



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**“PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD”**

**“FACULTAD DE MEDICINA”**

**“HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**“DETERMINACIÓN DE GENES CANDIDATOS MEDIANTE BÚSQUEDA  
DIRIGIDA Y BARRIDO GÉNICO EN UNA FAMILIA MEXICANA CON  
CONEXIÓN ANÓMALA TOTAL DE VENAS PULMONARES”**

**HIM-2015-036**

**TESIS**

Para optar por el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS**

Presenta:

**MARYANGEL PEREA CABRERA**

Tutora:

**DRA. ROCÍO SÁNCHEZ URBINA**

Programa de maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Hospital Infantil de  
México “Federico Gómez”

Ciudad de México, Agosto de 2023



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**

**TESIS**



**“PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD”  
FACULTAD DE MEDICINA  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**“DETERMINACIÓN DE GENES CANDIDATOS MEDIANTE  
BÚSQUEDA DIRIGIDA Y BARRIDO GÉNICO EN UNA  
FAMILIA MEXICANA CON CONEXIÓN ANÓMALA TOTAL  
DE VENAS PULMONARES”**

**HIM-2015-036**

**TESIS**

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS MÉDICAS**

Presenta:

**MARYANGEL PEREA CABRERA**

Tutora:

**DRA. ROCÍO SÁNCHEZ URBINA**

Ciudad de México, agosto de 2023

**COMITÉ TUTORIAL**

  
DRA. ROCÍO SÁNCHEZ URBINA

TUORA

  
DR. JAVIER TADEO GRANADOS RIVERÓN

COMITÉ TUTORIAL

DRA. GLORIA QUEIPO GARCÍA

COMITÉ TUTORIAL

  
DR. JUAN GARDUÑO ESPINOSA

RESPONSABLE DE UNIDAD ACADÉMICA

## **INTEGRANTES DEL JURADO**

### **PRESIDENTE**

**Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz**

### **SECRETARIO**

**Dr. Alberto Hidalgo Bravo**

### **VOCAL**

**Dra. Rocio Sánchez Urbina**

### **VOCAL**

**Dr. Javier Tadeo Granados Riveron**

### **VOCAL**

**Dr. Carlos Galaviz Hernández**



## DECLARATORIA

Durante los estudios de doctorado, realización del manuscrito y la realización de este trabajo de tesis, se contó con el apoyo de la beca CONACYT para posgrado (CVU 402272) y de Fondos Federales obtenidos a través de la convocatoria de la dirección de investigación del Hospital Infantil de México Federico Gómez.



## DEDICATORIA

Para todas las personas que participaron en poder realizar este sueño a pesar de los retos que enfrentamos a lo largo de esta etapa. A mi familia, mi mamá, mi papá y mis hermanos que me apoyaron en todo momento; a mi tutora Rocío, que tuvo toda la paciencia para impulsarme a lograrlo. A aquellos que ya no están, pero sé que me siguen cuidando y animando y para todos los que se han sumado para poder llegar a este momento. Al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y sus grandes profesionales a quienes pude llamar maestros y amigos y que me dejaron enorgullecerme de pertenecer a esta familia y a los pacientes que me permitieron tener el gusto de cuidarlos y aprender de ellos para dar un poco más de luz a la investigación en cardiogenética.

Mi más sincero agradecimiento a cada uno de ustedes hoy y siempre.



# ÍNDICE

I.	RESUMEN.....	8
II.	MARCO TEÓRICO.....	13
	GENERALIDADES .....	13
	DESARROLLO EMRIONARIO DE LAS VENAS PULMONARES. ....	17
	BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS.....	18
	ETIOLOGÍA DE LA CATVP: .....	24
	GENES CANDIDATOS PREVIAMENTE REPORTADOS ASOCIADOS A CATVP AISLADA:.....	25
	GENES CANDIDATOS PARA CATVP AISLADA, EN POBLACIÓN MEXICANA: .....	28
III.	ANTECEDENTES. ....	33
IV.	DISEÑO DEL ESTUDIO Y METODOLOGÍA.....	38
	DISEÑO DEL ESTUDIO.....	38
V.	METODOLOGÍA: .....	41
VI.	METODOLOGÍA FASE 1. ....	42
VII.	ANÁLISIS FASE 1. ....	53
VIII.	METODOLOGÍA FASE 2. ....	61
IX.	ANÁLISIS FASE 2. ....	69
X.	DISCUSIÓN .....	82
	SÍNDROME DE OPITZ 1. ....	82
	PROTEINA MIDLINE 1 .....	82
XI.	CONCLUSIÓN.....	87
XII.	PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES ASOCIADAS.....	88
XIII.	ANEXOS.....	89
XIV.	BIBLIOGRAFÍA.....	94

## RESUMEN

La conexión anómala total de venas pulmonares (CATVP) en nuestro país es una de las Cardiopatías Congénitas (CC) complejas más frecuentes, en población hispana la incidencia es 7.9 veces mayor que en población anglosajona. Su etiología aún no se conoce con certeza; no obstante, se han reportado algunas familias con la CC y herencia autosómica dominante, autosómica recesiva y ligada al cromosoma X. La CATVP también ha sido asociada a múltiples variantes génicas, presentando una amplia heterogeneidad y particularmente en las poblaciones latinas incluyendo la mexicana no existen reportes de genes que pueden causarla.

La búsqueda de genes candidatos, en general se puede hacer de forma masiva, cuando se desconocen los genes causales y se basa en el uso de técnicas de secuenciación masiva o dirigida, considerando los genes y secuencias previamente descritos o con alta sospecha secundario a su función, siendo de utilidad los paneles o secuenciaciones de tipo Sanger de genes sospechosos. Al respecto se encontró una familia consanguínea tío-sobrino y dos hijos concordantes para la CATVP, Previamente nuestro grupo de investigación realizó un estudio de mapeo de autocigosidad en la familia para determinar la presencia de variantes en genes recesivos localizando una región homocigota en el

locus 4q13 y un gen candidato *EPHA5*, sin que se asociara previamente a CATVP.

**JUSTIFICACIÓN:** En México las CC son responsables del 55% de las defunciones por malformaciones en niños menores de un año, la CATVP es más frecuente en nuestro medio que en otras poblaciones y es causa de tratamiento médico y quirúrgico obligatorio. Sin embargo, se sabe poco respecto a las causas genéticas, particularmente en poblaciones no caucásicas. Al encontrar variantes asociados a su desarrollo, seremos capaces de proponer el estudio genético de las familias mexicanas con afectados de CATVP y proporcionar asesoramiento adecuado.

**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:** La alta incidencia en nuestra población, así como la recurrencia observada en distintas familias sugieren una influencia genética importante en la etiología de la CATVP, es por ello por lo que la descripción de los genes asociados puede modificar de manera importante el manejo de las familias afectadas al poder determinar riesgos de recurrencia basados en el genotipo de los pacientes. Al momento actual no se ha descrito ningún gen asociado a CATVP en poblaciones latinas o mexicana.

**PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:** ¿Existirán variantes génicas que pudieran explicar el desarrollo de CATVP en una familia mexicana?

**PREGUNTAS SECUNDARIAS:** ¿Existirán variantes en el gen *EPHA5* en la familia índice?, ¿Existirán variantes en otros genes que pudieran relacionarse con el desarrollo de la CATVP aislada, en la familia índice?

**OBJETIVO GENERAL:** Determinar si existen variantes en el genoma de una familia mexicana que pueda explicar la presencia de CATVP.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS:** 1.- Determinar variantes patogénicas en el gen *EPHA5* en una familia consanguínea de pacientes con CATVP. 2.- Identificar variantes en la región 4q13 y otras regiones génicas que pudieran explicar la presencia de CATVP.

**HIPÓTESIS:** Existen variantes génicas patogénicas asociadas a la CATVP en una familia mexicana. A) Existen variantes patogénicas de pérdida de función en el gen *EPHA5* en el propósito. B) Existen variantes patogénicas en otros genes previamente descritos asociados a la patología en el propósito. C) Existen variantes patogénicas en genes previamente no asociadas a la patología en el propósito.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** Se realizó una búsqueda dirigida de variantes del gen *EPHA5* del propósito mediante reacciones en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación Sanger para los 18 exones del gen *EPHA5*. De manera simultánea se procedió a una búsqueda de genes candidatos mediante barrido genómico que incluyó un panel

cardiovascular de 380 genes asociados a CC y secuenciación de exoma completo en el paciente afectado.

**ANÁLISIS:** Para cada variante descubierta de acuerdo a sus características se consultaron bases de datos (The Genome Aggregation Database (*gnomAD*), 1000 genomes, Exome Variant Server (EVS), HapMap, dbSNP, etc.) lo cual permitió conocer su novedad y frecuencia. Para predecir el potencial patogénico de la variante se utilizaron las plataformas Mutation Taster, DANN, FTHMM MKL Coding y FTHMM MKL no Coding. La conservación de la proteína se estudió mediante alineamiento en la plataforma Ensembl genome browser 95 entre el genoma humano de referencia GRCh38 y genomas de 10 especies diferentes. En variantes comunes y que no suponían una relación patogénica directa se determinaron las frecuencias alélicas y genotípicas en población mexicana cuando estaban disponibles.

**RESULTADOS:** La búsqueda dirigida no reveló variantes patogénicas en las regiones codificantes del gen *EPHA5*. El panel cardiovascular no mostró alteraciones en los 380 genes previamente descritos asociadas a cardiopatías congénitas. Se descubrió una variante probablemente patogénica en el gen *MIDI* del propósito mediante secuenciación de segunda generación (NSG), reveló una transición de 608G>A, que genera un cambio de arginina por glutamina en la posición 206 de la proteína y que resulta en una mutación de sentido equivocado previamente descrita en dos mujeres latinas sanas en el gen *MIDI*, afectando al dominio b-box 2 y por lo tanto la función proteica, El

fenotipo es concordante con el SO. La madre del paciente es portadora de la mutación.

**CONCLUSIÓN:** Se encontró una nueva variante probablemente patogénica en *MIDI* c.608G>A asociada al síndrome de Opitz tipo I.

**PALABRAS CLAVE:** Conexión anómala total de venas pulmonares, Búsqueda de genes candidatos, secuenciación de siguiente generación.

# MARCO TEÓRICO.

## GENERALIDADES

Las cardiopatías congénitas (CC), se definen como aquellos trastornos estructurales o funcionales del corazón o los grandes vasos y son el defecto congénito más común al nacimiento, con una incidencia que varía en el mundo entre 6 y 19 por cada mil nacidos vivos<sup>1</sup>, en México, si bien no existen cifras oficiales, se estima que las CC, se presentan en 6 a 8 por cada mil nacidos vivos<sup>2,3</sup>, lo cual representa alrededor de 12,000 casos por año<sup>4,5</sup>. Las estadísticas de mortalidad presentadas por el Instituto Nacional de estadística, Geografía e informática (INEGI), demuestran que las CC abarcan aproximadamente el 12.5% de las causas de muerte de los niños menores de 1 año<sup>6</sup>. A pesar de que la mortalidad global en este grupo de edad ha disminuido notablemente desde el año 1990 cuando inicio su documentación en el país, las CC, no han presentado una disminución significativa a pesar de tratamientos quirúrgicos y médicos más avanzados.<sup>6</sup> (figura 1).

La conexión anómala total de venas pulmonares (CATVP) se define como la alteración estructural en que las venas pulmonares no tienen una conexión con el atrio izquierdo, condicionando que las mismas se conecten directamente a los sistemas de venas o drenen en el atrio derecho y tiene un índice de mortalidad del 85% en el primer año sin tratamiento quirúrgico<sup>7</sup>. De acuerdo a la clasificación de Darling, la

CATVP se divide por el sitio de desembocadura de las venas pulmonares<sup>8</sup>, siendo la variante más frecuente la forma supracardiaca, abarcando aproximadamente el 50% de los casos<sup>9, 10</sup>.

La frecuencia reportada de esta patología en series de pacientes con cardiopatía congénita (CC) a nivel internacional se encuentra entre 1.5% al 3.6%<sup>11</sup>, con una incidencia variable en diversas poblaciones, afectando aproximadamente a 2.5 por cada 100,000 recién nacidos vivos en población no hispana y de 19.8 por cada 100,000 nacidos vivos hispanos<sup>12</sup>, principalmente en varones<sup>10</sup>. En contraste, en nuestro país la CATVP es una de las CC complejas más frecuentes, situándose en el segundo lugar en frecuencia, únicamente superada por la Tetralogía de Fallot<sup>13</sup>. La CATVP ocupó el cuarto lugar dentro de los procedimientos quirúrgicos para corrección de CC realizados en México en el periodo 2011-2012<sup>13</sup>, no obstante, las 3 primeras cardiopatías intervenidas corresponden a formas simples de CC.



## Mortalidad en menores de 1 año 2017 (25,456)

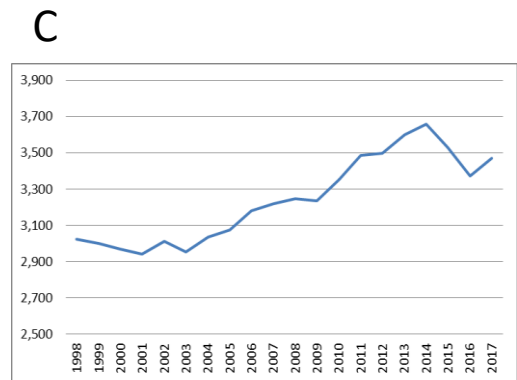
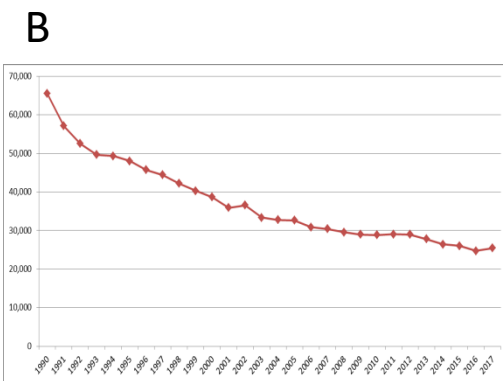
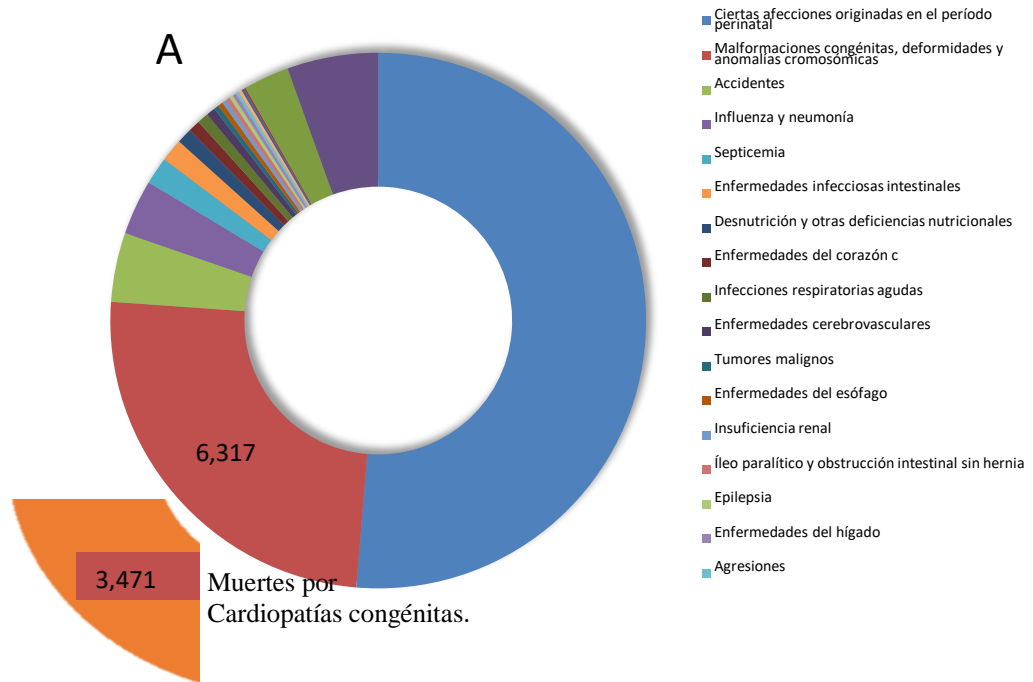


Figura 1. Mortalidad en menores de un año en México. A) Mortalidad por causa de muerte en menores de un año 2017, nótese 6,317 muertes por malformaciones congénitas, de las cuales 3,471 corresponden a Cardiopatías congénitas. B) Mortalidad general en menores de un año 1990-2017, se aprecia una disminución significativa en este rubro a lo largo del tiempo, mismo que contraste con la Mortalidad por cardiopatías congénitas en menores de un año 1990-2017 ©, misma que incluso se ha incrementado.

En el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se reciben aproximadamente 40 casos nuevos anuales, la mayoría de los casos reportados son de presentación aislada (68%), con predominancia en el sexo masculino (61%), lo cual es concordante con la literatura<sup>10</sup>.

<b>Clasificación de Darling</b>	
Tipo I	Nivel supracardiaco (vena cava superior, cayado de la vena ácigos, vena innominada y vena cava superior izquierda persistente).
Tipo II	Nivel cardiaco (seno coronario o directamente al atrio derecho, o ambos).
Tipo III	Nivel infracardiaco (vena porta, venas hepáticas, <i>ductus venosus</i> , venas gástricas o vena cava inferior)
Tipo IV	Tipo mixto (dos o más de los tres niveles previos)

Tabla 1. Tabla 1 Clasificación de Darling para la Conexión anómala total de venas pulmonares (Modificado de Attie; et. Al)

## DESARROLLO EMRIONARIO DE LAS VENAS PULMONARES.

El sistema vascular se desarrolla principalmente a partir de las células endoteliales derivadas del mesodermo, que se diferencia a partir de angioblastos, mismos que migran y se agregan para formar “cordones”, que comienzan a formar vasos de distintos calibres mediante la diferenciación de células musculares lisas y pericitos<sup>14</sup>, a través de la expresión de factores de crecimiento de fibroblastos (FGF), integrinas, colágeno, cadherinas vasculares endoteliales y factores de crecimiento vascular endotelial, entre otras<sup>14</sup>. Las venas pulmonares comienzan a desarrollarse en la cuarta semana de gestación (25-27 días de vida intrauterina), con la formación de una evaginación endotelial en la porción dorsal izquierda de la aurícula común, que forma la Vena Pulmonar Común (VPC). En la sexta semana de gestación la VPC se une al plexo pulmonar, esta absorción genera la división de la vena común en dos ramas (izquierda y derecha), que se dividirán para generar 4 ramas alrededor de la semana 8 de gestación<sup>15</sup>.

Se ha descrito que la CATVP se origina por la falla en el desarrollo de la VPC<sup>10</sup> y se consideran tres posibles mecanismos para explicar su origen embrionario, basándose en estudios patológicos: agenesia, involución y atresia, siendo esta última la causa menos frecuente<sup>16</sup>.

## BÚSQUEDA DE GENES CANDIDATOS.

Para la búsqueda de genes candidatos existen dos formas de abordaje general, de acuerdo con la existencia de información sobre un gen o genes que pudieran ser asociados con la etiología de la patología o no. Cuando se identifica un gen o genes que pueden relacionarse de manera previa, ya sea por reportes en ciencias básicas, reportes de casos o asociación fisiopatológica (la función del gen justifica el desarrollo de la enfermedad), se pueden realizar estudios de búsqueda dirigida (EBD), mientras que si no se cuenta con esta sospecha deberán de realizarse estudios de barrido genómico (EBG), los cuales permiten tener una hipótesis libre, es decir desconocer en su totalidad el gen o locus asociado<sup>17-19</sup>. Cada uno de los abordajes tiene ventajas y limitaciones (tabla 2).

<b>ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN GENÉTICA</b>	
<b>BUSQUEDA DIRIGIDA</b>	<b>BARRIDO GÉNICO</b>
Basada en hipótesis	Hipótesis libre
Costo bajo	Costo alto al requerir estudios moleculares complejos
Interpretación sencilla (solo se analizan las secuencias previamente propuestas)	Interpretación compleja (Se analizan grandes regiones génicas o genoma completo)
Menos falsos positivos	Más falsos positivos

Tabla 2. Características de los estudios de asociación genética.

Si se opta por EBD, generalmente se realiza una reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación subsecuente de acuerdo con las características del gen, siendo de elección la de punto final (Sanger), que permite observar la composición nucleica de la región

comprendida entre 2 oligonucleótidos cebadores (primers) elegidos o diseñados por el investigador. Una vez realizada la secuenciación las variantes encontradas deberán ser sometidas a análisis para determinar su papel en la etiología de la patología<sup>17,18</sup>.

En el caso de los EBG, se desconoce cuál o cuáles genes están involucrados en la patología, y por tanto requieren el análisis de grandes segmentos del genoma con el uso de estudios moleculares capaces de ser utilizados para este fin. La elección de las pruebas moleculares requiere establecer una estrategia basándose en parámetros, como la cantidad de pacientes afectados en una población (GWAS), la existencia de un patrón de herencia en una familia dada (estudios de ligamiento o estudios de pérdida de homocigocidad), o incluso los recursos económicos y técnicos disponibles (secuenciación en paralelo de segunda y tercera generación).

En la actualidad los estudios más utilizados son los de secuenciación de siguiente generación (NGS), en sus modalidades de panel génico, secuenciación de exoma y secuenciación del genoma completo. Los EBG tienden a tener costos más elevados y requieren una cantidad considerable de pruebas para el análisis de las variantes que pueden incluir análisis funcional *in silico*, pruebas estadísticas poblacionales o experimentos más complejos como modelos en tejidos o animales, lo cual eleva la posibilidad de encontrar falsos positivos<sup>17,18,20,21</sup>.

Los estudios de búsqueda de genes candidatos en cualquiera de sus variedades permiten la identificación de variantes en la secuencia génica y desde el año 2017 se ha obligado a reclasificar las mismas de acuerdo al efecto sobre el producto génico, su expresión y principalmente su asociación en relación con la etiología de una patología determinada. De acuerdo con la Human Genome Variation Society (HGVS)<sup>22</sup> y a las recomendaciones del Colegio Americano De Genética Médica y Genómica en asociación con el Colegio De Patología Molecular de estados Unidos<sup>23,24</sup>, esta clasificación ordena a las variantes en 5 categorías:

- **Variable benigna o no patogénica (VNP):** Tipo de cambio en la secuencia del ADN que no se ha asociado mediante estudios biológicos o *in silico* con cambios en la expresión o estructura del producto funcional y por ende no se relacionan con la etiología de una enfermedad.
- **Variable probablemente benigna o probablemente no patogénica (VPNP):** Tipo de cambio en la secuencia del ADN que en la que la evidencia actual mediante estudios biológicos o *in silico* sugieren que no genera cambios en la expresión o estructura del producto funcional y por ende no se relacionan con la etiología de una enfermedad, sin embargo, aún se requieren más estudios para demostrarlo.
- **Variante de significado incierto (VUS):** Tipo de cambio en la secuencia de ADN en la cual no se cuenta con ninguna evidencia

sobre el potencial patogénico de la misma, es común clasificar así a cambios que nunca se han descrito. La realización de estudios biológicos o *in silico*, permiten su reclasificación en otra categoría

- **Variante probablemente patogénica (VPP):** Tipo de cambio en la secuencia del ADN que en la que la evidencia actual mediante estudios biológicos o *in silico* sugieren que genera cambios en la expresión o estructura del producto funcional y por ende se relacionan con la etiología de una enfermedad, sin embargo, aún se requieren más estudios para demostrarlo.
- **Variante patogénica (VP):** Tipo de cambio en la secuencia del ADN que se ha asociado mediante estudios biológicos o *in silico* con cambios en la expresión o estructura del producto funcional y por ende se relacionan con la etiología de una enfermedad.

Dentro de estas variantes patogénicas se pueden clasificar de acuerdo con la evidencia de patogenicidad como se describe en la tabla 3. Además, los criterios se combinan de acuerdo con las reglas de puntuación de la tabla 4, para elegir una clasificación del sistema de cinco niveles <sup>24</sup>.

Tabla 3: Criterios de clasificación de las variantes patógenas

-Evidencia de patogenicidad	Categoría
Muy fuerte:	<p>Variante PVS1 nula (sin sentido, cambio de marco, <math>\pm 1</math> o 2 sitios de empalme canónicos, codón de iniciación, delección de uno o varios exones) en un gen en el que la LOF es un mecanismo conocido de la enfermedad.</p> <p>delección) en un gen en el que la LOF es un mecanismo conocido de la enfermedad. Advertencias:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cuidado con los genes en los que LOF no es un mecanismo de enfermedad conocido (por ejemplo, GFAP, MYH7).</li> <li>- Tenga cuidado al interpretar variantes LOF en el extremo 3' de un gen.</li> <li>- Tenga cuidado con las variantes de empalme que se prevé que conducen a la omisión de exón pero dejan el resto de la proteína intacta.</li> </ul>
Fuerte:	<p>PS1 Mismo cambio de aminoácido que una variante patógena previamente establecida, independientemente del cambio de nucleótido. Ejemplo: Val <math>\rightarrow</math> Leu causada por G&gt;C o G&gt;T en el mismo codón Advertencia: cuidado con los cambios que afectan al empalme y no al nivel de aminoácidos/proteínas.</p> <p>PS2 De novo (confirmación tanto de la maternidad como de la paternidad) en un paciente con la enfermedad y sin antecedentes familiares Nota: La confirmación de la paternidad únicamente es insuficiente. La donación de óvulos, la maternidad subrogada, los errores en la transferencia de embriones, etc., pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad. transferencia de embriones, etc., pueden contribuir a la no paternidad.</p> <p>PS3 Estudios funcionales bien establecidos in vitro o in vivo que apoyen un efecto perjudicial en el gen o productogénico. Nota: Los estudios funcionales que han sido validados y han demostrado ser reproducibles y sólidos en un entorno de laboratorio de diagnóstico clínico se consideran los más fiables. de diagnóstico clínico se consideran los mejor establecidos.</p> <p>PS4 La prevalencia de la variante en los individuos afectados aumenta significativamente en comparación con la prevalencia en los controles Nota 1: El riesgo relativo u OR, obtenido a partir de estudios de casos y controles, es <math>&gt;5,0</math>, y el intervalo de confianza en torno a la estimación del riesgo relativo u OR no incluye 1,0. Véase el artículo para una orientación detallada. Nota 2: En los casos de variantes muy raras en los que los estudios de casos y controles pueden no alcanzar significación estadística, la observación previa de la variante en múltiples pacientes no relacionados con el mismo fenotipo, y su ausencia en controles, puede utilizarse como nivel de evidencia moderado.</p>
Moderado:	<p>PM1 Situado en un punto caliente mutacional y/o dominio funcional crítico y bien establecido (por ejemplo, sitio activo de una enzima) sin variación benigna</p> <p>PM2 Ausente en los controles (o con una frecuencia extremadamente baja si es recesiva) en el Proyecto de Secuenciación del Exoma, proyecto de 1000 genomas o Consorcio de agregación de exomas Advertencia: Los datos poblacionales para inserciones/delecciones pueden ser mal llamados por secuenciación de nueva generación.</p> <p>PM3 Para trastornos recesivos, detectados en trans con una variante patogénica Nota: Esto requiere pruebas de los padres (o descendientes) para determinar la fase.</p> <p>PM4 Cambios en la longitud de la proteína como resultado de delecciones/inserciones dentro del marco en una región no repetida o variantes stop-loss.</p> <p>PM5 Nuevo cambio de sentido erróneo en un residuo de aminoácido en el que ya se ha observado un cambio de sentido erróneo diferente que se ha determinado que es patogénico que se ha observado anteriormente. Ejemplo: Arg156His es patógeno; ahora se observa Arg156Cys</p>
Soporte:	<p>PP1 Cosegregación con enfermedad en múltiples miembros de la familia afectados en un gen definitivamente conocido como causante de la enfermedad. Nota: Puede utilizarse como prueba más sólida con datos de segregación crecientes</p> <p>PP2 Variante sin sentido en un gen que tiene una tasa baja de variación sin sentido benigna y en el que las variantes sin sentido son un mecanismo común de enfermedad</p> <p>PP3 Múltiples líneas de evidencia computacional apoyan un efecto deletéreo en el gen o producto génico (conservación, evolución, impacto en el empalme, etc.) Advertencia: Dado que muchos algoritmos in silico utilizan los mismos datos o datos muy similares para sus predicciones, cada algoritmo no debe considerarse como un algoritmo un criterio independiente. El PP3 sólo puede utilizarse una vez en cualquier evaluación de una variante.</p> <p>PP4 El fenotipo del paciente o los antecedentes familiares son altamente específicos para una enfermedad con una única etiología genética</p> <p>PP5 Fuente reputada informa recientemente de que la variante es patogénica, pero el laboratorio no dispone de las pruebas para realizar una evaluación independiente</p>



Tabla 4. Reglas para combinar criterios para clasificar secuencias

Evidencia de patogenicidad	Categoría
Patogénico:	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Muy fuerte (PVS1) y               <ul style="list-style-type: none"> <li>a) <math>\geq 1</math> Fuerte (PS1-PS4) o</li> <li>b) <math>\geq 2</math> Moderado (PM1- PM6) o</li> <li>c) 1 Moderado (PM1-PM6) y 1 de soporte (PP1-PP5) o</li> <li>d) <math>\geq 2</math> de soporte (PP1-PP5)</li> </ul> </li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Fuerte (PS1-PS4) o</li> <li>(iii) 1Fuerte (PS1-PS4) y               <ul style="list-style-type: none"> <li>a) <math>\geq 3</math> Moderado (PM1-PM6) o</li> <li>b) 2 Moderado (PM1-PM6) AND <math>\geq 2</math> de apoyo(PP1-PP5) OR</li> <li>c) 1 Moderado (PM1-PM6) Y <math>\geq 4</math> de</li> </ul> </li> </ul>
Probablemente patogénico	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Muy fuerte (PVS1) Y 1 moderado (PM1-PM6) o</li> <li>(ii) 1 Fuerte (PS1-PS4) Y 1-2 moderada(PM1-PM6) o</li> <li>(iii) 1 Fuerte (PS1-PS4) Y <math>\geq 2</math> de soporte(PP1-PP5) OR</li> <li>(iv) <math>\geq 3</math> Moderado (PM1-PM6) o</li> <li>(v) 2 Moderado (PM1-PM6) AND <math>\geq 2</math> de soporte (PP1-PP5) o</li> <li>(vi) 1 Moderada (PM1-PM6) Y <math>\geq 4</math> de soporte (PP1-PP5)</li> </ul>
Benigno	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 independiente (BA1) o</li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Fuerte (BS1-BS4)</li> </ul>
Probablemente benigno	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Fuerte (BS1-BS4) y 1 de soporte (BP1- BP7) o</li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> de soporte</li> </ul>
Significado incierto:	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) No se cumplen otros criterios mostrados anteriormente o</li> <li>(ii) Los criterios de benignidad y patogenicidad son contradictorios</li> </ul>

## ETIOLOGÍA DE LA CATVP:

Si bien se ha descrito la presencia de CATVP en asociación con diferentes síndromes genéticos bien definidos y por ende con variantes patogénicas en genes específicos<sup>1,25</sup>, en la mayor parte de los pacientes se presenta de forma aislada, es decir, la única característica clínica es la CC, haciendo sospechar una herencia multifactorial en donde factores ambientales y genéticos potencialmente favorecen la aparición de la misma, sin embargo ninguno de los 2 componentes se ha dilucidado del todo y solo en algunas ocasiones se ha podido confirmar de manera directa su relación con la malformación. La alta incidencia en poblaciones hispanas ha abierto la posibilidad de que la heredabilidad de la patología tenga un componente genético más alto.

Dentro de los factores ambientales que se han descrito en la literatura se encuentran la exposición materna a solventes orgánicos<sup>25</sup> y recientemente asociado a obesidad materna con un OR de 3.6 en población mexicana<sup>26</sup>.

En lo referente a las causas genéticas se han descrito previamente algunos genes con patrones de herencia identificables como se explica más adelante, sin embargo, debido a la gran heterogeneidad genética de la CATVP el descubrimiento de nuevas variantes genéticas sigue siendo una posibilidad latente, como la

variante que se describió en población mexicana, por este mismo equipo como proyecto de maestría.

## GENES CANDIDATOS PREVIAMENTE REPORTADOS ASOCIADOS A CATVP AISLADA:

En lo que respecta al origen genético de la CATVP, existen pocos genes que se han podido asociar a la forma aislada de la enfermedad y en ningún caso se han descrito en población mexicana o latinoamericana. Se incluyen los siguientes:

- **TAPVRI.** (Total Anomalous Pulmonary Venous Return 1) Descrito en 1994, se identificó mediante análisis de ligamiento en una familia con 14 afectados con CATVP aislada (familia Utah-Idaho)<sup>27,28</sup>. Esta localizado en 4q12, en las coordenadas genómicas 4:51,800, 000-58, 500,000, cuenta con una forma de herencia autosómica dominante y penetrancia del 40%. TAPVR 1, se ha caracterizado por presentar un efecto fundador, que se demostró debido a que tanto la familia Utah-Idaho descrita originalmente, como las demás familias identificadas en el área de forma posterior por Ward, et al., contaban con una ancestría rastreable a Escocia, con un efecto fundador claro.

- ***ANKRD1*** (Ankyrin Repeat Domain-Containing Protein 1) Este gen, perteneciente a una familia génica altamente conservada conocida como proteínas de repetición de ankirina muscular (MARP por sus siglas en inglés), se localiza en la región 10q23.31, se expresa en el endotelio de los vasos sanguíneos, siendo un participante crucial para la génesis arterial. Clínicamente se ha asociado con CATVP y aterosclerosis aortica e iliaca, con una forma de herencia autosómica dominante<sup>29-31</sup>. De igual manera en el año 2008 se determinó que un paciente reportado previamente con CATVP aislada y una translocación 10;21 t (10;21) (q23.1;q11.2), presentaba pérdida de función de este gen <sup>31,32</sup>.
- ***PDGFRA*** (Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha). Gen localizado en 4q12, en las coordenadas génicas 4:54, 229,096-54, 298,244, codifica para un receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa, que requiere de la activación del gen PAX1, se asocia generalmente a cáncer de células estromales y a la creación de diferentes proteínas de fusión como lo es la forma atípica de la proteína BCR/ABL en la leucemia mieloide crónica<sup>30</sup>. Se logró asociar a la CATVP mediante modelos animales de pollo y ratón, en los que mutaciones con pérdida de función del mismo generaban la CC, utilizando estos modelos se determinó herencia autosómica dominante, expresividad variable y una penetrancia del 7%<sup>29,33,34</sup>.

- **ZIC3** (Zinc Finger Protein Of Cerebellum 3) Gen localizado en Xq26.3, codifica para un factor de transcripción tipo dedo de zinc, contribuyendo a establecer la lateralidad corporal<sup>31</sup>. Presenta una herencia ligada al cromosoma X y al momento actual se ha asociado con una expresividad variable importante, ha sido identificado en CC complejas aisladas (Transposición de grandes arterias y CATVP) y en formas sindrómicas como asociación VACTERL y *situs inversus* ligado al cromosoma X<sup>35,36</sup>.
- **LOCUS 22q11**. Asociado previamente a síndrome de delección 22q11, variantes en el número de copias (CNV), se han asociado con la presencia de CATVP sindromático y no sindromático en casos esporádicos del padecimiento, si bien la fisiopatología no ha sido explicada y no se asocia a genes específicos dentro de la región<sup>37</sup>.

La búsqueda en la literatura muestra una serie de genes candidatos diversos, asociados estadísticamente a la patología, correspondientes a mutaciones puntuales (*GXYLTI*, *HMGA2*, *SNAI1*, *VAV2*, *CST3*, *CLTCL1*, *ZDHHC8*)<sup>38</sup> y CNV's<sup>39</sup>, descubiertos mediante secuenciación de siguiente generación, sin embargo, carecen de confirmación biológica en lo referente a la asociación de la variante con la CATVP.

La herencia autosómica recesiva de la CATVP se ha propuesto debido a la presencia de la CC en familias en las que solo hay afectados

en hermandades, con antecedentes de consanguinidad, sin embargo, hasta el año 2020, no ha sido descrito un gen que se asociara a la misma<sup>40,41</sup>.

## GENES CANDIDATOS PARA CATVP AISLADA, EN POBLACIÓN MEXICANA:

A pesar de la alta frecuencia de esta patología en población latina y mexicana, no existen genes causales reportados en la literatura. En el año 2017, derivado del proyecto de maestría, se propuso al gen *EPHA5* (Eph receptor A5), como un nuevo gen candidato para CATVP en población mexicana (Ver sección de antecedentes para más detalles), con base a su función y a su identificación en una región de alta homocigosidad en 4q13.1, mediante un estudio de barrido génico de tipo mapeo de autocigosidad por microarreglos de SNP's.

Los genes *EPH*, corresponden a receptores de efrina de tipo tirocin-cinasa y son una de las subfamilias de genes más grandes de receptores. Al contrario de lo que se supondría el prefijo *EPH*, no se refiere al ligando con el que interactúan (efrina), si no que proviene del inglés “Erythropoietin Producing human Hepatocellular carcinoma cell line” por el primer tejido en el que fueron descritos<sup>42</sup>. Esta familia, altamente conservada cuenta con 66 genes ortólogos<sup>43</sup>, incluidas especies como el ratón (*Hek*)<sup>44</sup> y el pollo (*Cek*)<sup>45</sup> y adicionalmente se caracteriza por tener una alta homología entre sus integrantes<sup>46</sup>. En el ser humano se identifican 16 parálogos, subdivididos en 2 familias con base a la estructura de sus dominios extracelulares en A y B<sup>42,47</sup>, todos

ellos con una alta homología en DNA complementario (tabla 5) (figura 2). Los 16 receptores EPH interactúan con 9 ligandos correspondientes a efrinas, por lo que ya ha sido descrita la interacción de diferentes receptores con el mismo ligando y su coexpresión en distintos tejidos y funciones<sup>48</sup>.

GEN	HOMOLOGÍA CON <i>EPHA5</i>
<i>EPHA1</i>	41%
<i>EPHA2</i>	51%
<i>EPHA3</i>	64%
<i>EPHA4</i>	62%
<i>EPHA6</i>	59%
<i>EPHA7</i>	61%
<i>EPHA8</i>	57%
<i>EPHA10</i>	47%
<i>EPHB1</i>	54%
<i>EPHB2</i>	54%
<i>EPHB3</i>	53%
<i>EPHB4</i>	46%
<i>EPHB6</i>	38%

Tabla 5. Homología entre las proteínas codificadas por el gen *EPHA5* y sus parálogos (cDNA)<sup>48</sup>.

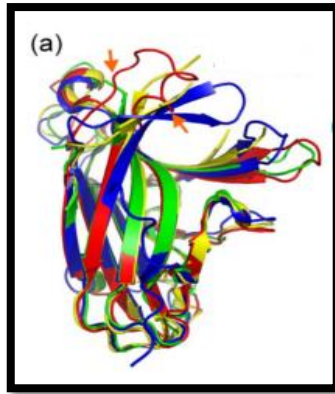


Figura 2. Imagen comparativa de la estructura de los receptores EPH. Se aprecia la superposición del dominio de unión a ligando de EPHA5 (rojo), EPHA2 (verde), EPHA4 (amarillo), EPHB2 (azul). Tomado de Huan X, Shi J, Lim L, et al.<sup>47</sup>.

En lo que se refiere a su expresión los receptores Eph se encuentran en casi todos los tejidos humanos y se han asociado a funciones tan diferentes como adhesión y migración celular, desarrollo axonal<sup>49,50</sup>, desarrollo y plasticidad del sistema nervioso central<sup>51</sup>, sistema hipocampal<sup>52</sup>, angiogénesis y desarrollo cardiovascular<sup>53,54</sup>, establecimiento de los segmentos corporales, ya que se sabe que estos receptores se expresan en las somitas y rombómeros del embrión<sup>45,55</sup>, desarrollo de las extremidades<sup>45</sup>.

*EPHA5* se localiza en el locus 4q11 y está conformado por 18 exones, presenta 6 isoformas por corte y empalme alternativo<sup>43</sup>. En lo que respecta a su estructura, al igual que los otros miembros de la



familia, este gen presenta 3 dominios funcionales: dominio catalítico de cinasa de tirosina intracelular, dominio transmembranal y dominio extracelular de unión a ligando<sup>44</sup>.

De forma específica, *EPHA5* se ha asociado con funciones muy variadas, incluyendo el desarrollo neurológico, expresándose en el cerebro de modelos animales y humanos en todas las etapas de la vida<sup>45,56</sup>, relacionándose con la plasticidad neuronal y de forma secundaria con diversas alteraciones en el comportamiento y discapacidad intelectual<sup>56-58</sup>. De igual manera se ha involucrado a alteraciones en su función en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2, ya que participa activamente en la función ventro-medial hipotalámica<sup>57</sup> y con la secreción de insulina en los islotes de las células beta pancreáticas<sup>59</sup>. Además, se ha demostrado su función con el metabolismo óseo, al participar como un activador de osteoclastos<sup>60</sup>. También existen reportes que asocian su sobreexpresión con diversos tipos de tumores sólidos malignos, al interferir con la expresión de genes asociados a la reparación celular como *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated)<sup>61</sup>, por regulación a la baja debido a metilación en su promotor<sup>62-64</sup>. Algunas neoplasias relacionadas incluyen el cáncer pulmonar<sup>61</sup>, prostático, adenocarcinoma ductal pancreático<sup>64</sup>, glioblastoma, cáncer de mama<sup>63</sup> y colorectal<sup>65</sup>.

Con respecto a su asociación con la CATVP, *EPHA5* tienen una alta homología con *EPHB2* que se ha asociado con angiogénesis y

diferenciación arterio-venosa temprana<sup>14,66,67</sup>. Por otro lado, en el pasado se ha descrito una afinidad cruzada entre los ligandos de los receptores *EPHA4*, *EPHA5* y *EPHB2*<sup>47,66,68</sup>, que se puede explicar por la alta homología entre su dominio de unión a ligando<sup>48</sup> (Tabla 5). La alta homología entre los receptores *EPHA5* y *EPHB2*, ha quedado clara en diferentes situaciones, entre ellas la participación similar en el metabolismo óseo, en donde ambos genes se expresan en los osteoclastos, con un efecto inhibitor de la osteogénesis<sup>60</sup>. Otro de sus parálogos, *EPHB4*, se co-expresa con la semaforina 3d (*Sema3d*), en la vena pulmonar primitiva de diversos vertebrados, si bien, no se ha descrito como parte de la etiología de la CATVP en humanos, se ha observado que ratones nulos (knock out) para *Sema3d*, no expresan tampoco el receptor de efrina B4 y el fenotipo resultante es esta CC<sup>69</sup>. Finalmente, en investigaciones recientes se ha demostrado la expresión de *EPHA5*, en estudios de proteómica en corazón adulto sano<sup>70</sup>.

## ANTECEDENTES.

En diciembre del año 2014 ingresó al servicio de cardiología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” un paciente de un año de edad, con diagnóstico de CATVP tipo I, con conexión a vena superior (Figura 3, Individuo V-4).

El paciente fue producto de la quinta gesta de una pareja consanguínea (tío-sobrina), madre de 25 años sana (III,3), padre de 31 años sano (IV1). El embarazo fue normal y el paciente fue obtenido a las 39 semanas de gestación por parto eutócico, peso al nacimiento de 3.8 kg (percentil 90), talla 53 cm (percentil 90), Apgar 8/7, Silverman Anderson de 0. El desarrollo psicomotriz fue adecuado, con sostén cefálico a los 3 meses de edad, sedestación a los 6 meses, bipedestación 11 meses. El diagnóstico de la CATVP ocurrió a los 7 meses de edad y fue sometido a cirugía a los 8 meses (figura 4). A la edad de 2 años 6 meses la exploración física mostraba un peso de 13 kg (percentil 50), talla 90 cm (percentil 25), desarrollo psicomotor normal, frente amplia, hipertelorismo, cicatriz en línea torácica media, genitales masculinos, testículos en saco escrotal, meato urinario en situación normal, resto de la exploración sin datos relevantes; USG renal sin alteraciones. En sus antecedentes familiares se reportó un hermano mayor de 2 años fallecido en casa por complicaciones cardiovasculares, que era concordante para la cardiopatía y sitio de conexión (individuo V-5), la revisión del expediente clínico reveló que presentaba retraso leve en el

desarrollo psicomotriz, frente amplia e hipertelorismo, la talla era de 76 cm (percentil <3), peso de 8.55 kg (percentil <3). Las otras hermanas del propósito fueron evaluadas (V1, V2 y V3) sin encontrar datos patológicos.

El antecedente de consanguinidad y la herencia horizontal observada en la genealogía sugirió una herencia autosómica recesiva. Por lo anterior, se decidió hacer un estudio de análisis de pérdida de heterocigocidad (LOH).

El estudio de LOH reveló regiones altamente homocigotas en la región 4q13.1, entre los SNPs rs12644315 y rs10017714 (Figura 5), sugiriendo la presencia del gen asociado en este locus. Tras el análisis de la región se concluyó que el gen *EPHA5* podía estar asociado a CATVP basándose en sus características ya descritas anteriormente y a pesar de no estar descrita su asociación previamente en la literatura.

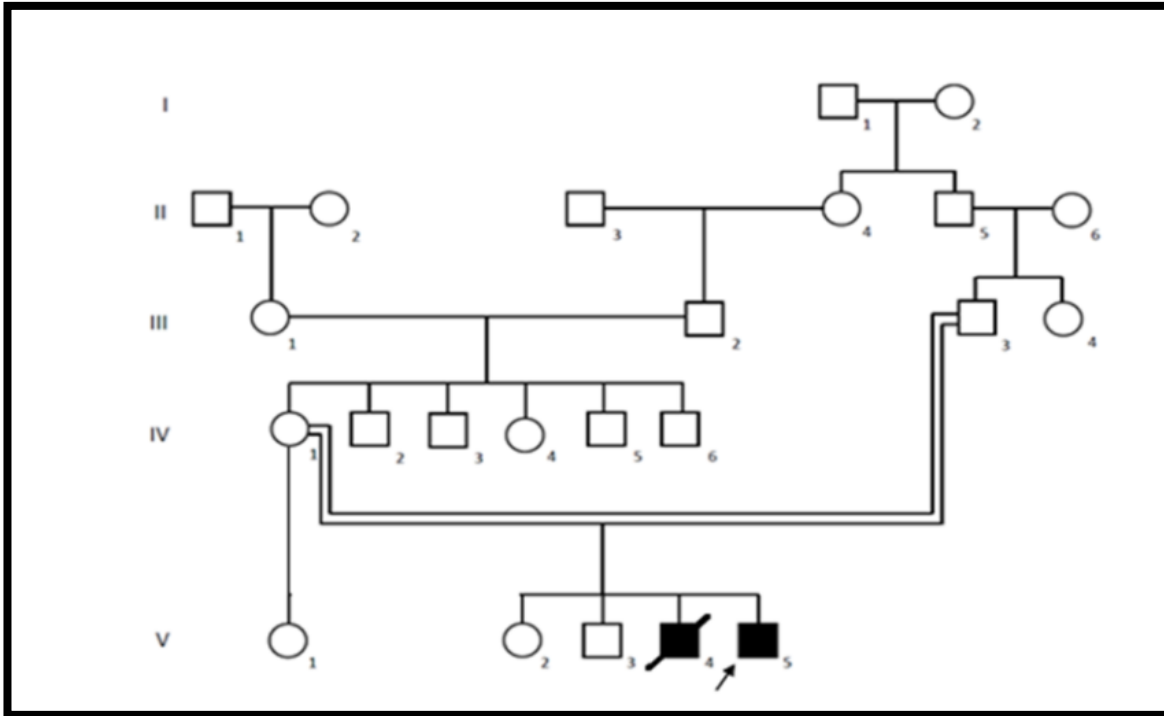
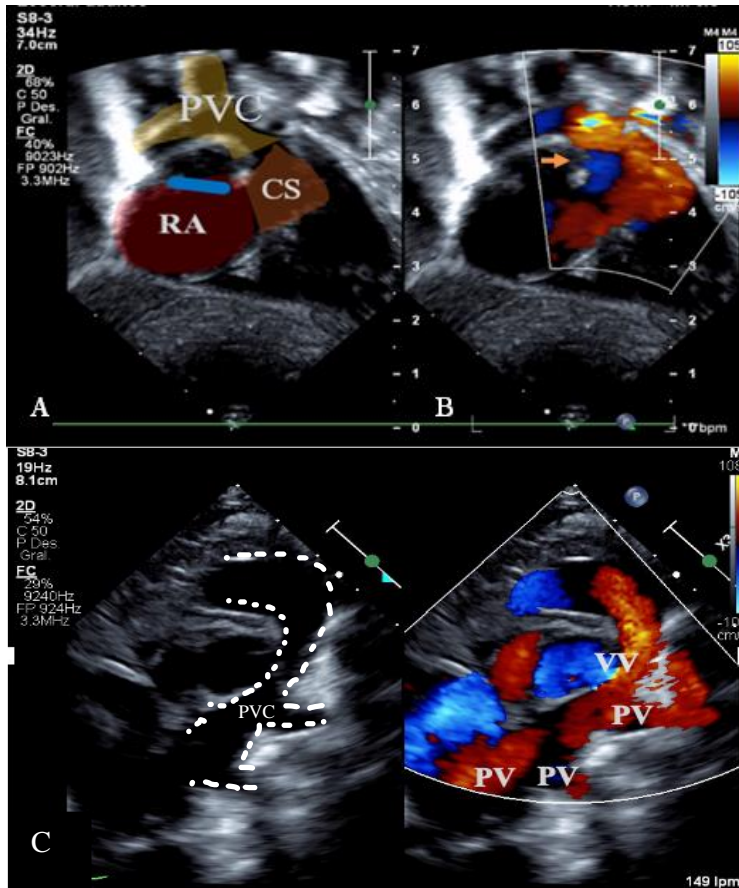


Figura 3. Familia consanguínea, unión tío sobrina (III3 Y IV1), con dos hijos afectados (V4 y V5)



**Figura 4.** A) Ecocardiograma de V4 antes de la cirugía. La vista subcostal muestra las venas pulmonares (VP) conectando al seno coronario (CS). B) Vista subcostal en donde se aprecian el atrio derecho (RA) e izquierdo (LA) y el defecto atrio septal (flecha) con flujo-conexión derecha a izquierda. C) Ecocardiograma del propósito (V5) previo a la corrección quirúrgica, la vista supraesternal muestra las venas pulmonares (PV) desembocando en la vena vertical (VV) y se observa el colector de las venas pulmonares (PVC) (línea punteada).

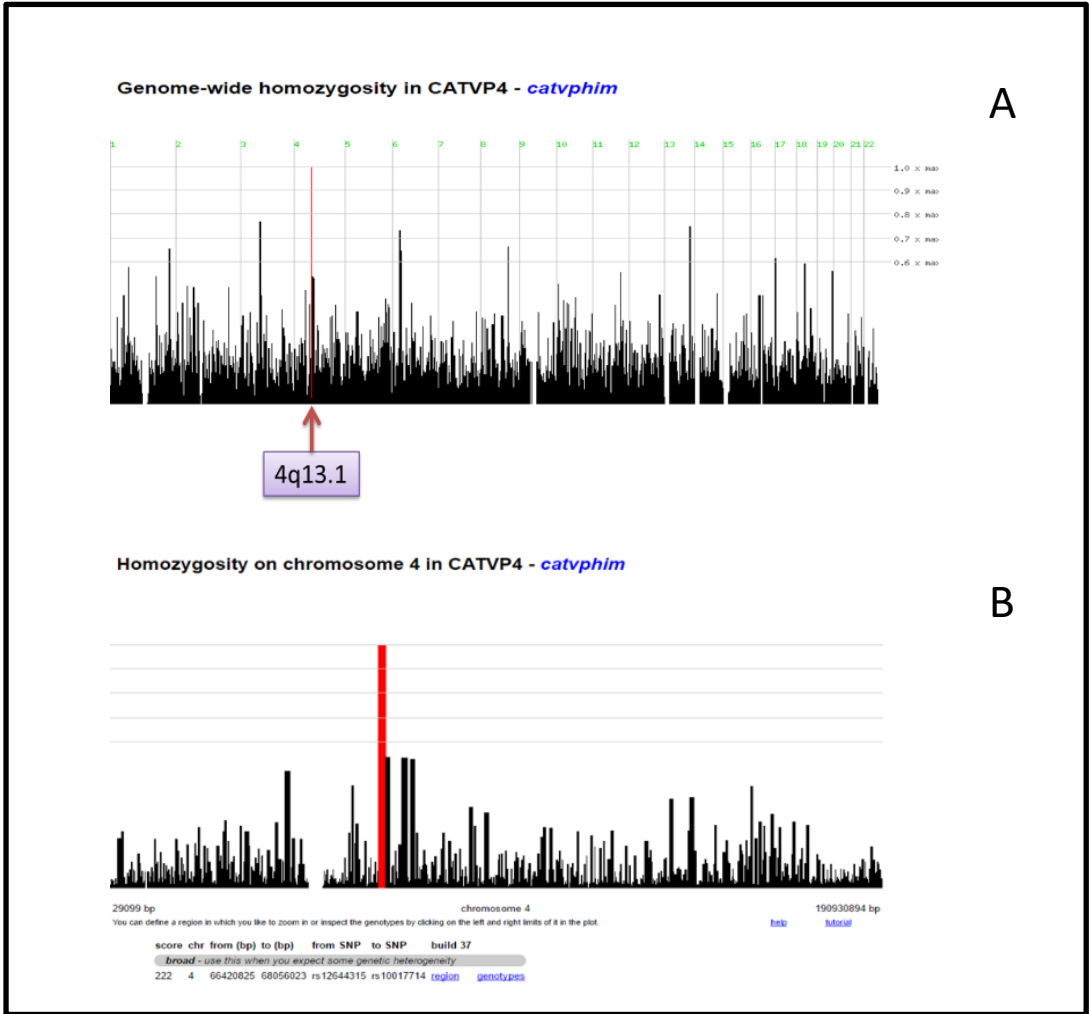


Figura 5. Estudio de LOH. A) se aprecia el análisis de todos los autosomas (1 al 22) y en rojo la región homocigota (LOH de 8 MB), en el cromosoma 4, B) Se observa una ampliación de este cromosoma y la misma región homocigota en 4q13.1 entre los SNPs rs12644315 y rs10017714

# DISEÑO DEL ESTUDIO Y METODOLOGÍA.

## DISEÑO DEL ESTUDIO

### **JUSTIFICACIÓN:**

En México las CC son responsables del 55% de las defunciones por malformaciones en niños menores de un año, la CATVP es más frecuente en nuestro medio que en otras poblaciones y es causa de tratamiento médico y quirúrgico obligatorio. Sin embargo, se sabe poco respecto a las causas genéticas, particularmente en poblaciones no caucásicas. Al encontrar variantes asociados a su desarrollo, seremos capaces de proponer el estudio genético de las familias mexicanas con afectados de CATVP y proporcionar asesoramiento adecuado.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

La alta incidencia en nuestra población, así como la recurrencia familiar sugieren una etiología genética de la CATVP, es por ello que la descripción de los genes asociados puede modificar de manera importante el manejo de las familias afectadas al poder determinar riesgos de recurrencia basados en el genotipo de los pacientes. Al momento actual no se ha descrito ningún gen asociado a CATVP en poblaciones latinas o mexicana.



## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:**

¿Existirán variantes génicas que pudieran explicar el desarrollo de CATVP en una familia mexicana?

## **PREGUNTAS SECUNDARIAS:**

¿Existirán variantes en el gen *EPHA5* en la familia índice?,

¿Existirán variantes en otros genes que pudieran relacionarse con el desarrollo de la CATVP aislada, en la familia índice?

## **OBJETIVO GENERAL:**

Determinar si existen variantes en el genoma de una familia mexicana mediante EBD y EBG que pueda explicar la presencia de CATVP.

## **OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

1.- Determinar variantes patogénicas en el gen *EPHA5* en una familia consanguínea de pacientes con CATVP.

2.- Identificar variantes en genes previamente asociados a la CATVP en la familia. 3. Identificar variantes patogénicas en otras regiones génicas que pudieran explicar la presencia de CATVP en la familia.

## **HIPÓTESIS:**

1. Existen variantes génicas patogénicas asociadas a la CATVP en una familia mexicana.

## **HIPÓTESIS SECUNDARIAS:**

- a) Existen variantes patogénicas de pérdida de función en el gen *EPHA5* en el caso índice.
- b) Existen variantes patogénicas en otros genes previamente descritos asociados a la patología en el caso índice.
- c) Existen variantes patogénicas en genes previamente no asociadas a la patología en el caso índice.

## **DISEÑO DEL ESTUDIO:**

Observacional, transversal, descriptivo.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS:**

Previo a la realización del estudio, el proyecto se sometió a aprobación por parte de los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## METODOLOGÍA:

El estudio se realizó en 2 etapas secuenciales con el fin de responder a las 3 hipótesis propuestas, como se muestra en la figura 6.

Como se explicó previamente este estudio es transversal descriptivo y se compone de 2 fases para la identificación de la etiología de CATVP en la familia índice:

- **FASE 1: Búsqueda genética dirigida.**
  - Búsqueda de variantes en el gen *EPHA 5*, en la familia índice.
- **FASE 2: Búsqueda por barrido génico**
  - **A)** Búsqueda de genes previamente asociados a cardiopatías congénitas mediante secuenciación de segunda generación de tipo panel dirigido a enfermedades cardiovasculares.
  - **B)** Búsqueda de genes no asociados previamente a CATVP mediante secuenciación de segunda generación de tipo exoma completo.

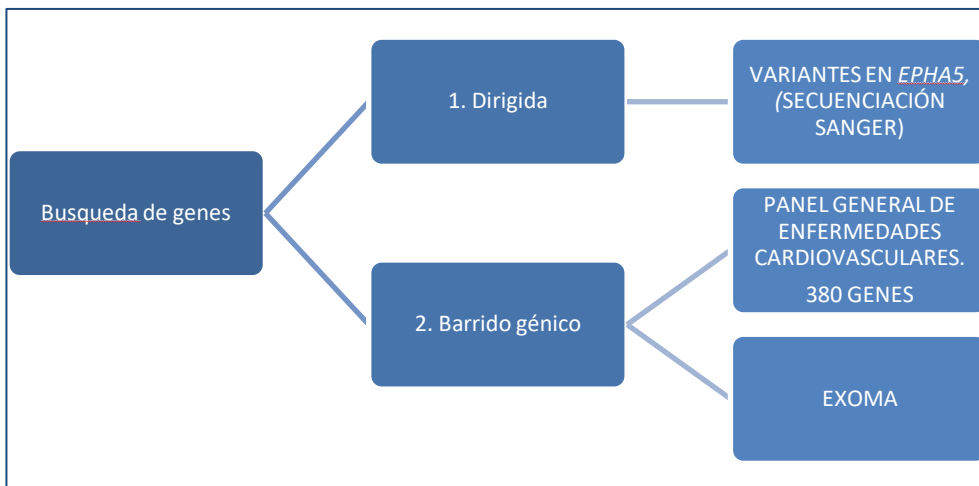


Figura 6. Diseño general del estudio. Se distinguen 2 fases BDG Y BBG. La BBG a su vez se subdivide en 2 fases

## METODOLOGÍA FASE 1.

Como se explicó previamente en la primera fase del estudio se buscaron variantes en el gen *EPHA5* en la familia índice. Para ello se inició con la realización de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de los 18 exones de este gen.

### **DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS:**

Para el diseño de los oligonucleótidos del gen *EPHA5*, se utilizó el programa Primer 3 input 0.4, y la secuencia de la isoforma 2 del gen disponible en la plataforma ensemble, se configuraron los valores de la plataforma (Tabla 6).

<b>RUBRO</b>	<b>VALORES</b>
<b>Tamaño de oligonucleótidos (primer size)</b>	21
<b>Optimización</b>	21.23
<b>Temperatura media</b>	55-60°
<b>Diferencia de TM máxima</b>	0.5°
<b>Contenido de G-C</b>	50-55
<b>Oligonucleótido</b>	FW-RV

Tabla 6. Condiciones para diseño de oligonucleótidos para los 18 exones del gen EPHA5 en la plataforma Primer input 4.0.

Los oligonucleótidos obtenidos fueron sometidos a optimización con el programa optimase protocol writer, consiguiendo secuencias de entre 134 y 937 pares de bases (pb). (Tabla 7).

## **OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUINEAS Y EXTRACCIÓN DEL ADN.**

Debido a que el estudio es un estudio familiar de trio (caso-progenitores), se tomaron previa firma de consentimiento informado 5 ml de sangre venosa en los padres y 3 ml del propósito en tubo con anticoagulante EDTA.

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el kit Quiagen® y el equipo automatizado Quiasinphony. El ADN obtenido se purificó utilizando el siguiente protocolo:

## **PURIFICACIÓN DE ADN:**

Se colocaron 4 µg de ADN genómico en un volumen total de 20 µl. Se añadió 1 µl de glucógeno a 10 mg/ml, 5 µl NaCl 1 M y 40 µl de etanol al 100%. El ADN se precipitó 30 min a -20°C, y se centrifugó 20 min a 13,000 rpm a 4°C. El botón de ADN se secó y resuspendió en buffer TE (Tris pH 8.0 10 mM, EDTA 0.1 mM).

El ADN obtenido se mantuvo almacenado hasta su procesamiento en un ultra-congelador a -70C.

## **REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA PARA EL GEN *EPHA5*.**

Se realizaron PCR's para los 18 exones del gen *EPHA5* en 5 muestras: propósito, el padre, la madre, un control sano (paciente masculino sano sin antecedentes familiares o personales de cardiopatías) y un control negativo (H<sub>2</sub>O).

Se inició con la PCR de los 18 exones del gen *EPHA5* en las 5 muestras (Tabla 7 y Tabla 8). Para su realización se utilizó la mezcla comercial para PCR GoTaq® y los oligonucleótidos diseñados (Tabla 5)

Las condiciones del termociclador para la PCR se reprodujeron en base a lo establecido en la estandarización. El producto de las 90 PCR fue corrido en geles de agarosa al 1%.

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA DEL OLIGONUCLEÓTIDO (PRIMER)	TAMAÑO (PARES DE BASES)	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN (°C)
EPHA5 E1 FW	TTGATCCGAGTCCAGATCTGC	591	59.6
EPHA5 E1 RV	TGGAAGGGGACGACAAATACC		
EPHA5 E2 FW	TCCAAAACCTCGAGCTTTG	578	58.4
EPHA5 E2 RV	TATTTGAAGTCCCCTCACCCC		
EPHA5 E3 FW	TCGTCTGGAGTTATGTGGAG	937	57.4
EPHA5 E3 RV	TGCAGATCTGGAGGCAAAC		
EPHA5 E4 FW	TTCCAGGGAAAAGCTTAGTCTC	226	57.9
EPHA5 E4 RV	TAGCACCACCAAATATCCGTG		
EPHA5 E5 FW	AAACCCCACTATTGTCCCTAC	592	57.7
EPHA5 E5 RV	CAGATTTCACTCAACTTGGCC		
EPHA5 E6 FW	TGCTACGTTCTCAAAATGCC	386	57.4
EPHA5 E6 RV	GAGCTCCCTGTACACTTCTAG		
EPHA5 E7 FW	ACCCACCACCTTGAGTTCTAG	541	55.2
EPHA5 E7 RV	ACCTGCCGACCTACCATAATAG		
EPHA5 E8 FW	GATCACTTAACCACAAGCTCC	191	56.5
EPHA5 E8 RV	AGATCAGCTGCAGAACTTCAG		
EPHA5 E9 FW	CTCTTCCTTATCTTGGGCTCTC	134	59.8
EPHA5 E9 RV	CATAGGAGTGAAAGTGGGAGG		
EPHA5 E10 FW	CTGGGCTTGATGTGACTGATTC	298	59.9
EPHA5 E10 RV	CCCAAGCCCGTATTCTTTACAG		
EPHA5 E11 FW	TATTGCATTGTCCAGTTCGG	821	55.2
EPHA5 E11 RV	AGAAGAGAAAAGCCAACCAG		
EPHA5 E12 FW	GTCTAAGAGGGGCATACAAGTG	305	56.5
EPHA5 E12 RV	TGAGGATATGCACACATG		
EPHA5 E13 FW	CGAAGAGCAGCAGGTTATATCAC	177	59
EPHA5 E13 RV	ACAGCATCATCATCACAGCAC		
EPHA5 E14 FW	CAGTGATTGGTGTGCTAGAC	357	56.5
EPHA5 E14 RV	TGACTTGTGTCAGGAATGC		
EPHA5 E15 FW	GCTTTCCTTACTTAGAGCTGC	672	59.8
EPHA5 E15 RV	GCTAAAACGTCTGGCAAGGG		
EPHA5 E16 FW	GGGGTGCTGGTCTGTTTTG	247	59.3
EPHA5 E16 RV	ATCACTCGGATCTGGCCTTG		
EPHA5 E17 FW	CCCATTACCAGCATCAACCG	769	59.3
EPHA5 E17 RV	GAGGCTTCTTGAGAGCTGC		
EPHA5 E18 FW	CACTATGTTGCCCTTTGC	292	57.2
EPHA5 E18 RV	CACTGTTTTCCCTTTTCCC		

Tabla 7. Características de los oligonucleótidos diseñados. En la columna 1: número de exón. Columna 2: FW: Delantero RV: Reverso. Columna 3: Pares de bases entre oligonucleótidos. Columna 4: temperatura de alineamiento en grados centígrados calculados por el programa de diseño

<b>EXONES: 4,5 Y 8</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Incubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineación	57.8°C	25 seg	
Extensión	72°C	1.1 min.	
Elongación final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	1
<b>EXONES: 1, 7, 9, 10, 15.</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Incubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineación	59.8°C	25 seg	
Extensión	72°C	1.1 min.	
Elongación final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	1
<b>EXON: 2</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Incubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineación	58.5°C	25 seg	
Extensión	72°C	1.1 min.	
Elongación final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	1
<b>EXON: 3</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Incubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineación	57.5°C	25 seg	
Extensión	72°C	1.1 min.	
Elongación final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	1
<b>EXON: 6</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Incubación	95°C	2 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg.	35
Alineación	57.4°C	25 seg	
Extensión	72°C	1.1 min.	
Elongación final	72°C	3 min	1
Conservación	4°C	∞	1
<b>EXON: 11</b>			



ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Incubación</b>	95°C	2 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 seg.	35
<b>Alineación</b>	55.2°C	25 seg	
<b>Extensión</b>	72°C	1.1 min.	
<b>Elongación final</b>	72°C	3 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	∞	1
<b>EXON: 13.</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Incubación</b>	95°C	2 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 seg.	35
<b>Alineación</b>	59.1°C	25 seg	
<b>Extensión</b>	72°C	1.1 min.	
<b>Elongación final</b>	72°C	3 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	∞	1
<b>EXONES: 12 Y 14.</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Incubación</b>	95°C	2 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 seg.	35
<b>Alineación</b>	56.7°C	25 seg	
<b>Extensión</b>	72°C	1.1 min.	
<b>Elongación final</b>	72°C	3 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	∞	1
<b>EXONES: 16 Y 17.</b>			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Incubación</b>	95°C	2 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 seg.	35
<b>Alineación</b>	59.4°C	25 seg	
<b>Extensión</b>	72°C	1.1 min.	
<b>Elongación final</b>	72°C	3 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	∞	1

Tabla 8. Condiciones de la PCR para los 18 exones del gen *EPHA5*.  
Abreviaturas: °C: Grados centígrados, min: minuto, seg: segundos.

## **PURIFICACIÓN DE LAS BANDAS DE PCR PARA SECUENCIACION TIPO SANGER:**

Las bandas de PCR que se mantuvieron en congelación se sometieron a purificación utilizando 2 kits de purificación distintos secundario a disponibilidad en el laboratorio.

Las bandas de los exones 2, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de la madre, padre y propósito y 12 del padre se purificaron con el kit para purificación directa de las bandas de PCR Fermentas GeneJet®, con el siguiente protocolo:

1. Se agregaron 47  $\mu$ l de binding buffer a las bandas, seguidos de centrifugación y mezcla (vortex), se comprobó PH adecuado (coloración amarilla).
2. Se agregaron 47 $\mu$ l de isopropanol a cada muestra y posteriormente se centrifugo y mezclo.
3. Se transfirieron a columnas y posteriormente se centrifugo a 12,000g, se decantó el excedente.
4. Se agregaron 700 $\mu$ l de buffer de lavado, se centrifugo a 12,000g por un minuto y de decantó el excedente.
5. Se centrifugo en seco a 12,000g por un minuto.
6. Se agregaron 25 $\mu$ l de buffer de elusión a 65°C y se dejó reposar por un minuto en tubo limpio.
7. Se centrifugó por un minuto a 12,000g.

Se cuantifico el ADN obtenido de las bandas utilizando un Nanodrop lite® de Thermo Fisher®, obteniendo las. Posterior a la medición se congelaron los purificados a -20°C.

Las bandas correspondientes a los exones 1, 3, 4, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18 de la madre, padre y propósito, así como el exón 12 de la madre y el propósito se purificaron usando el kit QIAquick® gel extraction, usando el siguiente protocolo, adaptado al sugerido por el fabricante para muestras con ADN mayor a 10 ng/μl:

1. Se pesaron las bandas (el peso se registró en miligramos).
2. Se agregaron 3 volúmenes del buffer QG por 1 volumen de gel (100mg gel= 300μl de buffer).
3. Se incubaron las muestras a 50°C, por lo menos 10 minutos o hasta que el gel se disolviera en su totalidad realizando mezcla por vortex cada 2 minutos.
4. Se corroboró el color amarillo en cada mezcla, indicando un pH de 7.5, siendo óptima para su utilización.
5. Se agregó el equivalente al volumen del gel de cada muestra de isopropanol al 100% a 50°C y se mezcló por vortex.
6. La mezcla se colocó en una columna de 2 ml, (incluida en el kit) y se centrifugó por un minuto a 17,900g.
7. Se descartó el excedente y se colocaron las columnas en los mismos tubos, en el caso de muestras de mas de 800 μl se repitió el paso 6.
8. Se agregaron 500μl de buffer QG y se centrifugó a 17,900 g, por un minuto, se descartó el filtrado y las columnas se colocaron en el mismo tubo.
9. Las columnas se lavaron aplicando en el centro del filtro 730μl de buffer PE y se dejó reposar por 5 minutos. Las columnas se centrifugaron a 17,900g por un minuto, se descartó.

10. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml.
11. Se procedió a la elusión del ADN, se agregaron 50µl de agua libre de proteasas en el centro de la columna y se dejó reposar por 4 minutos y posteriormente se centrifugo a 17,900g por un minuto.

### **SECUENCIACIÓN SANGER DE LAS MUESTRAS:**

Se inicio con la secuenciación de todos los exones del propósito y en caso de encontrar variantes se procedió a la secuenciación de los mismos exones en los progenitores.

Para la secuenciación se utilizaron los purificados de las bandas o el purificado directo de PCR y se calcularon las cantidades de ADN para ajustar la concentración a 25 ng/µl en cada mezcla.,.

La preparación de la reacción de secuenciación incluyo una reacción hacia adelante (Fw) y una reversa (Rv) para cada exón, en todos los casos las mezclas para las reacciones se ajustaron a los mismos volúmenes y componentes (ver tabla 10).

Las mezclas se colocaron en el termociclador con las condiciones de la tabla 11.

<b>Componente</b>	<b>Cantidades</b>
<b>Dideoxi nucleótidos (BDT)</b>	0.5 $\mu$ l
<b>Buffer</b>	3.5 $\mu$ l
<b>Oligonucleótidos*</b>	0.5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Ajustada $\mu$ l
<b>ADN</b>	Ajustada $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	10 $\mu$ l

Tabla 10. Mezcla para secuenciación. \*Los oligonucleótidos se utilizaron diluidos a una concentración 1:10, con agua libre de proteasas. El ADN se diluyo para obtener la concentración de 25 ng/ $\mu$ l.

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
<b>Incubación</b>	94°C	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	94°C	30 seg.	25
<b>Alineación</b>	55°C	30 seg.	
<b>Extensión</b>	72°C	30 seg.	
<b>Elongación final</b>	72°C	7 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	$\infty$	1

Tabla 11. Programa de secuenciación Sanger en termociclador.

Los productos de marcado se limpiaron utilizando el siguiente protocolo:

1. Se tomaron columnas de Cephadex®, sin burbujas y se colocaron en tubos colectores, se centrifugaron a 2000 rpm por 2 minutos.
2. Se colocó el marcado en el centro de la columna, asegurándose de no perforar el gel.
3. Se centrifugo la columna con tubos colectores a 2000 rpm por 2 minutos.
4. Los tubos se llevaron al concentrador (SpeedVac) por 30 minutos a 60°C, en algunos casos se mantuvieron en el concentrador por más tiempo para garantizar la evaporación total.
5. Se reconstituyeron las muestras con 20µl de formamida.
6. Se colocaron las muestras a 95°C por 5 minutos.
7. Inmediatamente se transfirieron a hielo y se protegieron de la luz por un lapso de 5 minutos.

El marcado se entregó para su secuenciación CINVESTAV, Zacatenco del IPN.

Se recibieron las secuencias, se consideraron adecuadas en 17 de 18 exones. En el caso del exón 11, se repitió el proceso en 4 ocasiones desde el inicio de estandarización, sin embargo, no se consiguieron secuencias adecuadas.

## ANÁLISIS FASE 1.

Como se explicó previamente (ver sección de metodología fase 1). La primera parte del estudio se enfocó en descubrir las potenciales variantes génicas patogénicas en el gen *EPHA5* en una familia mexicana consanguínea, debido a la evidencia teórica presentada durante el proyecto de maestría.

Durante la realización de las Reacciones en cadena de polimerasa, de los 18 exones del gen se buscó corroborar la amplificación de todos los fragmentos, así como su concordancia en el peso molecular con el fragmento esperado en el diseño de los oligonucleótidos y con el control (individuo sano). Adicionalmente se esperaba que el control negativo (agua libre de nucleasas) no tuviera amplificación. Estas condiciones se encontraron en 16 de 18 exones (figura 6 y 7).

Con respecto a los exones 1 y 17 se evidencio discrepancia en el peso molecular de los fragmentos, haciendo suponer cambios entre las secuencias, en ambos casos el control sano mostraba un fragmento concordante al esperado y no hubo amplificación de los controles negativos. En el exón 1, el padre y el paciente presentaban fragmentos discretamente más pequeños con respecto a la madre y el control (550 pb vs 600 pb). El exón 17 mostró

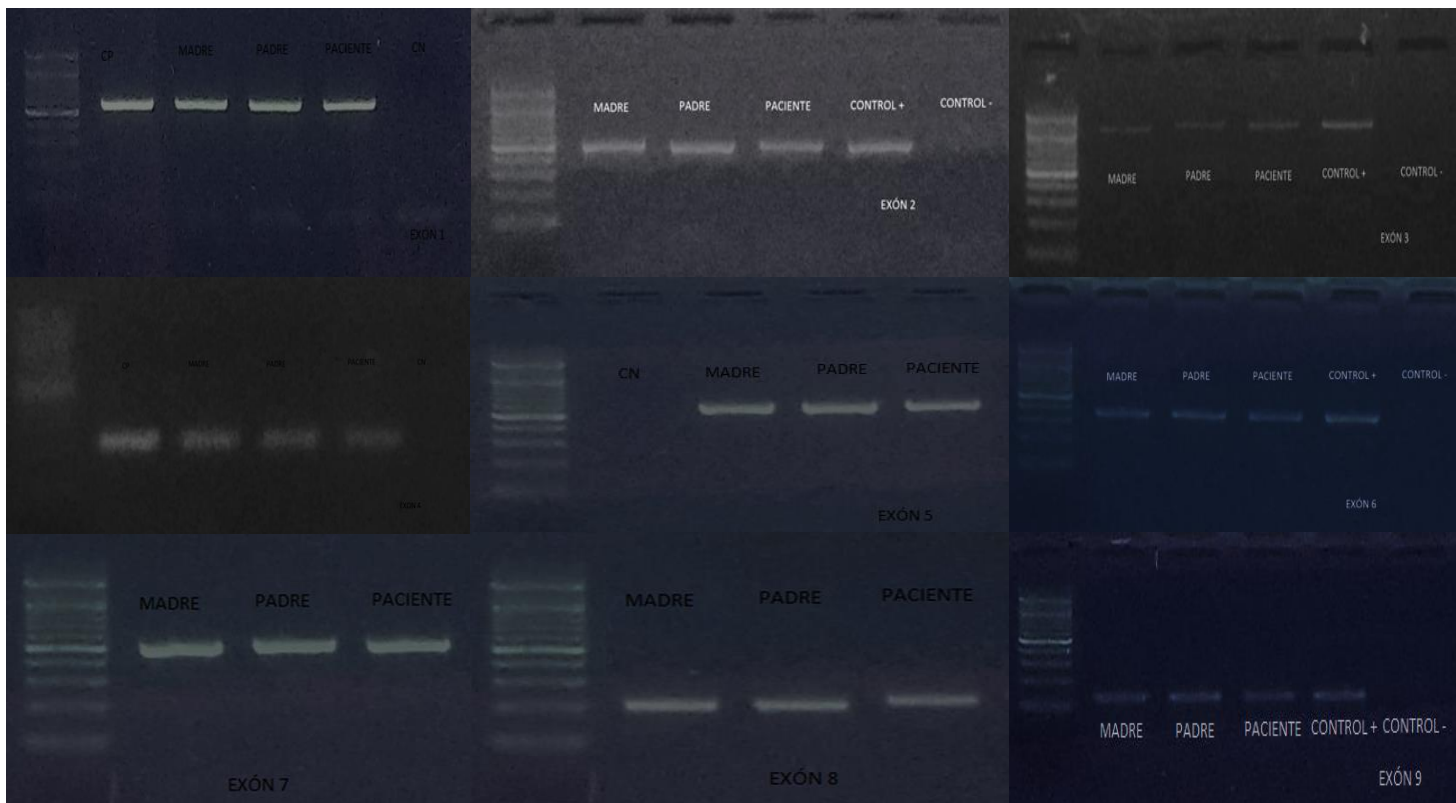


Figura 6. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) de los exones 1 al 9 del gen *EPHA5*, realizado en el propósito, madre, padre, control positivo (sano) y control negativo (agua destilada), el marcador de peso molecular (izquierda), es de 100 pb. con marcador en 500 pb., destaca que todos los controles positivos mostraron el tamaño esperado para el fragmento y no hubo amplificación de control negativo en ningún caso.





Figura 7. Reacción en cadena de polimerasa (PCR) de los exones 10 al 18 del gen *EPHA5*, realizado en el propósito, madre, padre, control positivo (sano) y control negativo (agua destilada), el marcador de peso molecular (izquierda), es de 100 pb. con marcador en 500 pb., destaca que todos los controles positivos mostraron el tamaño esperado para el fragmento y no hubo amplificación de control negativo en ningún caso.

mayores cambios con respecto al tamaño esperado del fragmento de 769 pares de bases (pb) y que coincide con el control positivo, pero no concuerda con los fragmentos de la madre (600pb aproximadamente) y el padre (800pb).

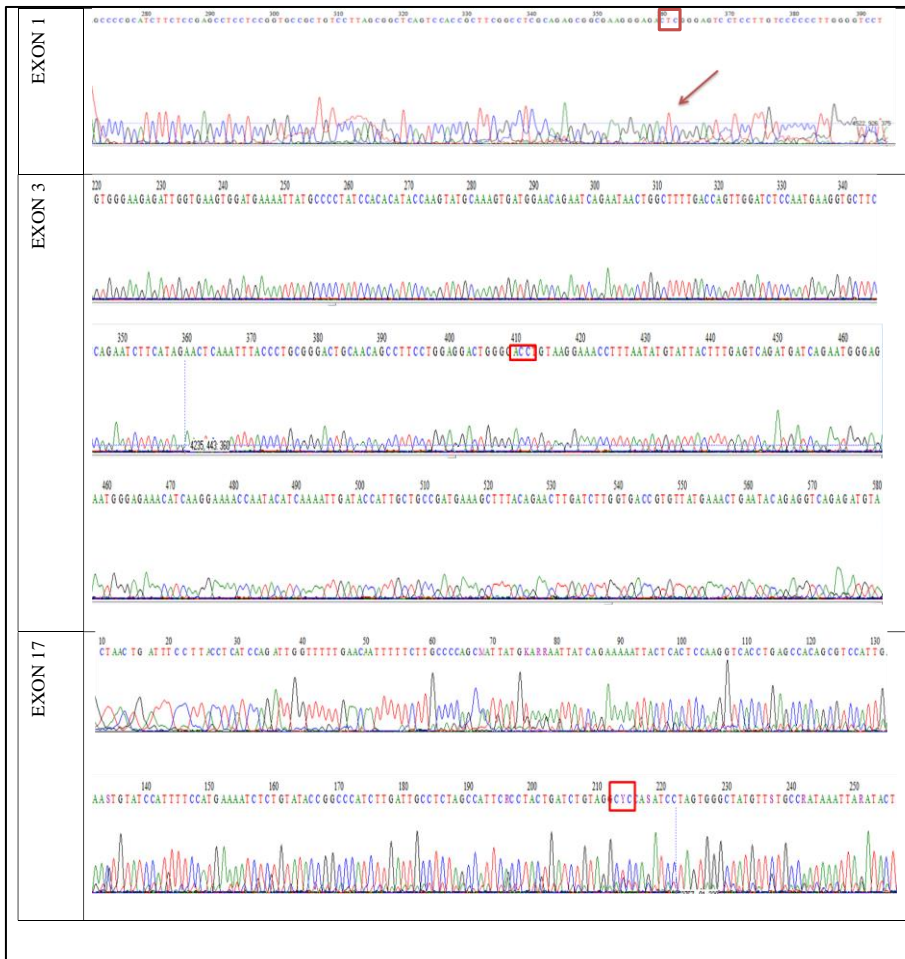
Al encontrar cambios en los pesos moleculares se creyó que existía un cambio en la secuencia, adicionalmente no se podían excluir variantes en pares de bases que se encontraban externos a los oligonucleótidos (primer) por este medio, por lo que se realizó la secuenciación en el propósito. La secuenciación fue exitosa para Fw y Rev, en 17 de 18 exones, presentando dificultad con la secuencia del exón 11, por lo que se diseñaron nucleótidos nuevos, con amplificación exitosa, pero sin conseguir secuencias adecuadas, aun después de realizar diferentes metodologías, rediseñar los oligonucleótidos y 2 tipos de técnicas de secuenciación en 2 laboratorios diferentes, por lo que se decidió diferir la secuenciación a la fase 2 (secuenciación de exoma).

Se realizó una revisión manual de las secuencias de los 17 exones, comparándolas con la isoforma 2 del gen *EPHA5* de la base de datos Ensemble genome browser, Se evidencio la presencia de alrededor de 75 VNP dispersas en todos los exones y 3 VUS localizadas en los exones 1,3 y 17, estas variantes se encontraban en estado homocigoto en el paciente, por lo que se decidió secuenciar estos mismos exones en ambos progenitores. (figura 9). La decisión de solo secuenciar estos exones en los progenitores se basó en los recursos

disponibles. En los 3 casos se evidencio la presencia de las mismas variantes en estado heterocigoto en ambos progenitores. Cuando se realizó la PCR del gen, se evidenció un cambio en el peso molecular de los fragmentos correspondientes a los exones 1 y 17, esto hizo suponer un cambio en la secuencia de ADN, que se buscó en la secuenciación posteriormente.

El análisis de las secuencias se realizó de manera manual como se explicó previamente y se comparó con la isoforma 2 del gen *EPHA5*, de la plataforma Ensembl gene browser®, con el genoma de referencia GRCh 38. El análisis mostro 3 variantes de significado incierto a lo largo del gen del probando, ampliando posteriormente la búsqueda en las bases de datos dbSNP, 1000 genomes y GnomAD, en donde las mismas fueron confirmadas y recatalogadas.

Las variantes encontradas correspondieron a cambios en los exones 1, 3 y 17, en todos los casos se catalogaron como mutaciones silenciosas, su localización y características se describen en la tabla 10 y figura 9.



**Figura 9.** Electroferograma de los exones 1,3 y 17 del gen EPHA5 en el propósito, en las 3 secuencias se aprecian cambios a la secuencia respecto a la base Ensembl genome browser 95 en el genoma humano de referencia GRCh38 y dbSNP, marcados en rojo.

Las variantes de los exones 1 y 3 se encontraron descritas en las 2 primeras bases de datos consultadas y correspondían a variantes no patogénicas. En el caso de la variante del exón 17, solo se describía en la base 1000 genomes y había sido reportada en 2 poblaciones, con una frecuencia máxima de alelo (MAF) DE 0.33 en población Mexicana residente en los Ángeles y Japoneses en Tokio, é involucraba al tercer nucleótido del codón, motivo por el cual se sospechó una mutación silenciosa al no modificar el aminoácido, pero dado a la población de referencia y a que se desconocía su relevancia en el efecto postraduccional como sitio de corte y empalme alternativo (splicing), se sometió a análisis con la plataforma ESEfinder, descartando esta posibilidad y se corroboró que se trataba de una mutación silenciosa (tabla 12).

En los tres casos, las variantes fueron buscadas de manera dirigida mediante secuenciación Sanger en los progenitores, en todos los casos se demostró un estado heterocigoto de ambos padres, apoyando la probable herencia autosómica recesiva observada en la genealogía.

Se debe de considerar que el abordaje del gen *EPHA5*, solo contemplo el análisis de las regiones codificantes y por complicaciones técnicas discutidas previamente, no pudo incluir al exón 11, por lo que no se ha podido descartar mediante la metodología utilizada la presencia de cambios en regiones no codificantes como intrones y UTR's.

VARIANTE (rs)	EXÓN	ALELOS	TIPO DE CAMBIO	SITIO DE SPLICING
rs750393876	1	T/G	Silenciosa	No
rs984876976	3	T/A/G	Silenciosa	No
rs7349683	17	T/G	Silenciosa	No

**Tabla 12. Caracterización de las variantes localizadas en la BGD, FASE 1**

## METODOLOGÍA FASE 2.

Como se describió previamente, la fase 2 del protocolo consistió en un estudio de barrido génico (EBG). Los estudios seleccionados fueron panel general de enfermedades cardiovasculares de 380 genes y estudio de exoma completo, mismos que se realizaron solo en el propósito con el fin de identificar variantes para confirmarlas posteriormente en los progenitores.

El EBG se realizó en el laboratorio Health in Code, en la Coruña, España con el soporte económico de la Unidad de Investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por lo que se realizó toma de muestra en saliva del propósito, previa firma de consentimiento informado por la madre del caso. La muestra se envió vía paquetería a España para la realización del estudio.

La muestra se estudió por el método de secuenciación masiva en paralelo utilizando los reactivos “SureSelectXT Reagent library preparation kit®” de la empresa Aligent. En enriquecimiento de las regiones de interés se realizó mediante las sondas comercial Agilent Clinical Research Exome®. Para el panel general de enfermedades cardiovasculares se analizaron 380 genes previamente asociados a cardiopatías congénitas y para el análisis secundario del exoma los genes asociados a las librerías patentadas por la empresa receptora. El

análisis terciario fue realizado con el archivo BAM proporcionado por la empresa en nuestro laboratorio.

## CONFIRMACIÓN DE LA VARIANTE EN LOS PROGENITORES

La variante encontrada en el cromosoma X del propósito (ver análisis fase 2), fue verificada en la madre y en las hermanas. Para su confirmación se procedió a diseñar oligonucleótidos para marcar la región (Exón 2, gen *MIDI*).

Para el diseño de los oligonucleótidos del gen *MIDI*, se utilizó el programa Primer 3 input 0.4, y la secuencia del gen disponible en la base de datos Ensemble, se configuraron los valores de la plataforma (Tabla 13).

<b>Tamaño de oligonucleótidos (primer size)</b>	21
<b>Optimización</b>	21.23
<b>Temperatura media</b>	55-60°
<b>Diferencia de TM máxima</b>	0.5°
<b>Contenido de G-C</b>	50-55
<b>Oligonucleótido</b>	FW-RV

Tabla 13. Condiciones para diseño de oligonucleótidos para el exón 2 del gen *MIDI* en la plataforma Primer input 4.0.



Los oligonucleótidos obtenidos fueron sometidos a optimización con el programa optimase protocol writer, La secuencia frontal fue: CCAGTTTTGTGACCAGGATCC. El oligonucleótido reverso fue: CAGAAAGGGGTTGGCTTAAGG. El fragmento de ADN entre los oligonucleótidos presentó un tamaño de 406 pb.

#### PCR DE LA SECUENCIA DEL EXON 2 *MIDI* MATERNO:

Para realizar la PCR se consideró un volumen total de 50  $\mu$ l, y el mix para PCR Gotaq®, la mezcla se describe en la tabla 14 y el ciclo de amplificación se describe en la tabla 15.

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>GoTaq®</b>	20 $\mu$ l
<b>Templado DNA</b>	5 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	20 $\mu$ l
<b>FW</b>	2.5 $\mu$ l
<b>RV</b>	2.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	50 $\mu$ l

Tabla 14. Contenido de la mezcla para Reacción en cadena de polimerasa del exón 2 del gen *MIDI* materno.

Se preparó un gel de agarosa al 1.5%, y se corrió el producto de PCR del control sano (masculino sano sin antecedentes) y un control negativo (agua libre de nucleasas), el fragmento obtenido correspondió con el tamaño esperado de 406 pb. (figura 10).

La banda correspondiente a la secuencia fue cortada, pesada y congelada a -20°C. El peso de la banda fue de 322 mg.

ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Incubación</b>	95°C	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	95°C	30 seg.	35
<b>Alineación</b>	67°C	30 seg.	
<b>Extensión</b>	70°C	30 seg.	
<b>Elongación final</b>	70°C	5 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	∞	1

Tabla 15. Programa de Reacción de Polimerasa del exón 2 del gen *MIDI* materno.

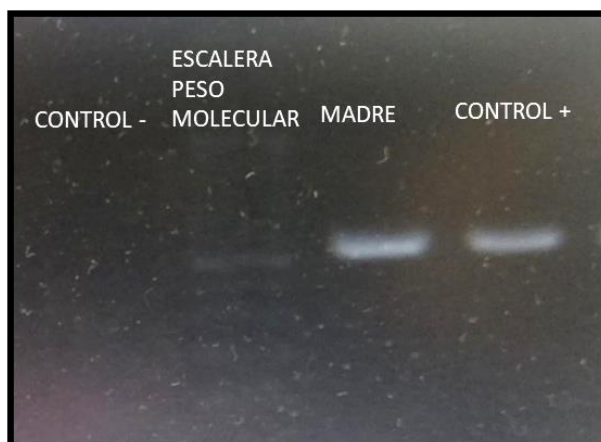


Figura 10. Bandas obtenidas por la PCR del exón 2 del gen *MIDI*. Se aprecian en orden: el control negativo, la escalera de peso molecular de 100 pb, indicando un peso aproximado de 406 pb en la banda obtenida de la PCR

## **PURIFICACIÓN DE LA BANDA DEL EXÓN 2 DEL GEN *MIDI* MATERNO.**

La banda correspondiente se purifico usando el kit QIAquick® gel extration, se siguió el siguiente protocolo, adaptado al sugerido por el fabricante para muestras con ADN mayor a 10 ng/μl:

1. Se confirmó el peso de la banda en 322 mg.
2. Se agregaron 3 volúmenes del buffer QG por 1 volumen de gel (322 mg gel= 966 μl de buffer).
3. Se incubó a 50°C, por 10 minutos realizando mezcla por vortex cada 2 minutos. Se verifico que el gel se disolviera en su totalidad.
4. Se corrobore el color amarillo en la mezcla, indicando un pH de 7.5, siendo óptima para su utilización.
5. Se agregó el equivalente al volumen del gel de cada muestra de isopropanol al 100% a 50°C (322 μl) y se mezcló por vortex.
6. La mezcla se colocó en una columna de 2 ml, (incluida en el kit) y se centrifugo por un minuto a 17,900g. Debido a que el volumen máximo permitido es de 750μl, este paso se repitió en 2 ocasiones, realizando el paso 7 entre ellos.
7. Se descartó el excedente y se colocaron las columnas en los mismos tubos.
8. Se agregaron 500μl de buffer QG y se centrifugo a 17,900 g, por un minuto, se descartó el filtrado y las columnas se colocaron en el mismo tubo.

9. Las columnas se lavaron aplicando en el centro del filtro 730µl de buffer PE y se dejó reposar por 5 minutos. Las columnas se centrifugaron a 17,900g por un minuto, se descartó.
10. Se transfirió la columna a un tubo limpio de 1.5 ml.
11. Se procedió a la elusión del ADN, se agregaron 30µl de agua libre de proteasas en el centro de la columna y se dejó reposar por 4 minutos y posteriormente se centrifugo a 17,900g por un minuto.

La concentración del ADN obtenido por este método se cuantifico en 8.5 ng/µl, con una relación 260 de 0.17 y 260/280 de 3.82.

### **SECUENCIACIÓN TIPO SANGER.**

La secuenciación fue realizada en la unidad de genética y genómica del Centro de Investigación Nacional y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por lo que el protocolo se modificó en base a lo sugerido por este laboratorio y a las características del purificado a secuenciar.

El marcaje se realizó utilizando los oligonucleótidos diseñados previamente para Fw y Rv para el exón 2 del gen *MIDI*, mismos que se diluyeron en 2µl de H<sub>2</sub>O, por cada µl de primer. Estas diluciones se utilizaron para realizar la mezcla para marcaje de la muestra al igual que el kit BigDye terminator reaction mix® y el buffer BDT secuencing®. Se realizaron 2 mezclas diferentes, una para cada uno de

los dos oligonucleótidos. Las mezclas se calcularon a un volumen total de 20  $\mu$ l, y su contenido se describe en la tabla 14.

<b>Componente</b>	<b>Cantidades</b>
<b>Big Dye terminator reaction mix®.</b>	4 $\mu$ l
<b>BDT sequencing Buffer</b>	2 $\mu$ l
<b>Oligonucleótidos*</b>	2 $\mu$ l
<b>H<sub>2</sub>O</b>	10 $\mu$ l
<b>ADN</b>	2 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	20 $\mu$ l

Tabla 14. Componentes de la mezcla para marcaje de la secuencia del exón 2 del gen *MIDI* materno. \*se realizaron 2 mezclas en una de ellas de utilizo el oligonucleotido Fw y otra para Rv, por lo que utilizó el primer requerido en cada caso.

Las mezclas se colocaron en el termociclador, el programa se describe en la tabla 15.

<b>ETAPA</b>	<b>TEMPERATURA</b>	<b>TIEMPO</b>	<b>CICLOS</b>
<b>Incubación</b>	96°C	5 min	1
<b>Desnaturalización</b>	96°C	30 seg.	25
<b>Alineación</b>	50°C	30 seg	
<b>Extensión</b>	60°C	30 seg.	
<b>Elongación final</b>	60°C	7 min	1
<b>Conservación</b>	4°C	$\infty$	1

Tabla 15. Programa de marcaje de secuenciación del exón 2 materno del gen *MIDI*.

El producto del marcaje se sometió a purificación utilizando el siguiente protocolo:

1. Se transfirieron las muestras salidas del termociclador a tubos Eppendorf® de 2 ml. Y se agregaron 5µl de EDTA al 0.125% y 60µl de etanol absoluto.
2. Se dejaron en reposo por 15 minutos.
3. Las muestras se colocaron en centrifuga fría (4° C) y se centrifugaron a 1860g por 45 minutos.
4. Se decantó el excedente sin golpear, para garantizar la conservación de las muestras.
5. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 187g por un minuto.
6. Se agregaron 60µl de etanol al 70%.
7. Las muestras se colocaron en centrifuga fría (4° C) y se centrifugaron a 1860g por 15 minutos.
8. Se decantó el excedente sin golpear, para garantizar la conservación de las muestras.
9. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente a 187g por un minuto.
10. Se dejaron secar a temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas.

Se enviaron ambas muestras (Fw y Rv) al laboratorio receptor para su procesamiento. Se recibieron las secuencias presentadas en las figuras 34 y 35.

## ANÁLISIS FASE 2.

Como se discutió previamente la fase 2, se incorporaron 2 metodologías diferentes para búsqueda de genes mediante barrido génico: Panel General para enfermedades cardiovasculares y secuenciación de exoma completo.

El panel general de enfermedades cardiovasculares abarco 380 genes previamente descritos como asociados a la génesis de diferentes cardiopatías congénitas tanto aisladas como sindromáticas (ver tabla 16), que debido a la amplia heterogeneidad alélica en este tipo de patologías eran imposibles de descartar en una primera instancia, no se presentó ninguna variante de interés, sin embargo es importante señalar que esto no implica que no existan genes relacionados en el desarrollo de la CATVP, si no que cualquiera que fuere, no se ha asociado previamente o no se ha considerado en el diseño molecular de la prueba, por lo cual el análisis del exoma tomó gran importancia.

<i>ACTA2</i>	<i>ACTC1</i>	<i>ACVR1</i>	<i>ACVR2B</i>	<i>ACVRL1</i>
<i>ANKRD1</i>	<i>B3GAT3</i>	<i>BMPR2</i>	<i>BRAF</i>	<i>CBL</i>
<i>CFC1</i>	<i>CITED2</i>	<i>COL1A1</i>	<i>COL1A2</i>	<i>COL3A1</i>
<i>COL5A1</i>	<i>COL5A2</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CRELD1</i>	<i>CHD7</i>
<i>DTNA</i>	<i>EFEMP2</i>	<i>EHMT1</i>	<i>ELN</i>	<i>ENG</i>
<i>EP300</i>	<i>EVC</i>	<i>EYA4</i>	<i>FBN1</i>	<i>FBN2</i>
<i>FLNA</i>	<i>FOXC1</i>	<i>FOXF1</i>	<i>FOXH1</i>	<i>FOXP1</i>
<i>GAA</i>	<i>GATA4</i>	<i>GATA5</i>	<i>GATA6</i>	<i>GDF1</i>
<i>GJA1</i>	<i>GJA5</i>	<i>HAND2</i>	<i>HRAS</i>	<i>IRX4</i>
<i>ISL1</i>	<i>JAG1</i>	<i>KANSL1</i>	<i>KCNA5</i>	<i>KCNJ8</i>
<i>KCNK3</i>	<i>KMT2D</i>	<i>KRAS</i>	<i>LEFTY2</i>	<i>MAP2K1/MEK1</i>
<i>MAP2K2</i>	<i>MCTP2</i>	<i>MED12</i>	<i>MED13L</i>	<i>MFAP5</i>
<i>MIB1</i>	<i>MYBPC3</i>	<i>MYH11</i>	<i>MYH6</i>	<i>MYH7</i>
<i>MYLK</i>	<i>NEXN</i>	<i>NF1</i>	<i>NKX2-5</i>	<i>NKX2-6</i>
<i>NODAL</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>PHP4</i>
<i>NRAS</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>PITX2</i>	<i>PLOD1</i>	<i>PRKG1</i>
<i>PTPN11</i>	<i>RAF1</i>	<i>RASA1</i>	<i>RASA2</i>	<i>RIT1</i>
<i>SALL4</i>	<i>SHOC2</i>	<i>SKI</i>	<i>SLC2A10</i>	<i>SMAD1</i>
<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD6</i>	<i>SMAD9</i>	<i>SOS1</i>
<i>SOS2</i>	<i>SPRED1</i>	<i>TAB2</i>	<i>TBX1</i>	<i>TBX20</i>
<i>TBX5</i>	<i>TDGF1</i>	<i>TFAP2B</i>	<i>TGFB2</i>	<i>TGFB3</i>
<i>TGFBR1</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>TNNI3</i>	<i>TNNI3K</i>	<i>TOPBP1</i>
<i>UPF3B</i>	<i>ZDHHC9</i>	<i>ZFPM2</i>	<i>ZIC3</i>	

Tabla 16. Genes incluidos en el panel general de enfermedades cardiovasculares asociados previamente a CC.



En el caso de la secuenciación de exoma completo se incluyó la secuenciación en paralelo de todo el genoma codificante, como era de esperarse se identificaron múltiples variantes patogénicas y de significado incierto, dispersas a lo largo del genoma, el tipo de regiones donde se describieron se muestran en la figura 11. El análisis manual de la región 4q11 se realizó comparando la secuencia obtenida en el estudio de exoma con la presentada en el genome browser ensemble®, dando una especial atención al exón 11 del gen *EPHA5*, mismo que no se había podido secuenciar por metodología Sanger en la primera fase del estudio. Este análisis permitió identificar variantes que pudieran involucrar cambios sutiles en las estructuras proteicas con la posibilidad de haber sido ignoradas por la computadora, como mutaciones de sentido equivocado o modificación de los sitios de corte y empalme, a pesar de esto no se logró identificar ninguna variante de interés en las regiones codificantes. El resto del locus altamente homocigoto tampoco mostro variantes sospechosas.

Al estudiar el resto de la secuencia del exoma, usando un análisis terciario con el programa Integrative Genomics Viewer (IGV), fue llamativa la presencia de una variante de significado incierto en el gen *MIDI*, previamente asociado a cardiopatía sindromática y que no se encontraba incluido en el panel cardiovascular.

<b>REGIÓN</b>	<b>VARIANTES ENCONTRADAS</b>
<b>EXÓNICAS</b>	<b>401</b>
Sinónimas	233
No sinónimas	164
Inserción	3
Delección	1
<b>INTRÓNICAS</b>	<b>351</b>
Intrónicas splicing	51
Intrónicas no splicing	300
<b>UTR</b>	<b>71</b>
<b>TOTAL</b>	<b>823</b>

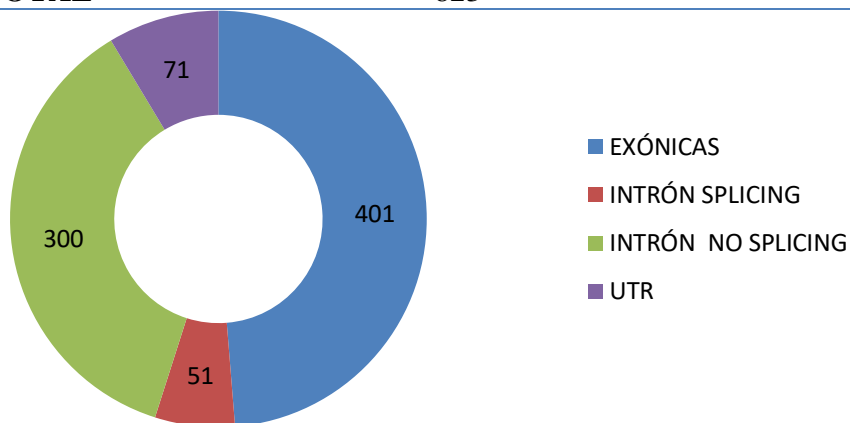


Figura 11. Variantes génicas encontradas mediante secuenciación de exoma. Arriba se muestran el tipo de regiones específicas en donde se describieron.

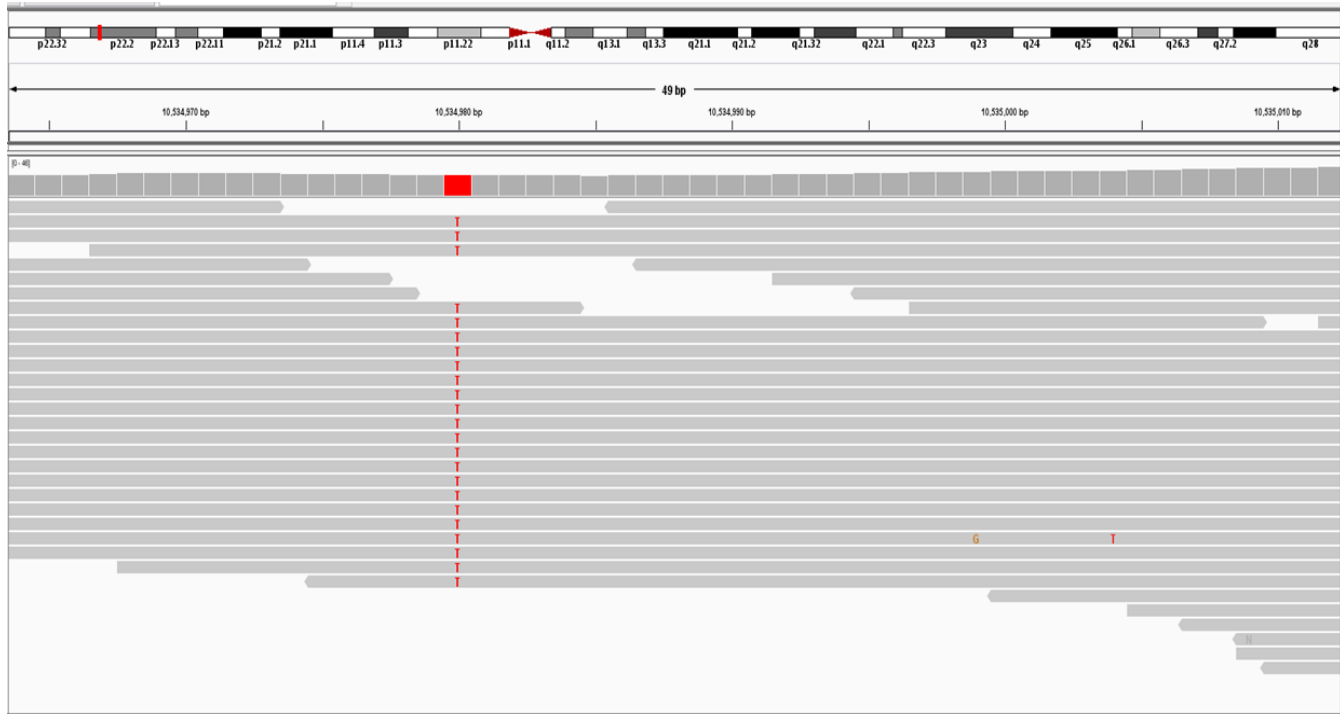
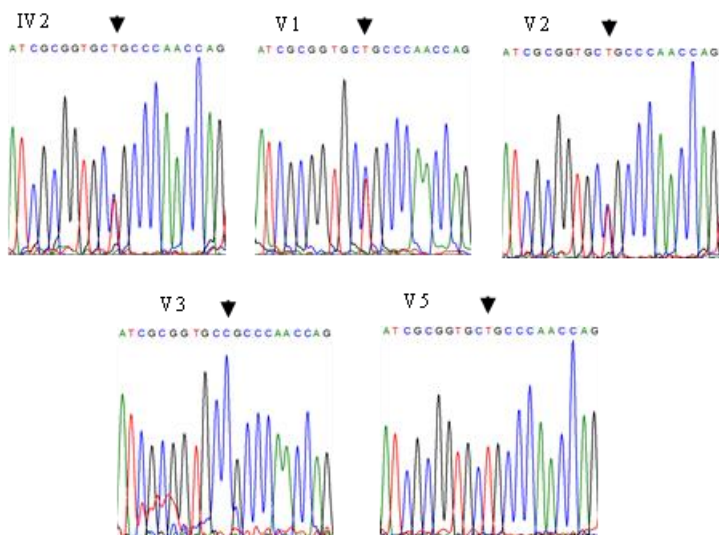


Figura 12. Imagen del IGV, correspondiente a la base 608, del exón 2 del gen MID1 en el propósito, donde se aprecia el cambio en toda la profundidad del estudio.

La variante de significado incierto que resulto llamativa se encontró en estado hemicigoto en el paciente, en el locus Xp22.2, en la posición registrada en dbSNP con referencia rs 754279780, que consistía en un cambio en ADN complementario de C>T608 y un cambio en el aminoácido ARG203GLN, este cambio era observable en toda la profundidad del archivo BAM, en el Integrative Genomics Viewer (IGV) (figura 11).

Se comprobó que esta misma variante estuviera presente en la madre (III1) en estado heterocigoto mediante secuenciación Sanger, tanto la secuencia FW como RV, mostraron esta variante, demostrando un estado de portadora. En el caso de las hermanas del propósito se demostró el estado de portadora en dos de ellas (V1, V2) (figura 3 y 13)



**Figura 13.** Secuenciación Sanger correspondiente a la secuencia FW de los nucleótidos 595 a 618 del exón 2 del gen *MIDI* de la madre y hermanas del propósito, se aprecia un cambio heterocigoto en la posición 608, caracterizada por un cambio T/C en los sujetos IV2, V1, V2 y V5.

La variante se encontró en la región codificante del gen *MIDI*, que es causante del síndrome de Opitz tipo I (OS) o GBBB I (MIM # 300000) y se localiza en el *locus* Xp22.2 con una herencia ligada al cromosoma X, con penetrancia completa en varones, pero con expresividad variable en las mujeres en quienes presenta penetrancia y expresividad mínima. Este gen codifica para una proteína de 667 Aminoácidos perteneciente a la familia TRIM (tripartite motif), conocida como Midline 1 o TRIM18 (NP\_001334662.1 NCBI protein

reference database), misma que se expresa en 27 tejidos del ser humano sano, incluyendo el corazón<sup>71</sup>.

El análisis específico mostro que esta variante se ha reportado previamente en el gene browser 1000 genomes, en 2 mujeres mexicanas sanas residentes en los Ángeles, California, en estado heterocigoto, no estando presente en otras poblaciones<sup>19</sup>, *gnomAD* confirmo la presencia de la variante en solo 2 de los 178,654 alelos estudiados, ambos en 2 mujeres hispanas sanas<sup>72</sup>, el EVS<sup>73</sup> no generó ningún resultado, esto nos da un criterio de patogenicidad PM2<sup>78</sup>.

Las pruebas iniciales *in silico* con predictores sobre el efecto de la variante se realizaron con las plataformas Mutation Taster, DANN, FTHMM MKL Coding y FTHMM MKL no Coding, en todos los casos se obtuvieron valores cercanos a 1 (tabla 17), siendo sugerentes de un efecto patogénico de la variante.

PLATAFORMA	VALOR
Mutation Taster	1
DANN	0.999383
FTHMM MKL Coding	0.93828
FTHMM MKL no Coding	0.98801

**Tabla 17.** Valores obtenidos en las plataformas predictoras de efecto de la variante C>T608; como se puede observar todos poseen valores cercanos a 1.

El alineamiento demostró que la Arginina en la posición 203 de

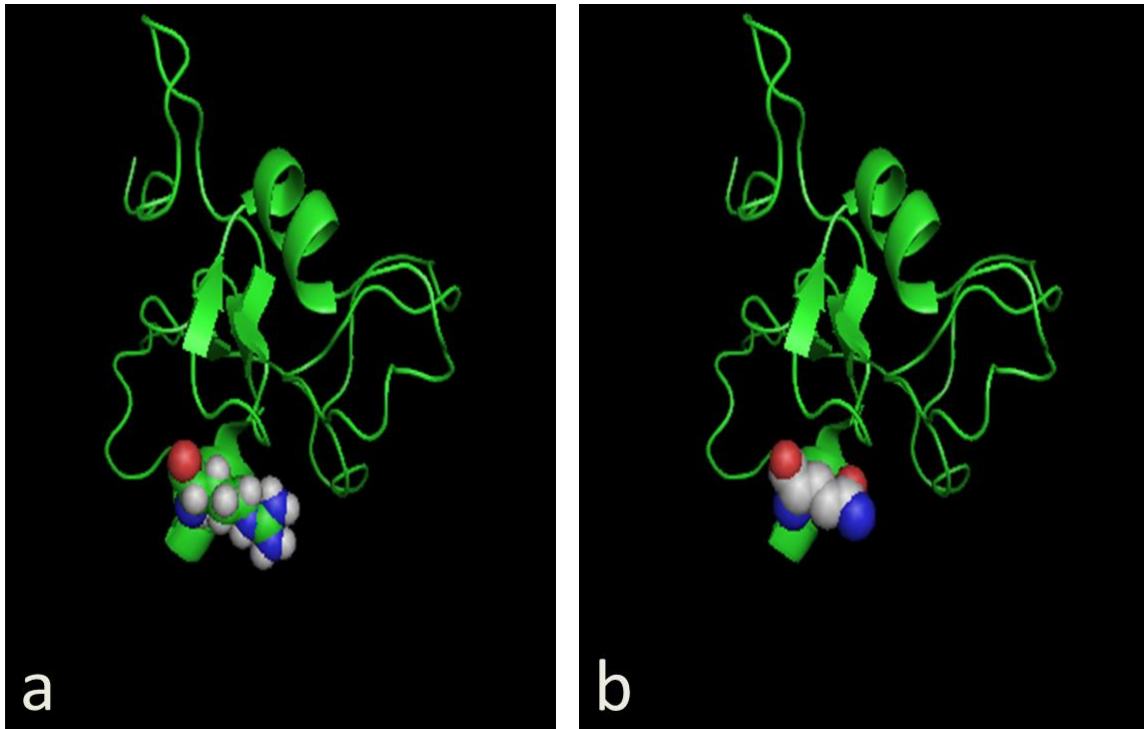
la proteína está altamente conservada en diferentes especies (figura 14), con excepción del pez cebra en el cual la arginina se ve sustituida por una histidina, ambos aminoácidos polarmente cargados, mientras que en nuestro paciente se encuentra un cambio por glutamina, modificando la polaridad.

La visualización en la plataforma PyMol mostró el cambio en la cadena lateral cercano a un dedo de zinc que está ubicado en His204 (figura 15). Es importante señalar que la variante Arg203Gln, se encuentra ubicada en la porción terminal del exón 2 y corresponde al dominio B-box2 de la proteína, solo se han reportado 3 variantes de manera previa en dicho dominio, Cys187X<sup>74</sup>, Cys195phe<sup>75,76</sup> y 606delG<sup>75 77</sup>, en todos los casos las variantes fueron patogénicas y mostraron expresividad variable (tabla 18). El efecto molecular de las mismas no se ha identificado en su totalidad, sin embargo, existe evidencia sobre la importancia de una apropiada coordinación entre los 2 dedos de zinc del dominio para mantener una estructura terciaria adecuada y poder interactuar adecuadamente con los dominios B-Box 1 y Ring<sup>78</sup>, es decir mutaciones en este dominio se asocian con una función disminuida de la proteína.

ESPECIE	SECUENCIA
HUMANO	EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
CHIMPANCE	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKVS-----PIRLKRSKGLEGT
RATÓN	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
PERRO	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTSLIKRNTELETL
GATO	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
VACA	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
OVEJA	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
GALLINA	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHREHQVAALSERYDKLKQNLESNLTNLIKRNTELETL
WALLABY	 EKVNMYCVTDDQLICALCKLVGRHRDHQVAALSERYDKLKXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
MOLLY DEL AMAZONAS	 EKVNMYCVTDEQLICALCKLVGRHRDHQVAALSDRYDKLKQALDSNLSSLIKRTSELE
PEZ CEBRA	 EKVNMYCITDEQLICSLCKLVGHHREHQVASLGERYDKLKQMLDSNLSNLIKRNSELE

**Figura 7.** Alineamiento múltiple entre las secuencias de la proteína midline 1 humana y ortólogos de diferentes especies, se observa que el aminoácido arginina (R) está altamente conservado con excepción del pez cebra, en donde está presente una histidina (H).





**Figura 8.** Visualización de la proteína MID1, en el programa PyMol, con la PDB de referencia Jun2. a) proteína silvestre, b) proteína mutante.

Variante	Tipo de mutación	Fenotipo
Arg203Gln	Sentido equivocado	Hipertelorismo, Frontal amplio, CATVP
Cys187X	Sin sentido	Hipertelorismo, LPH, Hipospadias
Cys195Phe	Sentido equivocado	Hipertelorismo, fístula traqueoesofágica, discapacidad intelectual y cardiopatía no especificada
606delG	Cambio en el marco de lectura	Hipertelorismo, Fistula traqueoesofágica, hipospadias, Discapacidad intelectual

**Tabla18.** Mutaciones descritas en la literatura con afectación del dominio Box2 de la proteína TRIM18. se observan el tipo de mutación y sus características fenotípicas más importantes.

Por otra parte, la evaluación clínica de caso índice (V5) y los antecedentes familiares revelaron dismorfias faciales leves y TAVPC con un aparente patrón de herencia autosómica recesiva. consistente en una variante sin sentido c.608G>A en estado heterocigoto en la madre (III1) y las hermanas (V1, V2) (Figura 3).

Las evaluaciones clínicas y cardiológicas de los hermanos (V1, V2 y V3) del caso índice, fueron normales. El desarrollo psicomotor y crecimiento fueron normales, no se encontraron defectos cardiovasculares dismorfias faciales, ni otras anomalías físicas o

enfermedades. Por lo tanto, la presentación clínica familiar y la determinación del estado heterocigoto de la variante de las hermanas (V1, V2), proponen el patrón de herencia ligado al cromosoma X, que demuestra un criterio de patogenicidad PP4 de la variante c.608G>A para SO<sup>24</sup>.

Las mutaciones en la B-Box 1 o B-Box 2 de la MID1 se han encontrado en pacientes con SO (Tabla 17, ANEXO 2). Se cree que estas mutaciones proporcionan pérdida de la función de MID1. El cambio en la posición 203 de la proteína está relacionado con la alteración del entorno químico generado en la región de uno de los dedos de zinc, presentes en la estructura de la proteína, probablemente impidiendo la unión del metal, esencial para ejercer la función del dominio B-Box 2, y la estabilización de la interfaz del dominio en tándem. Por lo que, a la variante c.608G>A se le asignó el criterio de patogenicidad PP3<sup>24</sup>. Y ya que se encuentra en un dominio funcional de la proteína, permite asignar el criterio de patogenicidad PM1<sup>24</sup>.

## DISCUSIÓN

### SÍNDROME DE OPITZ 1.

El síndrome de Opitz tipo I (OS) o GBBB I (MIM # 300000) es una condición genética rara con una herencia ligada al cromosoma X que es caracterizada por defectos de la línea media con una importante expresividad variable<sup>79-82</sup>, incluyendo hipoplasia cerebelar, frontal amplio, hipertelorismo, implantación anómala de los pabellones auriculares, fisuras faciales, fistula traqueo esofágica e hipospadias, así como cardiopatías congénitas que comprenden defectos septales, persistencia de conducto arterioso, estenosis e hipoplasia de la arteria pulmonar, coartación de la aorta, vena cava superior persistente, corazón izquierdo hipoplásico y doble salida del ventrículo derecho, con o sin discapacidad intelectual<sup>76</sup>. Como se refirió previamente el OS presenta una penetrancia incompleta en las mujeres con una expresividad mínima caracterizada por hipertelorismo (ANEXO 2).

Si bien no existe una relación genotipo-fenotipo clara, un análisis de la literatura demuestra el amplio espectro de la patología y lo compara con las características clínicas del propósito y de su hermano fallecido basado en las notas médicas.

### PROTEINA MIDLINE 1

Las proteínas Midline1 o TRIM18, pertenece a la familia tripartite motif (TRIM), que se caracterizan por ser metaloproteínas con una composición de dominios RBCCC (Ring-BBox-Coiled Coil)<sup>83</sup>. En el caso particular de Midline 1, la función principal es la formación de

homodímeros para asociarse a microtubulos mediante ubiquitinación<sup>83-85</sup>, los cambios patogénicos en la secuencia condicionan una pérdida de función al generar un acumulo de la subunidad catalítica  $\alpha$  de la protein fosfatasa, con una hipofosforilación subsecuente de las proteínas asociadas a microtúbulos<sup>86-89</sup>.

Como se ha observado previamente el espectro fenotípico del SOI es muy variado, esto puede ser explicado por el amplio número de genes que son regulados o sub regulados por MID1. Si bien hasta el momento no se ha observado una asociación fenotipo-genotipo, con excepción de las malformaciones cerebrales y las mutaciones sin sentido<sup>90</sup>; muchas características clínicas se superponen a los efectos conocidos de los genes regulados. Se sabe que la interacción génica es tan importante que la inhibición de la expresión de la proteína Midline-1 ha sido propuesta como blanco terapéutico de diversas enfermedades como enfermedad de Huntinton<sup>91</sup>, Alzheimer<sup>92</sup> o cáncer<sup>93-95</sup>.

A nivel molecular MID1 tiene la función principal de activar la ubiquitin ligasa 3, la cual ubiquitinizara a la proteína  $\alpha 4$  y a la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 2A (PP2A), sin embargo, múltiples genes son regulados o subregulados<sup>79</sup> por este gen y mutaciones en *MID1* repercutirán en la función de diversas vías génicas. Existen genes directamente asociados a la función de MID1, como por ejemplo *IGBP1* (immuno- globin binding protein), la cual permite la monoubiquitinación de alpha-4, mediante su unión con el dominio

Ring<sup>88,96,97</sup>. El dominio RING del gen *MIDI* se ha asociado de manera directa con la actividad de la ubiquitin ligasa 3, cuando se presentan mutaciones en B-box 1, el dominio RING no activa a la ubiquitin ligasa y por ende disminuye la ubiquiti<sup>98</sup> (ANEXO 3).

Por otro lado, PP2A es un regulador novel de la vía TOR <sup>79,99</sup> y su activación depende de los dedos de zinc del dominio RING y BBOX 1. La subunidad  $\alpha 4$  por otro lado se une a Bbox 1 y es por ello por lo que mutaciones en este dominio se asocian de manera directa a una disminución de la poliubiquitinación de la misma.

PAX6 es un factor de transcripción asociado al desarrollo del ojo, cerebro y páncreas, en xenopus se ha demostrado que el homólogo Mid1 regula la ubiquitinación y degradación del proteosoma de PAX6 y por lo tanto este gen se sobre expresa al disminuir la actividad de Mid1. De forma interesante el gen *SHH* (Sonic Hedgehog) inhibe la actividad de *PAX6*<sup>100</sup> En el pollo el ortólogo *Shh* ha demostrado actividad regulatoria en el nódulo de Hense, en donde de hecho *Shh* regula el lado izquierdo y *Mid1* el lado derecho, siendo ambos genes fundamentales para determinar la lateralidad (derecha izquierda) en etapas embrionarias tempranas. Si bien, en el ser humano *MID1* no es necesario para la lateralidad, se ha descrito una regulación negativa de *SHH* mediante la activación del gen *BMP4*, que reprime su expresión. Además, la activación de PP2A también es la principal fosfatasa para la activación de TAU, por lo tanto, la inhibición de *MID1* se ha visto como un blanco terapéutico para las tauropatías <sup>101</sup> .

El papel de *MID1* en la traducción ha sido ampliamente descrita, ya que se une al complejo de riboproteínas que la regula, incluyendo a

EF-1 $\alpha$  y de manera secundaria a otros genes como *ANXA2*, *RACK1* y *NPM* y a otras proteínas de choque térmico como *HSP90B*<sup>86</sup>, esta última proteína a su vez regula a *HTT*, que es el gen que produce la huntingtina por lo que la inhibición de *MID1* también se ha propuesto como blanco terapéutico para la enfermedad de Huntington<sup>91</sup>. Respecto al receptor de andrógenos, se sabe que *MID1* aumenta la traducción del gen *AR*<sup>102</sup> que a su vez regula a la alta a los genes *AKT*, *APDK1* y *GLI3*, este último también sufre una regulación negativa por *SHH*<sup>100</sup>. Dado a que la sobre expresión de *GLI3* se ha asociado con cáncer también se ha descrito como un posible blanco terapéutico. La regulación de *MID2* es clara a nivel molecular al formar homodimeros y heterodimeros con *MID1*<sup>89</sup>, fenotípicamente causan alteraciones similares.

Basándonos en la información anterior, interpretamos que la variante c.608G>A encontrada en el presente estudio es probablemente patogénica debido a una combinación de dos criterios moderados y dos criterios de apoyo para la patogenicidad<sup>24</sup>. Estos fueron (a) su localización dentro del dominio B-Box tipo 2, un dominio funcional crítico y bien establecido funcional (dedo de zinc de la proteína) (PM1) y un punto caliente punto caliente de la proteína; (b) la frecuencia del alelo en la población general es del 0,001% (PM2); (c) el efecto deletéreo de la variante en la proteína mediante análisis computacional (PP3), y (d) el patrón de herencia de la variante, así como el fenotipo observado en la familia estudiada (PP4) (ver tabla 3 y 4)<sup>24</sup>.



## CONCLUSIÓN.

Se halló una nueva variante probablemente patogénica en MID1 c.608G>A asociada al síndrome de Opitz tipo I.

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES ASOCIADAS.

Se presentaron los avances del protocolo en el congreso nacional de genética humana 2018, siendo premiado como uno de los mejores 20 trabajos.

Se ha publicado un artículo sobre etiología de CATVP en casos esporádicos en familias mexicanas.

Se presentó examen de candidatura en junio de 2019 obteniendo el dictamen positivo.

Se cuenta con un artículo publicado: Mol Genet Genomic Med. 2023;00:e2234. | 1 of 13 <https://doi.org/10.1002/mgg3.2234>.

# ANEXOS

## ANEXO 1. Carta de aceptación por el comité de ética del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD  
INSTITUCIÓN DE INVESTIGACIÓN

México, D.F., a 10 de febrero de 2015 DG/1000/ 103 /2015

Dra. Rocio Sánchez Urbina  
Laboratorio de Investigación en Biología del  
Desarrollo y Teratogénesis Experimental  
Presente

Informo a usted, que los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad, después de haber revisado su protocolo **HIM-2015-036** "Identificación de mutaciones para conexión anómala total de venas pulmonares variedad mendeliana, mediante mapeo de autocigosidad", han emitido el dictamen de:

**APROBADO**

En los términos y condiciones señalados por dichos Comités. Por lo anterior, se autoriza su desarrollo.

Atentamente

Dr. José Alberto García Aranda  
Director General

Con copia:  
C.P. Elias Hernández Ramírez, Jefe de la Unidad Auxiliar Administrativa de Proyectos de Investigación.  
JAGA/OMH/JGO/bvg

**INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM**  
DL. MÁRQUEZ 562, COL. DOCTORES DEL CLAYTON, C.P. 06720 MÉXICO D.F.  
COMPUTADOR, 5228-9917 EXT. 4315 Y 4100  
[www.inmfi.edu.mx](http://www.inmfi.edu.mx)

ANEXO 2.

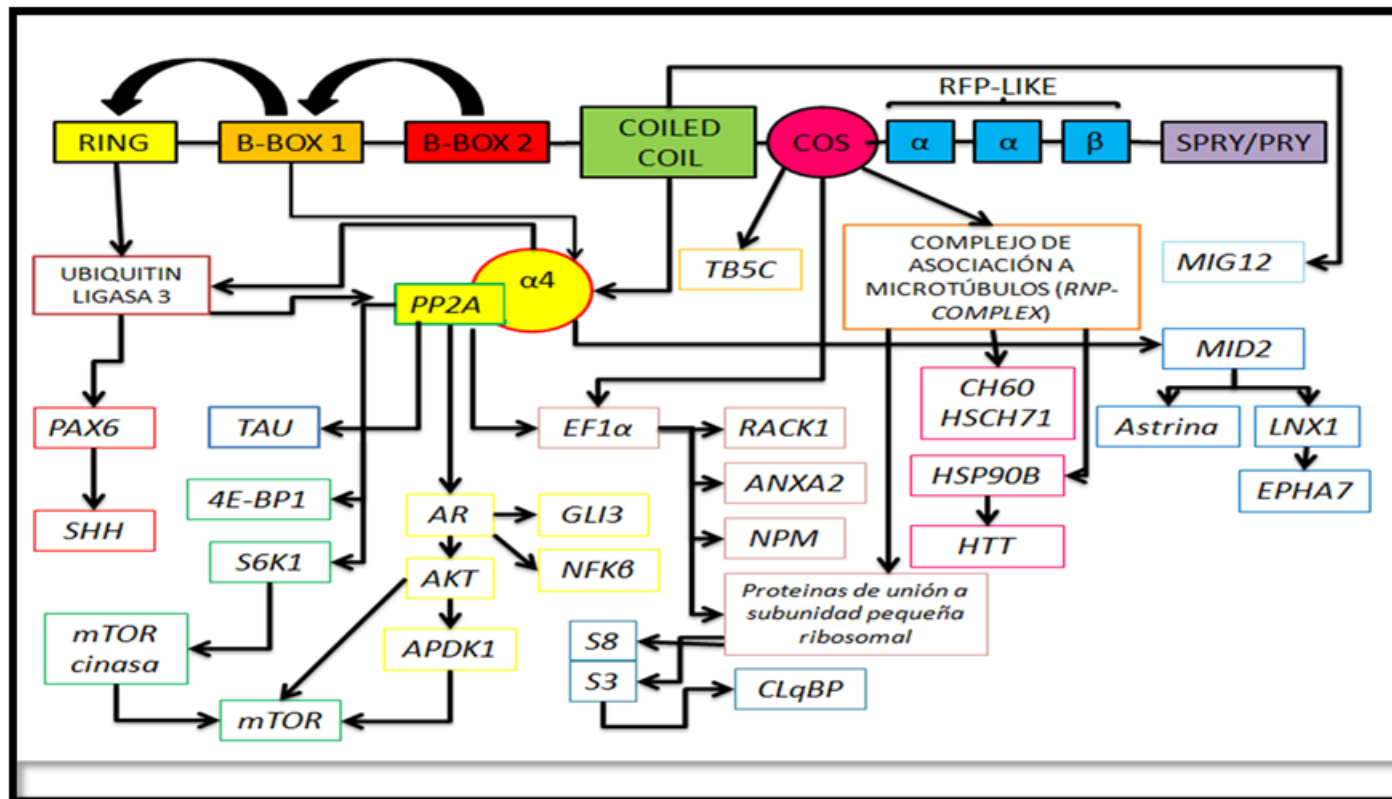
AUTOR	Mutación	Fenotipo no especificado	Hipertelorismo	Labio/paladar hendido	Fistula traqueoesofágica	Atresia anal	Hipospadias	Discapacidad intelectual	Implantación auricular baja	Displasia auricular	Pico de viuda	Alteración de la deglución/mastic	Alteración renal	Polihidroamnios	Madre con hipertelorismo	Cardiopatía congénita
So et al <sup>82</sup>	c.884T>C <sup>82</sup>		X	X			X								X	
	c.1545_1546delGA		X	X	X	X	X					X				ASD
	c.1171_1173delTCT		X	X		X	X									
	c.1656G>A		X	X		X	X								X	
	p.W552X	X														
	c.IVS3_16>T		X	X			X	X		X					X	
	c.1445_1446insAAA		X				X	X	X			X				
	c.1313_1316delTGAT		X	X				X	X	X						
	c.IVS7+1G>A		X	X			X								X	
c.IVS7_8_1447ins20pb		X	X			X			X							
c.829C>T		X	X			X					X					
Zhang et al <sup>81</sup>	c.712G>T		X				X									
	c.1230G>A		X				X									
	c.1284T>G		X				X									
	1679A>G		X				X									
Cheng et al <sup>103</sup>	c.1798insC		X	X			X									
	c.del3UTR	X														HLH,DSV D, HPA
Cho et al <sup>104</sup>	c.1798insC <sup>104</sup>		X		X		X								X	
Ferrentino et al <sup>74 *</sup>	c.712G>T		X				X									
	c.434G>A	X	X													
	c.1793delC	X	X													
	c.1285+1G>T	X	X													
	c.397_401delACCTG	X	X													
	c.1832A>G	X	X													
	c.819_829del11	X	X													
c.864+1G>T	X	X														

	c.388G>A	X	X														
	c.1141+2T>C	X	X														
	c.1573C>T	X	X														
	c.1856_1858delATG	X	X														
	c.1957G>A	X	X														
	c.1611_1612insTGAT	X	X														
	c.950_951insA	X	X														
	c.1108A>G	X	X														
	c.389A>T	X	X														
	c.561T>A	X	X														
	c.1605_1606insGTTT	X	X														
	c.1594G>A	X	X														
	c.1452_1455delACCA	X	X														
	c.430G>T	X	X														
	c.425G>C	X	X														
	c.1491_1533dup43	X	X														
	c.1663A>G	X	X														
Cox et al. <sup>105,106</sup>	c.1102C>T		X	X	X		X		X	X	X	X					
	c.1877T>C		X	X			X		X	X							PSA, ASD
	c.1051delC		X	X					X	X	X	X					VSD, ASD, COA
	c.1483C>T		X		X		X	X		X	X	X	X				VSD
	c.1402C>T		X		X		X	X		X	X	X					VSD, PS
	c.221_252del		X		X		X		X		X						
	c.343G>T		X	X	X		X	X		X	X	X	X				
De Falco et al. <sup>107</sup>	c.1387G>T		X	X	X		X										
	c.1331insA		X	X	X		X										
	c.1483C>T		X	X	X	X	X		X					X			
	c.757G>C		X	X	X		X							X			VCS, VSD
	c.1286G>A		X				X										
	c.1551insGTCAC		X		X	X	X										
	c.584G>T		X		X	X	X	X									
	c.1039C>T		X		X	X	X							X			BSVC
	c.1106_1107delAG		X	X	X		X	X	X								PDA
	c.1267G>T		X		X				X								
Fontanella et al. <sup>75</sup>	c.571T>A		X	X			X	X									
	c.584G>T		X		X	X	X	X									
	c.606delG		X		X		X	X									
Hunning et al. <sup>108</sup>	c.221_252dup		X									X				X	

Mnayer et al <sup>76</sup>	c.1322C>T		X		X		X			X	X				
Pinson et al <sup>77</sup>	c.1354G>A		X				X		X				X		X
	c.829C>T		X	X	X		X	X	X						
	c.1285_1289delGAGT		X		X		X	X	X		X				X
	c.1447insAACA		X		X	X	X						X		
	c.1483C>T		X	X			X	X	X			X			VSD
c.403_411delTCACTTG TG		X			X	X		X			X				
Ruiter et al <sup>90</sup>	c.1108A>G		X												
Shaw et al <sup>109</sup>	c.1483		X	X			X	X						X	BSVC
Taylor et al <sup>110</sup>	c.1798dupC		X		X	X	X								
Propósito	c. C>T608		X											X	CATVP
Hermano del propósito	c. C>T608		X					X						X	CATVP

**Tabla 18.** Genotipos y fenotipos de pacientes con síndrome de Opitz en la literatura. ABREVIATURAS: **HLH**, Corazón izquierdo hipoplásico. **DSVD**, Doble salida de ventrículo derecho. **HPA** Hipoplasia de la arteria pulmonar. **ASD** Defecto septal auricular. **VSD** Defecto septal ventricular. **PSA** Persistencia del conducto arterioso. **COA** Coartación de la aorta. **PS** Estenosis pulmonar. **VCS** Vena cava superior. **BSVC** doble salida de vena cava. superior. **NS**: no especificado.

ANEXO 3.



Estructura e interacciones de la proteína Midline 1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Shah SJ, Arnett DK. *Cardiovascular Genetics and Genomics in Clinical Practice*. (Shah SJ, Arnett DK, eds.). Bradford & Bigelow; 2015.
2. Palacios-Macedo A. Birth of a New Program in Mexico City: The Kardias Experience. *Pediatric Cardiac Surgery Annual*. 2008;11(1):7-10. doi:10.1053/j.pcsu.2007.12.002
3. Cervantes-Salazar J, Calderón-Colmenero J, Ramírez-Marroquín S, et al. Mexican registry of pediatric cardiac surgery. First report☆. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2014;71(5):286-291. doi:10.1016/j.bmhmx.2014.07.003
4. Calderon-Colmenero J. Regionalization of congenital heart disease care: A pending goal. *Arch Cardiol Mex*. 2019;89(2):138-146. doi:10.24875/ACME.M19000036
5. Calderón-Colmenero J, Cervantes-Salazar JL, Curi-Curi PJ, Ramírez-Marroquín S. Problemática de las cardiopatías congénitas en México. Propuesta de regionalización. *Arch Cardiol Mex*. 2010;80(2):133-140.
6. Instituto Nacional de Geografía e informática (INEGI). Pagina oficial con información geográfica y demografica de México. Consulta interactiva de datos. Base de datos Mortalidad en menores de un año. Accessed April 8, 2020. <https://www.inegi.org.mx/sistemas/olap/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
7. Seale AN, Uemura H, Webber SA, et al. Total anomalous pulmonary venous connection: Morphology and outcome from an international population-based study. *Circulation*. 2010;122(25):2718-2726. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.940825



8. Attie F, Colmenero, Calderón J, Zabal Cerdeira C, Buendía Hernández A. *Cardiología Pediátrica*. 2da e. Médica Panamericana; 2013.
9. Básica I, Castellanos LM, Aurelia C, Vargas S, Nivon MK. [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com) Estudio morfológico de la conexión anómala total de venas pulmonares. 2007;77(4):265-274.
10. Antonio Manzo-Ríos M, Ernesto Anaya-García J, Ruiz-Gastelum E, et al. Conexión Anómala Total de Venas Pulmonares Infracardiaca, Presentación de un Caso. *Bol Clin Hosp Infant Edo Son*. 2007;24(1):42-47.
11. Stein P. Total anomalous pulmonary venous connection. *AORN J*. 2007;85(3):509-520; quiz 521-524. doi:10.1016/S0001-2092(07)60123-9
12. Evans WN, Acherman RJ, Ciccolo ML, Castillo WJ, Restrepo H. An increased incidence of total anomalous pulmonary venous connection among Hispanics in southern Nevada. *Congenit Heart Dis*. 2015;10(2):137-141. doi:10.1111/chd.12199
13. Cervantes-Salazar J, Calderón-Colmenero J, Ramírez-Marroquín S, et al. El Registro Mexicano de Cirugía Cardíaca Pediátrica. Primer informe. *es i Revista de Investigación Clínica*. 2013;65(6):476-482.
14. Rosenthal N, Harvey R. *HEART DEVELOPMENT AND REGENERATION*. First edit. Elsevier; 2010.
15. Carlson MB. *Embiología Humana y Biología Del Desarrollo*. 2da ed. Harcourt; 2000.
16. Delisle G, Ando M, Calder AL, et al. Total anomalous pulmonary venous connection: Report of 93 autopsied cases with emphasis on diagnostic and surgical considerations. *Am Heart J*. 1976;91(1):99-122.

17. Klug WS, Cummings M, Spencer C, Palladino M. *Conceptos de Genética*. 10th ed.; 2013.
18. STRACHAN T, READ A. *Genética Humana*. 3rd ed. Mc Graw Hill; 2010.
19. Gibbs RA, Boerwinkle E, Doddapaneni H, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74. doi:10.1038/nature15393
20. Zhu M, Zhao S. Candidate Gene Identification Approach: Progress and Challenges. *Int J Biol Sci*. Published online 2007:420-427. doi:10.7150/ijbs.3.420
21. Fike AJ, Elcheva I, Rahman ZSM. The Post-GWAS Era: How to Validate the Contribution of Gene Variants in Lupus. *Curr Rheumatol Rep*. 2019;21(1):3. doi:10.1007/s11926-019-0801-5
22. Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat*. 2016;37:564-569. doi:10.1002/humu.22981
23. Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet*. Published online 2017. doi:10.1016/j.ajhg.2017.01.004
24. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. Published online 2015. doi:10.1038/gim.2015.30
25. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013;112(4):707-720. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300853

26. Alvarado-Terrones EG, Perea-Cabrera M, Klünder-Klünder M, et al. Maternal Obesity as a Risk Factor for the Development of Total Anomalous Pulmonary Venous Connection in Their Offspring. *Arch Med Res*. 2018;49(2):109-113. doi:10.1016/J.ARCMED.2018.06.001
27. Bleyl S, Botto L, Carey J, et al. Analysis of a Scottish founder effect narrows the TAPVR-1 gene interval to chromosome 4q12. *Am J Med Genet Part A*. 2006;140(A):2368–2373. doi:10.1002/ajmg.a.31471
28. Bleyl S, Nelson L, Odelberg SJ, et al. A gene for familial total anomalous pulmonary venous return maps to chromosome 4p13-q12. *Am J Hum Genet*. 1995;56(2):408-415.
29. Nash D, Arrington CB, Kennedy BJ, et al. Shared Segment Analysis and Next- Generation Sequencing Implicates the Retinoic Acid Signaling Pathway in Total Anomalous Pulmonary Venous Return (TAPVR). Published online 2015. doi:10.1371/journal.pone.0131514
30. Wei C, Daniel KB, Robert AS, David HP. Identification and Characterization of a Novel Cytokine-inducible Nuclear Protein from Human Endothelial Cells. *J Biol Chem*. 1995;270(17):10236-10245. doi:doi: 10.1074/jbc.270.17.10236
31. Cinquetti R, Badi I, Campione M, et al. Transcriptional deregulation and a missense mutation define ANKRD1 as a candidate gene for total anomalous pulmonary venous return. *Hum Mutat*. 2008;29(4):468-474. doi:10.1002/humu.20711
32. Acquati F, Russo A, Taramelli R, Tibiletti MG, Taborelli M, Camesasca C et al. Nonsyndromic Total Anomalous Venous Return Associated With a De Novo Translocation Involving Chromosomes 10 and 21 t(10;21)(q23.1;q11.2). *Am J Med Genet*. 2000;95(3):285-286.

33. Baxter EJ, Hochhaus A, Bolufer P, et al. leukaemia fuses BCR to PDGFRA. *Hum Mol Genet.* 2002;11(12):1391-1397. doi:10.1093/hmg/11.12.1391
34. Bleyl SB, Saijoh Y, Bax NAM, et al. Dysregulation of the PDGFRA gene causes inflow tract anomalies including TAPVR: integrating evidence from human genetics and model organisms. *Hum Mol Genet.* 2010;19(7):1286-1301. doi:10.1093/hmg/ddq005
35. Aruga J, Nagai T, Tokuyama T, et al. The Mouse Zic Gene Family.
36. Chung B, Shaffer LG, Keating S, Johnson J, Casey B, Chitayat D. From VACTERL-H to heterotaxy: Variable expressivity of ZIC3-related disorders. *Am J Med Genet A.* 2011;155(5):1123-1128. doi:10.1002/ajmg.a.33859
37. Cao R, Liu S, Liu C, et al. Duplication and Deletion of 22q11 Associated with Anomalous Pulmonary Venous Connection. *Pediatr Cardiol.* 2018;39(3):585-590. doi:10.1007/s00246-017-1794-3
38. Shi X, Huang T, Wang J, et al. Next-generation sequencing identifies novel genes with rare variants in total anomalous pulmonary venous connection. *EBioMedicine.* 2018;38:217-227. doi:10.1016/j.ebiom.2018.11.008
39. Shi X, Cheng L, Jiao X, et al. Rare Copy Number Variants Identify Novel Genes in Sporadic Total Anomalous Pulmonary Vein Connection. *Front Genet.* 2018;9. doi:10.3389/fgene.2018.00559
40. Alkuraya FS. The application of next-generation sequencing in the autozygosity mapping of human recessive diseases. *Hum Genet.* 2013;132(11):1197-1211. doi:10.1007/s00439-013-1344-x

41. Solymar L, Sabel KG, Zetterqvist P. Total anomalous pulmonary venous connection in siblings. Report on three families. *Acta Paediatr Scand*. 1987;76(1):124-127.
42. Committee EN. Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell*. 1997;90(3):403-404. doi:10.1016/S0092-8674(00)80500-0
43. No Title. Ensembl. Accessed June 30, 2020. [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000145242;r=4:65319563-65670495](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000145242;r=4:65319563-65670495)
44. Fox GM, Holst PL, Chute HT, et al. cDNA cloning and tissue distribution of five human EPH-like receptor protein-tyrosine kinases. *Oncogene*. 1995;10(5):897-905.
45. Brambilla R, Schnapp1 A, Casagrande F, et al. Membrane-bound LERK2 ligand can signal through three different Eph-related receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 1995;1413:3116-3126.
46. No Title. Homozygosity Mapper. Published 2016. Accessed January 1, 2016. [homozygositymapper.org](http://homozygositymapper.org)
47. Das G, Yu Q, Hui R, Reuhl K, Gale NW, Zhou R. EphA5 and EphA6: regulation of neuronal and spine morphology. *Cell Biosci*. 2016;6:48. doi:10.1186/s13578-016-0115-5
48. Huan X, Shi J, Lim L, et al. Unique Structure and Dynamics of the EphA5 Ligand Binding Domain Mediate Its Binding Specificity as Revealed by X-ray Crystallography, NMR and MD Simulations. *Medical Research Council of Singapore National Institutes of Health*. Published online 2013. doi:10.1371/journal.pone.0074040

49. Egea J, Klein R. Bidirectional Eph-ephrin signaling during axon guidance. *Trends Cell Biol.* 2007;17(5):230-238. doi:10.1016/j.tcb.2007.03.004
50. Kao TJ, Kania A. Ephrin-Mediated cis-Attenuation of Eph Receptor Signaling Is Essential for Spinal Motor Axon Guidance. *Neuron.* 2011;71(1):76-91. doi:10.1016/j.neuron.2011.05.031
51. Klein R. Eph/ephrin signaling in morphogenesis, neural development and plasticity. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(5):580-589. doi:10.1016/j.ceb.2004.07.002
52. Martínez A, Soriano E. Functions of ephrin/Eph interactions in the development of the nervous system: Emphasis on the hippocampal system. *Brain Res Rev.* 2005;49(2):211-226. doi:10.1016/j.brainresrev.2005.02.001
53. Kuijper S, Turner CJ, Adams RH. Regulation of Angiogenesis by Eph-Ephrin Interactions. *Trends Cardiovasc Med.* 2007;17(5):145-151. doi:10.1016/j.tcm.2007.03.003
54. Zhang J, Hughes S. Role of the ephrin and Eph receptor tyrosine kinase families in angiogenesis and development of the cardiovascular system. *J Pathol.* 2006;208(4):453-461. doi:10.1002/path.1937
55. Gale NW, Holland SJ, Valenzuela DM, et al. Eph Receptors and Ligands Comprise Two Major Specificity Subclasses and Are Reciprocally Compartmentalized during Embryogenesis known family of RTKs with at least 13 distinct members family display dynamic and spatially restricted expres. *Neuron.* 1996;17:9-19.
56. Gitanjali Das, Qili Yu, Ryan Hui, Kenneth Reuhl NWG, and Renping Zhou. EphA5 and EphA6: regulation of neuronal and spine morphology. *Cell Biosci.* 2016;6(48). doi:10.1186/s13578-016-0115-5

57. Szepietowska B, Horvath TL, Sherwin RS. Role of Synaptic Plasticity and EphA5-EphrinA5 Interaction Within the Ventromedial Hypothalamus in Response to Recurrent Hypoglycemia. *Diabetes*. 2014;63:1140-1147. doi:10.2337/db13-1259
58. Cooper M, Crocket D, Nowakowski R, Gale Nicholas, Zhou R. Distribution of EphA5 receptor protein in the developing and adult mouse nervous system. *J Comp Neurol*. 2009;514(4):310-328. doi:10.1002/cne.22030
59. Konstantinova I, Nikolova G, Ohara-Imaizumi M, et al. EphA-Ephrin-A-Mediated  $\beta$  Cell Communication Regulates Insulin Secretion from Pancreatic Islets. doi:10.1016/j.cell.2007.02.044
60. Yamada T, Yoshii T, Yasuda H, Okawa A, Sotome S. Dexamethasone Regulates EphA5, a Potential Inhibitory Factor with Osteogenic Capability of Human Bone Marrow Stromal Cells. doi:10.1155/2016/1301608
61. Staquicini FI, Qian MD, Salameh A, et al. Receptor tyrosine kinase EphA5 is a functional molecular target in human lung cancer. *Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(12):7345-7359. doi:10.1074/jbc.M114.630525
62. Li S, Zhu Y, Ma C, et al. Downregulation of EphA5 by promoter methylation in human prostate cancer. *BMC Cancer*. 2015;15. doi:10.1186/s12885-015-1025-3
63. Fu DY, Wang ZM, Wang BL, et al. Frequent epigenetic inactivation of the receptor tyrosine kinase EphA5 by promoter methylation in human breast cancer. *Hum Pathol*. 2010;41(1):48-58. doi:10.1016/j.humpath.2009.06.007
64. Giaginis C, Tsourouflis G, Zizi-Serbetzoglou A, et al. Clinical Significance of Ephrin (Eph)-A1, -A2, -A4, -A5 and -A7 Receptors in

- Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pathology & Oncology Research*. 2010;16(2):267-276. doi:10.1007/s12253-009-9221-6
65. Gu S, Feng J, Jin Q, Wang W, Zhang S. Reduced expression of EphA5 is associated with lymph node metastasis, advanced TNM stage, and poor prognosis in colorectal carcinoma. *Histol Histopathol*. Published online September 21, 2016:11815. doi:10.14670/HH-11-815
  66. Himanen JP, Chumley MJ, Lackmann M, et al. Repelling class discrimination: ephrin-A5 binds to and activates EphB2 receptor signaling. *Nat Neurosci*. 2004;7(5):501-509. doi:10.1038/nn1237
  67. Sakamoto A, Kawashiri M, Ishibashi-Ueda H, et al. Clinical Study Expression and Function of Ephrin-B1 and Its Cognate Receptor EphB2 in Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Int J Vasc Med*. 2012;7. doi:10.1155/2012/127149
  68. Katoh M, Katoh M. Comparative integromics on Eph family. *Int J Oncol*. Published online May 1, 2006. doi:10.3892/ijo.28.5.1243
  69. Degenhardt K, Singh MK, Aghajanian H, et al. Semaphorin 3d signaling defects are associated with anomalous pulmonary venous connections. *Nat Med*. 2013;19(6):760-765. doi:10.1038/nm.3185
  70. Doll S, Dreßen M, Geyer PE, et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. doi:10.1038/s41467-017-01747-2
  71. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, et al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(2):397-406. doi:10.1074/mcp.M113.035600
  72. (gnomAD) GAD. <http://gnomad.broadinstitute.org>.



73. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (URL: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [10 (12, 18) accessed].e.
74. Ferrentino R, Bassi MT, Chitayat D, Tabolacci E, Meroni G. MID1 mutation screening in a large cohort of Opitz G/BBB syndrome patients: twenty-nine novel mutations identified. *Hum Mutat.* 2007;28(2):206-207. doi:10.1002/humu.9480
75. Fontanella B, Russolillo G, Meroni G. MID1 mutations in patients with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Hum Mutat.* 2008;29(5):584-594. doi:10.1002/humu.20706
76. Mnayer L, Khuri S, Merheby HAA, Meroni G, Elsas LJ. A structure-function study of MID1 mutations associated with a mild Opitz phenotype. *Mol Genet Metab.* 2006;87(3):198-203. doi:10.1016/j.ymgme.2005.10.014
77. Pinson L, Augé J, Audollent S, et al. Embryonic expression of the human MID1 gene and its mutations in Opitz syndrome. *J Med Genet.* 2004;41:381-386. doi:10.1136/jmg.2003.014829
78. Massiah MA, Matts JAB, Short KM, et al. Solution Structure of the MID1 B-box2 CHC(D/C)C2H2 Zinc-binding Domain: Insights into an Evolutionarily Conserved RING Fold. *J Mol Biol.* 2007;369(1):1-10. doi:10.1016/J.JMB.2007.03.017
79. Winter J, Basilicata MF, Stemmler MP, Krauss S. The MID1 protein is a central player during development and in disease. *Frontiers in Bioscience - Landmark.* 2016;21(3):664-682. doi:10.2741/4413
80. Meroni G. *X-Linked Opitz G/BBB Syndrome*. University of Washington, Seattle; 1993. Accessed August 28, 2020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301502>

81. Zhang X, Chen Y, Zhao S, Markl jung E, Nordenskjöld A. Hypospadias associated with hypertelorism, the mildest phenotype of Opitz syndrome. *J Hum Genet.* 2011;56(5):348-351. doi:10.1038/jhg.2011.17
82. So J, Suckow V, Kijas Z, et al. Mild phenotypes in a series of patients with Opitz GBBB syndrome with MID1 mutations. *Am J Med Genet A.* 2005;132A(1):1-7. doi:10.1002/ajmg.a.30407
83. Wright KM, Du H, Dagnachew M, Massiah MA. Solution structure of the microtubule-targeting COS domain of MID1. *FEBS J.* 2016;283(16):3089-3102. doi:10.1111/febs.13795
84. Du H, Wu K, Didoronkute A, et al. MID1 catalyzes the ubiquitination of protein phosphatase 2A and mutations within its Bbox1 domain disrupt polyubiquitination of alpha4 but not of PP2Ac. *PLoS One.* 2014;9(9):e107428. doi:10.1371/journal.pone.0107428
85. Zanchetta ME, Napolitano LMR, Maddalo D, Meroni G. The E3 ubiquitin ligase MID1/TRIM18 promotes atypical ubiquitination of the BRCA2-associated factor 35, BRAF35. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 2017;1864(10):1844-1854. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.07.014
86. Aranda-Orgillés B, Trockenbacher A, Winter J, et al. The Opitz syndrome gene product MID1 assembles a microtubule-associated ribonucleoprotein complex. *Hum Genet.* 2008;123(2):163-176. doi:10.1007/s00439-007-0456-6
87. Liu J, Prickett TD, Elliott E, Meroni G, Brautigam DL. Phosphorylation and microtubule association of the Opitz syndrome protein mid-1 is regulated by protein phosphatase 2A via binding to the regulatory subunit 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2001;98(12):6650-6655. doi:10.1073/pnas.111154698

88. Massiah MA, Simmons BN, Short KM, Cox TC. Solution Structure of the RBCC/TRIM B-box1 Domain of Human MID1: B-box with a RING. *J Mol Biol.* 2006;358(2):532-545. doi:10.1016/J.JMB.2006.02.009
89. Short KM, Hopwood B, Yi Z, Cox TC. MID1 and MID2 homo- and heterodimerise to tether the rapamycin-sensitive PP2A regulatory subunit, alpha 4, to microtubules: implications for the clinical variability of X-linked Opitz GBBB syndrome and other developmental disorders. *BMC Cell Biol.* 2002;3:1. doi:10.1186/1471-2121-3-1
90. Ruiter M, Kamsteeg EJ, Meroni G, De Vries BBA. A MID1 mutation associated with reduced penetrance of X-linked opitz G/BBB syndrome. *Clin Dysmorphol.* 2010;19(4):195-197. doi:10.1097/MCD.0b013e32833dc5ee
91. Monteiro O, Chen C, Bingham R, et al. Pharmacological disruption of the MID1/ $\alpha$ 4 interaction reduces mutant Huntingtin levels in primary neuronal cultures. *Neurosci Lett.* 2018;673:44-50. doi:10.1016/j.neulet.2018.02.061
92. Schweiger S, Matthes F, Posey K, et al. Resveratrol induces dephosphorylation of Tau by interfering with the MID1-PP2A complex. *Sci Rep.* 2017;7(1):13753. doi:10.1038/s41598-017-12974-4
93. Zhang L, Li J, Lv X, Guo T, Li W, Zhang J. MID1-PP2A complex functions as new insights in human lung adenocarcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018;144(5):855-864. doi:10.1007/s00432-018-2601-0
94. Unterbruner K, Matthes F, Schilling J, et al. *MicroRNAs MiR-19, MiR-340, MiR-374 and MiR-542 Regulate MID1 Protein Expression.*; 2018. doi:10.1371/journal.pone.0190437

95. Schweiger S, Dorn S, Fuchs M, et al. The E3 ubiquitin ligase MID1 catalyzes ubiquitination and cleavage of Fu. *J Biol Chem*. 2014;289(46):31805-31817. doi:10.1074/jbc.M113.541219
96. Tao H, Simmons BN, Singireddy S, et al. Structure of the MID1 Tandem B-Boxes Reveals an Interaction Reminiscent of Intermolecular Ring Heterodimers<sup>†,‡</sup>. *Biochemistry*. 2008;47(8):2450-2457. doi:10.1021/bi7018496
97. Quaderi NA, Schweiger S, Gaudenz K, et al. Opitz G/BBB syndrome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22. *Nat Genet*. 1997;17(3):285-291. doi:10.1038/ng1197-285
98. Wright KM, Wu K, Babatunde O, Du H, Massiah MA. XLOS-Observed Mutations of MID1 Bbox1 Domain Cause Domain Unfolding. *PLoS One*. 2014;9(9):107537. doi:10.1371/journal.pone.0107537
99. Trockenbacher A, Suckow V, Foerster J, et al. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet*. 2001;29(3):287-294. doi:10.1038/ng762
100. Pfirrmann T, Jandt E, Ranft S, et al. Hedgehog-dependent E3-ligase Midline1 regulates ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Pax6 during visual system development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(36):10103-10108. doi:10.1073/pnas.1600770113
101. Schweiger S, Schneider R. The MID1/PP2A complex: A key to the pathogenesis of Opitz BBB/G syndrome. *BioEssays*. 2003;25(4):356-366. doi:10.1002/bies.10256
102. Köhler A, Demir Ü, Kickstein E, et al. A hormone-dependent feedback-loop controls androgen receptor levels by limiting MID1, a novel translation enhancer and promoter of oncogenic signaling. *Mol Cancer*. 2014;13(1):146. doi:10.1186/1476-4598-13-146

103. Cheng YKY, Huang J, Law KM, Chan YM, Leung TY, Choy KW. Prenatal diagnosis of maternally inherited X-linked Opitz G/BBB syndrome by chromosomal microarray in a fetus with complex congenital heart disease. *Clinica Chimica Acta*. Published online 2014.  
doi:10.1016/j.cca.2014.05.006
104. Cho HJ, Shin M yong, Ahn KM, et al. X-linked Opitz G/BBB syndrome: identification of a novel mutation and prenatal diagnosis in a Korean family. *J Korean Med Sci*. 2006;21(5):790-793.  
doi:10.3346/jkms.2006.21.5.790
105. Cox TC, Allen LR, Cox LL, et al. New mutations in MID1 provide support for loss of function as the cause of X-linked Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*. 2000;9(17):2553-2562. doi:10.1093/hmg/9.17.2553
106. Preiksaitiene E, Krasovskaja N, Utkus A, et al. R368X mutation in MID1 among recurrent mutations in patients with X-linked Opitz G/BBB syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2015;24(1):7-12.  
doi:10.1097/MCD.0000000000000059
107. Francesca De Falco, Silvia Cainarca, Grazia Andolfi, Rosa Ferrentino CB, German Rodríguez Criado, Olaf Rittinger, Nick Dennis, Sylvie Odent, Amit Rastogi, Jan Liebelt, David Chitayat, Robin Winter, Harindar Jawanda, Andrea Ballabio, Brunella Franco GM. X-Linked Opitz Syndrome: Novel Mutations in the MID1 Gene and Redefinition of the Clinical Spectrum. *Am J Med Genet*. 2003;120(A):22–228. doi:10.1002/ajmg.a.10265
108. Hüning I, Kutsche K, Rajaei S, et al. Exon 2 duplication of the MID1 gene in a patient with a mild phenotype of Opitz G/BBB syndrome. *Eur J Med Genet*. Published online 2013.  
doi:10.1016/j.ejmg.2013.01.004

109. Shaw A, Longman C, Irving M, Splitt M. Neonatal teeth in X-linked Opitz (G/BBB) syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2006;15(3):185-186. doi:10.1097/01.mcd.0000198931.09330.e8
110. Taylor J, Aftimos S. Congenital diaphragmatic hernia is a feature of Opitz G/BBB syndrome. *Clin Dysmorphol*. 2010;19(4):225-226. doi:10.1097/MCD.0b013e32833b2bd3