

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN DIRECTA
A LA REGIÓN PROMOTORA DE *STOX1***

SANDRA PATRICIA BELLO UYABAN

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

MAYO 2018

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN DIRECTA
A LA REGIÓN PROMOTORA DE *STOX1***

SANDRA PATRICIA BELLO UYABAN

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial para optar al título

MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA

DIRECTOR

PAUL LAISSUE MD., MSc., PhD.

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA

BOGOTÁ, D.C.

MAYO 2018

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 del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

**IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DE UNIÓN DIRECTA
A LA REGIÓN PROMOTORA DE *STOX1***

SANDRA PATRICIA BELLO UYABAN

APROBADO

**PAUL LAISSUE MD., MSc., PhD.
DIRECTOR**

JURADO

JURADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia, por bendecirme y apoyarme en este proceso.

A la universidad del Rosario y al CIGGUR por la experiencia académica e investigativa.

Al Dr. Paul Laissue y la Dra. Dora Fonseca por sus enseñanzas y guía durante el proceso.

A mis amigas que me acompañaron y apoyaron durante este camino para lograr este objetivo importante de nuestras vidas.

Contenido

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Preeclampsia	2
2.1.1 Definición y epidemiología.....	2
2.1.2 Fisiopatología.....	4
2.1.2.1 Disfunción endotelial	6
2.1.2.2. Proteínas relacionadas con disfunción endotelial	8
2.1.3 Etiología de la PE.....	11
2.1.4 Factores genéticos de la PE.....	12
2.1.4.1 Generalidades de <i>STOX1</i>	15
2.1.4.2 <i>STOX1</i> regula diferentes procesos biológicos.....	20
3. PREGUNTA CIENTÍFICA	23
4. OBJETIVOS DE LA INVESTACIÒN.....	24
4.1 Objetivo general.....	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1 Secuenciación del promotor de <i>STOX1</i> en pacientes francesas afectadas con preeclampsia.....	25
5.1.1 Población.....	25
5.1.2 Amplificación por PCR de la región promotora de <i>STOX1</i>	25

5.2 Análisis <i>in-silico</i> del promotor de <i>STOX1</i>	26
5.2.1 Identificación de sitios potenciales de unión a factores de transcripción en la región promotora de <i>STOX1</i>	26
5.3 Análisis del promotor de <i>STOX1</i> a través del ensayo monohíbrido en levaduras	27
5.3.1 Amplificación por PCR de la región promotora de <i>STOX1</i>	27
5.3.2 Clonaje en vector pCR4-TOPO TA	27
5.3.3 Ensayo de monohíbrido en levaduras	28
5.4 Construcciones plasmídicas	30
5.4.1 Promotor de <i>STOX1</i> en PGL4.22 [luc2CP/Puro].....	30
5.4.2 Construcciones plasmídicas para para ensayo de gen reportero	33
6. RESULTADOS.....	37
6.1 Experimento de monohíbrido en levaduras del promotor de <i>STOX1</i> humano.....	37
6.2 Análisis <i>in silico</i> del promotor de <i>STOX1</i>	38
6.3 Secuenciación del promotor de <i>STOX1</i> en pacientes con PE	39
7. DISCUSIÓN	40
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	44
9. REFERENCIAS	45
10. ANEXOS.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las isoformas de STOX1	16
Figura 2 Representación esquemática de los fragmentos del promotor de STOX1 utilizados en ensayo de dominio autoactivador	29
Figura 3 Esquema de las series alélicas realizadas a partir de la región promotora de STOX1	33

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Primers de amplificación del promotor de <i>STOX1</i>	25
Tabla 2 Programa de PCR para el fragmento del promotor de <i>STOX1</i>	26
Tabla 3 Primers de secuenciación promotor <i>STOX1</i>	26
Tabla 4 Programa de PCR sobre colonias bacterianas para promotor de <i>STOX1</i> en pCR4-TOPO TA	28
Tabla 5 Digestión del promotor de <i>STOX1</i> pCR4-TOPO TA.....	31
Tabla 6 Digestión BMP15 pGL4.22 [luc2CP/Puro]	31
Tabla 7 Ligación promotor <i>STOX1</i> (906pb) pGL4.22 [luc2CP/Puro]	32
Tabla 8 Programa de PCR sobre colonias bacterianas para verificación de ligación del promotor de <i>STOX1</i> en pGL4.22 [luc2CP/Puro]	32
Tabla 9 Primers de amplificación del promotor de <i>STOX1</i>	34
Tabla 10 Programa de PCR para el fragmento del promotor de <i>STOX1</i>	34
Tabla 11 Digestión de las series alélicas del promotor de <i>STOX1</i> clonado en el vector PGL4.22 [luc2CP/Puro]	35
Tabla 12 Ligación promotor <i>STOX1</i> pGL4.22 [luc2CP/Puro].....	36
Tabla 13 Resultado ensayo de monohíbrido en levaduras de promotor <i>STOX1</i> en librería de placenta humana.....	37
Tabla 14 TFBS análisis in silico del promotor <i>STOX1</i> 1 -305pb.....	38
Tabla 15 Resultados de la secuenciación del promotor de <i>STOX1</i>	39

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Análisis in silico del promotor de STOX1. Tabla TFBS	57
--	----

RESUMEN

La Preeclampsia (PE) es una enfermedad exclusiva del embarazo caracterizada por hipertensión arterial y compromiso multisistémico. Afecta entre el 2% y el 8% de las mujeres gestantes en el mundo y es la principal causa de morbilidad y mortalidad materna y neonatal. El principal evento relacionado con la fisiopatología de la PE es la disfunción endotelial, la cual depende del control poligénico de múltiples cascadas moleculares.

Diversas proteínas han sido estudiadas con el objetivo de esclarecer la fisiopatología de la enfermedad, entre ellas el factor de transcripción *STOX1*. Esta proteína regula diferentes procesos biológicos implicados en la fisiopatología de la PE como la angiogénesis, el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis. Sin embargo, se desconoce qué factores de transcripción se fijan al promotor de *STOX1* participando en su regulación. Durante el presente trabajo de tesis se propuso identificar los factores que interactúan potencialmente con la región promotora de *STOX1* e identificar, por medio de secuenciación del promotor, variantes que puedan afectar sitios de unión a factores de transcripción en una muestra de pacientes francesas afectadas con PE. Para cumplir este objetivo fueron utilizadas técnicas experimentales *in vivo* como el ensayo de monohíbrido en levaduras y bioinformáticas *in silico*. Se identificó al factor de transcripción HEY-L como un potencial regulador de *STOX1* y fue encontrada la variante c.-735T>G en la región donde potencialmente interactúa este factor de transcripción. Sin embargo, deben ser realizados estudios funcionales para validar la interacción definitiva y si la mutación genera una modificación en la transactivación del promotor.

1. INTRODUCCIÓN

La preeclampsia (PE) es una enfermedad hipertensiva del embarazo de interés en salud pública ya que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y perinatal (Eiland, Nzerue, & Faulkner, 2012). La PE es causada por anomalías en el desarrollo vascular de la placenta a consecuencia de una disfunción endotelial (Cerdeira & Karumanchi, 2012). Sin embargo, las vías moleculares relacionadas con su etiología no son completamente conocidas. En el año 2005 un estudio de mapeo posicional en familias holandesas afectadas con PE asoció el gen *STOX1* a la etiología de esta enfermedad (V. Rigourd et al., 2009). Posteriormente fueron desarrollados modelos en líneas celulares que mostraron un perfil transcripcional similar al presentado en el tejido placentario de pacientes afectadas con PE. Además, modelos animales con sobreexpresión de *STOX1* presentaron síntomas similares a la PE humana como el incremento gradual de la presión arterial, proteinuria y alteración en la histología placentaria con un incremento en los niveles de los factores antiangiogénicos. *STOX1* regula diferentes vías moleculares relacionadas con la fisiopatología de la PE como la coagulación, el estrés oxidativo, el metabolismo de los ácidos grasos, la inflamación, la angiogénesis, la apoptosis y el ciclo celular. Sin embargo, aún no se conoce qué factores de transcripción regulan la expresión de este gen (Ducat et al., 2016; Vaiman & Miralles, 2016). Este estudio busca identificar los factores de transcripción que interactúen potencialmente con la región promotora de *STOX1* que permitan una mejor comprensión en su regulación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Preeclampsia

2.1.1 Definición y epidemiología

La preeclampsia (PE) fue definida en el 2013 por el Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia “como una presión arterial materna mayor o igual a 140/90 después de la semana 20 de gestación en una mujer con medidas de presión arterial previamente normales, acompañada de uno de los siguientes hallazgos: proteinuria \geq 300 mg en recolección de orina

de 24 horas, trombocitopenia conteo plaquetario <100.000 células/mm³, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, edema pulmonar o síntomas neurológicos” (Chen, Jaffe, & Karumanchi, 2014; Melchiorre, Sharma, & Thilaganathan, 2014). Dependiendo de la edad gestacional de inicio, esta enfermedad puede ser clasificada en PE temprana cuando se presenta antes de la semana 34 de gestación y PE tardía cuando se presenta después de la semana 34 de gestación. La primera se ha asociado a mayor morbilidad y mortalidad como consecuencia de la severidad de los síntomas (Park, Shim, & Cha, 2015).

La PE es una patología frecuente que afecta entre el 2% y el 8% de las mujeres gestantes en el mundo (Jeyabalan, 2013; Melchiorre et al., 2014). Esta enfermedad causa alrededor de 50.000 muertes maternas anuales a nivel mundial (Eiland et al., 2012) y es la segunda causa de mortalidad materna en Colombia después de las hemorragias obstétricas (SIVIGILA, 2013) Por estos motivos, la Organización Mundial de la Salud propuso como uno de los objetivos de desarrollo del milenio reducir la mortalidad materna en un 75% (Eiland et al., 2012). Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad neonatal en el mundo es la PE, entre el 15% al 20% de los partos pretermino y el 12% al 20% de las restricciones de crecimiento intrauterino son debidas a esta patología (Jeyabalan, 2013).

Los factores de riesgo asociados con PE están relacionados con condiciones maternas preexistentes que aumentan la probabilidad de disfunción cardiovascular o con factores directamente relacionados con el embarazo (Jeyabalan, 2013). Dentro de los factores de riesgo maternos para la PE se encuentran el síndrome anticuerpos antifosfolípidos, el lupus eritematoso sistémico, el antecedente de preeclampsia y los factores de riesgo clásicos para enfermedad cardiovascular como la enfermedad renal, la hipertensión arterial crónica, la diabetes mellitus y la obesidad (Powe, Levine, & Karumanchi, 2011; Uzan, Carbonnel, Piconne, Asmar, & Ayoubi, 2011).

Por otra parte, los factores de riesgo relacionados con características del embarazo son la nuliparidad y la gestación múltiple. Esta última ha sido asociada con el aumento de volumen placentario al igual que con las molas hidatiformes (Uzan et al., 2011).

2.1.2 Fisiopatología

La PE es una patología que ocurre únicamente en presencia de tejido placentario que remite luego del alumbramiento. Cambios estructurales y funcionales de la placenta han sido asociados con la PE (Cerdeira & Karumanchi, 2012). Las anomalías en el desarrollo vascular placentario causan isquemia e hipoxia generando la liberación de factores solubles que originan una disfunción endotelial, una exagerada respuesta inflamatoria materna y una activación de las vías de coagulación y del complemento. Estos cambios se manifiestan principalmente por hipertensión arterial, proteinuria y edema (Ali & Khalil, 2015; Craici, Wagner, Weissgerber, Grande, & Garovic, 2014; Jebbink et al., 2012; Park et al., 2015).

Durante la gestación se producen cambios hemodinámicos para suplir los requerimientos nutricionales y metabólicos de la madre y el feto. Entre ellos se encuentra el aumento del gasto cardíaco, el aumento del volumen sanguíneo en un 45% desde la semana sexta de gestación hasta la semana 32, la vasodilatación uterina para aumentar el flujo sanguíneo, la vasodilatación sistémica, la disminución de la resistencia vascular, la disminución de la presión sanguínea y el aumento de la masa celular de glóbulos rojos para reducir la viscosidad sanguínea y generar un estado de hemodilución fisiológico que evita la predisposición de eventos tromboembólicos (Ali & Khalil, 2015; Kanasaki & Kalluri, 2009; Myatt & Webster, 2009). La placenta es el órgano que permite el desarrollo fetal dentro de un ambiente materno seguro. Su formación, maduración y mantenimiento adecuados evita resultados obstétricos adversos como la PE y la restricción del crecimiento intrauterino (Cerdeira & Karumanchi, 2012).

El desarrollo de la placenta es un proceso altamente regulado e implica dos etapas, la primera es la formación de una red vascular de vellosidades corionicas de origen fetal y la segunda la remodelación de la vasculatura existente (Mutter & Karumanchi, 2008). El suministro sanguíneo de la placenta depende de las arterias espirales, las cuales son ramas de la arteria uterina (Carty, Delles, & Dominiczak, 2008). Durante la gestación y formación de la placenta, es necesario que se efectúe una remodelación de las arterias espirales maternas mediante un proceso denominado pseudovasculogenesis, el cual consiste en la migración e

invasión de las células del citotrofoblasto en el endotelio y la capa muscular de las arterias espirales con el objetivo de que se complete la transición del recubrimiento vascular de epitelio a endotelio (Ali & Khalil, 2015; Cerdeira & Karumanchi, 2012; Jebbink et al., 2012).

La invasión citotrofoblástica ocurre en dos etapas. La primera ocurre en la semana 10 a 12 de gestación en segmentos de las arterias espirales (invasión endovascular) mientras que la segunda ocurre en la semana 16 de gestación en los segmentos miometriales (invasión intersticial). Esta última etapa se encuentra afectada en pacientes con PE (Carty et al., 2008; Pennington, Schlitt, Jackson, Schulz, & Schust, 2012). La modificación de la pared vascular a un fenotipo endotelial es fundamental debido a que el endotelio cumple funciones importantes como el control del tono vascular y la regulación de funciones anticoagulantes, anti plaquetarias y la fibrinólisis (Palei, Spradley, Warrington, George, & Granger, 2013).

Luego de producirse la invasión celular se genera una sustitución de la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos generando vasos resistentes a las sustancias vasoactivas. El control del tono vascular sanguíneo es independiente a la presión sanguínea materna (Kanasaki & Kalluri, 2009). Durante este proceso hay expresión de caderinas, metaloproteasas e integrinas que permiten el cambio del fenotipo epitelial a un fenotipo endotelial. Los citotrofoblastos expresan en una fase inicial moléculas de adhesión características de las células epiteliales como como las integrinas $\alpha 6$, $\beta 4$ y $\beta 1$ y la caderina E. Durante la invasión, las moléculas de adhesión celular epitelial dejan de ser expresadas para expresar integrinas $\alpha 1 / \beta 1$ y $\alpha v / \beta 3$ durante la fase de pseudovasculogénesis (Ali & Khalil, 2015). La remodelación de las paredes arteriales maternas permite que los vasos sean de baja resistencia y alto flujo sanguíneo para proporcionar el volumen sanguíneo adecuado para el crecimiento fetal (Amaral, Cunningham, Cornelius, & LaMarca, 2015).

La placenta es un órgano altamente vascularizado que se encuentra formado por vasos sanguíneos maternos y fetales. El desarrollo vascular de este órgano ocurre en tres fases: la vasculogénesis, la angiogénesis ramificada y la angiogénesis no ramificada (Ali & Khalil, 2015; Cerdeira & Karumanchi, 2012). El desarrollo se inicia cuando el blastocito se separa formando una primera capa celular externa llamada trofoectodermo que origina a la

formación de células epiteliales especializadas de la placenta en el día sexto luego de la fecundación, la capa celular interna que da lugar a la formación del embrión (Eiland et al., 2012). Los trofoblastos son las células especializadas de la capa celular externa del blastocito (Roland et al., 2016). La invasión de los trofoblastos origina las vellosidades placentarias formadas por una capa interna de citotrofoblastos y una capa externa multinucleada, el sincitiotrofoblasto. Posteriormente, las células mesénquimales invaden las vellosidades dando origen a vasos sanguíneos placentarios y adicionalmente los macrófagos derivados de estas células mesénquimales expresan los factores angiogénicos necesarios para el desarrollo (Mutter & Karumanchi, 2008). La diferenciación y el crecimiento de las células trofoblásticas conduce a la maduración de las vellosidades placentarias hasta un estadio terciario, finalmente, a la formación del laberinto placentario donde tiene lugar el intercambio de oxígeno y de nutrientes entre la madre y el feto (Cerdeira & Karumanchi, 2012).

2.1.2.1 Disfunción endotelial

La disfunción endotelial es el evento fisiopatológico más importante asociado a la PE. Puede ser secundaria a una falla en la remodelación de las arterias espirales uterinas o a una disfunción vascular preexistente al embarazo como en mujeres con antecedentes de diabetes mellitus, obesidad o hipertensión arterial en quienes el embarazo actúa como un factor de estrés fisiológico que exacerba la disfunción endotelial existente (Craici et al., 2014).

Durante el embarazo de mujeres que padecen PE se ha evidenciado una alteración en los cambios cardiovasculares necesarios para el desarrollo de una adecuada gestación. Por ejemplo, se presenta una disminución del volumen plasmático que ocasiona hipoperfusión placentaria. La disminución del volumen plasmático se ha asociado a la reducción en la activación de la renina plasmática en pacientes con PE. Esta enzima es requerida como sensor de volumen en el eje renina angiotensina aldosterona (Kanasaki & Kalluri, 2009).

En el estudio anatomopatológico de la placenta de mujeres que padecen PE se han observado anomalías como infartos, trombosis, inflamación crónica y aterosclerosis (Powe et al., 2011). Muchos de estos cambios han sido asociados a una remodelación insuficiente de las arterias espirales uterinas como consecuencia de la invasión poco profunda de las células del

citotrofoblasto en el miometrio, lo que a su vez no permite que los vasos sanguíneos adquieran el fenotipo endotelial y persistan como vasos sanguíneos de alta resistencia con una capa de músculo liso vasoactivo y una lámina elástica. Los vasos sanguíneos tortuosos ocasionan un flujo sanguíneo disfuncional e hipoperfusión intermitente. Esta concentración fluctuante de oxígeno origina una alteración en el proceso oxidativo de lípidos y proteínas generando especies reactivas de oxígeno, las cuales son proinflamatorias (Grill et al., 2009; Jebbink et al., 2012; Staff et al., 2013). Adicionalmente, el estrés oxidativo produce hipoxia y finalmente causa apoptosis y necrosis de las células placentarias (Cerqueira & Karumanchi, 2012; Petla, Chikkala, Ratnakar, Kodati, & Sritharan, 2013). Estos procesos de muerte celular liberan factores al espacio intervilloso placentario y posteriormente a la circulación materna ocasionando disfunción endotelial generalizada secundaria al desequilibrio entre factores angiogénicos y antiangiogénicos (Kleinrouweler et al., 2013; Mutter & Karumanchi, 2008).

Además de la remodelación arterial insuficiente, en la PE se produce aterosclerosis vascular de las arterias espirales. Este fenómeno consiste en una necrosis fibrinoide de la pared vascular con la acumulación subendotelial de macrófagos llenos de lípidos e infiltración de linfocitos a nivel perivascular, similar a lo que se observa en la vasculitis presentada en enfermedades autoinmunes (Kanasaki & Kalluri, 2009). La aterosclerosis disminuye el flujo sanguíneo intervilloso placentario y predispone a trombosis local que puede originar una obstrucción completa ocasionando infartos placentarios (Staff et al., 2013).

La alteración en el endotelio glomerular del riñón se manifiesta como proteinuria en las pacientes con PE. La endoteliosis glomerular se caracteriza por un edema de las células endoteliales con oclusión del lumen capilar originando disminución de la filtración glomerular (Kanasaki & Kalluri, 2009). La afectación en la barrera de filtración glomerular y el aumento de la permeabilidad vascular ocasionan la pérdida de proteínas en la orina (Uzan et al., 2011).

En el proceso fisiopatológico de la disfunción endotelial han sido relacionados varios factores angiogénicos y antiangiogénicos que se encuentran alterados en pacientes con PE. (Hahn, Lapaire, & Than, 2015).

2.1.2.2. Proteínas relacionadas con disfunción endotelial

Las proteínas angiogénicas, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el factor de crecimiento placentario (Myatt & Webster) son reguladores del desarrollo vascular de la placenta normal y por lo tanto directamente relacionados en condiciones patológicas como la PE (Carty et al., 2008; Cerdeira & Karumanchi, 2012). La familia de proteínas VEGFs está formada por las proteínas VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PlGF. El factor de crecimiento placentario (Myatt & Webster) es producido en las células trofoblásticas y puede ser expresado en sus cuatro isoformas placentarias: PlGF-1, PlGF-2, PlGF-3 y PlGF-4. Estas proteínas angiogénicas tienen como función promover la sustitución, migración y diferenciación de las células endoteliales (Petla et al., 2013). Los receptores de esta familia de proteínas son los receptores tirosin quinasa localizados en la membrana de células endoteliales. Entre ellos se encuentra el receptor Flt-1 o también llamado VEGFR-1, su forma soluble sFlt-1 que carece de dominio transmembrana y el receptor KDR o también llamado VEGFR2. La expresión de las proteínas y sus receptores varían de acuerdo a la edad gestacional. La proteína VEGF y el receptor KDR disminuye su expresión a medida que progresa el embarazo, por el contrario PlGF y el receptor Flt-1 aumentan los niveles a medida que progresa el embarazo (Cerdeira & Karumanchi, 2012).

En condiciones patológicas de la placenta como la PE, se ha evidenciado aumento en la expresión del receptor soluble tirosina quinasa 1 sFlt-1 (Park et al., 2015). Este receptor que es una variante de splicing del receptor VEGF Flt-1, identificado por primera vez en cultivos de células endoteliales humanas y es producido en la placenta para posteriormente ser liberado a la circulación materna (Hawfield & Freedman, 2009). sFlt-1 actúa como un potente antagonista de los factores angiogénicos VEGF y PlGF, y evita la interacción con los receptores endógenos ocasionando la disminución en la expresión de estas proteínas (Ali &

Khalil, 2015; Carty et al., 2008). La disminución de VEGF y PlGF causa la disfunción endotelial y la vasoconstricción (Goel & Rana, 2013).

El factor angiogénico VEGF estimula la vía de relajación dependiente de óxido nítrico y GMPc generando un incremento en las concentraciones intracelulares de calcio. Esto promueve la unión de la calmodulina con la enzima óxido nítrico sintasa estimulando la producción de óxido nítrico. Por lo tanto la disminución de VEGF causa vasoconstricción secundaria a bajos niveles de óxido nítrico y prostaciclina (Ali & Khalil, 2015). Adicionalmente, la proteína VEGF es importante para el mantenimiento de las fenestraciones de las células endoteliales glomerulares y el mantenimiento de los podocitos, lo que puede asociarse a la disfunción renal presentada en la enfermedad (Ballermann, 2005; Maharaj, Saint-Geniez, Maldonado, & D'Amore, 2006). Anticuerpos monoclonales anti-VEGF fueron creados como terapia antitumoral con el fin de reducir la angiogénesis de tumores sólidos, sin embargo los pacientes que recibían esta terapia presentaban efectos adversos posteriores como proteinuria e hipertensión, un fenotipo similar a la PE (Hawfield & Freedman, 2009).

La hipoperfusión placentaria causa zonas de hipoxia en el sincitiotrofoblasto, las cuales son más frecuentemente encontradas en placentas de pacientes con PE. Por medio de estudios histopatológicos fueron identificadas como una fuente de producción de sFlt-1 (Naljayan & Karumanchi, 2013). Los niveles de sFlt-1 incrementan antes del inicio de los síntomas y se correlacionan con la severidad de la PE (Cerdeira & Karumanchi, 2012). La relación sFlt-1 / PlGF se encuentra elevada en mujeres con PE en el segundo trimestre del embarazo, por lo cual ha sido propuesto como un biomarcador temprano para esta enfermedad (Ali & Khalil, 2015). Modelos murinos con sobreexpresión del receptor sFlt-1 presentaron un fenotipo similar a la PE evidenciándose proteinuria, hipertensión arterial y endoteliosis glomerular (Maynard et al., 2003). Estos hallazgos mostraron la importancia de sFlt-1 en el desarrollo de la PE (Carty et al., 2008).

Dentro de las proteínas antiangiogénicas se encuentra la endoglina soluble (sEng), una proteína relacionada con la disfunción endotelial. Esta proteína es una variante de la glicoproteína endoglina (Eng) que carece de dominio extracelular, se encuentra a nivel sérico

y es expresada en el sincitiotrofoblasto y las células endoteliales (Mutter & Karumanchi, 2008). La endogлина actúa como un receptor para el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), específicamente TGF- β 1 y TGF- β 3, modulando la señalización en la angiogénesis y la regulación del tono vascular. Por el contrario, la forma soluble (sEng) interfiere en la unión del TGF- β con su receptor afectando la vía angiogénica, la producción de óxido nítrico y por lo tanto la vasodilatación (Petla et al., 2013). Estudios *in vitro* han evidenciado que la sEng afecta la formación de capilares en las células endoteliales (Park et al., 2015). Un microarreglo de ARN de tejido placentario de mujeres con PE, permitió identificar niveles de sEng elevados en comparación con pacientes normotensas (Mutter & Karumanchi, 2008). Los niveles de esta proteína se han encontrado incrementados antes de la aparición de los signos y los síntomas clínicos de PE alrededor de la 9 a 11 semana de gestación (Grill et al., 2009). El incremento de los niveles de la proteína son proporcionales a la gravedad de los síntomas (Hawfield & Freedman, 2009). Sin embargo, los niveles elevados de esta proteína no son específicos para PE, pues otros trastornos del embarazo como la restricción del crecimiento intrauterino presentan niveles elevados de sEng limitando la especificidad de este marcador (Petla et al., 2013)

Otra proteína relacionada en la fisiopatología de PE es la proteína placentaria 13 (PP13). Hace parte de la familia de proteínas galectinas y es producida exclusivamente en la placenta en el proceso de diferenciación del sincitiotrofoblasto. Esta proteína regula la respuesta inmune innata y adaptativa generando tolerancia inmunológica durante el proceso de invasión trofoblástica y en la conversión de arterias espirales (Hahn et al., 2015). PP13 posee un dominio de unión a las proteínas Anexina II y Actina β , proteínas que tienen funciones en los procesos de placentación y remodelación de las arterias uterinas maternas. La proteína PP13 interfiere en la liberación de ácidos grasos y la síntesis de prostaciclina, por lo que se encuentra relacionada con el equilibrio del tono vascular (Hawfield & Freedman, 2009). Durante la gestación, los niveles de la PP13 se incrementan gradualmente. Sin embargo en mujeres que van a desarrollar PE se han identificado niveles de proteína bajos (Carty et al., 2008; Petla et al., 2013). La combinación de los niveles séricos de la PP13 en el primer

trimestre con el índice pulsátil de la arteria uterina en la ecografía doopler ha sido propuesto como un predictor de PE temprano (Nicolaidis et al., 2006).

La proteína NODAL fue identificada en estudios de mapeo posicional, la proteína pertenece a la familia de moléculas de señalización TGF- β la cual actúa en el desarrollo embrionario temprano a través de la formación del mesodermo y el mantenimiento de células precursoras placentarias (Vaiman & Miralles, 2016). El gen fue también secuenciado en las familias holandesas en donde se identificó un SNP de *STOX1* y se localizó la variante p.His165Arg presente en las madres con PE (Thulluru et al., 2013). En algunos se evidenció la cosegregación con la variante de *STOX1* (Vaiman & Miralles, 2016)

Por último la PAPP-A (proteína plasmática A asociada al embarazo), es una proteasa producida por el trofoblasto placentario y actúa escindiendo el factor de crecimiento similar a la insulina, una proteína importante para el crecimiento placentario y fetal (Park et al., 2015). Sus niveles se han encontrado reducidos en PE de inicio temprano lo cual refleja una placentación alterada. Sin embargo en la enfermedad de presentación tardía sus niveles no se modifican (Petla et al., 2013) y los niveles séricos de PAPP-A no son específicos para la PE. La PAPP-A también puede encontrarse disminuida en otras patologías relacionadas con el embarazo incluso ha sido utilizado como marcador potencial para el Síndrome Down (Carty et al., 2008).

Existen otras proteínas inflamatorias que se encuentran relacionadas con disfunción la endotelial. Durante la PE se produce un aumento en la producción y la liberación de las citoquinas TNF- α , IL-6 y IL-8. El TNF- α disminuye la vasodilatación inducida por acetilcolina en las células endoteliales e induce daño oxidativo por medio de la alteración del flujo de electrones a través de la mitocondria generando la liberación de especies reactivas de oxígeno ocasionando, daño en las células endoteliales (Haram, Mortensen, & Nagy, 2014).

2.1.3 Etiología de la PE

A pesar de que la PE es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materno fetal, es considerada un trastorno complejo del embarazo, debido a que su etiología no es

completamente conocida (E. M. George, 2014). El origen idiopático de la PE no permite el desarrollo de medidas preventivas y terapéuticas eficaces, actualmente el único tratamiento efectivo es el parto (Ali & Khalil, 2015). No obstante, en los últimos años se han intensificado las investigaciones acerca de la disfunción molecular subyacente a la PE y varias teorías han sido propuestas como causales de la enfermedad (E. M. George, 2014; Ramma & Ahmed, 2011). Entre ellas, específicamente relacionada con la disfunción endotelial encontramos: la isquemia placentaria secundaria al desequilibrio en los factores angiogénicos, la mala adaptación en la respuesta inmune innata y adaptativa. Este aspecto ha sido relacionado con el mayor riesgo que presentan las mujeres nulíparas a desarrollar PE, debido a que no tienen el tiempo suficiente para desarrollar una tolerancia inmunológica a los antígenos paternos (Lynch & Salmon, 2010). La mala adaptación inmunológica causa una invasión poco profunda de las arterias espirales uterinas por las células citotrofoblásticas asociado a una disfunción de las células endoteliales, mediado por una mayor liberación decidual de citoquinas y enzimas proteolíticas (Dekker & Sibai, 1998). Otras de las teorías postuladas son: el estrés oxidativo con modificación en las lipoproteínas de baja densidad, la respuesta inflamatoria materna anormal y los factores genéticos (Dekker & Sibai, 1998; E. M. George, 2014).

Todas las teorías que han sido propuestas en la etiología de la PE convergen en la hipoperfusión placentaria y el daño endotelial. La integridad y la función normal de la barrera placentaria dependen de un control estricto de la proliferación celular del trofoblasto y de la circulación materna (Roland et al., 2016).

2.1.4 Factores genéticos de la PE

Los aspectos genéticos relacionados con la PE fueron estudiados desde el reconocimiento de casos de la enfermedad presentes en una misma familia (P. J. Williams & F. Broughton Pipkin, 2011). Estudios epidemiológicos han demostrado que la PE tiene una predisposición familiar, la cual varía según las condiciones geográficas y raciales (Valenzuela et al., 2012). En comparación con la población general, las mujeres con un familiar de primer grado afectado por PE tienen cinco veces más riesgo de desarrollar la enfermedad y mujeres con un familiar en segundo grado afectado por PE tienen dos veces más riesgo de desarrollar la

enfermedad (Graves, 1998; Salonen Ros, Lichtenstein, Lipworth, & Cnattingius, 2000). La PE es una enfermedad compleja, en la cual variantes genéticas localizadas en diferentes loci contribuyen colectivamente a la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad. Además, la asociación de factores ambientales como el peso, la edad, el tabaquismo, el alcohol entre otros determinan un predisposición a la enfermedad (P. J. Williams & F. Broughton Pipkin, 2011).

Durante el desarrollo de la placenta se requiere la interacción entre el genotipo materno y el genotipo fetal. Este último se encuentra constituido por genes maternos y paternos (Petla et al., 2013). Los genes maternos y fetales pueden tener efectos independientes o interactivos sobre el riesgo de desarrollar enfermedades obstétricas (P. J. Williams & F. Broughton Pipkin, 2011). Las alteraciones en la expresión de los genes necesarios para el proceso de placentación y el desarrollo normal del embrión resultante de la interacción de los genotipos, causan resultados obstétricos adversos como la PE (Petla et al., 2013). Por esta razón, surge la teoría de la divergencia genética relacionada con la etiología de la PE. De acuerdo con esta teoría, los factores fetales y placentarios actúan para incrementar el flujo sanguíneo hacia el feto. Por el contrario, los factores maternos actúan disminuyendo la presión arterial de manera que el suministro de sangre materna no se vea afectado (Ali & Khalil, 2015). Durante la invasión del trofoblasto, el feto tiene acceso directo al flujo sanguíneo materno, por lo tanto no es posible reducir el contenido de nutrientes que llegan a la placenta sin afectar el suministro de nutrientes a sus propios tejidos. Adicionalmente, el volumen sanguíneo placentario es independiente del control vascular materno debido a los factores angiogénicos y hormonales locales (Ali & Khalil, 2015; P. J. Williams & F. Broughton Pipkin, 2011). Por lo tanto, en el embarazo normal debe existir un equilibrio entre los factores fetales que aumentan la presión arterial y los factores maternos que la disminuyen (Petla et al., 2013).

La contribución del genotipo fetal al desarrollo de la enfermedad está directamente relacionado con la función central de la placenta en la patogénesis de la PE. Los casos que han sido reportados de PE severa asociado a mola hidatiforme, en donde el origen genético es totalmente paterno confirman la contribución fetal de genes heredados paternalmente en el desarrollo de la enfermedad. Igualmente, estudios epidemiológicos han mostrado mayor

incidencia de casos de PE en embarazos de padres que nacieron de embarazos preeclámpicos (Paula J. Williams & Fiona Broughton Pipkin, 2011). Actualmente, se encuentra en marcha el gran estudio GOPEC (estudio genético de preeclampsia en Gran Bretaña) que está recopilando información genómica de 1.000 mujeres con preeclampsia, junto con los padres y el niño para explorar las contribuciones maternas y fetales a la PE (Wang, Rana, & Karumanchi, 2009).

Una de las aproximaciones genéticas es el estudio de gen candidato, el cual consiste en seleccionar un gen a partir de conocimientos biológicos relacionados con la fisiopatología de la PE, por medio de un diseño de casos y controles comparar las frecuencias alélicas de variantes genéticas entre las mujeres con PE y las mujeres gestantes sanas (Kleinrouweler et al., 2013; Paula J. Williams & Fiona Broughton Pipkin, 2011). Los genes candidato estudiados en PE pertenecen a vías biológicas como: la resistencia vascular, el sistema inmune, la coagulación, la fibrinólisis, el sistema renina angiotensina y las vías de señalización celular e inflamación. En el año 2012, se encontraron 7 variantes genéticas en las proteínas ACE (enzima convertidora de angiotensina), CTLA4 (proteína asociada a linfocitos T citotóxicos), Factor II de la coagulación, Factor V de la coagulación, LPL (lipoproteína lipasa) y SERPINE 1 (inhibidor de la serina peptidasa) (Park et al., 2015). Sin embargo, los estudios de gen candidato en una enfermedad compleja como la PE han mostrado resultados inconsistentes y no se ha identificado ningún gen universalmente aceptado debido a que es un fenotipo multigénico (Paula J. Williams & Fiona Broughton Pipkin, 2011).

La agrupación familiar de casos de PE permite realizar el análisis de ligamiento de todo el genoma, el cual es ideal para identificar loci de susceptibilidad y mapear variantes relacionadas con el fenotipo. Sin embargo, estos estudios requieren tamaños de muestra importantes para lograr probabilidades estadísticamente significativas. En la PE el mayor tamaño de muestra utilizado en análisis de ligamiento para identificar loci de susceptibilidad fue de 343 mujeres (Jebbink et al., 2012). Se identificaron loci en los cromosomas 2p13, 2q, 3p, 4q, 9, 10q, 11q23–24, 12q, 15q, 18 y 22q. Algunos de los genes asociados en PE fueron *ACVR2A*, *STOX1*, *VEGF*, el factor de necrosis tumoral α y la interleucina 10 (*IL - 10*) (Wiley

et al.). Entre ellos *ACVR2A*, localizado en el cromosoma 2q22, y *STOX1* localizado en el cromosoma 10q22 son los genes más estudiados (Ali & Khalil, 2015). En el año 2001 un estudio de 38 familias holandesas con PE, identificó una región crítica en el locus 10q22 donde se localiza el gen *STOX1* y se identificó una variante (p.Tyr153His) la cual se segregaba en siete de las ocho familias estudiadas (Jebbink et al., 2012).

Otra aproximación para estudiar la contribución de factores genéticos en la PE es el estudio de gemelos monocigotos. Este tipo de estudio permite diferenciar el componente ambiental y el componente genético en la presentación de un rasgo (Jebbink et al., 2012). Los estudios iniciales realizados en PE mostraron resultados discordantes en gemelas monocigotas, atribuyendo una heredabilidad de genes maternos baja. Sin embargo, estos estudios tenían un tamaño de muestra bajo lo cual disminuye la validez externa del estudio (Paula J. Williams & Fiona Broughton Pipkin, 2011). Posteriormente, se realizaron dos grandes estudios en gemelos, uno de ellos realizado en familias suecas con disponibilidad de grandes registros de individuos y registros multigeneración de 701.488 embarazos. El estudio informó que el 35% de la varianza era atribuible a efectos genéticos maternos, 20% a efectos genéticos fetales y menos del 1% a factores ambientales (Jebbink et al., 2012).

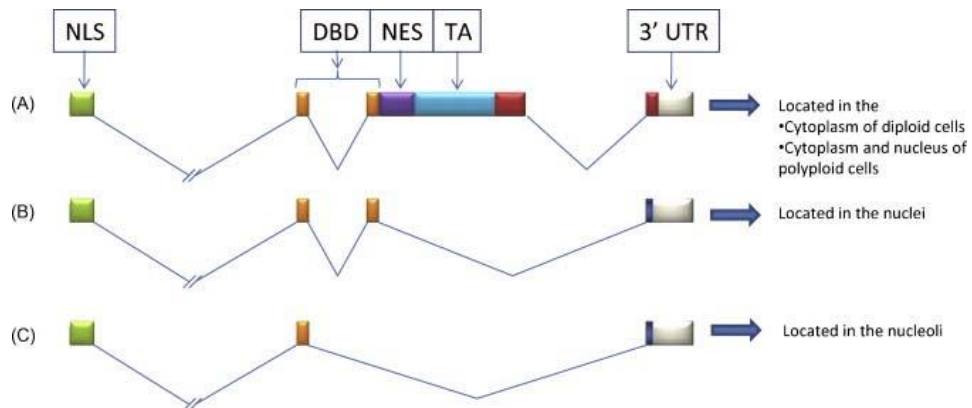
En las enfermedades complejas como la PE, la modificación en la expresión de ciertos genes depende de la interacción con otros genes. Este fenómeno es conocido como epistasis. Las interacciones genéticas son esenciales para comprender los fundamentos moleculares de la PE (P. J. Williams & F. Broughton Pipkin, 2011).

2.1.4.1 Generalidades de *STOX1*

STOX1 está localizado en la región cromosómica 10q22.1, codifica para el factor de transcripción Storkhead Box 1 (STOX1). Esta proteína se encuentra estructural y funcionalmente relacionada con la familia proteica FOX, cuya regulación se realiza a través de la fosforilación de la vía PI3K-Akt. En estado fosforilado la proteína STOX1 no ingresa al núcleo y es degradada por vía de ubiquitinización. Por el contrario, cuando no hay fosforilación, STOX1 funciona como un factor de transcripción en el núcleo celular (Marie van Dijk & Oudejans, 2011; M. van Dijk, van Bezu, et al., 2010).

Este factor de transcripción ha sido relacionado con diferentes vías biológicas como la inflamación, el ciclo celular y el estrés oxidativo (Vaiman & Miralles, 2016; M. van Dijk, Drewlo, & Oudejans, 2010). Tres isoformas de la proteína han sido descritas, las cuales son expresadas en estadios tempranos del desarrollo del tejido placentario: STOX1A, STOX1B y STOX1C. Dos de ellas han sido las más estudiadas: STOX1A y STOX1B (M. van Dijk, van Bezu, et al., 2010). La proteína STOX1A es la isoforma más larga con 987 aminoácidos. Posee un dominio de unión al DNA, un dominio alfa hélice, un dominio de localización celular y una señal de exportación nuclear por lo que puede estar localizada a nivel citoplasmático y nuclear. La isoforma STOX1B, con 227 aminoácidos, carece de dominio de exportación nuclear por lo que se encuentra localizada solo en el núcleo celular. La isoforma STOX1C tiene 169 aminoácidos, carece de dominio de exportación nuclear y parte del dominio alfa hélice, Figura 1 (M. van Dijk et al., 2005). Las proteínas STOX1A y STOX1B compiten por el mismo sitio de unión. Sin embargo, la isoforma STOX1A es capaz de activar la expresión génica puesto que contiene todos los dominios reguladores necesarios para su funcionamiento (Vaiman & Miralles, 2016; Marie van Dijk & Oudejans, 2011).

Figura 1. Representación esquemática de las isoformas de *STOX1*



El gen *STOX1* codifica tres isoformas (A) isoforma A, (B) isoforma B, (C) isoforma C. NLS señal de localización nuclear, DBD dominio de unión DNA, NES señal de exportación nuclear, TA dominio de transactivación (V. Rigour et al., 2009).

Estudios moleculares realizados con las construcciones plasmídicas de las tres isoformas de STOX1 fueron transfectadas en la línea celular SGHPL-5 y por medio análisis cuantitativos

de RT-PCR y Western blot se determinó una mayor expresión de la isoforma STOX1A (M. van Dijk, van Bezu, et al., 2010). Si bien la isoforma STOX1B se ha planteado la hipótesis de que actúa bloqueando la vía de diferenciación del sincitiotrofoblasto debido a que no posee señal de exportación nuclear. El tejido placentario depende de un adecuado diferenciamiento de los citotrofoblastos (células pluripotenciales de la placenta) en trofoblastos vellosos, trofoblastos extravellosos y sincitiotrofoblastos. Si este proceso no es adecuado el desarrollo anormal de la placenta ocasiona resultados obstétricos adversos como la PE (V. Rigourd et al., 2009)

STOX1 fue directamente asociado con la etiología de la PE en el año 2005 por medio de un estudio de mapeo posicional. El estudio originalmente se efectuó con 24 familias holandesas con PE y finalmente a 8 familias, las cuales fueron analizadas durante 3 generaciones. Por medio de marcadores genéticos microsatélites se identificó una región crítica de 444 Kb en la región cromosómica 10q21. Luego de la identificación de la región candidata fueron seleccionados 17 genes que fueron secuenciados. En uno de ellos se encontraron 5 mutaciones missense en hermanas afectadas por PE (M. van Dijk et al., 2005). De esta manera, se identificó el gen *STOX1* y la variante de susceptibilidad p.Tyr153His localizada en el dominio de unión de la proteína al DNA en tres generaciones de familias con PE (Eric M. George & Bidwell, 2013; Haram et al., 2014; Vaiman & Miralles, 2016; M. van Dijk, Drewlo, et al., 2010). La variante identificada en este estudio se encuentra localizada en el dominio estructural alfa hélice similar a la familia de proteínas FOX. En la posición 153 tiene una tirosina altamente conservada (Guenther & Garriga, 1996; M. van Dijk et al., 2005).

Luego de ser identificado *STOX1* como candidato para la PE en familias holandesas en el año 2007, se realizó un estudio en población finlandesa con el objetivo de identificar nuevas variantes en esta proteína. Tres diferentes enfoques fueron utilizados en esta población. Primero se tomó una cohorte de madres con PE y controles pareados para analizar marcadores haplotípicos en el gen *STOX1*. Segundo, se realizó un análisis de ligamiento para el cromosoma 10 y finalmente se evaluó la expresión de *STOX1* en el tejido placentario de embarazos PE y en placentas sin complicaciones. Los resultados no fueron congruentes con los obtenidos en la población holandesa ya que no se encontraron evidencias que apoyaran a

STOX1 como candidato para la PE en esta población (Kivinen et al., 2007). Otro estudio poblacional fue realizado en 157 mujeres holandesas con PE o restricción de crecimiento intrauterino y en 157 controles de la misma población. Sin embargo no fueron identificadas diferencias significativas en las frecuencias alélicas de p.Tyr153His de *STOX1* entre casos y controles, por lo que los resultados no fueron congruentes con el primer estudio (Berends et al., 2007).

Luego de la descripción del alelo de susceptibilidad en el gen *STOX1*, varios estudios han sido efectuados en relación con la metilación diferencial de este gen. El primero fue realizado sobre región promotora del gen *STOX1* donde se encuentran las islas CpG pero no fue posible identificar una metilación diferencial (Marie van Dijk & Oudejans, 2011). En el año 2010 se identificó una región diferencialmente metilada en el intrón 1 que condujo a una expresión reducida de *STOX1*. Líneas celulares de trofoblasto extraveloso y tejido placentario mostraron un mayor porcentaje de metilación en presencia de un estado homocigoto para el alelo de susceptibilidad p.Tyr153His (M. van Dijk, Drewlo, et al., 2010).

En el año 2009 se realizó una comparación de los niveles de ARNm de *STOX1* en tejidos de placentas que desarrollaron PE temprana y en tejidos placentarios de gestaciones normales, obteniendo niveles 2.1 veces más elevados en placentas con PE. Esto sugirió que la desregularización en la expresión de *STOX1* se presentaba de forma temprana en el desarrollo de la enfermedad (Founds et al., 2009; V. Rigourd et al., 2009).

Varios modelos de sobreexpresión de *STOX1* en líneas celulares y modelos animales han sido desarrollados. Las líneas celulares de coriocarcinoma son muy similares a las células trofoblásticas, por lo que han sido útiles para el estudio de enfermedades obstétricas dependientes de tejido placentario (Virginie Rigourd et al., 2008). Inicialmente, se crearon nueve líneas celulares JEG-3 de coriocarcinoma con sobreexpresión de la isoforma *STOX1A* (V. Rigourd et al., 2009), las cuales mostraron un perfil transcripcional similar al presentado en el tejido placentario de pacientes con PE (Doridot et al., 2013). La sobreexpresión de *STOX1A* se asoció cambios transcriptómicos en diferentes vías biológicas. Se evidenció una regulación negativa del factor de transcripción *GCM1*, el cual está relacionado con la

diferenciación del trofoblasto y el sincitotrofoblasto en el desarrollo placentario (V. Rigourd et al., 2009). Los genes que se identificaron con una regulación positiva fueron proteínas de familias de dedos de zinc, la endoglina, la sincitina y la interleucina 12. Este último se encuentra altamente expresado en el tejido placentario durante la gestación y más específicamente relacionado con el proceso de implantación (Virginie Rigourd et al., 2008). Las células HUVEC también han sido utilizadas para estudiar la PE. Estas células fueron expuestas a plasma de pacientes afectadas con PE y de pacientes con gestación normal con el objetivo de realizar un estudio transcriptómico. Por medio de aproximaciones bioinformáticas se identificaron diferencias transcriptómicas en vías relacionadas con la respuesta inflamatoria crónica, la coagulación y la matriz extracelular (Ducat et al., 2016).

En cuanto a los modelos animales, se creó un ratón transgénico con sobreexpresión del gen *STOX1* humano, para posteriormente ser cruzado con hembras Wild Type. Durante la gestación, las hembras presentaron síntomas similares a la PE humana como un incremento gradual de la presión arterial hasta la mitad de la gestación y una disminución a valores normales después del parto (Eric M. George & Bidwell, 2013). También presentaron proteinuria, alteración en la histología placentaria e incremento en los niveles de factores antiangiogénicos como la Endoglina y el sFlt1. Este modelo ha sido muy útil para obtener mayor conocimiento acerca de la fisiopatología de la enfermedad, realizar enfoques terapéuticos, identificar marcadores diagnósticos y evaluar efectos a largo plazo. Por ejemplo, este modelo murino fue utilizado para evaluar la efectividad del uso de la aspirina en el tratamiento de la PE. La administración de dosis bajas al inicio de la gestación demostró ser eficiente para prevenir el síndrome materno, con atenuación de los niveles de hipertensión, disminución de depósitos de fibrina en el riñón y la mejoría de la supervivencia fetal (Doridot et al., 2013). Por lo tanto, se sugirió que la administración de aspirina podría actuar en ciertas vías moleculares de la PE reguladas por *STOX1* (Eric M. George & Bidwell, 2013). Finalmente, el estudio más reciente utilizó el modelo murino con sobreexpresión de *STOX* con el objetivo evaluar la disfunción endotelial y cardiovascular causada por la PE. El análisis transcriptómico de las células endoteliales de ratones con embarazos normales o con embriones transgénicos evidenció diferencias significativas en la expresión de genes en redes

involucradas en vías celulares como la inflamación, el ciclo celular y la hipertrofia cardiaca. Adicionalmente, al análisis transcriptómico, la hipertrofia cardiaca fue corroborada a través de la comprobación del aumento del peso cardiaco y estudios histológicos de tejido miocárdico que mostraron fibrosis, núcleos celulares dilatados y desorganización de las fibras musculares (Ducat et al., 2016).

2.1.4.2 STOX1 regula diferentes procesos biológicos

STOX1 regula diferentes vías biológicas como la coagulación, el estrés oxidativo, el metabolismo de los ácidos grasos, la inflamación, la angiogénesis, la apoptosis y el ciclo celular (Vaiman & Miralles, 2016). La relación del factor de transcripción STOX1 con el ciclo celular fue identificada en líneas celulares de neuroblastoma, donde se evidenció una regulación positiva en la expresión de las proteínas Ciclina B1 y Ciclina A2 involucradas en el proceso de mitosis celular (van Abel et al., 2012). Por otra parte, un modelo murino indicó que la proliferación de las células epiteliales del oído interno estaba regulada por el factor de transcripción *Stox1* a través de las proteínas Ciclina A, Ciclina E y la fosforilación de la vía Akt (Vaiman & Miralles, 2016).

El estrés oxidativo ha sido correlacionado con la fisiopatología de la PE. STOX1 ha sido descrito como un regulador en el equilibrio del óxido nítrico y homeostasis mitocondrial (Virginie Rigourd et al., 2008). Un análisis transcriptómico de líneas celulares con sobreexpresión de *STOX1* y en tejido placentario de pacientes con PE, comparado con placentas normales, permitió identificar un aumento en la función mitocondrial, alteraciones en el metabolismo de las sustancias reactivas al oxígeno y nitrógeno en las muestras de pacientes con PE y en la línea celular con sobreexpresión de *STOX1*. Las placentas transgénicas mostraron niveles elevados de proteínas nitradas y bajos niveles de proteínas carboniladas. Este desequilibrio generó una alteración en la producción de óxido nítrico relacionada con el aumento de la presión arterial en la PE (Doridot et al., 2014). La sobreexpresión de *STOX1A* en la línea celular de coriocarcinoma JEG-3, mostró por medio de análisis transcriptómico la sobreexpresión de 24 genes involucrados en la vía del estrés oxidativo mitocondrial. Entre ellos se encuentran tres factores pro oxidantes no evidenciados

en líneas celulares con sobreexpresión de otras isoformas de *STOX1* (Vaiman & Miralles, 2016).

La apoptosis o muerte celular programada y la inflamación son dos procesos biológicos relacionados con la aparición de la PE. La sobreexpresión de *STOX1* indujo la expresión del ligando de la proteína del factor de necrosis tumoral TRAIL (Vaiman & Miralles, 2016). Esta proteína transmembrana, al ser clivada, genera la forma soluble sTRAIL (Wiley et al., 1995). sTRAIL es expresada en el tejido placentario durante la diferenciación del sincitotrofoblasto e induce la vía de señalización apoptótica dependiente de caspasas en las vellosidades placentarias ocasionado trombocitopenia, alteración en la migración celular e hipoxia placentaria (Lonergan et al., 2003). Además, la forma soluble de la proteína, libera factores endoteliales procoagulantes inducidos por trombina estimulando las vías celulares inflamatorias relacionadas con el proceso de la PE (Simoncini et al., 2009). Otra proteína relacionada con el factor de necrosis tumoral es la proteína TWEAK, relacionada con la proliferación de las células endoteliales y vasculares al encontrarse unida a su ligando. Sin embargo, su forma soluble se encuentra relacionada con vías pro inflamatorias paracrinas y autocrinas, en las células del citotrofoblastos, las células vasculares endoteliales y las células tubulares renales relacionadas con el contexto fisiopatológico de la PE (Vaiman & Miralles, 2016).

Los leucotrienos son los mediadores proinflamatorios que por medio del ácido araquidónico reclutan y activan células inflamatorias (Biagi et al., 1990). El modelo celular con sobreexpresión de *STOX1* identificó una regulación positiva en los genes *PLA2G6*, *ALOX5* y *LTA4* implicados en la biosíntesis de leucotrienos (Vaiman & Miralles, 2016) .

Finalmente, en cuanto al desarrollo placentario, *STOX1* también ha sido asociado con proteínas cuyas funciones son importantes en el desarrollo embrionario y placentario que permiten un adecuado desarrollo de la gestación. La proteína de adhesión celular α -T-Catenina se encuentra altamente expresada en PE generando alteración en la invasión trofoblástica, específicamente en el proceso de transición epitelio-mesénquimal (M. van Dijk, van Bezu, et al., 2010). Estudios posteriores identificaron que la proteína α -T-Catenina

estaba altamente inducida por la mutación p.Tyr153His localizada en el dominio de unión al ADN de STOX1 (Eric M. George & Bidwell, 2013). STOX1 se une al promotor CTNNA3 ocasionando un aumento en la expresión de la proteína de adhesión célula célula α -T-Catenina I llevando a un crecimiento reducido de las células trofoblásticas (Marie van Dijk & Oudejans, 2011; M. van Dijk, van Bezu, et al., 2010).

Por último, es importante señalar que numerosas publicaciones del grupo fundamentan y complementan los abordajes teóricos y experimentales citados en el trabajo presentado (Caburet et al., 2012; Carlosama et al., 2017; Castro et al., 2013; Diggle et al., 2012; Ducat et al., 2016; Fonseca, Garzon, et al., 2012; Fonseca et al., 2014; Fonseca et al., 2015; Fonseca, Prada, et al., 2012; Fonseca et al., 2013; Forero et al., 2016; L'Hote et al., 2010; Laissue, 2015, 2018; Laissue, Burgio, et al., 2009; Laissue, L'Hote, Serres, & Vaiman, 2009; Laissue, Lakhali, et al., 2009; Laissue et al., 2016; Laissue, Restrepo, & Ortiz, 2017; Lakhali et al., 2010; Lakhali, Laissue, Elghezal, & Fellous, 2008; Mateus et al., 2017; Mitropoulos et al., 2015; Nino et al., 2013; Ojeda et al., 2011; Ortega-Recalde, Beltran, et al., 2015; Ortega-Recalde et al., 2013; Ortega-Recalde, Moreno, et al., 2015; Ortega-Recalde, Silgado, Fetiva, Fonseca, & Laissue, 2016; Ortega-Recalde et al., 2014; Patino et al., 2014; Patino, Beau, et al., 2017; Patino, Silgado, & Laissue, 2017; Patino, Walton, et al., 2017; Prada & Laissue, 2014; Quintero-Ronderos, Mercier, Fukuda, et al., 2017; Quintero-Ronderos, Mercier, Gris, et al., 2017; Valero-Rubio, Jimenez, Fonseca, Payan-Gomez, & Laissue, 2018; Vatin et al., 2014)

3. PREGUNTA CIENTÍFICA

¿Cuáles son los factores de transcripción que se fijan al promotor *STOX1* participando en su regulación?

4. OBJETIVOS DE LA INVESTACIÓN

4.1 Objetivo general

Identificar factores de transcripción reguladores directos de *STOX1* que permita una mejor comprensión de las bases genéticas de la PE.

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar factores de transcripción que potencialmente interactúan con el promotor de *STOX1* en el ensayo de monohíbrido en levadura.
2. Predecir por aproximaciones *in-silico* potenciales sitios de unión a factores de transcripción en la región promotora de *STOX1*.
3. Identificar variantes en la región promotora de *STOX1* que podría afectar sitios de unión a factores de transcripción en una muestra de pacientes francesas afectadas con PE.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Secuenciación del promotor de *STOX1* en pacientes francesas afectadas con preeclampsia

5.1.1 Población

La población a estudio fue una muestra de 110 mujeres de origen francés con diagnóstico de PE. Los criterios de inclusión utilizados fueron la definición clínicas y paraclínicas de la PE: presión arterial materna mayor o igual a 140/90 después de la semana 20 de gestación en una mujer con medidas de tensión arterial previamente normales, acompañada de uno de los siguientes hallazgos: proteinuria ≥ 300 mg en recolección de orina de 24 horas, trombocitopenia conteo plaquetario <100.000 células/mm³, insuficiencia renal, insuficiencia hepática, edema pulmonar o síntomas neurológicos.

5.1.2 Amplificación por PCR de la región promotora de *STOX1*

Se realizó la extracción de ADN genómico de las mujeres participantes en el estudio por medio de precipitación salina. Para amplificar una región del promotor de *STOX1* de 830pb comprendida entre -1pb y -830pb (ENST00000298596.10), se diseñaron secuencias de oligonucleótidos con el programa primer 3 que incluía en sus extremos 5' y 3' secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción KpnI y HindIII para ser utilizados también en futuras construcciones plasmídicas (Tabla 1).

Tabla 1 Primers de amplificación del promotor de *STOX1*

Región	Secuencia del primer	
Promotor de <i>STOX1</i> (830 pb)	Forward Hprom_stox1-KpnI-4F	5'CGGGGTACCgcatgcatgaaagggtccttag 3'
	Reverse Hprom+62_stox1-HindIII	5'CCCAAGCTTCCGCCGCCTTCTGCGC CTCC 3'

El fragmento del promotor fue amplificado mediante la reacción PCR. La mezcla utilizada tenía un volumen final de 25 μ l. Esta mezcla contenía 100ng de ADN, 12.5 μ l de Master Mix

(Promega) y 0.8 μ M de cada primer. Las especificaciones utilizadas para la reacción de PCR están descritas en la Tabla 2.

Tabla 2 Programa de PCR para el fragmento del promotor de *STOX1*

Programa termociclador		Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Número de ciclos	30 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	64°C	40 segundos
Elongación	72°C	50 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

La amplificación fue comprobada en un gel de agarosa al 1% por electroforesis de en buffer TBE 1X. Se realizó la comparación del tamaño del fragmento con el patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen).

Los productos de PCR del fragmento del promotor de *STOX1* de las participantes fueron enviados a secuenciación utilizando los siguientes primers incluidos en la Tabla 3.

Tabla 3 Primers de secuenciación promotor *STOX1*

Secuencia del primer	
Hprom_stox1-KpnI-4F	5'CGGGGTACCgcatggtgaaagggccttag 3'
Hprom+62_stox1-HindIII	5'CCCAAGCTTCCGCCGCTTCTGCGCCTCC 3'
hSTOX1prom-585R	5' cctaagctagttgtttc 3'

5.2 Análisis *in-silico* del promotor de *STOX1*

5.2.1 Identificación de sitios potenciales de unión a factores de transcripción en la región promotora de *STOX1*

El análisis de la región promotora de *STOX1* comprendida entre -1pb y -830pb fue realizado por medio del software Genomatix y la función MatInspector (www.genomatix.de), con el objetivo de identificar sitios potenciales de unión de factores de transcripción (K. Cartharius et al.). Este software identifica posibles TFBS en una secuencia de nucleótidos a través de una librería de 634 matrices las cuales se encuentran organizadas de acuerdo a su similitud y

origen en 234 familias (K. Cartharius et al., 2005) . MatInspector utiliza el índice de similitud entre la secuencia central altamente conservada o core de la matriz (generalmente 4 nucleótidos) y la secuencia de nucleótidos del promotor. Un índice de similitud de 1 indica una unión perfecta a la matriz. Los potenciales sitios de unión a factores de transcripción para el análisis del promotor *STOX1* fueron seleccionados con un índice de similitud de 0.75.

5.3 Análisis del promotor de *STOX1* a través del ensayo monohíbrido en levaduras

5.3.1 Amplificación por PCR de la región promotora de *STOX1*

Se realizó la amplificación a partir de DNA genómico de la región promotora de *STOX1* comprendida entre -830pb y +76pb (906pb) (ENST00000298596.10) utilizando las secuencias de oligonucleótidos mencionados previamente en la tabla 1. La mezcla utilizada para la reacción de PCR tenía un volumen final de 25 μ l y contenía 100ng de ADN, 12.5 μ l de Master Mix (Promega) y 0.8 μ M de cada primer. El programa de PCR utilizado para la reacción está descrita en la Tabla 2. La amplificación fue comprobada en un gel de agarosa al 1% por electroforesis en un buffer TBE 1X. Se realizó la comparación del tamaño del fragmento con el patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen). El producto de PCR fue enviado a secuenciación directa para descartar variantes procedentes del sujeto donante, se realizó el alineamiento comparando la secuencia nucleotídica con la secuencia *wild type* empleando el programa informático Muscle.

5.3.2 Clonaje en vector pCR4-TOPO TA

Se realizó el clonaje de la secuencia del promotor *STOX1* comprendida entre -830pb y +76pb en el vector pCR4 TOPO TA (Invitrogen) resistente a ampicilina. El clonaje fue realizado de la siguiente manera: se adicionó 2 μ l del producto PCR, 1 μ l de buffer de sales, 1 μ l de agua y 1 μ l vector pCR4-TOPO TA (Invitrogen). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente de este producto de clonaje se utilizaron 2 μ l para ser introducido en 12.5 μ l de un vial de células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) que fueron transformadas para obtener mayor cantidad de material. La mezcla fue incubada en hielo durante 30 minutos. Inmediatamente se realizó un choque térmico que consistió en colocar la muestra a 42°C en un baño serológico

durante 30 segundos y a continuación en hielo durante 2 minutos. Luego se adicionó 125µL del medio revitalizante SOC y se incubó a 37°C en agitación horizontal a 300 rpm durante una hora. De la transformación se sembraron 80µL y 60µL en placas de LB agar con ampicilina y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Las colonias que crecieron en el medio sólido con ampicilina correspondían a las células transformadas por el vector, las cuales fueron extraídas y agregadas a 5 ml de medio LB con ampicilina para posteriormente realizar una PCR de verificación de la presencia del inserto con primers del vector T7 y del inserto Hprom_stox1-KpnI-4F. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Programa de PCR sobre colonias bacterianas para promotor de *STOX1* en pCR4-TOPO TA

Programa termociclador		Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Número de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	50 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

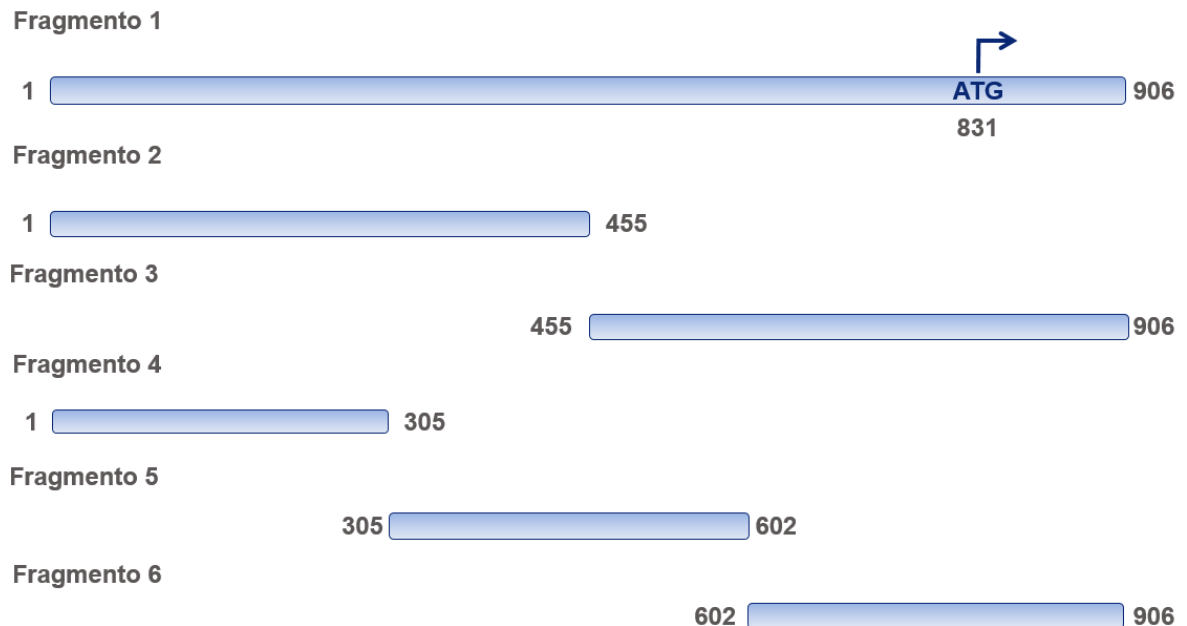
La amplificación fue verificada en un gel de agarosa al 1% por electroforesis en un buffer TBE 1X. Se realizó la comparación del tamaño del fragmento con el patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen). Posteriormente, se realizó el protocolo de extracción de ADN plasmídico y se envió a secuenciación para confirmar que no existiera ninguna variante inducida por la Taq polimerasa. Finalmente, después de la verificación de la construcción fue enviado a Hybrigenics Francia.

5.3.3 Ensayo de monohíbrido en levaduras

El ensayo de monohíbrido en levaduras permite identificar interacciones DNA – proteína. Los factores de transcripción (prey) que interactúan con una secuencia de DNA de interés (bait) son detectados por medio de la expresión de un gen reportero (Ouwkerk & Meijer, 2001). Inicialmente se realizó un ensayo de mapeo de dominio autoactivador. En este ensayo la secuencia del promotor de *STOX1* fue amplificada y clonada en el vector centrómico pB303 en 6 diferentes fragmentos: fragmento 1 secuencia completa nucleótidos (Maier &

Gessler) 1 a 906, fragmento 2 nt 1 – 455 nt, fragmento 3 de 456 a 906 nt, fragmento 4 de 1 a 305 nt, fragmento 5 de 306 a 602 nt y el fragmento 6 de 603 a 902 nt, Figura 2.

Figura 2 Representación esquemática de los fragmentos del promotor de *STOX1* utilizados en ensayo de dominio autoactivador



Representación esquemática de los fragmentos del promotor *STOX1* clonados en el vector pB303 para el ensayo de auto activación. El fragmento 1 representa la secuencia completa utilizada y a partir de esta se generaron los otros fragmentos.

Luego se realizó un acoplamiento célula-célula entre las levaduras que tienen el DNA (bait) y las cepas de levaduras que previamente han sido transformadas con una librería de cDNA de placenta humana. La interacción positiva activa la transcripción del gen reportero, la cual es anotada de acuerdo a un puntaje biológico predictivo (PBS) dependiendo de la probabilidad de la interacción y la similitud de la secuencia (Xie, Hu, Qian, Blackshaw, & Zhu, 2011).

De acuerdo al PBS las interacciones pueden ser clasificadas en seis categorías las cuales inician en la categoría A y finalizan en la categoría F. La categoría A indica una probabilidad

muy alta de la interacción, la categoría B indica una alta probabilidad en la interacción, la categoría C identifica interacciones con buena probabilidad, la categoría D indica que la probabilidad de la interacción es moderada ya que esta puede ser debida a falsas interacciones (falsos positivos o interacciones difícilmente detectables por la técnica) debido a: baja presencia de mRNA en la librería, toxicidad del prey para la levadura o plegamiento del prey. En la categoría E se encuentran las interacciones no específicas. La categoría F son artefactos técnicos probados experimentalmente.

5.4 Construcciones plasmídicas

5.4.1 Promotor de *STOX1* en PGL4.22 [luc2CP/Puro]

Previamente se realizó el clonaje de la región promotora de *STOX1* comprendida entre -830pb y +76pb (906pb) en el vector pCR4 TOPO TA. La secuencia fue confirmada para ser enviada a la realización del ensayo monohíbrido en levaduras. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del promotor para el clonaje en este vector incluían en sus extremos secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción KpnI y HindIII (5' y 3' respectivamente) presentes en el sitio de clonaje múltiple (*polilynker*) del vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] que permitan efectuar el proceso de digestión y ligación en otro vector (pGL4.22 [luc2CP/Puro]).

Digestión enzimática

A partir de la miniprep de la colonia 5 de la construcción del promotor *STOX1* (906pb) en pCR4-TOPO TA se realizó la digestión para obtener el fragmento del promotor. A partir de la miniprep de la construcción *BMP15* en pGL4.22 [luc2CP/Puro] que incluían en sus extremos la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción KpnI y Hind III se obtuvo el vector linearizado.

El proceso de digestión simultánea con las dos enzimas de restricción se realizó en el Buffer 2.1 (*CutSmart BioLabs*). La enzima HindIII (1 μ L=20U) funciona al 100% en este buffer y la enzima KpnI (1 μ L=10U) con el mismo buffer funciona al 75% (*Biolabs*: www.neb.com). De acuerdo con las concentraciones de la enzima y la actividad en el buffer la reacción se realizó como se muestra en las tablas 5 y 6.

Tabla 5 Digestión del promotor de *STOX1* pCR4-TOPO TA

Mezcla	Cantidad
1. Buffer 2.1	5 µL
2. Agua	25.5 µL
3. DNA (miniprep <i>STOX1</i> pCR4-TOPO TA)	17 µL (Lonergan et al.)100 ng)
4. Enzima KpnI (1µL=10U)	2 µL
5. Enzima HindIII (1µL=20U)	0.5 µL

Tabla 6 Digestión *BMP15* pGL4.22 [luc2CP/Puro]

Mezcla	Cantidad
1. Buffer 2.1	5 µL
2. Agua	32.5 µL
3. DNA (miniprep <i>BMP15</i> pGL4.22 [luc2CP/Puro])	10 µL (Lonergan et al.)100 ng)
4. Enzima KpnI (1µL=10U)	2 µL
5. Enzima HindIII (1µL=20U)	0.5 µL

Para cada reacción se utilizaron dos tubos con las mismas cantidades para obtener un volumen final de 100 µL. Los tubos fueron incubados a una temperatura de 37°C durante cuatro horas. Posteriormente, el producto final de digestión (100µL) se sometió a electroforesis en un gel preparativo de agarosa (1%) y se realizó la extracción del ADN con el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Ligación enzimática

Para la ligación del inserto del promotor de *STOX1* comprendido entre -830pb y +76pb (906pb) en el vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] linearizado se utilizó la enzima T4 ligasa para DNA (Invitrogen). Se realizó el cálculo de la cantidad de nanogramos del inserto en relación con los nanogramos del vector para una relación molar 3:1 de la siguiente manera: ng de inserto = (ng del vector x Kb del inserto)/Kb del vector x 3. Las condiciones de la ligación se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Ligación promotor *STOX1* (906pb) pGL4.22 [luc2CP/Puro]

Mezcla	Cantidad
1. Buffer T4 ligasa (1X)	4 μ L
2. Agua	10 μ L
3. Inserto (1.34 ng/ μ L)	3 μ L
4. Vector (1 ng/ μ L)	1 μ L
5. T4 ligasa (1U/ μ L)	0.5 μ L

La ligación se dejó en incubación a 16 °C durante 16 horas. Posteriormente se realizó la transformación del producto de ligación de la siguiente manera: se adicionó 3 μ L del producto de ligación en 25 μ L de células de *Escherichia coli* quimio competentes *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen). Las colonias que crecieron en el medio sólido con ampicilina fueron extraídas y añadidas a 5 ml de LB Base con ampicilina durante toda la noche en agitación a 37°C (minicultivos).

Comprobación de la ligación

Se procedió a la realización de una PCR de verificación de la ligación a partir de los minicultivos con un primer forward del vector pGL4 (RV3) y un primer reverse del fragmento de *STOX1* Hprom+62_stox1-HindIII (Tabla 3). El volumen final de la mezcla para la PCR fue de 25 μ l. Se adicionó 100ng de ADN, 12.5 μ l de Master Mix (Promega) y 0.8 μ M de cada primer. Las condiciones de la PCR se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Programa de PCR sobre colonias bacterianas para verificación de ligación del promotor de *STOX1* en pGL4.22 [luc2CP/Puro]

Programa termociclador		Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Número de ciclos	25 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	57°C	40 segundos
Elongación	72°C	50 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

Después de la verificación por PCR, se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo manual de miniprep de las colonias 5, 6, 7 y 8.

5.4.2 Construcciones plasmídicas para para ensayo de gen reportero

De acuerdo a los resultados del ensayo de monohíbrido en levaduras, la región del promotor *STOX1* utilizada para efectuar estas construcciones fue la comprendida entre -525pb y -830pb. Se realizaron tres construcciones plasmídicas adicionales las cuales se muestran de forma esquemática en la Figura 3. La metodología utilizada fue similar a la mencionada previamente en el apartado 5.4.1.

Figura 3 Esquema de las series alélicas realizadas a partir de la región promotora de *STOX1*



Se realizaron tres construcciones adicionales del promotor *STOX1* en el vector PGL4.22 [luc2CP/Puro] (azul oscuro), a) promotor *STOX1* 305pb comprendida entre -525pb y -830pb, b) promotor *STOX1* 201pb comprendida entre -629pb y 830pb y c) promotor *STOX1* 102pb comprendida entre -728pb y 830pb.

Para la realización de estas construcciones se diseñaron oligonucleótidos que incluían en sus extremos 5' y 3' secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción KpnI y HindIII respectivamente, Tabla 10. La amplificación se realizó a partir de la miniprep de la primera construcción realizada de la región promotora de *STOX1* comprendida entre -830pb y +76pb (906pb) clonada en el vector PGL4.22 [luc2CP/Puro].

Tabla 9 Primers de amplificación del promotor de *STOX1*

Región	Secuencia del primer	
Promotor de <i>STOX1</i> -525pb y -830pb (305 pb)	Forward Hprom_stox1-KpnI-4F	5'CGGGGTACCgtcatggatgaaagggtccttag 3'
	Reverse Hprom-545_stox1- HindIII	5'- CCCAAGCTTggttgagcaggaaacctagg - 3'
Promotor de <i>STOX1</i> -629pb y 830pb (201 pb)	Forward Hprom_stox1-KpnI-4F	5'CGGGGTACCgtcatggatgaaagggtccttag 3'
	Reverse Hprom-650_stox1- HindIII	5'- CCCAAGCTT ggagtgcagtggctattcact
Promotor de <i>STOX1</i> -728pb y 830pb (102 pb)	Forward Hprom_stox1-KpnI-4F	5'CGGGGTACCgtcatggatgaaagggtccttag 3'
	Reverse Hprom-750_stox1- HindIII	5'- CCCAAGCTTtcccacacctgttcattcaagt - 3'

Las especificaciones de la reacción de PCR se describen en la Tabla 10.

Tabla 10 Programa de PCR para el fragmento del promotor de *STOX1*.

Programa termociclador		Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	10 minutos
Número de ciclos	30 ciclos	
Desnaturalización	95°C	40 segundos
Anillamiento	64°C	40 segundos
Elongación	72°C	20 segundos
Elongación final	72°C	10 minutos

El producto de PCR se sometió a electroforesis por un gel preparativo de agarosa (1%) en buffer TBE 1X y se realizó la comparación del tamaño del fragmento con el patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen) para finalmente realizar el protocolo de extracción de ADN de gel con el kit *PureLink® Quick Gel Extraction* (Invitrogen).

Digestión enzimática

Se realizó la digestión enzimática de los fragmentos del promotor de *STOX1* para ser ligados en el vector PGL4.22 [luc2CP/Puro]. El vector ya había sido digerido previamente para la construcción anterior. De acuerdo con las concentraciones de la enzima y la actividad en el buffer, las reacciones realizadas se muestran en la tabla 11.

Tabla 11 Digestión de las series alélicas del promotor de *STOX1* clonado en el vector PGL4.22 [luc2CP/Puro]

Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (305pb)	Cantidad
6. Buffer 2.1	5 μ L
7. Agua	38.2 μ L
8. DNA (Extracción banda)	4.3 μ L (100ng)
9. Enzima KpnI (1 μ L=10U)	2 μ L
10. Enzima HindIII (1 μ L=20U)	0.5 μ L
Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (201pb)	Cantidad
1. Buffer 2.1	5 μ L
2. Agua	34.5 μ L
3. DNA (Extracción banda)	8 μ L (100ng)
4. Enzima KpnI (1 μ L=10U)	2 μ L
5. Enzima HindIII (1 μ L=20U)	0.5 μ L
Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (102pb)	Cantidad
1. Buffer 2.1	5 μ L
2. Agua	27.5 μ L
3. DNA (Extracción banda)	15 μ L (100ng)
4. Enzima KpnI (1 μ L=10U)	2 μ L
5. Enzima HindIII (1 μ L=20U)	0.5 μ L

Se realizó una incubación a 37°C durante cuatro horas. Luego el producto de la digestión (100 μ L) se sometió a electroforesis en un gel preparativo de agarosa (1%) y finalmente se realizó la extracción del ADN.

Ligación enzimática

Para la ligación de los fragmentos del promotor de *STOX1* de 305pb, 201pb y 102pb en el vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] se utilizaron las condiciones que se muestran en la tabla 12.

Tabla 12 Ligación promotor *STOX1* pGL4.22 [luc2CP/Puro]

Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (305pb)	Cantidad
6. Buffer T4 ligasa (1X)	4 µL
7. Agua	6.6 µL
8. Inserto (39.8 ng/ µL)	0.41 µL
9. Vector (14.29 ng/ µL)	7 µL
10. T4 ligasa (1U/µL)	2 µL
Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (201pb)	Cantidad
1. Buffer T4 ligasa (1X)	4 µL
2. Agua	5.1 µL
3. Inserto (46.2 ng/ µL)	0.5 µL
4. Vector	8.4 µL
5. T4 ligasa (1U/µL)	2 µL
Mezcla para el promotor de <i>STOX1</i> (102pb)	Cantidad
1. Buffer T4 ligasa (1X)	4 µL
2. Inserto (21.2 ng/ µL)	0.5 µL
3. Vector	14 µL
4. T4 ligasa (1U/µL)	2 µL

Se realizó la ligación y la transformación de la ligación y la comprobación de la ligación por medio de PCR sobre colonias bacterianas con un primer forward del vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] (RV3) y un primer reverse del fragmento de *STOX1* de cada construcción realizada mencionadas en la Tabla 9.

La amplificación fue comprobada por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1% y se extrajo el ADN plasmídico utilizando el protocolo miniprep manual de *STOX1* (305 pb) en pGL4.22 [luc2CP/Puro] colonia 7 y 5, *STOX1* (201 pb) en pGL4.22 [luc2CP/Puro] colonia 1, 3 y 5 y *STOX1* (102 pb) en pGL4.22 [luc2CP/Puro] colonia 1, 2 y 4. Las construcciones fueron conservadas en glicerol a -80°.

6. RESULTADOS

6.1 Experimento de monohíbrido en levaduras del promotor de *STOX1* humano

El ensayo mapeo de dominio autoactivador permitió identificar que el fragmento bait del promotor *STOX1* por sí mismo no activó la transcripción del gen reportero His3 del sistema monohíbrido en levaduras. El ensayo de crecimiento en levaduras en ausencia de histidina mostró autoactivación de todos los fragmentos a excepción del fragmento 4 correspondiente a 1 -305 nt, Figura 2. Por lo tanto, este fragmento del promotor de *STOX1* fue utilizado para la realización del ensayo final de monohíbrido.

El ensayo de monohíbrido en levaduras analizó 161 millones de interacciones del fragmento bait de *STOX1* 1-350 nt con la librería prey de placenta humana. Para cada interacción se realizó el cálculo del score biológico predictivo (PBS). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13 Resultado ensayo de monohíbrido en levaduras de promotor *STOX1* en librería de placenta humana

Gene Name (Best Match)	%Id 5p	%Id 3p	Start Stop	PBS
Homo sapiens - HEY-L	100.0	100.0		C
Homo sapiens - ARHGAP5	100.0	99.3		D
Homo sapiens - GRHL1	100.0			D
Homo sapiens - MSC	100.0	100.0		D
Homo sapiens - PLAG1	100.0	100.0		D
Homo sapiens - PLAGL2	100.0	100.0		D
Homo sapiens - SYNGR2	100.0	100.0	SI	D

%Id 5p: porcentaje de identidad de la secuencia en la región 5', **%Id 3p:** porcentaje de identidad de la secuencia en la región 3', **Start Stop:** fragmento contiene al menos un codón de parada, **PBS** categoría de score biológico predictivo.

En la categoría C se identificó a la proteína HEY-L interactuando potencialmente con el promotor de *STOX1*. La interacción fue identificada en dos clones de HEY-L (pB303_A-49 y pB303_A-23) los cuales se encontraba clonados *in frame*.

6.2 Análisis *in silico* del promotor de *STOX1*

El análisis de la secuencia promotora de *STOX1* con el software MatInspector Genomatix predijo 222 TFBS localizados entre -830pb y el codón de inicio ATG con similitud a la matriz mayor a 0.75 **Anexo 1**. Entre los factores de transcripción predichos, HEY-L identificado en el ensayo de monohíbrido en levaduras no fue identificado por medio de este análisis *in silico*. Los factores de transcripción que predijo el software para la región del promotor de *STOX1* de 305pb (-525pb y -830pb) utilizada para el ensayo monohíbrido fueron 46 TFBS, **Tabla 14**.

Tabla 14 TFBS análisis *in silico* del promotor *STOX1* 1 -305pb

Matrix Information	Core sim	Sequence
HMG box transcription factor Tcf7l1 (TCF3)	0,783	catggatGAAAggtcc
Special AT-rich sequence-binding protein 1	1	gatAATAAactagg
Caudal type homeobox transcription factor 2	1	tccttagTTATtacctg
Homeobox B5 / Hox-2alpha	1	caggaTAATAaactaaga
Octamer-binding transcription factor-1, POU class 2 homeobox 1 (POU2F1)	1	cttagttATTAtcc
Homeodomain transcription factor HOXC13	1	acaggataaTAAActaa
Ventral anterior homeobox 1	0,762	cttagTTATtacctg
Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	1	ttcacaggaTAAaactaagga
Homeobox B5 / Hox-2alpha	0,763	ttagTTATtacctgga
GATA-binding factor 3	1	acagGATAataa
Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain	0,75	ttacaGGATaataac
CCAAT/enhancer binding protein beta	1	tatccTGTGaaatag
Transcription factor with 8 central zinc fingers and an N-terminal KRAB domain	0,814	tctggaccTCAGaaatgccagct
Heat shock factor 2	1	tctctggaccTCAGaaatgccag
Signal transducer and activator of transcription 5B	1	ctggaccTCAGaaatgcc
PAX6 paired domain and homeodomain are required for binding to this site	1	tttctggaccCCAGagaag
Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (mouse)	0,75	ttcccttctggaccTCAGaa
Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha 1	1	ggccCAGAGaaag
Phenotypic adenoma gene (PLAG) 1	1	ctGAGCccaggaagggaaata
Serum response factor	0,803	ttcccttctGGCctc
Serum response factor	1	aggccagagAAGGaat
Nuclear factor of activated T-cells 5	1	gaagGAAaataactgaat
POU-factor Tst-1/Oct-6	0,9	aggaAATAactgaatga
Heat shock factor 1	0,868	aggaataaactTGAAtgaacagct
FAST-1 SMAD interacting protein	0,85	caactgttCATTCaag
HMG box-containing protein 1	1	taactgAATGaacaggtggga
Grainyhead-like 2 (BOM, TF2P2L3)	1	ccAACctgtcat
Grainyhead-like 1 (LBP32, MGR, TF2P2L2)	1	tgaaacGGTtggg
Estrogen-related receptor gamma, homodimer DR4 binding site	0,79	acaggtggagcaGGCagccg
Nuclear factor 1	1	cgccctggcctcCCAacct
Nuclear factor I/B	1	aggtggagcagGCCAgccg
E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	1	atgtGCGGcactgt
AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	1	cgagCACctgtag
Transcription factor E2a (E12/E47)	1	ggactacaGGTccccg
Mineralocorticoid receptor response element	0,885	ttggactacagGTGCcgg
GATA-binding factor 2	0,853	ctgaGATCagagg
Kruppel-like factor 12 (AP-2rep)	1	gagtgcaGTGGctattcac
Regulatory factor X 2	1	ctccagcctggcCAACaca
Zic family member 3 (odd-paired Drosophila homolog)	1	caacaCAGCgagacc
Alternative splicing variant of FOXP1, activated in ESCs	1	ctcaaaaAACAAAata
Multifunctional c-Abl src type tyrosine kinase	1	aaAACAaaat
Interferon regulatory factor (IRF)-related protein (NF-EM5, PIP, LSIRF, ICSAT)	1	aaaaaacaaaataGAAAcacaacaa
Doublesex and mab-3 related transcription factor 7	0,946	gtgtTTTgtttattttgt
HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOXJ1, Freac-6)	1	tagaacAAACaactag
E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	1	cttagGCGCagactga
Drosophila initiator motifs	1	tcTCAGttctg

Core sim: secuencia central de similitud. **Sequence:** letras mayúsculas: secuencia central o *core* de una matriz definida como la secuencia consecutiva (generalmente 4 nucleótidos) más altamente conservada.

6.3 Secuenciación del promotor de *STOX1* en pacientes con PE

En la secuenciación del promotor *STOX1* en 110 pacientes francesas con antecedente de PE se detectaron 9 variantes no sinónimas en la en la región comprendida entre -1pb hasta -830pb. Tabla 15 muestra las variantes y se han incluido el número de pacientes en donde se encontró la variante, la referencia del SNP (Rs), la frecuencia alélica mínima MAF, la predicción de Genomatix y la frecuencia la frecuencia alélica.

Tabla 15 Resultados de la secuenciación del promotor de *STOX1*

CAMBIO DNA	CIGOSIDAD	PACIENTES	Rs	MAF	GENOMATIX	FRECUENCIA ALELICA	
c.-735T>G	HETEROCIGOTA (1)	1/110	rs117971687	G=0.0028/14 (1000 Genomes)	Grainyhead-like transcription factors	T: 0.996	G:0.004
c.-383G>C	HETEROCIGOTA (13) HOMOCIGOTA (4)	17/110	rs12268540	C=0.1434/718 (1000 Genomes)	NO	G: 0.9	C: 0.1
c.-360A>G	HOMOCIGOTA (17) HETEROCIGOTA (29)	46/110	rs1573839	G=0.3962/1984 (1000 Genomes)	NO	A: 0.72	G:0.28
c.-359G>A	HETEROCIGOTA (34)	53/110	rs1618932	A=0.3948/1977 (1000 Genomes)	NO	G: 0.67	A: 0.33
c.-233 G>A.	HOMOCIGOTA (3) HETEROCIGOTA (13)	16/110	rs12268631	A=0.1428/715 (1000 Genomes)	Core promoter motif ten elements	G: 0.91	A: 0.09
c.-210T>G	HETEROCIGOTA(1)	1/110			NO	T: 0.996	G:0.004
c.-188C>G	HOMOCIGOTA (2) HETEROCIGOTA (6)	8/110	rs71478860	G=0.0915/458 (1000 Genomes)	NO	C: 0.95	G: 0.05
c.-58C>G	HETEROCIGOTA (1)	1/110			NO	C: 0.996	G: 0.004
c.-57G>C	HETEROCIGOTA (1) HOMOCIGOTA(1)	2/110	rs184399576	C=0.0232/116 (1000 Genomes)	NO	G: 0.98	C: 0.02

7. DISCUSIÓN

Dentro de los objetivos del presente trabajo de tesis se buscó identificar factores de transcripción que se unieran al promotor de *STOX1*. Los estudios fueron realizados en la región promotora del gen comprendida entre -1pb y -830pb. Esta secuencia fue elegida teniendo en cuenta que para que la transcripción pueda ser iniciada los promotores requieren de una región de 50 a 100pb correspondiente al promotor mínimo, la cual permite la unión de la enzima RNA polimerasa II y los factores de transcripción necesarios para el proceso (Roy & Singer, 2015). Además, la secuencia corriente arriba al promotor mínimo corresponde a la región promotora reguladora que permite activar la transcripción (Haberle & Lenhard, 2016). Se estima que 100 pb corriente arriba del inicio de la transcripción se encuentran las regiones reguladoras esenciales de la maquinaria de expresión de los genes.

Para predecir las interacciones proteína- DNA en este trabajo de tesis fueron utilizadas técnicas experimentales *in vivo* y bioinformáticas *in silico*. La metodología *in vivo* empleada para identificar los factores de transcripción que interactúan con el promotor *STOX1* fue el ensayo de monohíbrido en levaduras, una técnica de alto rendimiento para identificar interacciones (Deplancke, Vermeirssen, Arda, Martinez, & Walhout, 2006; Ouwerkerk & Meijer, 2001). Este ensayo permitió predecir las interacciones del promotor del gen *STOX1* en el contexto que se deseaba estudiar a través del uso de una librería de cDNA de placenta humana. Se analizaron 161 millones de interacciones de las cuales la proteína HEY-L una fue reportada dentro de las categorías de mediana probabilidad de interacción (categoría C). Es importante considerar que el ensayo de monohíbrido en levadura tiene limitaciones debido a posibles falsos positivos. Esta situación se relaciona con la detección de interacciones con factores de transcripción que tienen una baja expresión y con la imposibilidad de detectar proteínas que requieran modificaciones postraduccionales para unirse al ADN (Gubelmann et al., 2013). Adicionalmente, estos ensayos son realizados en el contexto genómico/proteómico de levaduras por lo que las proteínas procedentes de una librería humana pueden resultar tóxicas.

La proteína HEY-L identificada en este ensayo pertenece a la familia de proteínas bHLH (basic Helix-Loop-Helix) que actúan principalmente como represores transcripcionales y han sido relacionados con la vía de señalización NOTCH (Lavery et al., 2011). Esta cascada molecular regula la embriogénesis de los vasos sanguíneos, la miogénesis y la morfogénesis cardíaca (Buas, Kabak, & Kadesch, 2010). En la PE la vía de señalización NOTCH es requerida para un adecuado desarrollo placentario regulando la invasión de las células trofoblásticas, la vasculogénesis y el transporte fetoplacentario. Estudios en tejidos de placentas afectadas con PE donde se evaluó la expresión de receptores, ligandos y genes diana de la vía NOTCH se evidenció una regulación negativa en la PE. Estos hallazgos proporcionaron evidencia de que esta vía está relacionada con complicaciones del embarazo y la placentación (Fragkiadaki et al., 2015).

Nuestros resultados sobre una potencial interacción de HEY-L con el promotor de *STOX1* y su relación con el proceso de la placentación son hallazgos innovadores. En el presente trabajo fueron realizadas las construcciones de la serie alélica del promotor *STOX1* en el vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] para ser realizado en perspectiva el ensayo de gen reportero luciferasa en cultivos celulares y demostrar funcionalmente la potencial interacción .

Existen otras opciones metodológicas que permiten detectar interacciones proteína- DNA. El EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) es una técnica *in vitro*, fundamentada en la movilidad electroforética en la que el complejo ácidos nucleicos-proteína migra más lentamente en comparación con los ácidos nucleicos y las proteínas libres (Hellman & Fried, 2007). Existe una variación en esta técnica que utiliza un anticuerpo dirigido hacia la proteína de interés, lo que permite detectar de forma más específica la proteína que interactúa con el ADN (Pares-Matos, 2013). Otra de las técnicas utilizadas con este fin es la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP), un método focalizado en la inmunoprecipitación del complejo ADN-proteína. La detección se realiza por medio de anticuerpos específicos para identificar los factores de transcripción unidos al ADN y las secuencias específicas de ADN son amplificadas por medio de PCR y secuenciadas para su descripción (Mahony & Pugh, 2015). Estas técnicas podrían ser utilizadas en estudios futuros si se proponen factores potencialmente reguladores de *STOX1*.

Con el propósito de cumplir con el objetivo del presente trabajo de tesis fue también utilizada una herramienta *in silico* para predecir potenciales sitios de unión a factores de transcripción en la región promotora de *STOX1*. La función MatInspector del programa Genomatix, posee una de las librerías más amplias y actualizadas de matrices. Además, permite a través de análisis probabilísticos de similitud de secuencias predecir sitios de unión proteína- DNA con alta fiabilidad (Kerstin Cartharius, Frech, Karas, Wingender, & Werner, 1995). El resultado de la predicción bioinformática de la región promotora de *STOX1*, con un índice de similitud de 0.75 entre la secuencia central altamente conservada o core de la matriz y la secuencia de nucleótidos del promotor no permitió identificar la proteína HEY-L identificada en el ensayo monohíbrido (Anexo 1). Dentro de los factores de transcripción identificados solamente la proteína PLAG-1 fue hallada tanto en la predicción bioinformática *in silico* como en el ensayo monohíbrido en levaduras. Para este último se identificó con una probabilidad de interacción moderada baja (categoría D), la cual puede ser debida a falsos positivos o interacciones difícilmente detectables por la técnica. Este factor de transcripción es una proteína de dedos de zinc codificada por el gen adenoma pleomorfo 1 relacionada con la proliferación celular y la morfogénesis glandular. El aumento en su expresión ha sido relacionado con el desarrollo de adenomas pleomorfos en la glándula salival y hepatoblastomas (Queimado et al., 1999).

Para finalizar, se realizó en la presente tesis la secuenciación de la región promotora de *STOX1* en 110 pacientes francesas afectadas con PE. Las variantes en la región promotora proximal y distal podrían afectar la expresión génica al afectar sitios de unión a los factores de transcripción y regiones reguladoras. Se detectaron variantes en el 51% de pacientes y se identificó más de una variante en el promotor en el 47% de ellas. En las pacientes con fenotipo de PE nueve variantes fueron identificadas en la secuenciación (Tabla 16), de las cuales dos de ellas (c.-210T>G y c.-58C>G) no se encontraban reportadas en las bases de datos de SNP Ensembl. Una variante c.-735T>G, que fue identificada en la muestra de pacientes, se encuentra ubicada en la región promotora utilizada para el ensayo monohíbrido de levaduras. Esta variante presenta una frecuencia alélica de 0.004 en la muestra. Las frecuencias fueron comparadas de acuerdo al MAF del proyecto 1000 genomas. En la

posición de la variante c.-735T>G, por análisis *in silico*, se identificó al factor de transcripción Grainyhead (GHRL), que se fija potencialmente a esta posición del promotor. GHRL es una proteína que regula el desarrollo de diferentes órganos, la diferenciación epitelial y ha sido relacionado con metástasis en algunos tipos de cáncer controlando la transición epitelio mesénquimal (Ming et al., 2018) . Estudios en la placenta han identificado este factor de transcripción haciendo parte del transcriptoma de los trofoblastos regulando la diferenciación celular (Kubota, Kent, Rumi, Roby, & Soares, 2015). Análisis funcionales posteriores podrían demostrar si la variante afecta la trans-activación del promotor.

8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El factor de transcripción HEY-L es un potencial regulador de *STOX1* necesario para la transactivación del promotor. Con el objetivo de corroborar nuestros resultados se propone validar estos resultados a través de ensayos funcionales de gen reportero luciferasa y ensayo de movilidad electroforética EMSA.

En el presente trabajo fueron realizadas las construcciones de las series alélicas del promotor *STOX1* en el vector pGL4.22 [luc2CP/Puro] para ser realizado en perspectiva el ensayo de gen reportero luciferasa en cultivos celulares y demostrar funcionalmente la potencial interacción .

La secuenciación de la región promotora del gen candidato de preeclampsia *STOX1* identificó variantes en el 51% de las pacientes afectadas con esta patología lo cual podría afectar sitios de unión a factores de transcripción y regiones reguladores influyendo en la expresión génica.

Se identificó la variante c.-735T>G en una paciente afectada con preeclampsia, la cual se encuentra localizada en la región promotora donde potencialmente interactúa la proteína HEY-L, identificada a través del ensayo de monohíbrido en levadura. Adicionalmente, predictores bioinformáticos identificaron al factor de transcripción GHRL que se fija potencialmente en esta posición. Estudios futuros podrían validar si la mutación genera una modificación en la transactivación del promotor por medio de ensayos funcionales de luciferasa y ensayo de movilidad electroforética EMSA.

9. REFERENCIAS

- Ali, S. M., & Khalil, R. A. (2015). Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. *Expert Opin Ther Targets*, *19*(11), 1495-1515. doi:10.1517/14728222.2015.1067684
- Amaral, L. M., Cunningham, M. W., Cornelius, D. C., & LaMarca, B. (2015). Preeclampsia: long-term consequences for vascular health. *Vascular Health and Risk Management*, *11*, 403-415. doi:10.2147/VHRM.S64798
- Ballermann, B. J. (2005). Glomerular endothelial cell differentiation. *Kidney Int*, *67*(5), 1668-1671. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00260.x
- Berends, A. L., Bertoli-Avella, A. M., de Groot, C. J., van Duijn, C. M., Oostra, B. A., & Steegers, E. A. (2007). STOX1 gene in pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Bjog*, *114*(9), 1163-1167. doi:10.1111/j.1471-0528.2007.01414.x
- Biagi, G., De Rosa, V., Pelusi, G., Scagliarini, G., Sani, G., & Coccheri, S. (1990). Increased placental production of leukotriene B4 in gestational hypertension. *Thromb Res*, *60*(5), 377-384.
- Buas, M. F., Kabak, S., & Kadesch, T. (2010). The Notch effector Hey1 associates with myogenic target genes to repress myogenesis. *J Biol Chem*, *285*(2), 1249-1258. doi:10.1074/jbc.M109.046441
- Caburet, S., Zavadakova, P., Ben-Neriah, Z., Bouhali, K., Dipietromaria, A., Charon, C., . . . Fellous, M. (2012). Genome-Wide Linkage in a Highly Consanguineous Pedigree Reveals Two Novel Loci on Chromosome 7 for Non-Syndromic Familial Premature Ovarian Failure. *PLoS ONE*, *7*(3), e33412. doi:10.1371/journal.pone.0033412
- Carlosama, C., Elzaiat, M., Patino, L. C., Mateus, H. E., Veitia, R. A., & Laissue, P. (2017). A homozygous donor splice-site mutation in the meiotic gene MSH4 causes primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*, *26*(16), 3161-3166. doi:10.1093/hmg/ddx199
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., . . . Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*, *21*(13), 2933-2942. doi:10.1093/bioinformatics/bti473
- Cartharius, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., & Werner, T. (1995). *Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucl Acids Res 23: 4878-4884 (Vol. 23).*

- Carty, D. M., Delles, C., & Dominiczak, A. F. (2008). Novel biomarkers for predicting preeclampsia. *Trends Cardiovasc Med*, 18(5), 186-194. doi:10.1016/j.tcm.2008.07.002
- Castro, T., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Forero, D., Restrepo, C. M., Talero, C., . . . Laissue, P. (2013). Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder. *Neurol Sci*, 34(12), 2219-2222. doi:10.1007/s10072-013-1569-4
- Cerdeira, A. S., & Karumanchi, S. A. (2012). Angiogenic factors in preeclampsia and related disorders. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(11). doi:10.1101/cshperspect.a006585
- Chen, C. W., Jaffe, I. Z., & Karumanchi, S. A. (2014). Pre-eclampsia and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 101(4), 579-586. doi:10.1093/cvr/cvu018
- 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. doi:10.1038/ki.2014.17
- Dekker, G. A., & Sibai, B. M. (1998). Etiology and pathogenesis of preeclampsia: current concepts. *Am J Obstet Gynecol*, 179(5), 1359-1375.
- Deplancke, B., Vermeirssen, V., Arda, H. E., Martinez, N. J., & Walhout, A. J. (2006). Gateway-compatible yeast one-hybrid screens. *CSH Protoc*, 2006(5). doi:10.1101/pdb.prot4590
- Diggle, C. P., Parry, D. A., Logan, C. V., Laissue, P., Rivera, C., Restrepo, C. M., . . . Bonthron, D. T. (2012). Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis. *Hum Mutat*, 33(8), 1175-1181. doi:10.1002/humu.22111
- Doridot, L., Chatre, L., Ducat, A., Vilotte, J. L., Lombes, A., Mehats, C., . . . Vaiman, D. (2014). Nitroso-redox balance and mitochondrial homeostasis are regulated by STOX1, a pre-eclampsia-associated gene. *Antioxid Redox Signal*, 21(6), 819-834. doi:10.1089/ars.2013.5661
- Doridot, L., Passet, B., Mehats, C., Rigour, V., Barboux, S., Ducat, A., . . . Vaiman, D. (2013). Preeclampsia-like symptoms induced in mice by fetoplacental expression of STOX1 are reversed by aspirin treatment. *Hypertension*, 61(3), 662-668. doi:10.1161/hypertensionaha.111.202994
- Ducat, A., Doridot, L., Calicchio, R., Méhats, C., Vilotte, J.-L., Castille, J., . . . Vaiman, D. (2016). Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia. *Scientific Reports*, 6, 19196. doi:10.1038/srep19196

- Eiland, E., Nzerue, C., & Faulkner, M. (2012). Preeclampsia 2012. *Journal of Pregnancy, 2012*, 586578. doi:10.1155/2012/586578
- Fonseca, D. J., Garzon, E., Lakhal, B., Braham, R., Ojeda, D., Elghezal, H., . . . Laissue, P. (2012). Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients. *Reprod Biomed Online, 24*(3), 339-341. doi:10.1016/j.rbmo.2011.11.017
- Fonseca, D. J., Ortega-Recalde, O., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Patino, L. C., Bermudez, O. M., . . . Laissue, P. (2014). BMP15 c.-9C>G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online, 29*(5), 627-633. doi:10.1016/j.rbmo.2014.07.018
- Fonseca, D. J., Patino, L. C., Suarez, Y. C., de Jesus Rodriguez, A., Mateus, H. E., Jimenez, K. M., . . . Laissue, P. (2015). Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations. *Fertil Steril, 104*(1), 154-162.e152. doi:10.1016/j.fertnstert.2015.04.016
- Fonseca, D. J., Prada, C. F., Siza, L. M., Angel, D., Gomez, Y. M., Restrepo, C. M., . . . Laissue, P. (2012). A de novo 14q12q13.3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin. *Am J Med Genet A, 158a*(3), 689-693. doi:10.1002/ajmg.a.35215
- Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Vergara, J. I., Rios, X., Uribe, C., Chavez, L., . . . Laissue, P. (2013). A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth-Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene. *Br J Dermatol, 168*(2), 456-458. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11181.x
- Forero, D. A., Wonkam, A., Wang, W., Laissue, P., Lopez-Correa, C., Fernandez-Lopez, J. C., . . . Perry, G. (2016). Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries. *J Med Genet, 53*(7), 438-440. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103631
- Founds, S. A., Conley, Y. P., Lyons-Weiler, J. F., Jeyabalan, A., Hogge, W. A., & Conrad, K. P. (2009). Altered global gene expression in first trimester placentas of women destined to develop preeclampsia. *Placenta, 30*(1), 15-24. doi:10.1016/j.placenta.2008.09.015
- Fragkiadaki, P., Soultzis, N., Sifakis, S., Koutroulakis, D., Gourvas, V., Vrachnis, N., & Spandidos, D. A. (2015). Downregulation of notch signaling pathway in late preterm and term placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *PLoS One, 10*(5), e0126163. doi:10.1371/journal.pone.0126163
- George, E. M. (2014). New approaches for managing preeclampsia: clues from clinical and basic research. *Clin Ther, 36*(12), 1873-1881. doi:10.1016/j.clinthera.2014.09.023

- George, E. M., & Bidwell, G. L. (2013). STOX1: A new player in preeclampsia? *Hypertension*, *61*(3), 561-563. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00721
- Goel, A., & Rana, S. (2013). Angiogenic factors in preeclampsia: potential for diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *22*(6), 643-650. doi:10.1097/MNH.0b013e328365ad98
- Graves, J. A. (1998). Genomic imprinting, development and disease--is pre-eclampsia caused by a maternally imprinted gene? *Reprod Fertil Dev*, *10*(1), 23-29.
- Grill, S., Rusterholz, C., Zanetti-Dallenbach, R., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., & Lapaire, O. (2009). Potential markers of preeclampsia--a review. *Reprod Biol Endocrinol*, *7*, 70. doi:10.1186/1477-7827-7-70
- Gubelmann, C., Waszak, S. M., Isakova, A., Holcombe, W., Hens, K., Iagovitina, A., . . . Deplancke, B. (2013). A yeast one-hybrid and microfluidics-based pipeline to map mammalian gene regulatory networks. *Molecular Systems Biology*, *9*, 682-682. doi:10.1038/msb.2013.38
- Guenther, C., & Garriga, G. (1996). Asymmetric distribution of the *C. elegans* HAM-1 protein in neuroblasts enables daughter cells to adopt distinct fates. *Development*, *122*(11), 3509-3518.
- Haberle, V., & Lenhard, B. (2016). Promoter architectures and developmental gene regulation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *57*, 11-23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.014>
- Hahn, S., Lapaire, O., & Than, N. G. (2015). Biomarker development for presymptomatic molecular diagnosis of preeclampsia: feasible, useful or even unnecessary? *Expert Rev Mol Diagn*, *15*(5), 617-629. doi:10.1586/14737159.2015.1025757
- Haram, K., Mortensen, J. H., & Nagy, B. (2014). Genetic Aspects of Preeclampsia and the HELLP Syndrome. *Journal of Pregnancy*, *2014*, 910751. doi:10.1155/2014/910751
- Hawfield, A., & Freedman, B. I. (2009). Pre-eclampsia: the pivotal role of the placenta in its pathophysiology and markers for early detection. *Ther Adv Cardiovasc Dis*, *3*(1), 65-73. doi:10.1177/1753944708097114
- Hellman, L. M., & Fried, M. G. (2007). Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, *2*(8), 1849-1861. doi:10.1038/nprot.2007.249
- 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. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.08.004>

- Jeyabalan, A. (2013). Epidemiology of preeclampsia: impact of obesity. *Nutr Rev*, 71 Suppl 1, S18-25. doi:10.1111/nure.12055
- Kanasaki, K., & Kalluri, R. (2009). The Biology of Preeclampsia. *Kidney international*, 76(8), 831-837. doi:10.1038/ki.2009.284
- Kivinen, K., Peterson, H., Hiltunen, L., Laivuori, H., Heino, S., Tiala, I., . . . Kere, J. (2007). Evaluation of STOX1 as a preeclampsia candidate gene in a population-wide sample. *Eur J Hum Genet*, 15(4), 494-497. doi:10.1038/sj.ejhg.5201788
- Kleinrouweler, C. E., van Uitert, M., Moerland, P. D., Ris-Stalpers, C., van der Post, J. A., & Afink, G. B. (2013). Differentially expressed genes in the pre-eclamptic placenta: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 8(7), e68991. doi:10.1371/journal.pone.0068991
- Kubota, K., Kent, L. N., Rumi, M. A. K., Roby, K. F., & Soares, M. J. (2015). Dynamic Regulation of AP-1 Transcriptional Complexes Directs Trophoblast Differentiation. In *Mol Cell Biol* (Vol. 35, pp. 3163-3177). 1752 N St., N.W., Washington, DC.
- L'Hote, D., Laissue, P., Serres, C., Montagutelli, X., Veitia, R. A., & Vaiman, D. (2010). Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research. *Bioessays*, 32(2), 132-142. doi:10.1002/bies.200900027
- Laissue, P. (2015). Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing. *Mol Cell Endocrinol*, 411, 243-257. doi:10.1016/j.mce.2015.05.005
- Laissue, P. (2018). The molecular complexity of primary ovarian insufficiency aetiology and the use of massively parallel sequencing. *Mol Cell Endocrinol*, 460, 170-180. doi:10.1016/j.mce.2017.07.021
- Laissue, P., Burgio, G., l'Hote, D., Renault, G., Marchiol-Fournigault, C., Fradelizi, D., . . . Vaiman, D. (2009). Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic lethality in mice assessed by ultrasonography. *Int J Dev Biol*, 53(4), 623-629. doi:10.1387/ijdb.082613pl
- Laissue, P., L'Hote, D., Serres, C., & Vaiman, D. (2009). Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters. *Animal*, 3(1), 55-71. doi:10.1017/s1751731108003315
- Laissue, P., Lakhali, B., Benayoun, B. A., Dipietromaria, A., Braham, R., Elghezal, H., . . . Veitia, R. A. (2009). Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2. *J Med Genet*, 46(7), 455-457. doi:10.1136/jmg.2008.065086

- Laissue, P., Lakhali, B., Vatin, M., Batista, F., Burgio, G., Mercier, E., . . . Vaiman, D. (2016). Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans. *Open Biol*, 6(10). doi:10.1098/rsob.160109
- Laissue, P., Restrepo, C. M., & Ortiz, A. M. (2017). Improving the evaluation of milestones for students completing a clinical genetics elective. *Genet Med*, 19(12). doi:10.1038/gim.2017.62
- Lakhali, B., Laissue, P., Braham, R., Elghezal, H., Saad, A., Fellous, M., & Veitia, R. A. (2010). BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms? In *Clin Endocrinol (Oxf)* (Vol. 72, pp. 425-426). England.
- Lakhali, B., Laissue, P., Elghezal, H., & Fellous, M. (2008). [Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes]. *Gynecol Obstet Fertil*, 36(9), 862-871. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.07.002
- Lavery, D. N., Villaronga, M. A., Walker, M. M., Patel, A., Belandia, B., & Bevan, C. L. (2011). Repression of androgen receptor activity by HEYL, a third member of the Hairy/Enhancer-of-split-related family of Notch effectors. *J Biol Chem*, 286(20), 17796-17808. doi:10.1074/jbc.M110.198655
- Lonergan, M., Aponso, D., Marvin, K. W., Helliwell, R. J. A., Sato, T. A., Mitchell, M. D., . . . Keelan, J. A. (2003). Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), TRAIL Receptors, and the Soluble Receptor Osteoprotegerin in Human Gestational Membranes and Amniotic Fluid during Pregnancy and Labor at Term and Preterm. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(8), 3835-3844. doi:10.1210/jc.2002-021905
- Lynch, A. M., & Salmon, J. E. (2010). Dysregulated complement activation as a common pathway of injury in preeclampsia and other pregnancy complications. *Placenta*, 31(7), 561-567. doi:10.1016/j.placenta.2010.03.010
- Maharaj, A. S., Saint-Geniez, M., Maldonado, A. E., & D'Amore, P. A. (2006). Vascular endothelial growth factor localization in the adult. *Am J Pathol*, 168(2), 639-648. doi:10.2353/ajpath.2006.050834
- Mahony, S., & Pugh, B. F. (2015). Protein-DNA binding in high-resolution. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 50(4), 269-283. doi:10.3109/10409238.2015.1051505
- Maier, M. M., & Gessler, M. (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem Biophys Res Commun*, 275(2), 652-660. doi:10.1006/bbrc.2000.3354

- Mateus, H. E., Perez, A. M., Mesa, M. L., Escobar, G., Galvez, J. M., Montano, J. I., . . . Laissue, P. (2017). A first description of the Colombian national registry for rare diseases. *BMC Res Notes*, *10*(1), 514. doi:10.1186/s13104-017-2840-1
- Maynard, S. E., Min, J. Y., Merchan, J., Lim, K. H., Li, J., Mondal, S., . . . Karumanchi, S. A. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*, *111*(5), 649-658. doi:10.1172/jci17189
- Melchiorre, K., Sharma, R., & Thilaganathan, B. (2014). Cardiovascular implications in preeclampsia: an overview. *Circulation*, *130*(8), 703-714. doi:10.1161/circulationaha.113.003664
- Ming, Q., Roske, Y., Schuetz, A., Walentin, K., Ibraimi, I., Schmidt-Ott, K. M., & Heinemann, U. (2018). Structural basis of gene regulation by the Grainyhead/CP2 transcription factor family. *Nucleic Acids Res*, *46*(4), 2082-2095. doi:10.1093/nar/gkx1299
- Mitropoulos, K., Al Jaibaji, H., Forero, D. A., Laissue, P., Wonkam, A., Lopez-Correa, C., . . . Patrinos, G. P. (2015). Success stories in genomic medicine from resource-limited countries. *Hum Genomics*, *9*, 11. doi:10.1186/s40246-015-0033-3
- Mutter, W. P., & Karumanchi, S. A. (2008). Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res*, *75*(1), 1-8. doi:10.1016/j.mvr.2007.04.009
- Myatt, L., & Webster, R. P. (2009). Vascular biology of preeclampsia. *J Thromb Haemost*, *7*(3), 375-384. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03259.x
- Naljayan, M. V., & Karumanchi, S. A. (2013). NEW DEVELOPMENTS IN THE PATHOGENESIS OF PREECLAMPSIA. *Advances in chronic kidney disease*, *20*(3), 265-270. doi:10.1053/j.ackd.2013.02.003
- Nicolaidis, K. H., Bindra, R., Turan, O. M., Chefetz, I., Sammar, M., Meiri, H., . . . Cuckle, H. S. (2006). A novel approach to first-trimester screening for early pre-eclampsia combining serum PP-13 and Doppler ultrasound. *Ultrasound Obstet Gynecol*, *27*(1), 13-17. doi:10.1002/uog.2686
- Nino, M. Y., Mateus, H. E., Fonseca, D. J., Kroos, M. A., Ospina, S. Y., Mejia, J. F., . . . Laissue, P. (2013). Identification and Functional Characterization of GAA Mutations in Colombian Patients Affected by Pompe Disease. *JIMD Rep*, *7*, 39-48. doi:10.1007/8904_2012_138
- Ojeda, D., Lakhal, B., Fonseca, D. J., Braham, R., Landolsi, H., Mateus, H. E., . . . Laissue, P. (2011). Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype. *Fertil Steril*, *95*(8), 2658-2660.e2651. doi:10.1016/j.fertnstert.2011.04.045

- Ortega-Recalde, O., Beltran, O. I., Galvez, J. M., Palma-Montero, A., Restrepo, C. M., Mateus, H. E., & Laissue, P. (2015). Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clin Genet*, 88(4), e1-3. doi:10.1111/cge.12634
- Ortega-Recalde, O., Fonseca, D. J., Patino, L. C., Atuesta, J. J., Rivera-Nieto, C., Restrepo, C. M., . . . Laissue, P. (2013). A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations. *Mitochondrion*, 13(6), 749-754. doi:10.1016/j.mito.2013.03.010
- Ortega-Recalde, O., Moreno, M. B., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rojas, R. F., Mosquera, H., . . . Laissue, P. (2015). A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis. *Clin Exp Dermatol*, 40(7), 757-760. doi:10.1111/ced.12627
- Ortega-Recalde, O., Silgado, D., Fetiva, C., Fonseca, D. J., & Laissue, P. (2016). Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth-Macklin caused by a KRT1 mutation. *Br J Dermatol*, 175(6), 1372-1375. doi:10.1111/bjd.14969
- Ortega-Recalde, O., Vergara, J. I., Fonseca, D. J., Rios, X., Mosquera, H., Bermudez, O. M., . . . Laissue, P. (2014). Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology. *PLoS One*, 8(6), e64692. doi:10.1371/journal.pone.0064692
- Ouwerkerk, P. B., & Meijer, A. H. (2001). Yeast one-hybrid screening for DNA-protein interactions. *Curr Protoc Mol Biol*, Chapter 12, Unit 12.12. doi:10.1002/0471142727.mb1212s55
- Palei, A. C., Spradley, F. T., Warrington, J. P., George, E. M., & Granger, J. P. (2013). Pathophysiology of Hypertension in Preeclampsia: A Lesson in Integrative Physiology. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 208(3), 224-233. doi:10.1111/apha.12106
- Pares-Matos, E. I. (2013). Electrophoretic mobility-shift and super-shift assays for studies and characterization of protein-DNA complexes. *Methods Mol Biol*, 977, 159-167. doi:10.1007/978-1-62703-284-1_12
- Park, H. J., Shim, S. S., & Cha, D. H. (2015). Combined Screening for Early Detection of Pre-Eclampsia. *Int J Mol Sci*, 16(8), 17952-17974. doi:10.3390/ijms160817952
- Patino, L. C., Battu, R., Ortega-Recalde, O., Nallathambi, J., Anandula, V. R., Renukaradhya, U., & Laissue, P. (2014). Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis. *PLoS One*, 9(10), e109576. doi:10.1371/journal.pone.0109576

- Patino, L. C., Beau, I., Carlosama, C., Buitrago, J. C., Gonzalez, R., Suarez, C. F., . . . Laissue, P. (2017). New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Hum Reprod*, *32*(7), 1512-1520. doi:10.1093/humrep/dex089
- Patino, L. C., Silgado, D., & Laissue, P. (2017). A potential functional association between mutant BMPR2 and primary ovarian insufficiency. *Syst Biol Reprod Med*, *63*(3), 145-149. doi:10.1080/19396368.2017.1291767
- Patino, L. C., Walton, K. L., Mueller, T. D., Johnson, K. E., Stocker, W., Richani, D., . . . Harrison, C. A. (2017). BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9. *J Clin Endocrinol Metab*, *102*(3), 1009-1019. doi:10.1210/jc.2016-3503
- Pennington, K. A., Schlitt, J. M., Jackson, D. L., Schulz, L. C., & Schust, D. J. (2012). Preeclampsia: multiple approaches for a multifactorial disease. *Dis Model Mech*, *5*(1), 9-18. doi:10.1242/dmm.008516
- Petla, L. T., Chikkala, R., Ratnakar, K. S., Kodati, V., & Sritharan, V. (2013). Biomarkers for the management of pre-eclampsia in pregnant women. *Indian J Med Res*, *138*, 60-67.
- Powe, C. E., Levine, R. J., & Karumanchi, S. A. (2011). Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation*, *123*(24), 2856-2869. doi:10.1161/circulationaha.109.853127
- Prada, C. F., & Laissue, P. (2014). A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics. *Mamm Genome*, *25*(11-12), 618-635. doi:10.1007/s00335-014-9537-8
- Queimado, L., Lopes, C., Du, F., Martins, C., Bowcock, A. M., Soares, J., & Lovett, M. (1999). Pleomorphic adenoma gene 1 is expressed in cultured benign and malignant salivary gland tumor cells. *Lab Invest*, *79*(5), 583-589.
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Fukuda, M., Gonzalez, R., Suarez, C. F., Patarroyo, M. A., . . . Laissue, P. (2017). Novel genes and mutations in patients affected by recurrent pregnancy loss. *PLoS One*, *12*(10), e0186149. doi:10.1371/journal.pone.0186149
- Quintero-Ronderos, P., Mercier, E., Gris, J. C., Esteban-Perez, C., Moreno-Ortiz, H., Fonseca, D. J., . . . Laissue, P. (2017). THBD sequence variants potentially related to recurrent pregnancy loss. *Reprod Biol Endocrinol*, *15*(1), 92. doi:10.1186/s12958-017-0311-0
- Ramma, W., & Ahmed, A. (2011). Is inflammation the cause of pre-eclampsia? *Biochem Soc Trans*, *39*(6), 1619-1627. doi:10.1042/bst20110672

- Rigourd, V., Chauvet, C., Chelbi, S. T., Rebourcet, R., Mondon, F., Letourneur, F., . . . Vaiman, D. (2008). STOX1 Overexpression in Choriocarcinoma Cells Mimics Transcriptional Alterations Observed in Preeclamptic Placentas. *PLoS ONE*, *3*(12), e3905. doi:10.1371/journal.pone.0003905
- Rigourd, V., Chelbi, S., Chauvet, C., Rebourcet, R., Barbaux, S., Bessieres, B., . . . Vaiman, D. (2009). Re-evaluation of the role of STOX1 transcription factor in placental development and preeclampsia. *J Reprod Immunol*, *82*(2), 174-181. doi:10.1016/j.jri.2009.05.001
- Roland, C. S., Hu, J., Ren, C. E., Chen, H., Li, J., Varvoutis, M. S., . . . Jiang, S. W. (2016). Morphological changes of placental syncytium and their implications for the pathogenesis of preeclampsia. *Cell Mol Life Sci*, *73*(2), 365-376. doi:10.1007/s00018-015-2069-x
- Roy, A. L., & Singer, D. S. (2015). Core promoters in transcription: old problem, new insights. *Trends Biochem Sci*, *40*(3), 165-171. doi:10.1016/j.tibs.2015.01.007
- Salonen Ros, H., Lichtenstein, P., Lipworth, L., & Cnattingius, S. (2000). Genetic effects on the liability of developing pre-eclampsia and gestational hypertension. *Am J Med Genet*, *91*(4), 256-260.
- Simoncini, S., Njock, M. S., Robert, S., Camoin-Jau, L., Sampol, J., Harle, J. R., . . . Anfosso, F. (2009). TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res*, *104*(8), 943-951. doi:10.1161/circresaha.108.183285
- SIVIGILA. (2013). Mortalidad Materna. In.
- Staff, A. C., Benton, S. J., von Dadelszen, P., Roberts, J. M., Taylor, R. N., Powers, R. W., . . . Redman, C. W. (2013). Redefining preeclampsia using placenta-derived biomarkers. *Hypertension*, *61*(5), 932-942. doi:10.1161/hypertensionaha.111.00250
- Thulluru, H. K., Park, C., Dufort, D., Kleiverda, G., Oudejans, C., & van Dijk, M. (2013). Maternal Nodal inversely affects NODAL and STOX1 expression in the fetal placenta. *Front Genet*, *4*, 170. doi:10.3389/fgene.2013.00170
- Uzan, J., Carbonnel, M., Piconne, O., Asmar, R., & Ayoubi, J. M. (2011). Pre-eclampsia: pathophysiology, diagnosis, and management. *Vasc Health Risk Manag*, *7*, 467-474. doi:10.2147/vhrm.s20181
- Vaiman, D., & Miralles, F. (2016). Targeting STOX1 in the therapy of preeclampsia. *Expert Opin Ther Targets*, *20*(12), 1433-1443. doi:10.1080/14728222.2016.1253682

- Valenzuela, F. J., Pérez-Sepúlveda, A., Torres, M. J., Correa, P., Repetto, G. M., & Illanes, S. E. (2012). Pathogenesis of Preeclampsia: The Genetic Component. *Journal of Pregnancy*, 2012, 632732. doi:10.1155/2012/632732
- Valero-Rubio, D., Jimenez, K. M., Fonseca, D. J., Payan-Gomez, C., & Laissue, P. (2018). Transcriptomic analysis of FUCA1 knockdown in keratinocytes reveals new insights in the pathogenesis of fucosidosis skin lesions. *Exp Dermatol*. doi:10.1111/exd.13532
- van Abel, D., Michel, O., Veerhuis, R., Jacobs, M., van Dijk, M., & Oudejans, C. B. (2012). Direct downregulation of CNTNAP2 by STOX1A is associated with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 31(4), 793-800. doi:10.3233/jad-2012-120472
- van Dijk, M., Drewlo, S., & Oudejans, C. B. (2010). Differential methylation of STOX1 in human placenta. *Epigenetics*, 5(8), 736-742. doi:10.4161/epi.5.8.13084
- van Dijk, M., Mulders, J., Poutsma, A., Konst, A. A., Lachmeijer, A. M., Dekker, G. A., . . . Oudejans, C. B. (2005). Maternal segregation of the Dutch preeclampsia locus at 10q22 with a new member of the winged helix gene family. *Nat Genet*, 37(5), 514-519. doi:10.1038/ng1541
- van Dijk, M., & Oudejans, C. B. M. (2011). STOX1: Key Player in Trophoblast Dysfunction Underlying Early Onset Preeclampsia with Growth Retardation. *Journal of Pregnancy*, 2011, 521826. doi:10.1155/2011/521826
- van Dijk, M., van Bezu, J., van Abel, D., Dunk, C., Blankenstein, M. A., Oudejans, C. B., & Lye, S. J. (2010). The STOX1 genotype associated with pre-eclampsia leads to a reduction of trophoblast invasion by alpha-T-catenin upregulation. *Hum Mol Genet*, 19(13), 2658-2667. doi:10.1093/hmg/ddq152
- Vatin, M., Bouvier, S., Bellazi, L., Montagutelli, X., Laissue, P., Ziyat, A., . . . Gris, J. C. (2014). Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss. *Am J Pathol*, 184(2), 362-368. doi:10.1016/j.ajpath.2013.10.024
- Wang, A., Rana, S., & Karumanchi, S. A. (2009). Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiology (Bethesda)*, 24, 147-158. doi:10.1152/physiol.00043.2008
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., . . . et al. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3(6), 673-682.
- Williams, P. J., & Broughton Pipkin, F. (2011). The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 25(4), 405-417. doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.02.007

- Williams, P. J., & Broughton Pipkin, F. (2011). The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(4-4), 405-417. doi:10.1016/j.bpobgyn.2011.02.007
- Xie, Z., Hu, S., Qian, J., Blackshaw, S., & Zhu, H. (2011). Systematic characterization of protein-DNA interactions. *Cell Mol Life Sci*, 68(10), 1657-1668. doi:10.1007/s00018-010-0617-y

10. ANEXOS

Anexo 1 Análisis in silico del promotor de *STOX1*. Tabla TFBS

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$TCF7L1.01	HMG box transcription factor Tcf7l1 (TCF3)	0,86	3	19	+	0,783	0,866	catgatGAAAggtgcc
V\$CDX2.02	Caudal type homeobox transcription factor 2	0,85	17	35	+	1	0,9	tccttagtTTATtctcctg
V\$ISL1.01	Pancreatic and intestinal lim-homeodomain factor	0,82	17	39	-	1	0,883	ttcacaggaTAATAaactaa gga
V\$HOXB5.01	Homeobox B5 / Hox-2alpha	0,84	17	35	-	1	0,852	caggaTAATAaactaagga
V\$SATB1.01	Special AT-rich sequence-binding protein 1, predominantly expressed in thymocytes, binds to matrix attachment regions (MARs)	0,94	18	32	-	1	0,943	gatAATAaactaagg
V\$OCT1.03	Octamer-binding transcription factor-1, POU class 2 homeobox 1 (POU2F1)	0,85	19	33	+	1	0,864	cttagtttATTAtcc
V\$VAX1.01	Ventral anterior homeobox 1	0,84	19	37	+	0,762	0,846	cttagtTATTatcctgtg
V\$HOXC13.01	Homeodomain transcription factor HOXC13	0,91	20	36	-	1	0,918	acaggataaTAAActaa
V\$HOXB5.01	Homeobox B5 / Hox-2alpha	0,84	20	38	+	0,763	0,857	ttagtTTATtctcctgtga
V\$PDX1.01	Pdx1 (IDX1/IPF1) pancreatic and intestinal homeodomain TF	0,74	21	39	-	1	0,741	ttcacaggaTAATAaacta
V\$EVI1.06	Ecotropic viral integration site 1 encoded factor, amino-terminal zinc finger domain	0,83	23	39	-	0,75	0,875	ttcacaGGATAataaac
V\$GATA3.01	GATA-binding factor 3	0,91	24	36	-	1	0,917	acagGATAataaa
V\$CEBPB.02	CCAAT/enhancer binding protein beta	0,91	29	43	+	1	0,984	tatccTGTGaatag
V\$ZBRK1.01	Transcription factor with 8 central zinc fingers and an N-terminal KRAB domain	0,77	45	69	-	0,814	0,771	tctgggccTCAGaatgtcc cagct
V\$HSF2.02	Heat shock factor 2	0,95	47	71	-	1	0,953	tctctgggctcAGAAatgt cccag
V\$STAT5B.01	Signal transducer and activator of transcription 5B	0,92	50	68	-	1	0,935	ctgggctcAGAAatgtcc
V\$PAX6.02	PAX6 paired domain and homeodomain are required for binding to this site	0,87	56	74	+	1	0,872	ttctgagccCAGagaagg
V\$MOK2.01	Ribonucleoprotein associated zinc finger protein MOK-2 (mouse)	0,74	56	76	-	0,75	0,777	tccttctctgggCCTCaga a

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$PLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0,88	58	80	+	1	0,933	ctGAGGcccagagaagggaata
V\$SRF.03	Serum response factor	0,79	60	78	-	0,803	0,816	tttccctctCTGGgcctc
V\$SRF.05	Serum response factor	0,8	61	79	+	1	0,918	aggcccagagAAGGgaaat
V\$NACA1.01	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha 1	0,92	62	74	+	1	0,967	ggccCAGAgagg
V\$NFAT5.01	Nuclear factor of activated T-cells 5	0,83	70	88	+	1	0,836	gaagGGAaataacttgaat
V\$TST1.01	POU-factor Tst-1/Oct-6	0,9	72	90	+	0,9	0,912	agggaAATAacttgaatga
V\$HSF1.03	Heat shock factor 1	0,76	72	96	+	0,868	0,842	agggaataactTGAAtgacaggt
V\$HBP1.02	HMG box-containing protein 1	0,83	79	101	+	1	0,936	taacttgAATGaacaggttgga
V\$FAST1.01	FAST-1 SMAD interacting protein	0,81	82	98	-	0,85	0,828	caactgttCATTcaag
V\$GRHL2.01	Grainyhead-like 2 (BOM, TFCP2L3)	0,86	87	99	-	1	0,924	ccAACctgttcat
V\$GRHL1.01	Grainyhead-like 1 (LBP32, MGR, TFCP2L2)	0,86	88	100	+	1	0,907	tgaacaGGTTggg
V\$ESRRG.01	Estrogen-related receptor gamma, homodimer DR4 binding site	0,73	91	113	+	0,79	0,751	acaggttgggagcaGGCCaggcg
V\$NF1.04	Nuclear factor 1	0,9	93	113	-	1	0,936	cgctggcctgctcCCAAct
V\$NF1.04	Nuclear factor 1	0,9	93	113	+	0,852	0,902	aggttgggagcaggCCAGgcg
V\$E2F4.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	0,96	114	130	+	1	0,968	atgtgGCGGgcacctgt
V\$HINFP.01	Histone H4 transcription factor, MIZF, dimeric binding site	0,72	118	136	+	0,795	0,737	ggCGGGcacctgtagtc
V\$TCFE2A.01	Transcription factor E2a (E12/E47)	0,97	119	135	-	1	0,978	ggactacaGGTGcccgc
V\$AREB6.03	AREB6 (Atp1a1 regulatory element binding factor 6)	0,96	120	132	+	1	0,968	cgggCACctgtag
V\$GATA2.02	GATA-binding factor 2	0,9	148	160	+	0,853	0,918	ctgaGATCagagg
V\$CUX1.01	Cut-like homeobox 1, dimeric binding site	0,69	149	171	-	1	0,706	gctcaagCGATcctctgatctca
V\$KLF12.01	Kruppel-like factor 12 (Kubota et al.)	0,91	182	200	-	1	0,922	gagtgcGTGGctattcac
V\$RFX2.02	Regulatory factor X 2	0,84	198	216	+	1	0,841	ctccagctgggCAACaca
V\$ZIC3.01	Zic family member 3 (odd-paired Drosophila homolog)	0,88	210	224	+	1	0,897	caacaCAGCgagacc

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$FOXP1_ES.01	Alternative splicing variant of FOXP1, activated in ESCs	1	229	245	+	1	1	ctcaaaaAACAAAaata
V\$IRF4.01	Interferon regulatory factor (IRF)-related protein (NF-EM5, PIP, LSIRF, ICSAT)	0,94	232	256	+	1	0,946	aaaaaacaaaataGAAAc aaaca
V\$CABL.01	Multifunctional c-Abl src type tyrosine kinase	0,97	234	244	+	1	0,997	aaAACAAAaat
V\$DMRT7.01	Doublesex and mab-3 related transcription factor 7	0,81	237	257	-	0,946	0,835	gttgTTTGtttctattttgt
V\$HFH3.01	HNF-3/Fkh Homolog 3 (FOXI1, Freac-6)	0,97	244	260	+	1	0,974	tagaaacAAACAactag
V\$RB_E2F1_DP1.01	RB/E2F-1/DP-1 heterotrimeric complex	0,71	258	274	-	1	0,742	gttctGCGCctaagcta
V\$E2F.03	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	0,85	261	277	+	1	0,87	cttagGCGCagaactga
O\$DINR.01	Drosophila initiator motifs	0,94	269	279	-	1	0,974	tcTCAGTtctg
V\$BRACH.01	Brachyury	0,66	269	297	-	1	0,727	aggaaacctAGGTttgagtc tcagttctg
V\$BRACH.01	Brachyury	0,66	280	308	+	1	0,666	ctcaaacctAGGTtctctgct caaccccc
V\$TBX20.01	T-box transcription factor TBX20	1	295	323	-	1	1	gggcctgggAGGTgtggg ggttgagcagg
V\$WT1.01	Wilms Tumor Suppressor	0,92	296	314	-	1	0,962	aggtgTGGGggttgagcag
V\$NGFIC.01	Nerve growth factor-induced protein C	0,8	298	316	-	0,755	0,807	ggagGTGTggggggttgag c
V\$ZNF202.01	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	0,73	300	322	+	1	0,739	tcaaccCCCACacctcccag gcc
V\$ZNF143.01	Zinc finger protein 143	0,69	302	332	+	1	0,711	aacccccacaccTCCAgg cccccgctgaca
V\$RREB1.01	Ras-responsive element binding protein 1	0,8	305	319	+	1	0,892	cCCCACacctcccag
V\$GLI1.01	Zinc finger transcription factor GLI1	0,87	308	324	+	1	0,917	cacacctCCCAGgcccc
V\$EGR1.03	EGR1, early growth response 1	0,84	313	331	-	1	0,841	gtcagcgGGGcctggga g
V\$ZFX.01	X-linked zinc finger protein	0,97	314	324	-	1	0,992	ggGCCctggga
V\$SZF1.01	SZF1, hematopoietic progenitor-restricted KRAB-zinc finger protein	0,82	314	338	-	1	0,88	tgaGGGTgtcagcggggg cctggga
V\$PLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0,88	317	339	-	1	0,896	ctGAGGgtgtcagcggggg cctg
V\$AP4.01	Activator protein 4	0,85	318	334	-	1	0,865	ggtgtCAGCgggggct

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
O\$ZSCAN4.01	Zinc finger and SCAN domain containing 4	0,76	319	333	+	0,797	0,785	gGCCCccgctgacac
V\$ZIC3.03	Zinc finger protein of the cerebellum (Zic3)	0,91	320	334	-	1	0,914	ggtgtCAGCgggggc
V\$SIX4.01	Sine oculis homeobox homolog 4	0,88	325	339	-	1	0,953	ctgaggGTGTcagcg
V\$GCM1.01	Glial cells missing homolog 1, chorion-specific transcription factor GCMA	0,85	328	342	+	1	0,932	tgacaCCCTcaggt
V\$AP2.02	Activator protein 2 alpha	0,92	330	344	-	1	0,975	acaGCCTgagggtgt
V\$TCFAP2E.01	Transcription factor AP-2, epsilon	0,91	330	344	+	1	0,914	acaccctcAGGCtgt
V\$GRE.03	Glucocorticoid receptor, IR3 sites	0,88	331	349	+	1	0,89	caccctcagcgTGTTctc
V\$NMYC.02	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived	0,92	342	358	+	1	0,923	tgttctCGTGgttgc
V\$BHLHB2.02	Basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2 (secondary DNA binding preference)	0,8	343	357	+	1	0,812	gttctCGTGgttgc
V\$AML3.01	Runt-related transcription factor 2 / CBFA1 (core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1)	0,84	346	360	+	1	0,842	cctcGTGGttgctaa
V\$RFX5.01	Regulatory factor X, 5 (influences HLA class II expression)	0,91	350	368	-	1	0,951	gtccaagtAGCAaccac
V\$PAX1.01	Pax1 paired domain protein, expressed in the developing vertebral column of mouse embryos	0,65	352	370	-	1	0,663	cCGTTccaagttagcaacc
V\$TCF2.01	Hepatocyte nuclear factor 1 beta (HNF1B)	0,79	353	369	-	1	0,795	cgttcaaGTTAgcaac
V\$VMYB.05	v-Myb, variant of AMV v-myb	0,9	356	376	+	1	0,937	gctaactggAACGgcccc aa
V\$NF1.04	Nuclear factor 1	0,9	359	379	-	1	0,926	gctttggggccgttCAAgt t
V\$NF1.04	Nuclear factor 1	0,9	359	379	+	1	0,922	aacttgaacggccCAAa gc
V\$CREL.01	c-Rel	0,91	361	375	-	1	0,918	tggggcccTTCCAag
V\$E2F.02	E2F, involved in cell cycle regulation, interacts with Rb p107 protein	0,84	365	381	+	1	0,849	gaacggcccCAAagcca
V\$TR4.02	TR4 homodimer, DR1 site	0,75	375	399	+	1	0,76	aaagccAGGTcgaaggcg agtctcc
V\$ZTRE.04	3' half site of ZTRE motif	0,94	391	407	-	0,855	0,946	cagGGCGgggagactcg
V\$E2F1.01	E2F transcription factor 1	0,97	392	408	-	1	0,981	ccagGGCGgggagactc

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$MZF1.01	Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	393	403	-	1	0,992	gcGGGGagact
V\$ZBTB7.03	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokemon	0,88	393	415	+	1	0,889	agtctCCCCgcctgggga ctcc
V\$ZBED4.01	Zinc finger, BED-type containing 4; GC-box binding sites	0,93	394	408	-	1	0,951	ccaGGGCggggagac
V\$SP1.03	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	0,91	394	410	-	1	0,95	ccccaGGGCggggagac
V\$EBF1.01	Early B-cell factor 1	0,88	395	417	-	1	0,982	caggagTCCCcaggcgg ggaga
V\$MAZ.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0,9	395	407	-	0,867	0,914	caggGCGGggaga
V\$ZTRE.01	ZTRE motifs (1 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	397	413	-	0,879	0,781	agtccccaGGGCgggga
V\$ZTRE.02	ZTRE motifs (2 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	399	415	+	1	0,781	ccCGCCctggggactcc
V\$TCFAP2A.02	Transcription factor AP-2, alpha	0,94	400	414	+	1	0,973	ccgcCCTGgggactc
V\$TCFAP2B.01	Transcription factor AP-2, beta	0,86	400	414	-	0,784	0,863	gagTCCCcaggcgg
V\$GLIS1.01	GLIS family zinc finger 1	0,76	400	416	-	0,824	0,801	aggagtcccCAGGgcgg
V\$MYBL1.02	V-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog-like 1 (AMYB) (secondary DNA binding preference)	0,83	418	438	-	1	0,843	ccgccgtcggAACTgcag cgc
V\$NRSE.01	Neural-restrictive-silencer-element	0,67	418	448	+	1	0,671	gcgctgcagttgcacggCG GAtggacgcag
V\$RBPJK.01	Mammalian transcriptional repressor RBP-Jkappa/CBF1	0,87	424	436	-	0,777	0,896	gccgTGCGaactg
V\$DMP1.02	Cyclin D binding myb-like transcription factor	0,88	432	446	+	1	0,98	acggcGGATggacgc
V\$HINFP.01	Histone H4 transcription factor, MIZF, dimeric binding site	0,72	434	452	+	1	0,808	ggCGGAtggacgcagtca g
V\$SIX2.02	Sine oculis homeobox homolog 2	0,94	446	458	+	1	0,95	cagTCAGgttctc
V\$OLF1.01	Olfactory neuron-specific factor	0,82	448	470	-	1	0,901	cgcagcTCCCtggagaacc tgac
V\$IR2_NGRE.01	Repressive binding sites for glucocorticoid receptor (IR2)	0,8	453	467	-	1	0,987	agCTCCctggagaac
V\$IR2_NGRE.01	Repressive binding sites for glucocorticoid receptor (IR2)	0,8	454	468	+	1	0,883	ttCTCCaggagactg
V\$TCFAP2A.02	Transcription factor AP-2, alpha	0,94	472	486	-	1	0,949	aagtCCTGgggctcc

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$NF1.04	Nuclear factor 1	0,9	482	502	-	1	0,922	gctctggggttttCCAAgtc
V\$NFAT5.02	Nuclear factor of activated T-cells 5	0,87	483	501	+	1	0,929	acttGGAAaaacccagag
V\$CREL.01	c-Rel	0,91	484	498	-	1	0,972	tggggtttTTCCAag
V\$NMP4.01	NMP4 (nuclear matrix protein 4) / CIZ (Cas-interacting zinc finger protein)	0,97	487	497	+	1	0,987	ggAAAAacccc
V\$AML3.01	Runt-related transcription factor 2 / CBFA1 (core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1)	0,84	487	501	-	0,767	0,849	ctctGGGGtttttcc
V\$PLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0,88	489	511	-	0,958	0,905	caGGGGgcgcctctggggt tttt
V\$E2F3.01	E2F transcription factor 3	0,85	495	511	-	1	0,92	cagggGCGCgctctggg
V\$ZF5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	0,95	496	510	-	1	0,962	aggggcGCGCtctgg
V\$E2F2.01	E2F transcription factor 2	0,85	496	512	+	1	0,951	ccagaGCGCgcccctgg
V\$ZF5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	0,95	497	511	+	1	0,955	cagagcGCGCccctg
V\$CDE.01	Cell cycle-dependent element, CDF-1 binding site (CDE/CHR tandem elements regulate cell cycle dependent repression)	0,87	497	509	-	1	0,918	ggggGCGCtctg
V\$CTCF.01	CCCTC-binding factor	0,8	498	524	+	1	0,874	agagcgcgccctgGGGG aaggggagc
V\$E2F3.01	E2F transcription factor 3	0,85	498	514	+	1	0,856	agagcGCGCccctgggg
V\$EBF1.01	Early B-cell factor 1	0,88	499	521	-	0,775	0,887	cccctCCCCcaggggcgc gctc
V\$EBF1.01	Early B-cell factor 1	0,88	499	521	+	0,776	0,882	gagcgcGCCCctggggga agggg
V\$ZTRE.02	ZTRE motifs (2 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	501	517	-	0,844	0,787	ttCCCCcaggggcgcgc
V\$ROAZ.01	Rat C2H2 Zn finger protein involved in olfactory neuronal differentiation	0,73	501	517	+	0,75	0,775	gcGCGCccctgggggaa
V\$TCFAP2B.01	Transcription factor AP-2, beta	0,86	502	516	+	1	0,862	cgcGCCCctggggga
V\$ZTRE.02	ZTRE motifs (2 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	502	518	+	1	0,795	cgCGCCcctgggggaag
V\$ZIC3.02	Zic family member 3 (odd-paired Drosophila homolog)	0,77	503	519	-	1	0,774	ccttcCCCCaggggcgc
V\$TCFAP2A.02	Transcription factor AP-2, alpha	0,94	504	518	+	1	0,969	cgccCCTGgggggaag

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$TCFAP2A.01	Transcription factor AP-2, alpha	0,93	504	518	-	1	0,952	cttcccccAGGGgcg
V\$SPI1.02	SPI-1 proto-oncogene; hematopoietic transcription factor PU.1	0,96	506	526	+	1	0,96	ccctgggGGAAGgggagctc
V\$KLF.01	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	0,91	509	527	+	1	0,927	ctgggggaaGGGGagctc g
V\$MZF1.02	Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	510	520	+	1	0,995	tgGGGgaaggg
V\$MZF1.02	Myeloid zinc finger protein MZF1	0,99	516	526	+	1	0,991	aaGGGGagctc
V\$CTCFL.01	CCCTC-binding factor (Queimado et al.)-like (Haberle & Lenhard)	0,82	523	549	+	0,813	0,865	gctcgggacctcgaggcGGCTggaagt
V\$CETS1P54.01	c-Ets-1(p54)	0,92	536	556	+	0,843	0,931	aggcggCTGgaagtgcaggc
V\$PLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0,88	549	571	+	1	0,929	tcGAGGgcatcgcagggggccc
V\$NFKAPPAB50.01	NF-kappaB (p50)	0,83	550	564	-	0,75	0,865	ctgGCGAtgccctcg
V\$CTCFL.01	CCCTC-binding factor (Queimado et al.)-like (Haberle & Lenhard)	0,82	550	576	+	0,815	0,863	cgagggcatcgcaggggGCCgagttg
V\$XBOX.01	Motif bound by regulatory factor X (RFX) proteins	0,9	555	573	+	0,875	0,908	gcatcgccaGGGGgccgag
V\$IR2_NGRE.01	Repressive binding sites for glucocorticoid receptor (IR2)	0,8	556	570	-	0,759	0,804	ggCCCCctggcgatg
V\$AP2.01	Activator protein 2	0,9	557	571	+	0,831	0,925	atcGCCAgggggccg
V\$PLAG1.02	Pleomorphic adenoma gene 1	0,97	562	584	+	1	1	caGGGGgccgagttgggcccggg
V\$BKLF.01	Basic krueppel-like factor (KLF3)	0,95	577	595	+	1	0,961	ggcccGGGTgtggagaacg
V\$NUDR.01	NUDR (nuclear DEAF-1 related transcriptional regulator protein)	0,73	587	605	-	1	0,74	cgtTCGgcttcttcca
V\$IRF8.01	Interferon consensus sequence binding protein 1, interferon regulatory factor 8, dimeric binding site	0,71	587	611	+	0,75	0,724	tggagaacGAAGccgaacgctgggc
O\$HMTE.01	Human motif ten element	0,88	595	615	+	0,961	0,906	gaAGCCgaacgctgggctctg
V\$ZNF217.01	Zinc finger protein 217	0,9	601	613	+	0,922	0,913	GAACgctgggctc
V\$NRSE.01	Neural-restrictive-silencer-element	0,67	625	655	-	1	0,708	cggcctgcttaggccggCGGAgcgcctctgg

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$HDBP1_2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (SLC2A4 regulator and papillomavirus binding factor)	0,84	629	647	-	1	0,906	cttaggCCGGcggagcgct
V\$NXF_ARNT.01	bHLH-PAS type transcription factors NXF/ARNT heterodimer	0,9	638	662	-	1	0,906	ggtagggcgCGTGcttagggcg
V\$HINFP.01	Histone H4 transcription factor, MIZF, dimeric binding site	0,72	639	657	-	0,796	0,791	ggCGGCcgtgcttagggcg
V\$SP1.03	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	0,91	647	663	-	1	0,912	gggtgGGCgcccgtgc
V\$KLF6.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	0,89	647	665	-	1	0,896	gggggtGGGcggccgtgc
V\$EGR1.02	EGR1, early growth response 1	0,88	648	666	-	1	0,89	cgggggtGGGcggccgtg
V\$IKLF.01	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	0,91	650	668	-	1	0,999	gcccggGGTggggcgccg
V\$NM23.01	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	0,89	650	666	-	1	0,939	cgGGGTggggcgccg
V\$ZKSCAN3.01	Zinc finger with KRAB and SCAN domains 3	1	651	673	+	1	1	ggccgCCCCacccccggcc
V\$KLF6.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	0,89	652	670	-	1	0,968	ggggcgGGGTggggcgcc
V\$GC.01	GC box elements	0,88	652	668	-	0,872	0,946	gcccggGGTgcccggc
V\$ZBP89.01	Zinc finger transcription factor ZBP-89	0,93	653	675	+	1	0,959	cccccCaCCCCcggcccggc
V\$MAZR.01	MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0,88	653	665	-	1	0,925	gggggtGGGcgg
V\$CTCF.01	CCCTC-binding factor	0,8	653	679	-	1	0,873	gcccctggcggccGGGgtggggcg
V\$SALL2.01	Zinc finger protein Spalt-2, sal-like 2, p150(sal2)	0,91	655	665	-	1	0,962	ggggGTGGggc
V\$ZTRE.01	ZTRE motifs (1 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	655	671	-	0,848	0,764	cgggcccggGGTggggc
V\$ZNF219.01	Kruppel-like zinc finger protein 219	0,91	656	678	+	1	0,989	ccccCaCCCCcggcccggc
V\$ZBED4.02	Zinc finger, BED-type containing 4; polyG binding sites	0,92	658	672	-	1	0,952	gcccggcGGGgtgg
V\$LRRFIPI.01	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	0,82	658	676	+	1	0,914	ccaCCCCcggcccggc

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$HDBP1_2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (SLC2A4 regulator and papillomavirus binding factor)	0,84	658	676	+	1	0,864	ccaccCCGGcccgcag g
V\$CP2.02	LBP-1c (leader-binding protein-1c), LSF (late SV40 factor), CP2, SEF (SAA3 enhancer factor)	0,84	665	683	-	1	0,845	gACTGcgcctggcggcc g
V\$HES1.01	Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1 (HES-1)	0,92	669	683	+	0,944	0,932	ccgccagGCGCagtc
V\$ZSCAN10.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF206, Zfp206)	0,8	673	689	-	1	0,806	ggggccgacTGCGcctg
V\$PLAG1.02	Pleomorphic adenoma gene 1	0,97	675	697	-	1	1	caGGGGcggggccgact gccc
V\$E2F4.01	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding protein	0,96	680	696	-	1	0,989	aggggGCGGggccgact
V\$IKLF.01	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	0,91	680	698	-	0,94	0,988	ccaggGGGcggggccgac t
V\$NM23.01	NME/NM23 nucleoside diphosphate kinase1 and 2	0,89	680	696	-	1	0,907	agGGGGcggggccgact
V\$ZBTB7.03	Zinc finger and BTB domain containing 7A, pokemon	0,88	681	703	+	1	0,947	gtcggCCCCgcccctgga gtc
V\$SP1.01	Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	0,88	682	698	-	1	1	ccaggGGGcggggccga
V\$KLF6.01	Core promoter-binding protein (CPBP) with 3 Krueppel-type zinc fingers (KLF6, ZF9)	0,89	682	700	-	1	0,977	ctccagGGGcggggccg a
V\$ZBED4.01	Zinc finger, BED-type containing 4; GC-box binding sites	0,93	682	696	-	1	0,96	aggGGGcggggccga
V\$LRRFIP1.01	Leucine rich repeat (in FLII) interacting protein 1	0,82	682	700	+	0,789	0,824	tcgCCCCgcccctggag
V\$ZBP89.01	Zinc finger transcription factor ZBP-89	0,93	683	705	+	1	0,954	cggccccgCCCCctggagc tccg
V\$MAZR.01	MYC-associated zinc finger protein related transcription factor	0,88	683	695	-	1	0,932	gggggcGGGccg
V\$CTCFL.01	CCCTC-binding factor (Queimado et al.)-like (Haberle & Lenhard)	0,82	683	709	-	1	0,911	ggaacggagctccaggGG CGgggccc
O\$XCPE1.01	X gene core promoter element 1	0,8	683	693	-	1	0,877	ggGCGGggccc
V\$EGR1.03	EGR1, early growth response 1	0,84	683	701	-	1	0,864	gctccagGGGcggggcc g

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$ZTRE.02	ZTRE motifs (2 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	686	702	-	0,969	0,756	agCTCCagggggcggggg
V\$ZTRE.02	ZTRE motifs (2 bp spacer), ZNF658 binding site	0,75	687	703	+	1	0,765	ccCGCCccctggagctc
V\$VMYB.05	v-Myb, variant of AMV v-myb	0,9	697	717	-	1	0,924	ctgccgggggAACGgagctcc
V\$EBF1.01	Early B-cell factor 1	0,88	701	723	+	1	0,884	ctcgtTCCcggcagccagcg
V\$RFX1.02	X-box binding protein RFX1	0,9	702	720	-	0,882	0,912	tggtgccgggGGAacgga
V\$XBOX.01	Motif bound by regulatory factor X (RFX) proteins	0,9	703	721	+	0,844	0,928	ccgttccccCGGCagccag
V\$INSM1.01	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0,9	704	716	-	1	0,93	tgccgGGGaacg
V\$NRSE.01	Neural-restrictive-silencer-element	0,67	709	739	+	1	0,74	ccccggcagccagcggcCGGAcccggcgc
V\$PAX5.01	B-cell-specific activator protein	0,79	711	739	+	0,81	0,832	ccggcaGCCAgcggcgggaccggcgc
V\$ZBTB3.01	Zinc finger and BTB domain containing 3	0,95	713	723	+	1	1	ggcaGCCAgeg
O\$HMTE.01	Human motif ten element	0,88	718	738	+	1	0,902	ccAGCGccgggaccggcgcg
O\$XCPE1.01	X gene core promoter element 1	0,8	727	737	-	1	0,845	gcGCGGgtccg
V\$ZF5.02	ZF5 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161	0,83	727	741	-	1	0,844	ctgcgCGCGggtccg
V\$E2F2.01	E2F transcription factor 2	0,85	728	744	-	1	0,933	cgactGCGCgcggtcc
V\$ZF5.02	ZF5 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161	0,83	728	742	+	1	0,842	ggaccCGCGcgcagt
V\$ZF5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	0,95	729	743	-	1	0,967	gactgcGCGCgggtc
V\$E2F2.01	E2F transcription factor 2	0,85	729	745	+	1	0,882	gaccGCGCgcagtcgg
V\$ZF5.02	ZF5 POZ domain zinc finger, zinc finger protein 161	0,83	730	744	+	1	0,863	accgCGCGcagtcg
V\$NRF1.02	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)	0,79	732	748	+	1	0,795	ccgcgCGCAgtcggccg
V\$ZSCAN10.01	Zinc finger and SCAN domain containing 10 (ZNF206, Zfp206)	0,8	733	749	-	1	0,809	tcggccgacTGCgcg
V\$NUDR.01	NUDR (nuclear DEAF-1 related transcriptional regulator protein)	0,73	734	752	-	1	0,772	ggaTCGGccgactgcgcgc
V\$ZNF263.02	Zinc finger protein 263, ZKSCAN12	0,91	746	760	+	1	0,91	ccgateCTCCgccc

Matrix	Detailed Matrix	Opt	Start	End	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
V\$E2F1.01	E2F transcription factor 1	0,97	747	763	-	1	0,985	gctcGGCGggaggatcg
V\$ZIC3.02	Zic family member 3 (odd-paired Drosophila homolog)	0,77	747	763	+	0,776	0,806	cgatcCTCCcgccgagc
O\$DMTE.01	Drosophila motif ten element	0,77	754	774	+	1	0,774	cccgccgAGCGagcgggcgtcg
V\$WHN.01	Winged helix protein, involved in hair keratinization and thymus epithelium differentiation	0,95	765	775	-	1	0,955	acgACGCcgct
O\$HMTE.01	Human motif ten element	0,88	769	789	-	1	0,968	cgAGCGcgggcgctacgacgc
O\$DMTE.01	Drosophila motif ten element	0,77	774	794	-	1	0,812	ctcgcgAGCGcgggcgctac
V\$ZF5.01	Zinc finger / POZ domain transcription factor	0,95	778	792	-	1	0,958	cgcgcaGCGCggcg
V\$NRSE.01	Neural-restrictive-silencer-element	0,67	780	810	-	0,783	0,769	gcccgaacgcagggcctCGGCgagcgcg
V\$PAX9.01	Zebrafish PAX9 binding sites	0,78	788	808	+	0,882	0,792	cgccgagccctgcGTTGcgg
V\$CTCF.02	Insulator protein CTCF (CCCTC-binding factor)	0,69	798	824	-	0,75	0,695	gcccggcgccggagccCGCAacgcag
V\$GCM1.02	Glial cells missing homolog 1	0,85	800	814	-	1	0,866	gggagCCCGcaacgc
V\$PLAGL1.01	Pleiomorphic adenoma gene-like 1	0,87	804	826	+	0,799	0,874	tggggGCTCccggccggcggcga
V\$HES1.01	Drosophila hairy and enhancer of split homologue 1 (HES-1)	0,92	805	819	-	0,833	0,921	cgccggGAGCccgc
V\$HDBP1_2.01	Huntington's disease gene regulatory region-binding protein 1 and 2 (SLC2A4 regulator and papillomavirus binding factor)	0,84	811	829	-	1	0,853	ctttcgCCGcgccggga
V\$AP2.01	Activator protein 2	0,9	813	827	-	0,881	0,955	ttcGCCGcgccgg

Opt: optimum threshold; **Start:** TFBS start position; **End:** transcription factor binding sites end position; **Matrix sim:** matrix similarity; **Core sim:** core similarity. **Sequence:** letras mayúsculas: secuencia central o *core* de una matriz definida como la secuencia consecutiva (generalmente 4 nucleótidos) más altamente conservada.