

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“Estado de metilación de genes asociados a comunicación interventricular y comunicación interauricular en niños: casos y controles”

Por:

Dra. Melissa Calzada Dávila

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN
GENÉTICA MÉDICA

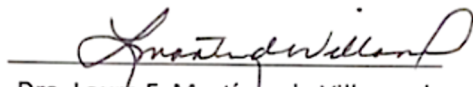
DICIEMBRE, 2021

“Estado de metilación de genes asociados a comunicación interventricular y comunicación interauricular en niños: casos y controles”


Aprobación de la tesis:



Dr. Luis Daniel Campos Acevedo
Director de tesis



Dra. Laura E. Martínez de Villarreal
Co-Directora de tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS.

Para mamá, papá, Santi, Mauri y Marifer, por su amor incondicional.

Para Juan Pablo, por su cálido apoyo, por estudiar conmigo y por su presencia en los buenos y malos momentos.

Para Gondii, por su reconfortante compañía.

Para mis maestros; que son mi ejemplo como genetistas:

Al Doctor Daniel, por guiar mi enseñanza y por dirigir esta tesis,

A la doctora Betty, por siempre creer en mi,

A la doctora Marisol, por inspirarme con su dedicación a los pacientes,

A la doctora Arelí, por enseñarme a trabajar con minuciosidad y detalle,

A la doctora Laura, por su gran compromiso con la educación.

Para el profesor Carlos Cruz Vega, que marcó mi formación y me inculcó el amor por la genética.

Agradezco a mis compañeras y compañeros de residencia, a quien puedo llamar amigas y amigos; Kia, Caro, Anasofi, Berty, Chuy, Joel y Santiago. Por su invaluable compañía, por enseñarme, por escucharme y por las risas compartidas.

Agradezco a todo el personal del Departamento de Genética.

Finalmente; agradezco a mis pacientes, por permitirme aprender tanto.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESUMEN	8
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN	10
a. Marco teórico	10
b. Definición del problema	13
c. Antecedentes	14
d. Justificación	18
Capítulo III	
3. HIPÓTESIS	20
Capítulo IV	
4. OBJETIVOS	21
Capítulo V	
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
Capítulo VI	
6. RESULTADOS	28
Capítulo VII	
7. DISCUSIÓN	32

Capítulo VIII

8. CONCLUSIONES34

Capítulo IX

9. BIBLIOGRAFÍA35

Capítulo X

10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO39

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. SNVs analizados	23
2. Grupo casos: individuos con genotipo wild-type y de riesgo.....	28
3. Grupo control: individuos con genotipo wild-type y de riesgo.....	28
4. ORs del alelo de riesgo para cardiopatía congénita.....	29
5. Comparación del porcentaje de metilación entre casos y controles.....	29
6. Comparación del porcentaje de metilación entre CIV y CIA.....	29
7. Grupo casos: comparación del estado de metilación entre genotipo wild-type y de riesgo.....	30
8. Grupo control. Comparación del estado de metilación entre genotipo wild-type y de riesgo.....	30
9. Comparación del porcentaje de metilación entre los subgrupos: casos y controles con alelos wild-type o de riesgo.....	31

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Flujograma de trabajo	27

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: organización mundial de la salud

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

SNV: variante de un solo nucleótido

CIA: comunicación interauricular

CIV: comunicación interventricular

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN:

Los defectos congénitos son la principal causa de mortalidad infantil, y de estos, las cardiopatías congénitas son los más frecuentes. Solo el 20% de las cardiopatías congénitas se explican por defectos cromosómicos o monogénicos, el restante 80% es pobremente entendido, un mecanismo poco estudiado es la epigenética. La metilación del DNA es el mecanismo epigenético mejor caracterizado. Estudios previos sugieren que las variantes de un solo nucleótido (single nucleotide variant o SNV) y las alteraciones en la metilación del DNA pueden contribuir al desarrollo de defectos congénitos. Existen muchos genes candidatos, entre ellos 4 genes que se han relacionado recientemente con las cardiopatías congénitas: *MTHFR*, *TBX1*, *TBX20* y *AXIN1*; cuya correcta expresión juega un papel crucial durante el desarrollo.

OBJETIVOS:

1. Determinar si las SNVs de riesgo en en nuestra población.
2. Comparar el estado de metilación entre casos y controles
3. Comparar el estado de metilación entre cardiópatas con genotipo de riesgo y wild-type.
4. Comparar el estado de metilación entre controles con genotipo de riesgo y wil-type.
5. Comparar el estado de metilación entre los 4 subgrupos.

METOLOGÍA:

Estudio piloto-exploratorio, transversal, observacional, descriptivo. Se evaluaron 66 recién nacidos (22 casos y 44 controles). Casos con comunicación interventricular (CIA) (n=15) y con comunicación interauricular (CIA) (n=7). En casos y controles se obtuvo muestras de sangre (aproximadamente 10 gotas) de los niños durante la muestra del tamiz neonatal. Se realizó genotipificación para 7 SNVs y estado de metilación del promotor de los 4 genes: *MTHFR*, *TBX1*, *TBX20* y *AXIN1*.

Los análisis estadísticos se realizaron en el software SPSSv.22 (SPSS Inc .; Chicago, IL, EE. UU.). Considerando estadísticamente significativos valores de probabilidad menores de 0.05 ($p < 0.005$).

RESULTADOS:

Las variantes de riesgo encontradas en nuestra población fueron los SNVs rs12921862 de *AXIN1* con un OR para los estados heterocigoto y homocigoto del alelo A de 63.3 ($p=0.00$) y rs4720169 de *TBX20* con un OR para los estados heterocigoto y homocigoto del alelo A de 7.6 ($p=0.005$).

Comparando el estado de metilación entre casos y controles se encontró diferencia significativa en los genes *AXIN1* ($p=0.036$) y *MTHFR* ($p=0.041$) entre casos y controles, con menor metilación de los casos, en los genes *TBX1* y *TBX20* también se encontró esta diferencia pero no fue significativa. Al comparar el estado de metilación entre cardiópatas con CIA y con CIV se encontró diferencia significativa en los genes *AXIN1*, *TBX20* y *TBX1*, con una menor metilación en el grupo de los cardiópatas con CIV. El estado de metilación del grupo CIA fue muy similar al grupo control.

Posteriormente el grupo de los casos fue subdividido por genotipo en aquellos con genotipo de riesgo de riesgo y wild-type. No se encontraron diferencias en la metilación. Finalmente al subdividir el grupo de los controles por genotipo en aquellos con alelo de riesgo y aquellos que son wild type se encontró que los casos con genotipo de riesgo en *MTHFR* rs1801131 alelo G ($p= 0.004$) y rs1801133 alelo A ($p= 0.007$) presentan mayor metilación.

CONCLUSIONES:

Los SNVs de riesgo en nuestra población son rs12921863 y rs4720169.

Al comparar casos con controles se encontró menor metilación generalizada en los cardiópatas de manera independiente de su genotipo.

En los cardiópatas no hubo diferencia en el estado de metilación dependiente del genotipo, sino que, en general, se encontraba hipometilación.

Al comparar el estado de metilación en el grupo de controles sí se encontró diferencia dependiente del genotipo encontrándose mayor metilación en los controles con alelos de riesgo del gen *MTHFR*; alelo G en rs1801131 y alelo A en rs1801133.

Se puede hipotetizar que la mayor metilación de los promotores de los genes *AXIN1*, *TBX20*, *TBX1* y *MTHFR* es un factor protector para cardiopatías congénitas de manera independiente al genotipo y que la hipermetilación de *MTHFR* aún en la presencia de alelos de riesgo es también un factor protector, en este caso dependiente del genotipo. Esto podría explicar el factor protector de la suplementación con folato para cardiopatías congénitas.

Capítulo II.

2. INTRODUCCIÓN

a. Marco teórico

Las malformaciones congénitas son definidas por la OMS como “anomalías estructurales o funcionales, como los trastornos metabólicos, que ocurren durante la vida intrauterina y se detectan durante el embarazo, en el parto o en un momento posterior de la vida. También son llamados defectos de nacimiento trastornos congénitos”. Estas malformaciones influyen de forma relevante en la morbilidad y mortalidad infantil.¹

Dentro de las anomalías congénitas, son las cardiopatías congénitas el grupo más común, con una incidencia de 17.9 por cada 1000 recién. En hombres esta tasa es 19.1/1000 y en mujeres es de 16.6/1000.²

Las cardiopatías congénitas se caracterizan por formaciones inadecuadas que se manifiestan como defectos de las paredes cardíacas, válvulas o vasos sanguíneos.³ De todos los tipos de cardiopatías congénitas son los defectos del septo ventricular y del septo atrial los subtipos más comunes, con una incidencia de 5.29/1000, lo cual corresponde al 29.6% de todos los casos de cardiopatías congénitas.²

Como la mayoría de los defectos congénitos humanos, las cardiopatías congénitas pueden ser explicadas, al menos en su mayoría, por herencia multifactorial, con una concordancia y una heredabilidad del 40-60% y 37%, respectivamente.^{4,5} En esta herencia de tipo multifactorial están involucrados tanto factores ambientales como genéticos.⁶

Sin embargo, también existen cardiopatías congénitas sindrómicas, que son debidas a alteraciones cromosómicas como aneuploidías, traslocaciones o deleciones cromosómicas; y a defectos monogénicos. Estos síndromes solo son la causa del 20% de los casos de cardiopatías congénitas. Ejemplos de enfermedades cromosómicas con cardiopatías congénitas son: síndrome de Down (trisomía 21), síndrome de Edwards (trisomía 18), síndrome de Patau (trisomía 13), síndrome de Turner (monosomía del X); y síndromes de microdeleción como 22q11 y 7q11.23. Ejemplos de enfermedades monogénicas con cardiopatías congénitas son: síndrome de Alagille, Holt-Oram, síndrome de Noonan, Costello, síndrome cardiofaciocutáneo y síndrome de CHARGE.⁷

No obstante, el mecanismo involucrado en el restante 80% de las cardiopatías congénitas no sindrómicas o aisladas es pobremente entendido⁷ y se ha intentado

encontrar variantes genéticas de susceptibilidad, así como factores ambientales que incrementen el riesgo de cardiopatías congénitas.

Para analizar los factores de riesgo genético de las cardiopatías congénitas es importante notar que el desarrollo embrionario cardíaco incluye una red compleja y bien orquestada de regulación de la transcripción que involucra aproximadamente 1500 genes (de los cuales 239 están bien identificados) y secuencias no codificantes adicionales que producen la migración de las células de las crestas neural y el crecimiento celular mesodérmico, proliferación y la diferenciación tan temprano como desde la 4ª semana de gestación.^{8,9}

El desarrollo cardíaco es controlado por muchos sistemas morfogénicos superpuestos que regulan redes transcripcionales intrincadas. Nodal, proteínas morfogénicas óseas (BMPs), Wnts, Sonic hedgehog, NOTCH, neuregulina, ácido retinoico, factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), y otras moléculas de señalización que son conocidos por jugar un rol esencial en regular la cardiogénesis, principalmente al controlar factores de transcripción cardíacos MESP1, GATA4, NKX2.5, HAND1, HAND2, ISL1, y muchos factores de transcripción TBX.¹⁰

Los grupos de genes más comúnmente implicados con cardiopatías congénitas son, por lo tanto, factores de transcripción como *GATA*, factores de transcripción homeobox (*NKX2.5*, *NKX2.6*), factores de transcripción T-Box (*TBX1*, *TBX5*, *TBX20*), y otros factores de transcripción (*CITED2*, *ANKRD1*, *FOG2*, *ZIC3*, *HAND2*).¹¹ Otros genes que están implicados en la aparición de cardiopatía congénita son parte de vías de transducción o componentes estructurales son los genes de señalización nodal (*NODAL*, *FOXH1*, *GDF1*, *CFC1*, etc.), genes de señalización notch (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *JAG1*), y otros (*ELN*, *GJA1*, *THRAP2*, *FLNA*).¹¹

Y a pesar de que se ha incrementado el entendimiento sobre el rol de las mutaciones genéticas y las variantes en el número de copias, los mecanismos en las cardiopatías aisladas son menos entendidos dado que están involucrados múltiples genes e interacciones. El desarrollo de nuevas técnicas, como la secuenciación del genoma, han permitido a los investigadores encontrar variantes genéticas que confieren riesgo para cardiopatías congénitas en poblaciones específicas.¹²

Las SNVs representan cambios en nucleótidos que se encuentran en las regiones codificantes o no codificantes del genoma. Hasta ahora, se han identificado muchos SNVs que influyen el desarrollo de cardiopatías congénitas.⁷

Por ejemplo; dentro del metabolismo de la homocisteína, se ha mostrado que una actividad reducida en la metilentetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) puede incrementar los niveles plasmáticos de homocisteína, y la hiperhomocisteinemia se asocia con alto riesgo para cardiopatías congénitas.¹³ Se han descrito polimorfismos en *MTHFR*, los más comunes C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131). La mayoría de los estudios muestra una asociación significativa entre C677T y cardiopatías congénitas.¹⁴

Sin embargo, estos cambios mencionados en la secuencia de DNA o SNVs no son suficientes para causar una cardiopatía congénita, ya que se requieren también factores ambientales para su producción. En este rubro, existen otros mecanismos extragenómicos, como son la epigenética y la mecanobiología. Los cuales son capaces de regular la expresión génica¹⁰ y estudios recientes han demostrado que la importancia de la regulación epigenética durante el desarrollo cardíaco.⁷

El término epigenética, que literalmente significa “sobre la genética convencional”, se refiere al estudio de cambios heredables en la expresión genética que ocurren independientemente de los cambios primarios en la secuencia de DNA.¹⁵ Estas modificaciones epigenéticas pueden ser heredadas a las células hijas durante la división celular e incluyen la **metilación del DNA y la modificación histónica**, que controlan la accesibilidad genética; y los **RNAs no codificantes**, que principalmente controlan la traducción del RNAm.¹⁰

Recientemente se ha incrementado el cuerpo de investigación clínica y experimental que ha identificado patrones aberrantes epigenéticos en muchas enfermedades poligénicas, incluyendo las cardiopatías congénitas.¹⁶

METILACIÓN DEL DNA

La metilación del DNA es una marca epigenética heredable.¹⁵

En el DNA, los nucleótidos secuenciales citosina-guanina en dirección 5'-3' se llaman dinucleótidos CpG y puede ser metilado en la posición 5 de la citosina por DNA metiltransferasas (DNMTs).¹⁷

La mayoría de la metilación del DNA es esencial para el desarrollo normal y juega un rol muy importante en un procesos clave, incluyendo la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X.¹⁷ Ya que no todos los genes están activos todo el tiempo, la metilación del DNA es uno de los mecanismos que utiliza la célula para controlar la expresión genética.¹⁸

Se esperaría que los dinucleótidos CpG formaran 4% de un genoma, sin embargo, solo 1% del genoma es compuesto de CpG.¹⁹ Aproximadamente 70% de los promotores génicos existen en islas CpG, y la metilación de estas áreas corresponden al silenciamiento genético.²⁰ La expresión espaciotemporal de los genes cardíacos durante el desarrollo es impresionantemente bien regulada, y la metilación del DNA juega un rol crítico.¹⁰

La disrupción de este proceso epigenético resulta en estados transcripcionales alterados. Este estado epigenético puede alterarse por factores ambientales, lo que conlleva al desarrollo de fenotipos anormales o patológicos¹⁵ como el desarrollo de cardiopatías congénitas.

El análisis del perfil de metilación permite incrementar nuestro entendimiento del epigenoma entero.¹⁵

b. Definición del problema

Aproximadamente el 1% de los niños nacen con cardiopatía congénita, y 25% requerirán cirugía dentro del primer año de vida.³

En el mundo la incidencia estimada de las cardiopatías congénitas es de 4-5 por cada 1000 nacimientos. En México no existen bases de datos que registren de forma sistematizada su frecuencia, por lo que el cálculo se basa en una prevalencia estimada de 8-10 por cada 1000 recién nacidos, y extrapolando a la natalidad, se esperan de 18,000 a 20,000 casos nuevos por año.²¹

En el registro de defectos congénitos del Hospital Universitario “Dr. José E. González” (ICBDSR/ECLAM) se encontraron que las cardiopatías congénitas tuvieron una incidencia de 1/445 recién nacidos en 2019, siendo el defecto congénito más frecuente de ese año. (8458 nacimientos y 19 con cardiopatía congénita).

De acuerdo al INEGI, las cardiopatías congénitas se ubican en segundo lugar como la causa de muerte en niños mexicanos menores de cinco años de edad.²² Además, el 50% de las cardiopatías congénitas requieren procedimientos quirúrgicos, de los cuales, el 30% se realizan con circulación extracorpórea.²³

La supervivencia de los niños con cardiopatía congénita depende de la complejidad de la malformación, edad a la que se realiza el diagnóstico, así como del tratamiento otorgado. En nuestro país, las cardiopatías congénitas tratadas en mayor prevalencia son los defectos del septum ventricular, persistencia del conducto arterioso, tetralogía de Fallot, defectos del septum arterial, conexión anómala de venas pulmonares y coartación de la aorta. Observándose una mortalidad global del 7.5% en comparación con el 4% de la reportada en países desarrollados.^{24, 25 y 26}

Dentro de todos los tipos de cardiopatías congénitas, son los defectos del septo ventricular y del septo atrial los subtipo más comunes, con una incidencia de 5.29/1000, lo cual corresponde al 29.6% de todos los casos de cardiopatías congénitas.²

La prevalencia y la letalidad de las cardiopatías congénitas han justificado una investigación extensa por décadas, pero la etiología de la mayoría de los casos permanece desconocida. A pesar de los avances monumentales para el entendimiento del desarrollo cardíaco, su gran complejidad continua limitando nuestra habilidad para identificar los mecanismos moleculares que subyacen las cardiopatías congénitas.¹⁰

Los defectos septales tanto en México como en otras partes del América Latina son una de las principales causas de morbimortalidad infantil, por lo que el estudio de los patrones de la metilación, de los SNVs de riesgo y de la relación entre estos en niños con cardiopatía congénita y niños sin cardiopatía congénita puede ampliar el conocimiento de los factores involucrados en su desarrollo, proveer de posibles biomarcadores para el establecimiento de un diagnóstico temprano y poder proporcionar un manejo oportuno, así como favorecer la detección de blancos terapéuticos y acciones preventivas destinadas a las mujeres en edad reproductiva.

c. Antecedentes

Antes de 1980 existían múltiples pistas que sugerían que la metilación podría jugar un rol en la regulación de la expresión genética. Por ejemplo; J.D. McGhee y G. D. Ginder compararon el estado de metilación de la beta-globina en células que expresaban y que no expresaban este gen. Usando enzimas de restricción distinguieron entre DNA metilado y no metilado, el dúo mostró que el locus de la beta-globina estaba, esencialmente, no metilado en células que expresaban beta-globina, pero metilado en otros tipos de células.¹⁸

Poco después, se utilizó un experimento más directo que examinó los efectos de inhibir la metilación usando 5-azacitidina en células de ratones. La 5-azacitidina es un análogo de la citidina, que cuando se integra al DNA inhibe severamente la acción de la enzima DNA metiltransferasa que normalmente metila DNA en residuos de citosina. Esto demostró que la remoción de citidina resultó en cambios en la diferenciación celular, lo que abrió la puerta a los investigadores para mejorar el entendimiento sobre cómo la metilación impacta la expresión genética y la diferenciación celular.¹⁸

Dado el rol crítico de la metilación del DNA en la expresión genética y en la diferenciación celular, parece obvio que errores en la metilación podrían originar un gran número de consecuencias devastadoras, incluyendo enfermedades. Se están estudiando las conexiones entre anomalías en la metilación y enfermedades como cáncer, lupus, distrofia muscular y un rango de defectos congénitos.¹⁷

Las posibles contribuciones de las anomalías en la metilación en las cardiopatías congénitas han sido recientemente exploradas. La metilación del DNA en tejido cardíaco ha sido comparada a través de estadios embrionarios, entre tejidos con cardiopatía congénita y tejidos control, así como entre tejidos neonatales y adultos.¹⁰

Chamberlain A.A. condujo en 2014 un estudio de análisis de metilación del genoma en etapas embrionarias de corazón de ratón que correspondían al desarrollo y maduración de las cámaras cardíacas. En corazones embrionarios de los días 11.5 a 14.5 los autores identificaron 79 genes con diferente metilación del DNA que correlacionaba con expresión alterada.²⁷

En biopsias miocárdicas de pacientes con tetralogía de Fallot y CIV se observó hipermetilación en la región promotora de *SCO2*, que codifica para una proteína del citocromo c oxidasa. Los autores hipotetizaron que la disminución resultante de *SCO2* produce un estado metabólico celular hacia la glicólisis, lo que retrasa la diferenciación y promueve la cardiomiopatía y falla cardíaca.²⁸

En otro estudio se comparó la metilación del DNA en recién nacidos con estenosis valvular aórtica, en un total de 52 genes se encontraba significativamente alterada la metilación del DNA en la sangre de recién nacidos con la estenosis aórtica comparados con recién nacidos sanos. De particular interés *APOA5* y *PCSK9* fueron hipermetilados y ambos son considerados factores de riesgo mayores para la enfermedad coronal en adultos.²⁹

En 2013 Sheng, W. evaluó la metilación del DNA en genes que codifican para factores de transcripción clave cardíacos *Nkx2.5* y *Hand1*, y ambos se encontraron hipermetilados en pacientes con tetralogía de Fallot.³⁰

Guliang Lyu et al. en 2018 identificaron diferencias genómicas y epigenómicas entre un par de gemelos discordantes para cardiopatía congénita: doble salida de ventrículo derecho. Ambos fueron sujetos a secuenciación del genoma y análisis de metilación. Se identificaron muy pocas diferencias genómicas, pero 1566 regiones diferencialmente metiladas entre los gemelos monocigóticos. 20% de estas regiones diferencialmente metiladas se localizaron 2kb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Particularmente *ZIC3* y *NR2F2* se encontraron con promotores hipermetilados en el gemelo monocigoto y otros pacientes con doble salida de ventrículo derecho, así como disminución de su expresión.³¹

Colectivamente, estos estudios demuestran que la metilación del DNA es fuertemente regulada durante la diferenciación y maduración cardíaca. Avances en nuestro entendimiento de estos patrones espaciotemporales puede ser útil para el tratamiento de cardiopatías congénitas y el remodelado patológico que comunmente produce falla cardíaca en pacientes con cardiopatías congénitas.¹⁰

De particular relevancia para nuestro estudio son los resultados de los siguientes dos estudios:

Hernández-Almaguer MD, (2019) et al. Analizaron el riesgo de 14 SNVs en 8 genes previamente reportados con asociación de riesgo para cardiopatías congénitas en población del noreste de México: *TBX1*, *TBX20*, *STX-18-AS1*, *AXIN1*, *MTHFR*, *NKX2.5*, *BMP4* y *NFATc*.

Incluyó 42 sujetos con defectos ventriculares (n=27), atriales (n=9) o del cojinete endocárdico (n=1), y defectos septales y atriales (n=2).

Se encontró significancia estadística para las variantes rs4720169 de *TBX20* ($p=0.05$) y rs12921862 de *AXIN1* ($p<0.001$) para defectos septales entre casos y controles.

- a) rs4720169 de *TBX20* reveló un OR de 1.88 para el alelo A y un OR de 3.88 para el homocigoto AA.
- b) Variantes rs12921862 de *AXIN1* revelaron un OR de 4.15 para el alelo A y un OR de 9.23 para el homocigoto AA.¹²

Sandra M. González-Peña et. Al. en 2021 analizó si la ingesta dietaria materna de ácido fólico está relacionada con el estado de metilación de los promotores de genes asociados a CIV (*AXIN1*, *TBX1*, *TBX20* y *MTHFR*). Encontró que la ingesta de suplementos fue significativamente mayor en las madres de niños sanos durante el primer trimestre del embarazo. Diferencias significativas fueron observadas en el estado de metilación de *MTHFR* y *AXIN1* entre los casos y controles. Se encontró correlación entre la suplementación materna de ácido fólico y el estado de metilación en *AXIN1* y *TBX20* entre casos y controles, encontrándose hipometilación en *AXIN1* e hipermetilación de *TBX20* con la suplementación.³²

MTHFR es un gen candidato promisorio porque regula la disponibilidad de folato activo al catalizar la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato a 5-metilentetrahidrofolato. La actividad reducida de *MTHFR* resulta en disminución de disponibilidad de 5-metilentetrahidrofolato para la re-metilación de homocisteína a metionina.³³ Muchos estudios han mostrado la asociación entre variantes de *MTHFR* con incremento del riesgo de cardiopatías congénitas aisladas, así como diferencias en los patrones de metilación entre las regiones promotores del gen *MTHFR* en niños con cardiopatías congénitas.³⁴

TBX1 codifica un factor de transcripción T-box implicado en el síndrome de delección 22q11, que afecta el desarrollo de muchos órganos, incluyendo el corazón.³⁵ Estudios han reportado mutaciones en el gen *TBX1* en familias con historia de cardiopatías congénitas, y algunas mutaciones han sido relacionadas a anomalías aisladas como tetralogía de Fallot, arco aórtico interrumpido, doble salida de ventrículo derecho, atresia pulmonar y defectos septales ventriculares.³⁶

TBX20 tiene actividades críticas en el desarrollo del corazón y función cardíaca adulta.³⁷ Mutaciones en la región codificante han sido asociados con casos esporádicos y familiares de cardiopatía, incluyendo defectos septales atriales, tetralogía de Fallot y cardiomiopatía dilatada en adultos.³⁸ Además, diferencias en los patrones de metilación entre sujetos con cardiopatía dilatada y CIV han sido observadas en la región promotora de *TBX20*.³⁴

AXIN1 es un componente de la vía de transducción de señal WNT y juega un rol en el ensamblaje del complejo b-catenina que regula la proliferación y promueve la miogénesis u osteogénesis. Estudios recientes han encontrado asociación entre la presencia de variantes alélicas en este gen y el riesgo de cardiopatías congénitas.¹²

Dado que existe limitada literatura entre la interacción genética-epigenética y su asociación con cardiopatías congénitas, esta investigación pretende contribuir en la determinación de la naturaleza de su relación para la producción de defectos del septo ventricular y atrial.

d. Justificación

Para la mayoría de los infantes diagnosticados de enfermedad cardíaca congénita, no se puede identificar un gen causante establecido o un agente teratógeno.

El tratamiento de la cardiopatía congénita es principalmente paliativo y contribuyen dos factores; el primero es que el desarrollo cardíaco ocurre temprano en la embriogénesis y es complejo, y el segundo, es que los estudios genómicos han identificado variantes patogénicas solo en el 10% de los casos.¹⁰

El diagnóstico temprano y la prevención de defectos congénitos ha mejorado alrededor del mundo, y la tasa de supervivencia ha incrementado, ya que el estudio de los factores genéticos y ambientales han ganado interés dentro de los investigadores de la salud pública.³⁹

Para avanzar en el diagnóstico, entendimiento y tratamiento de las cardiopatías congénitas, los factores críticos extragenómicos para el desarrollo cardíaco necesitan ser descubiertos.¹⁰ La metilación aberrante del DNA se ha observado en muchas cardiopatías congénitas humanas, incluyendo tetralogía de Fallot, corazón izquierdo hipoplásico, estenosis valvular aórtica, doble salida del ventrículo derecho y defectos septales ventriculares.¹⁰

La evaluación y modulación de la epigenética para el diagnóstico y tratamiento de las cardiopatías congénitas es extremadamente promisorio.¹⁰ También es biomarcador promisorio para el diagnóstico prenatal y la estratificación posnatal de cardiopatías congénitas.¹⁰

Y dado que en estudios previos se han encontrado SNVs de riesgo tan altos como en el estudio de Hernández-Almaguer MD, et. Al. (2019), quienes establecieron un OR de 9.23 para el homocigoto AA del SVN rs12921862 del gen *AXIN1*,¹² que a pesar de ser un factor de riesgo muy alto, no todos los niños con el genotipo AA tendrán cardiopatía, y niños con el alelo silvestre CC, aparentemente protector, sí tendrán cardiopatía. Por lo que se hipotetiza que existe diferencia del estado de metilación del promotor génico entre los

niños con genotipo AA con cardiopatía y sin cardiopatía; y diferencia del estatus de metilación entre los niños con genotipo silvestre con cardiopatía y sin cardiopatía.

Ya que, al tratarse de una herencia multifactorial, donde influyen genética y ambiente, un SNV de riesgo de riesgo, que tiene baja penetrancia, no determina al 100% la presencia de cardiopatía congénita, por lo que además de la variante de riesgo, están presentes factores ambientales.

Capítulo III.

3. HIPÓTESIS

Las variantes de un solo nucleótido asociadas a comunicación interventricular son dependientes de su estado de metilación.

Capítulo IV.

4. OBJETIVOS

1. Determinar las SNVs de riesgo para CIV y CIA en nuestra población.
2. Determinar si existe diferencia entre los patrones de metilación de los genes *AXIN1*, *TBX20*, *TBX1* y *MTHFR* (asociados a CIV y CIA) entre niños con cardiopatía y niños sin cardiopatía.
3. Determinar si existe diferencia entre los patrones de metilación de niños con CIV y CIA con genotipo de riesgo y wild-type.
4. Determinar si existe diferencia entre los patrones de metilación entre niños sin cardiopatía con genotipo de riesgo y wild-type.
5. Comparar si existe diferencia en los patrones de metilación entre los 4 subgrupos: cardiópatas con genotipo de riesgo, cardiópatas wild-type, sanos con genotipo de riesgo y sanos wild-type.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño:

- Estudio piloto-exploratorio, transversal, observacional, descriptivo, no experimental y correlacional entre neonatos sanos y neonatos con cardiopatía congénita: comunicación interventricular y comunicación interauricular.

El protocolo GN11-033 fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital Universitario “Dr. José E. González” a cargo de la Dra. Laura Elia Martínez Garza y tesista la Dra. MA Dolores Hernández Almaguer. Este estudio reclutó pacientes con **cardiopatía congénita** de 2010 a 2012 en el mismo hospital y en el Hospital Regional de Alta Especialidad Materno Infantil, a dichos pacientes se les tomó muestra sanguínea previo consentimiento informado para extracción de DNA y genotipificación de SNVs de riesgo.

Genes y SNVs estudiados:

TBX1: rs41260844,

TBX20: rs17675131, rs4720169

STX18-AS1: rs16835979, rs6824295, rs870142

AXIN1: rs370681, rs12921862, rs12921862

MTHFR: rs1801133, rs1801131

NKX2.5: rs2277923

BMP4: rs762642

NFATc1: RS754505

Como continuación de este estudio, fue aprobado el protocolo GN19-0001 por el Comité de Ética e investigación del Hospital Universitario “Dr. José El. González”. En el cual fueron reclutados **46 recién nacidos sanos**, hijos de madres sanas, sin antecedente de cardiopatía congénita en la familia, a los cuales, previo consentimiento informado a los padres, se les tomó muestra sanguínea para extracción de DNA.

Posteriormente se realizó **determinación de metilación** en los promotores de los genes: ***TBX1*, *AXIN1*, *TBX20* y *MTHFR*** en los casos y los controles reclutados.

METODOLOGÍA (véase fig. 1):

- i. Seleccionar los casos con CIA y CIV de los 42 casos de cardiopatía congénita no sindrómica.
- ii. Selección al azar de controles, de manera que queden en una relación 2:1 con los casos.
- iii. Genotipificación de casos y controles (véase tabla 1) de los siguientes 7 SNVs:
 - a. *TBX1*: rs41260844
 - b. *TBX20*: rs4720169
 - c. *AXIN1*: rs370681, rs12921862 y rs12921862
 - d. *MTHFR*: rs1801133, rs1801131

Tabla 1. SNVs analizados.

Gen	Locus	SNV	Tipo cardiopatía	Función	Posición	Ref	Alt
<i>AXIN1</i>	16p13.3	rs370681	CIA	Proteína citoplásmica	Intrónica	C	T
		rs1805105			Exón 2	A	G
		rs12921862			Intrónica	C	A
<i>TBX20</i>	7p14.2	rs4720169	CIA	Factor de transcripción	Intrón	G	A
<i>TBX1</i>	22q11.2	rs41260844	CIV	Factor de transcripción	Río arriba	C	T
<i>MTHFR</i>	1p36	rs1801133	CIA, CIV y defecto del cojinete endocárdico	Metabolismo de folato	Exón 5	G	A
		rs1801131			Exón 8	T	G

El DNA se extrajo de muestras de sangre con el Kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo los procedimientos del fabricante. La calidad y cantidad del DNA también fueron verificados por espectrofotometría (UV-Vis) con el NanoDrop™ 8000 (Thermo Fisher, Wilmington, DE, USA). Un set de SNVs prevalidados fue usado para rhAmp en el Step One Plus (Thermo Fisher) en 10 uL. La discriminación alélica SNV fue realizado usando FAM y YAKIMA.

- iv. Determinación del estado de metilación

Ensayos basados en Digestión con Enzimas de restricción sensibles a la metilación

Se realizarán ensayos basados en la digestión selectiva del DNA por endonucleasas de restricción específicas. La endonucleasa HpaII es capaz de digerir la secuencia de CCGG, pero solo cuando no está metilada. En contraste, la enzima MspI, que también corta el DNA en los sitios de CCGG, no se ve afectada por la metilación del DNA.

El análisis de metilación de promotores de genes específicos se realiza utilizando el kit EpiJet DNA Methylation Analysis (MspI/HpaII)

Brevemente, una muestra de DNA se dividirá en tres tubos, cada uno será digerido con una endonucleasa diferente que corta de manera preferencial: (1) DNA metilado; (2) DNA no metilado; y (3) DNA sin digerir. Además se incluirán los controles de DNA metilado y no metilado. Se incuban las muestras durante una hora a 37°C

PCR específica de metilación

La PCR cuantitativa (qPCR) se utilizará para estimar el nivel de metilación de los promotores de los genes *MTHFR*, *TBX1* y *TBX20* y *AXIN1* con Sybr Green incluyen cebadores específicos.

La reacción se llevará a cabo en un volumen final de 20 µL; conteniendo 40 ng de ADN digerido. La qPCR se realizará en el termociclador Step One Plus (Applied Biosystem). El programa del termociclador será el siguiente: desnaturalización del DNA mediante incubación a 95°C durante 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C durante 15 s, 60°C durante 30 s, 72°C durante 30 s y una extensión final a 72°C durante 2 min.

El análisis de la metilación de los promotores de los genes de interés se realizará utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ of 5-mC} = 100 / (1 + E)^{Ct2 - Ct1} \quad \text{Si } Ct3 - Ct1 \geq 4.5$$

Donde:

Ct1 es el ciclo de umbral de la muestra de "ADN no digerido"

Ct2 es el ciclo de umbral de la muestra de "Digerido con Epi HpaII"

Ct3 es el ciclo de umbral de la muestra "Digerido con Epi MspI"

E es el valor de eficiencia de la PCR (%)

qPCR Alelo específico

Se analizarán variantes genéticas del gen *MTHFR* mediante PCR en tiempo real (qPCR). La reacción de qPCR se realizará *con el termociclador Step One Plus (Thermo Fisher Scientific)*. Las reacciones de amplificación se

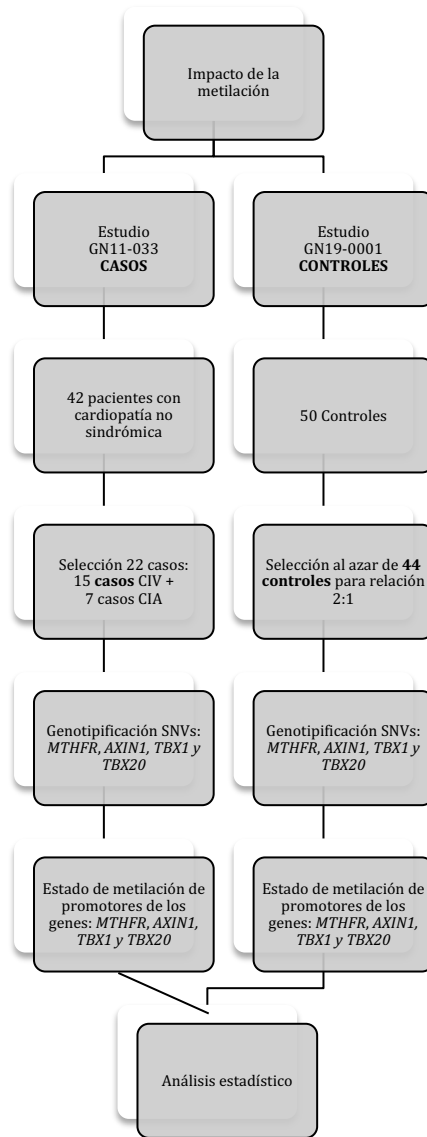
realizaran utilizando 50 ng de ADN, Master Mix II universal con UNG 2x (Applied Biosystems) y 0.5 μ L de cada sonda Taqman a 20x. Las condiciones de reacción serán las siguientes: incubación durante 2 minutos a 50 ° C, seguida de una primera etapa de desnaturalización durante 10 minutos a 95 ° C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95 ° C y 1,30 minutos a 60 ° C.

El análisis se realizará mediante el Software Step One v2.2.2, y los datos sin procesar se exportaron en archivos .txt para la interpretación de los resultados.

- v. Análisis estadístico:
 - a. Determinar ORs con intervalo de confianza del 95% de los alelos de riesgo con el programa *stelect statistical services*, <https://select-statistics.co.uk/calculators/confidence-interval-calculator-odds-ratio/>
 - b. Comparar los patrones de metilación de los genes *AXIN1*, *TBX20*, *TBX1* y *MTHFR* (asociados a cardiopatía congénita) entre niños con cardiopatía y niños sin cardiopatía para determinar si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Se determinó la distribución de los datos, encontrándose que el porcentaje de metilación no presenta una distribución normal, con significancia < 0.05 con prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, que fue utilizada por tener $n < 50$. Por lo tanto se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas. Para contrastar grupos de variables numéricas (en escala) se utilizó prueba no paramétrica de datos independientes: U de Mann-Whitney.
 - a. Comparar los patrones de metilación entre niños con cardiopatía con SNV de riesgo y niños con cardiopatía sin SNV de riesgo para determinar si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Utilizándose prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney
 - b. Comparar los patrones de metilación entre niños sin cardiopatía con SNV de riesgo y niños sin cardiopatía sin SNV de riesgo para determinar si existe diferencia significativa ($p < 0.05$). Utilizándose prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney
- vi. Mecanismos de confidencialidad: Los datos serán tratados con la confidencialidad pertinente conforme a lo establecido en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (SSA, 1988). Así como también se tomó como base la la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012,

Que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos (*Numerales 5.2, 5.6, 5.10, 6.2, 6.2.1 al 6.2.12*) (SSA, 2013). Manteniendo los datos personales, clínicos y los resultados de la evaluación como confidenciales, sin comunicar ninguno de ellos a otros participantes del estudio. Además, los resultados obtenidos no se presentarán en congresos o publicaciones hasta no ser aprobados por las comisiones correspondientes (Comisión de Ética y Comisión Científica), y tengan la previa autorización del jefe administrativo y la dirección.

Figura 1. Flujograma de trabajo



6. RESULTADOS

OBJETIVO 1. Determinar las SNVs de riesgo en nuestra población.

Se obtuvieron un total de 44 casos y 22 controles. De los casos, 15 tenían CIV y 7, CIA. Se encontró que la población control se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg, excepto para el SNV rs2720169 de *TBX20*.

En las tablas 2 y 3 se muestra la genotipificación de casos y controles, respectivamente.

Tabla 2. Grupo casos: individuos con genotipo wild-type y de riesgo.

CASOS n=22	AXIN1			TBX20	TBX1	MTHFR	
	rs370681	rs12921862	rs1805105	rs4720169	rs41260844	rs1801133	rs1801131
Alelo de riesgo	11	19	12	20	3	17	6
Wild type	11	3	10	2	19	5	16

Tabla 3. Grupo control: individuos con genotipo wild-type y de riesgo.

CONTROLES n=44	AXIN1			TBX20	TBX1	MTHFR	
	rs370681	rs12921862	rs1805105	rs4720169	rs41260844	rs1801133	rs1801131
Alelo de riesgo	22	4	28	25	16	34	8
Wild type	22	40	16	19	28	10	36

Las variantes de riesgo encontradas en nuestra población fueron los SNVs rs12921862 de *AXIN1* con un OR= 63.3 ($p=0.00$) y el SNV rs4720169 de *TBX20* con un OR= 7.6 ($p=0.005$) (véase tabla 4).

Tabla 4. ORs del alelo de riesgo para cardiopatía congénita.

Gen	SNV	OR (Intervalo de Confianza)	p
<i>AXIN1</i>	rs370681	1 (0.36-2.78)	1.000
	rs12921862	63.33 (12.87-311.64)	0.000
	rs1805105	0.69 (0.24-1.94)	0.476
<i>TBX20</i>	rs4720169*	7.6 (1.58-36.57)	0.005
<i>TBX1</i>	rs41260844	0.28 (0.07-1.08)	0.055
<i>MTHFR</i>	rs1801133	1 (0.29-3.39)	1.000
	rs1801131	1.69 (0.5-5-67)	0.394

*No se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

OBJETIVO 2. Comparación de patrones de metilación entre casos y controles.

La comparación del estado de metilación entre casos y controles mostró en los cardiópatas menor estado de metilación en los genes *AXIN1* ($p=0.036$) y *MTHFR* ($p=0.041$), (véase tabla 5).

Tabla 5. Comparación del porcentaje de metilación entre casos y controles.

Gen	%met casos (n=22)	%met control (n=44)	p
<i>AXIN1</i>	73.81 (DS: ± 35.60)	96.50 (DS: ± 39.8)	0.036
<i>TBX20</i>	4.97 (DS: ± 7.16)	11.17 (DS: ± 21.8)	0.369
<i>TBX1</i>	4.1 (DS: ± 5.67)	5.71 (DS: ± 10.85)	0.523
<i>MTHFR</i>	4.48 (DS: ± 4.63)	9.44 (DS: ± 37.9)	0.041

Al comparar el estado de metilación entre cardiópatas con CIV y CIA se encontró que existe diferencia significativa para la metilación de los genes *AXIN1*, *TBX20* y *TBX1*, con una menor metilación en cardiópatas con CIV (véase tabla 6).

Tabla 6. Comparación del porcentaje de metilación entre CIV y CIA.

Gen	%met cotrol (n=44)	%met CIV (n=15)	%met CIA (n=7)	p
<i>AXIN1</i>	96.50 (DS: ± 39.8)	57.79 (DS: ± 29.2)	108.14 (DS: ± 20.74)	0.001
<i>TBX20</i>	11.17 (DS: ± 21.8)	2.23 (DS: ± 2.17)	10.84 (DS: ± 11.61)	0.017
<i>TBX1</i>	5.71 (DS: ± 10.85)	1.69 (DS: ± 1.94)	9.56 (DS: ± 7.47)	0.001
<i>MTHFR</i>	9.44 (DS: ± 37.9)	3.43 (DS: ± 6.30)	6.72 (DS: ± 6.30)	0.210

OBJETIVO 3. Comparación de patrones de metilación en casos con genotipo de riesgo contra casos wild-type.

La comparación del estado de metilación en individuos cardiopatas con genotipo de riesgo contra genotipo wild-type no mostró diferencias significativas (véase tabla 7).

Tabla 7. Grupo casos: comparación del estado de metilación entre genotipo wild-type y de riesgo.

Gen	SNV	%met alelo de riesgo	%met Wild-type	<i>p</i>
<i>AXIN1</i>	rs370681	71.98 (DS: ±35.66)	75.64 (DS: ±37.19)	0.949
	rs12921862*	74.95 (DS: ±35.26)	66.58 (DS: ±21.52)	0.857
	rs1805105	74.09 (DS: ±34.78)	73.47 (DS: ±38.46)	0.821
<i>TBX20</i>	rs4720169	5.23 (DS: ±7.99)	2.37 (DS: ±0.43)	0.866
<i>TBX1</i>	rs41260844	5.97 (DS: ±4.1)	3.88 (DS: ±5.97)	0.160
<i>MTHFR</i>	rs1801133	4.48 (DS: ±5.88)	4.46 (DS: ±2.68)	0.858
	rs1801131	4.85 (DS: ±6.63)	4.34 (DS: ±4.90)	0.359

*No se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

OBJETIVO 4. Comparar patrones de metilación en controles con genotipo de riesgo contra controles wild-type.

La comparación del estado de metilación en individuos sanos con genotipo de riesgo contra wild-type mostró un mayor estado de metilación en rs1801131 de *MTHFR* en sanos con genotipo de riesgo ($p=0.007$) (véase tabla 8).

Tabla 8. Grupo control. Comparación del estado de metilación entre genotipo wild-type y de riesgo.

Gen	SNV	%met alelo de riesgo	%met Wild-type	<i>p</i>
<i>AXIN1</i>	rs370681	98.19 (DS: ±49.09)	94.81 (DS: ±28.77)	0.907
	rs12921862*	70.26 (DS: ±27.03)	101 (DS: ±41.64)	0.140
	rs1805105	99.015 (DS: ±44.78)	92.1 (DS: ±29.98)	0.770
<i>TBX20</i>	rs4720169	10.46 (DS: ±22.41)	12.10 (DS: ±21.71)	0.169
<i>TBX1</i>	rs41260844	4.84 (DS: ±7.2)	6.20 (DS: ±12.53)	0.845
<i>MTHFR</i>	rs1801133	10.89 (DS: ±43.18)	4.52 (DS: ±4.76)	0.196
	rs1801131	37.34 (DS: ±85.90)	3.245 (DS: ±8.80)	0.007

*No se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

OBJETIVO 5. Comparar si existe diferencia en los patrones de metilación entre los 4 subgrupos: cardiopatas con alelos de riesgo, cardiopatas wild-type, sanos con alelos de riesgo y sanos wild-type.

La comparación del estado de metilación entre los 4 subgrupos únicamente mostró diferencia significativa para ambos SNVs del gen *MTHFR*, rs1801131 ($p=0.004$) y rs1801133 ($p=0.007$), con un mayor estado de metilación en sanos con genotipo de riesgo (véase tabla 9).

Tabla 9. Comparación del porcentaje de metilación entre los subgrupos: casos y controles con alelos wild-type o de riesgo.

Gen	SNV	CASOS		CONTROLES		p
		%met alelo de riesgo	%met Wild-type	%met alelo de riesgo	%met Wild-type	
AXIN1	rs370681	71.98 (DS: ±35.66)	75.64 (DS: ±37.19)	98.19 (DS: ±49.09)	94.81 (DS: ±28.77)	0.651
	rs12921862*	74.95 (DS: ±35.26)	66.58 (DS: ±21.52)	70.26 (DS: ±27.03)	101 (DS: ±41.64)	0.093
	rs1805105	74.09 (DS: ±34.78)	73.47 (DS: ±38.46)	99.015 (DS: ±44.78)	92.1 (DS: ±29.98)	0.574
TBX20	rs4720169	5.23 (DS: ±7.99)	2.37 (DS: ±0.43)	10.46 (DS: ±22.41)	12.10 (DS: ±21.71)	0.354
TBX1	rs41260844	5.97 (DS: ±4.1)	3.88 (DS: ±5.97)	4.84 (DS: ±7.2)	6.20 (DS: ±12.53)	0.064
MTHFR	rs1801133	4.48 (DS: ±5.88)	4.46 (DS: ±2.68)	10.89 (DS: ±43.18)	4.52 (DS: ±4.76)	0.007
	rs1801131	4.85 (DS: ±6.63)	4.34 (DS: ±4.90)	37.34 (DS: ±85.90)	3.245 (DS: ±8.80)	0.004

*No se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio encontramos que los alelos de riesgo para nuestra población son rs12921862 con OR para el alelo A de 63 (*AXIN1*) y rs4720169 OR para el alelo A de 7.6 (*TBX20*), sin embargo, para este último la población control no se encontraba en equilibrio de Hardy Weinberg (véase tabla 4), esto es semejante a lo previamente reportado por Hernández-Almaguer MD, et. al. (2019).

A pesar de estos altos riesgos relativos encontrados, la presencia de este genotipo de riesgo en *TBX20* y *AXIN1* no es determinante en la generación de cardiopatía congénita, por lo que se revisaron diferencias en el estado de metilación que pudieran estar contribuyendo o previniendo cardiopatías congénitas.

Al comparar el estado de metilación entre los casos y controles se encontró que existe menor metilación estadísticamente significativa en el grupo de cardiopatas para los genes *AXIN1* ($p=0.036$) y *MTHFR* ($p=0.041$). Esto podría sugerir que su hipermetilación es un mecanismo protector en la producción de cardiopatías congénitas (véase tabla 5). Para el resto de los genes también se aprecia menor metilación en el grupo de cardiopatas, sin embargo, esta diferencia observada no fue estadísticamente significativa.

Se encontró una menor metilación en los sujetos con CIV respecto a los sujetos con CIA. Esta diferencia fue significativa para los genes *AXIN1* ($p=0.001$), *TBX20* ($p=0.017$) y *TBX1* ($p=0.001$). En *MTHFR* también se pudo observar menor metilación en CIV, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, esto se puede deber a la pequeña cantidad de sujetos con CIA ($n=7$), por lo que sería necesario aumentar la población en futuros estudios para corroborar y confirmar estos hallazgos.

El estado de metilación en sujetos con CIA fue muy similar al encontrado en los controles. Esto podría sugerir que la menor metilación es de riesgo solo para la generación de CIV (véase tabla 6).

Es interesante que entre los sujetos cardiopatas se encuentra una hipometilación generalizada sin diferencia por genotipo. En cambio, en el grupo control sí se observa diferencia en la metilación dependiente del genotipo para el gen *MTHFR*. En los SNVs rs1801131 y rs1801133 existe mayor metilación en controles con genotipo de riesgo.

Estos hallazgos sugieren que la hipermetilación es un factor protector para el desarrollo de cardiopatías congénitas.

El efecto protector del folato periconcepcional para prevenir defectos del tubo neural es ampliamente reconocido (Berry, R.J. 1999). En el caso del efecto del consumo de folato en la prevención de cardiopatías congénitas los estudios epidemiológicos han reportado diversos resultados. En un metaanálisis del 2015 se concluyó que la suplementación con folato se asocia con una disminución significativa del riesgo de cardiopatías congénitas (RR=0.72, 95% CI: 0.63-0.82).⁴⁰

En el estudio de González-Peña (2021) se exploró la interacción entre los nutrientes y la epigenética involucrada en las cardiopatías congénitas. Se encontró que la ingesta de folato era significativamente mayor durante el primer trimestre en las madres de niños sanos versus aquellas madres con hijos con cardiopatía congénita.³²

Aunque el mecanismo biológico subyacente de la relación entre el consumo de folato y el riesgo de cardiopatías congénitas aún no está determinado, se ha hipotetizado que el metabolismo del folato y/u homocisteína interfiere con el desarrollo del corazón, posiblemente al afectar a las células de la cresta neural. Sin embargo, el efecto preciso aún no está claro.⁴⁰

Se hipotetiza que la ingesta de folato provee los grupos metilo necesarios para una correcta expresión génica, permitiendo así la modulación adecuada de los genes necesarios para el desarrollo cardíaco y ser así un factor protector para cardiopatías congénitas.

Capítulo VIII.

8. CONCLUSIONES

Los SNVs de riesgo en nuestra población (rs12921862 y rs4720169, en *AXIN1* y *TBX20*, respectivamente) son independientes del estado de metilación de su promotor para su asociación con cardiopatías congénitas.

Al comparar casos con controles se encontró menor metilación de manera generalizada en los cardiópatas, independientemente de su genotipo.

En el grupo control se encontró diferencia en la metilación dependiente del genotipo, con mayor metilación en los controles con alelos de riesgo del gen *MTHFR*; alelo G en rs1801131 y alelo A en rs1801133.

La mayor metilación es un factor protector de cardiopatías congénitas debido al menor estado de metilación generalizada en los cardiópatas comparado con el grupo control y la mayor metilación encontrada en sujetos sanos con genotipo de riesgo en *MTHFR*.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud. Anomalías congénitas [Internet]. 2016. [citado 3 noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>
2. Wu W, He J, Shao X. Incidence and mortality trend of congenital heart disease at the global, regional, and national level, 1990-2017. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(23):e20593. doi:10.1097/MD.00000000000020593
3. Hoffman, J. The global burden of congenital heart disease. *Cardiovasc. J. Afr.* **2013**, 24, 141–145.
4. Davison BC (1967) Concordance and discordance of congenital heart disease in 20 families. *J Med Genet* 4:245–250.
5. Kuo CF, Lin YS, Hung SH, et al. (2018) Familial aggregation and heritability of congenital heart defects. *Circ J* 82:232–238.
6. van der Bom T, Zomer AC, Zwinderman AH, et al. The changing epidemiology of congenital heart disease. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:50–60.
7. Muntean I, Togănel R, Benedek T. Genetics of Congenital Heart Disease: Past and Present. *Biochem Genet*. 2017 Apr;55(2):105-123. doi: 10.1007/s10528-016-9780-7. Epub 2016 Nov 2. PMID: 27807680.
8. Bentham J, Bhattacharya S (2010) Molecular basis of cardio-vascular development. In: Kumar D, Elliot P (eds) *Principles and Practice of Clinical Cardiovascular Genetics*. Oxford University Press, New York, pp 17–25.
9. Devaux Y, Zangrando J, Schroen B et al. (2015) Long non-coding RNAs in cardiac development and ageing. *Nat Rev Cardiol* 12:415–425.
10. Jarrell DK, Lennon ML, Jacot JG. Epigenetics and Mechanobiology in Heart Development and Congenital Heart Disease. *Diseases*. 2019 Sep 1;7(3):52. doi: 10.3390/diseases7030052. PMID: 31480510; PMCID: PMC6787645.
11. Pierpoint ME, Basson CT, Benson DW Jr, Gelb BC, Giglia TM, Goldmuntz E, McGee G, Sable CA, Srivastava D, Webb CL (2007) AHA scientific statement. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge. A scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 115:3015–3038
12. Hernández-Almaguer MD, Calvo-Anguiano G, Cerda-Flores RM, Salinas-Torres VM, Orozco-Galicia F, Glenn E, García-Guerra J, Sánchez-Cortés G, Lugo-Trampe J, Martínez-Garza LE. Genetic Variants at the rs4720169 Locus of *TBX20* and the

- rs12921862 Locus of *AXIN1* May Increase the Risk of Congenital Heart Defects in the Mexican Population: A Pilot Study. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2019 Sep;23(9):664-670. doi: 10.1089/gtmb.2019.0029. PMID: 31524541.
13. Junker R, Kotthoff S, Vielhaber H, Halimeh S, Kosch A, Koch HG et al (2001) Infant methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype is a risk factor for congenital heart disease. *Cardiovasc Res* 51(2):251–254
 14. Wang W, Hou Z, Wang C, Wei C, Li Y, Jiang L (2013) Association between 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and congenital heart disease: a meta-analysis. *MetaGene* 1:109–125
 15. Jin, B., Li, Y., & Robertson, K. D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy?. *Genes & cancer*, 2(6), 607–617. <https://doi.org/10.1177/1947601910393957>
 16. Feinberg, A.P. The Key Role of Epigenetics in Human Disease Prevention and Mitigation. *N. Engl. J. Med.* **2018**, 378, 1323–1334.
 17. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005;6(8):597-610
 18. Phillips, T. (2008) The role of methylation in gene expression. *Nature Education* 1(1):116
 19. Jones, P.A. The DNA methylation paradox. *Trends Genet*. **1999**, 15, 34–37.
 20. Saxonov, S.; Berg, P.; Brutlag, D.L. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1412–1417.
 21. Márquez-González, H., et. Al., Análisis demográfico de una clínica de cardiopatías congénitas del Instituto Mexicano del Seguro Social, con interés en el adulto., Archivos de cardiología de México., 2017.
 22. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Causas de mortalidad 2016. (Citado 6 noviembre 2018). Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>
 23. González A. Circulación extracorpórea en el paciente neonato con cardiopatía congénita. *Rev Mex Cardiol*. 2004; 12:69-75.
 24. Bernier PL, Stefanescu A, Samoukovic G, Tchervenkov CI. The challenge of congenital heart disease worldwide: Epidemiologic and demographic facts. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. [Internet]. 2010 [citado 6 noviembre 2018]; 13:26-34. doi: 10.1053/j.pcsu.2010.02.005
 25. Cervantes-Salazar J, Calderón-Colmenero J, Ramírez-Marroquín S, Palacios-Macedo A, Bolio-Cerdan A, Vizcaíno-Alarcón A, Curi-Curi P, et al, Mexican

- registry of pediatric cardiac surgery. First report. *Rev Invest Clin.* [Internet] 2013 [citado 6 noviembre 2018]; 65:476-482. doi:10.1053/j.pcsu.2010.02.005
26. García-Montes JA, Calderón-Co,menero J, Casanova M, Zarco E, Fernández-de la Reguera G, Buendía A. Risk factors for prolonged mechanical ventilation after surgical repair of congenital heart disease. *Arch Cardiol Mex.* [Internet]. 2005 [citado 6 noviembre 2018]; 75:402-407.
 27. Chamberlain, A.A.; Lin, M.; Lister, R.L.; Maslov, A.A.; Wang, Y.; Suzuki, M.; Wu, B.; Greally, J.M.; Zheng, D.; Zhou, B. DNA methylation is developmentally regulated for genes essential for cardiogenesis. *J. Am. Heart Assoc.* **2014**, *3*, e000976.
 28. Grunert, M.; Dorn, C.; Cui, H.; Dunkel, I.; Schulz, K.; Schoenhals, S.; Sun, W.; Berger, F.; Chen, W.; Sperling, S.R. Comparative DNA methylation and gene expression analysis identifies novel genes for structural congenital heart diseases. *Cardiovasc. Res.* **2016**, *112*, 464–477.
 29. Radhakrishna, U.; Albayrak, S.; Alpay-Savasan, Z.; Zeb, A.; Turkoglu, O.; Sobolewski, P.; Bahado-Singh, R.O. Genome-Wide DNA Methylation Analysis and Epigenetic Variations Associated with Congenital Aortic Valve Stenosis (AVS). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154010.
 30. Sheng, W.; Qian, Y.; Wang, H.; Ma, X.; Zhang, P.; Diao, L.; An, Q.; Chen, L.; Ma, D.; Huang, G. DNA methylation status of NKX2-5, GATA4 and HAND1 in patients with tetralogy of fallot. *BMC Med. Genomics* **2013**, *6*, 46.
 31. Lyu G, Zhang C, Ling T, Liu R, Zong L, Guan Y, Huang X, Sun L, Zhang L, Li C, Nie Y, Tao W. Genome and epigenome analysis of monozygotic twins discordant for congenital heart disease. *BMC Genomics.* 2018 Jun 4;19(1):428. doi: 10.1186/s12864-018-4814-7. PMID: 29866040; PMCID: PMC5987557.
 32. González-Peña SM, Calvo-Anguiano G, Martínez-de-Villarreal LE, Ancer-Rodríguez PR, Lugo-Trampe JJ, Saldivar-Rodríguez D, Hernández-Almaguer MD, Calzada-Dávila M, Guerrero-Orjuela LS, Campos-Acevedo LD. Maternal Folic Acid Intake and Methylation Status of Genes Associated with Ventricular Septal Defects in Children: Case–Control Study. *Nutrients.* 2021; 13(6):2071. <https://doi.org/10.3390/nu13062071>
 33. Frosst, P.; Blom, H.J.; Milos, R.; Goyette, P.; Sheppard, C.A.; Matthews, R.G. A candidate genetic risk factor for vascular disease: A common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* **1995**, *10*, 111–113.
 34. Mittal, A.; Sharma, R.; Prasad, R.; Bahl, A.; Khullar, M. Role of cardiac TBX20 in dilated cardiomyopathy. *Mol. Cell Biochem.* **2016**, *414*, 129–136.
 35. Chen, L.; Fulcoli, F.G.; Tang, S.; Baldini, A. Tbx1 regulates proliferation and differentiation of multipotent heart progenitors. *Circ. Res.* **2009**, *105*, 842–851.

36. Gong, W.; Gottlieb, S.; Collins, J.; Blescia, A.; Dietz, H.; Goldmuntz, E.; McDonald-McGinn, D.M.; Zackai, E.H.; Emanuel, B.S.; Driscoll, D.A.; et al. Mutation analysis of TBX1 in non-deleted patients with features of DGS/VCFS or isolated cardiovascular defects. *J. Med. Genet.* **2001**, *38*, E45.
37. Iio, A.; Koide, M.; Hidaka, K.; Morisaki, T. Expression pattern of novel chick T-box gene, Tbx20. *Dev. Genes Evol.* **2001**, *211*, 559–562.
38. Kirk, E.P.; Sunde, M.; Costa, M.W.; Rankin, S.A.; Wolstein, O.; Castro, M.L.; Butler, T.L.; Hyun, C.; Guo, G.; Otway, R.; et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *81*, 280–291.
39. Torres-Cosme JL, Rolón-Porras C, Aguinaga-Ríos M, et al. (2016) Mortality from congenital heart disease in Mexico: A problem on the rise. *PLoS One* **11**:e0150422.
40. Feng Y, Wang S, Chen R, Tong X, Wu Z, Mo X. Maternal folic acid supplementation and the risk of congenital heart defects in offspring: a meta-analysis of epidemiological observational studies. *Sci Rep.* 2015;5:8506. Published 2015 Feb 17. doi:10.1038/srep08506

Capítulo X.

10. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Melissa Calzada Dávila

Candidata para el Grado de Especialista en Genética Médica

Tesis: “Estado de metilación en genes asociados a comunicación interventricular y comunicación interauricular en niños: casos y controles”.

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Nací en Monterrey, N.L. el 30 de septiembre de 1993. Crecí en Linares, N.L. Soy la segunda hija de una familia de papá, mamá y cuatro hijos.

Mi educación primaria y secundaria las llevé a cabo en la Escuela Primaria “Dr. Pedro Noriega” y en la secundaria #2 “Rodrigo Gómez”.

Mi bachillerato lo realicé en la Preparatoria No.4 Linares de la UANL, donde desarrollé mi gusto por la biología y la genética.

Ingresé a la licenciatura de médico cirujano y partero en la Universidad Autónoma de Nuevo León. Al finalizar, realicé mi servicio social en el Departamento de Genética del Hospital Universitario “Dr. José E. González”.

Actualmente estoy finalizando la residencia de Genética Médica en el Hospital Universitario “Dr. José E. González”.