

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE *STOX1* EN MUJERES
COLOMBIANAS CON PREECLAMPSIA SEVERA Y SÍNDROME HELLP.**

Laura Catalina Parada Niño, MD

**Trabajo de grado para optar al título de
Magíster en Genética Humana**

Universidad del Rosario

**Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud
Maestría en Genética Humana**

Bogotá, DC, Julio 2020.

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE *STOX1* EN MUJERES
COLOMBIANAS CON PREECLAMPSIA SEVERA Y SÍNDROME HELLP.**

Laura Catalina Parada Niño, MD

Director tesis:

Dora Janeth Fonseca, PhD

Trabajo de grado para optar al título de

Magíster en Genética Humana

Universidad del Rosario

Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud

Maestría en Genética Humana

Bogotá, DC, Julio 2020.

NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL

“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

El presente proyecto de grado para optar al título de Magister en Genética Humana de la estudiante Laura Catalina Parada Niño, fue inicialmente propuesto por el Dr. Paul Laissue, Profesor titular de carrera, quién se desempeñó como director de tesis hasta el mes de diciembre de 2019. Dada su desvinculación de la Universidad, la Vicedecanatura de Investigación de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud (EMCS), designó a la Dra. Dora Janeth Fonseca, en la labor de dirigir la culminación del proyecto en mención. El Dr Laissue en su calidad de profesor y director de tesis, orientó el desarrollo de la parte metodológica de la tesis, así como el numeral 2.1 del marco teórico. En adelante, el resto del contenido del trabajo fue elaborado por Laura Catalina Parada Niño, con la orientación de la Dra. Fonseca según la designación antes mencionada.

**IDENTIFICACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS DE *STOX1* EN MUJERES
COLOMBIANAS CON PREECLAMPSIA SEVERA Y SÍNDROME HELLP.**

Laura Catalina Parada Niño, MD

Aprobado

Director tesis:

Dora Janeth Fonseca, PhD

JURADO

JURADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia, por su bendición y apoyo durante este proceso.

A la Universidad del Rosario, mi alma mater y al CIGGUR por el crecimiento académico y la experiencia investigativa.

A la Dra. Dora Fonseca por su guía y apoyo en la culminación de este logro y por todas sus enseñanzas a lo largo de este camino.

Al Dr. Paul Laissue y a todos mis profesores por su tiempo y por transmitirme su conocimiento.

A mis amigos y compañeros por su compañía y apoyo durante esta experiencia.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. Introducción | 10 |
| 2. Marco teórico | 12 |
| 2.1 Preeclampsia | 12 |
| 2.1.1 Definición | 12 |
| 2.1.2 Epidemiología | 12 |
| 2.1.3 Diagnóstico | 13 |
| 2.1.4 Tratamiento | 14 |
| 2.1.5 Etiopatogenia | 14 |
| 2.2 Aspectos genéticos relacionados con la preeclampsia..... | 17 |
| 2.3 Importancia de <i>STOX1</i> en la preeclampsia..... | 21 |
| 3. Pregunta de investigación | 24 |
| 4. Objetivos | 25 |
| 4.1 Objetivo general..... | 25 |
| 4.2 Objetivos específicos | 25 |
| 5. Metodología | 26 |
| 5.1 Población de estudio | 26 |
| 5.2 Diseño de primers para el ORF de <i>STOX1</i> | 27 |
| 5.3 Análisis de los productos de secuenciación de Sanger de <i>STOX1</i> | 28 |
| 5.4 Análisis de la variante de 5'UTR del gen <i>STOX1</i> | 30 |
| 5.4.1 Clonaje TA en vector pCR TM 4-TOPO® para análisis de la variante de 5'UTR | 30 |
| 5.4.2 Transformación One Shot® TOP10 | 31 |
| 5.4.3 Extracción ADN plasmídico | 31 |

| | |
|--|----|
| 5.5 Identificación de sitios de fijación de factores de transcripción con la región promotora de <i>STOX1</i> | 32 |
| 5.5.1 Análisis TFBS a través de JASPAR | 32 |
| 5.6 Análisis de Datos | 33 |
| 6. Resultados | 35 |
| 6.1 Identificación de variantes moleculares en <i>STOX1</i> mediante secuenciación de Sanger. | 35 |
| 6.2 Análisis de TFBS para la variante c.-22delG, localizada en el promotor de <i>STOX1</i> , usando Genomatix y JASPAR. | 36 |
| 6.3 Análisis genético-poblacional..... | 36 |
| 7. Discusión..... | 45 |
| 8. Conclusiones y perspectivas | 51 |
| 9. Bibliografía | 52 |
| 10. Anexos | 62 |
| 10.1 Anexo 1 | 62 |
| 10.1.1 Extracción de ADN Salting Out (Tomado de los protocolos estandarizados por CIGGUR)..... | 62 |
| 10.2 Anexo 2..... | 65 |
| 10.2.1 Tabla Secuencias de primers usados para el ORF del gen <i>STOX1</i> | 65 |
| 10.3 Anexo 3..... | 66 |
| 10.3.1 Quick-DNA™MiniprepPlusKit / ZYMO Research (Extracción ADN por columna) | 66 |
| 10.4 Anexo 4..... | 67 |
| 10.4.1 Alineamientos de la secuencia proteica de <i>STOX1</i> humana vs <i>Stox1</i> de ratón. | 67 |
| 10.5 Anexo 5..... | 69 |
| 10.5.1 Purificación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep | 69 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Transformación arterias espirales en preeclampsia vs embarazo normal. Modificado de Chaiworapongsa, T. et al. 2014. | 16 |
| Figura 2. Loci de susceptibilidad y sus localizaciones cromosómicas identificadas a través de estudios de asociación y ligamiento. Tomado de Yong et al, 2018. | 19 |
| Figura 3. Isoforma A <i>STOX1</i> | 21 |
| Figura 4. Secuencias y PFM de JASPAR. A. GCM1; B. HES1 (Tomados de http://jaspar.genereg.net/). Secuencias core señaladas. | 39 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características demográficas pacientes con PE severa y síndrome HELLP..... | 27 |
| Tabla 2. Condiciones de estandarización de PCR para el ORF de STOX1 | 28 |
| Tabla 3. Variantes encontradas en STOX1 de mujeres colombianas con preeclampsia severa y síndrome HELLP. | 38 |
| Tabla 4. TFBS del análisis in silico del promotor de STOX1. | 38 |
| Tabla 5. Características genético-poblacionales de las variantes missense identificadas. FA: Frecuencia alélica; FG: Frecuencia genotípica. | 40 |
| Tabla 6. Tablas de contingencia casos/controles (valor p y OR)..... | 41 |
| Tabla 7. Modelos de análisis para estudio de asociación caso-control (pacientes con genotipo homocigoto para el polimorfismo)..... | 42 |
| Tabla 8. Test del equilibrio de Hardy-Weinberg. | 43 |
| Tabla 9. Desequilibrio de ligamiento de las variantes analizadas sobre el gen STOX1. D': primer valor, valor de p: segundo valor. | 43 |
| Tabla 10. Frecuencias haplotípicas de casos/controles y valor de p de los haplotipos. A. Frecuencias haplotípicas; B. Valor de p de los haplotipos. | 44 |

1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia representa un problema de salud pública, ya que es una de las principales causas de morbilidad materno-perinatal en el mundo, con afectación de hasta el 8% de todos los embarazos (Correa et al., 2016). El diagnóstico temprano permite implementar acciones clínicas que se anticipen al daño multisistémico y de esta manera evitar todas las comorbilidades materno-fetales que la enfermedad desencadena a corto y largo plazo. En la actualidad, el diagnóstico de la preeclampsia es tardío, lo que está en relación con las altas tasas de morbilidad descritas a nivel mundial.

Esta enfermedad con afectación de múltiples sistemas está caracterizada por la presencia de hipertensión arterial de inicio reciente en una mujer con ≥ 20 semanas de gestación junto con la afectación de órganos blanco y adicionalmente puede progresar a formas severas de la enfermedad como eclampsia o síndrome HELLP. A la fecha se ha determinado que la invasión trofoblástica alterada y la disfunción endotelial placentaria son los mecanismos más importantes en el desarrollo de la preeclampsia. Sin embargo, dada la complejidad fisiopatológica subyacente a la preeclampsia, aún no se conocen todos los factores implicados en su desarrollo. Se considera que la preeclampsia es una entidad multifactorial en donde factores genéticos y ambientales, se encuentran asociados al fenotipo. Desde el punto de vista genético, se han usado diferentes abordajes y tecnologías en búsqueda de variantes genéticas candidatas potencialmente relacionadas con el desarrollo de la enfermedad. Los estudios de ligamiento y asociación inicialmente localizaron regiones con posibles variantes de interés, para algunas de las cuales, fue posible avanzar en su estudio gracias a otras técnicas como la secuenciación y los estudios funcionales. Entre ellos se destaca *STOX1*, que es un factor de transcripción descrito en 2005, ha sido considerado ampliamente por su rol en el desarrollo de la enfermedad, y su implicación en la diferenciación trofoblástica (Berends et al., 2007). Dada la potencial implicación de *STOX1* en la etiología molecular de la preeclampsia, este trabajo analizó la región codificante del gen, para realizar la descripción de las variantes genéticas identificadas en una muestra de mujeres colombianas con preeclampsia severa y síndrome HELLP.

Mediante secuenciación de Sanger y el análisis bioinformático de la potencial patogenicidad de dichas variantes genéticas, se identificaron 8 variantes missense en el ORF de *STOX1*. Por primera vez se establecieron las características genético-poblacionales de las variantes del gen en pacientes colombianas afectadas con la enfermedad.

Consideramos que nuestro principal resultado en el análisis del ORF, fue el hallazgo de la variante c.563C>A (p.T188N) ya que los análisis *in silico* y de conservación evolutiva permiten sugerir su potencial patogenicidad y función. Adicionalmente, nuestro estudio estableció una asociación estadísticamente significativa entre la PE y la variante c.457T>C (p.Y153H), previamente descrito en otras poblaciones.

Respecto a la región promotora, a pesar que no era un objetivo central de nuestro trabajo, identificamos una variante genética que potencialmente altera la unión con factores de transcripción que probablemente pueden tener consecuencias sobre la actividad transcripcional del gen. Estimamos que ambos hallazgos deben ser validados mediante estudios funcionales que apoyen estas apreciaciones.

De esta manera los resultados de esta tesis permiten establecer que *STOX1* puede llegar a ser un biomarcador molecular de PE severa, con potencial uso a nivel clínico para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Preeclampsia

2.1.1 Definición

La preeclampsia es un síndrome multisistémico específico del embarazo, diagnosticado después de las 20 semanas de gestación, caracterizado por hipertensión arterial de inicio reciente y/o proteinuria (Haram et al., 2014). En los casos en los cuales no hay evidencia de proteinuria, el diagnóstico se realiza por la presencia de hipertensión arterial y signos de afectación en un órgano blanco, como edema pulmonar, trombocitopenia, daño renal o alteración en el SNC (Chaiworapongsa et al., 2014).

Se han descrito 2 subtipos de la enfermedad, definidos por el momento de aparición de esta. La primera es la forma de preeclampsia temprana, que se desarrolla antes de las 34 semanas de embarazo, la cual está asociada con alteraciones fetales, como la restricción del crecimiento intrauterino, el oligoamnios y la placentación defectuosa. La segunda hace referencia a una forma tardía, que se presenta después de las 34 semanas, con factores maternos preexistentes como el síndrome metabólico o la diabetes asociados a comorbilidades materno-fetales (Chaiworapongsa et al., 2014; Huppertz, 2018).

Además la preeclampsia tiende a progresar hacia formas más severas, con el desarrollo de comorbilidades, como el deterioro de la función renal, aparición de alteraciones visuales o cerebrales, eclampsia (preeclampsia más convulsiones y edema cerebral) y el síndrome HELLP (hemólisis, elevación enzimas hepáticas y trombocitopenia) (Aouache et al., 2018).

2.1.2 Epidemiología

La preeclampsia afecta entre el 3% y el 5% de todos los embarazos, siendo la primera causa de morbimortalidad materno-fetal en el mundo (Mol et al., 2016). En Colombia, constituye la segunda causa de mortalidad materna, por debajo de la hemorragia posparto (Mortalidad materna, Sivigila, Instituto Nacional de Salud, Colombia, IV periodo 2020 DANE, Estadísticas). Teniendo en cuenta los subtipos de preeclampsia, la forma tardía es la

presentación más prevalente, con más del 80% de los casos. La forma temprana aunque se asocia a comorbilidades más severas, como la restricción del crecimiento intrauterino, representa cerca del 12% de los casos de la enfermedad (Chaiworapongsa et al., 2014; Huppertz, 2018). Del total de embarazos complicados con preeclampsia, entre un 10% y un 20% de los casos progresa a síndrome HELLP (Ditisheim & Sibai, 2017).

Por otra parte, la preeclampsia se asocia a numerosos factores de riesgo, entre los que se encuentran: historia familiar en 1er grado de preeclampsia, antecedente personal de preeclampsia, haber sido producto de un embarazo con preeclampsia (también aplica para la pareja) nuliparidad, edad materna extrema (< 20 años y > 35 años), embarazo múltiple, primipaternidad, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes, factores ambientales, entre otros (Chaiworapongsa et al, 2014; Craici, Wagner, Weissgerber, Grande, & Garovic, 2014; Skjærven et al, 2005).

Además, es importante mencionar que existe algún riesgo de desarrollo de secuelas a largo plazo en las mujeres que presentan preeclampsia, con un aumento del riesgo de hasta 4 veces de ser hipertensas crónicas y de cerca de 2 veces en la probabilidad de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Hutcheon et al., 2011).

2.1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la preeclampsia se realiza con cifras tensionales $\geq 140/90$ mmHg en 2 tomas con 4 horas de diferencia, en una gestante previamente normotensa, o $\geq 160/110$ mmHg en 2 tomas con algunos minutos de diferencia, asociado a proteinuria (≥ 300 mg/24h o con relación proteinuria/creatinuria $\geq 0,3$ mg/dL o tiras reactivas con $\geq 1+$). En la actualidad, el diagnóstico de preeclampsia no incluye de forma estricta la presencia de proteinuria, por lo que es posible hacer el diagnóstico en su ausencia, si existen signos y síntomas de por lo menos una manifestación de afectación de órgano blanco o criterio de severidad, definidos por: i) trombocitopenia con < 100.000 plt/ μ L, ii) concentración de creatinina sérica con un valor $> 1,1$ mg/dL o el doble del valor de la concentración de creatinina sérica en ausencia de otra enfermedad renal, iii) elevación de transaminasas hepáticas dos veces por encima de la

concentración normal, iv) edema pulmonar o síntomas de alteración visual o cerebral (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013).

2.1.4 Tratamiento

El fundamento del manejo clínico de la preeclampsia es la finalización del embarazo, con la expulsión de la placenta y el control definitivo de los síntomas que desencadena la enfermedad. Sin embargo, lo ideal es mantener el embarazo el mayor tiempo posible para permitir el desarrollo del feto y así disminuir las complicaciones de un parto prematuro. Para esto es primordial garantizar el bienestar materno-fetal durante todo el proceso.

Dentro del manejo médico para el control de la sintomatología desencadenada por la preeclampsia, se encuentran los anticonvulsivantes como el sulfato de magnesio, utilizado de forma profiláctica para evitar la progresión a eclampsia, maduración pulmonar fetal con betametasona y los antihipertensivos como nifedipino o labetalol.

En la preeclampsia sin complicaciones se recomienda realizar controles médicos 2 veces a la semana hasta completar 37 semanas y en caso de aparecer complicaciones previas, se debe derivar a parto. Por otro lado en la preeclampsia severa, ante los inminentes riesgos que representa para la madre y el feto, las guías de manejo sugieren completar mínimo 34 semanas de gestación, con la terminación del embarazo en caso de aparición de cualquiera de las siguientes complicaciones: falla renal, edema pulmonar, trombocitopenia severa, coagulación intravascular diseminada, *abruptio placentae*, síntomas cerebrales persistentes, pruebas fetales insatisfactorias o muerte fetal independiente de la edad gestacional (American College of Obstetricians and Gynecologists, 2013).

2.1.5 Etiopatogenia

En la actualidad no se conocen por completo los eventos que desencadenan la enfermedad. Sin embargo, es posible afirmar que al menos parte de la causa debe subyacer en la placenta, debido a que al retirarla durante el parto, el cuadro clínico debido a la enfermedad desaparece en la mayoría de los casos (Malik et al., 2019). Se han postulado teorías acerca

de la fisiopatología y los eventos cardinales que explicarían el desarrollo de la preeclampsia (Correa et al., 2016). Dentro de las teorías propuestas, existe un modelo compuesto por 3 etapas, que se describe brevemente a continuación. Una etapa inicial, que involucra la inmunoregulación materna, ya que durante el embarazo debe existir un equilibrio entre el sistema inmunitario materno y los aloantígenos paternos para que pueda desarrollarse un embarazo exitoso (Michita et al., 2018). Cuando la tolerancia inmunológica materna es inadecuada se establece un ambiente uteroplacentario alterado, que desencadena un conjunto de respuestas conducentes a la preeclampsia (Paauw & Lely, 2018).

La segunda etapa del modelo involucra una invasión trofoblástica deficiente producida por la transformación incompleta de las arterias espirales (Paauw & Lely, 2018). En una gestación normal, las arterias espirales presentan cambios fisiológicos en la conformación de sus paredes, permitiendo que las células trofoblásticas reemplacen la túnica media e íntima en toda su extensión hasta la decidua y el miometrio, convirtiéndose en un sistema vascular de baja resistencia y alta capacitancia. En la preeclampsia la invasión trofoblástica no alcanza el miometrio, manteniendo un territorio vascular de alta resistencia, lo que conduce a un lecho placentario hipóxico con isquemia secundaria y liberación de factores proinflamatorios sistémicos (**Figura1**) (Manual obstetricia-ginecologia-2017). Como evidencia de ello, se ha descrito una activación exagerada de monocitos y neutrófilos, así como la sobreexpresión de receptores Toll-like 4 (TLR4) involucrados en la inducción de citoquinas proinflamatorias que favorecen este proceso patológico (Correa et al., 2016; El-Sayed, 2017).

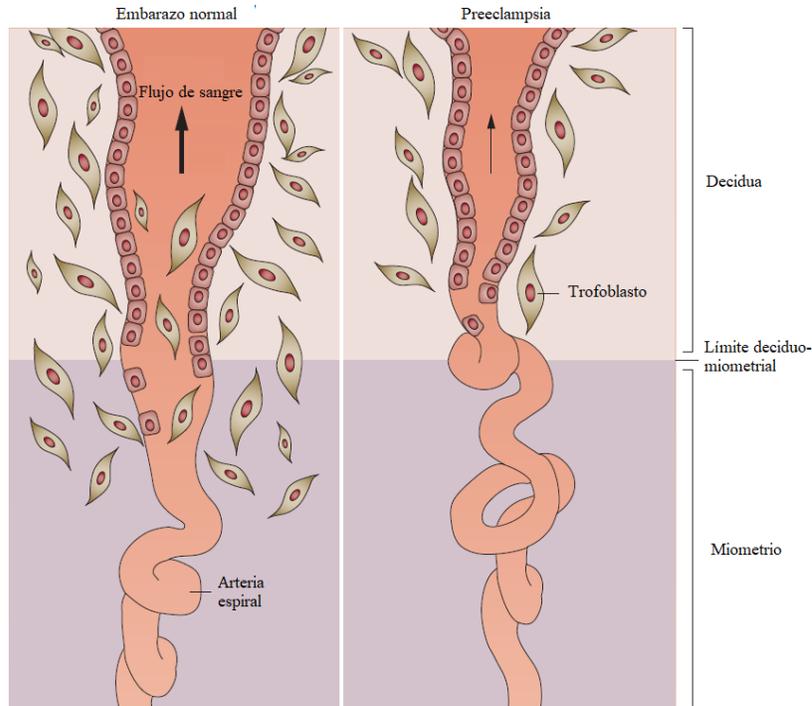


Figura 1. Transformación arterias espirales en preeclampsia vs embarazo normal. Modificado de Chaiworapongsa, T. et al. 2014.

Como respuesta ante la hipoxia placentaria se presenta además la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y un aumento de las tasas de apoptosis celular, lo que contribuye junto con los factores antes mencionados a una placentación anormal, con disfunción de la angiogénesis y un imbalance en la producción de factores proangiogénicos (Craici et al., 2014). Algunas de las moléculas más estudiadas e involucradas en la angiogénesis de la preeclampsia, se describen de forma breve a continuación, sFlt1 es el receptor endotelial de VEGF y PlGF, que actúa como un antagonista de ambos. Al estar sobreexpresado en la placenta preecláptica se ha asociado con los signos característicos de la enfermedad generándose daño endotelial (Maynard & Karumanchi, 2011; Maynard et al. 2003). PlGF (factor de crecimiento placentario), es una proteína proangiogénica, que induce el desarrollo y la maduración del sistema vascular placentario (Chau et al., 2017). VEGF es otro factor proangiogénico, asociado al mantenimiento de la integridad de la membrana de filtración glomerular, a la producción de óxido nítrico y prostaciclina en relación con la vasodilatación, así como a la regulación de la presión arterial (Maynard et al., 2003). Por

último, sEng es un receptor de superficie celular para TFG- β , sobreexpresado en la preeclampsia, que actúa como antiangiogénico amplificando el daño vascular causado por sFlt1 al antagonizar la actividad del factor transformante beta (Venkatesha et al., 2006).

En la etapa final del modelo, todos los factores liberados por la placenta anormalmente implantada junto con el daño endotelial instaurado, conducen al síndrome clínico con las manifestaciones clásicas descritas antes y sus complicaciones (Paauw & Lely, 2018).

Existen actualizaciones del modelo clásico de preeclampsia, hacia un modelo de 6 etapas, en el cual la primera fase representa todos los factores de riesgo ambientales y genéticos implicados en la enfermedad. Una segunda etapa que involucra los genes relacionados en la actualidad. La tercera explica la invasión trofoblástica inadecuada, que conduce a hipoperfusión e hipoxia placentaria. En una cuarta etapa, se describe la alteración en la liberación de factores maternos y placentarios, lo que explica las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En la quinta etapa se establece el diagnóstico. Por último, en la sexta fase hay signos de aterosclerosis, que ocurre en cerca del 40% de las placentas preeclámpticas, lo cual se caracteriza por ser una forma más severa de presentación, con lesiones focales en la pared de las arterias espirales, que conduce a infarto placentario y trombosis arterial (Michita et al., 2018).

2.2 Aspectos genéticos relacionados con la preeclampsia.

La preeclampsia es una enfermedad multifactorial, donde convergen tanto factores genéticos como ambientales. Evidencia de la predisposición genética de la enfermedad fue descrita a principios de los años 60 y en estudios posteriores se ha estimado que la heredabilidad del rasgo es cercano al 55% (Gray et al., 2018; Jebbink et al., 2012). Por esta razón, podemos considerar que la varianza fenotípica de la enfermedad es debida de manera fundamental a la varianza genética, lo que determina la importancia de realizar aproximaciones genéticas en búsqueda de genes causales de la susceptibilidad a la preeclampsia. Dado que esta enfermedad es de tipo complejo, se han asociado múltiples genes como responsables de dicha susceptibilidad genética, sin embargo, no es clara la contribución de estos a la etiología molecular de la patología. Se asume que tanto los genes maternos, como los paternos, tienen

un papel importante en el desarrollo del fenotipo, lo que llevado al desarrollo de estudios extensivos en familias ha permitido evidenciar la agregación familiar (Haram et al., 2014). En el año 2005 investigadores noruegos, establecieron que las mujeres con familiares afectados en primer grado de consanguinidad incrementaban el riesgo de sufrir preeclampsia en un orden de magnitud de 2.2. De igual manera describieron que las mujeres podían aumentar su riesgo de 1.7% hasta 1.9% si su segundo embarazo era el fruto de la relación con una pareja diferente (Skjærven et al., 2005).

La búsqueda de la causa genética de la preeclampsia ha implicado el uso de diferentes abordajes metodológicos. Inicialmente se realizaron estudios de asociación y ligamiento, que permitieron identificar de manera panorámica las regiones cromosómicas asociadas con la enfermedad, es decir dieron lugar a la localización de los loci de susceptibilidad a la preeclampsia (**Figura 2**). Por un lado, los estudios de ligamiento usan pedigrís familiares, en una técnica llamada “chromosome walking” o caminar sobre los cromosomas. Mientras que los estudios de asociación toman para su análisis grandes cohortes de individuos divididos en casos y controles, los cuales no están relacionados. (Buurma et al., 2013; Yong et al., 2018). Algunos de estos estudios de ligamiento incluyen los realizados en familias australianas y neozelandesas en el año 2000, donde describieron el locus *PREG1* en el cromosoma 2 asociado a preeclampsia/eclampsia, estos hallazgos confirmaban los previamente descritos en la misma región, por otro grupo de investigadores Islándicos (Moses et al, 2000). Más tarde un grupo de investigadores holandeses en el año 2005 estudiaron 24 familias con parejas de hermanas diagnosticadas con preeclampsia, donde sus resultados mostraron que el locus 10q22 se asocia a la enfermedad y describieron por primera vez la trasmisión materna del alelo de susceptibilidad Y153H del gen *STOX1* (van Dijk et al., 2005).

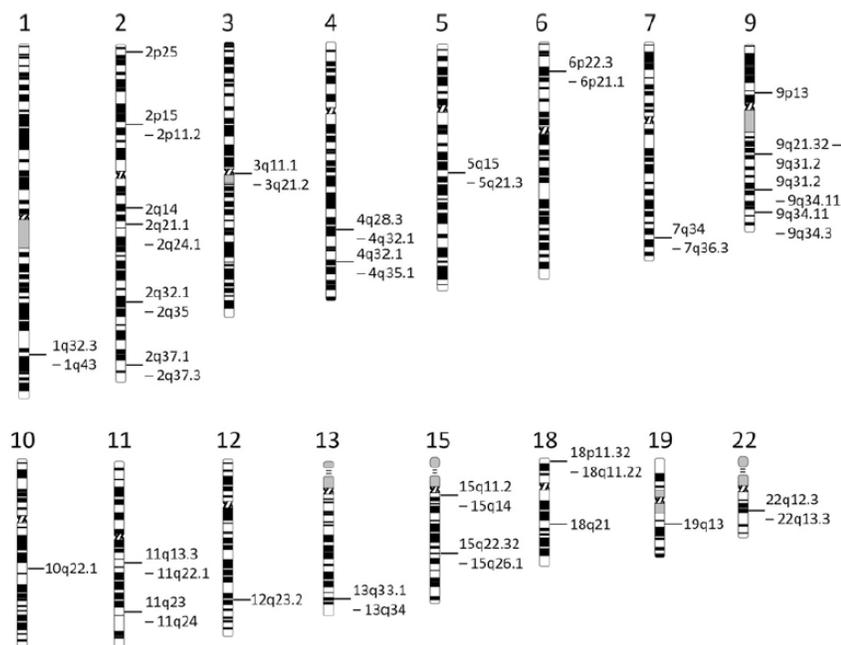


Figura 2. Loci de susceptibilidad y sus localizaciones cromosómicas identificadas a través de estudios de asociación y ligamiento. Tomado de Yong et al, 2018.

Posteriormente se desarrollaron las técnicas de secuenciación, inicialmente aparecieron las técnicas de primera generación con el método de Sanger y posteriormente las técnicas de siguiente generación, fue posible realizar el análisis de grandes regiones genómicas de manera simultánea, a través de sistemas con un alto grado de confiabilidad, con lo cual fue posible aprovechar toda la información obtenida de los estudios de asociación y ligamiento previos y a partir de esto se plantearon nuevas hipótesis de estudio, con lo cual también se describieron nuevos genes candidatos posiblemente asociados al fenotipo. Como es el caso del estudio realizado en el 2018 en una población rusa que incluyó 43 pacientes con preeclampsia y 22 pacientes control, en la cual usaron una aproximación de secuenciación de siguiente generación dirigida al gen *ACVR2A*. Este gen había sido descrito previamente a través de estudios de asociación en poblaciones australianas/neozelandesas como un gen candidato, debido a sus funciones en la invasión trofoblástica y la placentación. Con esta metodología los investigadores describen 2 polimorfismos (rs145399059, rs17692648) como marcadores de riesgo posiblemente asociados a preeclampsia en la población rusa, lo cual requeriría estudios adicionales que permitieran validar funcionalmente los hallazgos de

este estudio (Glotov et al., 2019). Otro tipo de abordaje usando secuenciación de siguiente generación es el realizado en Dinamarca por Hansen y colaboradores también en el 2018, donde incluyen a 50 pacientes con preeclampsia y a 50 pacientes como controles, realizan secuenciación de exoma completo (WES) para conformar 2 paneles de estudio, el primer panel de genes asociados a la enfermedad, es decir, aquellos genes asociados a factores de riesgo clínico de preeclampsia y un panel de genes que incluía genes de vías biológicas previamente descritas como asociados a la enfermedad. La variabilidad entre variantes fue comparada entre casos y controles a nivel de procesos biológicos, vías de señalización y de cada gen. Estos investigadores encuentran un menor número de variantes a nivel de vías de señalización y procesos biológicos en los casos en comparación con los controles. Sin embargo, en las limitaciones del estudio mencionan la ausencia de una historia clínica completa de los controles, lo que no excluye que algunos de ellos tuvieran factores de riesgo para la enfermedad (Hansen et al., 2018).

En nuestro grupo de investigación CIGGUR recientemente realizamos un estudio usando secuenciación de exoma completo en 79 mujeres colombianas con síndrome HELLP, un fenotipo extremo de preeclampsia, para lo cual se creó un subset de genes asociados a la enfermedad, que posteriormente fue sometido a una serie de filtros sobre variantes no sinónimas. Primero se filtraron las variantes con $MAF \leq 0.005$, para luego mediante predictores *in silico* (SIFT, PolyPhen-2, PhD-SNPs, SNPs&GO) evaluar su posible efecto patogénico y además filtrarlas teniendo en cuenta su conservación evolutiva. Finalmente se validaron por secuenciación de Sanger 110 variantes, las cuales se compararon con una cohorte de 346 pacientes como grupo control, que pertenecían al mismo origen étnico. De esta manera dentro de los hallazgos más interesantes del estudio, encontramos variantes con efecto funcional drástico en 5 genes que se han relacionado previamente con preeclampsia, *STOX1*, *PDGFD*, *IGF2*, *MMP1* y *DNAH11*, por generar codones prematuros de parada con proteínas truncadas de forma secundaria, sin embargo, estos hallazgos requieren estudios adicionales para su validación funcional posterior (Jiménez et al., 2020. Identifying new potential genetic biomarkers for HELLP syndrome using massive parallel sequencing. Submitted).

A partir de este estudio inicial de síndrome HELLP, surgió entonces el interés por conocer las variantes moleculares del gen *STOX1* en la población colombiana en fenotipos severos de la enfermedad y establecer que potencial grado de patogenicidad se podría atribuir a estas variantes.

2.3 Importancia de *STOX1* en la preeclampsia.

STOX1 es un gen localizado en la región 10q22, con función de factor de transcripción que codifica para una proteína de unión al ADN, involucrada en la diferenciación trofoblástica. Se expresa en tres isoformas llamadas *STOX1A*, *STOX1B*, *STOX1C*. La isoforma A es la canónica y traduce para la proteína más larga con 989 aminoácidos. *STOX1A* está formada por el dominio de unión al ADN de tipo hélice alada, el cual posee una gran homología con los factores de transcripción de la familia FOX. Esta región de la proteína está codificada por el exón 2 y parte del exón 3, y comprende 78 aminoácidos (posición 111 a 189). También posee una secuencia de localización nuclear (NLS) en el exón 1, una señal de exportación nuclear (NES) en el exón 3 y el dominio de transactivación, de igual manera localizado en el exón 3 (**Figura 3**). Las otras isoformas B y C carecen de señal de exportación nuclear, por lo que están confinadas al núcleo de manera exclusiva, a diferencia de la isoforma A que ante señales específicas se puede localizar en el citoplasma o en el núcleo. Además, la isoforma C carece de dominio de unión al ADN. (Berends et al., 2007; Rigourd et al., 2009)

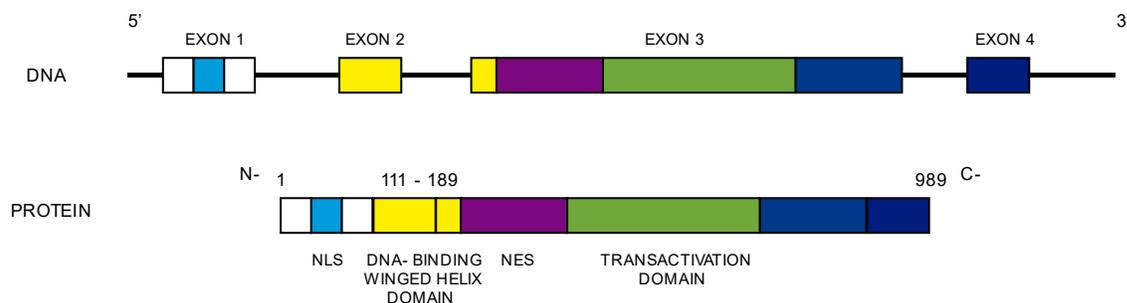


Figura 3. Isoforma A *STOX1*.

Se ha destacado a *STOX1* por ser un gen asociado al desarrollo de la preeclampsia. La primera descripción de esta asociación se dio en el año 2005, por van Dijk y colaboradores, quienes analizaron familias con hermanas afectadas con preeclampsia que evidenciaron la segregación de variantes moleculares del gen *STOX1*. De manera precisa los autores identificaron la variante missense c.457T>C, p.Y153H, rs1341667 la cual determinan como causal de la enfermedad, debido a la estricta conservación del residuo fenilalanina en la posición 153(van Dijk et al., 2005). Estudios posteriores realizados por otros grupos de investigación no lograron replicar en poblaciones diferentes los hallazgos de asociación del gen *STOX1* descrito previamente por Van Dijk et (Berends et al., 2007; Iglesias-Platas et al., 2007; Kivinen et al., 2007). A pesar de estos resultados discrepantes obtenidos de estudios de ligamiento y asociación, la relevancia funcional del gen *STOX1* en la etiología de la preeclampsia ha sido validada mediante estudios que han usado modelos celulares o murinos. Al respecto, Rigourd en el 2008 analizó un modelo celular en el cual mediante sobreexpresión de *STOX1* en células JEG-3, una línea celular de coriocarcinoma ideal para el estudio del trofoblasto, demostró por medio de un microarray y análisis bioinformáticos, que esta sobreexpresión resulta en la modificación transcripcional de hasta un 12.5% de los genes analizados, algunos de los cuales son targets directos de *STOX1* como lo demostraron por medio de inmunoprecipitación de la cromatina y que además se han asociado previamente con preeclampsia como es el caso de la endoglina, para la cual se evidenció que era inducido en 2.2 veces y este gen en particular ha sido considerado el marcador más temprano de la preeclampsia (Rigourd et al., 2008). Más adelante varios investigadores continuaron apoyando la asociación de *STOX1* en la fisiopatología de la preeclampsia, con abordajes cada vez más completos, como es el caso del estudio de Doridot y colaboradores en el 2013, donde a través de la creación de ratones transgénicos que sobreexpresaban *STOX1* pudieron demostrar la contribución de dicho gen en el desarrollo de la preeclampsia, ya que este modelo murino desarrolla los síntomas que se presentan en la enfermedad como son hipertensión arterial y proteinuria (Doridot et al., 2013).

De acuerdo a lo descrito previamente y tomando en conjunto estos hallazgos con respecto a *STOX1*, consideramos que los múltiples hallazgos positivos en estudios funcionales nos permiten considerar a *STOX1* como un gen determinante en la susceptibilidad genética de la preeclampsia, por lo cual la identificación de variantes moleculares tanto en la región

promotora, como en la región codificante de mujeres afectadas con preeclampsia severa y síndrome HELLP como es el caso de esta tesis, son del mayor interés para aportar a la etiología molecular de la enfermedad.

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existen variantes genéticas en la región codificante de *STOX1* relacionadas con la susceptibilidad de desarrollar preeclampsia severa y síndrome HELLP en un grupo de pacientes colombianas afectadas?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar las variantes genéticas del gen *STOX1* en un grupo de mujeres colombianas con preeclampsia severa y síndrome HELLP y determinar su potencial asociación con la enfermedad.

4.2 Objetivos específicos

1. Mediante el análisis de la región codificante del gen *STOX1* identificar variantes moleculares potencialmente relacionadas con la susceptibilidad genética para preeclampsia.
2. Determinar mediante análisis *in silico* la potencial patogenicidad de las variantes moleculares missense halladas en la región codificante del gen *STOX1*.
3. Describir las características genético-poblacionales de las variantes de secuencia identificadas en el gen *STOX1*.
4. Mediante análisis caso-control determinar la asociación de variantes moleculares del gen *STOX1* con la susceptibilidad genética a preeclampsia severa y síndrome HELLP.

5. METODOLOGÍA

5.1 Población de estudio

Se incluyó un grupo de 100 mujeres, conformado por 87 mujeres con diagnóstico de preeclampsia severa y 13 mujeres con síndrome HELLP, procedentes del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario Mayor-Méderi, de Bogotá- Colombia. Las características demográficas de las pacientes se presentan en la **Tabla 1**. Los criterios diagnósticos de preeclampsia con criterios de severidad que se tomaron en cuenta fueron: i) cifras tensionales sistólicas ≥ 160 mmHg y/o diastólicas ≥ 110 mmHg en 2 ocasiones con al menos 4 horas de diferencia en una paciente en reposo, ii) trombocitopenia $< 100.000/\text{ML}$, iii) alteración de la función hepática evidenciado por elevación de transaminasas al doble del valor normal, dolor epigástrico o en cuadrante superior derecho severo y refractario al tratamiento, que no puede ser explicado por otros diagnósticos o ambos. iv) insuficiencia renal progresiva (creatinina sérica $> 1.1\text{mg/dL}$ o el doble del valor sérico en ausencia de otra enfermedad renal v) edema pulmonar vi) alteraciones visuales o cerebrales inicio reciente. Por otro lado, los criterios diagnósticos para síndrome HELLP tomados se basaron en la clasificación de Missisipi que se subdivide en 3 clases: 1) Plaquetas $\leq 50.000/\mu\text{L}$, AST o ALT ≥ 70 UI/L, LDH ≥ 600 UI/L 2) Plaquetas $\leq 100.000/\mu\text{L}$ - $\geq 50.000\mu\text{L}$, AST o ALT ≥ 70 UI/L, LDH ≥ 600 UI/L. 3) Plaquetas $\leq 150.000/\mu\text{L}$ - $\geq 100.000\mu\text{L}$, AST o ALT ≥ 70 UI/L, LDH ≥ 600 UI/L (Barnhart, 2015; Dusse et al., 2015; Haram et al., 2009). Todas las pacientes de forma voluntaria firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio y posteriormente se tomaron muestras de sangre periférica. Se realizó extracción de ADN genómico, mediante salting out, según protocolo establecido en el laboratorio CIGGUR (**Anexo 1**) y también se realizó extracción de ADN por columna, usando los kits de Zimo Research corp, según el protocolo del fabricante correspondiente. (**Anexo 3**).

El ADN extraído fue cuantificado mediante Thermo Scientific™ NanoDrop™ One, teniendo en cuenta la relación de pureza 260/280 y 260/230. Se consideraron ADN de buena calidad aquellos que cumplían con la relación de pureza 260/280 cercana a 1.8 y la relación 260/230 entre 1.8 y 2.2.

Tabla 1. Características demográficas pacientes con PE severa y síndrome HELLP.

| VARIABLES | NÚMERO | PROMEDIO | DS |
|-------------------------|--------|----------|------|
| EDAD (años) | | | |
| <20 | 5 | 28,5 | 7,2 |
| 20-34 | 74 | | |
| >35 | 21 | | |
| TA SISTOLICA (mmHg) | | 161 | 22 |
| TA DIASTOLICA (mmHg) | | 101 | 16 |
| IMC (Kg/m2) | | 28,6 | 11,3 |
| PRIMIPATERNIDAD | 72/100 | | |
| ANTECEDENTE FAMILIAR PE | 22/100 | | |
| ANTECEDENTE PERSONAL PE | 4/100 | | |
| PE TEMPRANA | 22/87 | | |
| PE TARDIA | 65/87 | | |
| SÍNDROME HELLP | | | |
| ANTES DE 34 SEM | 4/13 | | |
| DESPUES DE 34 SEM | 9/13 | | |

5.2 Diseño de primers para el ORF de *STOX1*

Teniendo en cuenta que el ORF (open reading frame) del gen *STOX1* consta de 4 exones, se realizó el diseño de los primers de amplificación y secuenciación con las siguientes consideraciones: para los exones 2 y 4 fue posible utilizar la herramienta bioinformática PRIMER3 (v. 0.4.0) usando como Tann 64°C y 62°C, respectivamente. Sin embargo, para los exones 1 y 3 se diseñaron primers de manera manual debido a las características particulares de estos exones, en el caso del exón 1, tiene un contenido GC alto (79%) y 136pb de dicho exón que son idénticas sobre el intrón 1. El exón 3 se dividió en 3 bloques y se diseñaron 3 juegos de primers de amplificación y 8 primers de secuenciación, debido a la longitud del exón (2359pb). Adicionalmente se usó la herramienta bioinformática BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) en todos los primers diseñados, con el fin de verificar la especificidad de los mismos por el gen *STOX1*. Los primers y las condiciones de PCR estandarizadas se indican en la tabla 1, las secuencias de los primers se indican en los anexos. (**Anexo 2**)

Tabla 2. Condiciones de estandarización de PCR para el ORF de *STOX1*

| EXON | PCR | | CONDICIONES | | | | Secuenciación | Pb leídas en ORF |
|------|----------------|----------------|-------------|-----------|------|----------|------------------------------------|---------------------|
| | PRIMER FORWARD | PRIMER REVERSE | Tm | Extensión | DMSO | Longitud | Primers | |
| 1 | HuSTOX1-Ex1-4F | HuSTOX1-Ex1-7R | 64 | 60seg | 4% | 661pb | HuSTOX1-Ex1-Seq1F | 1-310 |
| 2 | HuSTOX1-Ex2-1F | HuSTOX1-Ex2-1R | 64 | 50seg | | 719pb | HuSTOX1-Ex2-Seq1F | 311-463 |
| 3-1 | HuSTOX1-Ex3-8F | HuSTOX1-Ex3-3R | 60 | 40seg | 4% | 537pb | HuSTOX1-Ex3-Seq-1F | 464-846 |
| 3-2 | HuSTOX1-Ex3-5F | HuSTOX1-Ex3-5R | 64 | 90seg | 4% | 1007pb | HuSTOX1-Ex3-5F | 657-1107 |
| | | | | | | | HuSTOX1-Ex3-Seq-3F/ HuSTOX1-Ex3-5R | 1088-1650/1017-1586 |
| 3-3 | HuSTOX1-Ex3-6F | HuSTOX1-Ex3-6R | 65 | 90seg | 4% | 1497pb | HuSTOX1-Ex3-Seq2R | 1526-2137 |
| | | | | | | | HuSTOX1-Ex3-Seq-4F | 1881-2477 |
| | | | | | | | HuSTOX1-Ex3-Seq-5F | 2320-2822 |
| | | | | | | | HuSTOX1-Ex3-Seq7F | 2160-2822 |
| 4 | HuSTOX1-Ex4-1F | HuSTOX1-Ex4-1R | 62 | 40seg | | 543pb | HuSTOX1-Ex4-Seq-1F | 2823-2970 |

Posteriormente los productos de PCR amplificados fueron verificados en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio. Para cada amplicón se determinó que tuviera el peso molecular esperado según la tabla 2, comparándolo con un Invitrogen™ 1 Kb Plus DNA Ladder.

5.3 Análisis de los productos de secuenciación de Sanger de *STOX1*

Los productos amplificados fueron secuenciados mediante la metodología de Sanger y los primers de secuenciación utilizados fueron diseñados según lo descrito en el apartado 5.2, (Tabla 1 y Anexo 2). La secuenciación fue realizada en un secuenciador automático ABI PRISM 3500xl por la empresa Elim Biopharm. Luego los archivos producto de esta secuenciación en formato ab1 se analizaron de forma manual a través del visualizador de cromatogramas Geospiza FinchTV Version 1.4.0, (<https://digitalworldbiology.com/FinchTV>). Se consideraron para el análisis las secuencias de óptima calidad, que permitieran identificar claramente las variantes homocigotas y heterocigotas. Se utilizó la herramienta bioinformática de alineamiento de secuencia múltiple MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), para comparar las secuencias obtenidas y las correspondientes a la versión WT de *STOX1* tomadas de la base de datos ensembl usando el transcrito identificado como ENST00000298596.11. Esta aplicación permitió identificar las variantes homocigotas, y para algunos casos verificó las variantes heterocigotas identificadas previamente con el análisis manual descrito.

Posteriormente, con las variantes identificadas en la secuenciación de Sanger, se realizó una traducción *in silico*, usando ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) con lo cual se obtuvieron variantes de tipo no sinónimas (missense) y sinónimas. Para cumplir con los objetivos de esta tesis, solo se tuvieron en cuenta en el análisis final las variantes missense. En las pacientes analizadas no se encontraron otro tipo de cambios genéticos en el gen *STOX1*. La potencial patogenicidad de las variantes identificadas se analizó por medio de Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para lo cual se tomó Q6ZVD7 como el código de la secuencia proteica de *STOX1*, según la base de datos Swiss-prot. También se utilizó SIFT (https://sift.bii.a-star.edu.sg/www/SIFT_seq_submit2.html) tomando la secuencia de la proteína de *STOX1* identificada en la base de datos CCDS de NCBI con el código CCDS41535. Adicionalmente, se utilizó Mutation Taster como un tercer predictor de patogenicidad (<http://www.mutationtaster.org/>) de igual manera usando el código identificador del transcrito de Ensembl ENST00000298596.11, para la secuencia codificante (ORF) de *STOX1*. (**Tabla 3**).

Para el análisis de conservación evolutiva se comparó la secuencia proteica curada de *STOX1* humana, identificada con [Q6ZVD7](#) contra la secuencia proteica curada de *Stox1* de ratón, identificada con [B2ROL2](#), usando Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) y posteriormente con los alineamientos se ubicó cada variante para validar la conservación entre las 2 especies. (**Anexo 4**)

Teniendo en cuenta que la preeclampsia es una enfermedad multifactorial en la cual las variantes comunes pueden tener un pequeño efecto funcional y las variantes raras patogénicas podrían potencialmente explicar fenotipos más severos, decidimos para el análisis final categorizar las variantes identificadas en dos grupos:

1. Variantes missense que cumplieran al menos con 2 de 3 criterios siguientes: tener un $MAF \leq 1\%$, variantes evolutivamente conservadas entre especies y variantes cuyo análisis *in silico*, indicara al menos un predictor de patogenicidad positivo.
2. Variantes missense que no cumplieron con los criterios del grupo 1.

Además, aunque el diseño del trabajo no contemplaba analizar la región promotora del gen *STOX1*, tuvimos en consideración las potenciales variantes de 5'UTR que se lograran

identificar en el análisis del exón 1. Estas fueron categorizadas en un 3 grupo y sujetas a análisis adicional según se describe a continuación en el apartado 5.4.

De manera precisa este proyecto no contempló el análisis del promotor del gen *STOX1*, ya que previamente en nuestro grupo de investigación se había realizado un trabajo con este propósito (Bello Uyaban, 2018. Tesis de Maestría), sin embargo, consideramos importante informar y analizar la variante que identificamos por las razones anteriormente descritas.

5.4 Análisis de la variante de 5'UTR del gen *STOX1*

Como será descrito en los resultados identificamos una variante heterocigota de tipo indel en la región promotora del gen *STOX1*, para verificar su posición exacta realizamos un clonaje, que será detallado a continuación.

5.4.1 Clonaje TA en vector pCRTM4-TOPO[®] para análisis de la variante de 5'UTR

Para realizar el clonaje de la variante tipo indel en estado heterocigoto identificada en la región promotora de *STOX1*, se realizó PCR convencional del exón 1 (que incluye la parte de la región promotora involucrada), según las condiciones estandarizadas (**Anexo 2**). Se usó TOPO[®] TA Cloning[®] Kit for Sequencing de Invitrogen y siguiendo el protocolo del fabricante se realizó la siguiente reacción:

| Reactivo | Volumen |
|--------------------------|------------|
| Producto de PCR fresco | 1µL |
| Salt solution | 1µL |
| Agua | 3µL |
| Vector TOPO [®] | 1µL |
| Volumen final | 6µL |

A continuación, se mezcló la reacción y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se dejó la reacción en hielo y se realizó la transformación.

5.4.2 Transformación One Shot® TOP10

Para realizar este procedimiento se tomaron 2µL de la reacción de clonaje TOPO® y se colocaron directamente en el vial de bacterias E.coli One Shot® quimiocompetentes descongelado previamente. Se dejaron en incubación en hielo por 30 minutos para proceder a choque térmico a 42°C por 30 segundos y luego fueron puestos en incubación en hielo por 5 minutos más. Posteriormente se agregaron 250µL de medio S.O.C y la mezcla fue puesta en agitación a 250rpm a una temperatura de 37°C por 1 hora. Finalmente, en 2 cajas de Petri con agar LB y antibiótico selectivo ampicilina se colocaron 80 µL y 100µL del producto de transformación y se dejó en incubación a 37° durante la noche. A las 16 horas de incubación se obtuvieron colonias en las 2 cajas de Petri.

Dentro de este procedimiento se requirió la preparación de 10 minicultivos en tubos Falcon de 15mL, en los cuales se agregó 3mL de medio LB y 15µL de ampicilina para cada uno, en cabina de flujo laminar. Posteriormente se escogieron 10 colonias para los minicultivos y se dejaron en incubación a 37°C durante la noche.

5.4.3 Extracción ADN plasmídico

En la extracción del ADN plasmídico se usaron 9 minicultivos con crecimiento bacteriano, usando QIAprep Spin Miniprep Kit, siguiendo el protocolo del fabricante (**Anexo 5**). Finalmente se cuantificaron las muestras en Thermo Scientific™ NanoDrop™ One con un promedio de 240ng/µL de ADN plasmídico. Las 9 muestras obtenidas con adecuada calidad de ADN plasmídico se enviaron a Elim Biopharm para secuenciación de Sanger.

5.5 Identificación de sitios de fijación de factores de transcripción con la región promotora de *STOX1*

Se realizó un análisis bioinformático por medio de Genomatix. con el objetivo de establecer la presencia de sitios de unión a factores de transcripción conservados en la región promotora de *STOX1*. Para el análisis usamos la región implicada en el cambio c.-22delG, localizados entre -100pb y el codón de inicio ATG con similitud a la matriz mayor a 0.75. A través de la herramienta GEMs Launcher de Genomatix, fue posible obtener un listado de los sitios de unión presentes en comparaciones de secuencias múltiples. Posteriormente con MatInspector se realiza la búsqueda, usando una extensa biblioteca de descripciones de matrices para los sitios de unión a factores de transcripción y de esta manera se localizan los complementarios de ADN. Esta herramienta bioinformática proporciona los datos de similitud de la secuencia que se quiere analizar con la matriz para el sitio de unión al factor de transcripción, así como similitud del núcleo o core de ese mismo sitio. Además, proporciona un índice de calidad a los aciertos, permitiendo filtrar estos resultados y seleccionarlos en función de la similitud de la matriz con la secuencia evaluada (Quandt, Frech, Karas, Wingender, & Werner, 1995).

5.5.1 Análisis TFBS a través de JASPAR

Por medio de la base de datos de JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>) se realizó el análisis de los perfiles de los TFBS encontrados a través de Genomatix: GCM1 y HES1 (para PLAGL1 no hay datos de perfiles curados en la actualidad por lo que no se incluyó). Esta base de datos reúne los perfiles de unión de los factores de transcripción curados y almacenados como PFM (matrices de frecuencia por posición) de múltiples especies organizados en 6 grupos taxonómicos.

Un PFM es el perfil de unión a un factor de transcripción (FT) que de manera *in silico* nos muestra la especificidad en la unión ADN/FT por medio de las frecuencias de cada nucleótido en cada posición, a partir de las interacciones observadas de ADN/FT (Fornes et al., 2019).

5.6 Análisis de Datos

Para cada variante identificada en la población de estudio se determinaron las características genético-poblacionales (entre ellas la frecuencia alélica y la frecuencia genotípica) y se verificó el comportamiento de las mismas en la base de datos gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) y en la base de datos de individuos de la población colombiana que se describirá posteriormente (en adelante los análisis genético-poblacionales solo consideraron esta última población). Se estableció el equilibrio de Hardy Weinberg (HWE) en la población de estudio y en la población de individuos pertenecientes a la población colombiana. Para este último parámetro se consideró que la población se encontraba en equilibrio, si el valor de p era mayor a 0.05 ($p > 0.05$). Adicionalmente se realizó el análisis de potencial desequilibrio de ligamiento (DL) entre las variantes identificadas, en este caso se consideró DL si el valor de D' era cercano a 1 y el valor de $p < 0,05$. Estos análisis genético-poblacionales se realizaron usando el programa SNPStats (<https://www.snpstats.net/start.htm>).

Como fue previamente mencionado, para las variantes genéticas identificadas en las pacientes, se realizó una búsqueda de las frecuencias alélicas y genotípicas en una población de personas consideradas como controles. Estos datos fueron extraídos de la base de datos pública gnomAD y de la base de datos de muestras de población colombiana (481 individuos), cuya información reposa en las instalaciones del CIGGUR. Es importante mencionar que estimamos que esta población control es un referente que permite inferir la distribución de las variantes de interés.

Para el análisis de asociación caso-control se construyeron tablas de contingencia de 2×2 , usando variables cualitativas nominales, dicotómicas. Para este fin se consideraron las variables enfermo o no, que categorizó a las pacientes y a las personas de la población normal colombiana respectivamente. Se consideró como factor de riesgo el genotipo heterocigoto polimórfico + homocigoto para la variante genética identificada en *STOX1*. Es importante resaltar que no para todas las variantes identificadas se presentó el genotipo homocigoto polimórfico y en estos casos la evaluación de fuerza de asociación se realizó solo considerando el genotipo homocigoto *wild type* vs el genotipo heterocigoto polimórfico. Para cuantificar la fuerza de asociación entre el factor de riesgo (genotipo) y la preeclampsia, se

determinó el *odds ratio* (OR). La asociación se determinó mediante la prueba estadística de Chi- cuadrado ($p < 0.05$) y en los casos en donde alguna celda de la tabla de contingencia de 2x2 involucrara menos de 5 pacientes se aplicó el estadístico con la corrección de Yates.

Además, para las variantes donde se encontraron homocigotos para el alelo polimórfico en la población de casos y controles se realizó el análisis de asociación agrupando los genotipos observados de la siguiente manera: TT vs TC vs CC ; TT+TC vs CC ó TT vs TC+CC, para los que también se usó la prueba estadística de Chi-cuadrado con un valor de $p < 0,05$. Todos estos análisis fueron realizados usando el programa estadístico SPSS V24.

Para la variante identificada en la región 5'UTR se realizó el análisis según lo descrito en la sección 5.5.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación de variantes moleculares en *STOX1* mediante secuenciación de Sanger.

En la población de pacientes analizada se identificaron 8 variantes no sinónimas tipo missense en el ORF del gen *STOX1* (**Tabla 3**).

Según lo descrito en la sección 5.3 de la metodología, las variantes missense fueron clasificadas en 2 grupos, en el primero se identificaron 4 variantes que correspondieron a: p.Y153H, p.T188N, p.G477R y p.L582F. De ellas solamente p.T188N cumplió a cabalidad con los tres criterios que definieron las categorías, es decir corresponde a una variante no sinónima, con MAF $\leq 1\%$, con 3/3 predictores *in silico* que indican patogenicidad y el residuo implicado está conservado durante la evolución. (**Anexo 4**). Para las 3 variantes restantes de este primer grupo, la siguiente en importancia fue p.G477R, ya que cumplía los criterios propuestos para la categoría, aunque el predictor de patogenicidad positivo (Polyphen2) no se encontraba en un rango de patogenicidad para considerar a la variante deletérea, por el contrario, cataloga a la variable como posiblemente deletérea. En el caso de la variante p.Y153H que cumplía con 2 de los 3 criterios, el MAF era $>1\%$ y en cuanto a la variante p.L582F no se encontró conservada evolutivamente.

En el segundo grupo se encontraron las variantes p.I158V, p.R492Q, p.E608D y p.A863T, para las cuales ningún predictor de patogenicidad fue positivo, tampoco se encontraron conservadas entre especies y en cuanto al MAF para 3 de ellas era $\leq 1\%$, con excepción de la variante p.E608D (**Tabla 3**).

Adicionalmente en la región 5'UTR se identificó la variante c.-22delG de tipo indel (**Tabla 3**).

6.2 Análisis de TFBS para la variante c.-22delG, localizada en el promotor de *STOX1*, usando Genomatix y JASPAR.

Mediante el estudio de la secuencia promotora de *STOX1* con el software MatInspector de Genomatix, para la región implicada en el cambio c.-22delG, se obtuvo la predicción de 3 TFBS (Transcription factor binding sites), GCM1, HES1 y PLAGL1 los cuales incluían la variante estudiada dentro de la región mejor conservada de su secuencia (**Tabla 4**).

Luego, mediante la herramienta bioinformática JASPAR se analizaron 2 de los 3 TFBS mencionados previamente, que correspondían a: GCM1 y HES1, no se incluyó PLAGL1 en este análisis, ya que en la actualidad no hay perfiles curados para este TFBS. Para GCM1 se encontró en la posición 4 de la secuencia (hebra minus) que el nucleótido C, presente en la variante c.-22delG, tiene el PFM más alto (21439) para esa posición y en el caso de HES1, la variante se encuentra en la posición 6 (hebra plus), donde el nucleótido G tiene el PFM más representativo entre los 4 nucleótidos para esa posición (**Figura 4**).

6.3 Análisis genético-poblacional

El análisis genético poblacional realizado mostró que las frecuencias alélicas de casos y controles era $< 1\%$, excepto para las variantes p.Y153H y p.E608D para las cuales era mayor $> 1\%$ (**Tabla 5**). Las variantes estuvieron en equilibrio de Hardy Weinberg, con un valor de $P > 0.05$, con excepción de la variante p.Y153H para los controles, la cual está en desequilibrio de HWE con un valor de p de 0,00012 (**Tabla 8**). El análisis de DL indicó que la variante p.T188N se encuentra en desequilibrio de ligamiento con todas las variantes analizadas, excepto p.Y153H y para esta última variante se encontró que está en DL con p.E608D y p.A863T. (**Tabla 9**).

Por otra parte, en el análisis de asociación entre casos y controles, se observó que para las variantes analizadas según el modelo de genotipo de riesgo establecido (homocigotos *wild type* vs heterocigotos + homocigotos polimórficos según el caso) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa. En el caso particular de la variante c.563C>A (p.T188N), aunque se encontró un valor de p de 0.023 (en el análisis de Chi-cuadrado) y un *odds ratio* de 9.796 IC [0.8-109.09], al tomar en cuenta la corrección de Yates este valor no

fue significativo (p: 0.131). Esta razón sumado al amplio valor del intervalo de confianza identificado en el análisis de OR, permite concluir que esta observación no es confiable estadísticamente (**Tabla 6**).

En las variantes en donde se identificaron pacientes homocigotas para el alelo polimórfico en el grupo de casos y controles (p.Y153H, p.E608D), aplicamos adicionalmente el análisis bajo diferentes modelos agrupando los genotipos así: TT vs TC vs CC, TT+TC vs CC ó TT vs TC+CC, para identificar la potencial asociación con la PE. El resultado indicó asociación estadísticamente significativa (p:0.035) para el polimorfismo p.Y153H, previamente asociado con preeclampsia (van Dijk et al., 2005) (**Tabla 7**).

También se encontraron 7 grupos haplotípicos para casos y controles, donde el haplotipo 1 representó el 47% y los haplotipos 6 y 7 alcanzaron un valor de p estadísticamente significativo entre casos y controles (**Tabla 10**).

Tabla 3. Variantes encontradas en *STOX1* de mujeres colombianas con preeclampsia severa y síndrome HELLP.

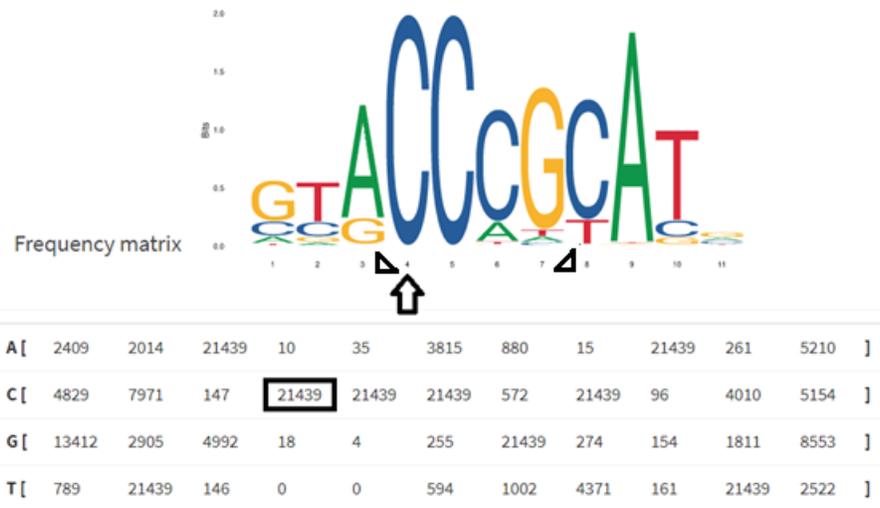
| Grupo | Región | N. pacientes | Variante | Cambio en proteína | Consecuencia | Polyphen2 | SIFT | Mutation Taster | rs | FA Casos | MAF(GnomAd) | FA controles | Conservación |
|-------|--------|--------------|-----------|--------------------|-----------------------------|-------------------|-------------|-----------------|-------------|----------|-------------|--------------|--------------|
| 1 | Exón 2 | 76 | c.457T>C | p.Y153H | MISSENSE | Possibly damaging | Deleterious | Polymorphism | rs1341667 | 0,51 | 0,62 | 0,53 | 2/2 |
| | Exón 3 | 2 | c.563C>A | p.T188N | MISSENSE | Probably damaging | Deleterious | Disease causing | rs73266500 | 0,01 | 0,003 | 0,001 | 2/2 |
| | Exón 3 | 1 | c.1429G>C | p.G477R | MISSENSE | Possibly damaging | Benign | Polymorphism | rs115442093 | 0,001 | 0,0015 | 0,003 | 2/2 |
| | Exón 3 | 1 | c.1744C>T | p.L582F | MISSENSE | Possibly damaging | Tolerated | Polymorphism | rs41278530 | 0,01 | 0,007 | 0,01 | 1/2 |
| 2 | Exón 3 | 1 | c.472A>G | p.I158V | MISSENSE | Benign | Benign | Polymorphism | rs774499233 | 0,005 | 0,000016 | 0,005 | 1/2 |
| | Exón 3 | 1 | c.1475G>A | p.R492Q | MISSENSE | Benign | Tolerated | Polymorphism | rs114834039 | 0,005 | 0,0009 | 0,001 | 1/2 |
| | Exón 3 | 50 | c.1824A>C | p.E608D | MISSENSE | Benign | Benign | Polymorphism | rs10509305 | 0,28 | 0,21 | 0,25 | 1/2 |
| | Exón 3 | 1 | c.2587G>A | p.A863T | MISSENSE | Benign | Benign | Polymorphism | rs7904300 | 0,005 | 0,0094 | 0,01 | 1/2 |
| 3 | 5'UTR | 1 | c.-22delG | | Alteración sitio unión a FT | | | | rs972301897 | 0,005 | 0,0004 | 0 | |

Tabla 4. TFBS del análisis in silico del promotor de *STOX1*.

| Detailed Matrix Information | Matrix sim. | Sequence |
|---|-------------|-----------------------|
| Glial cells missing homolog 1* | 0,866 | gggagCCCGcaacgc |
| Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1 (HES-1)* | 0,921 | gcggGCTCccggccg |
| Pleiomorphic adenoma gene-like 1* | 0,874 | tcgggGCTCccggccgccgga |

Figura 4. Secuencias y PFM de JASPAR. A. GCM1; B. HESI (Tomados de <http://jaspar.genereg.net/>). Secuencias core señaladas.

A. GCM1



B. HESI

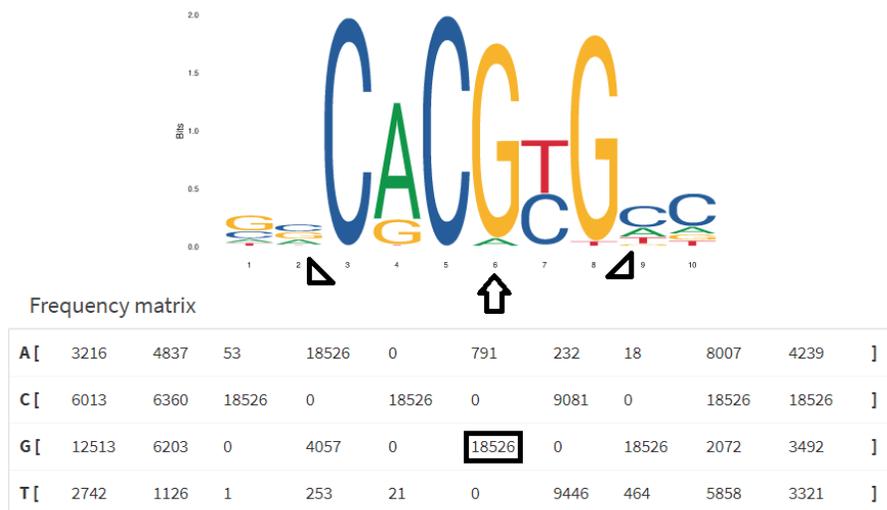


Tabla 5. Características genético-poblacionales de las variantes missense identificadas. FA: Frecuencia alélica; FG: Frecuencia genotípica.

| Casos | | | | | | | Controles | | | | | |
|----------|-------|----------|-------|----------|-------------|------|-----------|----------|-------|----------|-------------|-------|
| Variante | Alelo | # Alelos | FA | Genotipo | # Pacientes | FG | Alelo | # Alelos | FA | Genotipo | # Pacientes | FG |
| p.Y153H | T | 97 | 0,485 | TT | 21 | 0,21 | T | 451 | 0,469 | TT | 127 | 0,264 |
| | C | 103 | 0,515 | TC | 55 | 0,55 | C | 511 | 0,531 | TC | 197 | 0,410 |
| | | | | CC | 24 | 0,24 | | | | CC | 157 | 0,326 |
| p.T188N | C | 198 | 0,99 | CC | 98 | 0,98 | C | 961 | 0,999 | CC | 480 | 0,998 |
| | A | 2 | 0,01 | CA | 2 | 0,02 | A | 1 | 0,001 | CA | 1 | 0,002 |
| | | | | AA | 0 | 0 | | | | AA | 0 | 0 |
| p.R492Q | G | 199 | 0,995 | GG | 99 | 0,99 | G | 961 | 0,999 | GG | 480 | 0,998 |
| | A | 1 | 0,005 | GA | 1 | 0,01 | A | 1 | 0,001 | GA | 1 | 0,002 |
| | | | | AA | 0 | 0 | | | | AA | 0 | 0 |
| p.L582F | C | 199 | 0,995 | CC | 99 | 0,99 | C | 961 | 0,999 | CC | 480 | 0,998 |
| | T | 1 | 0,005 | CT | 1 | 0,01 | T | 1 | 0,001 | CT | 1 | 0,002 |
| | | | | TT | 0 | 0 | | | | TT | 0 | 0 |
| p.I158V | A | 199 | 0,995 | AA | 99 | 0,99 | A | 961 | 0,999 | AA | 480 | 0,998 |
| | G | 1 | 0,005 | AG | 1 | 0,01 | G | 1 | 0,001 | AG | 1 | 0,002 |
| | | | | GG | 0 | 0 | | | | GG | 0 | 0 |
| p.E608D | A | 144 | 0,72 | AA | 50 | 0,5 | A | 720 | 0,748 | AA | 269 | 0,559 |
| | C | 56 | 0,28 | AC | 44 | 0,44 | C | 242 | 0,252 | AC | 182 | 0,378 |
| | | | | CC | 6 | 0,06 | | | | CC | 30 | 0,062 |
| p.G477R | G | 199 | 0,995 | GG | 99 | 0,99 | G | 959 | 0,997 | GG | 478 | 0,994 |
| | C | 1 | 0,005 | GC | 1 | 0,01 | C | 3 | 0,003 | GC | 3 | 0,006 |
| | | | | CC | 0 | 0 | | | | CC | 0 | 0 |
| p.A863T | G | 199 | 0,995 | GG | 99 | 0,99 | G | 946 | 0,983 | GG | 466 | 0,969 |
| | A | 1 | 0,005 | GA | 1 | 0,01 | A | 16 | 0,017 | GA | 14 | 0,029 |
| | | | | AA | 0 | 0 | | | | AA | 1 | 0,002 |

Tabla 6. Tablas de contingencia casos/controles (valor p y OR).

| MUTACIÓN c.457T>C (p.Y153H) | | | |
|-----------------------------|---------------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET+HOM polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 79 | 354 | 433 |
| Ausente | 21 | 127 | 148 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,259)

| MUT c.1475G>A (p.R492Q) /c.1744C>T (p.L582F)/c.472A>G (p.I158V) | | | |
|---|-----------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 1 | 1 | 2 |
| Ausente | 99 | 480 | 579 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,219)

Corrección de Yates (0,77)

| MUTACIÓN c.1824A>C (p.E608D) | | | |
|------------------------------|---------------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET+HOM polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 50 | 212 | 262 |
| Ausente | 50 | 269 | 319 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,279)

| MUTACIÓN c.563C>A (p.T188N) | | | |
|-----------------------------|-----------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 2 | 1 | 3 |
| Ausente | 98 | 480 | 578 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,023) OR 9,796 IC [0,8-109,09]

Corrección de Yates (0,131)

| MUTACIÓN c.1429G>C (p.G477R) | | | |
|------------------------------|-----------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 1 | 3 | 4 |
| Ausente | 99 | 478 | 577 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,679)

Corrección de Yates (1)

| MUTACIÓN c.2587G>A (p.A863T) | | | |
|------------------------------|-----------------|--------|-------|
| Genotipo de riesgo | HET polimórfico | HOM WT | TOTAL |
| Presente | 1 | 15 | 16 |
| Ausente | 99 | 466 | 565 |
| TOTAL | 100 | 481 | 581 |

Valor p (0,239)

Corrección de Yates (0,4)

Tabla 7. Modelos de análisis para estudio de asociación caso-control (pacientes con genotipo homocigoto para el polimorfismo).

| Genotipos | c.457T>C (p.Y153H) | | |
|-----------|--------------------|-----|-----|
| | TT | TC | CC |
| Casos | 21 | 55 | 24 |
| Controles | 127 | 197 | 157 |

Valor p (0,035)

| Genotipos | c.457T>C (p.Y153H) | |
|-----------|--------------------|-----|
| | TT+TC | CC |
| Casos | 76 | 24 |
| Controles | 324 | 157 |

Valor p (0,089)

| Genotipos | c.457T>C (p.Y153H) | |
|-----------|--------------------|-------|
| | TT | TC+CC |
| Casos | 21 | 79 |
| Controles | 127 | 354 |

Valor p (0,259)

| Genotipos | c.1824A>C (p.E608D) | | |
|-----------|---------------------|-----|----|
| | AA | AC | CC |
| Casos | 50 | 44 | 6 |
| Controles | 269 | 182 | 30 |

Valor p (0,510)

| Genotipos | c.1824A>C (p.E608D) | |
|-----------|---------------------|----|
| | AA+AC | AA |
| Casos | 94 | 6 |
| Controles | 451 | 30 |

Valor p (0,928)

| Genotipos | c.1824A>C (p.E608D) | |
|-----------|---------------------|-------|
| | AA | AC+CC |
| Casos | 50 | 50 |
| Controles | 269 | 212 |

Valor p (0,278)

Tabla 10. Frecuencias haplotípicas de casos/controles y valor de p de los haplotipos. A. Frecuencias haplotípicas; B. Valor de p de los haplotipos.

A. Frecuencias haplotípicas

| Frecuencia haplotípica entre casos y controles (n=581) | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------|--------------------|---------------|----------------------|
| Número haplotipos | c.457T>C | c.472A>G | c.563C>A | c.1429G>C | c.1475G>A | c.1744C>T | c.1824A>C | c.2587G>A | Total | Controles (n= 481) | Casos (n=100) | Frecuencia acumulada |
| | Y153H | I158V | T188N | G477R | R492Q | L582F | E608D | A863T | | | | |
| 1 | T | A | C | G | G | C | A | G | 0,472 | 0,469 | 0,485 | 0,472 |
| 2 | C | A | C | G | G | C | A | G | 0,272 | 0,280 | 0,235 | 0,744 |
| 3 | C | A | C | G | G | C | C | G | 0,241 | 0,235 | 0,270 | 0,985 |
| 4 | C | A | C | G | G | C | C | A | 0,011 | 0,014 | NA | 0,996 |
| 5 | C | A | C | C | G | C | C | A | 0,002 | 0,002 | NA | 0,997 |
| 6 | C | G | A | C | A | T | C | A | 0,002 | 0,001 | 0,005 | 0,999 |
| 7 | C | A | A | G | G | C | C | G | 0,001 | NA | 0,005 | 1 |

B. Valor de p de los haplotipos

| Haplotipos | Controles | Casos | Valor p (<0,05) |
|------------|-----------|-------|-----------------|
| 1 | 225 | 49 | 0,69 |
| 2 | 134 | 24 | 0,43 |
| 3 | 113 | 27 | 0,46 |
| 4 | 6 | 0 | 0,26 |
| 5 | 1 | 0 | 0,65 |
| 6 | 0 | 1 | 0,03 |
| 7 | 0 | 1 | 0,03 |

7. DISCUSIÓN

La preeclampsia como enfermedad multifactorial, representa un reto ya que son muchos los aspectos fisiopatológicos y moleculares que aún se desconocen de la enfermedad, a pesar de las múltiples investigaciones realizadas a lo largo de los años desde diferentes áreas del conocimiento. En esta tesis el interés particular se centró en el gen *STOX1*, que fue estudiado por primera vez en el año 2005 en un grupo de pacientes con preeclampsia familiar. Los hallazgos de Van Dijk (2005) asociaron a *STOX1* con el desarrollo de la enfermedad, lo cual se ha explicado por la participación de este gen en la diferenciación del trofoblasto, en procesos inflamatorios y en el estrés oxidativo. Estudios adicionales que han usado modelos *in vivo* e *in vitro* han aportado mayor evidencia, respecto al papel de *STOX1* en la etiología de la preeclampsia. Un ejemplo de ello es el estudio desarrollado por Doridot et al, quienes en 2013 crearon una línea de ratones transgénicos mediante el cruce de hembras *wild-type* con machos knockdown homocigotos para *STOX1*. El efecto sobre el gen fue un fenotipo caracterizado por síntomas severos que se asemejaban con los de la preeclampsia humana (Doridot et al., 2013).

En el estudio realizado se incluyeron mujeres colombianas con preeclampsia severa y síndrome HELLP, en las cuales siguiendo la metodología previamente descrita se identificaron variantes genéticas y haplotipos con asociación estadísticamente significativa con la enfermedad. Estos hallazgos apoyan la importancia de *STOX1* en el desarrollo de la preeclampsia.

Dentro de nuestros resultados en las categorías inicialmente planteadas, para el primer grupo, la variante c.563C>A (p.T188N) es la de mayor interés, por diferentes razones: a) corresponde a la única variante con los 3 predictores positivos b) está conservada evolutivamente entre diferentes especies de mamíferos y c) su MAF es menor al 1% en bases de datos mundiales y propias de la población colombiana. Además, la sustitución del aminoácido treonina (Thr) por asparagina (Asn) se produce en la posición 188, la cual se encuentra ubicada en una región de vital importancia para el adecuado funcionamiento de un factor de transcripción, como es el dominio de unión al ADN.

Adicionalmente la frecuencia de la variante alélica A es 10 veces mayor entre las pacientes con PE severa, respecto a la población normal (**Tabla 3**). A pesar que para esta variante no encontramos evidencia de asociación en el estudio caso-control luego de aplicar la corrección de Yates, estimamos que la implicación funcional puede ser determinante y el hallazgo implica por primera vez a esta variante en la etiología de la enfermedad. Sugerimos la necesidad de la validación mediante análisis *in vitro* que permitirían dar evidencia al respecto.

Nuestro resultado, permite sugerir que es un marcador molecular de utilidad clínica para la identificación de mujeres colombianas con susceptibilidad a desarrollar PE severa y síndrome HELLP. Otros reportes en la literatura han identificado mediante estudios de asociación caso-control variantes genéticas de interés. Es el caso del estudio de van Rijn et al, en relación a TLR4 y NOD2, donde encontraron un OR de 6,9 IC [2.1–23.2] o como en el estudio de asociación realizado para el Factor V de Leiden, por Muetze et al, que muestra un OR de 4.45 [1.31–15.31] (Muetze et al., 2008; van Rijn et al., 2008). De manera interesante y descrito por primera vez en este trabajo, se evidenció que c.563C>A (p.T188N) está en desequilibrio de ligamiento con las demás variantes genéticas identificadas, con excepción de c.457T>C (p.Y153H) (**Tabla 9**) y hace parte de los dos haplotipos que presentaron diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles (**Tabla 10**).

El desequilibrio de ligamiento que hace referencia a la segregación no al azar de marcadores genéticos, en este caso de variantes de *STOX1*, puede tener una implicación biológica de relevancia, si se analiza teniendo en cuenta la potencial interacción entre SNPs, que ha sido reconocida como una de las características genéticas más importantes en las enfermedades de rasgos complejos (Marchini et al., 2005). Las interacciones de SNPs están basadas en el concepto de epistasis genética, por lo que en el caso de las variantes de *STOX1* nos permite sugerir que dicha interacción entre variantes, confiere susceptibilidad a la enfermedad (Cordell, 2002). Adicionalmente, se ha establecido que un SNP individual puede no tener efecto sobre el fenotipo, pero la combinación de ellos si logra demostrar asociación (P. Li et al., 2015). De esta manera, es plausible hipotetizar, basados en el análisis de haplotipos y DL, que para algunas de las variantes genéticas identificadas, existe una interacción que

genera susceptibilidad a la PE, efecto que ha sido denominado como interacciones de SNP que no muestran efectos marginales (INME) (P. Li et al., 2015).

Por otra parte, dentro del test de HWE entre casos y controles, encontramos en desequilibrio a la muestra de controles. Este hallazgo se explica por la probable relación con el concepto del riesgo competitivo de muerte asociado con un gen mutante, que puede causar que los controles se encuentren en desequilibrio de Hardy-Weinberg. En el caso de *STOX1* tenemos un alelo de riesgo (c.563C>A; p.T188N) asociado a la enfermedad y al fenotipo extremo de la misma, lo cual en el peor escenario puede causar la muerte de la paciente, lo que estaría en relación con el concepto previamente expuesto (Llorca et al., 2005). Además otros autores como Xu et al, han descrito que con frecuencia en estudios de casos y controles, es común reportar asociaciones con diferencias estadísticamente significativas entre estos, cuando los controles están en desequilibrio de Hardy-Weinberg, pero debido a errores en genotipificación, sin embargo, no parece ser nuestro caso, debido a la profundidad (50x) de las muestras de WES (Xu et al., 2002).

En el caso de la variante c.457T>C (p.Y153H) perteneciente al mismo grupo 1 de nuestras categorías, fue descrita en 2005 por van Dijk et al, como una variante causal, predominante y de importancia en el desarrollo de PE. El residuo involucrado, la fenilalanina en la posición 153, se encuentra conservada evolutivamente en especies de mamíferos, lo cual evoca su potencial importancia biológica. Adicionalmente, el mismo grupo de investigadores demostró en 2010 que la forma alélica mutante regula negativamente la invasión del trofoblasto mediante la regulación positiva de la α -T-catenina (CTNNA3), una proteína de adhesión celular. A pesar que estos hallazgos justifican su potencial contribución en el desarrollo de la enfermedad, algunos autores no han logrado replicar su asociación en estudios caso-control en poblaciones diferentes a la danesa, descrita por van Dijk y colaboradores (Kivinen et al., 2007). Dentro de los resultados de esta tesis se encuentra un escenario interesante, ya que en el análisis de asociación para c.457T>C (p.Y153H), se identificó una diferencia estadísticamente significativa entre la variante analizada y la preeclampsia, representado con un valor de p: 0.035 (**Tabla 7**), lo que estaría en concordancia con los hallazgos reportados inicialmente por el grupo danés en 2005 y le daría una relevancia mayor a la variante en cuanto a su contribución con el desarrollo del fenotipo.

(Kivinen et al., 2007; van Dijk et al., 2005, 2010). A pesar de este hallazgo nuestro estudio presenta dos limitaciones que potencialmente podría impactar los resultados de estudios de asociación caso-control, uno de ellos es utilizar controles poblacionales, más que controles de mujeres en quienes hayamos descartado preeclampsia y otro es la potencial estratificación poblacional, en el caso que los orígenes étnicos de los casos y los controles no fueran similares. Desde esta perspectiva es claro que el análisis de marcadores de ancestría (no contemplado en este proyecto) es importante para determinar que potenciales asociaciones genéticas no son el reflejo de la variación genética entre los casos y los controles.

Similar a los datos genético-poblacionales reportados a nivel mundial, la frecuencia alélica de la variante c.457T>C (p.Y153H) en los casos y en los controles es alta (51% y 53% respectivamente), lo que se acerca a la hipótesis de “*enfermedad común, variante común*”, que plantea que patologías comunes son atribuibles en parte a variantes alélicas presentes en más 5% de la población (Reich & Lander, 2001). Es probable que estas variantes frecuentes analizadas de manera individual expliquen una pequeña proporción de la heredabilidad atribuida a la PE. Sin embargo, consideramos que la evidencia funcional de la implicación de la variante en el fenotipo de la enfermedad es un fuerte argumento que cataloga a esta variante como de impacto en el desarrollo de la PE.

Para las demás variantes analizadas de este primer grupo, es decir p.G477R y p.L582F, en el estudio de casos y controles, no se encontró asociación con PE (**Tabla 6**), sin embargo, es importante considerar que estas variantes podrían ser interesantes debido a su potencial localización sobre la secuencia de exportación nuclear o el dominio de transactivación de *STOX1*, sin embargo, en la actualidad no hay literatura que pueda avalar dicha hipótesis, por lo cual requieren estudios adicionales para establecer su potencial relación con el fenotipo.

Con relación a las variantes del grupo 2: p.I158V, p.R492Q, p.E608D, p.A863T, en el análisis caso-control, no se halló asociación con PE, sin embargo, estas variantes se encontraron en desequilibrio de ligamiento junto con p.G477R, p.I158V y p.T188N (**Tabla 6 y Tabla 9**), por lo que pueden incluirse en la sugerencia de interacciones de SNPs descrita anteriormente o pueden ser polimorfismos no relacionados con la PE.

Por otra parte, la variante c.-22delG debido a su localización sobre el promotor de *STOX1* puede potencialmente alterar el sitio de unión a factores de transcripción específicos. Para

responder esta hipótesis, realizamos un estudio *in silico* usando las herramientas bioinformáticas Genomatix y Matinspector, las cuales nos permitieron identificar 3 TFBS (Transcription factor binding sites), de potencial unión al promotor de *STOX1* en la localización genómica que involucraba la variante estudiada (c.-22delG) (**Tabla 4**). Estos tres TFBS son GCM1 (Glial cells missing homolog 1), HES1 (hes family bHLH transcription factor 1, nombre previo: *Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1*) y PLAGL1 (Pleiomorphic adenoma gene-like 1).

De los 3 TFBS identificados uno de ellos se destacó sobre los otros dos, por la relación con preeclampsia previamente descrita, este TFBS es GCM1 (Glial cells missing homolog 1) el cual es un factor de transcripción con un papel clave en el desarrollo placentario y con un papel importante en la regulación positiva de la expresión génica de la sincitina 1 y el PGF (factor de crecimiento placentario), los cuales son fundamentales en la vasculogénesis placentaria y la formación del sincitiotrofoblasto. De manera interesante, la expresión de GCM1 y sus genes target, sincitina 1 y PFG se encuentra disminuida en preeclampsia (Chen et al., 2004; Chiang et al., 2009; Chiu et al., 2018). Por otro lado, los dos TFBS restantes HES1 y PLAGL1, carecen de reportes en la literatura que apoyen una relación con preeclampsia. En el caso de HES1 (hes family bHLH transcription factor 1, nombre previo: *Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1*) hace parte de la familia de proteínas básicas helix-loop-helix importantes en la neurogénesis, miogénesis, hematopoyesis y la determinación sexual y PLAGL1 (Pleiomorphic adenoma gene-like 1) es un factor de transcripción tipo zinc finger, parte de la familia PLAG, junto a PLAG1 y PLAGL2 con efectos antiproliferativos, localizado en una región cromosómica frecuentemente delecionada en diferentes tipos de cánceres, expresado en neumocitos tipo II (Z. Li et al., 2014; Rani et al., 2016).

Como parte del análisis de la variante identificada sobre el promotor de *STOX1* usamos la herramienta bioinformática JASPAR por medio de la cual se identificó que para GCM1 en la posición 4 se obtenía un PFM mayor para el nucleótido C, en comparación con el resto de los nucleótidos, lo que estaría en relación con una alta interacción observada ADN/FT, es decir de *GCM1* con *STOX1*. Este hallazgo indicaría una mayor especificidad de unión ADN/FT, lo cual ha sido descrito previamente en la literatura, debido a que algunas

posiciones pueden contribuir en mayor medida en la especificidad o son más importantes en la actividad del sitio de unión (Figura 4A) (Fornes et al., 2019; G. D. Stormo, 2000; Gary D. Stormo, 2013). Por lo tanto, teniendo en cuenta que la variante delecionada sobre el promotor de *STOX1* se encuentra localizada en una posición altamente específica para la unión de GCM1, podemos asumir que potencialmente podría alterar la unión ADN/FT, haciendo que GCM1 se vea afectado funcionalmente, en un efecto de regulación a la baja, lo que a su vez podría alterar sus genes target (sincitina 1 y PFG) con un efecto negativo sobre la vasculogénesis y el desarrollo del sincitiotrofoblasto, eventos cardinales en el desarrollo de preeclampsia. Lo anterior estaría en concordancia con los hallazgos de la investigación desarrollada por Rigourd et al. en 2008 en la cual el desarrollo de un modelo celular con sobreexpresión de *STOX1* causó la disminución de la expresión de GCM1 en un orden de magnitud de 3,4 y de sincitina 1 en orden de magnitud de 2 (Rigourd et al., 2008). En el caso de HES1, la variante se presenta en la posición 6 de la secuencia (**Figura 4B**) donde el nucleótido G también tiene un PFM mayor al resto de los nucleótidos para esa posición, lo cual estaría en relación con una mayor especificidad de unión ADN/FT, sin embargo para este TFBS, como mencionaba previamente, no hay reportes en la literatura hasta el momento que apoyen su asociación con preeclampsia. No obstante, estudios funcionales basados en luciferasa, qRT-PCR y EMSA podrían definir la real implicación de la variante y los TFBS en la transactivación del gen.

En conjunto los hallazgos de este trabajo permitieron identificar variantes genéticas y haplotipos de interés en el gen *STOX1* por lo que podemos sugerir que este gen es un biomarcador molecular de PE severa, con gran utilidad en la aplicación clínica.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. El uso de la secuenciación de Sanger para el ORF del gen *STOX1*, nos permitió identificar algunas de las variantes missense más frecuentes en la población colombiana con preeclampsia severa y síndrome HELLP.
2. Dentro de los resultados más destacados de este trabajo, se encuentra la descripción de la variante p.T188N en 2 pacientes con PE severa, que como mencionaba anteriormente fue una variante que podemos considerar de potencial causalidad dadas sus características, como la localización en el DBD (DNA-binding-domain), tener predictores de patogenicidad positivos, un MAF < 1%, por encontrarse en DL con 6 de las 7 variantes analizadas y por hacer parte de los dos haplotipos que presentaron diferencia estadísticamente significativa entre casos y controles.
3. Debido a la importancia de la variante descrita anteriormente (c.563C>A; p.T188N), consideramos a la misma como un potencial biomarcador de uso clínico en preeclampsia. Sin embargo, son necesarios estudios funcionales que validen nuestros hallazgos, como la realización de análisis de luciferasa o EMSA.
4. También destacamos la descripción de 2 haplotipos de riesgo asociados a preeclampsia, los cuales no habían sido descritos previamente en la literatura, lo que apoya el papel de *STOX1* en la fisiopatología de la preeclampsia.
5. Además de manera incidental identificamos una variante interesante dentro de la región promotora de *STOX1*, cercana al ATG gracias a la ubicación de los primers de amplificación del exón 1, lo que nos permitió analizar mediante estudios *in silico*, los sitios de unión a factores de transcripción en esta región, donde de manera particular encontramos al factor de transcripción GCM1, involucrado en la vasculogénesis y la fusión del sincitiotrofoblasto, eventos claramente alterados en la preeclampsia, lo que aumenta la relevancia de este hallazgo, por lo que sería interesante realizar estudios directos de dicha interacción ADN/FT con estudios funcionales adicionales.

9. BIBLIOGRAFIA

- American College of Obstetricians and Gynecologists, & American College of Obstetricians and Gynecologists (Eds.). (2013). *Hypertension in pregnancy*. American College of Obstetricians and Gynecologists.
- Aouache, R., Biquard, L., Vaiman, D., & Miralles, F. (2018). Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1496. <https://doi.org/10.3390/ijms19051496>
- Barnhart, L. (2015). HELLP Syndrome and the Effects on the Neonate. *Neonatal Network*, *34*(5), 269-273. <https://doi.org/10.1891/0730-0832.34.5.269>
- Bello Uyaban, S. P. B. (2018). *IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN DIRECTA A LA REGIÓN PROMOTORA DE STOX*. Tesis de Maestría. Universidad Colegio Mayor Nuestra Señora del Rosario.
- Berends, A., Bertoli-Avella, A., De Groot, C., Van Duijn, C., Oostra, B., & Steegers, E. (2007). Short communication: STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *114*(9), 1163-1167. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2007.01414.x>
- Buurma, A. J., Turner, R. J., Driessen, J. H. M., Mooyaart, A. L., Schoones, J. W., Bruijn, J. A., Bloemenkamp, K. W. M., Dekkers, O. M., & Baelde, H. J. (2013). Genetic variants in pre-eclampsia: A meta-analysis. *Human Reproduction Update*, *19*(3), 289-303. <https://doi.org/10.1093/humupd/dms060>

- Chaiworapongsa, T., Chaemsaihong, P., Yeo, L., & Romero, R. (2014). Pre-eclampsia part 1: Current understanding of its pathophysiology. *Nature Reviews Nephrology*, *10*(8), 466-480. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2014.102>
- Chau, K., Hennessy, A., & Makris, A. (2017). Placental growth factor and pre-eclampsia. *Journal of Human Hypertension*, *31*(12), 782-786. <https://doi.org/10.1038/jhh.2017.61>
- Chen, C.-P., Chen, C.-Y., Yang, Y.-C., Su, T.-H., & Chen, H. (2004). Decreased Placental GCM1 (Glial Cells Missing) Gene Expression in Pre-eclampsia. *Placenta*, *25*(5), 413-421. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.10.014>
- Chiang, M.-H., Liang, F.-Y., Chen, C.-P., Chang, C.-W., Cheong, M.-L., Wang, L.-J., Liang, C.-Y., Lin, F.-Y., Chou, C.-C., & Chen, H. (2009). Mechanism of Hypoxia-induced GCM1 Degradation: IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF PREECLAMPSIA. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(26), 17411-17419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016170>
- Chiu, Y.-H., Yang, M.-R., Wang, L.-J., Chen, M.-H., Chang, G.-D., & Chen, H. (2018). New insights into the regulation of placental growth factor gene expression by the transcription factors GCM1 and DLX3 in human placenta. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(25), 9801-9811. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001384>
- Cordell, H. J. (2002). Epistasis: What it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans. *Human Molecular Genetics*, *11*(20), 2463-2468. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.20.2463>

- Correa, P. J., Palmeiro, Y., Soto, M. J., Ugarte, C., & Illanes, S. E. (2016). Etiopathogenesis, prediction, and prevention of preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, *35*(3), 280-294. <https://doi.org/10.1080/10641955.2016.1181180>
- Craici, I. M., Wagner, S. J., Weissgerber, T. L., Grande, J. P., & Garovic, V. D. (2014). Advances in the pathophysiology of pre-eclampsia and related podocyte injury. *Kidney International*, *86*(2), 275-285. <https://doi.org/10.1038/ki.2014.17>
- Ditisheim, A., & Sibai, B. M. (2017). Diagnosis and Management of HELLP Syndrome Complicated by Liver Hematoma: *Clinical Obstetrics and Gynecology*, *60*(1), 190-197. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000253>
- Doridot, L., Passet, B., Méhats, C., Rigourd, V., Barbaux, S., Ducat, A., Mondon, F., Vilotte, M., Castille, J., Breuiller-Fouché, M., Daniel, N., le Provost, F., Bauchet, A.-L., Baudrie, V., Hertig, A., Buffat, C., Simeoni, U., Germain, G., Vilotte, J.-L., & Vaiman, D. (2013). Preeclampsia-Like Symptoms Induced in Mice by Fetoplacental Expression of STOX1 Are Reversed by Aspirin Treatment. *Hypertension*, *61*(3), 662-668. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.202994>
- Dusse, L. M., Alpoim, P. N., Silva, J. T., Rios, D. R. A., Brandão, A. H., & Cabral, A. C. V. (2015). Revisiting HELLP syndrome. *Clinica Chimica Acta*, *451*, 117-120. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.10.024>
- El-Sayed, A. A. F. (2017). Preeclampsia: A review of the pathogenesis and possible management strategies based on its pathophysiological derangements. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, *56*(5), 593-598. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2017.08.004>

- Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranašić, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Chèneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., & Mathelier, A. (2019). JASPAR 2020: Update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, gkz1001. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1001>
- Glotov, A. S., Kazakov, S. V., Vashukova, E. S., Pakin, V. S., Danilova, M. M., Nasykhova, Y. A., Masharsky, A. E., Mozgovaya, E. V., Eremeeva, D. R., Zainullina, M. S., & Baranov, V. S. (2019). Targeted sequencing analysis of *ACVR2A* gene identifies novel risk variants associated with preeclampsia. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 32(17), 2790-2796. <https://doi.org/10.1080/14767058.2018.1449204>
- Gray, K. J., Saxena, R., & Karumanchi, S. A. (2018). Genetic predisposition to preeclampsia is conferred by fetal DNA variants near *FLT1*, a gene involved in the regulation of angiogenesis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 218(2), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.562>
- Hansen, A. T., Bernth Jensen, J. M., Hvas, A.-M., & Christiansen, M. (2018). The genetic component of preeclampsia: A whole-exome sequencing study. *PLOS ONE*, 13(5), e0197217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197217>
- Haram, K., Mortensen, J. H., & Nagy, B. (2014). Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. *Journal of Pregnancy*, 2014, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2014/910751>

- Haram, K., Svendsen, E., & Abildgaard, U. (2009). The HELLP syndrome: Clinical issues and management. A Review. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 9(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2393-9-8>
- Huppertz, B. (2018). The Critical Role of Abnormal Trophoblast Development in the Etiology of Preeclampsia. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(10), 771-780. <https://doi.org/10.2174/1389201019666180427110547>
- Hutcheon, J. A., Lisonkova, S., & Joseph, K. S. (2011). Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(4), 391-403. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2011.01.006>
- Iglesias-Platas, I., Monk, D., Jebbink, J., Buimer, M., Boer, K., van der Post, J., Hills, F., Apostolidou, S., Ris-Stalpers, C., Stanier, P., & Moore, G. E. (2007). STOX1 is not imprinted and is not likely to be involved in preeclampsia. *Nature Genetics*, 39(3), 279-280. <https://doi.org/10.1038/ng0307-279>
- Jebbink, J., Wolters, A., Fernando, F., Afink, G., van der Post, J., & Ris-Stalpers, C. (2012). Molecular genetics of preeclampsia and HELLP syndrome—A review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(12), 1960-1969. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.004>
- Kivinen, K., Peterson, H., Hiltunen, L., Laivuori, H., Heino, S., Tiala, I., Knuutila, S., Rasi, V., & Kere, J. (2007). Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *European Journal of Human Genetics*, 15(4), 494-497. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201788>

- Li, P., Guo, M., Wang, C., Liu, X., & Zou, Q. (2015). An overview of SNP interactions in genome-wide association studies. *Briefings in Functional Genomics*, *14*(2), 143-155. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elu036>
- Li, Z., Ding, Y., Zhu, Y., Yin, M., Le, X., Wang, L., Yang, Y., & Zhang, Q. (2014). Both gene deletion and promoter hyper-methylation contribute to the down-regulation of ZAC/PLAGL1 gene in gastric adenocarcinomas: A case control study. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, *38*(6), 744-750. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2013.06.007>
- Llorca, J., Prieto-Salceda, D., Combarros, O., Dierssen-Sotos, T., & Berciano, J. (2005). Riesgos competitivos de muerte y equilibrio de Hardy-Weinberg en estudios de casos y controles sobre asociación entre genes y enfermedades. *Gaceta Sanitaria*, *19*(4), 321-324. <https://doi.org/10.1157/13078032>
- Malik, A., Jee, B., & Gupta, S. K. (2019). Preeclampsia: Disease biology and burden, its management strategies with reference to India. *Pregnancy Hypertension*, *15*, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.preghy.2018.10.011>
- Marchini, J., Donnelly, P., & Cardon, L. R. (2005). Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nature Genetics*, *37*(4), 413-417. <https://doi.org/10.1038/ng1537>
- Maynard, S. E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T. A., Morgan, J. P., Sellke, F. W., Stillman, I. E., Epstein, F. H., Sukhatme, V. P., & Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in

- preeclampsia. *Journal of Clinical Investigation*, 111(5), 649-658.
<https://doi.org/10.1172/JCI17189>
- Michita, R. T., Kaminski, V. de L., & Chies, J. A. B. (2018). Genetic Variants in Preeclampsia: Lessons From Studies in Latin-American Populations. *Frontiers in Physiology*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01771>
- Mol, B. W. J., Roberts, C. T., Thangaratnam, S., Magee, L. A., de Groot, C. J. M., & Hofmeyr, G. J. (2016). Pre-eclampsia. *The Lancet*, 387(10022), 999-1011.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00070-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00070-7)
- Moses, E. K., Lade, J. A., Guo, G., Wilton, A. N., Grehan, M., Freed, K., Borg, A., Terwilliger, J. D., North, R., Cooper, D. W., & Brennecke, S. P. (2000). A Genome Scan in Families from Australia and New Zealand Confirms the Presence of a Maternal Susceptibility Locus for Pre-Eclampsia, on Chromosome 2. *The American Journal of Human Genetics*, 67(6), 1581-1585. <https://doi.org/10.1086/316888>
- Muetze, S., Leeners, B., Ortlepp, J. R., Kuse, S., Tag, C. G., Weiskirchen, R., Gressner, A. M., Rudnik-Schoeneborn, S., Zerres, K., & Rath, W. (2008). Maternal factor V Leiden mutation is associated with HELLP syndrome in Caucasian women. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 87(6), 635-642.
<https://doi.org/10.1080/00016340802112740>
- Paauw, N. D., & Lely, A. T. (2018). Cardiovascular Sequels During and After Preeclampsia. In P. L. M. Kerkhof & V. M. Miller (Eds.), *Sex-Specific Analysis of Cardiovascular Function* (Vol. 1065, pp. 455-470). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-77932-4_28

- Rani, A., Greenlaw, R., Smith, R. A., & Galustian, C. (2016). HES1 in immunity and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 30, 113-117. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2016.03.010>
- Reich, D. E., & Lander, E. S. (2001). On the allelic spectrum of human disease. *Trends in Genetics*, 17(9), 502-510. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02410-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02410-6)
- Rigourd, V., Chauvet, C., Chelbi, S. T., Rebourcet, R., Mondon, F., Letourneur, F., Mignot, T.-M., Barbaux, S., & Vaiman, D. (2008). STOX1 Overexpression in Choriocarcinoma Cells Mimics Transcriptional Alterations Observed in Preeclamptic Placentas. *PLoS ONE*, 3(12), e3905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003905>
- Rigourd, V., Chelbi, S., Chauvet, C., Rebourcet, R., Barbaux, S., Bessières, B., Mondon, F., Mignot, T.-M., Danan, J.-L., & Vaiman, D. (2009). Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *Journal of Reproductive Immunology*, 82(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2009.05.001>
- Skjærven, R., Vatten, L. J., Wilcox, A. J., Rønning, T., Irgens, L. M., & Lie, R. T. (2005). Recurrence of pre-eclampsia across generations: Exploring fetal and maternal genetic components in a population based cohort. *BMJ*, 331(7521), 877. <https://doi.org/10.1136/bmj.38555.462685.8F>
- Stormo, G. D. (2000). DNA binding sites: Representation and discovery. *Bioinformatics*, 16(1), 16-23. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.1.16>
- Stormo, Gary D. (2013). Modeling the specificity of protein-DNA interactions. *Quantitative Biology*, 1(2), 115-130. <https://doi.org/10.1007/s40484-013-0012-4>

- van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Könst, A. A. M., Lachmeijer, A. M. A., Dekker, G. A., Blankenstein, M. A., & Oudejans, C. B. M. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nature Genetics*, *37*(5), 514-519. <https://doi.org/10.1038/ng1541>
- van Dijk, M., van Bezu, J., van Abel, D., Dunk, C., Blankenstein, M. A., Oudejans, C. B. M., & Lye, S. J. (2010). The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by α -T-catenin upregulation. *Human Molecular Genetics*, *19*(13), 2658-2667. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq152>
- van Rijn, B. B., Franx, A., Steegers, E. A. P., de Groot, C. J. M., Bertina, R. M., Pasterkamp, G., Voorbij, H. A. M., Bruinse, H. W., & Roest, M. (2008). Maternal TLR4 and NOD2 Gene Variants, Pro-Inflammatory Phenotype and Susceptibility to Early-Onset Preeclampsia and HELLP Syndrome. *PLoS ONE*, *3*(4), e1865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001865>
- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y. M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T. A., Stillman, I. E., Roberts, D., D'Amore, P. A., Epstein, F. H., Sellke, F. W., Romero, R., Sukhatme, V. P., Letarte, M., & Karumanchi, S. A. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nature Medicine*, *12*(6), 642-649. <https://doi.org/10.1038/nm1429>
- Xu, J., Turner, A., Little, J., Bleecker, E., & Meyers, D. (2002). Positive results in association studies are associated with departure from Hardy-Weinberg equilibrium: Hint for genotyping error? *Human Genetics*, *111*(6), 573-574. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0819-y>

Yong, H. E. J., Murthi, P., Brennecke, S. P., & Moses, E. K. (2018). Genetic Approaches in Preeclampsia. En P. Murthi & C. Vaillancourt (Eds.), *Preeclampsia* (Vol. 1710, pp. 53-72). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7498-6_5

10. ANEXOS

10.1 Anexo 1

10.1.1 Extracción de ADN Salting Out (Tomado de los protocolos estandarizados por CIGGUR)

Materiales y Equipos

Pipetas *Pasteur*

Tubos Falcon de 15 ml

Tubos *eppendorf* 1,5 ml

Micropipetas

Agitador *Shaker*

Centrífuga

Baño serológico

Vórtex

Nanodrop

Congelador -20C

Reactivos

Solución de glóbulos rojos

Solución de glóbulos blancos

Solución precipitante de proteínas

Isopropanol

Proteinasa K 50ng/ μ l

Buffer EB o TE 1X

Procedimiento

1. En tubo falcón de 15 ml medir 6 ml de Buffer de glóbulos rojos y adicionar la sangre del tubo tapa lila con una pipeta *Pasteur*. Mezclar suavemente hasta obtener una solución homogénea.

2. Agitar en *Shaker* fuertemente durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Precalentar baño serológico a 56°C.
4. En tubo falcón de 15 ml medir 3 ml de Isopropanol para cada muestra de ADN que se desee procesar y dejar a -20°C (se necesitará para el final del procedimiento).
5. Centrifugar las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Descartar el sobrenadante por inversión conservando el *pellet*.
6. Agregar 4 ml de la solución de lisis de glóbulos rojos, mezclar fuertemente el *pellet* en vortex hasta tener una solución homogénea.
7. Colocar en *shaker* y agitar fuertemente durante 15 minutos a temperatura ambiente.
8. Centrifugar las muestras a 4500 rpm durante 10 minutos a 4°C y seguidamente descartar el sobrenadante por inversión conservando el *pellet*.
9. Desprender *pellet* mediante vórtex y posteriormente adicionar 4 ml de solución de lisis de glóbulos blancos y realizar vórtex nuevamente hasta homogeneizar la muestra.
10. Adicionar 10 µl de Proteinasa K 50 µg/µl a la muestra y mezclar fuertemente en vórtex.
11. Llevar las muestras al baño serológico previamente precalentado a 56°C e incubar por 4 horas, realizando vórtex de las muestras cada hora.
12. Al finalizar las 4 horas de incubación, adicionar 800 µl de la solución precipitante de proteínas y mezclar en vórtex para homogeneizar la muestra y seguidamente llevar a congelador -20°C durante 5 minutos.
13. Centrifugar a 4500 rpm durante 20 minutos a 4°C.
14. Retirar de congelador de -20°C tubos falcón con isopropanol y posteriormente transferir por inversión el sobrenadante, mezclar suavemente por inversión hasta visualizar la mota de ADN.
15. Pescar la mota de ADN con pipeta o con una punta para micropipeta y transferirlo a un tubo eppendorf.

16. Centrifugar a 13000 g durante 5 minutos y seguidamente dejar secar a temperatura ambiente aproximadamente por 1 hora o el tiempo que sea necesario para no tener residuos de alcoholes.

17. Agregar 200 µl de Buffer TE 1X ó Buffer EB al pellet de ADN obtenido y dejar incubar a 4°C toda la noche.

18. Al siguiente cuantificar y almacenar a -20°C.

Referencias

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struls K. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc. Copyright© 2003.

10.2 Anexo 2

10.2.1 Tabla Secuencias de primers usados para el ORF del gen *STOX1*

| EXÓN | TIPO DE PRIMER | NOMBRE PRIMER | SECUENCIA |
|------|----------------|--------------------|----------------------------|
| 1 | Amplificación | HuSTOX1-Ex1-4F | Gtggagaacgaagccgaacgctg |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex1-7R | gcctagcctctgtggcagaagaC |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex1-Seq1F | gcagccagcgccggaccg |
| 2 | Amplificación | HuSTOX1-Ex2-1F | attgcatgacctctgaactctgat |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex2-1R | tctcattttgactcctttccacaga |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex2-Seq1F | caatgtaaatcttttcttgcatag |
| 3-1 | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-8F | ctggcattttaatcacatgtatta |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-3R | ACACTGAAACTGCCCATCTGTA |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq-1F | cattttaatcacatgtattatgttac |
| 3-2 | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-5F | ATATCTGGTGAGCATGGAGAGCTG |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-5R | GTTGTTTCAGCATATGGCTCTTTGG |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq-3F | CACCTGAAGAATGGCCCGTCCGAG |
| 3-3 | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-6F | ACAACAGTGCTAGGTTCCCATTTG |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex3-6R | ggtctcaatctcttgacctcgtgA |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq2R | AAAGGAGGCACCTCGTGATGGCAG |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq-4F | GCATGTTGAGATATGAAGTGTATGG |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq-5F | GAGAATGACGACTTACGTCAAATGC |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex3-Seq7F | GCCTAAATTCAGGGGCCAGTTTG |
| 4 | Amplificación | HuSTOX1-Ex4-1F | ctgtgaaggcagctgtcaataatt |
| | Amplificación | HuSTOX1-Ex4-1R | AGCCTTAAGACACCAAAAGAGGAA |
| | Secuenciación | HuSTOX1-Ex4-Seq-1F | gtgaagcctttaaatgtaaagag |

10.3 Anexo 3

10.3.1 *Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit / ZYMO Research (Extracción ADN por columna)*

1. Agregue hasta 200 µl de muestra a un tubo de microcentrífuga y agregue:

- 200 µl de BioFluid & Cell Buffer (Rojo)
- 20 µl de proteinasa K

2. Mezcle bien o agite en vórtex durante 10-15 segundos y luego incube el tubo a 55°C durante 10 minutos.

3. Agregue 1 volumen de Genomic Binding Buffer a la muestra digerida. Mezcle bien o agite en vórtex durante 10-15 segundos.

- Ejemplo: Agregue 420 µl Genomic Binding Buffer a la muestra digerida de 420 µl.

4. Transfiera la mezcla a una columna Zymo-Spin™ IIC-XLR en un tubo de recolección. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Descarte el tubo de recolección con el sobrenadante.

5. Agregue 400 µl de Pre-Wash Buffer de ADN a la columna de centrifugado en un nuevo tubo de recolección. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Vaciar el tubo de recogida.

6. Agregue 700 µl de g-DNA Wash Buffer a la columna de centrifugado. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Vaciar el tubo de recogida.

7. Agregue 200 µl de g-DNA Wash Buffer a la columna de centrifugado. Centrifugar a $\geq 12,000$ x g durante 1 minuto. Descarte el tubo de recolección con el sobrenadante.

8. Transfiera la columna de centrifugado a un tubo limpio de microcentrífuga. Agregue ≥ 50 µl de DNA Elution Buffer o agua directamente en la matriz. Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego centrifugar a velocidad máxima durante 1 minuto para eluir el ADN. El ADN eluido puede usarse inmediatamente o almacenarse a $\leq -20^\circ\text{C}$ para uso futuro.

Referencias

Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit. Catalog Nos. D4068 & D4069. ZYMO RESEARCH CORP.

10.4 Anexo 4

10.4.1 Alineamientos de la secuencia proteica de *STOX1* humana vs *Stox1* de ratón.

Variantes

1. p.Y153H
2. p.I158V
3. p.T188N
4. p.G477R
5. p.R492Q
6. p.L582F
7. p.E608D
8. p.A863T

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  MARPVQLAPGSLALVLCRLEAQKAAGAAEEPGGRAVFRFRANARCFWNARLARAASRL 60
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  MARPVQLAPGSLALVLSPREAG--QAAGEPGGRALFRFRANARCFWNARLARAASRL 57
*****. **          ** *****:*****

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  AFQGWLRRGVLLVRAPPACLVLRDAWRRRALRPPRGFRIRAVGDVFPVQMNPIQSQFV 120
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  AFLGWLRRGVLLVRAPQPCVQLRDAWRRRALRPPRGFRITAVGDVFPVQMSPIAQCQRFV 117
** ***** * :***** *****. *:.*:

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  PLGEVLCCAIADMNTAQIVVTQESLLERLMKHYPGIAIPSEDILYTTLGLTIKERKIYHT 180
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  PLAEVLCCAIADMNAQVMVTQQSLEHLIKHYPGIAVPSPDILYSTLGALIQERKIYHT 177
*.:*****:***:*.:.***:***:*.:*****:***:***:*.:*****

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  GEGYFIVTPQTYFITNTTTQENKRLPDSERLMPASMTYLVSMESCAESAQENAAPISSH 240
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  GEGYFIVTPSTYFITNTPMQNKSALLSNEGCSGPTSGTYLVSVDCCAEPTQENEALFSH 237
*****.***** * ** * *:. * : * *****:.* ** :*** * :**

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  CQSCQCFRDMHTQDVQEAPVAAEVTRKSHRGLGESVSVWQNGAVSVSAEHHICESTKPLP 300
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  CPSCQCYPDTSMCDKDLLTAAEVTRKSQEGLEETALTENQVVSASEDTHICVNPCKPLP 297
* ***: * * :. *****:.* *:.: .* .* * : *** . ****

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  YTRDKEKGGKFGFSLWRSLSRKEKPKTEHSSFSAQFPPEEWPVRDEDDLNDIPRVEHE 360
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  YTKD--KGRFQFGLWRSLSRKEKPKAEYHSFSAQFPPEEWPVRDEDSSTKIIPRVEHA 355
*:* ***:***:*****:*.: ***** ***** . :*****

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  IIKRINPILTVDNLIKHTVLMQKYEEQKKYNSQGTSTDMLTIGHKYPSKEGVKKRQGLSA 420
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  LIKRINPVLTVDNLTKHTALMQKYEEQKKYNSQGTSM DILTTRHKDSSKEVIGKRQGFQA 415
:*****:***** *.* ***** ***** *: * ** * * : * * *

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  KPQQGHSRRDRHKARNQGSFQPGSIR--LEKHPKLPATQPIPRIKSPNEMVQGKPLGE 478
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  KSRRRGSSHKGRHKARSQGSLEPGNPGQEKQKPKVPAAPRTKSPSEQVHH-LQGR 474
* : * * :.*****.*****:***. **:*:***:* * * * * * * : * .

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  ITTVLGSGLIYKKRISNPFQGLSHRGSTISKGHKIQKTSDLKPSQTGPKEKPFQKPRSLD 538
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  NPAVLGSGLIYKKQINNPFQGMHLRKHVSQKHAVQKTHGLKPTCVGPEEKPFWSAGSSD 534
:*****:***: * :***** :*** .***: .**:* * * . * *

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  SSRIFDGKAKEPYAEQPNDKMEAESYINDPTVKPINDDFRGHLFSHPQQSMLQNDGKCC 598
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  PSGVFDGEAQPPEYQCRDKLEAGSTQVAKAPVHPVSDDFRGGPGNYPPRRVLPGPSRCC 594
* :***:*. ** * * .**:* * * : . * :.*.***** .:* : * . :**

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  PFMESMLRYEVYGGENEVIPEVLRKSHSHFDKLGKTPHSLPSRGASFSDRT---PSA 655
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  SFRESMLRPGVYHEENKDLPEVLRKSWSTCDMFLGTKEKKQALPAQRCSLDPDSSVHAE 654
* ***** * * :.***** * * : * :. :***: .*:. :

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN  CRLVDNTIHFQNLGLLDYPVGNPLRQAARQDKDSEELLRKGFBV-QDAETTSLENEQLS 714
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE  DKTVDKILHFQNLGLLDCPAGANRLRTHERQDGNSEELSRKALQIPEAEIVNMENEGLS 714
```

: **: :***** *.* * ** ** :**** **.: :** ..:*** **

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN NDDQALY---QNEVEDDDGACSSLYLEEDDISENDLRLQMLPGHSQYSFTGGSQGNHLG 770
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE DSEQDQVALSHSDPGAGDDGGCSSLCLEDDDFSETDDFCPSLPGHTQHSFAGGGTWNHLG 774
:.* :. :***.*** **:*:*:*:*: ****:*:*:*.* ****

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN KQKVIERSLTEYNSTMERVESQVLKRNECYKPTGLHATPGESQEPNLSAESCGLNSGAQF 830
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE TPAMTGKSLTDCNSKAHRLELLAIERNPWYKATGLFSNAGESPNPDLSD-NPGQNSRIPW 833
. : :***: **.*:* :.:** ** **.*. :. *** :*:** . * ** :

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN GFNYEEEPSVAKCVQASAPADERIFDYYSARKASFEAEVIQDTIGDTGKKPASWSQSPQN 890
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE GFNYEGEPTVAHVQTPAAAAGRSLACSTVRTTSFPVEILQESPGDRGKSPIVWRQSLPS 893
***** **:**: :* *.. :. :.*:* *.:*.: ** **.* * ** .

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN QEMRKHFPPQFQLFNTSHMPVLAQDVQYEHSHLEGTENHSMAGDSGIDSPRTQSLGSNNS 950
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE QEMKEHFTDKLQLVKTSHGVPVSAQEPQ--GEHLEGTENYSMTGDSGIDSPRTQSLVSTNS 951
:.* :*:**.: ** *: * .*****:*:***** **.* **

SP|Q6ZVD7|STOX1_HUMAN VILDGLKRRQNFLQNVEGTKSSQPLTSNSLLPLTPVINV 989
SP|B2RQL2|STOX1_MOUSE AILDGFKRRQHFLPNREGVQKSNLASNSLFLTPAINV 990
.*****.***.* **.:** *.****: ***.***

10.5 Anexo 5

10.5.1 Purificación de ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep

Nota: Todos los pasos del protocolo deben llevarse a cabo a temperatura ambiente (15–25 °C).

Procedimiento

1. Resuspender el pellet de células bacterianas en 250 µl de Buffer P1 y transfíralas a un tubo de microcentrífuga. Asegúrese de que se haya agregado RNase A al Buffer P1. No se deben ver grupos de células después de la resuspensión del pellet.

Si se ha agregado el reactivo LyseBlue al Buffer P1, agite vigorosamente la botella de buffer para asegurarse que las partículas de LyseBlue estén completamente disueltas. Las bacterias deben ser resuspendidas completamente haciendo vórtex o pipeteando hacia arriba y hacia abajo hasta que no queden grupos de células.

2. Agregue 250 µl de Buffer P2 y mezcle bien invirtiendo el tubo 4–6 veces.

Mezcle suavemente invirtiendo el tubo. No haga vórtex. Si es necesario, continúe invirtiendo el tubo hasta que la solución se vuelva viscosa y un poco clara. No permita que la reacción de lisis continúe durante más de 5 min.

Si se agregó LyseBlue al Buffer P1, la suspensión celular se volverá azul después de la adición de Buffer P2. La mezcla debe dar como resultado una suspensión de color homogéneo. Si la suspensión contiene regiones incoloras localizadas, o si los grupos de células parduzcas aún son visibles, continúe mezclando la solución hasta lograr una suspensión de color homogéneo.

3. Agregue 350 µl de Buffer N3. Mezcle inmediata y completamente invirtiendo el tubo 4–6 veces. Para evitar la precipitación localizada, mezcle bien la solución, inmediatamente después de la adición de Buffer N3. La solución debe volverse turbia.

Si se ha utilizado el reactivo LyseBlue, la suspensión se debe mezclar hasta que el rastro azul desaparezca y la suspensión sea incolora. Una suspensión incolora homogénea indica que la SDS ha sido efectivamente precipitada.

4. Centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm ($\sim 17,900 \times g$) en una microcentrífuga de mesa. Se formará un pellet blanco compacto.
5. Aplique 800 μl del sobrenadante del paso 4 a la columna de centrifugado QIAprep 2.0 por pipeteo.
6. Centrifugar durante 30–60 s. Deseche el sobrenadante.
7. Recomendado: Lave la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0.5 ml de Buffer PB y centrifugación durante 30–60 s. Deseche el sobrenadante.
8. Lave la columna de centrifugación QIAprep 2.0 agregando 0,75 ml de Buffer PE y centrifugando para 30-60 s.
9. Deseche el sobrenadante y centrifugue a toda velocidad durante 1 minuto adicional para eliminar buffer de lavado residual.
10. Coloque la columna QIAprep 2.0 en un tubo limpio de microcentrífuga de 1,5 ml. Para eluir el ADN, agregue 50 μl de Buffer EB (10 mM Tris \cdot Cl, pH 8.5) o agua al centro de cada columna de centrifugado QIAprep 2.0, dejar reposar durante 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto.

Referencias

QIAprep® Miniprep Handbook. Protocol: Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit and a Microcentrifuge. QIAGEN.