



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

Búsqueda de variantes genéticas en el
gen *EPAS1* relacionadas con el desarrollo de
Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares

T E S I S

para obtener el título de

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Presenta

Valeria Dejanira Vicente Juárez

Asesores

Dra. Irma Eloisa Monroy Muñoz
QFB. Alejandro Gutiérrez García

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2020.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Búsqueda de variantes genéticas en el gen EPAS1 relacionadas con el desarrollo de Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares.

Que presenta la pasante: Valeria Dejanira Vicente Juárez
Con número de cuenta: 413034926 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR RIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Búsqueda de variantes genéticas en el gen EPAS1 relacionadas con el desarrollo de Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares.

Que presenta la pasante: **Valeria Dejanira Vicente Juárez**
Con número de cuenta: **413034926** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Búsqueda de variantes genéticas en el gen EPAS1 relacionadas con el desarrollo de Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares.

Que presenta la pasante: **Valeria Dejanira Vicente Juárez**
Con número de cuenta: **413034926** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

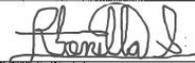
Búsqueda de variantes genéticas en el gen EPAS1 relacionadas con el desarrollo de Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares.

Que presenta la pasante: **Valeria Dejanira Vicente Juárez**
Con número de cuenta: **413034926** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	_____
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Búsqueda de variantes genéticas en el gen EPAS1 relacionadas con el desarrollo de Persistencia del Conducto Arterioso en casos familiares.

Que presenta la pasante: **Valeria Dejanira Vicente Juárez**
Con número de cuenta: **413034926** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

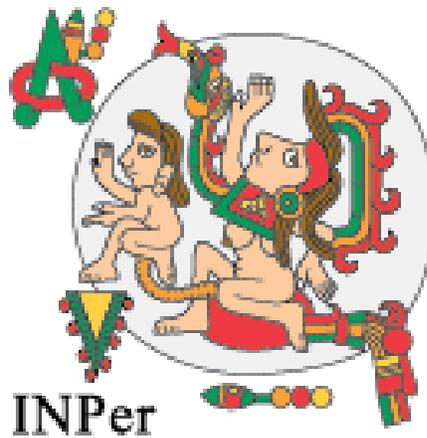
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Noviembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Esther Revuelta Miranda	_____
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	_____
SECRETARIO	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	_____
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
2do. SUPLENTE	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genética y Genómica Humana del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinoza Los Reyes”, bajo la dirección de la Dra. Irma Eloísa Monroy Muñoz.

“La ciencia no sólo es compatible con la espiritualidad, es una profunda fuente de espiritualidad”

Carl Sagan

AGRADECIMIENTOS

- Por ser el cambio que necesitaba en la vida, por brindarme un panorama amplio, por darme la oportunidad de crecer en muchos aspectos, por ser el paso a cosas magnificas, y por ser mi *alma mater* gracias UNAM, gracias mi FES.

- Por brindarme una formación completa, por la motivación que me inspiran, por compartir no sólo conocimientos sino, la pasión por hacer lo que amas y por todo su apoyo en este trayecto, gracias Profesores.

- Agradezco al INPer y en especial al laboratorio de Genética y Genómica humana, por permitirme desarrollar este trabajo.

- Dra. Irma: Nunca tendré las palabras adecuadas para expresar mi admiración por usted, tanto profesional como personalmente. Agradezco infinitamente todo su apoyo, así como la paciencia que tuvo conmigo. Por abrirme las puertas no sólo a este proyecto, sino también a la familia del laboratorio de genética y genómica, gracias.

- Dr. Javier: Gracias por su paciencia y apoyo. Por confiar en mí y ayudarme a crecer durante mi estancia en el INPer.

DEDICATORIAS

- ➔ A mi mamá, Nohemí. Por todas tus enseñanzas, porque tu recuerdo me motiva a seguir día a día, por el amor y alegría que inculcaste en mí, por estar a mi lado a cada paso y ser el mejor ángel guardián.
- ➔ A mi papá, Álvaro. Por siempre motivarme a soñar en grande y estar detrás de esos sueños. Por ser el mayor ejemplo de audacia y valor, por tu forma particular de ser. Por ser el pilar más fuerte de mi vida.
- ➔ A Román. Por enseñarme de perseverancia y paciencia, por ser un recordatorio constante de que siempre hay algo mejor. Por ser la mejor motivación. Te adoro, hermano.
- ➔ A mi Tía Cata. Por enseñarme que el apoyo que se da de corazón no conoce límites y que la devoción y esmero por nuestra labor nunca termina. Eres la mejor maestra y tía.
- ➔ Para toda mi familia, que siempre serán el mejor y más grande ejemplo de lealtad.
- ➔ A Moi, porque a través de este trayecto hemos aprendido y crecido juntos. Por la admiración, confianza, paciencia y sobre todo el cariño que me das en mí cada día.
- ➔ A Miri, por tu gran amistad, madurez y motivación. Por mostrarme que la empatía y nobleza pueden ser la mejor defensa y arma. Sin duda, eres una persona a la que admiro y de la que más he aprendido en este camino. Por seguir queriéndome después de conocer todas mis facetas. Por estar. Gracias por TODO, hermana.
- ➔ Para Itzi, Andy & Chema. Por estar en el momento más difícil de mi vida, porque conocen mis cenizas. Sin su influencia y cariño, no estaría donde estoy.
- ➔ Para Donajú, LilyMonkey, Carito, Ramita, Oblis & Aline. Pensión: por ser mi familia adoptiva, por guiarme, por su cariño y paciencia, por aceptarme en sus hogares, por enseñarme tanto y siempre motivarme a crecer (.).

- ➔ Para Karlita, mi Polola, Luz & Ale. Porque la carrera no hubiera sido igual sin ustedes. Por todo su apoyo en esta etapa. Las quiero mucho, niñas.
- ➔ Para Jorge, Karlita, Gaby, Albertoio & Montse. INPerTeam, sin ustedes esto hubiera sido aún más complicado. Por su paciencia, orientación y obvio, los gratos recuerdos. Los admiro mucho amikos.
- ➔ A los que perduran en el recuerdo, con el corazón para mis Yayitos, mi Abuelito Felipe & mi Tía Ruth.

Recuerden que pase lo que pase, todo va a estar bien.

Con mucho cariño, Vale



The red vineyard near Arles (1888). Vincent van Gogh.

“El éxito es a veces el resultado de toda una serie de fracasos”

Vicent van Gogh



ABREVIATURAS

▶ A	Adenina
▶ AA	Aminoácido(s)
▶ ADN	Ácido Desoxirribonucleico
▶ Ala	Alanina
▶ AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
▶ ARNm	Ácido Ribonucleico
▶ C	Citocina
▶ CA	Conducto Arterioso
▶ CC	Cardiopatía(s) congénita(s)
▶ CE	Células Endoteliales
▶ CML	Células del músculo liso
▶ CO	Monóxido de carbono
▶ COX	Ciclooxigenasa
▶ CYP450	Citocromo P450
▶ dNTP	Deoxinucleósido(s) trifosfato(s)
▶ eNOS	Endothelial nitric oxide synthetase (Óxido nítrico sintetasa de células endoteliales)
▶ <i>EPAS1</i>	Gen de la proteína del dominio PAS1
▶ ESE	Exonic Splicing Enhancer (Potenciador Exónico de Splicing)
▶ ESS	Exonic Splicing Silencer (Silenciador Exónico de Splicing)
▶ ET-1	Endotelina 1
▶ Fw	Forward
▶ G	Guanina
▶ GC	Guanilil Ciclasa
▶ GluR1	Receptor Inotrópico De Glutamato-1
▶ Gly	Glicina
▶ GMPc	Guanosin Monofosfato Cíclico
▶ HIF2 α	Factor de respuesta a hipoxia
▶ H ₂ S	Sulfuro de hidrógeno



▶ H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
▶ HREs	Hipoxia Response Elements (Elementos de Respuesta hipoxia)
▶ HRMA	High Resolution Melting Assay (Ensayo de desnaturalización de alta resolución)
▶ INDEL	Mutación Tipo Inserción o Delección
▶ IP	Infantes prematuros
▶ Kb	kilo base
▶ LEI	Lámina Elástica Interna
▶ MEC	Matriz extracelular
▶ NO	Óxido Nítrico
▶ O ₂	Oxígeno
▶ Pb	Pares de Bases
▶ PCA	Persistencia del Conducto Arterioso
▶ PCR	Polymerasa Chain Reaction (Reacción en cadena Polimerasa)
▶ PCR _{pf}	PCR punto final
▶ PG	Prostaglandinas
▶ PGE ₂	Prostaglandina E ₂
▶ PLT	Plaquetas
▶ preARNm	ARNm prematuro
▶ p300-CBP	Proteína 300 de unión a CREB
▶ QP	Gasto pulmonar
▶ QS	Gasto sistémico
▶ REDOX	Reacción de óxido-reducción
▶ RN	Recién Nacidos
▶ ROS	Especies Reactivas de O ₂
▶ RVP	Resistencia Vascular Pulmonar
▶ Rw	Reverse
▶ SFs	Splicing Factors (Factores de Splicing)
▶ SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un sólo nucleótido)
▶ SNV	Single Nucleotide Variant (Variante de un solo nucleótido)
▶ SN2	Sustitución nucleofílica tipo 2
▶ T	Timina



- ▶ **TFAP2 β** Factor de Transcripción AP2 β
- ▶ **TRPM3** Receptor de Melastanina 3
- ▶ **Tx** Tratamiento
- ▶ **URF** Unidades relativas de fluorescencia
- ▶ **VEGF** Factor De Crecimiento de las Células Endoteliales
- ▶ **WT** Wild Type (silvestre)
- ▶ **3DE** Ecocardiografía Tridimensional
- ▶ **°C** Grados Celsius



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. DISPOSITIVO DE OCLUSIÓN AMPLATZER®, URL1.	7
FIGURA 2. DISPOSITIVO NIT-OCCLUD®, URL2.	7
FIGURA 3. CIRCULACIÓN FETAL, URL3.	9
FIGURA 4. CIERRE DEL CONDUCTO ARTERIOSO.	10
FIGURA 5. MECANISMOS QUE INTERVIENEN EN EL CA ANTES Y DESPUÉS DEL NACIMIENTO.	11
FIGURA 6. SEÑALIZACIÓN DURANTE EL CIERRE FUNCIONAL DEL CONDUCTO ARTERIOSO.	12
FIGURA 7. CIERRE ANATÓMICO DEL CA.	15
FIGURA 8. ESTRUCTURA “CRYSTAL” DE LA PROTEÍNA EPAS1.	20
FIGURA 9. UBICACIÓN DEL GEN EPAS1 EN EL CROMOSOMA 2, URL4.	21
FIGURA 10. DOMINIOS ESPECÍFICOS DE LA PROTEÍNA EPAS1	21
FIGURA 11. ESTRUCTURA DE EPAS1 COMO HETERODÍMERO CON ARNT	22
FIGURA 12. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LOS GENES HIFA, URL5.	23
FIGURA 13. ESQUEMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA EMPLEADA.	28
FIGURA 14. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN Y DESNATURALIZACIÓN UTILIZADO PARA EL ENSAYO DE HRM.	29
FIGURA 15. PROGRAMA UTILIZADO PARA LA PCR PUNTO FINAL.	31
FIGURA 16. PROGRAMA UTILIZADO PARA PURIFICACIÓN CON EXONUCLEASA.	32
FIGURA 17. PROGRAMA UTILIZADO PARA LA PCR DE SECUENCIA.	33
FIGURA 18. CURVA NORMALIZADA DE MELTING.	35
FIGURA 19. RESULTADO DE LA ELECTROFORESIS EN EL GEL DE AGAROSA 1.5%.	36
FIGURA 20. ELECTROFEROGRAMA OBTENIDO DE LA SECUENCIACIÓN DEL EXÓN 5 DE <i>EPAS1</i> , DEL MIEMBRO II-8 DE LA FAMILIA 2.	37
FIGURA 21. ELECTROFEROGRAMA DEL EXÓN 11, PERTENECIENTE A II-6 DE LA FAMILIA II. VARIANTE NG_016000.1:g.86414G>C/rs7598371.	39
FIGURA 22. ELECTROFEROGRAMA DEL EXÓN 9 CORRESPONDIENTE A MIEMBROS DE LA FAMILIA II.	39
FIGURA 23. ELECTROFEROGRAMA DEL EXÓN 12 DEL INDIVIDUO II-3 DE LA FAMILIA II. VARIANTE NG_016000.1:g.88008G>A/ rs184760160.	41



FIGURA 24. ELECTROFEROGRAMA DE LOS SNPs: NG_016000.1:g.63738C>G NG_016000.1:g.63741C>T, NG_016000.1:g.63741_63742InsT, Y NG_01600.1:g.63742C>T. _____	42
FIGURA 25. INSERCIÓN DE T ENTRE LAS BASES 63741 Y 63742 EN <i>EPAS1</i> . _____	42
FIGURA 26. ELECTROFEROGRAMAS DEL EXÓN 3 DE LA FAMILIA II: NG_016000.1:g.63741C>T, NG_016000.1:g.63741_63742InsC, Y NG_01600.1:g.63742C>T. _____	43
FIGURA 27. DIAGRAMA DE LOS SITIOS POTENCIALES DE SPLICING PERTENECIENTE AL EXÓN 3 DE <i>EPAS1</i> . _____	44
FIGURA 28. ELECTROFEROGRAMA EN FW DEL EXÓN 14 CORRESPONDIENTE A II-5 DE LA FAMILIA II. SE ENCUENTRA RESULTADO NG_016000.1:g.89554T>C. _____	44
FIGURA 29. ELECTROFEROGRAMA FW DEL EXÓN 16 PERTENECIENTE A I-1 MIEMBRO DE LA FAMILIA I. SE OBSERVA NG_016000.1:g.92114C>G/ RS765994211 DENTRO DEL RECUADRO AMARILLO. _____	45
FIGURA 30. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS MÚLTIPLE DE UN FRAGMENTO DE <i>EPAS1</i> . _____	46
FIGURA 31. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS MÚLTIPLE DE <i>EPAS1</i> . _____	46
FIGURA 32. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE LA PROTEÍNA <i>EPAS1</i> . _____	47
FIGURA 33. VERSIÓN SIMPLIFICADA DE LA VÍA HIF EN UNA CÉLULA, CON UN ENFOQUE EN ASPECTOS ESPECÍFICOS	49
FIGURA 34. REGULACIÓN POR FACTORES DE SPLICING DE UNIÓN AL ARN. _____	51
FIGURA 35. PROCESO DE BRANCHING. _____	52
FIGURA 36. DIAGRAMA DE PEDIGRÍ DE LA FAMILIA I. _____	55
FIGURA 37. DIAGRAMA DE PEDIGRÍ DE LA FAMILIA II. _____	56



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. PROCEDIMIENTOS PARA CERRAR EL CONDUCTO ARTERIOSO. _____	6
TABLA 2. FACTORES QUE INTERVIENEN EN EL CIERRE ANATÓMICO DEL CONDUCTO ARTERIOSO _____	16
TABLA 3. GENES QUE SE ENCUENTRAN ASOCIADOS CON EL CIERRE DEL CONDUCTO ARTERIOSO. _____	19
TABLA 4. REACTIVOS Y VOLÚMENES CORRESPONDIENTES PARA EL ANÁLISIS POR HRMA. _____	29
TABLA 5. REACTIVOS Y VOLÚMENES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR PUNTO FINAL. _____	30
TABLA 6. REACTIVOS Y VOLÚMENES PARA LA AMPLIFICACIÓN POR PCR PUNTO FINAL CON 7-DEAZA-2'- DEOXYGUANOSINA. _____	30
TABLA 7. REACTIVOS Y VOLÚMENES PARA LA REACCIÓN DE PURIFICACIÓN. _____	31
TABLA 8. REACTIVOS Y VOLÚMENES PARA PCR DE SECUENCIA. _____	32
TABLA 9. CLUSTERS IDENTIFICADOS POR EL SOFTWARE DE HRMA. _____	36
TABLA 10. ASOCIACIÓN ENTRE EL FENOTIPO Y LAS VARIANTES ENCONTRADAS. _____	38
TABLA 11. EVALUACIÓN DE VARIANTES SINÓNIMAS EN DBSNP Y HSF 3.0. _____	40
TABLA 12. EVALUACIÓN DE VARIANTES SINÓNIMAS EN RNAFOLD. _____	45
TABLA 13. EVALUACIÓN DE VARIANTES NO SINÓNIMAS EN DBSNP Y POLYPHEN 2.0. _____	45



CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS	2
I.1.1. Definición	2
I.1.2. Etiopatogenia	2
I.1.3. Estadísticas internacionales y nacionales	3
I.1.3.1. Las cardiopatías más comunes	3
I.2. PERSISTENCIA DEL CONDUCTO ARTERIOSO	3
I.2.1. Definición	3
I.2.2. Complicaciones	4
I.2.3. Diagnóstico	4
I.2.3.1. Estudios de Gabinete	5
I.2.4. Tratamiento	7
I.3. CONDUCTO ARTERIOSO	8
I.3.1. Circulación fetal	8
I.3.2. Anatomía y Fisiología	9
I.3.3. Cierre del Conducto Arterioso	10
I.3.3.1. Señalización	10
I.3.3.2. Cierre Funcional	12
I.3.3.2.1. Vasoconstricción	13
I.3.3.2.2. Vasodilatación	14
I.3.3.3. Cierre anatómico	15
I.3.3.3.1. Proliferación y Migración de CML	16
I.3.3.3.2. Matriz extracelular	17
I.3.3.3.3. Células endoteliales	18
I.3.3.3.4. Interacción de células sanguíneas	18
I.3.4. Regulación Génica	19
I.4. <i>EPAS1</i>	21
I.4.1. Antecedentes	21
I.4.2. Familia dominio PAS/ bHLH	22
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
III. JUSTIFICACIÓN	25



IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVOS	27
VI. METODOLOGÍA	28
VI.1. AMPLIFICACIÓN DE LOS EXONES	28
VI.2. PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA	31
VI.3. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN	32
VI.4. PURIFICACIÓN EN COLUMNA	33
VI.5. SECADO Y REHIDRATACIÓN	33
VI.6. SECUENCIACIÓN DE SANGER	33
VI.7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	34
VII. RESULTADOS	35
VII.1. BÚSQUEDA DE VARIANTES POR HRMA	35
VII.2. BÚSQUEDA DE VARIANTES POR PCR PUNTO FINAL	36
VII.3. SECUENCIACIÓN	37
VII.4. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	39
VIII. DISCUSIÓN	48
VIII.1. VARIANTES NO SINÓNIMAS	50
VIII.2. VARIANTES SINÓNIMAS	50
VIII.3. VARIANTES DE SIGNIFICADO INCIERTO	53
VIII.4. RELACIÓN GENOTIPO – FENOTIPO	54
VIII.4.1. Familia I	54
VIII.4.2. Familia II	55
IX. CONCLUSIONES	57
X. REFERENCIAS	58
XI. URLS CONSULTADOS	65
XII. ANEXOS	66
XII. 1. ANEXO 1. CEBADORES UTILIZADOS PARA SECUENCIACIÓN DE <i>EPAS1</i>	66
XII. 2. ANEXO 2. ESTUDIO CON RNAFOLD.	67



RESUMEN

Las cardiopatías son los defectos congénitos más comunes a nivel mundial, y dentro de estas, la persistencia del conducto arterioso o PCA es la reportada con más frecuencia. En esta, el CA que comunica a la arteria pulmonar y la aorta durante la etapa fetal, no se cierra espontáneamente, debido a la falla de mecanismos como migración y proliferación de células de CML y CE, disrupción de la LEI, y adhesión de células sanguíneas, por mencionar algunos.

Por otro lado, y de acuerdo a diversos autores, alteraciones en *EPAS1* podrían ser una de las causas genéticas para que el cierre del CA se vea afectado, ya que este es un factor de transcripción que regula una gran variedad de genes que, a su vez, interfieren en procesos como la angiogénesis, regulación de la eritropoyesis, remodelación de vasos sanguíneos, maduración y diferenciación celular, por mencionar algunos. En el trabajo presentado, se analizan las variantes en la secuencia genética de *EPAS1* para establecer una posible relación con PCA no sindrómica en casos de recurrencia familiar. A través del análisis de los fragmentos exónicos de *EPAS1* en dos familias que reportan la afección, mediante HRMA, PCR punto final, secuenciación de Sanger y herramientas bioinformáticas.

Fueron detectadas un total de 14 variantes que permiten pensar que existe una relación entre la PCA no sindrómica y *EPAS1* pues, los polimorfismos intrónicos rs184760160, rs7557402, rs75984373 y rs202210836, rs184760160, rs7557402, c.1035-52G>A y c.1035-25T>A, así como la variante exónica rs765994211, podrían afectar características importantes del ARNm y/o la función de *EPAS1*. Los SNPs encontrados, al igual que otros reportados en la literatura, podrían truncar la función de *EPAS1*, afectando posiblemente su papel como factor de transcripción involucrado en diversos mecanismos, que a su vez resultan imprescindibles para el correcto cierre del conducto arterioso.



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cardiopatías Congénitas

I.1.1. Definición

Las cardiopatías congénitas (CC) son errores en la embriogénesis cardíaca, que se manifiestan con mayor severidad durante el periodo neonatal o en la edad pediátrica (Campos, 2016). Dichas malformaciones en alguna de las cámaras cardíacas y/o de sus grandes vasos, provocan cambios en la morfofuncionalidad del corazón; estas se originan en las primeras semanas de gestación (3^{ra} y 10^{ma} semana) por factores que alteran o detienen el desarrollo embriológico del sistema cardiovascular (Vijayalakshmi et al., 2019; Leis et al., 2010). En muchos casos se trata de un trastorno crónico debido a los efectos secundarios tanto de la misma cardiopatía como de los procedimientos correctivos (Moons, 2001).

I.1.2. Etiopatogenia

Las CC son de origen multifactorial, y aproximadamente el 8% se encuentran asociadas a factores genéticos, mientras el 2% a factores ambientales.

Entre los mecanismos patogenéticos que causan las CC se encuentran anomalías en: la migración de tejido ectomesenquimal, en el flujo de la sangre intracardiaca, en la apoptosis, en la matriz extracelular, en el desarrollo y en los “situs” y bucles. (Vijayalakshmi et al., 2019)

Existen otros elementos que aumentan el riesgo de padecer alguna CC donde se encuentran: infecciones, exposición materna a drogas y teratógenos, condiciones médicas en los padres como diabetes mellitus, hipotiroidismo, etc., exposición de los padres a bebidas alcohólicas, humo de cigarro, etc., niveles alterados de vitaminas, uso de reproducción asistida, factores ambientales, factores sociodemográficos, y recurrencia familiar de alguna CC (Donofrio et al., 2014; Vijayalakshmi, et al., 2019).



I.1.3. Estadísticas internacionales y nacionales

Estos son los defectos congénitos más comunes a nivel mundial, las cifras indican una prevalencia del 0.8% al 1%, contemplando a los recién nacidos (RN) vivos y a los nacidos a término; sin embargo, en RN prematuros las cifras reportadas alcanzan un 8.3% (Bravo et al., 2018); En países como Inglaterra, Estados Unidos, Canadá, España, Japón e Italia, se reporta una prevalencia que va de 2.1 hasta 12.3 por cada 1000 recién nacidos vivos (Calderón et al., 2010).

Mientras tanto, en México se estima que por cada 1,000 RN vivos aproximadamente 10 de ellos sufren de alguna CC (Mendieta, et al., 2013). En 2013, de 1,876 muertes por CC (52%) ocurrieron en la Ciudad de México y cinco estados (Estado de México, Jalisco, Puebla, Guanajuato y Veracruz) (Torres et al., 2016).

I.1.3.1. Las cardiopatías más comunes

De acuerdo a la publicación del equipo de Torres, J., en el 2016, en nuestro país se reportan como las principales cardiopatías congénitas a la persistencia del conducto arterioso, defecto de comunicación interventricular, defecto de comunicación interauricular, conexión discordante ventrículo-arterial y tetralogía de Fallot.

La persistencia del conducto arterioso o conducto arterioso persistente (PCA) es la CC más común en nuestro país, reportándose con mayor frecuencia en infantes prematuros (IP), con una frecuencia del 33% en IP con muy bajo peso, y hasta un 65% en IP con un peso extremadamente bajo (Marconi et al., 2019).

I.2. Persistencia del conducto arterioso

I.2.1. Definición

Durante la etapa fetal, la arteria pulmonar y la aorta se encuentran comunicados mediante el conducto arterioso, por lo que este juega un papel fundamental en la circulación fetal. Al nacimiento, este conducto se cierra espontáneamente al iniciar la respiración normal; Sin embargo, en ocasiones existe una falla en el cierre fisiológico de dicha estructura y por consiguiente, el proceso no logra llevarse a cabo adecuadamente manteniendo el cortocircuito, donde la sangre fluye de izquierda a derecha; Este defecto es mejor conocido como PCA, es una cardiopatía congénita de tipo acianógena



y se asocia mayormente con RN pretérmino, incrementando la mortalidad y complicaciones como insuficiencia cardiaca, acidosis metabólica, falla renal, hemorragia intraventricular y/o pulmonar, displasia broncopulmonar, entre otras (Marconi, et al., 2019).

I.2.2. Complicaciones

Al presentarse esta patología, días después del nacimiento la resistencia vascular pulmonar (RVP) disminuye, por lo que la proporción de flujo sanguíneo aórtico que se desvía hacia la circulación pulmonar se incrementa (permeabilidad ductal), resultando en un exceso de flujo sanguíneo a los pulmones influyendo en la disminución del volumen pulmonar y la capacidad funcional residual; lo que predispone a hipertensión, congestión y edema pulmonar, así como agravamiento de la falla respiratoria; además el tiempo de ventilación mecánica se prolonga, y aumentan las necesidades de oxígeno, incrementando el riesgo de presentar enfermedad pulmonar crónica. La desviación del flujo sanguíneo de la circulación sistémica puede llegar a exceder la capacidad del aumento compensatorio del gasto cardiaco total, comprometiendo la perfusión de órganos vitales como intestino, riñón y cerebro; dónde, por ejemplo, al disminuir el flujo sanguíneo renal y esplácnico aumenta la incidencia de insuficiencia renal y enterocolitis necrosante (Benitz, 2016; Soria, 2019).

Aunque es poco frecuente, se ha reportado incidencia de endarteritis infecciosa que se define como inflamación de la túnica interna de las arterias; ésta puede manifestarse como embolia pulmonar séptica.

I.2.3. Diagnóstico

La PCA se clasifica con base en la severidad del cortocircuito, que es dependiente de su tamaño y de la relación entre el gasto pulmonar (QP) y el gasto sistémico (QS). Esta reportado que el valor de QP/QS normalmente es de 1, de 1.5:1 como pequeño, de 1.5 - 2.2:1 como moderado y mayor de 2.2:1 como grande. Los estudios de gabinete y análisis clínicos son de ayuda para clasificarla como:

- » Silente No existe soplo ni hipertensión arterial pulmonar. Es diagnosticado por ecocardiografía.



- Pequeño Presencia de un soplo continuo audible, mínimas alteraciones hemodinámicas. Por lo general asintomático.
- Moderado Existe un soplo continuo, pulsos amplios, sobrecarga en cavidades izquierdas, hipertensión arterial leve a moderada. Puede o no haber insuficiencia cardiaca leve (compensada). Se presenta intolerancia al ejercicio, disnea al esfuerzo, desarrollo ponderal anormal, además hiperactividad precordial.
- Grande Exhibe soplo continuo, pulsos amplios, sobrecarga importante en cavidades izquierdas, hipertensión arterial de moderada a severa. Se reporta insuficiencia cardiaca descompensada, con dificultades al alimentarse, deterioro del desarrollo, taquipnea, dificultad respiratoria, infección frecuente en vías respiratorias.

I.2.3.1. Estudios de Gabinete

El examen clínico detallado, la ecocardiografía y el ecocardiograma orientan al diagnóstico de PCA. Por otro lado, el electrocardiograma puede resultar normal si se trata de un cortocircuito de menor magnitud, o mostrar alteraciones si se trata de una alteración moderada; la radiografía de tórax puede o no mostrar cardiomegalia dependiendo de la gravedad de la PCA, mientras la radiografía anteroposterior de tórax llega a revelar cardiomegalia, plétora pulmonar, dilatación de la arteria pulmonar, inclusive en adultos se ha encontrado el conducto arterioso calcificado. Sin embargo, lo más recomendable es realizar la ecocardiografía modo M, bicondicional y/o Doppler color o Doppler continuo (este estudio tiene una sensibilidad del 90-95%) en sus modalidades pulsado, continuo y color para cualquier persona que sea sospechosa a presentar PCA, permitiendo confirmar el diagnóstico y establecer un tratamiento adecuado, ya que estas técnicas determinan la forma y diámetro del conducto arterioso en su extremo aórtico y pulmonar, identificar datos indirectos de la sobrecarga de volumen (crecimiento de aurícula izquierda, ventrículo izquierdo, taquicardia auricular paroxística), medir el gasto pulmonar y de la presión arterial pulmonar mediante la medición del gradiente transpulmonar a través del conducto, valorar el grado de repercusión hemodinámica y descartar lesiones asociadas. Otras técnicas también utilizadas son la resonancia magnética y cateterismo cardiaco, aunque no son comunes. (San Luis et al., 2012; IMSS, 2010).



Tabla 1. Procedimientos para cerrar el conducto arterioso.

Tratamiento	Nombre	Indicaciones	Mecanismo	Nota
Farmacológico (Marconi et al., 2019; Lu et al., 2019; Yang et al., 2013).	Ibuprofeno	Vía Oral 10mg/kg el primer día, seguido de 5mg/kg por 2 días o 10mg/kg cada 24h, por 3 días Motrin, Johnson & Johnson Pharmaceuticals Ltd	Inhibidores de COX	Tratamiento de primera línea. Menos agresivo que la indometacina
	Indometacina	Vía Intravenosa Dosis inicial: 0.2 mg/kg, 0.1 mg/kg cada 24 horas en lactantes menores de 48 h edad; Dosis inicial 0.2 mg/kg, 0.1 mg/kg cada 12 horas, seguido de 0.1 mg/kg cada 24 h en lactantes mayores de 48 h		Provoca insuficiencia renal entre otras RAM
	Acetaminofeno	Vía oral 15mg/kg cada 6 h, por 3 días Tylenol, Johnson & Johnson Pharmaceuticals Ltd.)	Inhibidor de COX de forma no significativa	Cuando hay contraindicaciones en el tx con inhibidores de COX. Indicado desde 27 SDG
Quirúrgica (Pamukco et al., 2018).	Ligadura	Consiste en hacer un pequeño corte quirúrgico en el lado izquierdo del tórax. Se liga el conducto arterial.	Se utilizan hebras de seda 2-0 o 3-0 Ti-cron y hemoclips en algunos casos	Menos costosa que el cateterismo
Cateterismo (se elegirá el dispositivo con base en el tamaño y morfología del CA)	Amplatzer® (Arévalo et al., 2017). (Figura 1)	PCA moderado y grande PCA calcificado	Dispositivo autoexpandible cilíndrico, confeccionado de una malla de nitinol. Puede o no contener material trombogénico. Se ajusta a la forma del vaso y evita la migración	Su forma asegura la colocación, previene embolización y se ajusta al ahusamiento de conductos, contribuye a la obstrucción completa gracias al poliéster que



Se introduce a través de la arteria femoral, un catéter hasta el conducto arterioso; se coloca una guía de recambio hasta el tronco pulmonar; se introduce el dispositivo.			del dispositivo posterior a su implante.	contiene; reduciendo riesgos.
	Nit-Occlud ® Coil. (Figura 2)	PCA de 2 a 5mm	Es un disco de retención forzado en forma de espiral. Garantiza una oclusión eficiente. Aleación de níquel y titanio	Es ajustable

Recientemente, la ecocardiografía tridimensional (3DE) se ha convertido en un complemento de la ecocardiografía en el manejo de pacientes que padecen alguna CC. Existen tres modalidades: volumen completo, 3D-tiempo real, y la imagen multiplanar (adquisición de dos o tres planos simultáneos); Esta permite realizar un mejor análisis al obtener información más clara sobre la anatomía y funcionalidad del corazón (Simpson et al., 2019).

I.2.4. Tratamiento

Se administran tratamientos conservadores (como: diuréticos, restricción de líquidos, ventilación mecánica, etc.), para favorecer el cierre espontáneo del CA (Marconi et al., 2019).

El objetivo del tratamiento para PCA es cerrar el conducto arterioso a través de los procedimientos mostrados en la Tabla 1.



Figura 1. Dispositivo de oclusión Amplatzer ®, URL1.



Figura 2. Dispositivo Nit-Occlud ®, URL2.



I.3. Conducto Arterioso

I.3.1 Circulación fetal

La primera descripción de la circulación fetal la realizó Galeno en el siglo II dC, donde observó <entre otras estructuras> al conducto arterioso (CA), y señaló que el CA cerraba posnatalmente. En 1628 William Harvey acuñó el término circulación fetal y negó la existencia de la circulación pulmonar en el feto. En 1938 Barcroft, Barron, Barklay, Franklin & Pricharts realizaron los primeros registros de la circulación en fetos de corderos. Dawes y colaboradores, describieron por primera vez los cambios que ocurren en la circulación fetal al nacimiento. (Vijayalakshmi et al., 2019).

La circulación fetal es muy singular y difiere de la circulación en un adulto. El embrión debe prepararse para el cambio súbito de concentración de oxígeno en la sangre a través de los pulmones en lugar de la placenta, y para esta adaptación resultan esenciales las modificaciones de dicha circulación.

Se basa en las diferentes presiones a las que la sangre oxigenada y poco oxigenada fluyen a través de las venas (y derivaciones) que desembocan en el corazón, dichas presiones están controladas por vías mecánicas y fisiológicas que regulan la resistencia vascular y la dirección del flujo de la sangre desde el corazón hasta la aurícula, siguiendo alguna de estas rutas (Garabedian et al., 2018) (Figura 3):

- Llegar al ventrículo derecho y salir a la arteria pulmonar
 - Con dirección a pulmones (Según Carlson, el 12% del flujo sanguíneo total).
 - Que se desvíe por el conducto arterioso.
- Cruzar por el foramen oval a la aurícula izquierda y pasar directo a aorta.

Al final, toda esta sangre llega a la aorta para continuar con su recorrido. Además, existe una mezcla constante de sangre con diferentes concentraciones de oxígeno que provienen del cordón umbilical y/o de la circulación sistémica del feto (Garabedian et al., 2018).

A través de dos grandes arterias umbilicales la sangre muy oxigenada llega desde la placenta hacia los órganos que más la necesitan como corazón y cerebro, y recibe la sangre menos saturada de oxígeno proveniente de la circulación sistémica del feto (Garabedian et al., 2018).

Es importante que la circulación prenatal sea capaz de adaptarse a los cambios fisiológicos que están por venir; por ejemplo, los mecanismos que influyen en la capacidad tisular para ajustar sus resistencias vasculares de acuerdo a las necesidades de oxígeno (Garabedian et al., 2018).

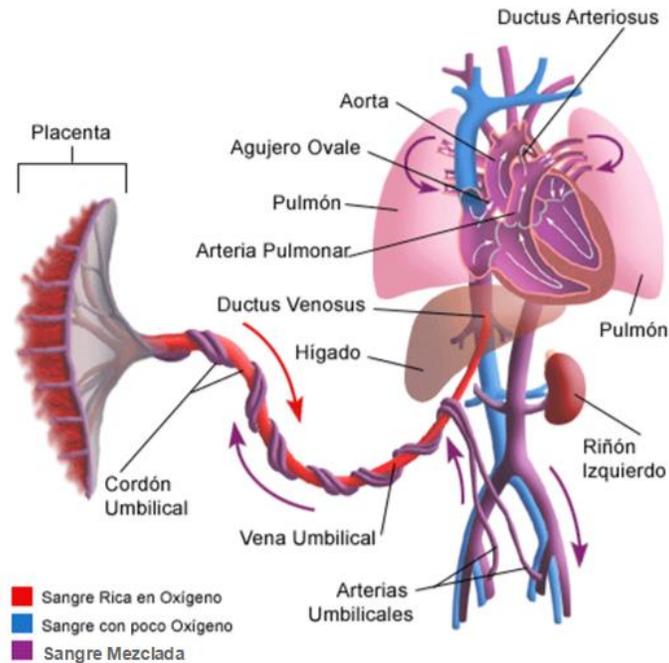


Figura 3. Circulación Fetal, URL3.

Existen tres cortocircuitos prenatales que son indispensables para mantener la circulación paralela y la distribución preferente de los flujos sanguíneos: conducto venoso, conducto arterioso y foramen oval (Garabedian et al., 2018).

I.3.2. Anatomía y Fisiología

El conducto arterioso es una estructura vascular que conecta a la aorta descendente y la pulmonar; este se encuentra permeable desde la 8^{va} semana de gestación y durante todo el desarrollo intrauterino, manteniendo 80% del gasto cardíaco fetal. Se encuentra localizado a la izquierda de la bifurcación del tronco de la arteria pulmonar y a nivel aórtico, en la unión del arco aórtico con la aorta descendente, aproximadamente a 1cm de donde surge la subclavia izquierda (San Luis et al., 2012; Delabaere et al., 2016).

La porción distal del CA se origina del sexto arco aórtico izquierdo, mientras que de la porción proximal se origina la rama izquierda de la arteria pulmonar (San Luis et al., 2012).



Este cortocircuito protege los pulmones de un flujo de sangre que supera la capacidad que tienen sus vasos durante la mayor parte de la vida intrauterina. La permeabilidad del conducto arterioso fetal se mantiene de forma activa mediante la acción de las prostaglandinas E2, parte de cuyo efecto está mediado por el óxido nítrico (Carlson et al., 2014).

I.3.3. Cierre del Conducto Arterioso

I.3.3.1. Señalización

Dicho conducto comienza a cerrarse a partir de la semana 35 a 36 de gestación. Al nacimiento durante el cierre, se forma un tejido fibroso llamado “ligamento arterioso” mediante mecanismos de vasoconstricción de las fibras elásticas de la capa media, proliferación de tejido conectivo en la capa media, disrupción de la lámina elástica interna y necrosis hística (Figura 4) (San Luis, 2012). Y debe culminar al momento del nacimiento (48 – 72 hrs), de lo contrario al pasar 3 meses extrauterinos, se considera PCA (Vijayalakshmi et al., 2019; Benitz, 2016).

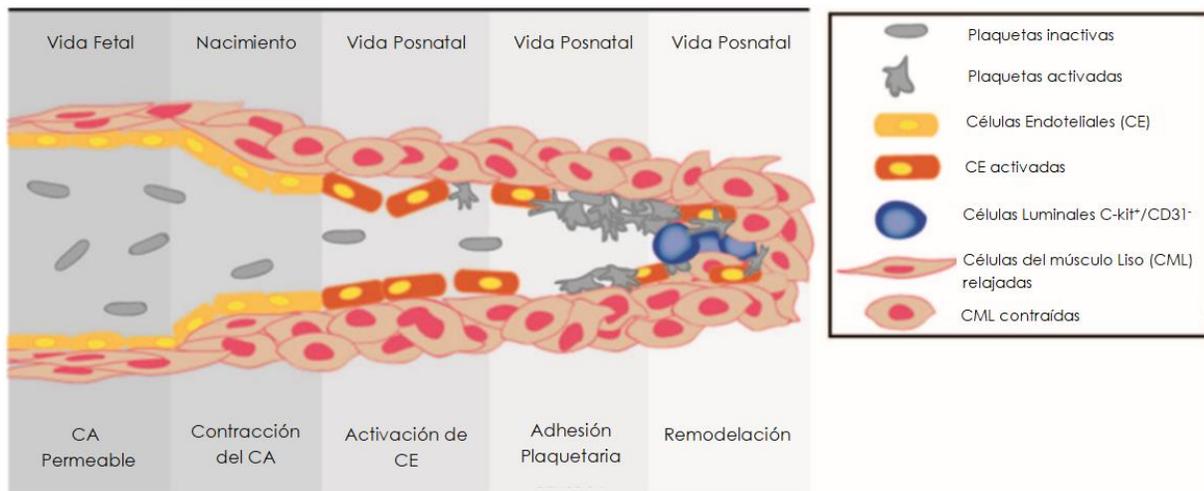


Figura 4. Cierre del Conducto arterioso.

Secuencia de eventos que contribuyen a la oclusión postnatal del CA. El aspecto luminal de la pared CA adopta un fenotipo protrombótico con activación endotelial, depósito de factor Von Willebrand y fibrina/fibrinógeno, y eventualmente desprendimiento de CE de la lámina elástica interna, lo que conduce a la exposición al colágeno. Este proceso desencadena la acumulación de plaquetas que circulan en el lumen residual de CA. El tapón de plaquetas que sella la luz residual del CA contraído y, junto con otros mecanismos, facilita posterior remodelación luminal (Modificado de Hamrick et al., 2010).



El cierre del CA es un proceso interactivo y complicado, su cierre espontáneo después del nacimiento es resultado de una equilibrada y compleja interacción entre el oxígeno, factores neurohumorales locales y circulantes y de las características especiales del músculo liso de la pared del cortocircuito (Soria, 2019). Crockett et al. (Figura 5), hace una integración y ordena los mecanismos que se llevan a cabo en el CA, abierto y durante el proceso del cierre:

Factores Moleculares que mantienen el conducto arterioso abierto in útero	Factores Moleculares que intervienen en la contracción del conducto arterioso después del nacimiento
<ul style="list-style-type: none">▶ Baja tensión de Oxígeno▶ Niveles altos de prostaglandinas en la circulación▶ Incremento Intracelular del AMPc y GMPc▶ Activación de los canales de Potasio	<ul style="list-style-type: none">▶ Alta tensión de Oxígeno▶ Niveles bajos de prostaglandinas en la circulación▶ Activación de Citocromo P₄₅₀▶ Aumento del calcio intracelular▶ Disminución intracelular del AMPc y GMPc▶ Inhibición de los canales de potasio▶ Producción de isoprostanos▶ Respuesta a Acetilcolina y Noradrenalina▶ Activación de los miembros de la familia cinasa Rho▶ Aumento de Angiotensina II

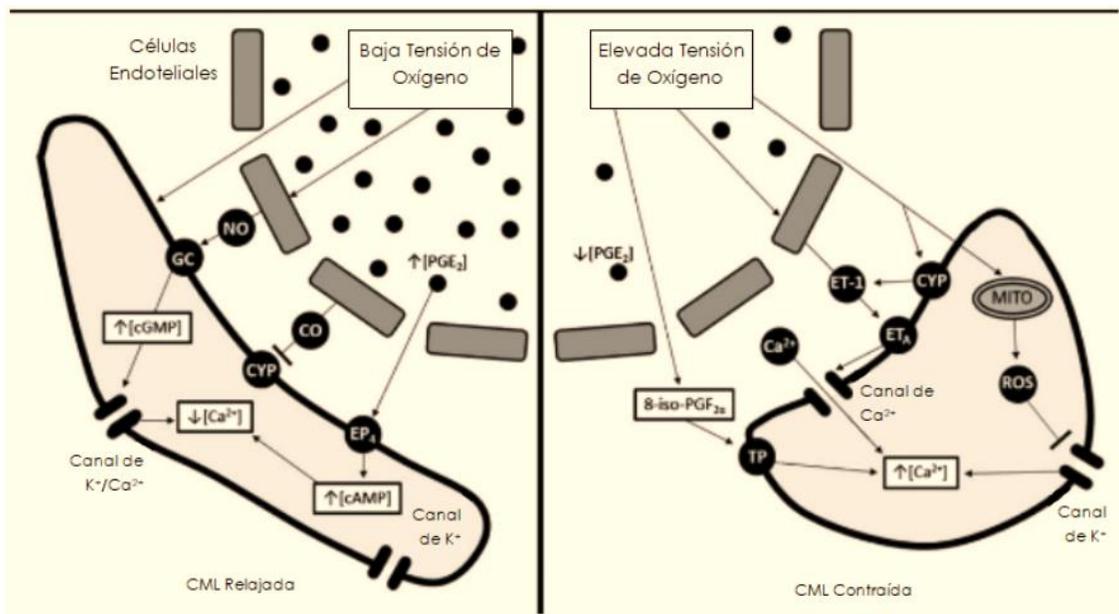


Figura 5. Mecanismos que intervienen en el CA antes y después del nacimiento.

Comparación e integración algunos mecanismos que ocurren durante la vida fetal para mantener abierto el CA y después del nacimiento para cerrar este cortocircuito (Modificado de Crockett et al., 2019).



Para el análisis práctico de dicho proceso, este proceso ha sido dividido en dos: el cierre funcional y el cierre anatómico; aunque involucran distintos factores ocurren paralelamente.

I.3.3.2. Cierre Funcional

Al nacimiento, cuando la tensión de oxígeno se eleva y los niveles de Prostaglandina E₂ disminuyen, el CA se contrae gracias a la interacción de Factores vasodilatadores (Prostaglandina E₂ (PGE₂), óxido Nítrico(NO), péptidos pancreáticos, monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrogeno (H₂S)) y Factores vasoconstrictores (detección de Oxígeno(O₂), Citocromo P450 (CYP450), Ácido retinoico, Glutamato, hipoosmolalidad, Bradiquinina y corticoesteroides) que intervienen en el tono vascular (Figura 6) (Hung et al, 2018).

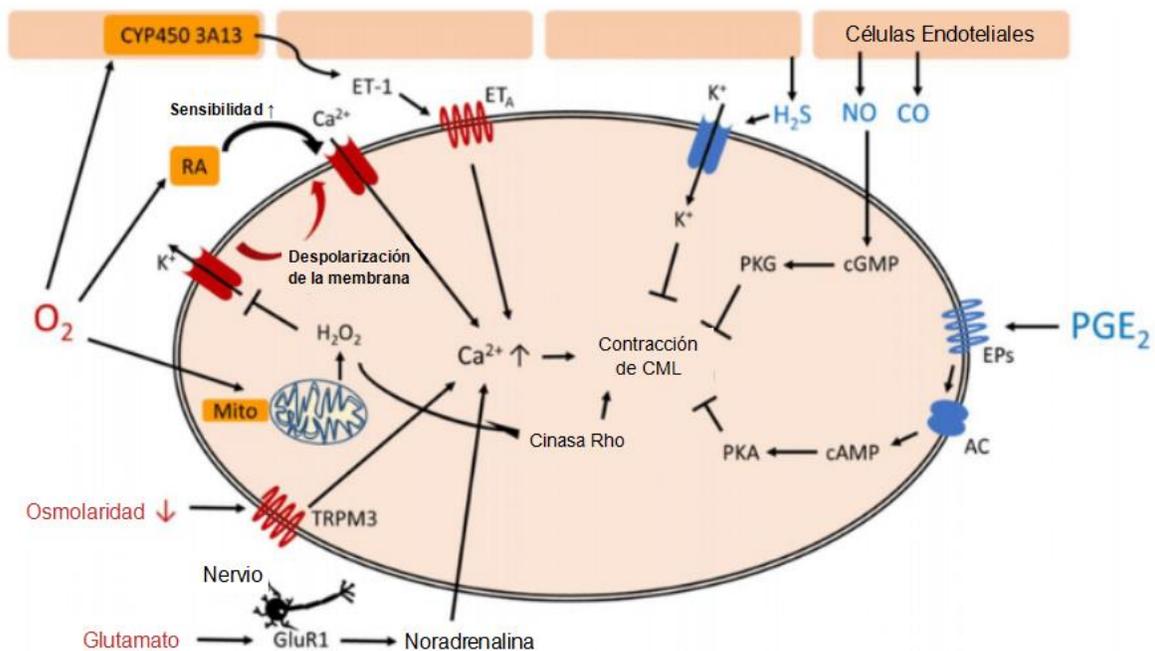


Figura 6. Señalización durante el cierre funcional del conducto arterioso.

AC: adenilciclase, cAMP: adenosin monofosfato cíclico, cGMP: guanosin monofosfato cíclico, EPs: receptores de PG₂, ET: endotelina, GluR1: subunidad 1 del receptor inotrópico de glutamato, Mito: mitocondria, PGE₂: Prostagandina E₂, PKA: Protein cinasa A, PKG: Protein Cinasa G, RA: ácido retinoico, SMC: células del musculo liso, TRPM3: Receptor potencial transitorio de melastanina 3 (Modificado de Hung et al., 2018).



I.3.3.2.1. Vasoconstricción

» Vías en las que interfiere el Oxígeno

Se han descrito diversos mecanismos como base de la vasoconstricción en respuesta a una elevada tensión de oxígeno en el CA. Estos resultan en un aumento de calcio, que a su vez provoca la vasoconstricción del CA, con excepción de la vía que involucra a la ruta de la Rho-cinasa.

El O₂ es detectado por las células del músculo liso (CML) gracias a la red dinámica mitocondrial. Por causa del O₂ que se metaboliza a través de la cadena de transporte de electrones y de la fisión mitocondrial, se lleva a cabo una reacción tipo REDOX y se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el peróxido de hidrogeno (H₂O₂); estas inhiben a los canales de potasio (K⁺) dependiente de voltaje, y a su vez provoca despolarización de la membrana. Esto activa los canales de calcio (Ca²⁺) tipo "L", incrementando concentración intracelular de este catión y resultando en contracción del músculo liso (Hung et al., 2018; Bökenkamp et al., 2010; Arboleda et al., 2017).

Recientemente, se ha concluido que la ruta de la Rho-cinasa mantiene la constricción del CA, por medio del sistema mitocondrial. Las ROS, activan la ruta de la Rho-cinasa donde se fosforila la cadena ligera de la miosina; Mediante un mecanismo de *Feedback*, se incrementa la actividad de la RHO-cinasa, lo que promueve la contracción de las CML (Hung et al., 2018; Karki et al., 2019).

Por otro lado, el CYP450 y la endotelina-1 (ET-1) participan en conjunto. En respuesta al O₂; aumentan los niveles de ET-1 que actúa vía receptor ET_A, por lo que los niveles de Ca²⁺ aumentan. Mientras, el CYP450 libera y sintetiza ET-1 (Coceani et al., 2012; Hung et al., 2018).

El ácido retinoico por otro lado, y de acuerdo a diversos autores, ha demostrado que regula la expresión de la subunidad α_{1G} de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Yokoyama, et al. 2006).

» Vías en las que no interfiere el Oxígeno

El glutamato favorece la contracción del CA mediante la producción de noradrenalina por la subunidad 1 del receptor inotrópico de glutamato (GluR1). El glutamato es el antagonista del bloqueador alfa1 del receptor adrenérgico. (Fujita et al., 2016).



El receptor de melastanina 3 (TRPM3) actúa como un sensor hipoosmótico; este tiene una expresión mayor en el CA a comparación de la aorta. La hipo-osmolaridad promueve el aumento de los niveles de calcio (Aoki et al., 2012).

La bradiquinina promueve el aumento de calcio intracelular, ya que incrementa la actividad del NO e induce la formación del factor de hiperpolarización derivado del endotelio, promoviendo la vasodilatación. Se ha demostrado que induce una respuesta bifásica, ya que a bajas concentraciones induce la relajación (receptor Bk-2), y a altas concentraciones promueve la contracción (receptor BK-1) (Bökenkamp et al., 2010; Duboscq et al., 2017).

I.3.3.2.2. Vasodilatación

» PGE₂

Es producida por la placenta y el CA en la vida intrauterina, su función es mantener el CA permeable a través de receptores como EP2, EP3 y EP4; la activación de estos receptores incrementa la producción de AMPc intracelular por la vía adenilil ciclase, e inhibe de la cadena ligera de la miosina, por lo que el CA permanece dilatado. Después del nacimiento, los niveles de PGE₂ disminuyen gracias al catabolismo pulmonar y a la remoción de la placenta. La disminución de PGE₂ se considera un mecanismo importante para el cierre del CA (Hung et al, 2018; Duboscq et al., 2017; Coceani et al., 2012).

» NO, CO y H₂S

El NO funge como vasodilatador. Este es producido por la óxido-nítrico sintetasa de las células endoteliales (eNOS) en el lumen del CA y en *vasa vasorum*, para luego interactuar con la guanilil ciclase (GC) de las CML; provocando la producción de guanosin monofosfato cíclico o GMPc y disminuyendo los niveles de Ca²⁺ (Hung et al., 2018).

Otros gases como el monóxido de carbón (CO) y el ácido sulfhídrico (H₂S) pueden actuar como vasodilatadores. El CO se sintetiza en las CML del CA mediante la enzima homooxigenasa-1 y -2. Este inhibe la formación de la ET-1 al actuar sobre el CYP450. Por otro lado, el H₂S tiene efecto sólo en algunas especies, como ratones; a bajas concentraciones induce la vasoconstricción del CA, y a concentraciones altas, promueve la vasodilatación. El mecanismo por el cual esto ocurre, no ha sido completamente dilucidado por los investigadores, aunque parece actuar directamente sobre los canales de K⁺ (Hung et al., 2018; Crockett et al., 2019).



I.3.3.3. Cierre anatómico

El cierre anatómico del CA, es un proceso bien organizado que involucra mecanismos que interactúan entre sí, como la formación de almohadillas de la íntima, migración y proliferación de las CML, producción de matriz extracelular (MEC), proliferación de células endoteliales (CE) y la interacción con células sanguíneas (Figura 7, Tabla 2).

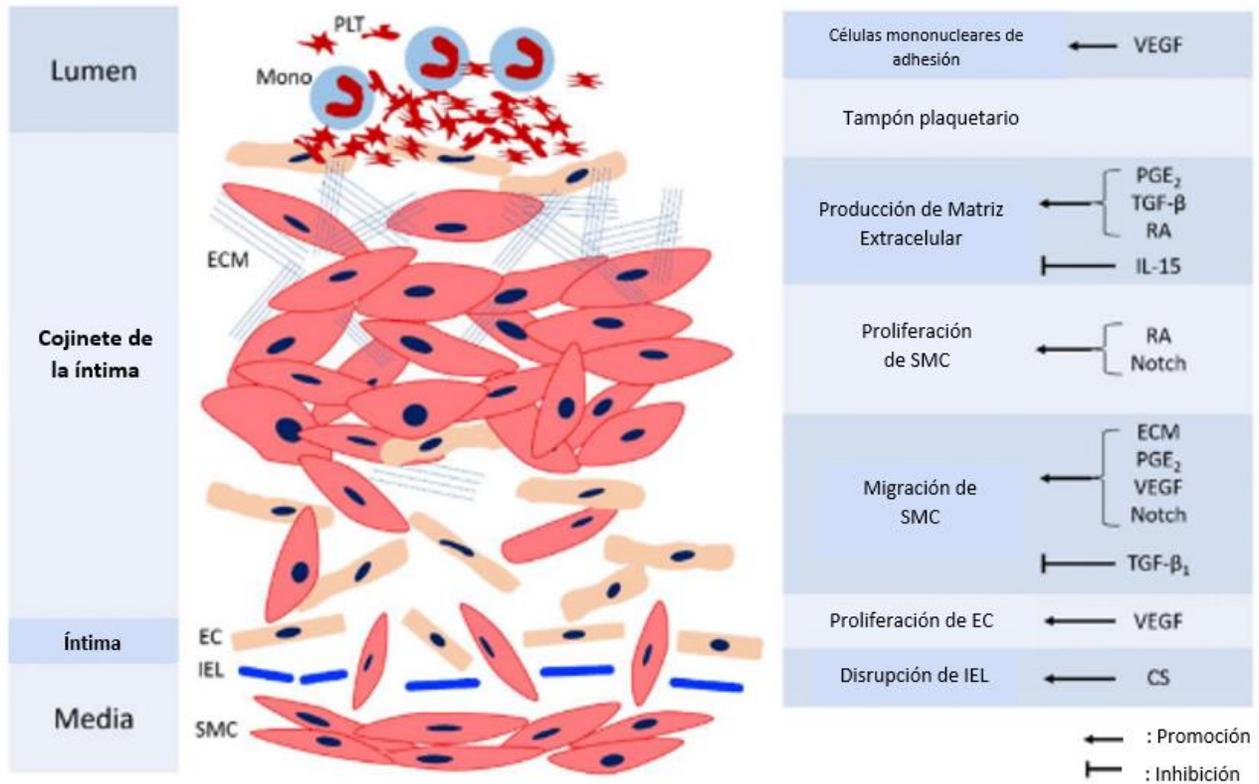


Figura 7. Cierre anatómico del CA.

CS: Condroitin sulfato, EC: células endoteliales, ECM: matriz extracelular, IEL: Lámina elástica interna, IL-15: interleucina-15, Mono: monocito, PDGF: factor derivado de crecimiento derivado de plaquetas, PGE2: prostaglandina E2, PLT: plaquetas, RA: ácido retinoico, SMC: células del musculo liso (por sus siglas en inglés), TGF-B: Factor de crecimiento transformador-B. VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (Modificado de Hung et al., 2018).



Tabla 2. Factores que intervienen en el cierre anatómico del conducto arterioso (Hung et al., 2018).

Células	Mecanismos	Factores	Efectos
Células del Músculo Liso (SMCs)	Migración	PGE2	+
		TGF-β1	-
Notch		+	
Fibronectina y hialuronano		+	
VEGF		+	
	Proliferación	Ácido retinoico	+
		Notch	+
Producción de Matriz Extra Celular (ECM)	Hialuronano	Ácido retinoico	+
		TGF-β	+
		PGE2	+
		IL-15	-
	Fibronectina	Ácido Retinoico	+
	Sulfato de Condroitina	TGF-β	+
	Elastina	PGE ₂	-
		Oxígeno	-
Células Endoteliales (EC)	Proliferación	VEGF	+
Lámina Elástica interna (IEL)	Disrupción	Sulfato De Condroitina	+
Células Sanguíneas	Células mononucleares de adhesión	VEGF	+
	Tampón de Plaquetas	PDGF	+

I.3.3.3.1. Proliferación y Migración de CML

La remodelación del CA comienza con la separación de CE de la lámina elástica interna (LEI), originando un espacio subendotelial a donde las CML indiferenciadas migran y proliferan. Este proceso se lleva a cabo gracias a los siguientes factores:

» PGE₂

Induce la migración de CML a través de la ruta de la proteína de intercambio activada por cAMP (Epac, por sus siglas en inglés). La activación en serie de la señalización PGE₂-EP4-cAMP-Epac, no altera la proliferación de CML ni la producción de ácido hialurónico (Lezoualc'h et al., 2016)



»- Ácido Retinoico

Promueve a las CML y la proliferación de MEC. Estimula el crecimiento de las CML gracias al aumento de la expresión del antígeno nuclear celular y disminución de la apoptosis. Diversos estudios, han demostrado que la administración materna de vitamina A, incrementa la producción de ácido retinoico, promoviendo el engrosamiento de la íntima (Wu et al., 2008; Yokoyama et al, 2007).

»- TGF- β_1

Es una molécula de anclaje del citoesqueleto de las CML a la MEC, y reprime la migración de estas células; además incrementa la formación de la placa focal por medio de la unión de integrinas con el citoesqueleto, para mantener la tensión necesaria para que la contracción del CA sea sostenida (Hung et al., 2018).

»- Señalización Notch

El sistema Notch es altamente expresando en la vascularización humana y regula el comportamiento celular, así como la proliferación, diferenciación, migración y angiogénesis. La pérdida de los receptores Notch en el CA está asociada con la regulación negativa de la expresión génica de CML contráctiles, contribuyendo al desarrollo de PCA (Hung et al, 2018; Krebs et al., 2016)

I.3.3.3.2. Matriz extracelular

»- Ácido hialurónico

Promueve la migración de CML; su síntesis es regulada por otros factores como TGF-B, PGE2 e interleucina-15 (IL-15). El hialuronano es regulado por PGE2, por la ruta EP4-cAMP-PKA (Hung et al., 2018).

»- Elastina

La pérdida de la proteína de unión a elastina y la producción de los péptidos de elastina, intensifican la migración de las CML. La elastina es regulada por la PGE2 (inhibe la elastogénesis por vía del receptor EP4) y el oxígeno (que reduce la secreción de elastina en las CML) (Hsieh et al., 2014).

»- Fibronectina

Las CML secretan fibronectina para promover su migración en el endotelio durante el proceso de la formación de cojinetes de la íntima (Hamrick et al., 2010).



»- Sulfato de Condroitina

Actúa como promotor de la remodelación del conducto arterioso ya que le proporciona estabilidad al ácido hialurónico y deteriora la estructura de las fibras de elastina. Además, promueve la migración de CML a través de la LEI de forma indirecta, al inducir su desprendimiento de la elastina y aumentar la síntesis de fibronectina (Hung et al., 2018).

I.3.3.3.3. Células endoteliales

Las CE se separan de la LEI durante el proceso de remodelación del CA, formando el espacio subendotelial para la migración de las CML y CE. La migración de las CE es inducida por las integrinas y el factor de crecimiento de las células endoteliales vasculares (VEGF por sus siglas en inglés).

»- Integrinas

Las CE y las CML experimentan un aumento de integrinas durante la formación íntima de cojinetes. En pacientes pretérmino con PCA, se ha encontrado una regulación negativa en la expresión de integrinas (Shelton et al., 2014).

»- VEGF

Es un factor de crecimiento inducido por hipoxia; estimula la proliferación y migración de las CE, así como las CML. Clyman propuso en 1999, que la vasoconstricción inicial causa una pérdida del flujo sanguíneo laminal, produciendo consecuentemente una zona hipóxica en la capa muscular media del CA (Hung et al., 2018).

I.3.3.3.4. Interacción de células sanguíneas

Las células mononucleares son activadas por la respuesta inflamatoria inducida por la isquemia de la pared vascular; después de la constricción del CA, los monocitos y algunos macrófagos se adhieren al lumen, el grado de esta adhesión celular se relaciona con la extensión de los cojinetes. Además, la acumulación de plaquetas forma un tapón, que sella la luz residual del CA contraído (Hung et al., 2018; Hamrick et al., 2010).



I.3.4. Regulación Génica

Al tratarse de un proceso complicado, el cierre del CA se encuentra constituido por diversos mecanismos que, a su vez son regulados por una gran variedad de genes, tal y como se muestra en la Tabla 3 (Waleh et al., 2015).

Tabla 3. Genes que se encuentran asociados con el cierre del conducto arterioso, modificado de Waleh et al.

Acción\Mecanismo en el que interfiere	Genes involucrados
Señalización Ca ²⁺	<i>CACNA1G/Cav3.1</i> , <i>ATP2A3/SERCA</i> , <i>CACNA1C/CaV1.2</i> , <i>CACNB2/Cavβ2</i> , <i>RHOB</i> , <i>ROCK1</i>
Canales de K ⁺	<i>ABCC9/SUR2B</i> , <i>KCNA2/Kv1.2</i> , <i>KCNB1/Kv2.1</i> , <i>KCNS3/Kv9.3</i> , <i>KCNJ8/Kir6.1</i> , <i>KCNA5/Kv1.5</i>
Proteínas contráctiles	<i>ACTA2</i> , <i>CNN1/Calp</i> , <i>MYH11/SM1</i> , <i>MYH11/SM2</i> , <i>MYLK</i> , <i>MYOCD/mio</i> , <i>TPM1/Trop</i>
Señalización de la Endotelina	<i>EDNRA/EtA-rec</i> , <i>EDNRB/EtB-rec</i> , <i>ECE1</i>
Señalización de prostaglandinas	<i>CYP8A/PTGIS</i> , <i>PTGER4/EP4</i> , <i>PTGS1/COX1</i> , <i>SLCO2A/PG trans</i> , <i>PDE1B</i> , <i>PDE3B</i> , <i>PTGS2/COX2</i> , <i>PDE4D</i>
Señalización de Oxido Nítrico	<i>NOS3/Enos</i> , <i>PDE5A</i>
Inflamación y remodelación	<i>AGTR2</i> , <i>EPAS1/HIF2α</i> , <i>SMARCA4/BRG1</i> , <i>TGFB1/TGFβ1</i> , <i>AGTR1</i> , <i>BMP4</i> , <i>IGF1</i> , <i>ILK</i> , <i>JAG1</i> , <i>MAPK1/ERK2</i> , <i>PDGFB/PDGF-B cad</i> , <i>TFAP2B/TFAP2β</i> , <i>FN1</i> , <i>PTPN11</i> , <i>TRAF1</i>

Lewis, menciona a síndromes dismórficos de un solo gen, asociados con PCA como: *SMADIP1* (Mowat-Wilson), *PTPN11* (Noonan), *TBX5* (Holt-Oram), *FLNA* (heterotopia ventricular), *TFAP2β* (Chaar), entre otros.



Por mencionar algunos genes, existe una gran variedad que codifican las proteínas miofibrilares y los que se asocian con la diferenciación muscular, por ejemplo, el gen *MYH11* que codifica la cadena pesada de miosina; o *RHOB*, que codifica para RhoB GTPasa (Stoller et al., 2012).

Por otro lado, los canales iónicos son el resultado de la expresión de genes como *TASK-1* y *ABCC9* (por mencionar algunos), que son esenciales para la formación y el funcionamiento adecuado del canal de K^+ ; otro ejemplo son las bombas de Na^+/K^+ donde interfieren genes como *ATP1B1* entre muchos otros. El gen *EDN1* codifica para la endotelina-1, que tiene una expresión significativa en el CA; así como se ha encontrado un incremento en la expresión de *AGTR1* (receptor de angiotensina II), en neonatos. En la ruta de las PG, se han estudiado genes implicados como: *PTGER4*, *PTGS1*, *PTGS2* (por ejemplo). Se han encontrado niveles elevados de su traducción horas después del nacimiento (Stoller et al., 2012).

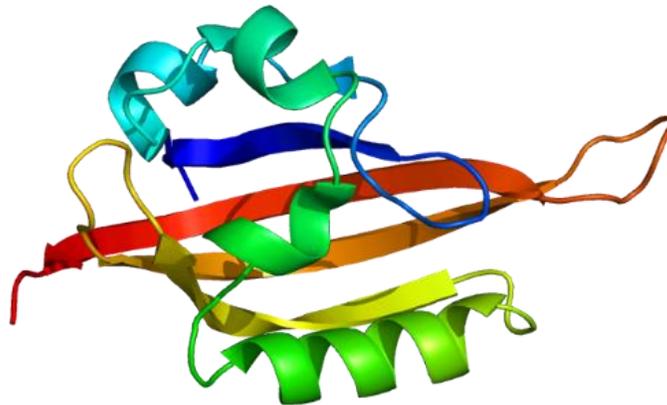


Figura 8. Estructura "CRYSTAL" de la proteína EPAS1.

Sin embargo, uno de los genes más estudiados es *TFAP2 β* , que se encuentra asociado con PCA no sindrómica (Stoller, 2012). Este gen es mencionado por Hsieh y otros autores, como uno de los factores de transcripción que juegan un rol importante en el cierre del CA. Se han encontrado polimorfismos relacionados con la falla del tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos, al igual que en *EPAS1* (otro importante factor de transcripción) (Dagle et al., 2009).

Equipos de trabajo como el de Ivey (2008), Hajj (2012), y Dagle (2009), han profundizado en el estudio de la asociación de *EPAS1* con la PCA (reportando polimorfismos), concluyendo que el papel



de este gen incluye el refinamiento del potencial de transactivación de *TFAP2β* mediante la regulación negativa de la unión de ADN a este factor de transcripción (a través del dominio bHLH/PAS); además de ser un posible regulador transcripcional de ET-1 (durante el desarrollo en el músculo liso ductal) y al mismo tiempo regula su expresión en células del músculo liso vascular.

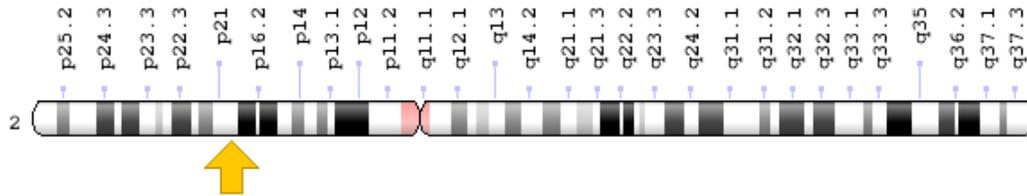


Figura 9. Ubicación del gen *EPAS1* en el cromosoma 2, URL4.

I.4. *EPAS1*

También conocido como *MOP2*, *PAS2D*, *BHLHE73*, *ECYT4*, *HLF* y *HIF2α*, es el gen que codifica el factor inducible a hipoxia 2α (*HIF2α*). Este factor de transcripción está involucrado en la inducción genes regulados por el Oxígeno; su expresión aumenta a medida que los niveles de oxígeno disminuyen (Figura 8).

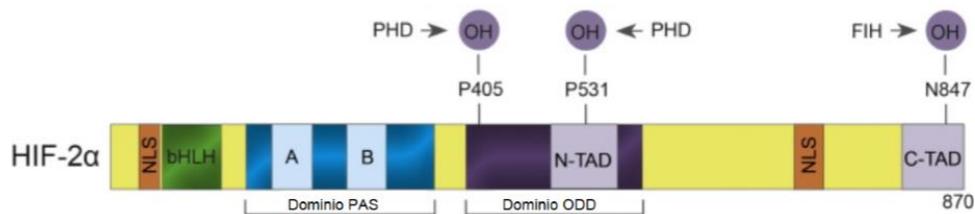


Figura 10. Dominios específicos de la proteína *EPAS1* (Modificado de Wigerup et al., 2016).

I.4.1. Antecedentes

Este gen se ubica en la banda 21 del brazo corto del cromosoma 2 (2p21) (Figura 9). De acuerdo con la plataforma GenBank, UniProt y GenAtlas, contiene un total de 89.3 kb (89,300 pb) de las cuales solo 5148, se transcriben. Consta de 16 exones, codificando una proteína formada por 870 aminoácidos (a.a.) (Figura 10).



De acuerdo con la base de datos UniProt®, EPAS1 forma heterodímeros con ARNT que se unen en la secuencia de ADN 5'-RCGTG-3' (en el promotor) (Figura 11), en los elementos de respuesta hipoxia (HRE, por sus siglas en inglés), de acuerdo con Downes et al. (2018), EPAS1 regula aproximadamente 1,454 genes; uno de ellos es el factor de crecimiento vascular endotelial, conocido como VEGF por lo que se encuentra implicado en el desarrollo de los vasos sanguíneos y del sistema tubular pulmonar. Por lo que EPAS1 está asociada a procesos como la angiogénesis, la remodelación de vasos sanguíneos, maduración celular, desarrollo de la placenta y pulmones, por mencionar algunas funciones. Por otro lado, a nivel molecular actúa como ADN vinculante con la acetiltransferasa y otros factores de transcripción, es activador y forma heterodímeros.

De acuerdo a GenAtlas y GenBank, se expresa en la mayoría de los tejidos; sin embargo, se han reportado niveles elevados en células endoteliales de placenta, pulmón, hígado y corazón.

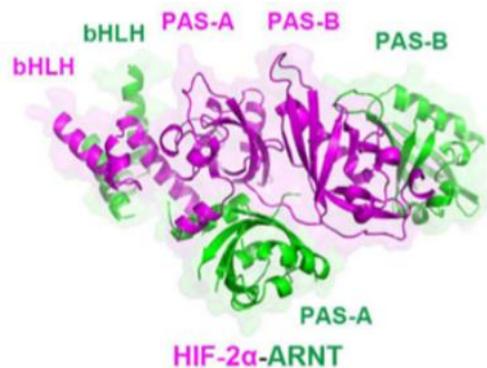


Figura 11. Estructura del factor de transcripción *EPAS1* como heterodímero con ARNT, Modificado de Wu et al., 2016.

I.4.2. Familia dominio PAS/ bHLH

La subunidad 1 de la proteína PAS que se expresa en el endotelio (EPAS1, por sus siglas en inglés), pertenece a un grupo de factores de transcripción del dominio basic-helix-loop-helix (bHLH) o PAS (PER-ARNT-SIM), presentes en animales y plantas; este dominio consta de dos motivos alfa altamente conservados. Los miembros de esta familia permiten una respuesta hipóxica rápida sin la necesidad



de sintetizar proteínas de novo, a través de continua transcripción y traducción de los factores HIF α (HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α), seguidos de una rápida degradación a través de mecanismos como la ubiquitinación. Sin embargo, cuando la tensión de oxígeno desciende, este proceso se inhibe y los HIF α s se estabilizan, promoviendo su heterodimerización y así, activar la expresión de otros genes (Figura 12). Esta familia además de estar regulados por la metilación dependiente de oxígeno, son regulados post-traduccionalmente por modificaciones en residuos alterando su actividad (Tian et al., 1996; Tian et al., 2019; Downes et al., 2018).

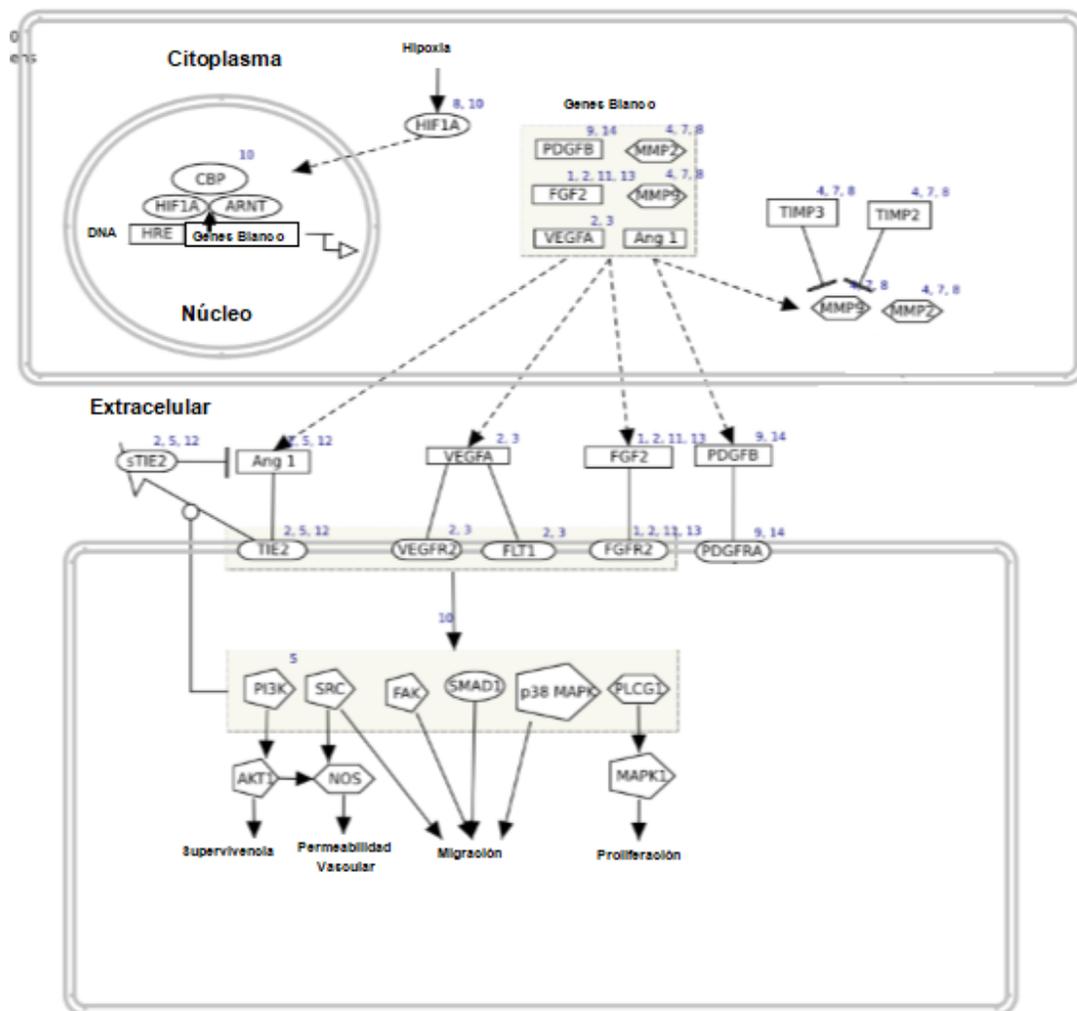


Figura 12. Ruta de Señalización de los genes HIF α . Modificado de wikipeathways, URL5.



II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente, las cardiopatías son la principal causa congénita de muerte reportada en neonatos a nivel mundial y en México, siendo la PCA una de las más frecuentes; sin embargo, al ser un padecimiento de tipo multifactorial no se ha profundizado en el análisis de todos los posibles factores genéticos, dentro de los cuales se encuentra *EPAS1*, del que autores como Ivey (2008), Dagle (2009), Bökenkamp (2010) y Hajj (2012), han descrito variantes en pacientes que presentan dicha cardiopatía. Este factor de transcripción activa a una gran variedad de genes en respuesta a señales hipóxicas y se encuentra implicado en la angiogénesis y en la remodelación de vasos sanguíneos que son mecanismos involucrados en el cierre del conducto arterioso.



III. JUSTIFICACIÓN

La PCA es una cardiopatía que puede provocar complicaciones graves en los recién nacidos y en la etapa adulta, por lo que resulta de suma importancia estudiar los mecanismos involucrados en su desarrollo.

Aunque se trata de un padecimiento de origen multifactorial, la consideración de factores moleculares involucrados con esta afección (a su vez referida con una compleja señalización), tal como *EPAS1* que, al ser sensible a variaciones en el nivel de oxígeno se encuentra estrechamente relacionado con el cierre del CA, permitiría ampliar el panorama etiopatogénico de dicha enfermedad.

Pese a que la PCA ha sido estudiada, son pocos los casos con recurrencia familiar y no sindrómicos reportados, por lo que el análisis de casos familiares brinda la oportunidad para indagar en el factor genético que puede estar relacionado con este padecimiento.

Es por ello, que en este trabajo se planteó un estudio exploratorio de búsqueda de variantes en el gen *EPAS1* a través del análisis por HRM y secuenciación capilar de toda la región exónica del gen, empleando como modelo el análisis de 2 casos familiares. Los resultados obtenidos permitirán aportar información sobre la relación de este gen con la presencia de PCA no sindrómica, y proponer la búsqueda de las variantes encontradas en un mayor número de casos para así evaluar su potencial como posibles marcadores biológicos y/o blancos terapéuticos de la enfermedad.



IV. HIPÓTESIS

Sí el gen *EPAS1* está implicado en procesos claves para el cierre del conducto arterioso, entonces se encontrarán variantes genéticas en dicho gen que afecten su funcionamiento o estructura en los casos familiares de PCA.



V. OBJETIVOS

General

Analizar variantes en la secuencia genética de *EPAS1* para establecer una posible relación con PCA no sindrómica en casos de recurrencia familiar.

Particulares

- Analizar los exones de *EPAS1* mediante HRMA, PCR punto final y Secuenciación de Sanger.
- Identificar variantes y su impacto en las secuencias mediante análisis bioinformático.
- Determinar si existe una relación entre las variantes encontradas y el desarrollo de PCA.



VI. METODOLOGÍA

Las muestras utilizadas fueron recolectadas previamente, del mismo modo el proceso de extracción de ADN genómico y su cuantificación se realizó tiempo atrás. Se mantuvieron almacenadas a -20°C hasta su uso. Las secuencias de los cebadores o *primers* utilizados para HRMA y PCR, se muestran en el anexo 1.

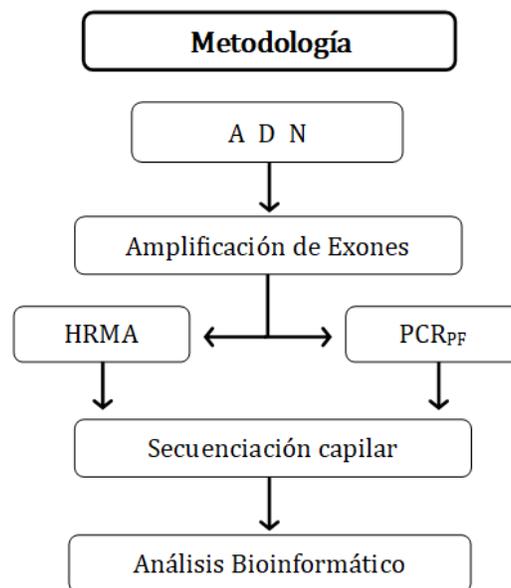


Figura 13. Esquema general de la metodología empleada.

VI.1. Amplificación de los exones

» HRMA

Esta técnica permite identificar variantes de un sólo nucleótido (también conocidos como SNP) en el ADN y de esta forma agrupar las secuencias en clusters basándose en la longitud, contenido GC y complementariedad de las bases. Está fundamentada en la PCR tiempo real, y posibilita detectar variaciones en la secuencia al medir los cambios en la hibridación de ADN bicatenario (Tylor, 2009).

Consiste en la amplificación de una región específica en presencia de un fluoróforo intercalante, que se activa al unirse a ADN bicatenario, posteriormente es sometido a un aumento gradual de la temperatura; a medida que el ADN es desnaturalizado, la fluorescencia desciende. Este cambio en la fluorescencia es medido y con ello se genera la curva característica de "melting".



La reacción fue montada de acuerdo a las indicaciones del kit de Precision Melt Supermix™ de Bio-Rad® (tabla 4). Cada muestra, así como los controles se analizaron por duplicado.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes correspondientes para el análisis por HRMA.

REACTIVO	VOLUMEN (μl)
MasterMix	6.25
Primer Forward [20 pmol/μl]	1.25
Primer Reverse [20 pmol/μl]	1.25
H ₂ O	1.75
ADN [25 ng/μl]	2.00
Volumen Final de Reacción	12.5

Para continuar, se utilizó el equipo CFX96 -también de Bio-Rad®, mediante el programa de amplificación y desnaturalización indicado (Figura 14).

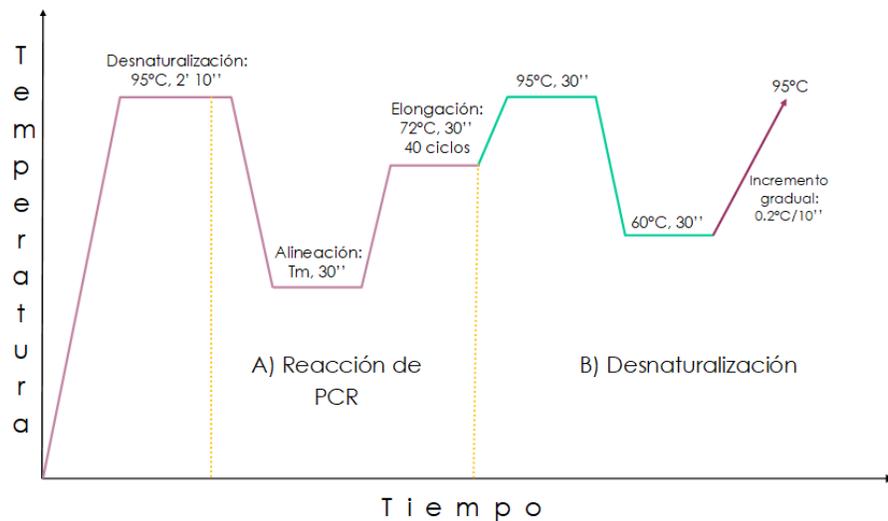


Figura 14. Programa de amplificación y desnaturalización utilizado para el ensayo de HRM.

A) Reacción de PCR (amplificación), B) Desnaturalización mediante un aumento gradual de la temperatura (0.2°C cada 10 segundos), en esta etapa se midió la señal emitida por los fluoróforos.



Posteriormente se analizan los archivos obtenidos mediante el software Precision Melt Analysis® Software v1.3 de Bio-Rad®; donde se logran observar los distintos clusters en los que las muestras han sido agrupadas. Se procedió a realizar PCR de secuenciación de las dos muestras con el porcentaje de confiabilidad más alto encontrados en cada cluster.

»- PCR punto final

Se realizó la amplificación de los exones que no fue posible amplificar por HRMA, como es indicado por el kit HotStarTaq® MasterMix de QIAGEN (Tabla 5), mediante el programa e indicaciones que sugiere el fabricante (Figura 15). Sólo para el exón 1, se utilizó el reactivo 7-Deaza-2'-deoxyguanosina (Tabla 6).

Tabla 5. Reactivos y volúmenes para la amplificación por PCR punto final.

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
HotStarTaq	6.25
Primer Forward [10 pmol/µl]	1.25
Primer Reverse [10 pmol/µl]	1.25
H ₂ O	1.75
ADN [25 ηg/µl]	2.00
Volumen Final de Reacción	12.5

Tabla 6. Reactivos y volúmenes para la amplificación por PCR punto final con 7-Deaza-2'-deoxyguanosina.

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
HotStarTaq	12.5
Primer Forward [10 pmol/µl]	2.50
Primer Reverse [10 pmol/µl]	2.50
H ₂ O	2.50
ADN [25 ηg/µl]	4.00
7-Deaza [2.5 pmol/µl]	1.00
Volumen Final de Reacción	12.5

Para comprobar si la amplificación se había llevado a cabo correctamente, los productos de reacción se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TAE 1x.

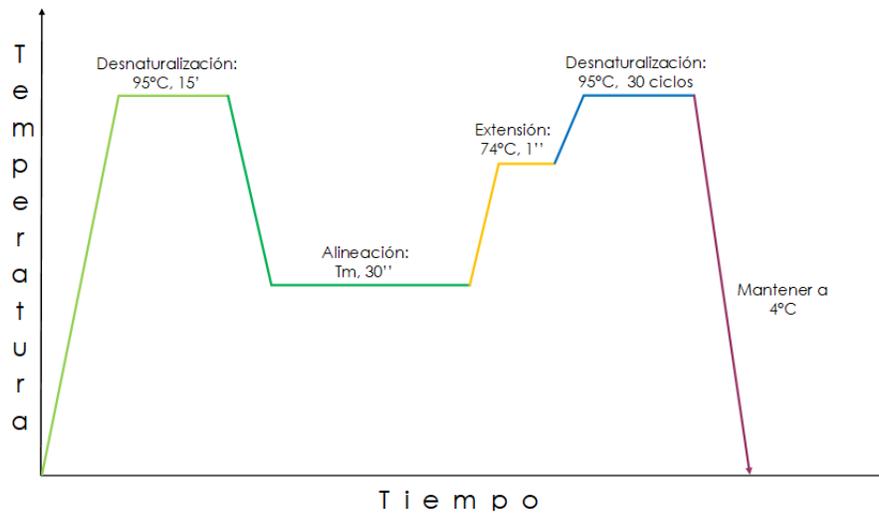


Figura 15. Programa utilizado para la PCR punto final.

VI.2. Purificación Enzimática

Se busca eliminar las impurezas (*primers* y dNTPs) en los productos de reacción resultantes del HRMA y de la PCR punto final; por lo que fueron purificados con la exonucleasa ExoSAP-IT® (USB Corporation) (Tabla 7), siguiendo las indicaciones del fabricante (Figura 16).

Tabla 7. Reactivos y volúmenes para la reacción de purificación.

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
Producto de PCR o HRM	2.00
H ₂ O	4.00
ExoSAP-IT	1.00
Volumen Final de Reacción	7

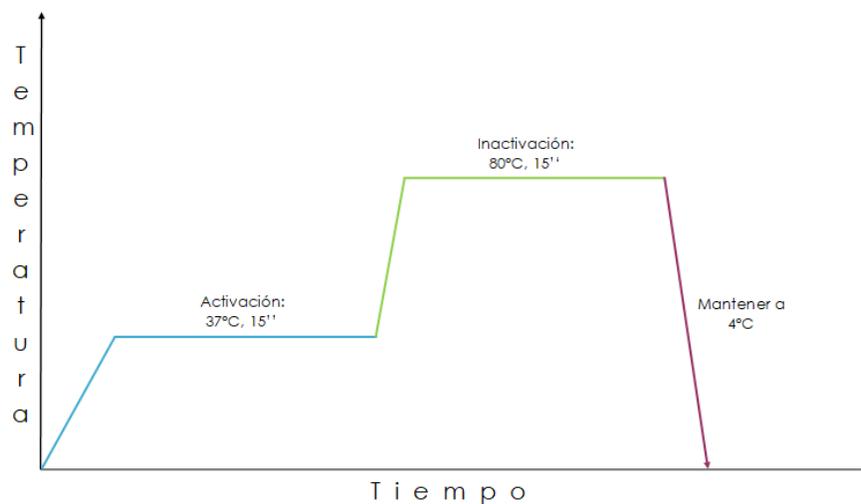


Figura 16. Programa utilizado para purificación con exonucleasa.

VI.3. Reacción de Secuenciación

Posterior a la purificación, se llevó a cabo la PCR de secuenciación, que se realizó con el kit BigDye® v3.1 Terminator Sequencing Cycle de Applied Biosystem (Tabla 8), repitiendo el programa (Figura 17) por 40 ciclos.

Tabla 8. Reactivos y volúmenes para PCR de secuencia.

REACTIVO	VOLUMEN (µl)
Producto purificado con ExoSAP-IT	7.00
BigDye® 3.1	2.00
Primer Forward o reverse [3.2 pM]	1.00
ddH ₂ O	7.00
Buffer de reacción	3.00
Volumen Final de Reacción	20.0

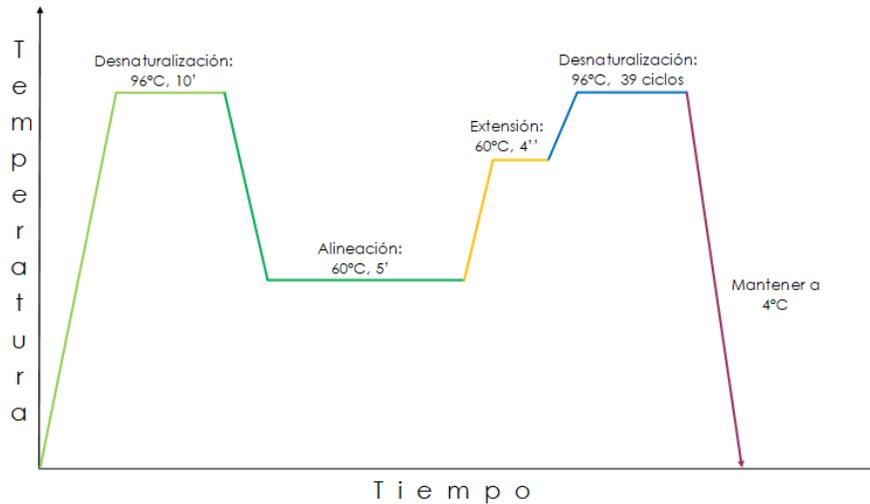


Figura 17. Programa utilizado para la PCR de secuencia.

VI.4. Purificación en columna

Para eliminar los dNTPs que no se incorporaron en la PCR de secuencia, el producto obtenido se filtra a través de columnas de sefarosa del kit Dye Ex 2.0 spin® de QIAGEN.

VI.5. Secado y Rehidratación

Los productos purificados se deshidrataron totalmente por medio de un desecador rotatorio y con vacío, para posteriormente hidratarlas con formamida, con el fin de prevenir la evaporación del ADN durante el proceso de secuenciación.

VI.6. Secuenciación de Sanger

Para desnaturalizar el ADN y evitar su renaturalización, los productos fueron sometidos a un choque térmico, llevándolos a una temperatura de 96°C durante 5 minutos, y posteriormente fueron colocados en un cooler que se encontraba a -20°C.

La secuenciación se llevó a cabo en el equipo 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, utilizado el polímero POP7 del mismo fabricante.



VI.7. Análisis Bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con los electroferogramas resultantes para comprobar que la base fue correctamente asignada por el equipo, mediante el programa BioEdit v.7.0.5.

En seguida, las secuencias depuradas fueron evaluadas por medio de Blastn (Basic Local Alignment Search Tool, nucleotide) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (URL6), con el objetivo de buscar variantes en el gen *EPAS1* al alinearlas con la secuencia consenso del gen estudiado.

Para comprobar si los polimorfismos encontrados habían sido reportados previamente por otros autores, fueron examinados con el software Database of Single Nucleotide Polymorphism (dbSNP) del NCBI (URL7).

Con el fin de determinar si existe un efecto de las variantes en la estructura proteica, se realizó un análisis con la herramienta Mutalyzer 2.0.29 (URL8), que clasifica a la variante analizada como sinónimas o no sinónima.

Posteriormente, el posible impacto de las variantes no sinónimas fue estimado mediante la aplicación PolyPhen-2 (URL9), que predice si el cambio encontrado genera una alteración patogénica o benigna en la proteína; Por otro lado las variantes sinónimas fueron evaluadas mediante el programa Human Splicing Finder 3.0 (URL10), que integra matrices de detección propias y externas de sitios de splicing, puntos de ramificación, secuencias reguladoras de splicing, etc. detectando ruptura de sitios aceptor y donador de splicing canónicos, creación de sitios donadores y aceptores alternativos, ruptura del punto de ramificación, creación de silenciadores (ESS) y eliminación de potenciadores (ESE, por sus siglas en inglés).

Además, se utilizó RNAfold (URL11) para determinar si las alteraciones restantes tenían algún impacto en la estructura secundaria del ARNm, al comparar los diferentes posibles plegamientos obtenidos mediante el análisis de la secuencia consenso y de la secuencia que contenía la alteración.



VII. RESULTADOS

VII.1. Búsqueda de variantes por HRMA

Se analizaron los exones 6, 8, 10, 11, 12, 13 y 15 de *EPAS1* en los miembros de ambas familias, ya que durante la estandarización de esta técnica fueron los que, de un total de 16, se obtuvo una amplificación adecuada.

Con ayuda de las curvas de desnaturalización normalizadas proporcionadas por el software (Figura 18), se logró inferir si las muestras analizadas contenían variantes al compararse con muestras control, ya que esta herramienta asocia a las muestras en grupos o *clusters* con base en los patrones que sus secuencias sigan.

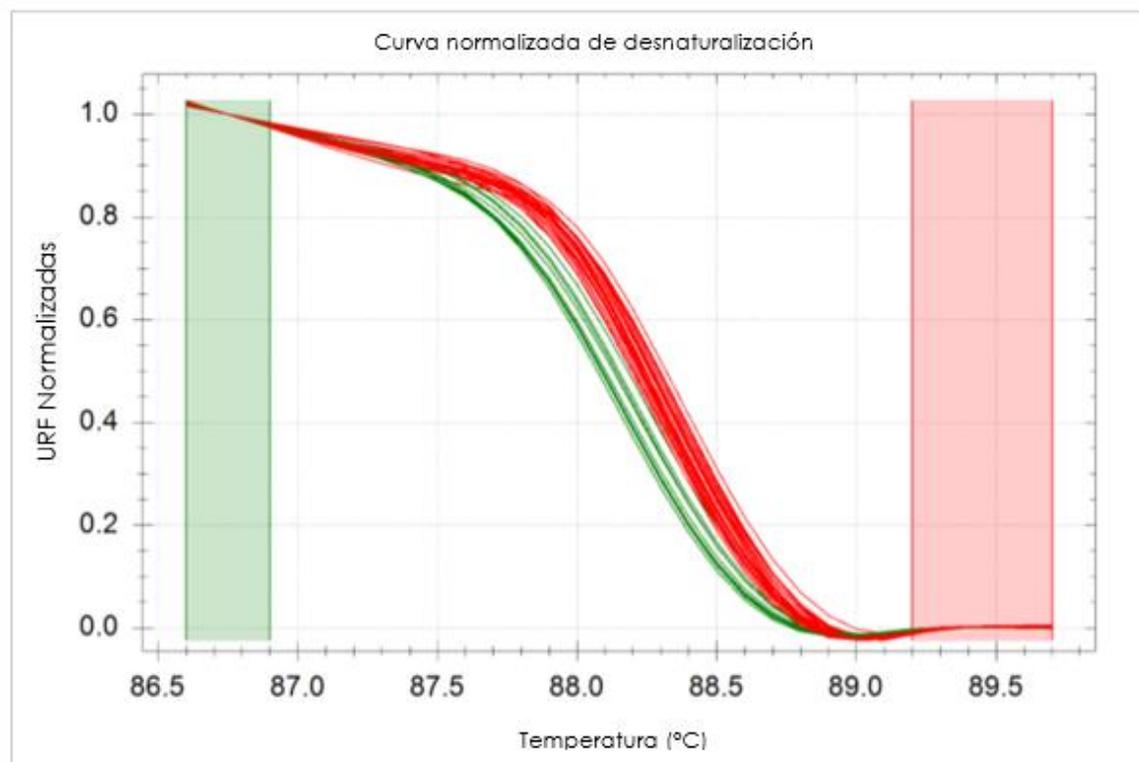


Figura 18. Curva Normalizada de Melting.

Ejemplo de la Curva Normalizada de melting obtenida del Exón 12, se pueden observar dos clusters diferentes.



Posteriormente, fueron secuenciadas dos muestras representativas de cada cluster, con base en el porcentaje de confianza proporcionado por el mismo programa (Tabla 9).

Tabla 9. Clusters identificados por el software de HRMA.

Exón	Clusters identificados
6	1
8	1
11	2
12	2
13	1
15	1

VII.2. Búsqueda de variantes por PCR punto final

Los exones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 10, 14 y 16 de cada muestra problema, fueron amplificados mediante PCR punto final, y por medio de un gel de agarosa al 1.5% (Figura 19) se corroboró su amplificación.

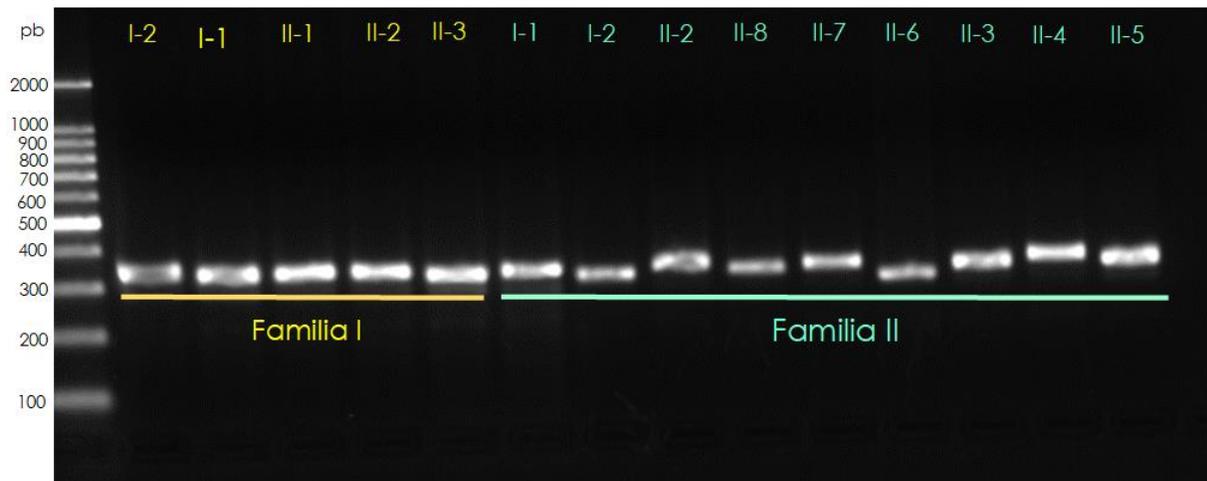


Figura 19. Resultado de la electroforesis en el Gel de agarosa 1.5%.

En el ejemplo se muestra la amplificación del exón 16 de *EPAS1* para los miembros de ambas familias.



VII.3. Secuenciación

Una vez comprobada la amplificación adecuada de los exones por PCR punto final, y haber seleccionado las muestras de HRMA, los amplicones fueron sometidos a secuenciación capilar, obteniendo sus correspondientes electroferogramas (Figura 20) y secuencias en formato FASTA, para así comenzar con la asociación entre el fenotipo y el genotipo de los sujetos estudiados (Tabla 10).

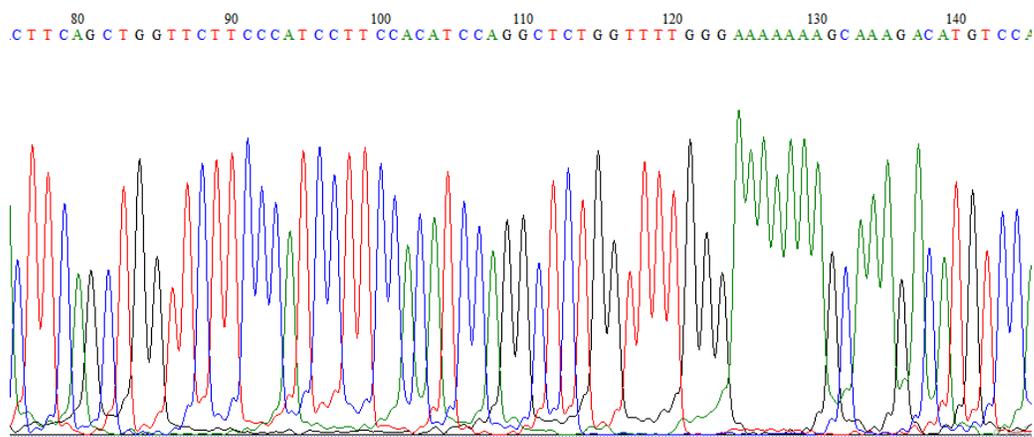


Figura 20. Fragmento del electroferograma obtenido de la secuenciación capilar del exón 5 de *EPAS1*, del miembro II-8 de la familia 2.

Cada variante identificada tiene una incidencia variable respecto a las demás, además de que no todos los sujetos afectados con PCA presentan las mismas variantes.

En el caso de la familia I la mayoría de las variantes se encuentran en los sujetos que presentan este padecimiento. Por otro lado, la distribución de los polimorfismos que presentan los miembros de la familia II, no permite la fácil correlación entre en genotipo y fenotipo, ya que se encontraron sujetos que, aunque padezcan la afección presentan un mínimo de variantes, y lo opuesto, miembros que, aunque exhibieron un gran número de variantes no desarrollaron PCA.



Tabla 10. Asociación entre el fenotipo y las variantes encontradas.

Variante \ Sujeto	Familia I					Familia II								
	I-1	I-2	II-1	II-2	II-3	I-1	I-2	II-2	II-3	II-4	II-5	II-6	II-7	II-8
NG_016000.1:g.63732A>C	□		□	□	□	□	□				□	□		
NG_016000.1:g.63738C>G		□	□		□									
NG_016000.1:g.63741C>T		□	□	□	□		□				□	□	□	
NG_016000.1:g.63741_63742InsT	□	□	□		□		□				□	□	□	
NG_016000.1:g.63742C>T						□	□	□		□	□	□	□	□
NG_016000.1:g.77567T>A	□		□	□	□	□	□	□				□		
NG_016000.1:g.84086G>A	□		□	□	□	□		□	□		□	□	□	
NG_016000.1:g.84113T>A	□			□		□								
NG_016000.1:g.84131C>G						■	□	■	□	■	□	□	□	■
NG_016000.1:g.86414G>C						□	□	□	□	□	□	□	□	
NG_016000.1:g.88008G>A							□		□		□	□	□	
NG_016000.1:g.89554T>C	□		□	□	□	□	□		□	□	□	□	□	□
NG_016000.1:g.89590G>C	□		□	□	□	□	□	□	■	■	□	□	□	
NG_016000.1:g.92114C>G	□			□										
Número de variantes halladas	8/ 10	3/ 10	8/ 10	8/ 10	8/ 10	9/ 12	10/ 12	6/ 12	6/ 12	5/ 12	10/ 12	11/ 12	9/ 12	3/ 12

□ Heterocigoto
 ■ Homocigoto

En las celdas de color amarillo se presentan los individuos afectados de la familia I y en verde los de la familia II.



VII.4. Análisis Bioinformático

Se encontraron 12 variantes que no afectan la secuencia de aminoácidos en el producto proteico final (tabla 11):

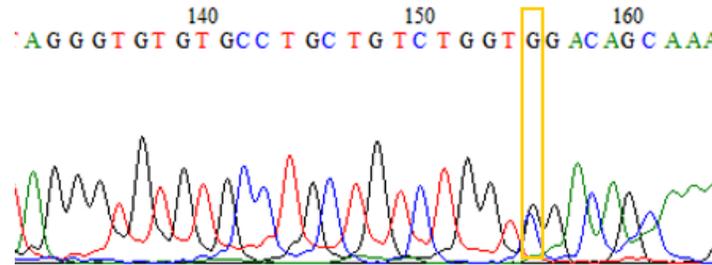


Figura 21. Electroferograma en Fw del exón 11, perteneciente a II-6 de la familia II. Dentro del marco se encuentra la variante NG_016000.1:g.86414G>C/rs7598371.

De acuerdo a los algoritmos de predicción utilizados, se encontraron 4 variantes sinónimas que a pesar de representar una ruptura, creación o alteración en los sitios ESS y/o ESE intrónicos, no producen ningún impacto en el proceso de splicing; 2 de estas variantes interfieren, con los puntos de ramificación. Y sólo el SNV rs7598371 (Figura 21) ha sido reportado con anterioridad por el equipo de Yu en el 2016, asociado a la hipertensión pulmonar a gran altitud.

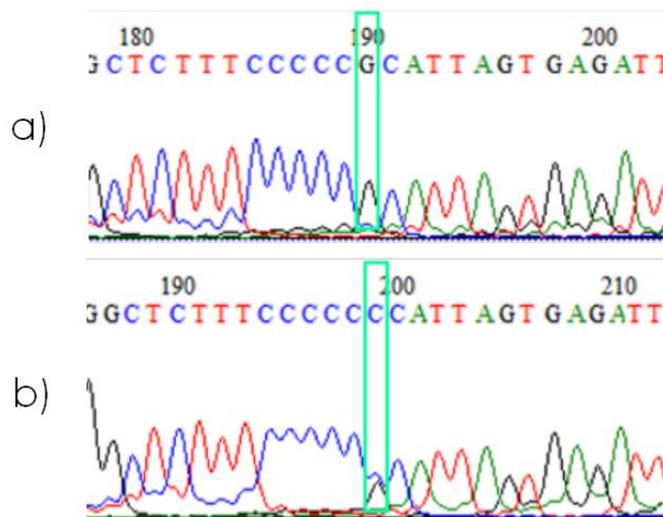


Figura 22. Electroferograma en Fw del exón 9 correspondiente a miembros de la familia II.

Dónde: a) es I-1 homocigoto y b) I-2 heterocigoto, indicando la variante NG_016000.1:g.84131C>G o rs7557402.



Tabla 11. Evaluación de variantes sinónimas en dbSNP y HSF 3.0.

Variante	Código de dbSNP	Localización	Human Splicing Finder Transcripto
NG_016000.1:g.63732A>C	rs535860790	Intrón (corriente abajo Exón 3)	Sin probable impacto en splicing c.218-18A>C
NG_016000.1:g.63738C>G	rs202210836	Intrón (corriente abajo Exón 3)	Sin probable impacto en splicing c.218-12C>G
NG_016000.1:g.63741C>T	rs75984373	Intrón (corriente abajo Exón 3)	Sin probable impacto en splicing c.218-9C>T
NG_016000.1:g.63741_63742InsT	No reportada	Intrón (corriente abajo Exón 3)	Sin alteración significativa en el splicing c.218-9_218-8insT
NG_016000.1:g.63742C>T	No reportada	Intrón (corriente abajo Exón 3)	Sin alteración significativa en el splicing c.218-8C>T
NG_016000.1:g.77567T>A	No reportada	Intrón (corriente arriba Exón 7)	Ruptura de un sitio ESS intrónico, sin probable impacto en el splicing. c.886+35T>A
NG_016000.1:g.84086G>A	No reportada	Intrón (corriente abajo Exón 9)	Mutación intrónica que afecta los puntos de ramificación/ <i>branching</i> . Ruptura de un sitio ESS intrónico, sin probable impacto en el splicing. Creación de un sitio ESE intrónico, sin probable impacto en el splicing. c.1035-52G>A
NG_016000.1:g.84113T>A	No reportada	Intrón (corriente abajo Exón 9)	Mutación intrónica que afecta los puntos de ramificación/ <i>branching</i> . Ruptura de un sitio ESS intrónico, sin probable impacto en el splicing. Creación de un sitio ESE intrónico, sin probable impacto en el splicing. c.1035-25T>A
NG_016000.1:g.84131C>G	rs7557402	Intrón (corriente abajo Exón 9)	Ruptura de un sitio aceptor WT, alteración potencial en el splicing. c.1035-7C>G
NG_016000.1:g.86414G>C	rs7598371	Intrón (corriente arriba Exón 11)	Ruptura de un sitio ESS intrónico, sin probable impacto en el splicing. Creación de un sitio ESE intrónico, sin probable impacto en el splicing. c.1554+48G>C
NG_016000.1:g.88008G>A	rs1884760160	Exón 12	Alteración de un sitio ESS exónico, posible alteración en el splicing. c.1737G>A
NG_016000.1:g.89554T>C	No reportada	Intrón (corriente abajo Exón 14)	Sin alteración significativa en el splicing c.2173-20T>C



Por otro lado, la variante rs184760160 es reconocida como una alteración en un sitio ESS exónico, ocasionando posiblemente una alteración en el splicing. El SNP rs7557402 (Figura 22) se identificó como la ruptura de un sitio aceptor silvestre, implicando una alteración potencial en el splicing. De acuerdo a la plataforma ClinVar (URL12) ambas variantes, aunque asociadas a la eritrocitosis familiar, son interpretadas como benignas. No obstante, rs184760160 (Figura 23) sólo es reportada como una variante heterocigota en los pacientes estudiados por Dinardo & col.

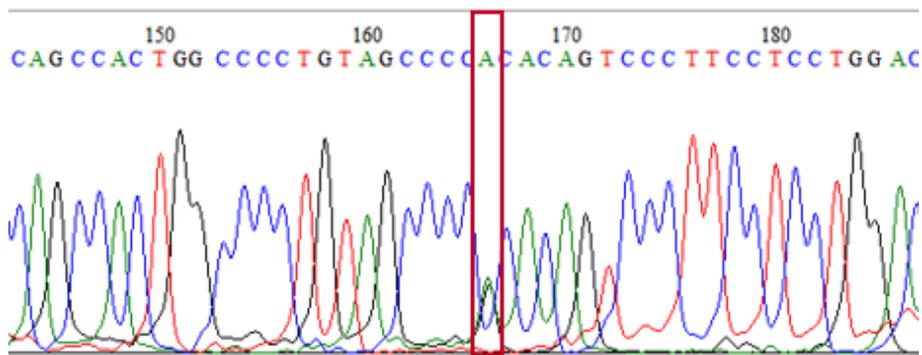


Figura 23. Electroferograma en Fw del exón 12 que corresponde al individuo II-3 de la familia II. Se encuentra señalado NG_016000.1:g.88008G>A/ rs184760160.

Fueron halladas 6 variantes de significado incierto bajo el análisis bioinformático, aunque, cabe mencionar que 3 de estas han sido previamente descritas: El polimorfismo rs75984373 (Figuras 24 y 26), se encuentra asociado a policitemia de gran altitud, causada por hipoxia arterial persistente y deterioro ventilatorio (Zhao et al., 2017); La variante rs202210836 (Figura 24), es reportada en ClinVar como probablemente benigna pero asociada a la eritrocitosis familiar. Sin embargo, aunque el SNP rs535860790 se encuentra registrado en el sitio web del NCBI, no contiene información sobre este.

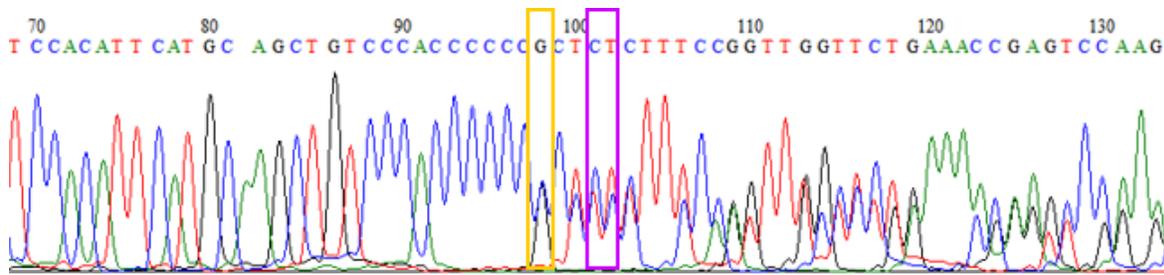


Figura 24. Electroferograma en Fw donde se encuentran los SNPs: NG_016000.1:g.63738C>G NG_016000.1:g.63741C>T, NG_016000.1:g.63741_63742InsT, y NG_01600.1:g.63742C>T.

Electroferograma Fw del exón 3 perteneciente a I-2 de la familia I, dónde se señala: En amarillo NG_016000.1:g.63738C>G/ rs202210836, mientras en morado NG_016000.1:g.63741C>T/ rs75984373, NG_016000.1:g.63741_63742InsT, y NG_01600.1:g.63742C>T.

Aunque en las variantes del exón 3, evaluadas con HSF 3.0 no mostraron impacto alguno en el splicing, se puede observar en el diagrama de los sitios potenciales de splicing del mismo exón (Figura 27), obtenido del mismo sitio web, que la parte de la secuencia afectada (Figuras 24, 25 y 26) coincide con un sitio marcado como un aceptor natural y potencial de splicing.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
436 bits(236)	2e-118	239/240(99%)	1/240(0%)	Plus/Plus
Query 1	CCACCCCCCCCC	CTTTCCAGTTT	TGCTCTGAAAACGAGTCCGAAGCCGAAGCTGACCAGC	60
Sbjct 63730	CCACCCCCCCCC	CTTTCCAGTTT	TGCTCTGAAAACGAGTCCGAAGCCGAAGCTGACCAGC	63788
Query 61	AGATGGACAAC	TGTACCTGAAAGCCTTGGAGGGTTTCATTGCCGTGGTGACCCAAGATG	120	
Sbjct 63789	AGATGGACAAC	TGTACCTGAAAGCCTTGGAGGGTTTCATTGCCGTGGTGACCCAAGATG	63848	
Query 121	GCGACATGATC	TTTCTGTGAGAAAACATCAGCAAGTTCATGGGACTTACACAGGTGACAC	180	
Sbjct 63849	GCGACATGATC	TTTCTGTGAGAAAACATCAGCAAGTTCATGGGACTTACACAGGTGACAC	63908	
Query 181	CCTCCTCTATC	TTTCAAAGAAGAAATGTTTCCATTTGGGGGTAGAAATGAGTGGAAG	240	
Sbjct 63909	CCTCCTCTATC	TTTCAAAGAAGAAATGTTTCCATTTGGGGGTAGAAATGAGTGGAAG	63968	

Figura 25. Inserción de T entre las bases 63741 y 63742 en el gen *EPAS1*.

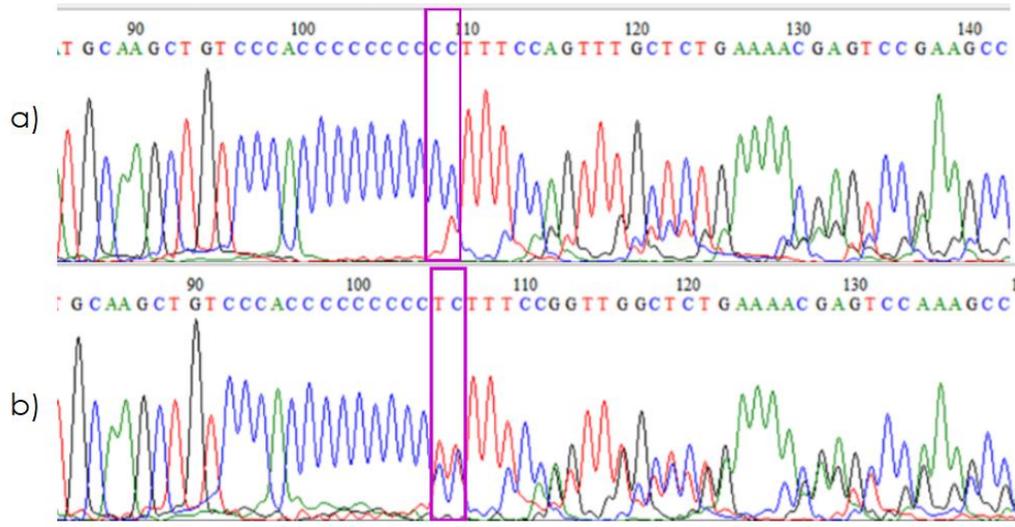


Figura 26. Electroferogramas del exón 3 de la familia II: NG_016000.1:g.63741C>T, NG_016000.1:g.63741_63742InsC, y NG_01600.1:g.63742C>T.

Electroferogramas en Fw del exón 3 perteneciente a la Generación filial 1 de la familia II, dónde a) es I-1 y b) es I-2. En el recuadro se encuentran señaladas: NG_016000.1:g.63741C>T/ rs75984373, NG_016000.1:g.63741_63742InsC, y NG_01600.1:g.63742C>T.

Además, las alteraciones registradas en el exón 3, fueron evaluadas con el programa RNAfold, dónde se encontró que estas variantes producen cambios en el plegamiento del ARNm, y la energía requerida para la formación de estas posibles estructuras es menor que para formar la estructura silvestre.

Por otra parte, el SNP encontrado en el exón 14 (Figura 28) que también fue sometido al análisis *in silico* con RNAfold (Tabla 12), demostró alterar el plegamiento del ARNm; y se encontró la energía requerida para la formación de estas posibles estructuras es ligeramente mayor que para formar la estructura que no presenta alteraciones (Anexo 2).

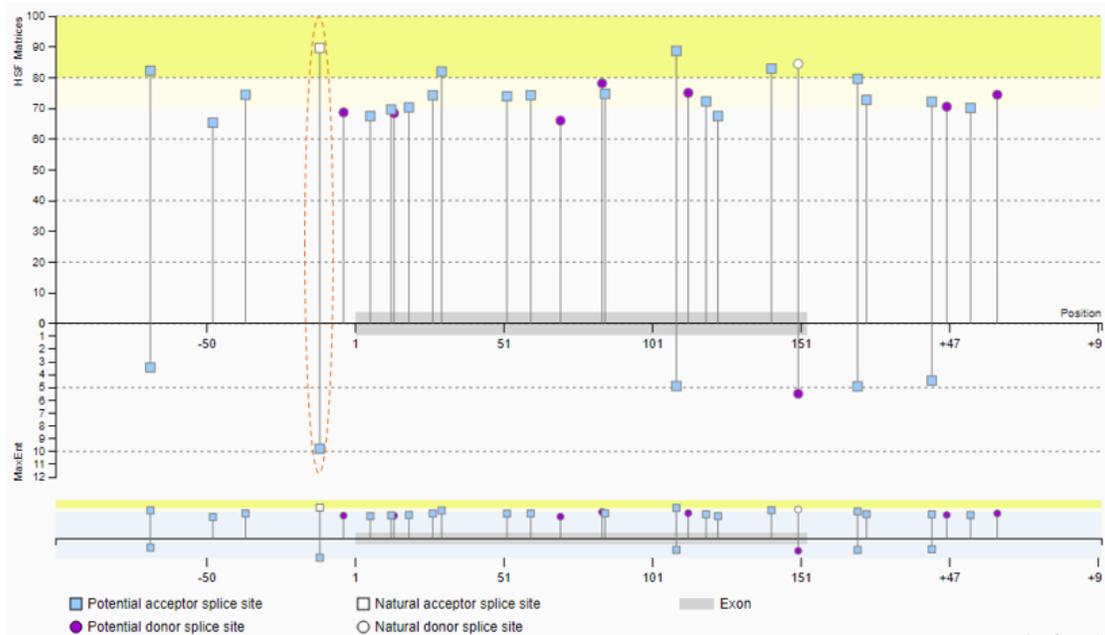


Figura 27. Diagrama de los Sitios potenciales de splicing perteneciente al ex3n 3 de *EPAS1*.

Se observa remarcado el sitio que corresponde a la secuencia afectada en los miembros de ambas familias. La secuencia es ACCCCCCCCC. Modificado de la plataforma HSF 3.1.

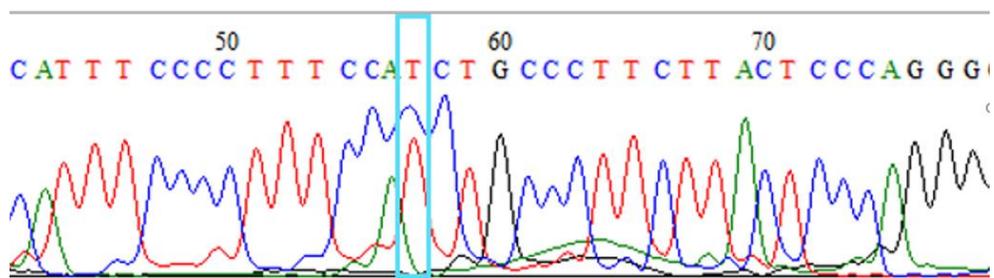


Figura 28. Electroferograma en fw del ex3n 14 correspondiente a II-5 de la familia II. Se encuentra resaltado NG_016000.1:g.89554T>C.



Tabla 12. Evaluación de variantes sinónimas en RNAfold.

Mutación	Posición	Plegamiento de ADN	
		Silvestre	Alterada
NG_016000.1:g.89554T>C	Exón 14	6 posibles plegamientos $\Delta G = -103.9$ a -107.6 kcal/mol	10 posibles plegamientos $\Delta G = -99.5$ a -104.3 kcal/mol

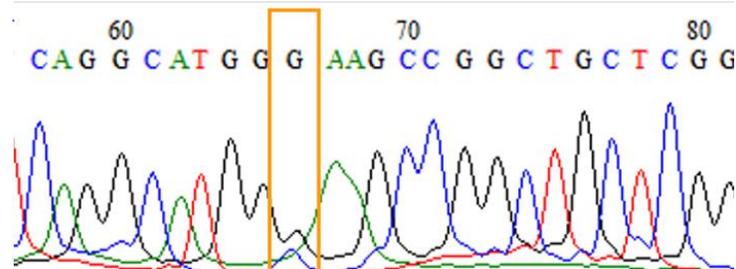


Figura 29. Electroferograma Fw del exón 16 perteneciente a I-1 miembro de la familia I. Se observa NG_016000.1:g.92114C>G/ rs765994211 dentro del recuadro amarillo.

Tabla 13. Evaluación de variantes no sinónimas en dbSNP y Polyphen 2.0.

Variante	Código de identificación de dbSNP	Cambio	Efecto (score)
NG_016000.1:g.89590g>C	No reportada	Gly730Ala	Benigna (0.001)
NG_016000.1:g.92114C>G	rs765994211	Ala823Gly	Posiblemente Maligna (0.770)

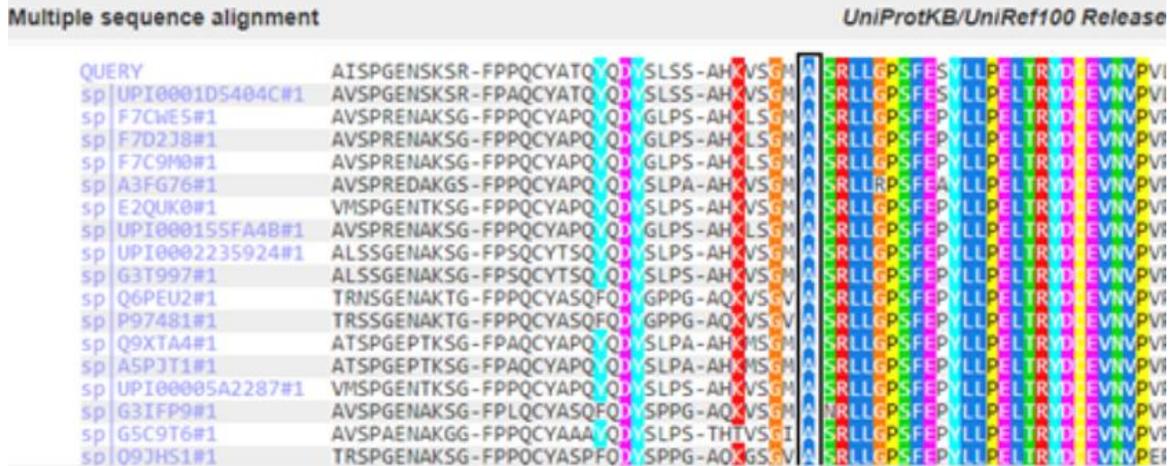


Figura 30. Alineamiento de secuencias múltiple de un fragmento de *EPAS1*.

Dónde se observa que Ala del cambio A823G (rs765994211) es un aminoácido conservado en diferentes organismos.

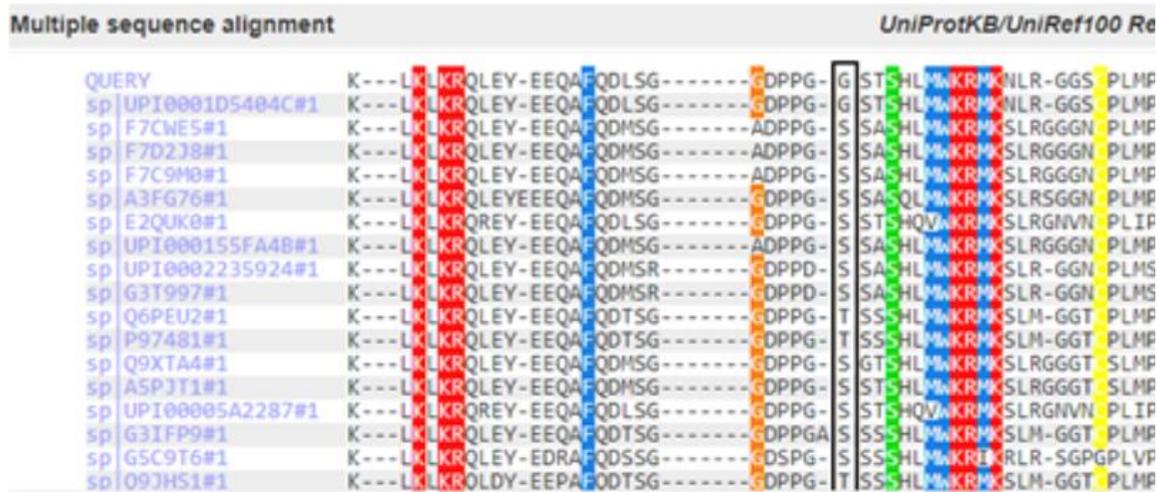


Figura 31. Alineamiento de secuencias múltiple de un fragmento de *EPAS1*. Se observa que el residuo G del cambio G870A es un aminoácido poco conservado en diferentes organismos.

Por otra parte, se identificaron 2 variantes que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos en la proteína (Tabla 13): Se encontró que el polimorfismo rs765994211 (Figura 29), es considerado



como posiblemente maligno ya que el aminoácido Ala es un residuo altamente conservado (Figura 30); mientras la otra variante, que no ha sido registrada con anterioridad, arrojó un score muy bajo en PolyPhen2, por lo que su efecto es descrito como benigno; la conservación del aminoácido Gly, se encuentra poco conservada (figura 31). De acuerdo a la secuencia proteica, ambas variaciones no se encuentran relacionadas con ningún dominio específico de la proteína (Figura 32).

1	MTADKEKKRS	SSERRKEKSR	DAARCRRSKE	TEVIFYELAHE	LPLPHSVSSH	50
51	LDKASIMRLA	ISFLRTHKLL	SSVCSENESE	AEADQQMDNL	YLKALEGFIA	100
101	VVTQDGMIF	LSENISKFMG	LTQVELTGHS	IFDFTHPCDH	EEIRENLSLK	150
151	NGSGFGKSK	DMSTERDFFM	RMKCTVTNRG	RTVNLKSATW	KVLHCTGQVK	200
201	VYNNCPPHNS	LCGYKEPLLS	CLIIIMCEPIQ	HPSHMDIPLD	SKTFLSRHSM	250
251	DMKFTYCDDR	ITELIGYHPE	ELLGRSAYEF	YHALDSENMT	KSHQNLCTKG	300
301	QVVSQGQYRML	AKHGGYVWLE	TQGTVIYNPR	NLQPQCIMCV	NYVLSEIEKN	350
351	DVVFSSMDQTE	SLFKPHLMAM	NSIFDSSGKG	AVSEKSNFLF	TKLKEEPEEL	400
401	AQLAPTPGDA	IISLDFGNQN	FEESSAYGKA	ILPPSQPWAT	ELRSHSTQSE	450
451	AGSLPAFTVP	QAAAPGSTTP	SATSSSSSSCS	TPNSPEDYYT	SLDNDLKIEV	500
501	IEKLFAMDTE	AKDQCSTQTD	FNELDLETLA	PYIPMDGEDF	QLSPICPEER	550
551	LLAENPQSTP	QHCFSA MTNI	FQPLAPVAPH	SPFLLDKFQQ	QLESKKTEPE	600
601	HRPMSSIFFD	AGSKASLPPC	CGQASTPLSS	MGGRSNTQWP	PDPPLHFGPT	650
651	KWAVGDQRTE	FLGAAPLGGP	VSPPHVSTFK	TRSAKGFGAR	GPDVLS PAMV	700
701	ALSNKLLKLR	QLEYEEQAFQ	DLSGGDPPGG	STSHLMWKRM	KNLRGGSCPL	750
751	MPDKPLSANV	PNDKFTQNPM	RGLGHPLRHL	PLPQPPSAIS	PGENSKSRFP	800
801	PQCYATQYQD	YSLSSAHKVS	GMA S RLLGPS	FESYLLPELT	RYDCEVNV PV	850
851	LGSSTLLQGG	DLLRALDQAT				870

Figura 32. Secuencia de aminoácidos de la proteína EPAS1.

Se encuentran remarcados los dominios: bHLH -azul (14-67), PAS1 -salmón (84-154), PAS2 - verde (230-300) y PAC -lila (304-347). Sobre las líneas punteadas se encuentran regiones importantes como: sitio de unión a ADN -rojo (26-53), sitio requerido para la heterodimerización con ARNT -amarillo (171-192), NTAD -cian (496-542) y CTAD -verde claro (830-870). Por otra parte, dentro del círculo amarillo se puede ver el cambio A823G, y en azul G730A.



VIII. DISCUSIÓN

EPAS1 ha sido asociado a lo largo de su análisis a padecimientos como la eritrocitemia/policitemia, hipertensión pulmonar, mal de montaña crónico y dolor de cabeza de gran altitud, principalmente; estos padecimientos son provocados al exponerse a condiciones hipóxicas donde se ha relacionado con alteraciones en la frecuencia cardiaca, vasodilatación cerebral, sobreperfusión de lechos microvasculares y la respuesta transcriptómica de dicho gen bajo estas condiciones; de hecho, existen diversos estudios (humanos y murinos) entorno a sujetos que habitan en lugares ubicados a una elevada altura respecto al nivel del mar, por ejemplo: la población de la meseta tibetana, donde han comprobado que *EPAS1* ha sufrido alteraciones para adaptarse a un entorno con bajos niveles de O₂ (Li et al., 2019; Pouling et al., 2002; Schweizer et al., 2019; Zhao et al., 2017).

Como puede observarse en los resultados presentados, los SNPs: rs184760160, rs7557402, rs75984373 y rs202210836, se encuentran asociados con el aumento del nivel de eritrocitos. De acuerdo con ClinVar, estas variantes son descritas como benignas para la eritrocitosis familiar y/o la policitemia, al conllevar a un deterioro en la función adecuada de *EPAS1*. Sosteniendo esto, Zhao & col. (en su estudio realizado en la población tibetana), encontraron que rs75984373 además de otras SNVs en este gen embotan la respuesta eritropoyética durante la hipoxemia, pues *EPAS1* es el principal regulador de la EPO bajo estas condiciones. Este mecanismo adquirido por los habitantes del Tíbet, es de gran ayuda ya que, al habitar en un ambiente con poco oxígeno, les brinda acceso a una mejor calidad de vida en este entorno. No obstante, dicho impacto no es igual de fructuoso para individuos en otras circunstancias, donde alteraciones en este factor de transcripción ocasionan que no ejecute su propósito adecuadamente, impidiendo o alterando su papel en mecanismos como la diferenciación, angiogénesis, vasoconstricción y/o remodelación de vasos sanguíneos (Dinardo et al., 2013, Peng et al., 2017).

En el estudio realizado por del equipo de Peng (2017), la respuesta hipóxica de *Epas1* fue evaluada en diferentes tejidos de ratones Knockout donde observaron que la regulación de la enzima convertidora de angiotensina I (ACE, por sus siglas en inglés), se redujo significativamente en los pulmones y el corazón en los ratones heterocigotos (*Epas1*(+/-)), manifestando menor hipertrofia y menor presión arterial pulmonar. Esta enzima es un regulador clave de la tensión arterial, genera el péptido vasoconstrictor angiotensina II que, a su vez, induce la producción y migración de las CML,



además impele la adhesión de monocitos y neutrófilos a las células endoteliales, que son mecanismos importantes para el cierre del CA (Hung et al., 2018)

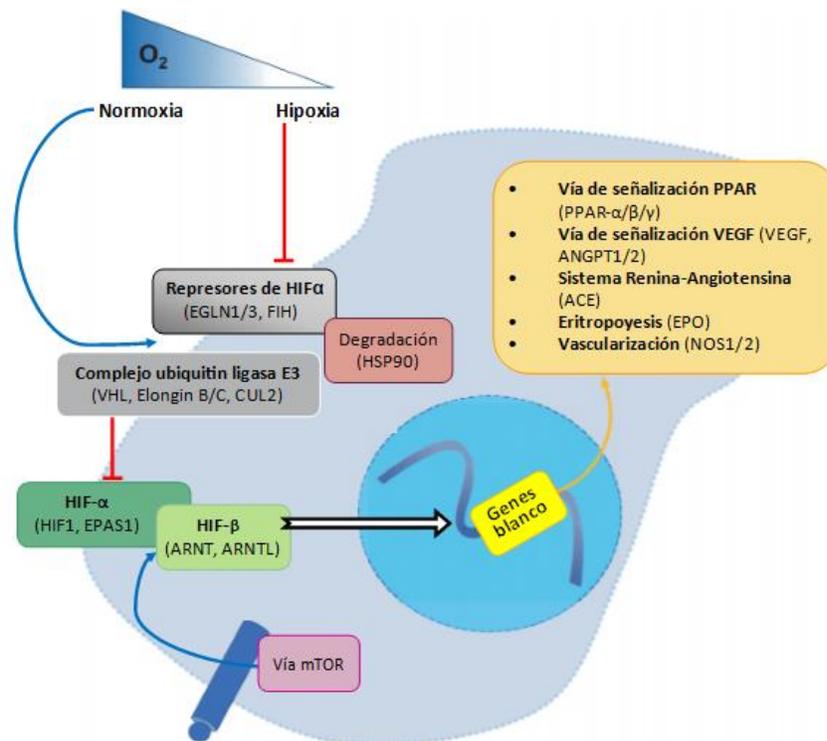


Figura 33. Versión simplificada de la vía HIF en una célula, con un enfoque en aspectos específicos (inhibidores, factores de transcripción HIF y genes blanco posteriores).

En un nivel normal de O_2 los HIFs son degradados por ubiquitinación. Durante la hipoxia la ubiquitinación de los HIFs se interrumpe y estos activan los HREs, modificado de Graham et al., 2019.

Algo similar ocurrió con el *VEGF*, al encontrar una baja expresión en los pulmones y corazón; este factor es blanco de *EPAS1*, y juega un papel importante en la angiogénesis (Peng et al., 2017).

Muchos de estos genes blanco incrementan el transporte de O_2 a tejidos hipóxicos por medio de la maduración de eritrocitos y control de la actividad transcripcional durante la angiogénesis (Figura 33) (Graham et al., 2019).



Por otra parte, la SNV rs7598371 ha sido asociada a la hipertensión pulmonar a gran altitud; en esta afección se lleva a cabo la remodelación vascular y vasoconstricción de los vasos pulmonares, estos mecanismos inducidos por la respuesta a niveles bajos de O₂, se ven alterados como consecuencia de cambios en *EPAS1* (Yu et al., 2016; Grimminger et al, 2017; Younget al., 2019).

El análisis del gen *EPAS1* realizado en 2 familias con integrantes diagnosticados con PCA, permitió la identificación de algunos polimorfismos previamente descritos y asociados a determinados fenotipos, así como el hallazgo de variantes que aún no han sido descritas.

VIII.1. Variantes no sinónimas

Las variantes encontradas implican un cambio de aminoácido Gly por Ala y viceversa. La Glicina es un aminoácido polar neutro, y es el más sencillo al tener como radical “R” un hidrógeno (H), este maneja un P.I. de 5.97 a pH neutro, además posee una alta solubilidad (249.9 g/L); mientras la Ala considerado el aminoácido menos no polar, siendo su radical el grupo CH₃ por lo que se considera alifático, cuenta con un P.I. de 6.01 y una solubilidad de 167.2 g/L (Damodaran et. al, 2019).

Como se observa en la tabla 12, el análisis *in silico* realizado muestra que la sustitución en la posición 823 de Ala por una Gly, provoca una alteración posiblemente dañina, al ocurrir en un sitio conservado evolutivamente (Figura 30); al contrario del cambio de Gly por Ala en la posición 730, que se muestra menos conservado (Figura 31). Ambas variantes encontradas manifiestan una sustitución que incluye estos aminoácidos, al ser muy similares gracias a las características que les brindan sus respectivos grupo R, no provocarían teóricamente, un cambio significativo en la función de la proteína.

Cabe señalar que, aunque ambas alteraciones no se encuentran en un dominio específico de la proteína (Figura 32), la variante en la posición 823, se ubica muy cerca del sitio de transactivación C-terminal (CTAD, por sus siglas en inglés), que se encuentra en toda la familia HIFs, y que manifiesta un alto grado de conservación en organismos tanto procariontes como eucariontes; este sitio CTAD, es hidroxilado en condiciones de normoxia al promover la interacción con el coactivador p300-CBP e inducir la transcripción (OMIM, URL13).

VIII.2. Variantes sinónimas

Las variantes sinónimas son reportadas como alteraciones en la secuencia de ADN que no generan un impacto directo en la secuencia de a.a. de la proteína. Con el tiempo se ha propuesto y verificado que estos cambios en codones sinónimos, pueden llegar a provocar una alteración biológica importante,



al afectar puntos importantes en el empalme, perturbar la estabilidad de ARNm ya sea modificando la eficiencia y velocidad de la traducción, así como la precisión de su plegamiento y alterando la conformación de proteínas. Más de 50 padecimientos humanos han sido asociados con Variantes sinónimas (Burh et al., 2016; Hunt et al., 2014; Eilbeck et al., 2017).

Se realizó un análisis *in silico* para verificar si las variantes encontradas afectaban el proceso de “corte y empalme” o Splicing, que consiste en remover los intrones y unir las secuencias exónicas flanqueantes del pre-ARNm, para producir ARNm maduro. Este complicado proceso bioquímico requiere de un complejo riboproteico conocido como spliceosoma, que cataliza reacciones de transesterificación, al reconocer elementos que actúan *in cis*. El grado de similitud para cada uno de estos elementos en un pre-ARNm, aunado a su posición, determinan su impacto en el splicing, pues, mientras más semejantes sean al consenso reportado y mejor posicionados se encuentren, serán más fácilmente reconocidos por la maquinaria de empalme (Martínez et al., 2015; Lee et al., 2015). Se encontró que 6 de las variantes sinónimas presentes, estaban ubicadas en sitios relacionados con el proceso de empalme.

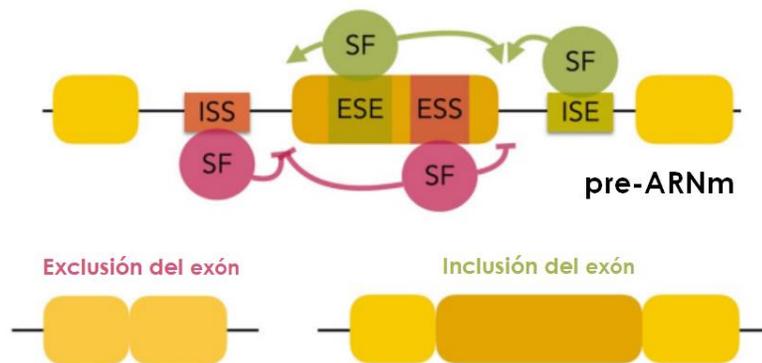


Figura 34. Regulación por factores de splicing de unión al ARN.

La unión de factores de splicing (SF) específicos a potenciadores intrónicos o exónicos (ISE y ESE, respectivamente), promueve la inclusión del exón, mientras que la unión de dichos factores de splicing (SF) a silenciadores de empalme intrónicos o exónicos (ISS y ESS, respectivamente) inhibe el empalme del exón. Modificado de Gallego et al., 2017.



Existen secuencias relativamente cortas y conservadas, necesarias para definir un el proceso de splicing, las cuales pueden estimular o inhibir el reconocimiento de sitios de splicing débiles, mejor conocidas como potenciadores y silenciadores (SE y SS respectivamente, por sus siglas en inglés) (Figura 34) (Bali et al., 2015; Hunt et al., 2014; Gallego et al., 2017).

Se detectó que los SNPs c.86+35T>A, c.1035-52G>A, c.1035-25T>A, rs7598371 representaban alteraciones en los sitios ESE y ESS intrónicos que, a su vez no refieren un impacto en el splicing, mientras que la variante rs1884760160 sí genera una perturbación en el splicing al alterar un sitio ESS exónico. Las variantes que se encuentran en estos sitios tienen el potencial de provocar el desequilibrio de algunas isoformas de ARNm funcional, aumentando o disminuyendo los niveles necesarios para la célula en cuestión y, por otro lado, pueden activar otros sitios de splicing vecinos generando mensajeros aberrantes, los cuales producirán a su vez proteínas no funcionales (Hunt et al., 2014, Martínez et al., 2015).

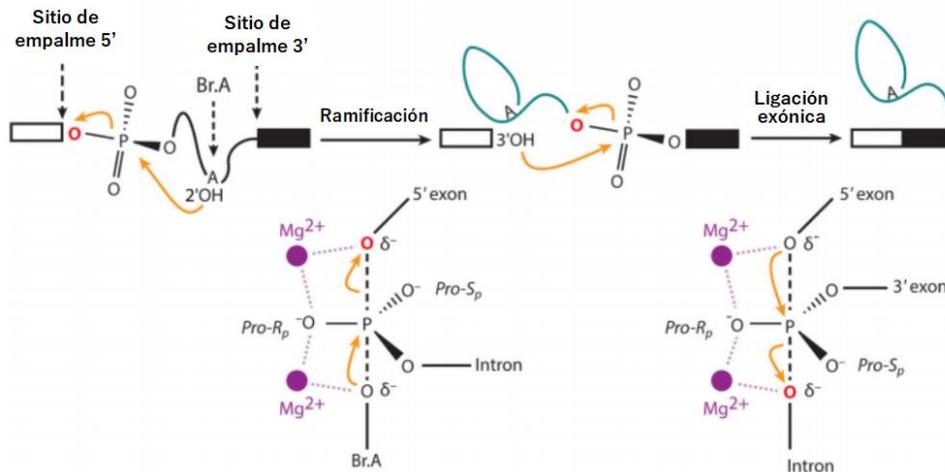


Figura 35. Branching.

En la secuencia de ramificación, el grupo OH⁻ específico de adenina lleva a cabo un ataque nucleofílico (SN2) sobre el enlace fosfodiéster del sitio de empalme 5' (o sitio donador) del exón que lo antecede, con el fin de liberarlo y formar un intermediario constituido por el intrón que los unía en forma de lazo o lariat conectado al exón siguiente, para que posteriormente el exón libre se ligue con el sitio de empalme 3' (sitio aceptor) del exón perteneciente al intermediario por medio otra reacción SN2 y así liberar la secuencia intrónica para posteriormente ser degradado.

Modificado de Lee et al., 2015.



Los SNPs c.1035-52G>A y c.1035-25T>A además, repercuten en la secuencia de ramificación o Branchpoint (Figura 35). Esta es una secuencia intrónica que antecede el inicio del exón, además se encuentra flanqueada por una región rica en residuos de pirimidina; este branchpoint contiene una secuencia conservada, importante para el reconocimiento del spliceosoma y, a su vez la formación de intrones lariat o lazo, con una secuencia consenso que difiere ligeramente entre especies. Las mutaciones reportadas en la secuencia de ramificación, especialmente en la adenina puede provocar un splicing inadecuado, resultando en desordenes genéticos (Chiang et al., 2017; Martinez et al., 2015; Lee et al., 2015).

Por otra parte, la variante rs7557402 de acuerdo al análisis realizado con HSF, provoca una alteración potencial, ya que representa la ruptura del sitio aceptor (o 3') (Figura 35), lo que sugiere que la sustitución de C por G localizada en el intrón corriente abajo del exón 9, causaría, una falla en la ligación entre el exón 8 y el exón 9 de *EPAS1* repercutiendo en la secuencia del ARNm, y por lo tanto del producto proteico final.

VIII.3. Variantes de significado incierto

Dentro de las variantes sin sentido, se encontró que 5 de estas se encuentran en un fragmento de 10 pb del intrón corriente abajo del exón 3, a menos de unas 20pb de la zona codificante. La región ACCCCCCCCC (63732 - 63742pb) se superpone parcialmente al sitio aceptor de splicing del Ex. 3 (Figura 27). En este fragmento de la secuencia, se encontró una inserción de T entre las posiciones 63741 y 63742, lo que podría significar que no se lleva a cabo correctamente el empalme, alterando la ligación del exón 2 con el 3; este exón codifica para el dominio PAS1, que de acuerdo al sitio web Interpro (URL14), está involucrado en la heterodimerización con proteínas de la misma familia, por lo que significaría que se ve afectada la función de la proteína (Wu, 2016).

La sustitución de C>T en la posición 89554 fue evaluada para comparar los cambios que provoca en la estructura secundaria del ARNm, encontrando que el número de posibles plegamientos aumenta, y la energía necesaria para que esto se lleve a cabo disminuye, por lo que esta conformación se ve favorecida, lo que podría alterar el proceso de transcripción, ya que los cambios en este tipo de estructura pueden alterar la unión de componentes ribonucleicos en algún paso de la vida de un ARNm e influenciar la expresión génica. Los mecanismos por los cuales la estructura secundaria del ARNm regula la expresión génica comprende prácticamente cada paso del proceso de expresión de



genes, incluidas la transcripción, splicing, traducción y degradación, así como en la estabilidad de la misma molécula (Bali et al., 2015).

VIII.4. Relación Genotipo – Fenotipo

A lo largo del análisis de la PCA, se ha clasificado como PCA no sindrómica o PCA1, PCA2 (asociada con el síndrome de Char y el gen *TFAP2b*) y la PCA3 (vinculada con el gen *PRDM6*); El hallazgo de las variantes en *EPAS1* en dos familias diferentes afectadas por PCA no sindrómica, muestra que:

En ambas familias, se encontró una variante en un sitio exónico altamente conservado, provocaría la pérdida de función del alelo dañado, siendo que la expresión del alelo normal no sea suficiente para cubrir la demanda de esta proteína como factor de transcripción durante el proceso de cierre del CA, por lo que podría hablarse de haploinsuficiencia (Jackson et al., 2018). Esta SNV no se encuentra presente en todos los individuos afectados por PCA por lo que no se puede afirmar que esta sea la causa de dicha afección. Sin embargo, cabe recordar que la PCA al tener diferentes grados de impacto, podría relacionarse siempre y cuando en los individuos que tuvieran la variante presentaran una PCA con un grado mayor de complejidad que en los que no fue encontrada.

VIII.4.1. Familia I

El análisis del gen *EPAS1* realizado a los 5 integrantes de esta familia, de los cuales 4 (I-1, II-1, II-2, II-3) refirieron PCA, donde al tratarse de una enfermedad autosómica dominante se estima que al menos el 50% de los descendientes se encontrarían afectados (Jackson et al., 2015) (Figura 36), permitió la identificación de algunas variantes que se presentaron principalmente en los miembros que padecen o padecieron dicha enfermedad.

En esta familia, se logró detectar un total de 10 variantes, de las cuales los sujetos afectados por PCA presentaron una media de 8, sin embargo, no todos manifestaron las mismas variantes (Tabla 10).

Considerando que no todos los polimorfismos encontrados provocan un daño significativo en la expresión o regulación génica, y que, además los individuos no presentan el mismo patrón de SNVs, se debe tener presente que la PCA es una enfermedad que resulta de la compleja interacción de múltiples genes, así como de factores ambientales, por lo que es complicado determinar los cambios genéticos causales de la afección.

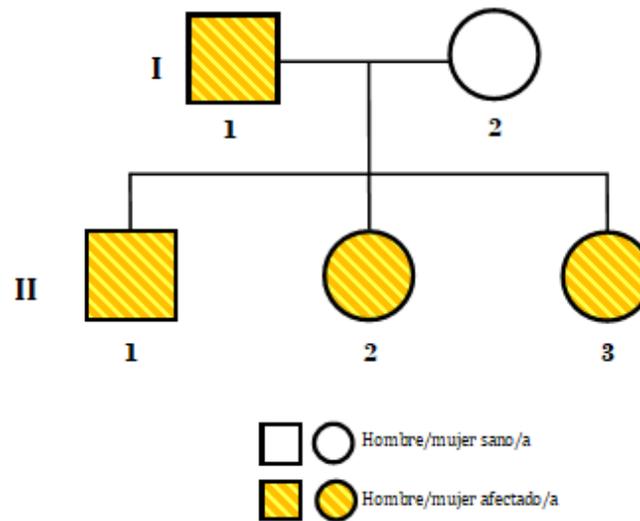


Figura 36. Diagrama de pedigrí de la Familia I.

No obstante, el impacto de una SNV en un gen puede ser pequeño, pero en presencia de otras variantes en localizadas en otros genes y en un contexto ambiental particular, puede incrementar el riesgo de padecer una enfermedad (Jackson et al., 2018).

VIII.4.2. Familia II

De acuerdo a la Tabla 10 se puede observar que, aunque la generación filial I no refleja el fenotipo, el padre (I-1) notificó tener un hermano afectado por PCA. Por otro lado, no hay informes sobre la madre (I-2) que determinen haber tenido parentesco con personas que presenten la enfermedad, pero se sospecha que pudiera haber antecedentes familiares de dónde se presenten alteraciones del gen *EPAS1* sin que estuviera informada al respecto, ya que se encontró un número mayor de variantes en ella, que en el padre.

A lo largo de la búsqueda de las variantes en esta familia (Tabla 10), fueron ubicadas 12 variantes. Sin embargo, la relación entre estas y el fenotipo de los miembros resulta opaca, ya que algunos individuos afectados por la enfermedad de interés, son portadores de menos anomalías que los no afectados, siendo el caso de II-8 y el caso contrario el II-5.



Como se muestra en el pedigrí (Figura 37), el tipo de herencia en esta familia refleja una transmisión autosómica recesiva, contrario a lo reportado por la literatura. Sin embargo, en el 2002, el equipo de Mani, planteo la posibilidad alternativa dónde se pueda atribuir a loci individuales con un efecto significativo, pero con una penetrancia reducida de tal manera que dentro de una familia determinada casi todos los sujetos albergarían mutaciones en el mismo locus de la enfermedad, pero solo una fracción de los individuos que heredan el alelo de riesgo desarrollarán el padecimiento; lo que podría de cierta forma justificar que los individuos con PCA no sean en la mayoría de los casos los que presenten un mayor número de anomalías. Sin embargo, no hay que perder de vista que los resultados del estudio de Mani realizado en el norte de Irán, basados en el loci 12q24, sugieren que la PCA de herencia autosómica recesiva con penetrancia reducida es más común en la descendencia de uniones consanguíneas.

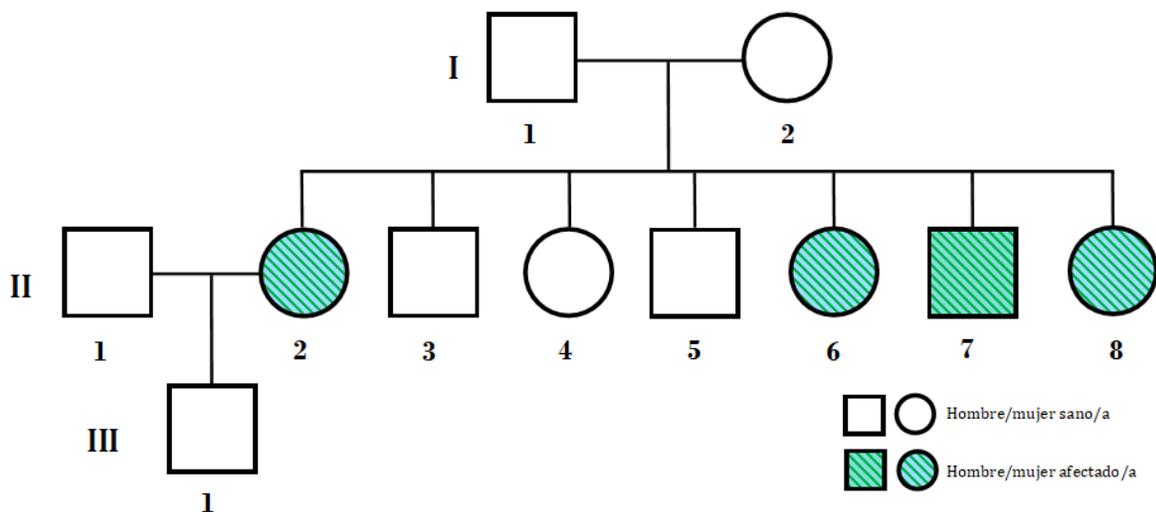


Figura 37. Diagrama de pedigrí de la Familia II.

De igual forma que en el caso de la Familia I, se debe considerar que la expresión y regulación de ciertos polimorfismos es el reflejo de la determinación multifactorial con contribuciones de múltiples genes o factores ambientales. Además, existe la posibilidad de que la compleja interacción de estos elementos juegue un papel, donde el resultado sea una afección que, aunque carezca de manifestaciones clínicas, se encuentre presente, como lo puede ser el CA silente, para este caso.



IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados del estudio realizado al gen *EPAS1* se puede concluir que:

- La variante sin sentido rs765994211 es considerada posiblemente maligna al localizarse cerca de un sitio muy conservado evolutivamente.
- Los SNPs rs184760160, rs7557402, c.1035-52G>A y c.1035-25T>A, alteran los procesos de empalme y ramificación, así como un sitio aceptor de splicing, por lo que podrían perjudicar aspectos o características importantes del ARNm.
- En la región ACCCCCCCCC (63732 - 63742pb) que corresponde al sitio aceptor de splicing del exón 3, se encontraron 4 sustituciones y una inserción, lo que probablemente produzca una alteración en la función de la proteína, al impedir una correcta ligación exónica.
- De acuerdo al análisis *in silico*, la sustitución c.2173-20T>C provoca posibles alteraciones en la estructura secundaria del ARNm.
- Aunque los polimorfismos rs184760160, rs7557402, rs75984373 y rs202210836, resultan benéficos para la eritrocitemia familiar, pues embota la función de *EPAS1* que es el gen responsable, afectan mecanismos en los que es esencial la participación de dicho gen como: proliferación, diferenciación, angiogénesis y vasoconstricción.
- Las variantes encontradas, al igual que otras reportadas en la literatura, podrían truncar la función de *EPAS1*, afectando posiblemente su papel como factor de transcripción involucrado en diversos mecanismos, que a su vez resultan imprescindibles para el correcto cierre del conducto arterioso.
- De un total de catorce variantes detectadas, ocho tienen presencia en ambas familias y aunque no se puede afirmar que alguna de estas sea determinante para truncar el cierre del CA, permite pensar que existe una relación entre la PCA no sindrómica y *EPAS1*, considerando la complejidad que existe en cualquier cardiopatía congénita.



X. REFERENCIAS

- Aoki, R., Yokoyama, U., Ichikawa, Y., Kumagaya, S., Iwasaki, S., Nishimaki, S., Seki, k., Yokota, S., Minamisawa, S. & Ishikawa, Y. (2012). *Plasma Hypoosmolarity After Birth Promotes Closure of the Ductus Arteriosus*. *Circulation Journal* 104(2), 326-336. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu199>.
- Arboleda, M. & Franco, N. (2017). *Rol de la función mitocondrial en el corazón y sus implicaciones en disfunciones cardíacas*. *Ing. Cienc.* 13 (26), 233–268. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.13.26.9>.
- Areválo, L., Solano, L. & Villatoro, J. (2017). *Cierre percutáneo de conducto arterioso mediante un asa arteriovenosa en un paciente con síndrome de la cimitarra*. *Bol Med Hosp Infant Mex* 74(1), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2016.07.006>.
- Bali, V., & Bebok, Z. (2015). *Decoding mechanisms by which silent codon changes influence protein biogenesis and function*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 64, 58–74. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.03.011>.
- Bateson, J., Schulz, R., Olley, P. (1999). *Response of Fetal Rabbit Ductus Arteriosus to Bradykinin: Role of Nitric Oxide, Prostaglandins, and Bradykinin Receptors*. *Pediatric Research* 45(4), 568–574. <https://doi.org/10.1203/00006450-199904010-00017>.
- Benitz, W. (2016). *Patent Ductus Arteriosus in Preterm Infants*. *Pediatrics* 137(1), <https://doi.org/10.1542/peds.2015-3730>
- Bökenkamp, R., DeRuiter, M., Van Munsteren, C., & Gittenberger, A. (2010). *Insights into the pathogenesis and genetic background of patency of the ductus arteriosus*. *Neonatology*, 98(1), 6-17. <https://doi.org/10.1159/000262481>.
- Bravo-Valenzuela, J., Peixoto, B., & Júnior, A. (2018). *Prenatal diagnosis of congenital heart disease: A review of current knowledge*. *Indian heart journal* 70(1), 150-164. <https://doi.org/10.1016/j.ihj.2017.12.005>.
- Buhr, F., Jha, S., Thommen, M., Mittelstaedt, J., Kutz, F., Schwalbe, H. & Komar, A. (2016). *Synonymous Codons Direct Cotranslational Folding Toward Different Protein Conformations*. *Celda. Mol.* 61(3), 341–351. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.008>.
- Calderón, J., Cervantes, J., Curi, P. & Ramírez, S. (2010). *Problemática de las cardiopatías congénitas en México. Propuesta de regionalización*. *Arch. Cardiol. Mex.* 80(2), 133-140. ISSN 1665-1731.
- Campos-García, V., Ordóñez, G. & Monjaraz, S. (2016). *El intervencionismo percutáneo en la corrección de defectos cardíacos congénitos (DCC): experiencia en una UMAE*. *Gac. Med. Mex.* 152, 667-673. <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2016/gm165o.pdf>.
- Carlson, B. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. (5ed.). Editorial ELSIEVER.



- Chiang, H., Wu, J., & Chen, Y. (2017). *Identification of functional single nucleotide polymorphisms in the branchpoint site*. Human Genomics 11-27. <https://doi.org/10.1186/s40246-017-0122-6>.
- Clyman, R., Chan, C., Mauray, F., Chen, Y., Cox, W., Seidner, S., Lord, E., Weiss, H., Waleh, N., Evans, S. & Koch, C. (1999). *Permanent anatomic closure of the ductus arteriosus in newborn baboons: The roles of postnatal constriction, hypoxia, and gestation*. Pediatr. Res. 45(1), 19-29. <https://doi.org/10.1203/00006450-199901000-00005>.
- Coceani, F. & Bragatti, B. (2012). *Mechanisms of Ductus Arteriosus Closure*. Semin Perinatol 36(2), 92-97. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2011.09.018>.
- Crockett S., Berger C., Shelton E. & Reese J. (2019). *Molecular and mechanical factors contributing to ductus arteriosus patency and closure*. Congenital Heart Disease 14(1), 15-20. <https://doi.org/10.1111/chd.12714>.
- Dagle, J., Lepp, N., Cooper, M., Schaa, K., Kelsey, K., Orr, K., Zimmerman, C., Steffen, K., Johnson, K., Marazita, M. & Murray, J. (2009). Determination of genetic predisposition to patent ductus arteriosus in preterm infants. Pediatrics. 123(4), 1116–1123. <https://doi:10.1542/peds.2008-0313>.
- Damodaran, S. & Parkin, K. (2019). *Fennema química de los alimentos*. (4a ed.). Esditorial Acribia.
- Delabaere, A. & Gallot, D. (2016). *Fisiología Fetal*. EMC-Ginecología y obstetricia 52(1), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(15\)76285-5](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(15)76285-5).
- Dinardo, L., Santos, L., Schettert, T., Soares, G., Krieger, E., & Pereira, C. (2013). *Investigation of Genetic Disturbances in Oxygen Sensing and Erythropoietin Signaling Pathways in Cases of Idiopathic Erythrocytosis*. Genetics Research International 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/495724>.
- Donofrio, M., Moon, A., Homberguer, L., Copel, J., Sklansky, M., Abuhamad, A., Cuneo, B., Huhta, J., Jonas, R., Krishnan, A., Lacey, S., Lee, W., MichelfelderSr, E., Rempel, G. Silverman, N., Spray, T., Strasburger, J., Tworetzky, W. & Rychik, J. (2014). *Diagnosis and treatments of fetal cardiac disease: A scientific statement from the american heart association*. Circulation 129(21), 83-2242. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437597.44550.5d>.
- Downes, N., Laham-Karam, N., Kaikkonen, M., Ylä- Herttuala, S. (2018). *Differential but complementary HIF1A and HIF2A transcriptional regulation*. Molecular Therapy 26(7), 1735-1745. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.05.004>.
- Duboscq, C. (2017) *Vascular endothelium*. HEMATOLOGÍA. 21(Extraordinario), 19-30. <http://www.sah.org.ar/revista/numeros/vol21/extra/07-Vol%2021-extra.pdf>
- Eilbeck, K., Quinlan, A., & Yandell, M. (2017). *Settling the score: variant prioritization and Mendelian disease*. Nature Reviews Genetics, 18(10), 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.52>.
- Frails, P., Mazzone, M., Schmidt, T. & Carmeliet, P. (2009). *Regulation of Angiogenesis by Oxygen and Metabolism*. Developmental Cell 16(2), 167-179. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.003>.



- Fujita, S., Yokoyama, U., Ishiwata, R., Aoki, R., Nagao, K., Masukawa, D., Umemura, M., Fujita, T., Iwasaki, S., Nishimaki, S., Seki, K., Ito, S., Goshima Y., Asou, T., Masuda, M. & Ishikawa, Y. (2016). Glutamate promotes contraction of the rat ductus arteriosus. *Circulation Journal*, 80(11), 2388-2396. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-16-0649>.
- Gallego, L. Bordone, M., Leote, A., Saraiva, N., Ascensao, M., Barbosa, N. (2017). Alternative Splicing: the pledge, the turn, and the prestige. The key role of alternative splicing in human biological systems. *Hum Genet* 136, 1015-1042. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1790-y>.
- Gálvez, F., Parra, J., Beirana, L., Martínez, C., Osuna, M. & Lazo, C. (2013). *Cierre percutáneo del conducto arterioso permeable en niños utilizando el Amplatzer vascular plug II*. 24, *Rev Mex Cardiol* 24 (1): 29-34. <http://www.medigraphic.com/revmexcardiol>.
- Garabedian, C., Storme, L. & Deruelle, P. (2018). *Hemodinámica fetal prenatal y durante el parto*. *EMC-Ginecología-Obstetricia* 54(4), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1283-081X\(18\)41442-7](https://doi.org/10.1016/S1283-081X(18)41442-7).
- Graham, A. & McCracken. (2018). Convergent evolution on the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway genes EGLN1 and EPAS1 in high-altitude ducks. *Heredity* 122, 819–832. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0173-z>
- Grimminger, J., Richter, M., Tello, K., Sommer, N., Gall, H. y Ghofrani, H (2017). *Thin Air Resulting in High Pressure: Mountain Sickness and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension*. *Canadian Respiratory Journal*, 17, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2017/8381653>.
- Hajj, H., & Dagle, J. M. (2012). *Genetics of Patent Ductus Arteriosus Susceptibility and Treatment to PDA Gene Discovery*. *Semin. Perinatol.* 36(2), 98–104. <https://doi.org/10.1053/j.semperi.2011.09.019>.
- Hamrick, S., & Hansmann, G. (2010). *Patent Ductus Arteriosus of the Preterm Infant*. *PEDIATRICS* 125(5), 1020–1030. <https://doi.org/10.1542/peds.2009-3506>.
- Hsieh, Y., Liu, N., Ohmori, E., Yokota, T., Kajimura, I., Akaike, T. & Minamisawa, S. (2014). *Transcription Profiles of the Ductus Arteriosus in Brown-Norway Rats With Irregular Elastic Fiber Formation*. *Circulation Journal*, 78(5), 1224–1233. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-13-1029>.
- Hung, Y., Yeh, J. & HsuInt., J. (2018). *Molecular Mechanisms for Regulating Postnatal Ductus Arteriosus Closure*. *Mol. Sci.*, 19(7), 1861. <https://doi.org/10.3390 / ijms19071861>.
- Hunt, R., Simhadri, V., Iandoli, M., Sauna, Z., & Kimchi, C. (2014). *Exposing synonymous mutations*. *Trends. Genet.* 30(7), 308–321. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.04.006>.
- Imss. (2010). *Guía de Práctica Clínica. Detección de cardiopatías congénitas en niños mayores de 5 años, adolescentes y adultos*. Secretaria de salud. <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/054GER.pdf>.
- Ivey, K., Sutcliffe, D., Richardson, J., Clyman, R., García, J. & Srivastava, D. (2008). *Transcriptional Regulation During Development of the Ductus Arteriosus*. *Circ Res.* 103(4), 388-395. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.180661>.



- Jackson, M., Marks, L., May, H. & Wilson, J. (2018). *The genetic basis of disease*. Essays biochem. 62(5), 643-723. <https://doi.org/10.1042/EBC20170053>.
- Jímenez, E. Tapia, J. & Mas, J. (2004). *El esplaiçosoma: corte y empalme del pre-ARNm*. REB 23 (2), 59-63. <http://www.facmed.unam.mx>.
- Karki, P. & Birukof, K. (2019). *Rho and Reactive Oxygen Species at Crossroads of Endothelial Permeability and Inflammation*. ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING 32 (13), 1009-1022. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7798>
- Krebs, L., Norton, C. & Gridley, T. (2016). *Notch signal reception is required in vascular smooth muscle cells for ductus arteriosus closure*. Genesis. 54(2), 86–90. <https://doi.org/10.1002/dvg.22916>.
- Lee, Y. & Rio, D. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. Annu. Rev. Biochem. 84, 291-323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>.
- Leis, M., Rodríguez, R., & García, M. (2010). *Clinical practice guidelines. Diagnosis and treatment of preeclampsia-eclampsia*. Ginecología y obstetricia de Mexico 78(06), 461-525.
- Lezoualc'h, F., Fazal, L., Laudette, M. & Conte C. (2016). *Cyclic AMP Sensor EPAC Proteins and Their Role in Cardiovascular Function and Disease*. Circ Res. 118(5), 881-897. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306529>.
- Li, C., Li, X., Xiao, J., Liu, J., Fan, X., Fan, F., & Lei, H. (2019). *Genetic changes in the EPAS1 gene between Tibetan and Han ethnic groups and adaptation to the plateau hypoxic environment*. PeerJ, 7, e7943. <https://doi.org/10.7717/peerj.7943>.
- Lu, J., Li, Q., Zhu, L., Chen, C. & Li, Z. (2019). *Oral ibuprofen is superior to oral paracetamol for patent ductus arteriosus in very low and extremely low birth weight infants*. Medicine (Baltimore) 98(31), e16689. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000016689>.
- Mani, A., Meraji, S., Houshyar, R., Radhakrishnan, J., Mani, A., Ahangar, M., Rezaie, T., Taghavinejad, M., Broumand, B., Zhao, H., Williams, C. & Lifton, R. (2002). *Finding genetic contributions to sporadic disease: a recessive locus at 12q24 commonly contributes to patent ductus arteriosus*. Proc Natl Acad Sci USA. 99 (23) 15054-15059. <https://doi.org/10.1073/pnas.192582999>.
- Marconi E., Bettioli, A., Ambrosio, G., Perduca, V., Vannacci, A., Troiani, S., Dani, C., Mugelli, A. & Lucenteforte, E. (2019). *Efficacy and safety of pharmacological treatments for patent ductus arteriosus closure: a systematic review and network metaanalysis of clinical trials and observational studies*. Pharmacol Res, 148, 104418. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104418>.
- Martínez, N., Rosas, N. & Martínez, R. (2015). *Regulación del splicing alternativo: implicaciones en el diagnóstico y tratamiento del cáncer*. Med Clin 144(7), 317-323. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2014.02.021>.
- Mendieta, G., Santiago, E., Mendieta, H., Dorantes, R., Ortíz, G. & Otero, G. (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. 2013;149(6):617-623. https://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n6/GMM_149_2013_6_617-623.pdf



- Moons, P., De Volder, E., Budts, W., De Geest, S., Elen, J., Waeytens, K., & Gewillig, M. (2001). *What do adult patients with congenital heart disease know about their disease, treatment, and prevention of complications? A call for structured patient education.* *Heart*, 86(1), 74–80. <https://doi.org/10.1136/heart.86.1.74>.
- Pamukcu, O., Tuncay, A., Narin, N., Baykan, A., Korkmaz, L., Argun, M. & Uzum, K. (2018). *Patent Ductus Arteriosus closure in preterms less than 2 kg: Surgery versus transcatheter.* *Int J Cardiol*, 250, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.10.020>.
- Peng, Y., Cui, C., He, Y., Ouzhuluobu, Zhang, H., Yang, D., Su, B. (2017). *Down-Regulation of EPAS1 Transcription and Genetic Adaptation of Tibetans to High-Altitude Hypoxia.* *Mol. Biol. Evol.* 34(4), 818–830. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw280>.
- Poulin, M., Fatemian, M., Tansley, J., O'Connor, D. & Robbins, P. (2002). *Changes in Cerebral Blood Flow During and After 48 H of Both Isocapnic and Poikilocapnic Hypoxia in Humans.* *Exp. Physiol.* 87(5), 633–642. <https://doi.org/10.1113 / eph8702437>.
- Saito, T., Fukai, A., Mabuchi, A., Ikeda, T., Yano, F., Ohba, S., Nishida, N., Akune, T., Yoshimura, N., Nakagawa, T., Nakamura, K., Tokunaga, K., Chung, U. & Kawaguchi, H. (2010). *Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF-2 α during skeletal growth and osteoarthritis development.* *Nat Med.* 16(6), 678-686. <https://doi.org/10.1038/nm.2146>.
- San Luis, R., Arias, L., Peralta, M., Lázaro, J., León, J., Benítez, Z., Jáuregui, O., Yañez, L. & Manrique, M. (2012). *Guía de Práctica Clínica. Persistencia del conducto arterioso.* *Rev Med Inst Seguro Soc* 50(4), 453-463.
- Schweizer, R., Velotta, J., Ivy, C., Jones, M., Muir, S., Bradburd, G. & Cheviron, Z. (2019). *Physiological and genomic evidence that selection on the transcription factor Epas1 has altered cardiovascular function in high-altitude deer mice.* *PLoS Genet*, 15(11), e1008420. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008420>.
- Shelton, E., Ector, G., Galindo, C., Hooper, C., Brown, N., Wilkerson, I., Pfaltzgraff, E., Paria, B., Cotton, R., Stoller, J. & Reese, J. (2014). *Transcriptional profiling reveals ductus arteriosus-specific genes that regulate vascular tone.* *Physiol Genomics* 46(13), 457-466. <https://doi.org/10.1152/fisiolgenómica.00171.2013>.
- Simpson, J. & Van Den Bosch, A. (2019). *Educational series in congenital heart disease: three-dimensional echocardiography in congenital heart disease.* *Echo Res Pract.* 6(2) 75-86. <https://doi.org/10.1530/ERP-18-0074>.
- Sood, R., Zehnder, J., Druzin, M. & Brown, P. (2006). *Gene expression patterns in human placenta.* *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103(14), 5478-5483. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508035103>.
- Soria, X. (2019). *Factores predisponentes para administrar segundo ciclo de paracetamol o cierre quirúrgico del ductus arterioso persistente en recién nacido pretérmino.* Tesis de posgrado. Universidad de San Francisco de Quito, Ecuador. <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7817>.



- Stoller J., DeMauro S., Dagle J. & Reese J (2011) *Current Perspectives on Pathobiology of the Ductus Arteriosus*. J Clin Exp Cardiol, 8 (1), S8-001. <https://doi.org/10.4172/2155-9880.S8-001>.
- Tian S, Li L, Min, W. & Yang F. (2019). *Genome-wide analysis of basic helix–loop–helix superfamily members related to anthocyanin biosynthesis in eggplant (Solanum melongena L.)*. PeerJ 7, e7768. <https://doi.org/10.7717/peerj.7768>.
- Tian, H., Mcknight, S. & Russell, D. (1996). *Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells*. Genes y Dev. 11(1), 72-82. <https://doi.org/10.1101/gad.11.1.72>.
- Torres, J., Rolón, E, Aguinaga, M., Acosta, P., Reyes, E. & Murguía, T. (2016). *Mortality from Congenital Heart Disease in Mexico: A Problem on the Rise*. PLoS ONE 11(3), e0150422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150422>.
- Tylor, C. (2009). *Mutation scanning using high-resolution melting*. Biochem. Soc. Trans. 37, 433–437; <https://doi.org/10.1042/BST0370433>
- Vijayalakshmi, I., Rao, S., Chug, R. & Perloff, J. (2019). *Comprehensive Approach To Congenital Heart Diseases*. 2a ed. Editorial Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Waleh, N., Barrette, A., Dagle, J., Momany, A., Jin, C., Hills, N., Shelton, E., Reese, J. & Clyman, R. (2015). *Effects of advancing gestation and non-caucasian race on ductus arteriosus gene expression*. J Pediatr 167(5), 1033–1041. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.07.011>.
- Wigerup, C., Pålman, S., & Bexell, D. (2016). *Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer*. Pharmacol & Ther 164, 152–169. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.009>.
- Wu, D. & Rastinejad, F. (2016). *Structural characterization of mammalian bHLH-PAS transcription factors*. Curr Opin Struct Biol. 43, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.09.011>.
- Wu, L., Xu, S., Teng, J., Wu, W.; Ye, D. & Wu, X. (2008). *Differential response of human fetal smooth muscle cells from arterial duct to retinoid acid*. Acta Pharmacol. Sin. 29(4), 413–420. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00766.x>.
- Yang, E., Song, E., & Choi, Y. (2013). *Comparison of oral ibuprofen and intravenous indomethacin for the treatment of patent ductus arteriosus in extremely low birth weight infants*. J Pediatr (Rio J) 89(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.02.006>
- Yokoyama, U., Minamisawa, S., Adachi-Akahane, S., Akaike, T., Naguro, I., Funakoshi, K., Iwamoto, M., Nakagome, M., Uemura, N., Hori, H., Yokota, S. & Ishikawa, Y. (2006). *Multiple transcripts of Ca₂ channel 1-subunits and a novel spliced variant of the 1C-subunit in rat ductus arteriosus*. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290(4), 1660 –1670. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00100.2004>.
- Yokoyama, U., Sato, Y., Akaike, T., Ishida, S., Sawada, J., Nagao, T., Quan, H., Jin, M., Iwamoto, M., Yokota, S. & Susumu, Y. (2007). *Maternal vitamin A alters gene profiles and structural maturation*



of the rat ductus arteriosus. *Physiol. Genom.*, 31(1), 139–157.
<https://doi.org/10.1152/fisiolgenómica.00007.2006>.

Young, J., Williams, D. & Thompson, A. (2019). *Thin Air, Thick Vessels: Historical and Current Perspectives on Hypoxic Pulmonary Hypertension.* *Front. Med.* 6, 93
<https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00093>.

Yu, Z., Han, Y., Chen, D., Zhang, X. & Chang R. (2016). *Association between genetic polymorphisms of HIF-2 α gene and high altitude pulmonary hypertension in Han population.* *Z Safflower Medical Journal* 96(40), 3213-3217. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.40.003>.

Zhao Y., Zhang Z., Liu L., Zhang Y., Fan X., Ma L., Li J., Zhang Y., He H. & Kang L. (2017). *Associations of high altitude polycythemia with polymorphisms in EPAS1, ITGA6 and ERBB4 in Chinese Han and Tibetan populations.* *Oncotarget* 8(49), 86736-86746.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21420>.



XI. URLS CONSULTADOS

➤➤ URL	E n l a c e	➤ Fecha de consulta
➤➤ URL1	https://www.medicalexpo.es/prod/st-jude-medical/product-70886-518350.html	➤ 09/10/19
➤➤ URL2	http://colmediks.com/productos/dispositivos-oclusores/nit-occlud-coil/	➤ 09/10/19
➤➤ URL3	https://www.stanfordchildrens.org/es/topic/default?id=fetalcirculation-90-PO4893	➤ 09/10/19
➤➤ URL4	https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPAS1#location	➤ 27/10/19
➤➤ URL5	https://www.wikipathways.org/index.php/WikiPathways	➤ 03/11/19
➤➤ URL6	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi	➤ 20/06/19
➤➤ URL7	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/	➤ 25/08/19
➤➤ URL8	https://www.mutalyzer.nl/	➤ 31/07/19
➤➤ URL9	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	➤ 01/12/19
➤➤ URL10	http://umd.be/Redirect.html	➤ 22/11/19
➤➤ URL11	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi	➤ 10/04/20
➤➤ URL12	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/	➤ 02/02/20
➤➤ URL13	https://omim.org/	➤ 06/02/20
➤➤ URL14	https://www.ebi.ac.uk/interpro/	➤ 14/03/20



XII. ANEXOS

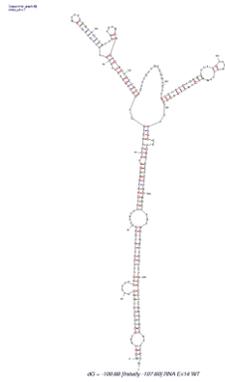
XII. 1. Anexo 1. Cebadores utilizados para secuenciación de *EPAS1*.

Exón	Sentido	Secuencia	Tm Teórica (°C)
1	Forward	5'-GACGGAGTTTTTAAAGTGGGCTG-3'	67.8
	Reverse	5'-AGCACTCTTCTCCCAACCACTCT-3'	
2	Forward	5'-TAACCTTCCGGGACTAACCC-3'	62.2
	Reverse	5'-GGTCCCCTGCATATAGGAACAT-3'	
3	Forward	5'-CAGATGGTTGGCAGTATGCG-3'	64.4
	Reverse	5'-GGCATTTCAGGGAGAGGTC-3'	
4	Forward	5'-CCACAGGTGCTAAGAGAGCA-3'	67.8
	Reverse	5'-CTGATGTTGCCCTACCTTCCA-3'	
5	Forward	5'-GTGTTGATGGCAGACCACAG-3'	66.3
	Reverse	5'-GGTCAGACATGGAGCCGAGA-3'	
6	Forward	5'-GTCCCAGGTGTAGGGTAACG	62.2
	Reverse	5'-CACACACACAGGTAAGACCCA-3'	
7	Forward	5'-GGAACAACAGGGGTTTGGT-C'	64.4
	Reverse	5'-CCACTCAAGGCCACATACCA-3'	
8	Forward	5'-CATGCGATCTGCTGAGCCT-3'	67.8
	Reverse	5'-CCCCACATACCCTGCACCAA-3'	
9	Forward	5'-AACAGGATCCGAAACAGACATACA-3'	64.4
	Reverse	5'-ATAGTAAGAACTTCTCCAGCCCC-3'	
10	Forward	5'-CTTAGGGCCTTCTCTGCGGTTTTT-3'	57.3
	Reverse	5'-ACTCTAGGGGGCTCTGTGATAACC-3'	
11	Forward	5'-ACTCTGTCCCCCTCCTTCTGGC-3'	66.3
	Reverse	5'-GGCCAAACGTCTCCAAGTCTTT-3'	
12	Forward	5'-TGTCTCCCCTCAGACGGATTCAA-3'	64.4
	Reverse	5'-TACTAGTGGGTGCCTCTCGGTTTCG-3'	
13	Forward	5'-GCCTTTTGGGTCTTTGAGTCATCA-3'	62.2
	Reverse	5'-CCACATCCCCACCCCTCTCAGCA-3'	
14	Forward	5'-GCCAGCAAGTGCCAGCCCTGTTC-3'	66.3
	Reverse	5'-CTCCCAGCCCCAGTCCTTCCA-3'	
15	Forward	5'-AAGGTTGGCTGTAGTTCTGGTGAC-3'	54.9
	Reverse	5'-ACTGTGCAGACGCTGGAAAAAAA-3'	
16	Forward	5'-TATCCCCAGTCACAAAGAAGTAG-3'	53.1
	Reverse	5'-CAAAATTTAAGAACATTTCAGAACA-3'	

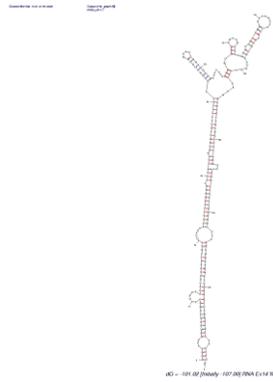


XII. 2. Anexo 2. Estudio con RNAfold.

Resultados del análisis *in silico* de los posibles plegamientos del exón 14 de una secuencia consenso.



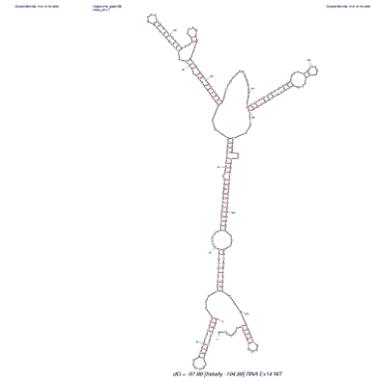
Plegamiento 1



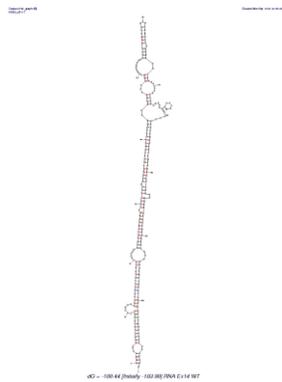
Plegamiento 2



Plegamiento 3



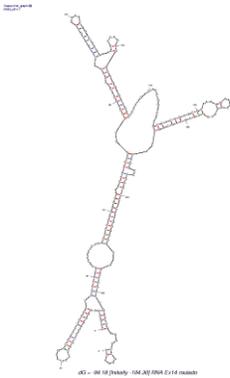
Plegamiento 4



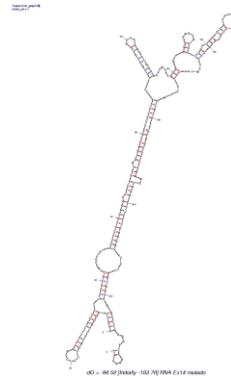
Plegamiento 5



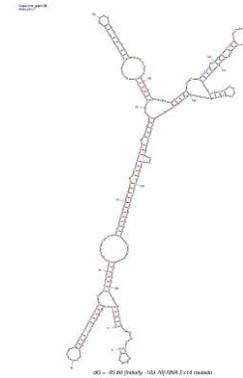
Resultados del análisis *in silico* de los posibles plegamientos del exón. 14 de la secuencia alterada.



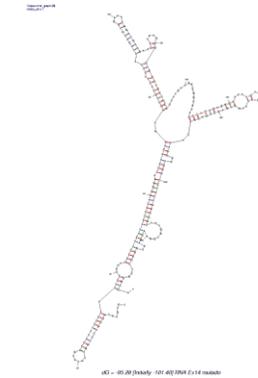
Plegamiento 1



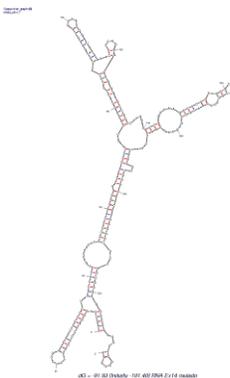
Plegamiento 2



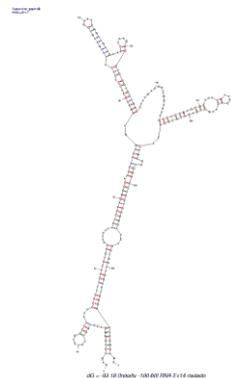
Plegamiento 3



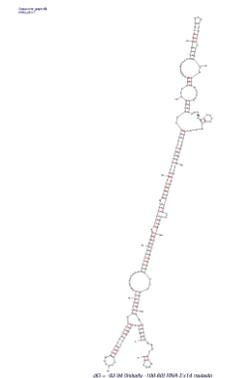
Plegamiento 4



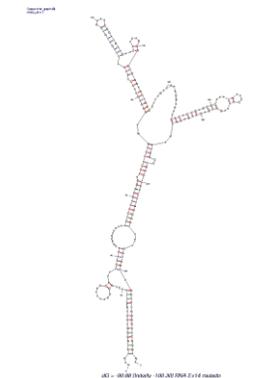
Plegamiento 5



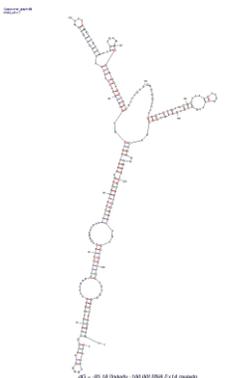
Plegamiento 6



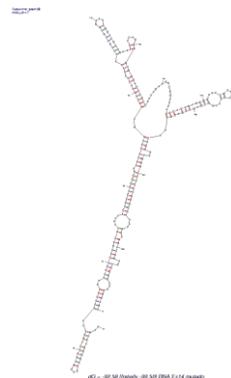
Plegamiento 7



Plegamiento 8



Plegamiento 9



Plegamiento 10