP2B</i>.</b> El gen <i>TFAP2B</i> se encuentra localizado en el cromosoma 6p12.3 (rectángulo de contorno rojo). Debajo se encuentra esquematizada la estructura el gen; las zonas en rojo son aquellas que fueron secuenciadas en este proyecto, los números indican la cantidad de pb que posee cada exón/intrón. Debajo del gen se encuentran los esquemas del mRNA y el CDS (region codificante). Modificada de ENSEMBL ( <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> by (Aken et al., 2016). . . . .	62

## Índice de tablas

1.	<b>Resumen de mutaciones reportadas en <i>TFAP2B</i> asociadas a PCA no sindrómica.</b> . . . . .	32
2.	<b>Temperaturas optimas de amplificación</b> . . . . .	39
3.	Resultados: Posición y cantidad de bases secuenciadas. . . . .	44
4.	<b>Resultados: Variantes encontradas.</b> . . . . .	45
5.	<b>Frecuencia de las variantes encontradas.</b> . . . . .	47
6.	Posición y tamaño de los exones/intrón del gen <i>TFPA2B</i> que fueron secuenciados en este proyecto. . . . .	62
7.	Posición y tamaño del mRNA y CDS del gen <i>TFPA2B</i> con base en los exones/intrón que fueron secuenciados en este proyecto. . . . .	63
8.	Oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación de fragmentos del gen <i>TFAP2B</i> . . . . .	65

## Abreviaturas

- **AMPc:** Adenosín Monofosfato cíclico
- **ATP:** Adenosín trifosfato
- **BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool* (by NCBI)
- **BMP's:** Bone morphogenetic proteins (Proteínas morfo genéticas óseas)
- **CA:** Conducto Arterioso
- **CDS:** *coding region sequence* (secuencia de la region codificante)
- **CM:** Calmodulina
- **COX:** Ciclo oxigenasa
- **COX I:** Ciclo oxigenasa I
- **COX II:** Ciclo oxigenasa II
- **Da:** Dalton
- **DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (DNA o Ácido desoxirribonucleico)
- **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- **ET-1:** Endotelina 1
- **EP4:** *E-type prostanoid receptor 4*
- **FDA:** *Food and Drug Administration*
- **IP3:** *Inositol trisphosphate* (Inositol trifosfato)
- **K<sub>ATP</sub>:** Canales de Potasio sensibles a ATP
- **Kv:** Canales de Potasio dependientes de voltaje
- **miRNA:** *micro RNA*
- **MLC:** *Myosin Light Chain* (Cadena Ligera de la Miosina)
- **MLCA:** Células Musculares Lisas del Conducto Arterioso
- **MLCK:** *Miosyn Light Chain Kinase* (Cinasa de la cadena ligera de la miosina)
- **MLCP:** *Miosyn Light Chain Phosphatase* (Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina)
- **NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*
- **pb:** pares de bases
- **PCA:** Persistencia del Conducto Arterioso
- **PCR:** *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- **PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>
- **PGE sintasa:** Prostaglandina E sintasa

- **PGH<sub>2</sub>**: Prostaglandina H<sub>2</sub>
- **PLC**: *Phospholipase C* (fosfolipasa C)
- **pO<sub>2</sub>**: Presión parcial de Oxígeno
- **ROCK**: *Rho-associated coiled-coil forming protein kinasa* (Protein-cinasa hélice-enrollada asociada a Rho).
- **ROS**: *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de Oxígeno)
- **RNA**: *Ribonucleic acid* (RNA o Ácido ribonucleico)
- **RS**: Retículo Sarcoplásmico
- **RT-PCR**: *Reverse transcription polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa)
- **SNP**: *Single Nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de un solo nucleótido)
- **TFAP2B**: *transcription factor AP-2 beta (activating enhancer binding protein 2 beta)*
- **UTR**: *untranslated region* (región no traducida)

# Resumen

La Persistencia del Conducto Arterioso (PCA) es una de las principales cardiopatías congénitas en México con una prevalencia aproximada de 2.9 por cada 10,000 recién nacidos vivos y es la principal causa de muerte por cardiopatías congénitas en infantes menores de un año. En el mundo también representa una de las cardiopatías congénitas más frecuentes, con una prevalencia aproximada de 1 por cada 1,000 recién nacidos vivos, lo que la posiciona como la tercer cardiopatía congénita; los continentes con más casos de PCA no síndrómica son Europa, Asia y Norte América (en los Estados Unidos existe una prevalencia aproximada de 2 por cada 10,000 recién nacidos vivos).

A pesar de que la PCA aislada es considerada como un problema de salud pública en México, los estudios realizados acerca de esta enfermedad en población mexicana son escasos. Por ello, se realizó este estudio exploratorio mediante secuenciación de Sanger para buscar variantes en el gen *TFAP2B* en una familia del Estado de México con 4 miembros diagnosticados con PCA no síndrómica. El gen *TFAP2B* es un factor de transcripción que se expresa en células derivadas de la cresta neural, en el conducto arterioso (CA) regula la transcripción de muchos genes implicados en su desarrollo así como en el proceso del cierre definitivo. *TFAP2B* es uno de los genes implicados en el cierre del CA, y se han reportado múltiples mutaciones de este gen asociadas a la presencia de PCA aislada y es, hasta ahora, el único gen asociado directamente síndrome de Char, el cual se considera la forma síndrómica más común de PCA.

Mediante el análisis de la secuencia del gen *TFAP2B* en los integrantes de la familia de estudio, se encontraron 7 variantes genéticas (*NG\_008438.1:g.266dup1*, *rs886061570*, *rs2982621*, *rs886061672*, *rs556444679*, *rs2817419* y *rs2817420*) que no pudieron vincularse a la presencia de la PCA en la familia analizada, no implican una alteración directa sobre la función del gen, pero podrían causar un aumento en la predisposición para el desarrollo de la PCA, pero aún faltan más estudios que puedan confirmarlo. Al mismo tiempo se descartó la presencia de las variantes reportadas por otros autores con asociación a PCA no síndrómica, lo que sugiere que la presencia de PCA no siempre implica alteraciones en el gen *TFAP2B* por lo que la etiología de la PCA puede variar entre individuos, además, al ser considerada una patología poligénica, los factores genéticos podrían no ser suficientes para el desarrollo de la misma.

## *Abstract*

Patent Ductus Arteriosus (PDA) is one of the most frequent congenital heart disease in Mexico with an average prevalence of 2.9 cases per 10,000 live births and it is the leading cause of mortality among children under 1 year of age from congenital heart disease. Worldwide PDA represent one of the main congenital heart disease with a prevalence of approximately 1 per 1,000 live births, positioning it how the third congenital heart disease, this pathology is highly frequent in Europe, Asia and North America (USA posses a prevalence of 2 per 10,000 live births).

Even when PDA is considered as a public health problem in Mexico there are not enough studies in this population. This is the reason why this exploratory study was realized in a Mexican family from Estado de México with four of the eight members affected with PDA. The aim of this study was searching variants in the *TFAP2B* gene using Sanger sequencing, to inquire if in this family the presence of PDA is associated with genetic alterations in the *TFAP2B* gene. The interest in finding an association between this case of familial non syndromic patent ductus arteriosus and genomic alterations in *TFAP2B*, comes from the intimate relationship among the expression of *TFAP2B* and the development and closure of the ductus arteriosus. This gene regulates the transcription of many fundamental genes of the ductus arteriosus closure and is the only one gene, until now, associated with the syndromic form of PDA, Char syndrome.

Were identified 7 genetic variants (*NG\_008438.1:g.266dup1*, *rs886061570*, *rs2982621*, *rs886061672*, *rs556444679*, *rs2817419* y *rs2817420*) but no evidence was found between the variants and the presence of PDA in this case. At the same time was discarded the presence of the reported variants and mutations associated with PDA. The absence of genomic alterations in *TFAP2B* suggest not all the PDA cases are developed by the same reasons, also is necessary to consider it is a multifactorial pathology and possibly genomic variations are not enough to develop non syndromic PDA.

# Marco Teórico

## 1. Introducción

El Conducto Arterioso (CA) es una estructura vascular esencial en la etapa fetal que conecta la arteria pulmonar con la aorta, creando un corto circuito que evita que la circulación pulmonar se sobrecargue. La Persistencia del Conducto Arterioso (PCA) está considerada como una cardiopatía congénita que surge cuando el CA permanece abierto posterior a los primeros tres meses de vida después del parto, provocando un corto circuito en la circulación del recién nacido que puede provocar complicaciones serias que pueden llevar a la muerte. Aún cuando se cuenta con dos tratamientos aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) para esta condición, ambos basados en la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, actualmente aún se debaten los beneficios contra los efectos adversos al utilizar estos fármacos, sumado a esto, se sabe que algunos pacientes son resistentes al tratamiento farmacológico. Por esto, es importante estudiar los diversos factores que participan en el desarrollo de esta patología, principalmente los factores genéticos que permitan comprender mejor la etiología de la enfermedad.

La mayoría de los estudios sobre PCA se han realizado por su presencia en síndromes que presentan esta patología como una de sus características. El síndrome de Char destaca por ser el más común, es autosómico dominante, está asociado al cromosoma 6p12-21 y se caracteriza por la triada: PCA, dimorfismo facial y alteraciones morfológicas en el quinto dedo. El gen *TFAP2B* (6p12.3), que se encuentra dentro del locus que se asocia al síndrome de Char, codifica para el factor de transcripción AP-2 beta que controla la expresión de genes implicados en el cierre del CA; se han reportado múltiples mutaciones en este gen que se asocian con la PCA tanto en el síndrome de Char como en PCA aislada, algunas de esas mutaciones son las mismas en ambos casos, sin embargo aún no se sabe porque un mismo genotipo da dos fenotipos diferentes.

En México la PCA es una de las cardiopatías congénitas más frecuentes y una de las que mayor mortalidad alcanza, por lo que se considera como un problema de salud pública. Aun así, los hay pocos estudios sobre esta patología realizados en México, por ello el presente proyecto busca aportar información sobre la PCA aislada en una familia de Jilotepec, Estado de México. La familia esta compuesta de ocho miembros, de los cuales, cuatro de ellos fueron diagnosticados con PCA no sindrómica que fueron tratados quirúrgicamente después de haber presentado resistencia al tratamiento. Se busca explorar, mediante secuenciación de Sanger, si existen variantes en *TFAP2B* que pudieran contribuir en el desarrollo de la PCA en esta familia. *TFAP2B* fue elegido para ser analizado por su asociación al síndrome de Char y su importante participación en el cierre del CA al regular el control del ciclo celular y la diferenciación celular en el cierre funcional, al promover la transcripción de genes necesarios para la contracción del CA y el mantenimiento de la misma; también participa en el cierre definitivo del CA al promover procesos de apoptosis/necrosis para la formación del ligamento arterioso.

La búsqueda de variantes en el gen *TFAP2B* abarcó los siete exones y en el intrón cuatro, que son las zonas con mayor cantidad de mutaciones reportadas que presentan una asociación a la presencia de PCA no sindrómica, resistencia al tratamiento y al síndrome de Char.



## 2. Conducto Arterioso

### 2.1. Descripción general

El Conducto Arterioso (CA) es una estructura vascular normal y esencial en la circulación fetal que conecta el tramo descendente proximal de la aorta, con el origen de la rama izquierda de la arteria pulmonar [Figura 1] ( Schneider and Moore, 2006a).

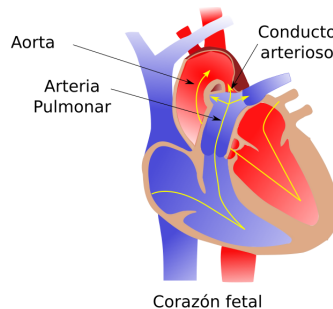


Figura 1: **Corazón fetal.** En el corazón fetal, el CA es una estructura vascular normal que une la arteria pulmonar con la aorta descendente, provocando un corto circuito de suma importancia en la circulación fetal.

### 2.2. Formación del Conducto Arterioso

Aproximadamente en la octava semana de gestación, la porción distal de la rama izquierda del sexto arco aórtico, derivado de células de la cresta neural, forma el conducto arterioso ( Schneider and Moore, 2006a). En el corazón normal, con un arco aórtico del lado izquierdo, el CA conecta a la arteria pulmonar izquierda con la aorta descendente [Figura 2] ( Ji et al., 2014).

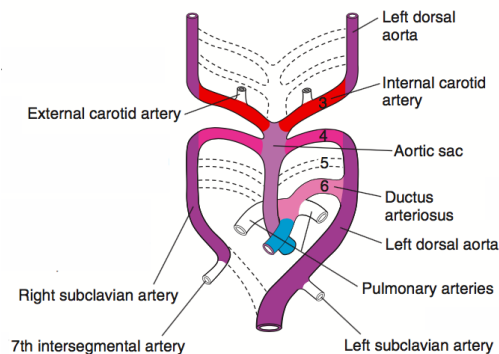


Figura 2: **Transformación de los arcos aórticos.** En este esquema se observa como el sexto arco aórtico da paso al CA ( Kliegman et al., 2011).

### 2.3. Histología

Histológicamente el CA es una arteria muscular que posee una capa adventicia, una media muscular, una lámina elástica interna y una capa íntima de endotelio (Schneider and Moore, 2006a). La capa media muscular del CA es pobre en fibras elásticas y rica en fibras musculares lisas que están dispuestas en forma helicoidal y longitudinal que le permiten contraerse y dilatarse; las fibras elásticas, principalmente formadas por elastina, están dispuestas de forma concéntrica y separan a las fibras musculares en la capa media, como se muestra en la Figura 3 (González et al., 2008). La capa íntima del CA posee endotelio espeso e irregular con material mucoide abundante, también referido como cojinetes de la íntima (Bökenkamp et al., 2009). Aunque aparentemente, la constitución del CA parece similar a la de la arteria pulmonar y a la de la aorta descendente, estas están compuestas principalmente de capas de fibras elásticas dispuestas de manera circunferencial y poseen menos fibras musculares (Schneider and Moore, 2006a).

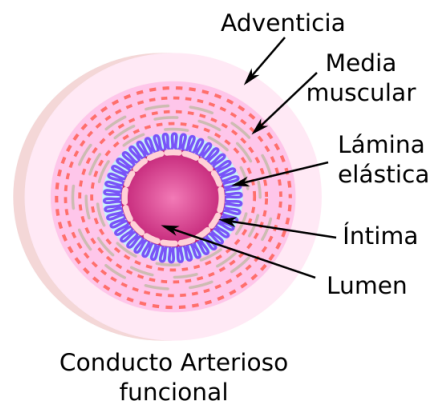


Figura 3: **Histología del Conducto Arterioso.** El CA es una arteria elástica que posee una lámina media constituida por una gran cantidad de fibras musculares separadas por fibras elásticas de elastina. La lámina íntima que se transformará en los cojinetes del CA esta compuesta por células endoteliales y posee una gran cantidad de mucosa de componentes de la matriz extracelular . Modificada de (Bökenkamp et al., 2009).

### 2.4. Circulación fetal: función e importancia del Conducto Arterioso

Durante la etapa fetal, la sangre ingresa al feto a través de la vena umbilical. Esta sangre es rica en oxígeno y procede de la placenta, lugar en donde se oxigena la sangre por intercambio gaseoso, como se observa en la Figura 4, debido a que los pulmones aún no pueden realizar la función de oxigenación porque se encuentran colapsados (Smith-Agreda and Agreda, 1991).

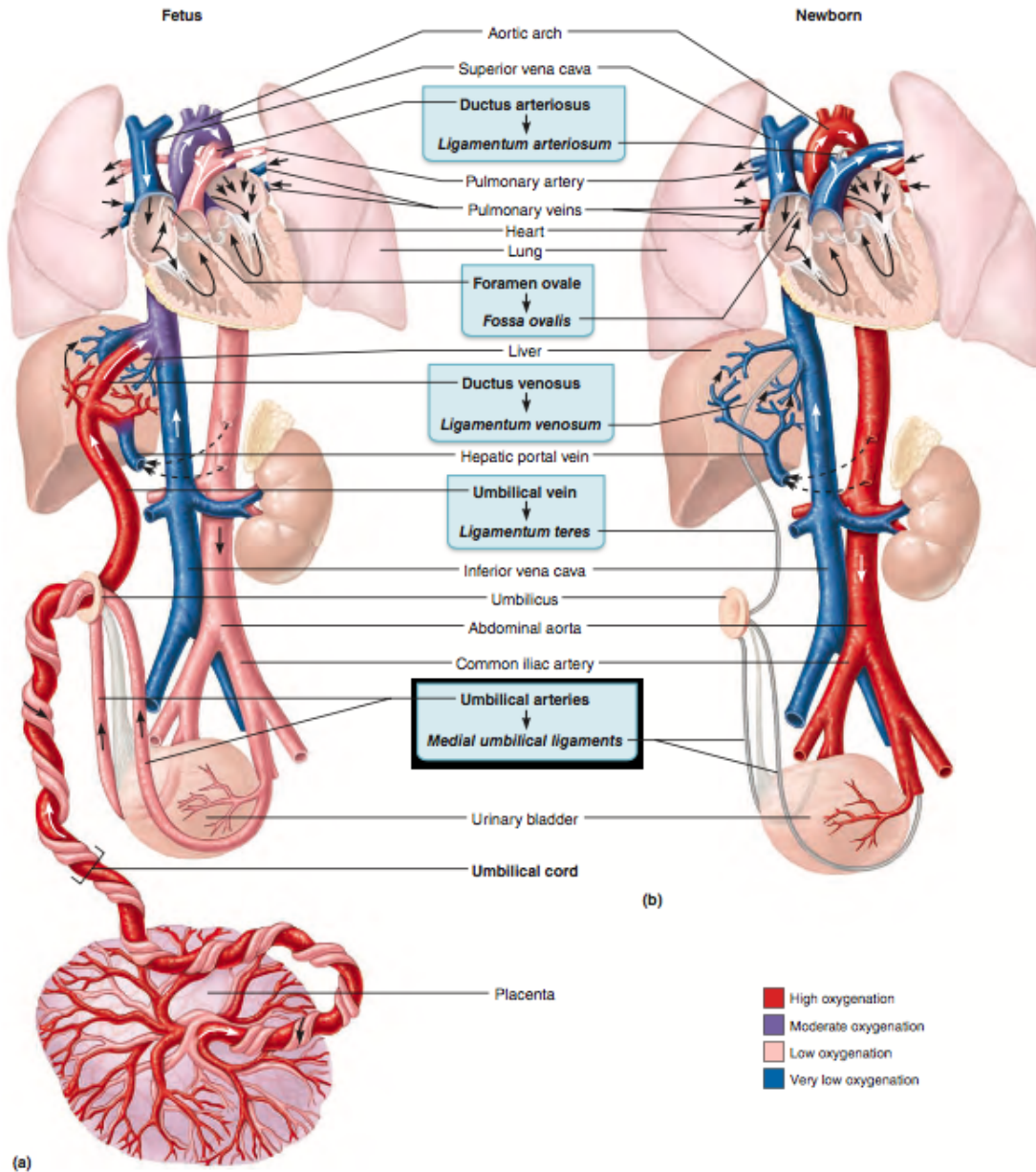


Figura 4: **Circulación en el feto y en el recién nacido.** En la figura a) se observa el esquema de la circulación fetal, en la cual, el CA deriva el flujo sanguíneo de la arteria pulmonar a la aorta descendente. En la figura b) se encuentra esquematizada la circulación del recién nacido, en esta etapa el CA ya no juega un papel importante y se transforma en ligamento arterioso. Los recuadros de color verde muestran los nombres de las estructuras de adaptación y su transformación en el recién nacido. Los vasos sanguíneos tienen un código de color dependiendo la oxigenación de la sangre que transportan: rojos: oxigenación alta; morados: oxigenación moderada; rosas: oxigenación baja y azules: muy baja oxigenación (Marieb and Hoehn, 2013).

Una vez en la vena umbilical, la sangre pasa al interior del hígado hacia el conducto hepato-cárdico siguiendo hacia la vena cava inferior y posteriormente entra a la aurícula derecha en donde la válvula de Eustaquio (válvula de la vena cava inferior) dirige la corriente hacia el foramen oval, entrando directamente en la aurícula izquierda. En la aurícula izquierda desembocan las venas

pulmonares, que en la etapa fetal son de pequeño calibre y contienen sangre muy poco oxigenada en su interior. Por el orificio aurículo-ventricular izquierdo la sangre pasa de la aurícula al ventrículo izquierdo, y una vez ahí esta será impulsada a través de la aorta para distribuirse por todo el organismo. Sin embargo, el CA vierte sangre con baja oxigenación en la porción final del cayado aórtico (casi en la aorta descendente) proveniente de la arteria pulmonar, este proceso evita que se sobrecargue el flujo que va hacia los pulmones [Figura 4] (Smith-Agreda and Agreda, 1991).

Los pulmones sólo necesitan una pequeña cantidad de sangre para aspectos nutricionales y requerimientos metabólicos, por ello, el CA desvía aproximadamente 55% del flujo sanguíneo que va hacia la arteria pulmonar. Este hecho es de extraordinaria importancia debido a que, por arriba de la desembocadura del CA inician los troncos arteriales que irrigan los miembros superiores, entre los que destacan las vesículas encefálicas; de esta manera, el encéfalo tiene una situación de privilegio en cuanto a aporte de oxígeno mientras que todos los elementos que reciben sangre de las ramas arteriales que parten de la aorta, por debajo del CA, tendrán una oxigenación más pobre. Finalmente, por las arterias umbilicales, la sangre llega a los capilares de las vellosidades placentarias, en donde se intercambia el anhídrido carbónico por oxígeno para incorporarlo al interior del feto mediante la vena umbilical, cerrándose de esta manera el circuito circulatorio [Figura 4] (Gournay, 2011).

## 2.5. Mantenimiento del Conducto Arterioso en la vida fetal

El CA se encuentra permeable desde la octava semana de gestación hasta el nacimiento (San Luis-Miranda et al., 2012). La permeabilidad del CA en el útero es un estado activo, es decir, tiene un tono intrínseco que se mantiene mediante varios mecanismos. Uno de los mecanismos más relevantes es la vasodilatación; el sistema vasodilatador más importante en el CA es la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), que tiene un potente efecto inhibitor sobre las Células Musculares Lisas del Conducto Arterioso (CMLCA) mediante la inactivación de la cinasa de la cadena ligera de la miosina ( " *Miosyn Light Chain Kinase*", MLCK) (Smith, 1998).

La PGE<sub>2</sub> se produce principalmente en la placenta y en menor medida en el CA. La estimulación de los receptores para PGE<sub>2</sub>, especialmente EP4, activa a la adenilato ciclasa; el incremento intracelular de AMPc inhibe a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), resultando en la relajación del CA [Figura 5]. La PGE<sub>2</sub> se sintetiza a partir del ácido araquidónico por una enzima con dos isoformas, la ciclo oxigenasa I y II (COX I y COX II, respectivamente)(Yokoyama et al., 2010).

La presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) participa de manera directa en la regulación de la contracción del CA mediante la modulación de la respuesta a los vasodilatadores y vasoconstrictores. La tensión relativamente baja de oxígeno, al que está expuesto el CA fetal, ayuda a mantener la permeabilidad (Smith, 1998).

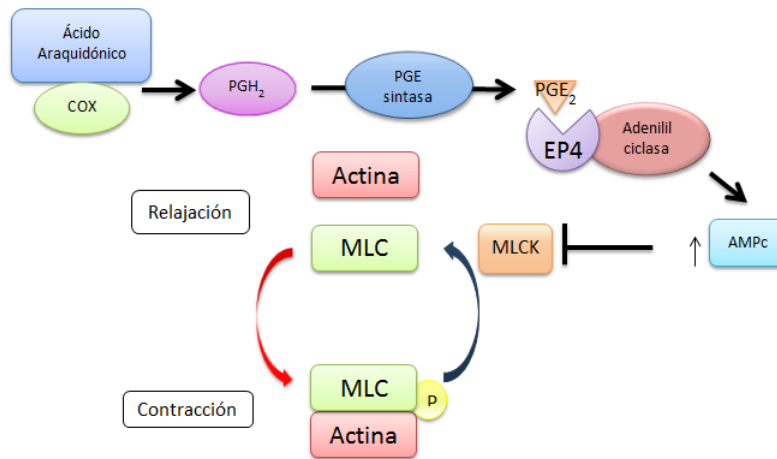


Figura 5: **Mantenimiento del Conducto Arterioso en la vida fetal.** El mecanismo más importante del mantenimiento del CA en la vida fetal se lleva a cabo mediante la inactivación de la MLCK por acción de la PGE<sub>2</sub>, evitando de esta manera la contracción de las CMLCA. Al mismo tiempo, los altos niveles de PGE<sub>2</sub> evitan el desarrollo de los cojinetes de la íntima.

## 2.6. Cierre normal del Conducto Arterioso

El cierre del CA se inicia aproximadamente en entre la semana 35-36 de gestación y termina entre las 18-48 horas posteriores al nacimiento (Gournay, 2011), aunque algunos autores marcan un rango de 3 (Schneider and Moore, 2006a) hasta 6 meses posteriores al parto (Weichert et al., 2010). El proceso de cierre del CA se realiza en tres etapas:

1. Remodelamiento del CA o cierre anatómico
2. Contracción del CA o cierre funcional
3. Cierre definitivo y la formación del ligamento arterioso

### 2.6.1. Remodelamiento del CA o cierre anatómico

El cierre anatómico del CA está asociado a procesos de diferenciación celular de su capa íntima. El engrosamiento de la íntima es el cambio fenotípico más prominente del remodelamiento e involucra varios procesos: a) un área de deposición sub-endotelial de matriz extracelular, b) el desensamblaje de la lámina elástica interna y la pérdida de fibras elásticas en la lámina media y c) la migración de células musculares lisas indiferenciadas dentro del espacio sub-endotelial (Akaike and Minamisawa, 2014) como se aprecia en la [Figura 6]).

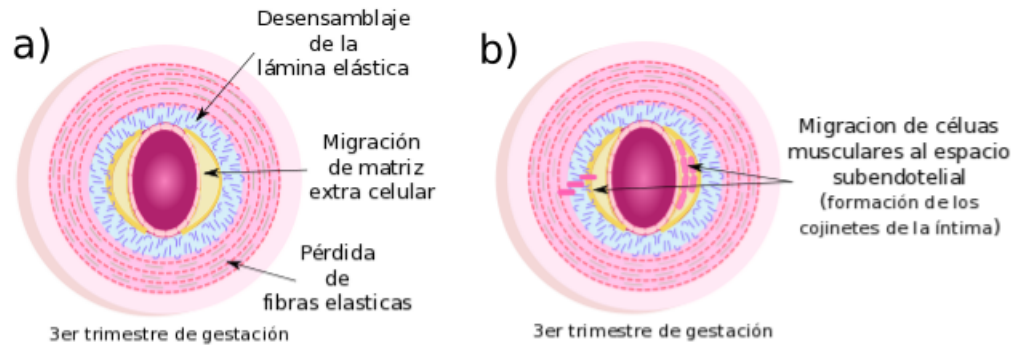


Figura 6: **Remodelamiento o Cierre Anatómico a) y b).** a) En el último trimestre de gestación el CA comienza a prepararse para el cierre. Inicia el desensamblaje de la lámina elástica y la pérdida de las fibras elásticas de la lámina media, (b para que células musculares indiferenciadas migren de la lámina media hacia la íntima y se comiencen a desarrollar los cojinetes del CA. Modificada de (Bökenkamp et al., 2009).

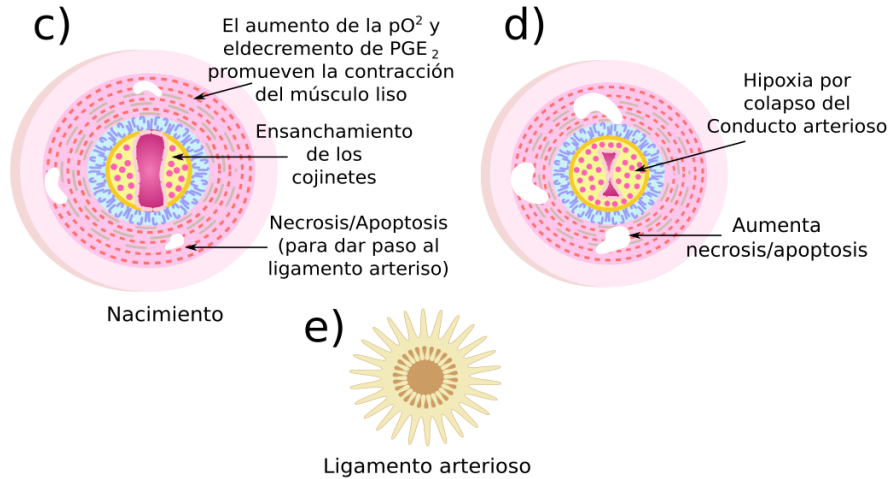


Figura 7: **Remodelamiento o Cierre Anatómico c), d) y e).** c) Al momento del nacimiento la respiración del feto cambia y se incrementa la pO<sub>2</sub> promoviendo la contracción de las CMLCA. Al mismo tiempo, la pérdida de la placenta baja los niveles de PGE<sub>2</sub>, induciendo el crecimiento de los cojinetes del CA y perdiéndose el mecanismo más importante de mantenimiento del CA. d) La contracción mantenida de las CMLCA y el crecimiento de los cojinetes bloquean el flujo sanguíneo del CA, dejándolo en un estado de hipoxia que promueve los procesos de necrosis y apoptosis para la formación del ligamento arterioso e). Modificada de (Bökenkamp et al., 2009).

El CA, para su cierre permanente, posee una programación preestablecida que activa el remodelamiento del CA en el último trimestre de gestación e involucra una serie de estímulos mecánicos y humorales. El cierre anatómico abarca cuatro mecanismos distintos: (I) desarrollo de los cojinetes de la íntima, (II) sollicitación mecánica de flujo sanguíneo turbulento a lo largo del estrechamiento del lumen, (III) hipoxia humoral por el colapso de *vasa vasorum* en el CA en constricción y (IV) interacción de plaquetas con las paredes del CA (se cree que promueven el cierre del lumen mediante la formación de trombos), Ver Figura 7 (Cocconi and Baragatti, 2012) .

El crecimiento interno de la íntima forma estructuras parecidas a cojinetes, que son críticas para el cierre permanente del CA en humanos y en muchas otras especies. El desarrollo de los cojinetes de la íntima comienza durante la etapa prenatal, en el último trimestre de gestación, y termina después del nacimiento, coincidiendo con el proceso de contracción del CA. PGE<sub>2</sub> juega un papel clave en este proceso participando de dos maneras, ambas dependientes de AMPc: la primera consiste en la deposición de ácido hialurónico dentro del tejido de la íntima, vía protein-cinasa A, y la segunda mediante la estimulación de la migración de células musculares lisas indiferenciadas hacia la íntima, por medio de la vía de señalización de la proteína Epac (Coceani and Baragatti, 2012).

El engrosamiento de la íntima inicia con el levantamiento de las células endoteliales y la acumulación de ácido hialurónico en la región sub-endotelial, creando un espacio adecuado para la migración de células musculares lisas, que atraviesan la lámina elástica que se fragmentó previamente, hasta la región sub-endotelial, como se observa en la [Figura 6] (Coceani and Baragatti, 2012). El ácido hialurónico magnifica la acción de PGE<sub>2</sub>, promoviendo la migración celular, en lo que parece ser un *loop* de autorrefuerzo, además las CMLCA secretan la glicoproteína fibronectina, que también promueve la migración; se ha reportado que las células musculares lisas del CA producen el doble de fibronectina que las células del músculo liso de la aorta (Yokoyama et al., 2010). Otros dos factores, la glicoproteína laminina y la hormona de crecimiento, parecen intervenir en el proceso de migración. El crecimiento de los cojinetes de la íntima persiste hasta el periodo postnatal a través de la influencia residual de PGE<sub>2</sub> y por la activación inducida por oxígeno de los canales de Ca<sup>+2</sup> tipo T (Coceani and Baragatti, 2012).

### **2.6.2. Contracción del Conducto Arterioso o cierre funcional**

Después del nacimiento, la contracción del CA es desencadenada por: a) incremento de la tensión de oxígeno, b) decremento significativo de PGE<sub>2</sub> circulante y la promoción de su degradación por los pulmones, c) decremento en la expresión de los receptores para PGE<sub>2</sub> (especialmente EP4) en la pared del CA y d) decremento de la presión sanguínea dentro del CA causada por el crecimiento de los cojinetes de la íntima (Akaike and Minamisawa, 2014).

La transición de la circulación fetal a la circulación del recién nacido comienza con la primera respiración, la cual, aumenta la presión parcial de oxígeno (pO<sub>2</sub>) reduciendo la resistencia vascular pulmonar, este incremento activa la contracción del CA permitiendo que el flujo sanguíneo pulmonar incremente (Archer et al., 2004). La contracción del CA bajo condiciones normales depende de dos eventos independientes: el incremento en la sangre de la pO<sub>2</sub> y la caída en la concentración de PGE<sub>2</sub> al perderse la placenta. Estos eventos contribuyen sinérgicamente para la contracción y cierre funcional del CA (Coceani, 1994).

La mayoría de los músculos lisos vasculares se contraen en respuesta al incremento de la tensión de oxígeno pero la contracción del músculo liso del CA es de mayor magnitud. Esto se debe a que el CA ha desarrollado un sistema altamente especializado de censo de oxígeno, así como genes que la mantienen de manera independiente a la concentración de calcio intracelular (sensibilización al calcio). (Coceani and Baragatti, 2012).

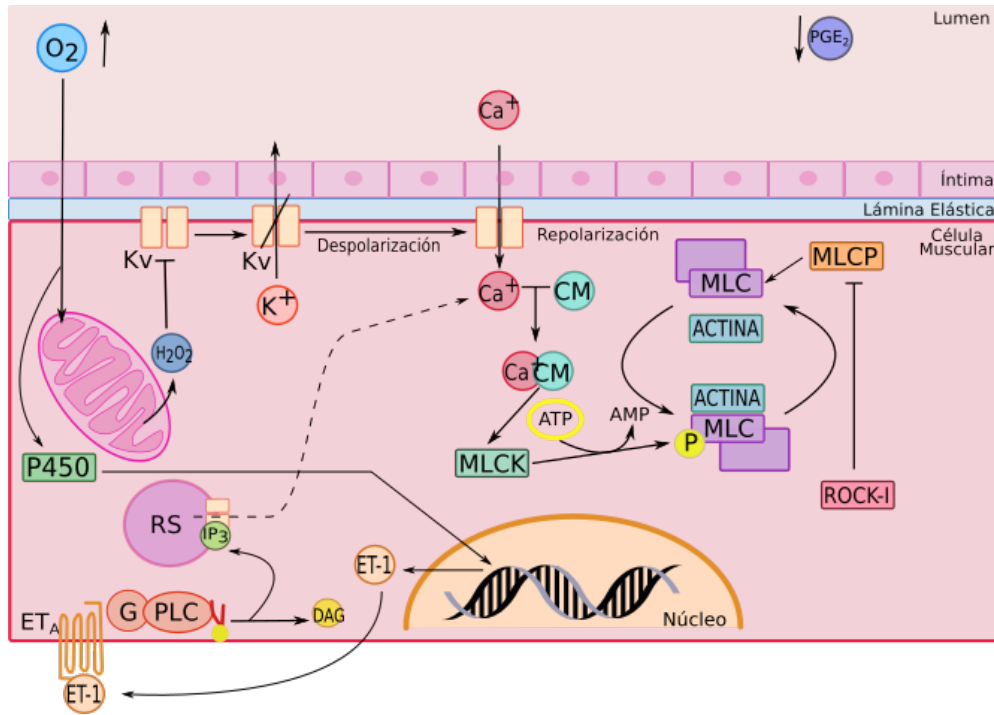


Figura 8: **Contracción del Conducto Arterioso o cierre funcional.** El CA censa el nivel de  $O_2$  mediante los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones, generando a su vez  $H_2O_2$ , el cual, inactiva a los canales de  $K^+$  despolarizando la membrana plasmática. Los canales de  $Ca^{+2}$  se activan y re-polarizan la membrana, al mismo tiempo el Retículo Sarcoplásmico (RS) también libera  $[Ca^{+2}]$  vía inositol trifosfato ( $IP_3$ ). El  $Ca^{+2}$  intracelular se une a Calmodulina (CM) y activa a la MLCK permitiendo la contracción muscular, la cual es mantenida por sensibilización al calcio.

A medida que aumenta la  $pO_2$ , un sensor de oxígeno mitocondrial compuesto por los complejos de la cadena de transporte de electrones I y III (complejo NADH deshidrogenasa y complejo citocromo bc1, respectivamente), se activa, lo que genera especies reactivas de oxígeno difusibles (principalmente  $H_2O_2$ ) (Archer et al., ?).  $H_2O_2$  es la manera en la que el oxígeno inhibe por completo la corriente de potasio en las CMLCA, mediante la suspensión transitoria de los canales de potasio dependientes de voltaje ( $K_v$  channels) y ATP-sensibles ( $K_{ATP}$  channels), que también participan como sensores de oxígeno, causando la despolarización de la membrana plasmática. Esto lleva a la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L y tipo T que subsecuentemente incrementa el calcio intracelular repolarizando la membrana celular (Ver [Figura 8]) (Akaike and Minamisawa, 2014). Al mismo tiempo se activa el Citocromo P450 de la subfamilia 3A (CYP3A) induciendo al aumento de la producción de Endotelina 1 (ET-1), que es un potente vaso-constrictor en el CA que se produce tanto en el endotelio como en el propio músculo liso del CA [Figura 5] (Cocconi, 1994).

La concentración de calcio citosólico también incrementa debido a que es liberado del retículo sarcoplásmico mediante la vía de señalización fosfolipasa-C(PLC)/inositol-trifosfato( $IP_3$ ) en las CMLCA, por ello se cree que muchos canales transportadores están involucrados en la contracción inducida por oxígeno. El calcio intracelular se conjuga con calmodulina (CM) para activar a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (*Myosin Light Chain Kinase*, MLCK), que es una cinasa



tipo II dependiente de calcio-calmodulina. La MLCK fosforila a la cadena ligera de la miosina (*Myosin Light Chain*, MLC) provocando la interacción miosina-actina, lo que resulta en una contracción muscular dependiente de ATP, como se aprecia en la [Figura 8] (Kajimoto et al., 2007). La MLC es desfosforilada por una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que relaja la interacción miosina-actina generando la relajación. El calcio intracelular es extraído de la célula mediante el intercambio de sodio-calcio en la membrana citoplasmática y es introducido de nuevo al retículo sarcoplásmico por bombas de calcio (SERCA), sin embargo, se sabe que en el CA la contracción se mantiene hasta el cierre definitivo por sensibilización al calcio y cuando el mantenimiento de la contracción falla el CA permanece abierto (Akaike and Minamisawa, 2014).

La activación de la vía Rho-cinasa induce la sensibilización al calcio al inhibir a la MLC fosfatasa (MLCP), independientemente de si continúa el incremento de  $\text{Ca}^{+2}$  citosólico, resultando en la persistencia de la fosforilación de la MLC y por lo tanto el mantenimiento de la contracción [Figura 8]. La acción de la familia Rho de GTPasas (Rho, Rac y CDC42) están reguladas por un efector específico de tipo serin-treonin cinasa localizado río abajo, llamado *ROCK* (Rho-associated coiled-coil forming protein kinasa). Aún no está bien definido como actúa *ROCK* en el mantenimiento de la constricción del conducto arterioso, pero se ha demostrado que aumenta su expresión cuando la  $\text{pO}_2$  se incrementa y por lo tanto, cuando hay aumento de ROS. *ROCK* es parte fundamental en la sensibilización al calcio y el mantenimiento de la contracción del CA tanto de conejos como de humanos (Kajimoto et al., 2007).

### 2.6.3. Formación del ligamento arterioso

Después del parto, el remodelamiento del CA para su cierre definitivo está asociado con la pérdida de CMLCA por procesos de apoptosis y necrosis que llevan a la formación de tejido fibroso, dejando como vestigio del CA al ligamento arterioso (Smith, 1998). El cierre del CA se completa a las ocho semanas de edad en aproximadamente 88% de los infantes (San Luis-Miranda et al., 2012).

## 3. Persistencia del Conducto Arterioso (PCA)

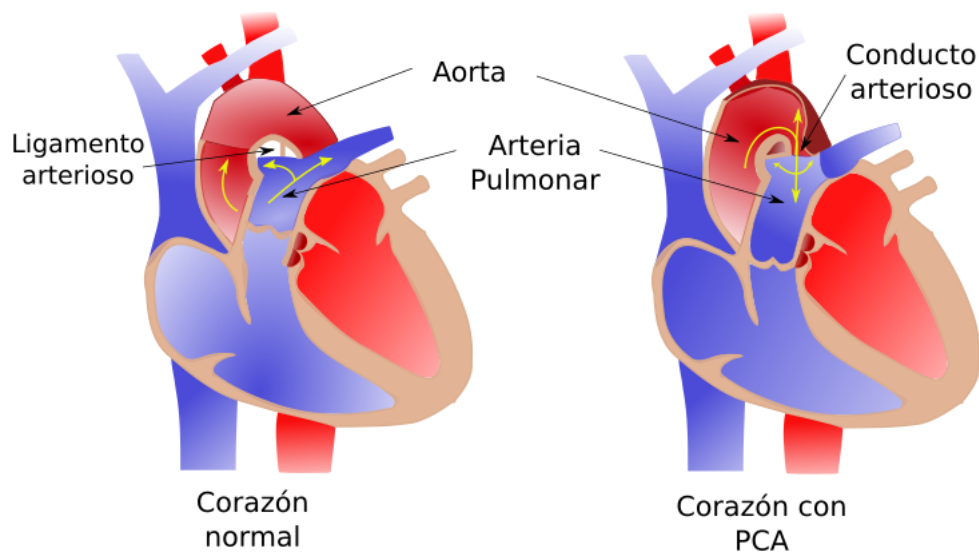
### 3.1. Descripción general

La Persistencia del Conducto Arterioso (PCA) se define como la persistencia de la permeabilidad del CA posterior a la sexta semana de vida extrauterina, (San Luis-Miranda et al., 2012), aunque algunos autores establecen que se considera persistencia hasta pasados de 3 (Schneider and Moore, 2006a) a 6 meses posteriores al parto (Weichert et al., 2010), la Figura 9 muestra una esquematización de un corazón con PCA y un corazón normal. Hasta ahora no hay una norma que establezca un tiempo definido a partir del cual se pueda considerar persistencia, por lo que el diagnóstico se basa en el criterio del médico. La PCA se considera una cardiopatía congénita, las cuales se definen como anomalías en la estructura cardio-circulatoria o en las funciones del corazón y los grandes vasos, y que está presente en el nacimiento aunque se descubra posteriormente (Mendieta-Alcántara et al., 2013).

El CA puede persistir en una gran variedad de tamaños y configuraciones, generalmente el extremo aórtico del CA en la PCA es más largo que el extremo terminal del lado de la arteria pulmonar.

El tamaño, la configuración y la relación del CA con las estructuras adyacentes son importantes para determinar la resistencia del flujo sanguíneo (un factor importante del grado de derivación sanguínea) y para la evaluación del cierre quirúrgico. La magnitud de la derivación del flujo sanguíneo no solo depende de la resistencia ductal, también depende del gradiente de presión entre la aorta y la arteria pulmonar; este gradiente de presión es dinámico con componentes sistólicos y diastólicos que, cuando se da de izquierda a derecha resulta en sobre-circulación pulmonar y en volumen aórtico disminuido (Schneider and Moore, 2006a).

Las consecuencias clínicas y hemodinámicas de la PCA dependen del grado de derivación que el CA ejerza entre la aorta y la arteria pulmonar, la derivación es favorecida por el decremento postnatal de la resistencia vascular pulmonar. Generalmente esta derivación es de izquierda a derecha, lo que puede llevar a flujo pulmonar aumentado, edema pulmonar, falla pulmonar, deterioro de la respiración que puede tornarse en enfermedad pulmonar crónica. Además esta derivación modifica la distribución de la sangre en los pulmones y otros órganos contribuyendo al incremento de riesgo de estrés respiratorio neonatal prolongado, hemorragias intraventriculares, enterocolitis necrotizante, displasia bronco-pulmonar y la muerte (Fanos et al., 2011).



**Figura 9: Persistencia del Conducto Arterioso (PCA).** La PCA provoca un corto circuito entre la arteria pulmonar y la aorta alterando el flujo normal, lo que provoca que se sobrecargue a los pulmones y se modifique el flujo sanguíneo que va hacia otros órganos. La gravedad de la PCA depende del diámetro y la morfología del CA.

Comúnmente la PCA aislada ocurre esporádicamente, lo que ha impedido que se clasifique como un típico desorden genético, sin embargo, se estima que la PCA ocurre en casos de hermanos en un 5%, lo que sugiere un componente genético en la patogénesis además de aspectos multifactoriales. La transmisión de la PCA de forma genética se ha descrito tanto en modelos animales como en humanos, de los casos descritos en humanos aproximadamente del 8-11% involucran anomalías cromosómicas. La búsqueda para encontrar una conexión genética con la PCA aislada ha estado enfocada en los genes afectados en las formas sindrómicas de PCA, el objetivo de encontrar genes asociados con la PCA aislada no solo es para determinar la forma en la que esta se hereda sino también para elucidar interacciones complejas entre los genes afectados y los aspectos ambientales,

pues se sabe que la PCA es multifactorial. El conocimiento de los genes que mantienen el balance entre la permanencia y el cierre del CA puede ayudar al desarrollo de nuevas estrategias farmacogenéticas y al mejoramiento de los protocolos terapéuticos actuales (Bökenkamp et al., 2009).

Un estudio retrospectivo (1991-2006) en 333 pares de gemelos dicigóticos y 99 pares de gemelos homocigóticos de dos centros (Universidad de Yale (Bökenkamp et al., 2009) y Universidad de Connecticut (Bhandari et al., 2009) concluyó que la PCA es altamente familiar. La PCA aislada se presenta en aproximadamente 1 de cada 2,000 recién nacidos a término (Satoda et al., 2000), lo que constituye al rededor del 10% de todas las cardiopatías congénitas (Shaffer et al., 1998). La PCA se considera una enfermedad multifactorial y se ha reportado que es más frecuente en áreas urbanas de mayor altitud, cuando existen antecedentes de consanguinidad entre los padres, cuadros febriles e infecciones maternas durante la gestación, exposición materna a fluoxentina, prematurez y bajo peso al nacimiento (Mani et al., 2005). A diferencia de otros grandes vasos, el CA se contrae en condiciones de normoxia y se relaja en condiciones hipóxicas, lo que trae como consecuencia que en las poblaciones que se encuentran a mayores altitudes la PCA sea más frecuente (Weir et al., 2008).

### **3.2. Farmacoterapia para PCA.**

La farmacoterapia para PCA involucra el uso de inhibidores de la ciclo oxigenasa (COX), de la cual existen dos isoformas COX I y COX II. Los inhibidores de COX evitan la transformación del ácido araquidónico en diferentes tipos de prostaglandinas involucradas en el mantenimiento del CA, por lo que inhibir a COX permite el cierre del CA. Hay dos agentes farmacológicos aprobados por la FDA en los Estados Unidos: la indometacina y el lisinato de ibuprofeno; aunque estos fármacos son químicamente diferentes ambos inhiben a las dos isoformas de COX pero en diferentes grados. La indometacina tiene un poder de inhibición más potente sobre COX I pero esta misma intensidad de inhibición se ha relacionado con efectos adversos a nivel gastrointestinal, cerebral y renal. El lisinato de ibuprofeno tiene un poder de inhibición menor sobre COX I, lo que resulta en menos efectos vasoconstrictores sobre órganos vitales. Ambos fármacos se unen a proteínas, son metabolizados principalmente por el hígado y poseen la misma efectividad en el tratamiento para el cierre del CA en infantes pretérmino (Sekar and Corff, 2008).

Existen diferencias en el efecto de la indometacina y el ibuprofeno sobre el flujo sanguíneo cerebral y renal; por un lado la indometacina decrece el flujo sanguíneo y el consumo de oxígeno cerebral en comparación con el ibuprofeno, por lo que la indometacina se utiliza como tratamiento profiláctico en recién nacidos de bajo peso para prevenir la hemorragia intraventricular, mientras que el ibuprofeno no posee este efecto protector. La indometacina también decrece en mayor medida el flujo sanguíneo renal comparado con el ibuprofeno, lo que puede resultar en oliguria y el incremento en los niveles de creatinina (Sekar and Corff, 2008).

Existe una gran cantidad de evidencia que a dosis terapéuticas de ibuprofeno, los niveles de bilirrubina libre no incrementan. Algunos incidentes de hipertensión pulmonar han sido reportados con ibuprofeno, pero esto no se ha reportado en la forma de lisinato de ibuprofeno por lo que es la forma en la que ha sido aprobado por la FDA (Sekar and Corff, 2008).

Aún hay un gran debate sobre el uso de indometacina e ibuprofeno para el tratamiento de la PCA debido a la evaluación de beneficios contra efectos adversos, la resistencia al tratamiento de algunos recién nacidos y el riesgo de reapertura posterior al tratamiento. Se estima que la reapertura del CA sucede aproximadamente entre el 20 y el 35 % de los recién nacidos que tuvieron una respuesta inicial al tratamiento. En un intento de reducir la tasa de fracasos de la indometacina en el cierre ductal, se estudió la posibilidad de la administración de un ciclo prolongado (6-8 dosis) en lugar del ciclo habitual (2-3 dosis) pero los resultados concluyeron que el ciclo prolongado no mejora la tasa de fracasos del tratamiento con indometacina, al contrario, puede haber mayores riesgos secundarios por extender la administración de indometacina en recién nacidos (González et al., 2008).

### 3.3. PCA en México y el Mundo

La PCA es la cardiopatía congénita más común en México, el Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez reporta una frecuencia de 24.84 % entre las cardiopatías congénitas en la edad pediátrica y en el Hospital General del Centro Médico Nacional "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) la frecuencia es de 20.8 % siendo la segunda cardiopatía más frecuente en la consulta cardiológica pediátrica de este hospital. Su incidencia aumenta directamente en prematuros y se reporta el predominio de la PCA en el sexo femenino sobre el masculino con una relación 2:1 (dos mujeres por cada hombre). La prevalencia de las cardiopatías congénitas es de 60 a 105 por cada 10 000 nacidos vivos. Excluyendo a los recién nacidos prematuros, la prevalencia de la PCA se estima en 2.9 por cada 10,000 nacidos vivos (San Luis-Miranda et al., 2012).

En México, la PCA se considera como un problema de salud pública debido a que ha sido la principal causa de muerte por cardiopatías congénitas en infantes menores de 1 año (registros de los años 1998-2013), como se aprecia en la Figura 12. En el año 2013, en promedio, fallecieron 10 niños menores de un año de 235 diagnosticados con PCA, según datos del INEGI/SSA. La causa de muerte en los pacientes con PCA es por alguna de las complicaciones que surgen por la derivación del flujo sanguíneo generado por el CA, como son: edema pulmonar, enfermedad pulmonar crónica, hemorragias intraventriculares, enterocolitis necrozante y displasia broncopulmonar. Los estados más afectados son el Estado de México, Ciudad de México y Puebla (Torres-Cosme et al., 2016).

Mundialmente, la PCA es una de las cardiopatías congénitas más comunes, colocándose como la tercer cardiopatía congénita, siendo mas frecuente en Europa, Asia y Norte América, como se muestra en la Figura 10. A través del tiempo la prevalencia de los casos reportados de cardiopatías congénitas ha aumentado aproximadamente de < 1 por 1,000 recién nacidos vivos en 1930 a 9 por cada 1,000 recién nacidos vivos en los años recientes, como se observa en la Figura 11. En promedio anualmente en el mundo hay 150 millones de nacimientos, lo que corresponde a 1.35 millones de recién nacidos vivos con cardiopatías congénitas al año, lo que representa un problema de salud pública. Se cree que este incremento se debe a las mejoras en los métodos y en las tecnologías de diagnóstico así como especialistas mejor preparados. Estas causas han hecho que la PCA se una de las cardiopatías congénitas que han mostrado un mayor incremento a través del tiempo (van der Linde et al., 2011). Este aumento de la prevalencia de la PCA también se ha registrado en México a través del tiempo (Torres-Cosme et al., 2016).

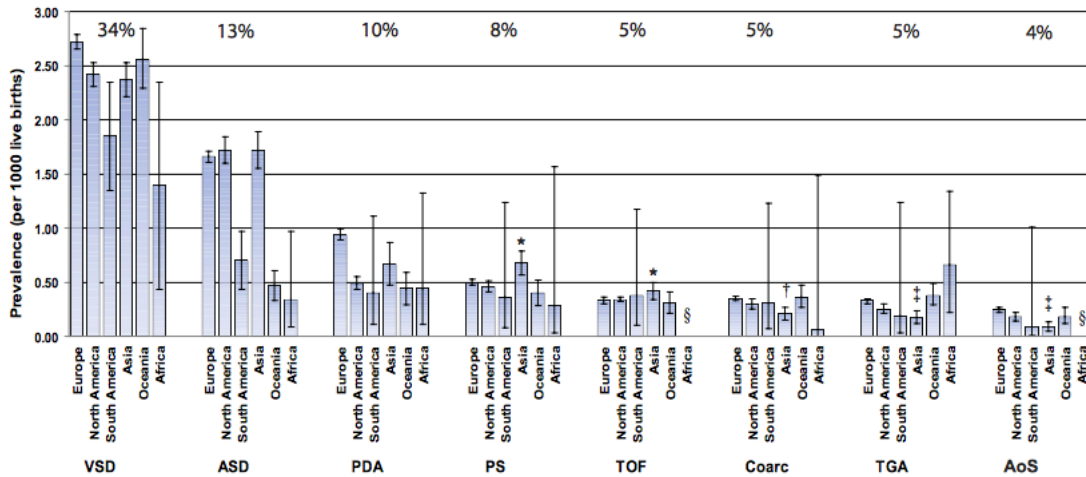


Figura 10: **Prevalencia de subtipos de Cardiopatías Congénitas en el Mundo**. Defecto septal ventricular (*Ventricular septal defect* VSD), Comunicación interauricular (*Atrial septal defect* ASD), Persistencia del Conducto arterioso (*Patent Ductus Arteriosus*), Estenosis pulmonar (*pulmonary stenosis* PS), Tetralogía de Fallot (*Tetralogy of Fallot* TOF), Coartación de la aorta (*Coarctation of the aorta* Coarc), Transposición de los grandes vasos (*transposition of the great arteries* TGA) y Estenosis aórtica (*aortic stenosis* AoS) (van der Linde et al., 2011).

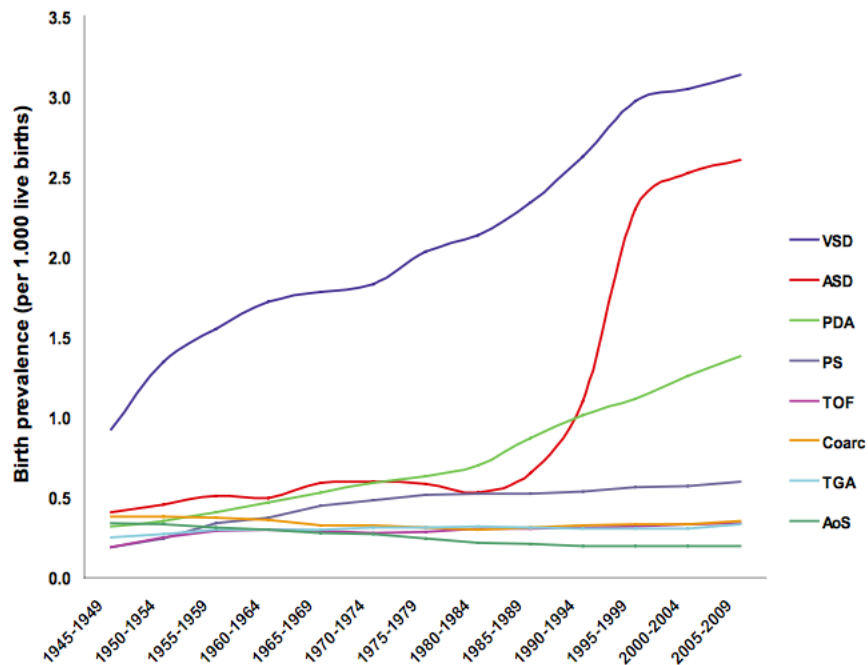
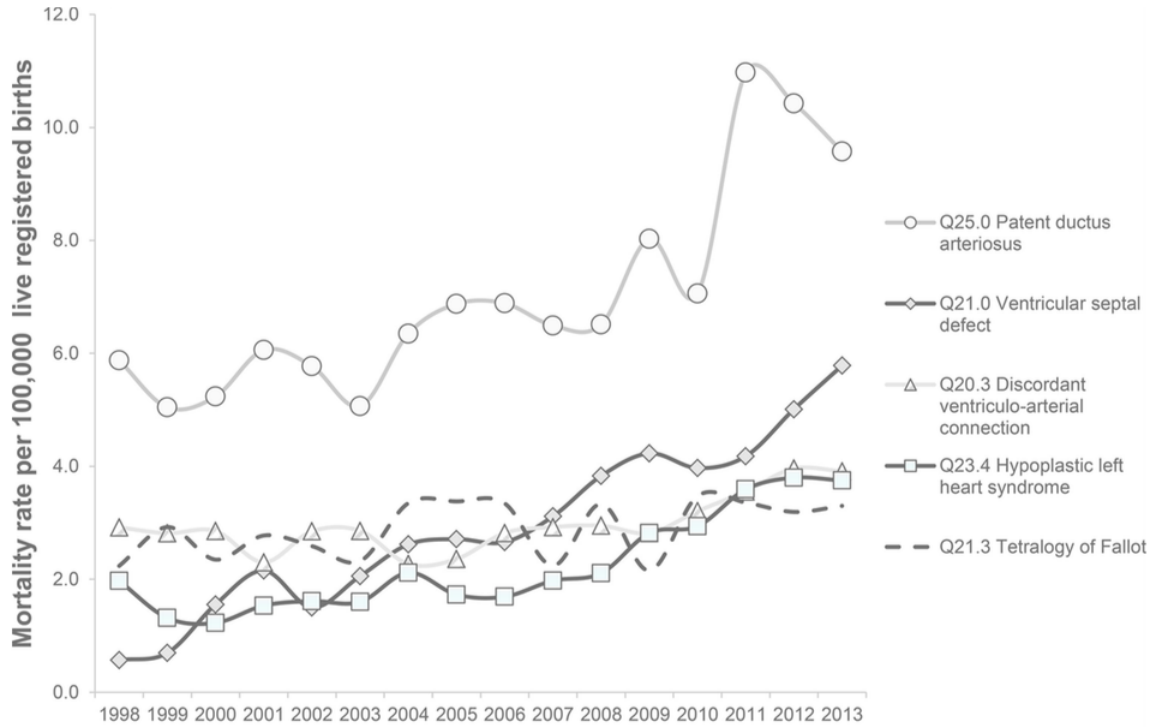


Figura 11: **Prevalencia de las Cardiopatías Congénitas a través del tiempo a nivel mundial**. Defecto septal ventricular (*Ventricular septal defect* VSD), Comunicación interauricular (*Atrial septal defect* ASD), Persistencia del Conducto arterioso (*Patent Ductus Arteriosus*), Estenosis pulmonar (*pulmonary stenosis* PS), Tetralogía de Fallot (*Tetralogy of Fallot* TOF), Coartación de la aorta (*Coarctation of the aorta* Coarc), Transposición de los grandes vasos (*transposition of the great arteries* TGA) y Estenosis aórtica (*aortic stenosis* AoS) (van der Linde et al., 2011).



Source: Death certificates, Secretary of Health Mexico

Figura 12: **Principales causas de mortalidad infantil en México por Cardiopatías Congénitas a través del tiempo.** Persistencia del Conducto arterioso (*Patent Ductus Arteriosus*), Defecto septal ventricular (*Ventricular septal defect*), Conexión ventrículo-arterial discordante (*Discordant ventriculo-arterial connection*), Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (*Hypoplastic left heart syndrome*), Tetralogía de Fallot (*Tetralogy of Fallot*)(Torres-Cosme et al., 2016).

Por otro lado, se sabe que la prevalencia de la PCA incrementa hasta 30 veces en altitudes de 4,500-5,000 en comparación con el nivel del mar (Penaloza and Arias-Stella 2007). Alzamora-Castro et al.,(1960) reportaron que la prevalencia de la PCA incrementa en niños que a pesar de haber nacido al nivel del mar, su madre provenía de zonas con una altura de mayor o igual a 2,500 metros sobre el nivel del mar y se observaba un incremento aún mayor conforme incrementaba la altitud. Estos resultados fueron confirmados por Penaloza and Arias-Stella,(2007), quienes además sugieren que los pacientes con PCA sintomática de tierras altas (a partir de 2,500 metros sobre el nivel del mar) sean tratados con Amplatzer® pues los tratamientos farmacológicos podrían no ser efectivos.

Se ha reportado que la PCA es más frecuente en el sexo femenino, en áreas urbanas de mayor altitud, cuando existen antecedentes de consanguinidad entre padres, cuadros febriles e infecciones maternas durante la gestación, exposición materna a fluoxetina, premadurez y bajo peso al nacimiento. La PCA se asocia fuertemente con las trisomías 21, 18 y 13; con los síndromes de Char, Noonan, Holt-Oram, Rubinstein-Tayb y Meckel-Gruber; así como con la rubéola congénita. También en los infantes con madres con diabetes, fenilcetonuria o adicciones (mariguana y cocaína); con padres con exposición materna a busulfán, litio, talidomida, trimetadiona, calcioantagonistas, esteroides o anticonvulsivos. (San Luis-Miranda et al., 2012).

### 3.4. *TFAP2B* y PCA

En general el gen *TFAP2B* es expresado en las células derivadas de la cresta neural y se ha observado que se expresa de una manera única en el músculo liso del CA, aunque curiosamente no se ha detectado ni en la aorta ni en la arteria pulmonar (Hilger-Eversheim et al., 2000). Deleciones generadas por mutagénesis dirigida en *TFAP2B* han mostrado que previene la contracción del CA en ratones recién nacidos, de manera similar, en humanos las mutaciones dominantes negativas y las mutaciones en los sitios de *splicing* de *TFAP2B* (mutaciones que se han descrito en el síndrome de Char), previenen la contracción del CA (Zhao et al., 2011).

Los mecanismos moleculares detallados, subyacentes a las anomalías genéticas que causan PCA aislada siguen siendo desconocidos. La mayoría de los estudios genéticos sobre PCA aislada se han concentrado en aquellos genes que se han asociado a las formas sindrómicas de PCA, de las cuales, el síndrome de Char es la más común de todas (Chen et al., 2011). El Síndrome de Char (CHAR; OMIM#169100) es un desorden autosómico dominante con penetrancia completa pero expresión variable del fenotipo que pertenece a los síndromes de tipo corazón-mano, es una forma sindrómica de PCA acompañada de dimorfismo facial y anomalías en el quinto dedo (Zhao et al., 2011). Satoda et al., (1999) asociaron el síndrome de Char al cromosoma 6p12-p21, pero el único gen que se ha podido asociar directamente a este síndrome, dentro de este locus, es el gen *TFAP2B*, el cual presenta mutaciones aproximadamente en el 50% de los individuos con síndrome de Char (Gelb, 2013). En humanos se han descrito dos mecanismos patológicos para el síndrome de Char: dominante negativo y haploinsuficiencia. En las mutaciones dominantes negativas, las proteínas mutantes se dimerizan y bajan los niveles de proteína *TFAP2B* normal, dejando solamente un 1/4 de proteína *TFAP2B* funcional. La haploinsuficiencia es causada por un *splicing* anormal del gen *TFAP2B*, produciendo un salto de exón y mutaciones del marco de lectura, lo que conlleva a la creación de un codón de paro prematuro, teniendo como consecuencia la pérdida de la mitad de la proteína funcional *TFAP2B* (Zhao et al., 2011). Recientemente, estudios bioquímicos han atribuido la variabilidad fenotípica a los mecanismos de haploinsuficiencia y efecto dominante negativo que causan las diferentes mutaciones en el gen *TFAP2B* (Satoda et al., 2000).

Durante el desarrollo temprano del CA de ratón, *TFAP2B* se expresa en el sexto arco aórtico, precursor del CA, que se forma a partir de células de la cresta neural, mientras que en la etapa media del desarrollo *TFAP2B* se expresa en las paredes del CA. La expresión de *TFAP2B* a lo largo del desarrollo del CA indica una importante participación en la regulación de otros genes que será esencial en el remodelamiento y el cierre del CA al nacimiento, por lo que las anomalías causadas por las mutaciones en este gen pueden ser atribuidas a la alteración en la expresión de los genes que regula (Zhao et al., 2011).

Zhao et al., (2011), generaron ratones *Knock-out* para *tfap2b* y observaron que los ratones *tfap2b* *-/-* se desarrollaron normalmente durante la embriogénesis, pero el color de la mayoría de los mutantes cambió de rosa a morado poco tiempo después del nacimiento, mostrando síntomas de falla corazón-pulmón e hipoxia. A las 2 horas después del nacimiento, la mayoría de los *tfap2b* *-/-* parecían sanos pero el análisis histológico del CA invariablemente mostró PCA. La mayoría de los *tfap2b* *-/-* murieron 24 horas después del nacimiento. Entre los ratones *tfap2b* *-/-* que sobrevivieron al menos 6 horas, el CA permaneció abierto, en contraste con los ratones silvestres. Por otro lado (58), investigaron si *tfap2b* está involucrado en la vía de señalización de las prostaglandinas, mediante la administración de indometacina en ratones gestantes de 18.5 semanas y se observó que tanto los ratones silvestres como los mutantes *tfap2b* *-/-* tuvieron un cierre prematuro del CA, lo que sugiere que la PCA en *tfap2b* *-/-* es un evento primario independiente de la vía de las prostaglandinas.

Chen et al., (2011) secuenciaron el gen *TFAP2B* en dos familias no relacionadas (A y B) usando como controles 100 sujetos, no relacionados, con PCA aislada y 100 sujetos sanos. La familia A abarcaba tres generaciones y se constituía de 16 individuos, de los cuales 5 fueron diagnosticados con PCA no sindrómica. La familia B también se extendía por tres generaciones y 2 de los 13 individuos fueron diagnosticados con PCA no sindrómica. Los investigadores identificaron la variante heterocigota  $c.601+5G > A$  en el intrón 3, esta variante solo estuvo presente en 4 de los miembros afectados de la familia A (ver Figura 13), y ninguno de los miembros sanos de la familia A la poseían, ni tampoco ninguno de los miembros del grupo control. Los miembros afectados de la familia B poseían una mutación heterocigota no reportada que, deleta 4pb en el exón 2 ( $c.435\_438delCCGG$ ) alterando el marco de lectura y generando, a su vez un codón de paro prematuro (ver Figura 13); esta mutación no se encontró en ninguno de los miembros sanos de esta familia ni de los control. Posteriormente (23) analizaron estas mutaciones mediante ensayos de transactivación; como esperaban, el gen *TFAP2B* silvestre indujo la expresión de luciferasa y esta se incrementaba cuando se unía al factor de transactivación *CITED2*. Por otro lado, cuando el gen *TFAP2B* tenía la mutación  $c.601+5G > A$  o  $c.435\_438delCCGG$ , la señal de luciferasa fue muy baja y *CITED2* no tuvo efecto sobre la señal. La mutación  $c.601+5G > A$  causa la delección del exón 3 mientras que la mutación  $c.435\_438delCCGG$  genera una proteína trunca no funcional de 188 aminoácidos. Realizaron Western-blot para comprobar la expresión del gen con ambas mutaciones y observaron que cuando *TFAP2B* posee la mutación  $c.435\_438delCCGG$  se expresa una proteína trunca de 21kDa mientras que la silvestre es de 51kDa y cuando *TFAP2B* presenta  $c.601+5G > A$ , ninguna proteína se expresa. Ya que ambas mutaciones se encuentran en la región que codifica para el dominio de transactivación de la proteína realizaron ensayos de transactivación y encontraron que la proteína trunca generada por  $c.435\_438delCCGG$  no inhibe a la proteína silvestre. Los autores proponen que  $c.601 + 5G > A$  y  $c.435\_438delCCGG$  deben ser consideradas como un factor de riesgo para la PCA aislada (ver Tabla 1). La mutación  $c.601 + 5G > A$  ha sido identificada tanto en individuos con síndrome de Char como en individuos con PCA aislada pero aún no se sabe cual es mecanismo por el cual una misma mutación resulta en dos fenotipos diferentes pero los autores proponen que depende de interacciones ambientales complejas.

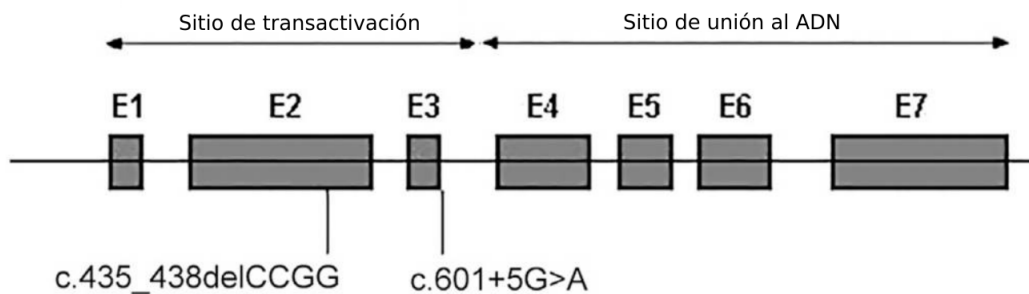


Figura 13: **Localización de las mutaciones  $c.601 + 5G > A$  y  $c.435\_438delCCGG$ .** Representación del gen *TFAP2B*, los 3 primeros exones codifican para el dominio de transactivación y del 4-7 para el dominio de unión al DNA. La mutación  $c.601 + 5G > A$  que causa la pérdida del exón 3 se encuentra en el intrón 3 y la mutación  $c.435\_438delCCGG$  se encuentra en el exón 2 y genera un codón de paro prematuro. Modificada de (Ji et al., 2014).

Waleh et al., (2010), identificaron tres factores de riesgo independientes para predecir la presencia de PCA cuando la vía de inhibición de las prostaglandinas es inhibida: 1) inmadurez gestacional, 2) ausencia de exposición antenatal a glucocorticoides y 3) presencia del alelo *rs2817399(A)* en el gen *TFAP2B* (ver Tabla 1). *rs2817399(A)* esta presente en un bloque de haplotipos que abarca la mayor parte del gen, por lo que es posible que variaciones genéticas responsables de la PCA no



sindrómica puedan estar localizadas en cualquier lugar de este bloque. Esta variante se encuentra entre los exones 4 y 5; en este intrón se encuentran la mayor cantidad de mutaciones reportadas para el síndrome de Char en *TFAP2B*. Este grupo midió la expresión de *TFAP2* en muestras de CA humano de diferentes edades gestacionales y observaron que entre la semana 11 y 22 de gestación (final del primer trimestre hasta el final del segundo trimestre) había un incremento significativo en la expresión del mRNA de *TFAP2B*, lo que mostró que la expresión del mRNA de *TFAP2B* esta significativamente ligada a la edad gestacional, por lo que utilizaron un modelo multivariable (que incluyó la edad gestacional) para examinar los efectos de la transcripción de *TFAP2B* sobre genes que participan en la contracción del CA. Los resultados obtenidos, con un intervalo de confianza del 95% ( $p > 0,05$ ), mostraron que existe una correlación positiva entre la presencia del *SNP rs2817399(A)* con el decremento de la expresión de genes involucrados en la contracción inducida por oxígeno en el CA, los genes en lo que se observó una disminución de su transcripción fueron los siguientes:

- Señalización de calcio: *CACNA1G/Ca-alpha1G*, *CACNA1C/Ca-alpha1C* y *CACNB2/CaLbeta2*.
- *RHOB*
- Canales  $K^+$ : *KCNA2/Kv1.2* y *KCNA5/Kv1.5*.
- Proteínas contráctiles: *CNN1/calponina*
- Señalización de las prostaglandinas: *PDE1B*, *PDE3B*, *PDE4D* y *PTGIS/PGI2-sintetasa*.
- Inflamación/remodelamiento: *EPAS1/HIF2alpha*

El estudio fue realizado en CA de fetos humanos 11 a 22 semanas de gestación (n=57). El tejido fue obtenido bajo la vigilancia de la Universidad de Nuevo México, el CA humano fue obtenido de fetos provenientes de embarazos terminados por elección en mujeres sanas; no se administraron prostaglandinas durante la terminación de los embarazos.

Para determinar que los cambios eran específicos para el alelo *rs2817399(A)*, Waleh et al., (2010) examinaron y compararon otros dos polimorfismos de *TFAP2B*: *rs2817419(G)* y *rs2635727(T)*. Estos polimorfismos no se han asociado a la incidencia de PCA, ambos polimorfismos se encuentran en el exón 7 en donde no se han reportado mutaciones para el síndrome de Char. Ninguno de los polimorfismos fue asociado a cambios en la expresión de mRNA en ninguno de los genes candidatos. La genotipificación mostró que el alelo *rs2817399(A)* estaba presente en 25 de 57 (44%) de los CA fetales, lo que indica que el alelo *rs2817399 (A)* es un polimorfismo funcional (o posee una asociación estrecha con un polimorfismo funcional), que tiene un rol activo en la regulación de la contracción del CA (Waleh et al., 2010).

Dagle et al., (2009), estudiaron una población de 366 recién nacidos prematuros (<32 semanas de gestación) encontraron que el *SNP rs987237* se asocia con la presencia de PCA cuando posee el alelo G (ver [Tabla 1]), pero cuando posee el alelo A está asociado positivamente con la ausencia de PCA, este polimorfismo se encuentra localizado en una región altamente conservada entre los exones tres y cuatro, la cual contiene un alto número de sitios de unión a factores de transcripción. Este *SNP rs987237* está presente en un bloque de haplotipos, que en caucásicos, se extiende desde

la región intrónica entre los exones uno y dos hasta el término del gen en el exón 7, dentro de este bloque los exones dos, cuatro, y cinco son los que poseen más mutaciones reportadas en el síndrome de Char. Además encontraron una posible asociación positiva entre dos polimorfismos: *TFAP2B* *rs987237* y *EPAS1* *rs1867785* relacionada a la resistencia al tratamiento.

Tabla 1: **Resumen de mutaciones reportadas en *TFAP2B* asociadas a PCA no sindrómica.**

ID	<i>rs879253871</i>	<i>rs987237</i>	<i>rs2817399</i>
Mutación	c.435_438delCCGG	c.602 – 724A > G	c.821 + 528A > G
Referencia	(Chen et al., 2011)	(Dagle et al., 2009)	(Waleh et al., 2010)
Localización	Exón 2	Intrón 3	Intrón 4
Alteración	Codón de paro	Falla en <i>splicing</i>	Falla en <i>splicing</i>
Frecuencia	Sin datos	G=0.445	G=0.3672

Para ver más datos del gen *TFAP2B*, ver la ficha técnica en el **Anexo I**.

## Justificación

La PCA es la cardiopatía más común en México, el Instituto Nacional de Cardiología-Ignacio Chávez reportó una frecuencia de 24.84% entre las cardiopatías congénitas en la edad pediátrica y el Hospital General del Centro Médico Nacional "La Raza" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó una frecuencia 20.8% posicionándose como la segunda cardiopatía más frecuente en la consulta cardiológica pediátrica de este hospital (San Luis-Miranda et al., 2012). Además de la alta prevalencia de la PCA en México, es la cardiopatía congénita con la mayor mortalidad en el país según datos del INEGI/SSA, por lo que es considerada es como un problema de salud pública (Torres-Cosme et al., 2016).

Comúnmente la PCA aislada ocurre esporádicamente, lo que ha impedido que se clasifique como un típico desorden genético pero, se ha reportado que existen una recurrencia aproximada del 5% de casos de PCA aislada entre hermanos (Forsey et al., 2009) y reportes de casos familiares de PCA aislada (Martin et al., 1986; Chen et al., 2011; Ji et al., 2014). De los posibles genes que podrían asociarse a la PCA, el gen *TFAP2B* es uno de los candidatos más fuertes por su asociación al síndrome de Char, el cual, es la forma sindrómica más común de PCA (Chen et al., 2011); es un síndrome autosómico dominante con penetrancia completa pero expresión variable del fenotipo, que presenta la triada PCA, dimorfismo facial y alteraciones del quinto dedo (Zhao et al., 2011). El síndrome de Char está asociado al cromosoma 6p12-p21, dentro de este locus se encuentra el gen *TFAP2B*, el único gen con mutaciones asociadas con el síndrome de Char hasta ahora (Gelb, 2013) en el NCBI están reportadas cinco mutaciones en *TFAP2B* asociadas a PCA, una de ellas en el exón dos (*rs80338910* (Zhao et al., 2001)), una en el intrón 3 (*rs80338911* (Mani et al., 2005)), una en el exón cuatro (*rs80338912* (Mani et al., 2005)), dos en el intrón cuatro (*rs80338913* y *rs80338916* (Mani et al., 2005; Zhao et al., 2011)) y tres en el exón 5 (*rs80338914* (Satoda

et al., 2000), rs80338915 (Zhao et al., 2001) y rs80338917 (Satoda et al., 2000)). Algunas de estas mutaciones se han encontrado en individuos con PCA no sindrómica pero aún no se sabe por que las mismas mutaciones causan fenotipos diferentes (Chen et al., 2011; Ji et al., 2014), también se han encontrado mutaciones en *TFAP2B* solo en personas con PCA aislada que se segregan como bloques de haplotipos que abarcan todo el gen (Dagle et al., 2009; Waleh et al., 2010; Chen et al., 2011). Por otro lado el polimorfismo *rs987237* esta asociado a la resistencia al tratamiento farmacológico de la PCA (Dagle et al., 2009).

Otra de las razones por las cuales el gen *TFAP2B* es un buen candidato para la asociación con PCA aislada es debido a que este gen se expresa en las células procedentes de la cresta neural, células de la cuales proviene el CA (Zhao et al., 2001). *TFAP2B* controla la expresión de genes de canales de calcio (*CACNA1G /Ca-alpha1G*, *CACNA1C /Ca-alpha1C* y *CACNB2 /CaLbeta2*) ) y potasio(*KCNA2/Kv1.2* y *KCNA5/Kv1.5*), genes que participan en la sensibilización al calcio (*RHOB*), proteínas contráctiles (*CNN1/calponina*), genes necesarios para la señalización de prostaglandinas (PDE1B, PDE3B, PDE4D y PTGIS/PGI2-sintetasa), y de inflamación/remodelamiento (EPAS1/HIF2alpha) (Waleh et al., 2010) y participa en procesos de apoptosis y ciclo celular; por lo que tiene un papel fundamental en el CA desde su formación, mantenimiento y cierre (remodelamiento, contracción y formación del ligamiento arterioso) (Zhao et al., 2001).

A pesar de la alta frecuencia y la mortalidad que presenta la PCA en México así como los antecedentes de variantes en el gen *TFAP2B* que suponen un riesgo para el desarrollo de la PCA, no hay estudios en la población mexicana sobre la relación que existe entre alteraciones en *TFAP2B* y la PCA. Por ello, en este proyecto se plantea realizar un estudio exploratorio de búsqueda de variantes en el gen *TFAP2B* a través de la secuenciación de sus 7 exones flanqueados por pequeños fragmentos intrónicos que cubren las zonas de todas las variantes reportadas, tanto las asociadas a PCA aislada como las asociadas a Síndrome de Char. Con la finalidad de aportar más información sobre la relación de este gen con la presencia de PCA no sindrómica, utilizando como modelo de estudio una familia del Estado de México, Jilotepec; que posee ocho miembros que abarcan tres generaciones, de los cuales, cuatro fueron diagnosticados con PCA aislada y fueron resistentes al tratamiento.

## Hipótesis

Si el gen *TFAP2B* está implicado en procesos claves para el cierre del conducto arterioso, entonces podrán encontrarse variantes génicas que estén asociadas con la alteración en el funcionamiento o la estructura del gen en la familia de estudio.

## Características del estudio

- Retrospectivo
- Caso familiar

## Objetivos

### Objetivo general:

Identificar variantes en el gen *TFAP2B* que puedan provocar predisposición del cierre del CA o mutaciones que puedan asociarse con la presencia de la PCA en los integrantes de la familia en estudio.

### Objetivos específicos:

1. Determinar si existe una relación entre el genotipo observado mediante la secuenciación del gen *TFAP2B* con el fenotipo observado.
2. Identificar si en esta familia la PCA se está presentando como una enfermedad con herencia autosómica dominante, autosómica dominante o poligénica.

## Familia de estudio

Se estudió una familia de Jilotepec (Estado de México), México. De los 10 integrantes que componen esta familia se analizaron 8 de ellos, de los cuales, cuatro (977, 975, 974 y 970) fueron diagnosticados con PCA no sindrómica. Los pacientes 977, 975 y 974 reportaron haber recibido tratamiento farmacológico con ibuprofeno pero no tuvo efecto, por lo que fueron intervenidos quirúrgicamente para el cierre del CA. La paciente 970 fue intervenida para el cierre por Amplatzer® directamente, sin recibir tratamiento farmacológico previo, debido a los antecedentes de sus hermanas y las características de su PCA.

Al observar la Figura 15, se puede inferir que la PCA en esta familia no se está presentando de forma autosómica dominante pues las pacientes las 970, 974 y 975 no poseen ningún padre afectado; en este caso podría encajar más una herencia autosómica recesiva en la que uno o ambos padres sean heterocigotos y la razón por la que el individuo 977 no haya heredado la enfermedad a su descendencia, pero falta información sobre el abuelo paterno así como de más miembros de la familia para determinar con seguridad que se está heredando de manera autosómica recesiva. Además sabemos que esta enfermedad no está ligada al sexo pues se presenta tanto en hombres como en mujeres. A diferencia del síndrome de Char, que es la forma sindrómica más frecuente de PCA (Chen et al., 2011), que se hereda de forma autosómica dominante (Zhao et al., 2011), la PCA aislada no se ha podido asociar a un tipo de herencia mendeliana y hasta ahora se no se considera como una enfermedad monogénica sino poligénica (Forsey et al., 2009) por lo que no seguiría los modelos de herencia mendelianos. Aún así Martin et al., (1986), reportó un caso familiar de PCA aislada en la que estaban afectadas tres generaciones con casos tanto en hombres como mujeres sin presencia de consanguinidad que sugería fuertemente una herencia de tipo autosómica recesiva. Wei et al., (1984) describió una familia de la cual cuatro de los seis hijos de una pareja estaban afectados con PCA. Ni los padres ni los abuelos poseían enfermedades cardíacas congénitas. Por lo que sugieren que en este caso familiar la herencia autosómica recesiva podría tener un papel importante y descartan la altitud como factor de riesgo para este caso.

La PCA muestra rasgos que la caracterizarían como una enfermedad poligénica; se sabe que una gran cantidad de genes están involucrados en el cierre del conducto arterioso y que alteraciones en estos genes pueden provocar PCA, algunos de esos genes son: *COX-I* (Loftin et al., 2001), *COX-II* (Loftin et al., 2001), *EP4* (Nguyen et al., 1997; Segi et al., 1998), *VEGF* (Clyman et al., 2002; Waleh et al., 2011), *TFAP2B* (Minamisawa and Yokoyama, 2012; Zhao et al., 2011; Ivey et al., 2008), *Jag1* (Feng et al., 2010), *TGFβ* (Rabinovitch, 1996), *EPAS1* (Zhao et al., 2011; Ivey et al., 2008), *ET-1* (Coceani and Baragatti, 2012). Esta siempre asociada a Síndrome de Char (Zhao et al., 2011) y ocasionalmente a defectos genéticos como trisomía 13, 18 y 21, síndromes de Noonan, Holt-Oram, Rubinstein-Tayb, Meckel-Gruber y CHARGE (9p-). Además el cierre del conducto arterioso se ve influenciado por factores no genéticos como: prematuridad, bajo peso al nacimiento (Siassi et al.; 1976) y exposición prenatal a fluoxetina (Waleh et al.; 2010), mayor frecuencia en mujeres que en hombres 2:1 (Polani and Campbell, 1960; Forsey et al., 2009), infección de rubeola durante el primer trimestre de embarazo (Schneider and Moore, 2006b), madres con diabetes, fenilcetonuria o adicciones (mariguana y cocaína); con padres con exposición materna a busulfán, litio, talidomida, trimetadiona, calcioantagonistas, esteroides o anticonvulsivos. Hipoxia provocada por la altura durante la gestación y al momento del nacimiento (Penaloza and Arias-Stella, 2007). La estructura familiar y los miembros afectados pueden apreciarse en el árbol genealógico mostrado en la [Figura 15].

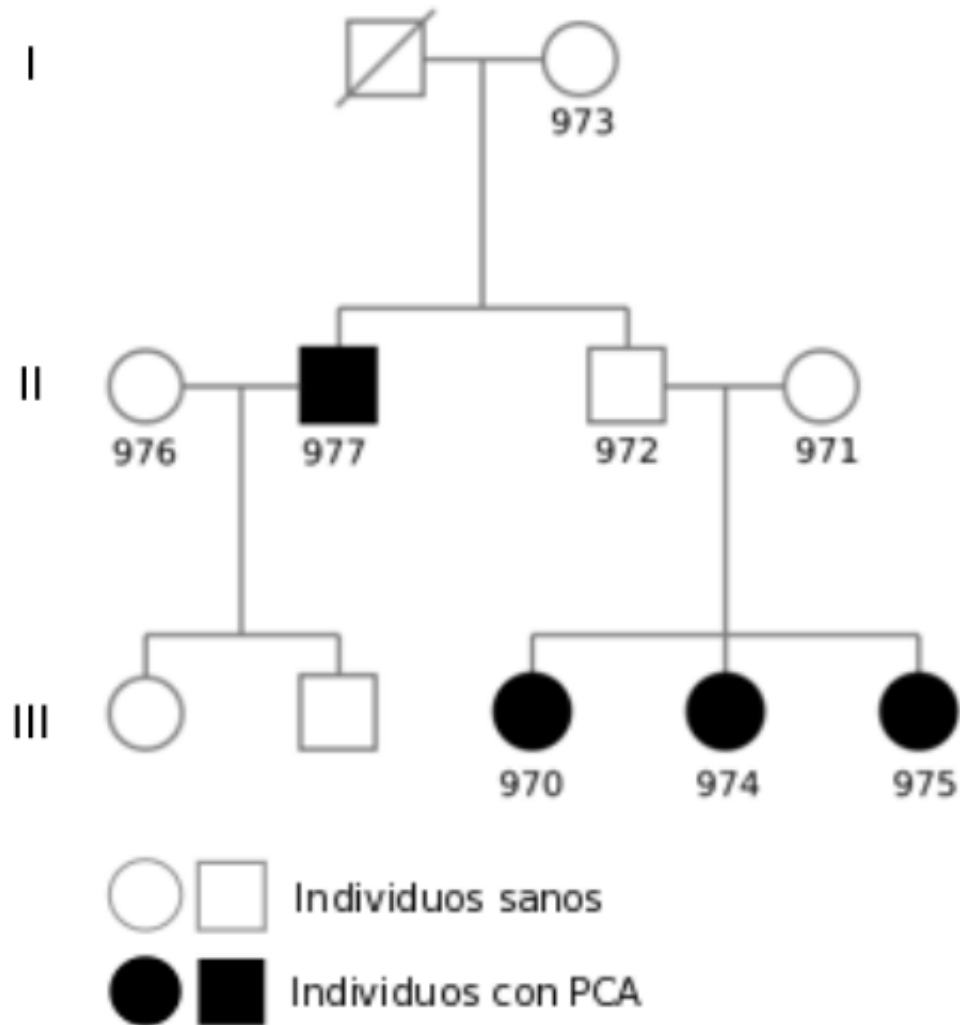


Figura 14: **Familia en estudio.** La familia de estudio abarca tres generaciones (I-III). Los individuos afectados, un varón y tres mujeres, se encuentran resaltados en color negro.

### Criterios de inclusión

1. Tener relación de parentesco en primero, segundo o tercer grado con las pacientes 970, 974 y 975, y que su condición de presencia o ausencia de PCA aporte información sobre la forma en la que se hereda la PCA en esta familia.
2. Aceptar participar en el proyecto mediante la firma del consentimiento informado aprobado por el comité de bioética. Para los casos de menores de edad sus padres o tutores deberán aceptar y firmar el consentimiento informado para sus hijos posterior al asentimiento informado de los menores.

## Criterios de exclusión

1. Que el paciente no quiera ser parte del proyecto y no firme la carta de consentimiento informado o que algún menor se niegue a asentir.
2. Que padezca alguna enfermedad que no permita la toma de muestra.
3. PCA asociada a síndrome: síndrome de Char, trisomías 13, 18 y 21, síndrome de Noonan, Holt-Oram, Rubinstein-Tayb, Meckel-Gruber y CHARGE.

## Criterios de eliminación

1. Que los pacientes (sus padres en caso de ser menores de edad) decidan retirarse del estudio.
2. Que la calidad del DNA sea insuficiente para el estudio y no sea posible tomar otra muestra de sanguínea.
3. Que no se cuente con la información suficiente para realizar el análisis estadístico de los resultados (hoja de datos del paciente incompleta).

# Materiales y métodos

1. Toma de muestra<sup>1</sup>: se tomó una muestra de sangre periférica por venopunción y utilizando sistema Vacutainer®, la sangre fue recolectada con tubos Vacutainer® de 6ml con EDTA (tapa morada), cuando fue posible las muestras se tomaron por duplicado. Las muestras sanguíneas fueron almacenadas a 4°C y el DNA se extrajo en un tiempo no mayor a 3 días después de la toma de muestra.
2. Extracción de DNA: la extracción de DNA se realizó con Wizard® Genomic DNA Purification Kit siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, como se muestra en la Figura 15, para mayor información del protocolo de extracción ir al Anexo II.
3. Cuantificación espectrofotométrica del DNA: se cuantificó la cantidad de DNA de doble cadena mediante espectrofotometría UV con NanoDrop 2000 Thermo Scientific®. Al mismo tiempo se revisó la relación 260/230 (contaminación con solventes orgánicos; pureza aceptable = 2.0 +/- 0.3) y 260/280 (contaminación con proteínas; pureza aceptable 1.8 +/- 0.3) para verificar la pureza del DNA.

---

<sup>1</sup>Todos los pacientes y sus padres fueron informados mediante la lectura del formato de consentimiento informado y sólo se aceptaron los pacientes menores de edad asintieron a participar en el proyecto y cuyos padres firmaron el consentimiento informado.

**Wizard® Genomic DNA Purification Kit**  
INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

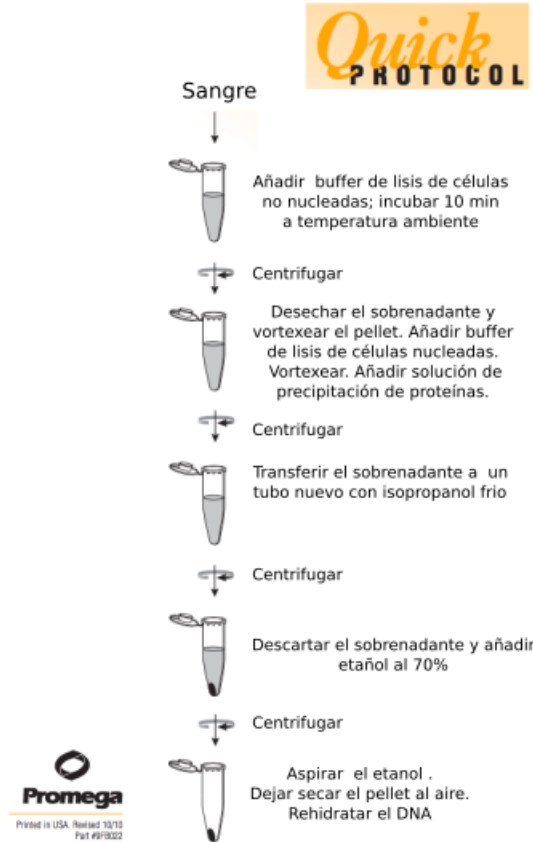


Figura 15: Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega®. Protocolo simplificado de aislamiento de DNA genómico de sangre completa. Modificada de Wizard® Genomic DNA Purification Kit: Isolation of Genomic DNA from Whole Blood, Quick Protocol. Promega® EE.UU

#### 4. PCR

- a) Los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar cada gen fueron diseñados para abarcar por completo cada exón y parte de la región intrónica, como se puede ver en la Figura 16. Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó el software Primer Select de DNASTAR® y se evaluó su especificidad mediante la plataforma de Primer-BLAS del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Las condiciones de amplificación se estandarizaron mediante PCR punto final utilizando el protocolo descrito en la Figura 18, con HotStart Mastermix de Qiagen®, las temperaturas optimas se encuentran registradas en la Tabla 2. La comprobación del peso molecular de los amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%, como se muestra en la Figura 17. Los oligonucleótidos diseñados y utilizados en este proyecto se encuentran en el Anexo III.



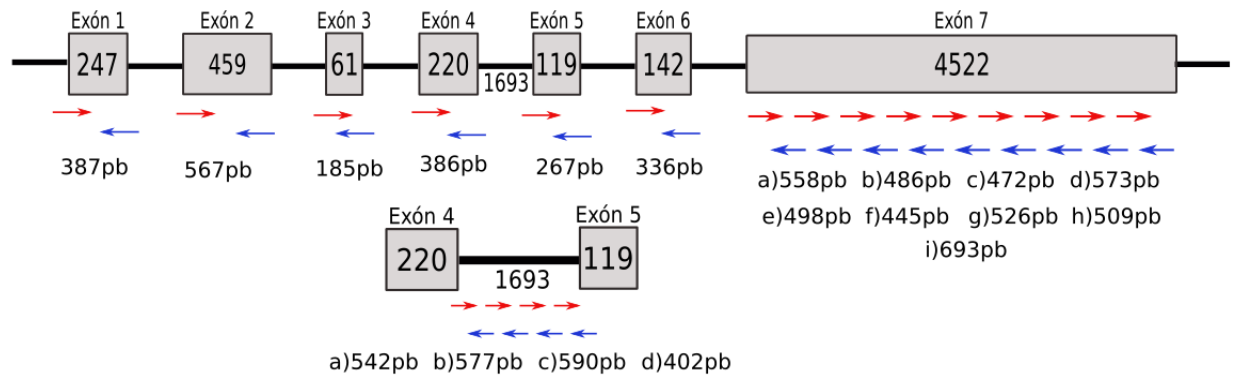


Figura 16: **Oligonucleótidos utilizados para la secuenciación del gen *TFAP2B***. Se observa cada par de oligonucleótidos utilizados, las regiones que abarcan y el tamaño del amplicón en pb

Tabla 2: **Temperaturas óptimas de amplificación**

Nombre del amplificado	Temperatura óptima
Exón 1	54-58°C
Exón 2	54-58°C
Exón 3	47-54°C
Exón 4	56-59°C
Intrón 4A	53-57°C
Intrón 4B	55-57°C
Intrón 4C	42-51°C
Intrón 4D	53-59°C
Exón 5	54-57°C
Exón 6	56-58°C
Exón 7A	52-63°C
Exón 7B	62-65°C
Exón 7C	51-60°C
Exón 7D	53-56°C
Exón 7E	54-61°C
Exón 7F	56-67°C
Exón 7G	61-63°C
Exón 7H	55-59°C
Exón 7I	51-55°C

b) Una vez estandarizadas las condiciones se realizaron las PCR's de punto final en cada muestra, utilizando HotStar Mastermix de Quiagen® con el protocolo de amplificación mostrado en la [Figura 18], se comprobaron por electroforesis en gel de agarosa al 2.0%.

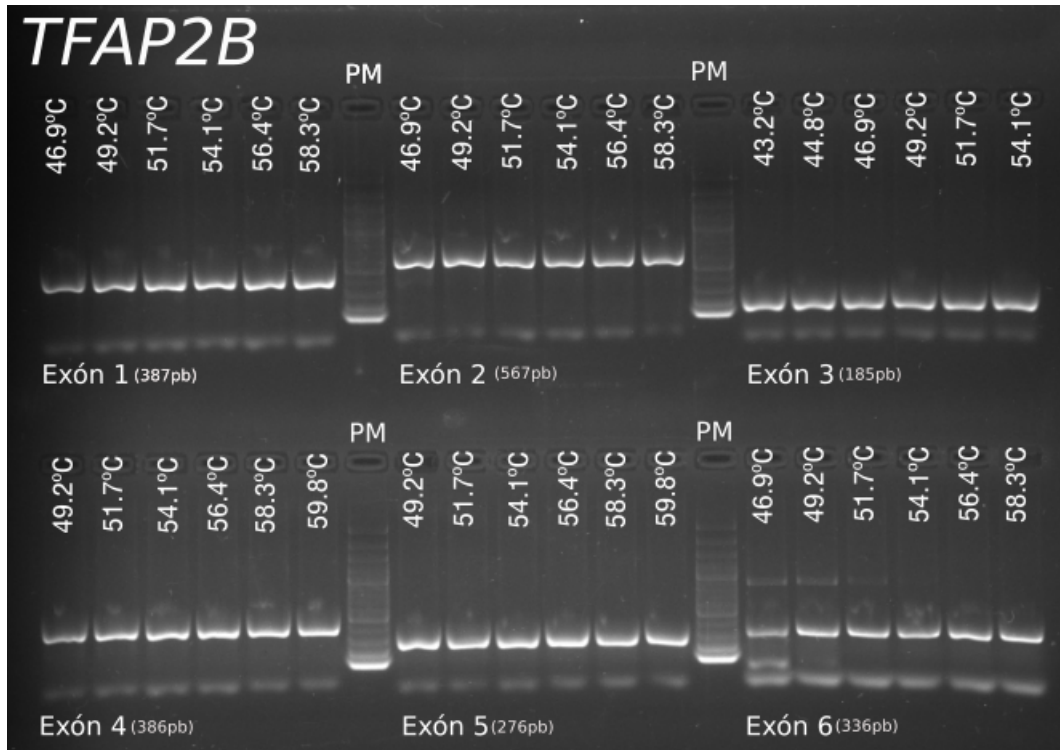


Figura 17: **Estandarización de las condiciones de PCR.** Marcador de peso Molecular (PM)= 1000pb (1Kb). Tamaño de los exones: Exón 1 (287 pb), Exón 2 (567 pb), Exón 3 (185pb), Exón 4 (386pb), Exón 5 (267pb), Exón 6 (336pb). Las temperaturas marcadas arriba de cada carril, son la rampa de temperaturas de alineamiento que se utilizó en cada PCR para encontrar las temperaturas óptimas de amplificación.

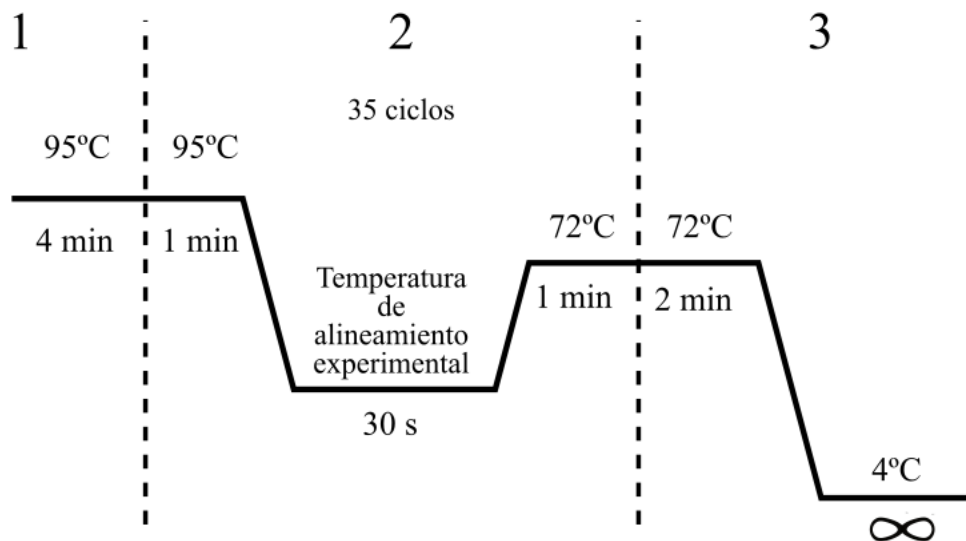


Figura 18: **Protocolo de PCR de punto final.** Protocolo utilizado para todas las PCR's de punto final de este proyecto. Paso 1: desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos. El paso 2: amplificación que abarca: 1) desnaturalización (95°C/1 minuto), 2) alineamiento (Temperatura óptima (ver Tabla 2) /30 segundos y 3) extensión (72°C/ 1 minuto). El paso 3 : mejoramiento de la extensión (72°C/ 2 minutos) y la temperatura en termociclador hasta su almacenamiento ( 4°C).

5. Secuenciación del gen *TFAP2B*: se realizó la secuenciación de todos los exones y del intrón 4 del gen *TFAP2B*, mediante la técnica de secuenciación de Sanger por electroforesis capilar. Cada muestra se analizó por triplicado. Los productos de PCR fueron purificados utilizando ExoSAP-IT® (USB Corporation, Cleveland, Ohio, E.U.A) y fueron marcados para ser secuenciados empleando el kit BigDye® v1.1 y v3.1 Terminator Sequencing Cycle (Applied Biosystems, Warrington, Cheshire, Inglaterra). Cada fragmento fue secuenciado con ambos *primers*, *Forward* y *Reverse*, a una concentración de 3.2 mM. Las reacciones de secuenciación se purificaron empleando el kit Dye Ex 2.0 Spin kit (Qiagen®, Crawley, W. Sussex, Inglaterra) y se corrieron en el secuenciador capilar ABI 3130.
6. Análisis bioinformático: Se resolvieron las ambigüedades encontradas en los electroferogramas de las secuencias obtenidas, mediante la comparación de la secuencia *forward* vs secuencia *reverse* de cada fragmento, para definir secuencias consenso en cada individuo para cada región secuenciada. Se empleó el software BioEdit v.7.2 para leer y comparar los electroferogramas y el software EditSeq del paquete Lasergene de DNASTAR® para crear las secuencias consenso en formato FASTA. Las secuencias consenso se alinearon en una primera etapa contra en la base de datos del NCBI, utilizando la plataforma de Nucleotide Blast (nBlast), para verificar la especificidad de la secuencia y de la especie. Posteriormente, las secuencias consenso se alinearon contra la secuencia de referencia del gen *TFAP2B* (NCBI Reference Sequence: NG\_008438.1) para identificar la posición de los fragmentos secuenciados y de las variantes encontradas como se muestra en las Figuras 19-23. También fueron alineadas las secuencias del mRNA y del CDS (*coding DNA sequence*) contra la secuencia de referencia para facilitar el análisis de las variantes.

Sequence ID: Query\_166101 Length: 325 Number of Matches: 1

Range 1: 34 to 324 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pre

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
531 bits(287)	1e-153	290/291(99%)	1/291(0%)	Plus/Plus
Query 26388	GGGCTGGGTGCTGATTATTACCTTACTGCTGTCTTTTCAGGAGAAGCTGTTCACTTA	26447		
Sbjct 34	GGGCTGGGTGCTGATTATTACCTTACTGCTGTCTTTTCAGGAGAAGCTGTTCACTTA	93		
Query 26448	GCTAGGGATTTTGGGTACATTTGCGAAACGGAGTTTCCCGCCAAAGCCGCTCTGAGTAT	26507		
Sbjct 94	GCTAGGGATTTTGGGTACATTTGCGAAACGGAGTTTCCCGCCAAAGCCGCTCTGAGTAT	153		
Query 26508	TTGAACCGGCAGCACACAGACCAGTGCACCTCCCGAAAGAAATATGCTGTTGGCC	26567		
Sbjct 154	TTGAACCGGCAGCACACAGACCAGTGCACCTCCCGAAAGAAATATGCTGTTGGCC	213		
Query 26568	ACCAAGTGAGTTTATTAGACTCTGGGCCCTCATCTCACTCCAGCTGGCTAGGCCACCCG	26627		
Sbjct 214	ACCAAGTGAGTTTATTAGACTCTGGGCCCTCATCTCACTCCAGCTGGCTAGGCCACCCG	273		
Query 26628	ACTTTGGAGTAGGTGGTGGGGAGGGGCAGAGAAAGAAGCAAGGGGTTT	26677		
Sbjct 274	ACTTTGGAGTAGGTGGTGGGGAGGGGCAGAGAAAGAAGCAAGGGGTTT	324		

NG\_008438.1:G.26673dup1

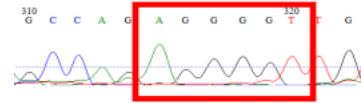


Figura 19: Variante NG\_008438.1G.26673dup1

Range 1: 9 to 506 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
909 bits(492)	0.0	497/499(99%)	1/499(0%)	Plus/Plus
Query 29340	TTCTGTGCTCGCCACCCCTTTCAGGCAACTTTGTAAAGAAATTTACGGATCTACTGGC	29399		
Sbjct 9	TTCTGTGCTCGCCACCCCTTTCAGGCAACTTTGTAAAGAAATTTACGGATCTACTGGC	68		
Query 29400	GCAGGACCGACACCGATAGGGAAACAGCCGACCCAGCCCATCTCGAGCCGGGATCCA	29459		
Sbjct 69	GCAGGACCGACACCGATAGGGAAACAGCCGACCCAGCCCATCTCGAGCCGGGATCCA	128		
Query 29460	GAGCTGCCTCAGGCACCTCAGCCTCATCAGCACGGCTTCGGCGCCCGGCCATTTGCGC	29519		
Sbjct 129	GAGCTGCCTCAGGCACCTCAGCCTCATCAGCACGGCTTCGGCGCCCGGCCATTTGCGC	188		
Query 29520	CGCGCTCACGGCCCTGCAGAACTATCTCACGGAGGCGCTCAAAGGCATGGACAAGATGTT	29579		
Sbjct 189	CGCGCTCACGGCCCTGCAGAACTATCTCACGGAGGCGCTCAAAGGCATGGACAAGATGTT	248		
Query 29580	CTTGAACAACACCCCACTAACAGGCACACGTCTGGGAAAGCCAGGTAGTAAAACTGG	29639		
Sbjct 249	CTTGAACAACACCCCACTAACAGGCACACGTCTGGGAAAGCCAGGTAGTAAAACTGG	308		
Query 29640	CGACAGGAGGAGaaacacaggaatgaaatTTTTAAAAAAGAAAGAAATGTTTT	29699		
Sbjct 309	CGACAGGAGGAGaaacacaggaatgaaatTTTTAAAAAAGAAAGAAATGTTTT	368		
Query 29700	aaatcaaaaggggagaaacacaggaatgaaatTTTTAAAAAAGAAAGAAATGTTTT	29759		
Sbjct 369	aaatcaaaaggggagaaacacaggaatgaaatTTTTAAAAAAGAAAGAAATGTTTT	428		
Query 29760	TGGAAGAATTATATTAGGTAGAATACACATACAATCAAAATTA-AAAAAAGCTAAA	29819		
Sbjct 429	TGGAAGAATTATATTAGGTAGAATACACATACAATCAAAATTA-AAAAAAGCTAAA	487		
Query 29820	taacttAAAAAAAACTGA 29838			
Sbjct 488	TAACITAAAAAAAACTGA 506			

rs886061570

rs2982621

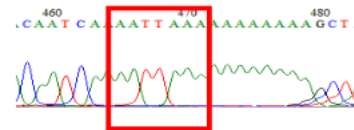


Figura 20: Variante rs886061570 y rs2982621

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
785 bits(425)	0.0	433/436(99%)	3/436(0%)	Plus/Plus
Query 30420	TGAGGAAATCCGGACCAATAAGTTGATCAAACATCATCAGTTCCCTTCAGAAATGTTA	30479		
Sbjct 1	TGAGGAAATCCGGACCAATAAGTTGATCAAACATCATCAGTTCCCTTCAGAAATGTTA	60		
Query 30480	CTAGCTCCAGCCCTTGCAGCATCTGCATAGAGAGAACTCACATTTATATATTTGTGT	30539		
Sbjct 61	CTAGCTCCAGCCCTTGCAGCATCTGCATAGAGAGAACTCACATTTATATATTTGTGT	120		
Query 30540	CATCTACTAATTTATGAACTATAGAAAAAAAAAAAAACACACACACAATAGAA	30599		
Sbjct 121	CATCTACTAATTTATGAACTATAGAAAAAAAAAAAAACACACACACAATAGAA	177		
Query 30600	TACGTTGATTAGTATGTAATTCCTTCGGAGGGGTATGTACCATTCATCTCTCTGTTT	30659		
Sbjct 178	TACGTTGATTAGTATGTAATTCCTTCGGAGGGGTATGTACCATTCATCTCTCTGTTT	237		
Query 30660	TCCAAGGCTTGCCTGCATGGTTATGAGCTTCTCAAAGAGGACTTGGGCTTCCTACAC	30719		
Sbjct 238	TCCAAGGCTTGCCTGCATGGTTATGAGCTTCTCAAAGAGGACTTGGGCTTCCTACAC	297		
Query 30720	AATCTATAAGGTACAGAGAAAAAAAAAATCCGATCCCTTTTTAAATCAAAGCCCTGTGTCA	30779		
Sbjct 298	AATCTATAAGGTACAGAGAAAAAAAAAATCCGATCCCTTTTTAAATCAAAGCCCTGTGTCA	357		
Query 30780	GAAATCTGCAGGTGCACCTTTTAAAGAAAGCTCAAAGGGAATAATTTAGAAAAGTGGCCAA	30839		
Sbjct 358	GAAATCTGCAGGTGCACCTTTTAAAGAAAGCTCAAAGGGAATAATTTAGAAAAGTGGCCAA	417		
Query 30840	TATGATGGAAGCAGCT 30855			
Sbjct 418	TATGATGGAAGCAGCT 433			

rs886061572

rs556444679

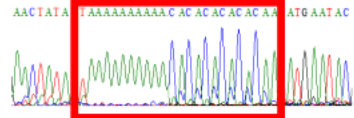


Figura 21: Variante rs886061572 y rs556444679

Range 1: 19 to 391 Graphics ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
684 bits(370)	0.0	372/373(99%)	0/373(0%)	Plus/Plus
Query 31759	TCGTTTAGCACTTCTGATCTTCATGGCCACGCCCTAGAACAATGTTGAGAGGAATGCAATGG			31818
Sbjct 19	TCGTTTAGCACTTCTGATCTTCATGGCCACGCCCTAGAACAATGTTGAGAGGAATGCAATGG			78
Query 31819	CCAAGAGCTAGACGTTACGGAGAGTGTAGTCACTCTCTTTCCAGCTCAGAGGCCCTGCG			31878
Sbjct 79	CCAAGAGCTAGACGTTACGGAGAGTGTAGTCACTCTCTTTCCAGCTCAGAGGCCCTGCG			138
Query 31879	CCTTCGTCCGACAGCTCCGCTGATCGCATTAGATGTGTTCTGATTGCACAAGGCCAAGGAG			31938
Sbjct 139	CCTTCGTCCGACAGCTCCGCTGATCGCATTAGATGTGTTCTGATTGCACAAGGCCAAGGAG			198
Query 31939	AGACCACACTGAAAAACGATCGTCTCTTTCCCTTGCAGGGCAACCGGCCACCGCTGTGA			31998
Sbjct 199	AGACCACACTGAAAAACGATCGTCTCTTTCCCTTGCAGGGCAACCGGCCACCGCTGTGA			258
Query 31999	CGTGCAGAGACGCGATGGACGCGCTTGTCTTACTGTGAGGTCCTGAGAGCGTGTGG			32058
Sbjct 259	CGTGCAGAGACGCGATGGACGCGCTTGTCTTACTGTGAGGTCCTGAGAGCGTGTGG			318
Query 32059	GCCACAGGCCCCAGTCTGTTGAGGACATAGAATCAGCCGCTGGAGGGGCTGCCGACTG			32118
Sbjct 319	GCCACAGGCCCCAGTCTGTTGAGGACATAGAATCAGCCGCTGGAGGGGCTGCCGACTG			378
Query 32119	CGCGGGCCCTTCC	32131		
Sbjct 379	CGCGGGCCCTTCC	391		

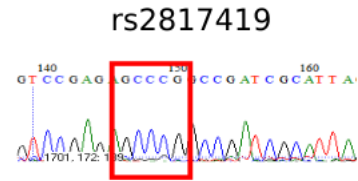


Figura 22: Variante rs2817419

Range 1: 3 to 465 Graphics ▼ Next Match ▲ Prev

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
850 bits(460)	0.0	462/463(99%)	0/463(0%)	Plus/Plus
Query 31247	GGGACTATCCCAAGTGGATAAAGTTTCATGCATTTAATATTTCTCACTCTGGCAGCCCA			31306
Sbjct 3	GGGACTATCCCAAGTGGATAAAGTTTCATGCATTTAATATTTCTCACTCTGGCAGCCCA			62
Query 31307	GCTCCTTTCTTGGCTCCATCTTAGCATTATCATGAAATAAGATCTGGAATCCATTGTCT			31366
Sbjct 63	GCTCCTTTCTTGGCTCCATCTTAGCATTATCATGAAATAAGATCTGGAATCCATTGTCT			122
Query 31367	GCACCTCCGCAAAAACAGTGAAGAAATATCCCGGGATAAAGGTTGAATGAGAGAGGTCCT			31426
Sbjct 123	GCACCTCCGCAAAAACAGTGAAGAAATATCCCGGGATAAAGGTTGAATGAGAGAGGTCCT			182
Query 31427	AAATATAGTGTGTATACACTCACCTATTTAAACAAGTATGACGAGATTTTGCATACCC			31486
Sbjct 183	AAATATAGTGTGTATACACTCACCTATTTAAACAAGTATGACGAGATTTTGCATACCC			242
Query 31487	TTAAGATAACGACATAGATGTTGTTCTGCAGGATTTATAGTTAGGACCCACTCAATTTCT			31546
Sbjct 243	TTAAGATAACGACATAGATGTTGTTCTGCAGGATTTATAGTTAGGACCCACTCAATTTCT			302
Query 31547	CCAGGACTCCCGGTTTTGCCCCCTCCCGCTTGGCTTGGTGGGGTGGGGATGGGGGA			31606
Sbjct 303	CCAGGACTCCCGGTTTTGCCCCCTCCCGCTTGGCTTGGTGGGGTGGGGATGGGGGA			362
Query 31607	GTGGGATTCGCTGGGTTTTTAGGAATCTGCTGAGAGCTTTGCCATTTTTTATAAAG			31666
Sbjct 363	GTGGGATTCGCTGGGTTTTTAGGAATCTGCTGAGAGCTTTGCCATTTTTTATAAAG			422
Query 31667	AGGAAAGGGAAGTTAGGAAGCTCGTCTCAGGTCACCAAAAGGG	31709		
Sbjct 423	AGGAAAGGGAAGTTAGGAAGCTCGTCTCAGGTCACCAAAAGGG	465		



Figura 23: Variante rs2817420

Utilizando como plantilla la secuencia de referencia se introdujeron las variantes encontradas y se guardó en formato FASTA con EditSeq (Lasergene de DNASTAR®), las secuencias con las variantes fueron introducidas posteriormente en Translate Tool de Expasy (<http://web.expasy.org/translate/> by (Artimo et al., 2012)), que traduce las secuencias con seis marcos de lectura diferentes. Una vez que fue encontrado el marco de lectura correcto se realizó un protein-BLAST contra la secuencia de referencia de la proteína TFAP2B (NCBI Reference Sequence: NP\_003212.2) para identificar cambios de aminoácidos o codones de paro prematuros.

Con la finalidad de obtener la nomenclatura correcta y el posible efecto de cada una de las variantes encontradas, se utilizaron las herramientas *Name Checker* del software Mutalyzer (<https://www.mutalyzer.nl> by (Wildeman et al., 2008)). Las variantes fueron buscadas en dbSNP y dbVar en el NCBI y en ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html> by (Aken et al., 2016)), para saber si habían sido reportadas con anterioridad y obtener la mayor cantidad de información

sobre ellas. Además, las variantes encontradas se analizaron con la herramienta Human Splicing Finder 3.0 (<http://www.umd.be/HSF3/> by (Desmet et al., 2009)) para predecir si estas afectaban los sitios de *splicing*. Para determinar si las variantes alteraban otros mecanismos de control se utilizaron las herramientas miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>), para determinar si las variantes interferían con sitios de unión a miRNA's, y UTRScan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>), para otros elementos regulatorios.

7. Modelado *in silico* . Las variantes que hubieran alterado el marco de lectura o los puntos de *splicing* hubieran sido modeladas *in silico* con SWISS-MODEL y Phyre2 para predecir una estructura molde que presentara más de 40% de homología con la secuencia de interés.
8. Se verificó la relación entre genotipo y fenotipo con prueba exacta de Fisher con RStudio (R Core Team, 2016).

## Resultados y Discusión.

Como se encuentra extensamente explicado en la sección de "Familia de estudio." en la página 35, mediante el análisis del árbol genealógico de la familia estudiada podemos inferir que la PCA en esta familia no se está presentando de forma autosómica dominante pero la cantidad de individuos e información acerca de esta familia impiden determinar con seguridad si la PCA se presenta de forma autosómica recesiva o como una enfermedad poligénica.

Se secuenciaron los 7 exones del gen *TFAP2B* incluyendo algunas bases pertenecientes a los intrones y la secuenciación del intrón 4 completo, debido a que varias mutaciones reportadas en este intrón se han asociado a la PCA no sindrómica y en síndrome de Char. Los 8 individuos que participaron en este estudio pertenecen a una familia (descrita en la Figura 15) de Jilotepec, Estado de México. Las secuencias obtenidas (cuya posición y longitud se muestran en la Tabla 3) se analizaron con BLAST del NCBI y las variantes encontradas se analizaron con ExPASy Translate Tool (Artimo et al., 2012) y Mutalyzer 2.0.23 (Wildeman et al., 2008), el análisis con estas herramientas bioinformáticas mostró que ninguna de las variantes encontradas afectan el marco de lectura de la proteína, cada variante encontrada se encuentra descrita en la Tabla 3. Para predecir si las variantes alteraban el *splicing* del mRNA se utilizó la herramienta Human Splicing Finder 3.0 (Desmet et al., 2009), el análisis determinó que ninguna de las variantes parece alterar el *splicing* del mRNA ni en los puntos de corte (donadores y aceptores) ni en los *branch point*.

Tabla 3: Resultados: Posición y cantidad de bases secuenciadas.

Exón/Intrón	Posición/pb	Bases secuenciadas (posición/pb)
<i>TFAP2B</i> Exón 1	5001-5247/247	4958-5293/335
<i>TFAP2B</i> Exón 2	9682-10140/459	9667-10169/502
<i>TFAP2B</i> Exón 3	14894-14954/61	14850-15024/175
<i>TFAP2B</i> Exón 4	22336-22555/220	22313-22652/340
<i>TFAP2B</i> Intrón 4A	22556-24249/1693	22511-23011/501

continúa en la página siguiente

Tabla 3 – continúa tabla

Exón/Intrón	Posición/pb	Bases secuenciadas (posición/pb)
<i>TFAP2B</i> Intrón 4B	22556-24249/1693	23011-23544/534
<i>TFAP2B</i> Intrón 4C	22556-24249/1693	23497-24040/543
<i>TFAP2B</i> Intrón 4D	22556-24249/1693	23969-24349/381
<i>TFAP2B</i> Exón 5	24240-24368/119	24211-24429/218
<i>TFAP2B</i> Exón 6	26431-26572/142	26428-26677/251
<i>TFAP2B</i> Exón 7A	29367-33888/4522	23353-29835/483
<i>TFAP2B</i> Exón 7B	29367-33888/4522	29910-30346/437
<i>TFAP2B</i> Exón 7C	29367-33888/4522	30447-30853/406
<i>TFAP2B</i> Exón 7D	29367-33888/4522	30830-31374/544
<i>TFAP2B</i> Exón 7E	29367-33888/4522	31238-31718/480
<i>TFAP2B</i> Exón 7F	29367-33888/4522	31754-32172/418
<i>TFAP2B</i> Exón 7G	29367-33888/4522	32341-32815/475
<i>TFAP2B</i> Exón 7H	29367-33888/4522	32823-33306/483
<i>TFAP2B</i> Exón 7I	629367-33888/4522	33260-33828/568

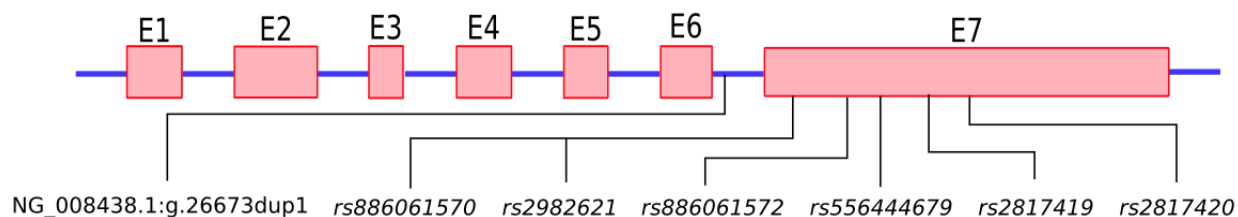


Figura 24: Esquema de la ubicación de las variantes encontradas

Tabla 4: Resultados: Variantes encontradas.

Variante	Descripción	Análisis <i>in silico</i>
NG_008438.1:g. 26673dup1	Se duplica una G en una posición perteneciente al intrón 6. Esta presente en los 8 individuos (970-977). Homocigota	Duplicación. Esta variante no se encuentra reportada. No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
NG_008438.1:g. 29802_29803delTT; NM_003221.3(TFAP2B):c. *135_*136delTT; NC_000006.12:g. 50843527_50843528delTT (GRCh38); <i>rs886061570</i>	Se encuentra en el exón 7 en una zona que ya no es parte del CDS. Esta presente en los 8 individuos(970-977).	Deleción. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: incierta.No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
continúa en la página siguiente		

**Tabla 4 – continúa tabla**

<b>Variante</b>	<b>Descripción</b>	<b>Análisis <i>in silico</i></b>
NG_008438.1:g. 29803T > A; NM_003221.3:c. *136T > A; NC_000006.12:g. 50843528T > A (GRCh38); <i>rs2982621</i>	Se encuentra en el exón 7 en una zona que ya no es parte del CDS. Está presente en los 8 individuos (970-977). Homocigota	SNP. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: benigna. No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
NG_008438.1:g. 30578del; NM_003221.3:c. *911delA; NC_000006.12:g. 50844303delA (GRCh38); <i>rs886061572</i>	Se deleta una A en el exón 7 en una zona que ya no es parte del CDS. Está presente en 7 de los 8 individuos. El individuo 976 no posee esta delección.	Delección. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: incierta. No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
NG_008438.1:g. 30591_30592delCA NM_003221.3:c. *924_*925delCA NC_000006.12:g. 50844316_50844317delCA (GRCh38); <i>rs556444679</i>	Se deleta una CA en el exón 7 en una zona que ya no es parte del CDS. Esta presente en 7 de los 8 individuos. El individuo 976 no posee esta delección.	Delección. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: conflicto de interpretación benigna/incierta. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
NG_008438.1:g. 31468G > A; NM_003221.3:c. *1801G > A; NC_000006.12:g. 50845193G > A (GRCh38); <i>rs2817419</i>	Transición G > A en exón 7 en una zona que no pertenece al CDS. Esta presente en los 8 individuos (970-977). Homocigota	SNP. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: benigna. No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).
NG_008438.1:g. 31894T > C NM_003221.3:c. *2227T > C; NC_000006.12:g. 50845619T > C (GRCh38); <i>rs2817420</i>	Transición T > C en exón 7 en una zona que no pertenece al CDS. Esta presente en los 8 individuos (970-977). Homocigota	SNP. Consecuencias moleculares: 3 <i>prime UTR variant</i> . Significancia clínica: benigna. No afecta el marco de lectura de la proteína. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i> ).

Las variantes *rs2982621*, *rs2817419* y *rs2817420* (ver Figura 24 y Tabla 4) son transiciones homocigotas que se presentan en los 8 individuos analizados, por lo que ninguna de estas variantes es exclusiva de los miembros afectados con PCA. Ya que estas variantes son homocigotas podemos inferir que los hijos de los individuos 976 y 977 (no analizados en este estudio) también poseerán estas variantes de forma homocigota. Las variantes se encuentran reportadas en el NCBI y en



ENSEMBL (Aken et al., 2016), todas son consideradas clínicamente como benignas, sin asociación directa con alguna patología. Las frecuencias de los alelos de estas variantes, en población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos, obtenidas de 1000 Genomes Project Phase 3 (Consortium et al., 2015), son más altas que la frecuencia del alelo ancestral, además es más frecuente el genotipo homocigoto del alelos *rs2982621(A)*, *rs2817419(A)* y *rs2817420(C)* que los genotipos heterocigoto u homocigoto del alelo ancestral, las frecuencias pueden observarse con detalle en la Tabla 5. También se buscaron las frecuencias de los alelos para diferentes poblaciones y subpoblaciones como se muestra en las Figuras 25-27. Se puede apreciar que los alelos encontrados en los integrantes de la familia de estudio no son alelos de riesgo en ninguna de las poblaciones o subpoblaciones. La variante *rs2982621(A)* tiene una frecuencia del 89 % en población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos y es similar en poblaciones latinoamericanas como colombianos (89 %) y puertorriqueños (82 %). Esta frecuencia también es parecida en europeos (88 %) y asiáticos del sur (91 %), pero sube hasta el 100 % en asiáticos del este, por lo que en esta población la presencia del alelo T se podría considerar una mutación más que un SNP. Tomando en cuenta la descendencia sudasiática y europea de los latinoamericanos, la presencia de este alelo podría provenir de estas poblaciones. Esta misma tendencia de frecuencias se observa en la variante *rs2817420(C)* mientras que la variante *rs2817419(A)* mantiene una frecuencia más constante entre 69-83 % en todas las poblaciones y subpoblaciones, teniendo las frecuencias más altas los asiáticos del este (80 %) y la población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos (83 %).

Tabla 5: Frecuencia de las variantes encontradas.<sup>2</sup>

Variante	Frecuencias
NG_008438.1:g. 26673dup	Sin datos de frecuencia.
<i>rs886061570</i>	Sin datos de frecuencia
<i>rs2982621</i>	Frecuencias para MXL. Alelos: $T = 0,109$ ; $A = 0,891$ Genotipos: $T T = 0,047$ ; $T A = 0,125$ ; $A A = 0,828$ ; Frecuencia general: $T = 0,137$ ; $A = 0,863$ ; $T T = 0,041$ ; $A A = 0,768$ ; $A T = 0,191$ ; Origen del alelo: <i>germline</i> .
<i>rs886061572</i>	Sin datos de frecuencia
<i>rs556444679</i>	Sin datos de frecuencia
<i>rs2817419</i>	Alelo ancestral: A Frecuencias para MXL. Frecuencia Alelos: $G = 0,172$ ; $A = 0,828$ Genotipos: $G G = 0,016$ ; $G A = 0,312$ ; $A A = 0,672$ ; Frecuencia general: $G = 0,264$ ; $A = 0,736$ ; $G G = 0,071$ ; $A A = 0,544$ ; $A T = 0,385$ ; Origen del alelo: <i>germline</i> .
<i>rs2817420</i>	Alelo ancestral: C. Frecuencias para MXL. Alelos: $T = 0,078$ ; $C = 0,922$ Genotipos: $T T = 0$ ; $T C = 0,156$ ; $C C = 0,844$ ; Frecuencia general: $T = 0,061$ ; $C = 0,939$ ; $T T = 0,006$ ; $C C = 0,885$ ; $T C = 0,109$ ; Origen del alelo: <i>germline</i> .

<sup>2</sup>Frecuencias para población de Los Angeles (California, USA.) con ancestros Mexicanos (MXL) comparadas con Frecuencia general (promedio de todas las poblaciones). Obtenidas de 1000 Genomes Project Phase 3 (Consortium et al., 2015).

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies

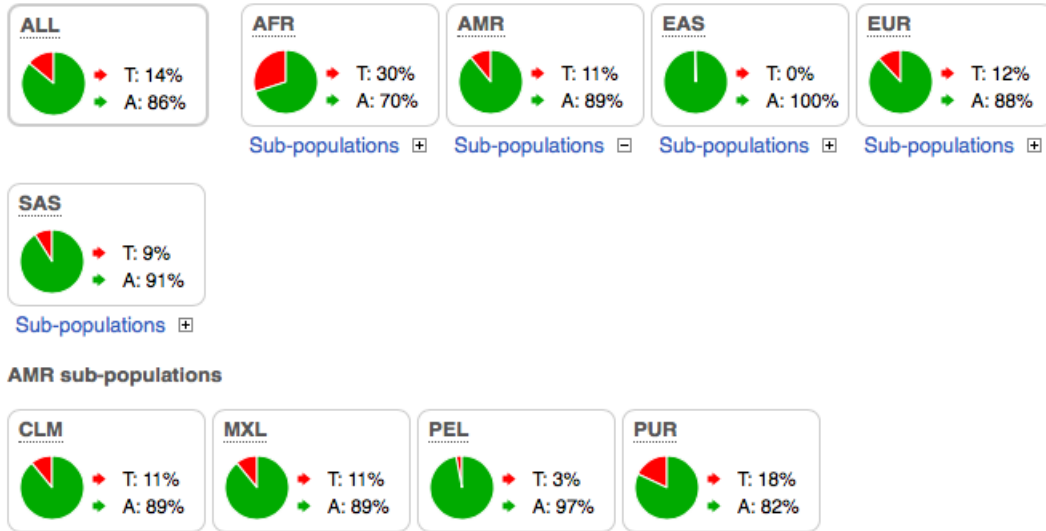


Figura 25: **Frecuencias *rs2982621***. Poblaciones: Todos (*All*), Africanos (*AFR*), Americanos (*AMR*), Asiáticos del Este (*EAS*), Europeos (*EUR*) y Asiáticos del Sur (*SAS*). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín (*CLM*), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos (*MXL*), Peruanos de Lima (*PEL*), Puertorriqueños (*PUR*)

1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies

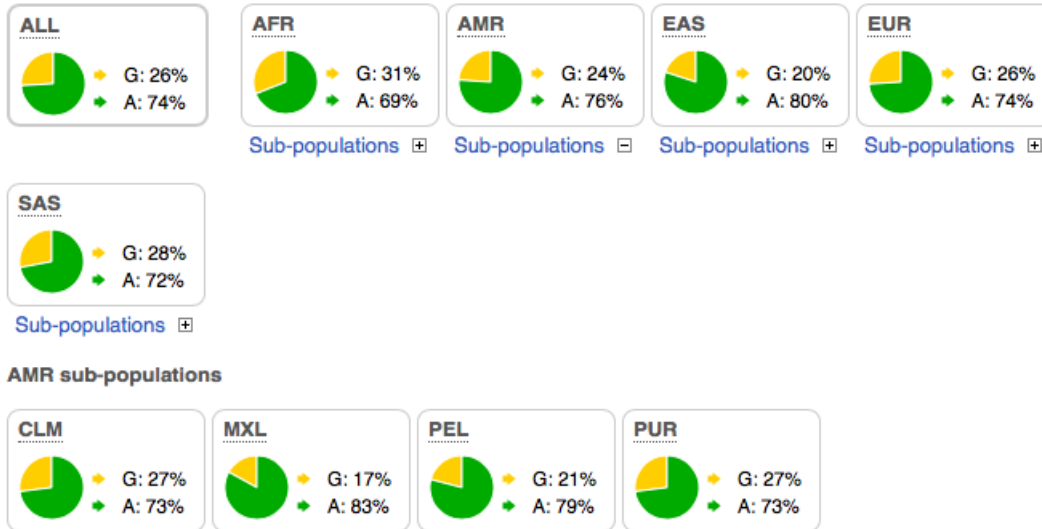


Figura 26: **Frecuencias *rs2817419***. Poblaciones: Todos (*All*), Africanos (*AFR*), Americanos (*AMR*), Asiáticos del Este (*EAS*), Europeos (*EUR*). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín (*CLM*), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos (*MXL*), Peruanos de Lima (*PEL*), Puertorriqueños (*PUR*)

### 1000 Genomes Project Phase 3 allele frequencies

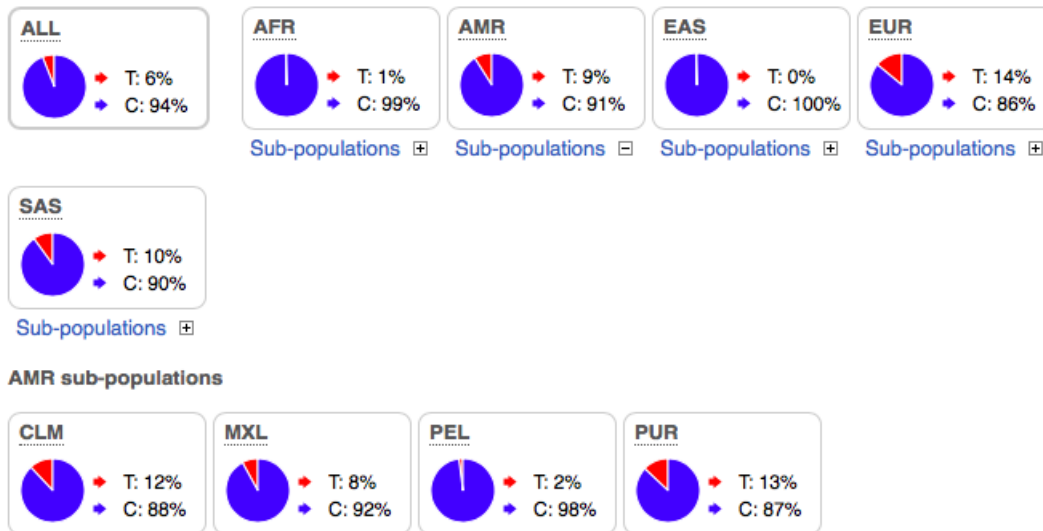


Figura 27: **Frecuencias rs2817420**. Poblaciones: Todos (*All*), Africanos (*AFR*), Americanos (*AMR*), Asiáticos del Este (*EAS*), Europeos (*EUR*). Subpoblaciones Americanas: Colombianos de Medellín (*CLM*), población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos (*MXL*), Peruanos de Lima (*PEL*), Puertorriqueños (*PUR*)

Ninguna de las tres transiciones *rs2982621*, *rs2817419* y *rs2817420* se encuentra dentro del CDS del gen (las tres se encuentran en la zona 3' *UTR* (*untranslated region*) y el análisis con ExpASy Translate Tool (Artimo et al., 2012) y Mutalyzer 2.0.23 (Wildeman et al., 2008) confirma que no alteran el marco de lectura del mRNA y por lo tanto la proteína no posee cambios de aminoácidos o codones de paro prematuros [Tabla 6]. Las variantes también fueron analizadas con la herramienta bioinformática Human Splicing Finder 3.0 (Desmet et al., 2009), el análisis determinó que ninguna de estas transiciones parecen alterar el *splicing* de la proteína ni en los puntos de corte (donadores y aceptores) ni en los *branch point*, ver Tabla 4. Con base en los análisis realizados y en las frecuencias reportadas de los alelos variante podemos decir que la evidencia indica que estas variantes no tienen una relación determinante con la presencia de PCA por si solas. Además Waleh et al., (2010) reportó que el *SNP rs2817419* no produce un decremento en la expresión de genes regulados por *TFAP2B* durante el cierre del CA y descarta su asociación con la presencia de PCA.

Por ser bi-alélicas, las variantes *rs2982621*, *rs2817419* y *rs2817420* son las únicas variantes encontradas con frecuencias reportadas por lo que fueron utilizadas para realizar un análisis de correlación entre las variantes con el sitio web LDlink (<https://analysisistools.nci.nih.gov/LDlink/?tab=home> by (Machiela and Chanock, 2015)) del *National Cancer Institute (Division of Cancer Epidemiology and Genetics)*. Primero se utilizó la herramienta LDpair que determina la correlación de un par de alelos de forma población-específica, en este caso se utilizaron las frecuencias de población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos, obtenidas de 1000 Genomes Project Phase 3 (Consortium et al., 2015). La D prima ( $D'$ ) es un indicador de segregación alélica que va de 0 a 1; valores más altos de  $D'$  muestran un mayor ligamiento de los alelos. La R cuadrada ( $R^2$ ) mide la correlación de los alelos de dos variantes genéticas y es sensible a la frecuencia del alelo, va de 0 a 1 y mientras más alto sea el valor muestra una mayor correlación. Altos valores de chi-cuadrada y valores bajos de *p-values* son

evidencia de que los haplotipos se desvían de los valores esperados y sugieren que pueden presentar desequilibrio de ligamiento. Como muestra la [Figuras 29], los alelos de las variantes se encuentran ligados y lo más probable es que se segreguen como un haplotipo; esto tiene sentido debido a que se encuentran físicamente muy cercanas, las tres en el exón 7. Además Waleh et al., (2010) reportaron que la variante *rs2817399*, esta presente en un bloque de haplotipos que abarca casi todo el gen *TFAP2B* y Dagle et al., (2009) también indicó que la variante *rs987237* se encuentra en un bloque de haplotipos, que en caucásicos, abarca desde el intrón uno hasta el término del exón 7. Ya que las variantes *rs886061572* y *rs556444679* se encuentran entre las variantes *rs2982621* y *rs2817420*, es muy probable que se segreguen juntas, es decir que pertenezcan al mismo haplotipo.

La variante *rs886061570* y *rs2982621* también podrían tomarse como una delección y una inserción (NG\_008438.1:g.[29803T>A;29802delT]), pero no se encuentran reportadas juntas en el NCBI ni en ENSEMBL; por lo tanto fueron reportadas como dos variantes separadas para fines prácticos. Ya que estas variantes se encuentran una junto a la otra en el exón 7, es muy posible que *rs886061570* también sea parte del mismo haplotipo.

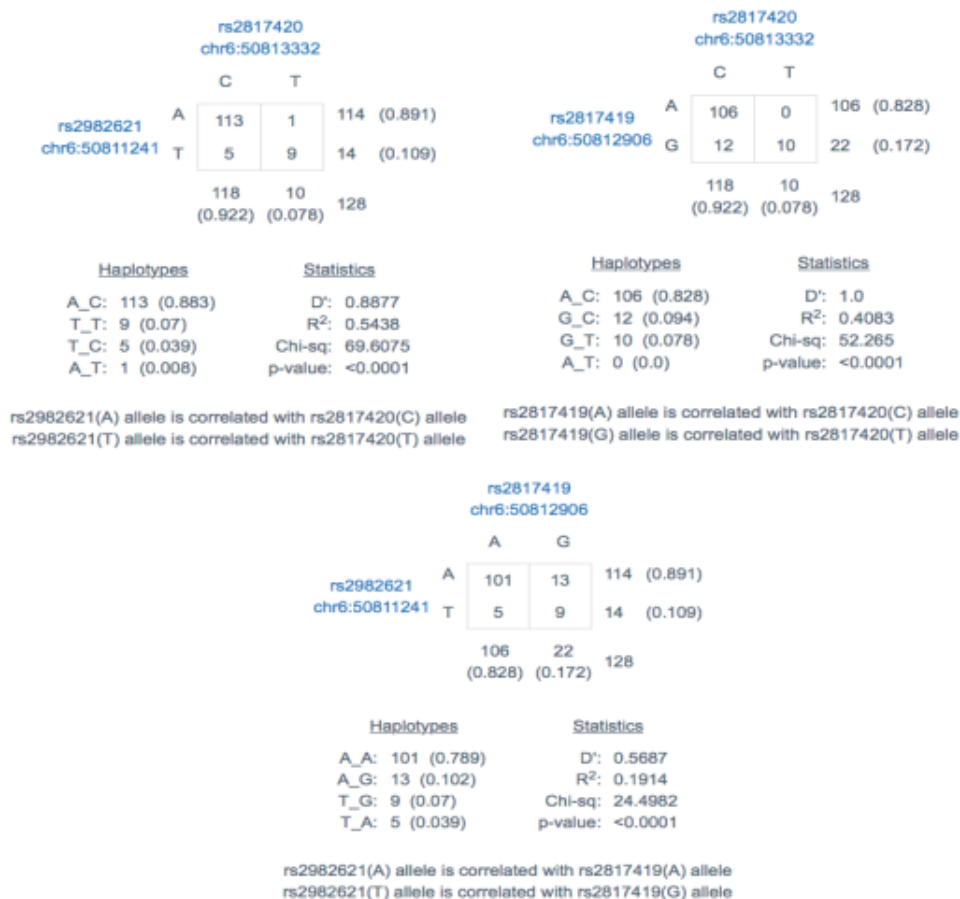


Figura 28: Correlación entre los alelos de las variantes *rs2982621*, *rs2817419* y *rs2817420*

Posteriormente se utilizó la herramienta LDhap que calcula las frecuencias de los haplotipos con base en las frecuencias de las variantes población-específicas, en esta estimación también fueron utilizadas las frecuencias de población de Los Angeles (California, EE.UU.) con ancestros mexicanos, obtenidas de *1000 Genomes Project Phase 3* (Consortium et al., 2015). Como se puede observar en la Figura 29, los alelos de las variantes que poseen los individuos de la familia de estudio son los más frecuentes si consideramos que se segregan como un haplotipo. La alta frecuencia de las variantes, tanto de manera conjunta como individual, sugieren una falta de asociación directa de estas con el desarrollo de PCA. Si añadimos que las variantes no afectan el marco de lectura del mRNA, ni zonas de *splicing* y que no se encuentran en la región codificante de del gen

RS Number	Position (GRCh37)	Allele Frequencies	Haplotypes			
rs2982621	chr6:50811241	A=0.891, T=0.109	A	A	T	T
rs2817419	chr6:50812906	A=0.828, G=0.172	A	G	G	A
rs2817420	chr6:50813332	C=0.922, T=0.078	C	C	T	C
<b>Haplotype Count</b>			<b>101</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>5</b>
<b>Haplotype Frequency</b>			<b>0.7891</b>	<b>0.0938</b>	<b>0.0703</b>	<b>0.0391</b>

Figura 29: Frecuencia de los haplotipos de las variantes *rs2982621*, *rs2817419* y *rs2817420*

Por otra parte la variante NG\_008438.1:g.26673dup (Tabla 4) no se encontró reportada ni en el NCBI ni en ENSEMBL (Aken et al., 2016) pero no parece estar asociada a la presencia de PCA en la familia estudiada debido a que se encuentra tanto en los individuos sanos como en aquellos con PCA, aun que podría añadir una cierta predisposición. Esta variante se encuentra en el intrón 6 y el análisis realizado con Human Splicing Finder 3.0 (Desmet et al., 2009) no muestran alteraciones en los sitios de *splicing*. ExPASy Translate Tool y Mutalyzer 2.0.23 (Wildeman, M. et al., 2008) confirmaron que esta variación tampoco altera el marco de lectura del mRNA.

Las variantes *rs886061572* y *rs556444679* (Tabla 6) son deleciones en el exón 7 pero que no pertenecen al CDS, estas deleciones se presentan en todos los individuos excepto en el 976. Al realizar una prueba exacta de Fisher (prueba realizada con RStudio (36)) con un nivel de confianza del 95%. Tomando como H0: Que la variante *rs886061572* no esta relacionada con la presencia de PCA y Ha: La variante *rs886061572* esta relacionada con la presencia de PCA. Al poseer un  $p\text{-value} = 1 > 0,05$  se acepta la H0 y por lo tanto esta variante no posee evidencia estadísticamente significativa que la asocie a la presencia de PCA, como se ve en las Figuras 30 y 31. Lo mismo sucede para la variante *rs556444679*. Aun que esta prueba solo trata a las variantes como si fueran mutaciones en las que su presencia se asociara a la presencia o ausencia del fenotipo, la realidad es que estas y las otras variantes encontradas solo podrían tener un efecto de predisposición. Ya que las variantes *rs886061572* y *rs556444679* fueron las únicas que no se encontraron en la paciente 976, podría ser que esta paciente presentara una menor disposición a la PCA y al haber transmitido a su descendencia el gen con todas estas variantes como un haplotipo, sus hijos pudieron haber estado más protegidos y con las condiciones ambientales favorables no desarrollaron PCA a pesar de tener un padre con esta condición.

```

> Analisis_rs886061572
      Con_rs886061572 Sin_rs886061572
sin_PCA              3              1
con_PCA              4              0

```

Figura 30: **Planteamiento de la prueba exacta de Fisher para la variante *rs886061572*.** Se muestra una tabla con los individuos sin PCA y con PCA que poseen la variante y los individuos con sin PCA y con PCA que no la poseen. Prueba realizada con RStudio (36)

```

> fisher.test(Analisis_rs886061572)

      Fisher's Exact Test for Count Data

data:  Analisis_rs886061572
p-value = 1
alternative hypothesis: true odds ratio is not equal to 1
95 percent confidence interval:
 0.00000 39.00055
sample estimates:
odds ratio
 0

```

Figura 31: **Resultados de prueba exacta de Fisher para la variante *rs886061572*.** Realizada con un 95 % de nivel de confianza, la prueba exacta de Fisher demuestra que no hay asociación de la variable con la presencia de PCA no sindrómica, con un  $p - value = 1 > 0,05$  se acepta la  $H_0$ . prueba realizada con RStudio (36)

Para descartar que las variantes encontradas en los integrantes de esta familia afectaran algún elemento de regulación, se buscaron miRNA's en miRTarBase que tuvieran como blanco (elementos de respuesta a miRNA's "MRE" por sus siglas en inglés) los sitios en los que se encuentran las variantes y por lo tanto que estas pidieran impedir su alineamiento parcial o completo pero, no se encontró ninguno. Además se utilizó UTRScan que es una herramienta que analiza elementos regulatorios de las regiones 5' y 3' UTR, pero no se observó ningún elemento regulatorio que se traslapara con las variantes reportadas. Estas herramientas solo analizan algunos de los elementos de regulación conocidos en *TFAP2B*, por lo que no se puede decir con certeza que estas variantes no tengan efecto sobre elementos regulatorios que pudieran generar una predisposición al desarrollo de la PCA. Estas herramientas solo muestran resultados aproximados de los elementos de regulación más conocidos, por lo que son necesarios más estudios que comprueben que estas variantes verdaderamente no alteran la regulación de elementos en *cis* y en *trans* en 3' UTR, que provoquen alteraciones en la transcripción o traducción de *TFAP2B* que puedan ser predisponentes para la presencia de PCA no sindrómica. Ya que el único rasgo que muestran los individuos con PCA aislada es la falla en el cierre del CA, es muy probable algunos de los casos de esta patología no se den directamente por mutaciones sobre un gen sino, por alteraciones que provoquen un fallo en la regulación tejido-específica de genes que controlan el cierre del CA que en conjunto con factores ambientales generen la PCA.

La altura es uno de los factores ambientales que incrementa la posibilidad de desarrollar PCA. Los sujetos afectados nacieron en Jilopetec, Estado de México (977 y 975) y en la Ciudad de México (974 y 975), estas localidades se encuentran a una altura de 2,452 y 2,250 metros sobre el nivel

del mar respectivamente; estas alturas podrían afectar la contracción del CA para su cierre debido a que las concentraciones de oxígeno son menores a mayores altitudes; esto se ve evidenciado en la alta frecuencia de casos de PCA en la ciudad de México y el Estado de México reportado por (Torres-Cosme et al., 2016). La altura también podría haber influenciado la ausencia de PCA en los hijos de los sujetos 976 y 975, como se ve en la Figura 15, quienes a diferencia de sus primas (970, 974, 975), nacieron en la ciudad de Guadalajara, Jalisco., que se encuentra a una altura de 1,700 m sobre el nivel del mar, una altura menor que pese a los factores de riesgo genéticos heredados de su padre o de ambos progenitores los factores ambientales pudieron haber protegido a los niños evitando la presencia de PCA. Esta diferencia puede apreciarse ya que a 2,250 y 2,450 metros se posee aproximadamente una pO<sub>2</sub> de 62 mmHg y hay un 77% del oxígeno disponible a nivel del mar mientras que a 1,700 aproximadamente una pO<sub>2</sub> de 73 mmHg y 82% de oxígeno; se considera que a partir de los 2,500 metros de altura sobre el nivel del mar (75% de oxígeno) empiezan a mostrarse síntomas de hipoxia por altura y las saturación de oxígeno en la sangre arterial comienza a caer. Aunque faltan más estudios para observar que tanta influencia tienen los factores de riesgo ambientales como la altura sobre individuos con alteraciones en el gen *TFAP2B* y en específico con las variantes encontradas.

Por otro lado tomando la altura como factor de riesgo ambiental, un fallo en los puntos centrales del censo del oxígeno para el cierre funcional del CA podría conllevar a la PCA además de que explicaría la resistencia al tratamiento, pues aunque se inhibiera la producción de PGE<sub>2</sub>, la contracción del CA así como el mantenimiento aún se verían afectados y el CA no cerraría, por lo que los genes que participan en el censo del oxígeno para el cierre funcional del CA pueden ser un buen blanco de estudio en estos individuos. Por ejemplo *EPAS1*, el cual es un factor de respuesta a hipoxia que se expresa en el CA y que participa en la contracción del músculo liso del CA inducida por oxígeno, se asoció por Dagle et al., (2009) con resistencia al tratamiento y Waleh et al., (2010) observaron que *TFAP2B* influye sobre la expresión de este gen.

Aunque las variantes encontradas no parecen afectar la función de *TFAP2B* no podemos descartar que en los intrones 1, 2, 3, 5 y 6, los cuales no fueron secuenciados (por falta de tiempo y recursos, por lo que en este proyecto solo se secuenciaron las zonas con mayor probabilidad de poseer mutaciones) posean alguna variante que este ligada a la presencia de PCA, aunque la probabilidad es menor. Además debido a que este estudio solo basó en el análisis de un caso familiar no se puede determinar si las variantes de manera conjunta pueden ser un factor de riesgo para la presencia de PCA aislada. Ya que la frecuencia de los alelos *rs2982621(A)*, *rs2817419(A)* y *rs2817420(C)* es muy alta en todas las poblaciones y subpoblaciones su presencia puede ser considerada normal y no presentan una asociación por sí mismos con la presencia de PCA. Si tomamos en cuenta que ninguna de las variantes encontradas en este estudio afectan el marco de lectura del mRNA, que no afectan las zonas de *splicing*, ni los elementos regulatorios más comunes en este gen; las posibilidades de que *TFAP2B* sea uno de los factores genéticos causantes del desarrollo de la PCA en los individuos de la familia de estudio son menores. Ya que la mayoría de las variantes se encuentran en la región 3' UTR lo más probable es que si poseen un efecto, ya sea individual o conjunto sobre *TFAP2B*, que provoque una predisposición a la PCA sea por alteraciones en la transcripción o en la traducción, pero con los resultados de este estudio no puede saberse. Ji et al., (2014), sugieren que las mutaciones que encontraron en *TFAP2B* provocaban el desarrollo de PCA aislada debido a haploinsuficiencia, pero en este caso familiar no hay evidencia que apoye que la presencia de PCA sea consecuencia de haploinsuficiencia provocada por las variantes encontradas. Ya que la PCA aislada presenta como única alteración la falta de cierre y por lo tanto la permanencia del CA posterior al nacimiento,

no es extraño que no existan mutaciones que alteren directamente el funcionamiento y estructura de el gen *TFAP2B* en los miembros de la familia estudiada, pero aún quedan varias interrogantes como por qué algunos casos de PCA aislada si han presentado mutaciones que alteran la expresión o el funcionamiento de la proteína presentando el mismo fenotipo, ni por qué hay tanta variabilidad en la respuesta al tratamiento. La resistencia al tratamiento o la reapertura del CA posterior al tratamiento sugieren que la PCA puede tener distintos orígenes, es decir, cualquiera de las fases del cierre del CA podría estar siendo afectada. A diferencia de la PCA asociada a síndromes, la PCA aislada tendría más posibilidades de presentarse por alteraciones de la regulación tejido-específica que por mutaciones en la secuencia codificante del gen, el problema es que hacer análisis de expresión en pacientes humanos se complica debido a que la obtención de muestras de CA implica la realización de procedimientos invasivos para el paciente y que la obtención de controles sanos no sería posible.

## Conclusiones

En este proyecto se secuenciaron los 7 exones y el intrón 4 del gen *TFAP2B* por ser las zonas con mayor cantidad de mutaciones reportadas asociadas a PCA y a síndrome de Char. Las variantes genéticas encontradas en el gen *TFAP2B* no pudieron asociarse a la presencia de la PCA en los individuos analizados ni de manera individual ni como haplotipo debido a que no alteran el marco de lectura del mRNA ni los puntos de *splicing* así como su alta frecuencia en varias poblaciones relacionadas con la población mexicana y en la población en general. Ninguna de las variantes encontradas fue exclusiva de los individuos afectados, por lo que se dificulta saber si estas variables podrían provocar una predisposición a la PCA.

Ya que seis de las siete variantes encontradas en este proyecto se ubican en la región 3'UTR las variantes podrían causar alteraciones en la regulación de la expresión de *TFAP2B* que podrían causar una predisposición a la PCA pero se requieren más estudios que puedan probar que estas variantes realmente afectan la regulación en *cis* o en *trans* en este gen o que altere regiones de regulación en algún otro gen que sea regulado por la zona 3'UTR del mismo mediante RNA's no codificantes. No se descarta la posibilidad que haya variantes genéticas en los intrones no analizados en este proyecto, los cuales podían ser analizados en proyectos futuros.

Al mismo tiempo se descartó la presencia de las variantes reportadas con asociación a PCA no sindrómica y síndrome de Char, por lo que la presencia de PCA no siempre esta determinada por estas mutaciones y probablemente la etiología de la PCA no sindrómica varía entre individuos; el hecho de que esta enfermedad muestre rasgos de una patología multifactorial podría significar que los factores genéticos pueden no ser suficientes para el desarrollo de la misma. Sin embargo, la presencia de las variantes encontradas en esta familia podrían ser un factor predisponente a la aparición de la enfermedad, pero se requieren más estudios que incluyan una población mayor y el enfrentamiento de las variantes con factores ambientales (como la altura, tanto en la gestación como en el nacimiento), que aumenten el riesgo de la presencia de PCA.

No se encontró evidencia que indique que la presencia de PCA en esta familia se deba a haploinsuficiencia como habían reportado algunos autores. Aún sigue siendo desconocida la causa por la que algunos individuos son resistentes al tratamiento, como lo fueron los individuos con PCA



de la familia estudiada, las variantes encontradas en *TFAP2B* en los individuos afectados no indican una asociación directa entre alteraciones en este gen y la resistencia al tratamiento. A pesar de ser un caso familiar, lo que facilita la identificación de patrones de herencia, no se encontró un patrón clásico de herencia, aunque la información sugiere más una tendencia hacia la herencia autosómica recesiva, falta más información del abuelo paterno y otros integrantes de la familia para asegurarlo y confirmar que hay un factor genético determinante en la presencia de PCA en esta familia. Aún quedan muchas interrogantes sobre esta patología que deben ser estudiadas para comprenderla mejor y poder proponer métodos de diagnóstico y mejores opciones de tratamiento para los individuos afectados pero este estudio exploratorio ha mostrado algunos de los rumbos que podrían tomarse en el estudio de esta enfermedad.

## Perspectivas

Aún quedan muchos aspectos que investigar para el mejor conocimiento de la PCA. Faltan estudios de PCA aislada en poblaciones grandes, que registren varias generaciones familiares y determinar que cantidad de caso se dan *de novo* y cuantos casos son familiares. En este estudio podrían integrarse variables ambientales como la altura de gestación y la altura al momento del nacimiento y observar que tanto influye en los casos *de novo* y en los casos familiares. También debe determinarse que tipo o tipos de herencia se presentan en los casos familiares, ya que hay reportes de casos con las características de herencia autosómica recesiva, dominante y poligénica. El hecho de que existan casos *de novo* y familiares, aislados y sindrómicos, y los diferentes efectos que puede tener el tratamiento (efecto positivo, nulo o temporal) puede indicar que hay varias etiologías y que la PCA puede surgir por alteraciones en diferentes procesos del cierre del CA. No solo podrían estar afectados componentes genéticos de estos procesos sino también factores epigenéticos y otros factores de regulación tejido específicos de la expresión génica.

## Referencias

- [1] Akaike, T. and Minamisawa, S. (2014). Role of ion channels in ductus arteriosus closure. *Human Genet Embryol*, 3(116):2161–0436.
- [2] Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., Vogel, J.-H., White, S., Zadissa, A., Flicek, P., and Searle, S. M. J. (2016). The ensembl gene annotation system. *Database*, 2016:baw093.
- [3] Alzamora-Castro, V., Battilana, G., Abugattas, R., and Sialer, S. (1960). Patent ductus arteriosus and high altitude. *The American journal of cardiology*, 5(6):761–763.
- [4] Archer, S. L., Wu, X.-C., Thébaud, B., Moudgil, R., Hashimoto, K., and Michelakis, E. D. (2004). O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: redox-sensitive k<sup>+</sup> channels are regulated by mitochondria-derived hydrogen peroxide. *Biological chemistry*, 385(3-4):205–216.
- [5] Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., et al. (2012). Expasy: Sib bioinformatics resource portal. *Nucleic acids research*, 40(W1):W597–W603.
- [6] Bhandari, V., Zhou, G., Bizzarro, M. J., Buhimschi, C., Hussain, N., Gruen, J. R., and Zhang, H. (2009). Genetic contribution to patent ductus arteriosus in the premature newborn. *Pediatrics*, 123(2):669–673.
- [7] Bökenkamp, R., DeRuiter, M. C., Van Munsteren, C., and Gittenberger-de Groot, A. C. (2009). Insights into the pathogenesis and genetic background of patency of the ductus arteriosus. *Neonatology*, 98(1):6–17.
- [8] Chen, Y.-W., Zhao, W., Zhang, Z.-F., Fu, Q., Shen, J., Zhang, Z., Ji, W., Wang, J., and Li, F. (2011). Familial nonsyndromic patent ductus arteriosus caused by mutations in tfap2b. *Pediatric cardiology*, 32(7):958–965.
- [9] Clyman, R. I., Seidner, S. R., Kajino, H., Roman, C., Koch, C. J., Ferrara, N., Waleh, N., Mauray, F., Chen, Y. Q., Perkett, E. A., et al. (2002). Vegf regulates remodeling during permanent anatomic closure of the ductus arteriosus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(1):R199–R206.
- [10] Coceani, F. (1994). Control of the ductus arteriosus—a new function for cytochrome p450, endothelin and nitric oxide. *Biochemical pharmacology*, 48(7):1315–1318.
- [11] Coceani, F. and Baragatti, B. (2012). Mechanisms for ductus arteriosus closure. In *Seminars in perinatology*, volume 36, pages 92–97. Elsevier.
- [12] Consortium, . G. P. et al. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571):68–74.
- [13] Dagle, J. M., Lepp, N. T., Cooper, M. E., Schaa, K. L., Kelsey, K. J., Orr, K. L., Caprau, D., Zimmerman, C. R., Steffen, K. M., Johnson, K. J., et al. (2009). Determination of genetic predisposition to patent ductus arteriosus in preterm infants. *Pediatrics*, 123(4):1116–1123.

- [14] Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., and Bérout, C. (2009). Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research*, 37(9):e67–e67.
- [15] Fanos, V., Pusceddu, M., Dessì, A., and Marcialis, M. A. (2011). Should we definitively abandon prophylaxis for patent ductus arteriosus in preterm new-borns? *Clinics*, 66(12):2141–2149.
- [16] Feng, X., Krebs, L. T., and Gridley, T. (2010). Patent ductus arteriosus in mice with smooth muscle-specific jag1 deletion. *Development*, 137(24):4191–4199.
- [17] Forsey, J. T., Elmasry, O. A., and Martin, R. P. (2009). Patent arterial duct. *Orphanet journal of rare diseases*, 4(1):17.
- [18] Gelb, B. D. (2013). Char syndrome.
- [19] González, M. D. R., Guzmán, E. G., Quiles, M. J. P., Tejero, M. A., and Cabañas, J. M. G. (2008). Ductus arterioso persistente. *Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología*, pages 353–361.
- [20] Gournay, V. (2011). The ductus arteriosus: physiology, regulation, and functional and congenital anomalies. *Archives of cardiovascular diseases*, 104(11):578–585.
- [21] Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., and Buettner, R. (2000). Regulatory roles of ap-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene*, 260(1):1–12.
- [22] Ivey, K. N., Sutcliffe, D., Richardson, J., Clyman, R. I., Garcia, J. A., and Srivastava, D. (2008). Transcriptional regulation during development of the ductus arteriosus. *Circulation research*, 103(4):388–395.
- [23] Ji, W., Benson, M. A., Bhattacharya, S., Chen, Y., Hu, J., and Li, F. (2014). Characterization of transcription factor ap-2 beta mutations involved in familial isolated patent ductus arteriosus suggests haploinsufficiency. *journal of surgical research*, 188(2):466–472.
- [24] Kajimoto, H., Hashimoto, K., Bonnet, S. N., Haromy, A., Harry, G., Moudgil, R., Nakanishi, T., Rebeyka, I., Thébaud, B., Michelakis, E. D., et al. (2007). Oxygen activates the rho/rho-kinase pathway and induces rhob and rock-1 expression in human and rabbit ductus arteriosus by increasing mitochondria-derived reactive oxygen species. *Circulation*, 115(13):1777–1788.
- [25] Kliegman, R. M., Behrman, R. E., Jenson, H. B., and Stanton, B. M. (2011). *Nelson textbook of pediatrics*. Elsevier Health Sciences.
- [26] Loftin, C. D., Trivedi, D. B., Tiano, H. F., Clark, J. A., Lee, C. A., Epstein, J. A., Morham, S. G., Breyer, M. D., Nguyen, M., Hawkins, B. M., et al. (2001). Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3):1059–1064.
- [27] Machiela, M. J. and Chanock, S. J. (2015). Ldlink: a web-based application for exploring population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics*, 31(21):3555–3557.

- [28] Mani, A., Radhakrishnan, J., Farhi, A., Carew, K. S., Warnes, C. A., Nelson-Williams, C., Day, R. W., Pober, B., Lifton, R. P., et al. (2005). Syndromic patent ductus arteriosus: evidence for haploinsufficient *tfap2b* mutations and identification of a linked sleep disorder. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(8):2975–2979.
- [29] Marieb, E. N. and Hoehn, K. (2013). *Human anatomy & physiology*. Pearson Education.
- [30] Martin, R., Banner, N., and Radley-Smith, R. (1986). Familial persistent ductus arteriosus. *Archives of disease in childhood*, 61(9):906–907.
- [31] Mendieta-Alcántara, G. G., Santiago-Alcántara, E., Mendieta-Zerón, H., Dorantes-Piña, R., de Zárate-Alarcón, G. O., and Otero-Ojeda, G. A. (2013). Incidencia de las cardiopatías congénitas y los factores asociados a la letalidad en niños nacidos en dos hospitales del estado de México. *Gac Med Mex*, 149(6):617–623.
- [32] Minamisawa, S. and Yokoyama, U. (2012). *Recent Advances Concerning the Molecular Mechanism of Patent Ductus Arteriosus*. INTECH Open Access Publisher.
- [33] Nguyen, M., Camenisch, T., Snouwaert, J. N., Hicks, E., Coffman, T. M., Anderson, P. A., Malouf, N. N., and Koller, B. H. (1997). The prostaglandin receptor ep4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth. *Nature*, 390(6655):78–81.
- [34] Penaloza, D. and Arias-Stella, J. (2007). The heart and pulmonary circulation at high altitudes. *Circulation*, 115(9):1132–1146.
- [35] Polani, P. and Campbell, M. (1960). Factors in the causation of persistent ductus arteriosus. *Annals of human genetics*, 24(4):343–358.
- [36] R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- [37] Rabinovitch, M. (1996). Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. In *Seminars in perinatology*, volume 20, pages 531–541. Elsevier.
- [38] San Luis-Miranda, R., Arias-Monroy, L. G., Peralta-Pedrero, M. L., Lázaro-Castillo, J. L., León-Ávila, J. L., Benítez-Aréchiga, Z. M., Jáuregui-Ruiz, O., Yáñez-Gutiérrez, L., and Manrique-Valle, M. (2012). Guía de práctica clínica. persistencia del conducto arterioso. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 50(4):453–463.
- [39] Satoda, M., Pierpont, M. E. M., Diaz, G. A., Bornemeier, R. A., and Gelb, B. D. (1999). Char syndrome, an inherited disorder with patent ductus arteriosus, maps to chromosome 6p12-p21. *Circulation*, 99(23):3036–3042.
- [40] Satoda, M., Zhao, F., Diaz, G. A., Burn, J., Goodship, J., Davidson, H. R., Pierpont, M. E. M., and Gelb, B. D. (2000). Mutations in *tfap2b* cause char syndrome, a familial form of patent ductus arteriosus. *Nature genetics*, 25(1):42–46.
- [41] Schneider, D. J. and Moore, J. W. (2006a). Patent ductus arteriosus. *Circulation*, 114(17):1873–1882.
- [42] Schneider, D. J. and Moore, J. W. (2006b). Patent ductus arteriosus. *Circulation*, 114(17):1873–1882.

- [43] Segi, E., Sugimoto, Y., Yamasaki, A., Aze, Y., Oida, H., Nishimura, T., Murata, T., Matsuoka, T., Ushikubi, F., Hirose, M., et al. (1998). Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor ep4-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 246(1):7–12.
- [44] Sekar, K. and Corff, K. (2008). Treatment of patent ductus arteriosus: indomethacin or ibuprofen? *Journal of perinatology*, 28:S60–S62.
- [45] Shaffer, K. M., Mullins, C. E., Grifka, R. G., O’Laughlin, M. P., McMahon, W., Ing, F. F., and Nihill, M. R. (1998). Intravascular stents in congenital heart disease: short-and long-term results from a large single-center experience. *Journal of the American College of Cardiology*, 31(3):661–667.
- [46] Siassi, B., Blanco, C., Cabal, L. A., and Coran, A. G. (1976). Incidence and clinical features of patent ductus arteriosus in low-birthweight infants: a prospective analysis of 150 consecutively born infants. *Pediatrics*, 57(3):347–351.
- [47] Smith, G. C. (1998). The pharmacology of the ductus arteriosus. *Pharmacological reviews*, 50(1):35–58.
- [48] Smith-Agreda, V. and Agreda, V. S. (1991). *Manual de embriología y anatomía general*, volume 5. Universitat de València.
- [49] Torres-Cosme, J. L., Rolón-Porras, C., Aguinaga-Ríos, M., Acosta-Granado, P. M., Reyes-Muñoz, E., and Murguía-Peniche, T. (2016). Mortality from congenital heart disease in mexico: A problem on the rise. *PloS one*, 11(3):e0150422.
- [50] van der Linde, D., Konings, E. E., Slager, M. A., Witsenburg, M., Helbing, W. A., Takkenberg, J. J., and Roos-Hesselink, J. W. (2011). Birth prevalence of congenital heart disease worldwide. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(21):2241–2247.
- [51] Waleh, N., Hodnick, R., Jhaveri, N., McConaghy, S., Dagle, J., Seidner, S., McCurnin, D., Murray, J. C., Ohls, R., and Clyman, R. I. (2010). Patterns of gene expression in the ductus arteriosus are related to environmental and genetic risk factors for persistent ductus patency. *Pediatric research*, 68(4):292–297.
- [52] Waleh, N., Seidner, S., McCurnin, D., Giavedoni, L., Hodara, V., Goelz, S., Liu, B. M., Roman, C., and Clyman, R. I. (2011). Anatomic closure of the premature patent ductus arteriosus: The role of cd14+/cd163+ mononuclear cells and vegf in neointimal mound formation. *Pediatric research*, 70(4):332–338.
- [53] Wei, J., Chang, Y.-C., Ko, G.-C., and Shieh, S.-M. (1984). Familial patent ductus arteriosus. *The American journal of cardiology*, 54(1):235–236.
- [54] Weichert, J., Hartge, D. R., and Axt-Fliedner, R. (2010). The fetal ductus arteriosus and its abnormalities—a review. *Congenital heart disease*, 5(5):398–408.
- [55] Weir, E., Obreztkhikova, M., Vargese, A., Cabrera, J., Peterson, D., and Hong, Z. (2008). Mechanisms of oxygen sensing: a key to therapy of pulmonary hypertension and patent ductus arteriosus. *British journal of pharmacology*, 155(3):300–307.

- [56] Wildeman, M., Van Ophuizen, E., Den Dunnen, J. T., and Taschner, P. E. (2008). Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Human mutation*, 29(1):6–13.
- [57] Yokoyama, U., Minamisawa, S., and Ishikawa, Y. (2010). Regulation of vascular tone and remodeling of the ductus arteriosus. *Journal of Smooth Muscle Research*, 46(2):77–87.
- [58] Zhao, F., Bosserhoff, A.-K., Buettner, R., and Moser, M. (2011). A heart-hand syndrome gene: Tfp2b plays a critical role in the development and remodeling of mouse ductus arteriosus and limb patterning. *PloS one*, 6(7):e22908.
- [59] Zhao, F., Weismann, C. G., Satoda, M., Pierpont, M. E. M., Sweeney, E., Thompson, E. M., and Gelb, B. D. (2001). Novel tfap2b mutations that cause char syndrome provide a genotype-phenotype correlation. *The American Journal of Human Genetics*, 69(4):695–703.

# Anexos

## Anexo I: Gen *TFAP2B*

### Descripción general

- Símbolo: *TFAP2B*
- Nombre completo: *transcription factor AP-2 beta. (AP- 2 : activating enhancer binding protein 2)*. (Factor de transcripción AP-2 beta. AP-2: proteína de unión al potenciador de activación)
- Tipo de gen: codifica para una proteína
- Localización: 6p12.3
- Orientación: cadena *forward (plus strand)*
- Exones: 7 . No posee *splicing* alternativo. Ver Figura 32, Tabla 6 y Tabla 7
- Tamaño: 28,888 pares de bases (pb)
- Región: 5,001-33,888
- Enfermedades asociadas:
  - Síndrome de *Char*
  - Persistencia del Conducto Arteriso
  - Enfermedad del sueño
  - Neoplasia del músculo esquelético

- Generalidades: Este gen codifica para un miembro de la familia de factores de transcripción AP-2. Las proteínas AP-2 forman homo o hetero-dímeros con otros miembros de la familia AP-2 y se unen secuencias específicas de ADN. Se cree que *TFAP2B* estimula la proliferación celular y suprime la diferenciación terminal de algunos tipos celulares. Esta proteína funciona tanto como activador como represor transcripcional. Las mutaciones en este gen dan como resultado el síndrome de Char (autosómico dominante), lo que sugiere la acción de este gen en la diferenciación de los derivados de células de la cresta neural.

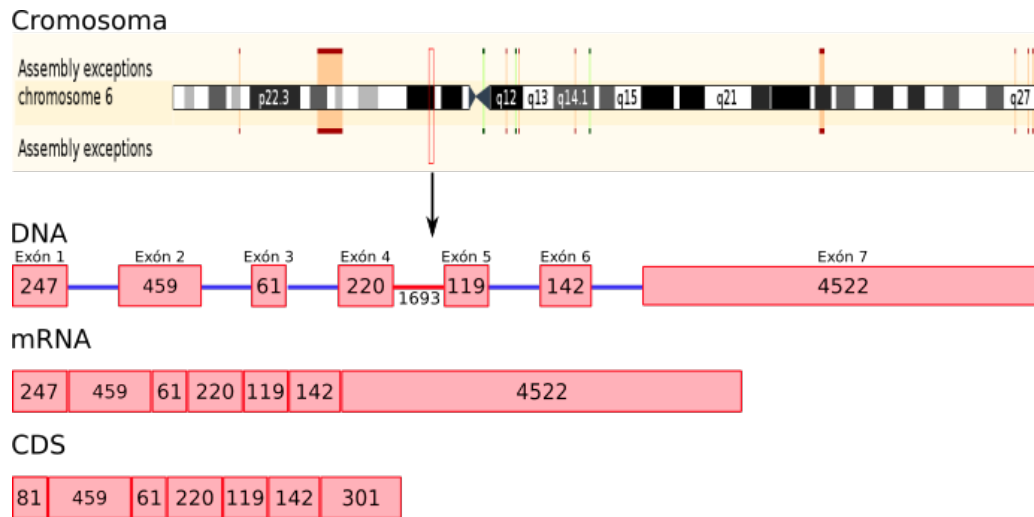


Figura 32: **Localización y estructura genómica de *TFAP2B***. El gen *TFAP2B* se encuentra localizado en el cromosoma 6p12.3 (rectángulo de contorno rojo). Debajo se encuentra esquematizada la estructura el gen; las zonas en rojo son aquellas que fueron secuenciadas en este proyecto, los números indican la cantidad de pb que posee cada exón/intrón. Debajo del gen se encuentran los esquemas del mRNA y el CDS (region codificante). Modificada de ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html> by (Aken et al., 2016).

**Tabla 6: Posición y tamaño de los exones/intrón del gen *TFPA2B* que fueron secuenciados en este proyecto.**

Exón/Intrón	DNA posición/pb
Exón 1	5001-5247 / 247
Exón 2	9682-10140 / 459
Exón 3	14894-14954 / 61
Exón 4	22336-22555 / 220
Intrón 4	22556-24249 / 1693
Exón 5	24240-24368 / 119
Exón 6	26431-26572 / 142
Exón 7	29367-33888 / 4522



**Tabla 7: Posición y tamaño del mRNA y CDS del gen *TFPA2B* con base en los exones/intrón que fueron secuenciados en este proyecto.**

Exón/Intrón	mRNA/(posición/pb)	CDS/(posición/pb)
Exón 1	5001-5247/(1-247/247)	5166-5247/(1-81/81)
Exón 2	9682-10140/(248-706/459)	9682-10140/(82-540)(459)
Exón 3	14894-14954/(707-767)(61)	14894-14954/(541-601)(61)
Exón 4	22336-22555/(768-987)(220)	22336-22555/(602-821)(220)
Intrón 4	-	-
Exón 5	24250-24368/(989-1106)(119)	24250-24368/(822-940)(119)
Exón 6	26431-26572/(1107-1248)(142)	26431-26572/(941-1082)(142)
Exón 7	29367-33888(1249-5770) (4522)	29367-29668 (1083-1383) (301)

## Proteína

- Nombre completo: *transcription factor AP-2 (AP- 2 : activating enhancer binding protein 2) beta*
- Tamaño: 460 aminoácidos
- Peso: 50,474 Da
- Generalidades: La familia de factores transcripcionales *TFAP2* consta de cinco miembros: *TFAP2A*, *TFAP2B*, *TFAP2C*, *TFAP2D* y *TFAP2E* (Waleh et al., 2010). Es una familia de genes sensibles a ácido retinóico, que están involucrados en la regulación transcripcional de varios genes requeridos durante el desarrollo embriológico y que tienen un papel importante en el desarrollo, apoptosis, control del ciclo celular y procesos morfológicos complejos (Zhao et al., 2011).
- Estructura: Se une al DNA en forma de dímero, estos dímeros pueden ser homodímeros o heterodímeros formados con otros miembros de la familia AP-2. Interactúa con *CITED4*, para reprimir la activación de la transcripción interactúa con *CITED2* (vía C-terminal); la interacción estimula la actividad transcripcional *TFAP2B*. La proteína consiste en un amino-terminal rico en prolina y glutaminas (P/Q) que es el sitio de activación transcripcional y un dominio *helix-span-helix* que regula la dimerización y la unión al DNA (Mani et al., 2005).
- Función: Proteína de unión a secuencias específicas de DNA, que interactúa con *enhancers* para regular la transcripción de genes seleccionados. Los factores *AP-2* se unen a secuencias consenso 5'-GCCNNGGC-3' estimulando la transcripción de genes que participan en un amplio espectro de funciones biológicas importantes y también interactúan con otros factores de transcripción (Mani et al., 2005).

# Anexo II: "Wizard® Genomic DNA Purification Kit"

## Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

**Quick**  
PROTOCOL

### Isolation of Genomic DNA from Whole Blood

Sample Size	Lysis Solution		Protein Precipitation		DNA Rehydration Solution
	Cell	Nuclei	Solution	Isopropanol	
300µl	900µl	300µl	100µl	300µl	100µl
1ml	3ml	1ml	330µl	1ml	150µl
3ml	9ml	3ml	1ml	3ml	250µl
10ml	30ml	10ml	3.3ml	10ml	800µl

As little as 20µl can be processed with this system. Please see Technical Manual #TM050, Section 3.C.

#### Red Blood Cell Lysis

- Using volumes from the table above, combine the appropriate volumes of Cell Lysis Solution and blood. Mix by inversion.
- Incubate for 10 minutes at room temperature.
- Centrifuge:
  - ≤300µl sample 13,000–16,000 × *g*\*; 20 seconds
  - 1–10ml sample 2,000 × *g*; 10 minutes
- Discard supernatant. Vortex pellet.

#### Nuclei Lysis and Protein Precipitation

- Using volumes from the table above, add Nuclei Lysis Solution and mix by inversion.
- Add Protein Precipitation Solution; vortex for 20 seconds.
- Centrifuge:
  - ≤300µl sample 13,000–16,000 × *g*\*; 3 minutes
  - 1–10ml sample 2,000 × *g*; 10 minutes

#### DNA Precipitation and Rehydration

- Transfer supernatant to a new tube containing isopropanol (using volumes from table above). Mix.
- Centrifuge:
  - ≤300µl sample 13,000–16,000 × *g*\*; 1 minute
  - 1–10ml sample 2,000 × *g*; 1 minute
- Discard supernatant. Add 70% ethanol (same volume as isopropanol).
- Centrifuge as in Step 9.
- Aspirate the ethanol and air-dry the pellet (10–15 minutes).
- Rehydrate the DNA in the appropriate volume of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

\*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: [www.promega.com](http://www.promega.com)

#### ORDERING/TECHNICAL INFORMATION:

[www.promega.com](http://www.promega.com) • Phone 608-274-4330 or 800-356-9526 • Fax 608-277-2601

Blood



Add Cell Lysis Solution. Incubate.



Centrifuge.



Discard supernatant. Vortex pellet. Add Nuclei Lysis Solution. Mix. Add Protein Precipitation Solution.



Centrifuge.



Transfer supernatant to new tube containing isopropanol.



Centrifuge.



Discard supernatant. Add ethanol.



Centrifuge.



Aspirate ethanol. Air-dry pellet. Rehydrate DNA.

2818MA11\_9A  
2818MA



**Promega**

Printed in USA. Revised 10/10  
Part #9FB022

## Anexo III: Oligonucleotidos

Tabla 8: Oligonucleótidos diseñados y utilizados para la amplificación de fragmentos del gen *TFAP2B*

Nombre del oligonucleótido	Secuencia
<i>TFAP2B</i> _1F	5'-ATATGTGGGTGTCTGGGTGTAAAT-3'
<i>TFAP2B</i> _2F	5'-CTCTTTCTCTGTCTCCTTCTCTGG-3'
<i>TFAP2B</i> _3F	5'-GCAATTCTTTAATATCCTGTCAA-3'
<i>TFAP2B</i> _4F	5'-CACATTCTATCAGCCGGTCATCAG-3'
<i>TFAP2B</i> _5F	5'-GCTCCACTGGGCTTTAGATTG-3'
<i>TFAP2B</i> _6F	5'-ATACTAACAAAGCTGACAAGGGAAT-3'
<i>TFAP2B</i> _7A_F	5'-TAATGCCAATGACAACGACACTGA-3'
<i>TFAP2B</i> _7B_F	5'-TCGGTTCTCAGTGTCTATTTCAAG-3'
<i>TFAP2B</i> _7C_F	5'-CTGAGGAAAATCCGGACCAATAAG-3'
<i>TFAP2B</i> _7D_F	5'-TAAAGAAGCTCAAAGGGAATAAT-3'
<i>TFAP2B</i> _7E_F	5'-TTTGATTTTTACCCTCTGGATACA-3'
<i>TFAP2B</i> _7F_F	5'-CCACACTGCAGCCCATCTCCAAC-3'
<i>TFAP2B</i> _7G_F	5'-CGAAGCTTCCCCTCCTCCACCTC-3'
<i>TFAP2B</i> _7H_F	5'-TCCCAAACAAAATAGCGAAAGAC-3'
<i>TFAP2B</i> _7I_F	5'-CAAGCAATTATTTTCATATCCTACG-3'
<i>TFAP2B</i> _1R	5'-CTCTATCTGCAAAGCTCTAAGGTG-3'
<i>TFAP2B</i> _2R	5'-AGCATTTCCTTATTCGTGGTCTTT-3'
<i>TFAP2B</i> _3R	5'-AGTGAAAATTCATCATAAAGACG-3'
<i>TFAP2B</i> _4R	5'-TTTGCTGGAACCTTCTCCTCACT-3'
<i>TFAP2B</i> _5R	5'-TCAGCCTCCAGCCGACAGTTA-3'
<i>TFAP2B</i> _6R	5'-ACAACCCCTCTGGCTTCTTTCTCT-3'
<i>TFAP2B</i> _7A_R	5'-ACCGATATTGTTGCTCCGTTGTA-3'
<i>TFAP2B</i> _7B_R	5'-CGCCCTCGCCCTCCCTAAT-3'
<i>TFAP2B</i> _7C_R	5'-TTGGAGTGTTGAGGAATGTTAGCA-3'
<i>TFAP2B</i> _7D_R	5'-GGAGGTGCAGACAATCGATTC-3'
<i>TFAP2B</i> _7E_R	5'-TTGCTTGGGCCCTTTTGGTGAC-3'
<i>TFAP2B</i> _7F_R	5'-CTTTCTCGGTTCGCTTAGCCCT-3'
<i>TFAP2B</i> _7G_R	5'-CCTCCTGTCTTTCGCTATTTTGTT-3'
<i>TFAP2B</i> _7H_R	5'-TAGGAAAGCATTGTAGCAGAGGA-3'
<i>TFAP2B</i> _7I_R	5'-AGAACTGAAGATGAAAACACAAC-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4A_F	5'-AACTGTGGGAGAAGTTCAGAGACG-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4A_R	5'-AAAACATGCAATAAAAGAGAAAGAG-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4B_F	5'-AAGCAACTCTTTCATACCTTCAGT-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4B_R	5'-TCAAAATGAGAAAGTTCCTGGGT-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4C_F	5'-CTTGTACTTTTTGTCCATACTTTAG-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4C_R	5'-AGTGTCTTTTTTTTATCTTGTGAG-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4D_F	5'-CATGTGCAGCTTCTACCTTCTCTA-3'
<i>TFAP2B</i> _INT4D_R	5'-TAACGTGACATTTGCTGCTTTGC-3'

