

Artículo original

Los polimorfismos de nucleótido único y los haplotipos de la región 3'UTR del gen *GATA4* contribuyen al riesgo genético de cardiopatía congénita



Silvia Pulignani, Cecilia Vecoli*, Saverio Sabina, Ilenia Foffa, Lamia Ait-Ali y Maria Grazia Andreassi

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Institute of Clinical Physiology, Pisa, Italia

Historia del artículo:

Recibido el 15 de septiembre de 2015

Aceptado el 22 de diciembre de 2015

On-line el 23 de abril de 2016

Palabras clave:

Haplotipo

Polimorfismos de nucleótido único

3'UTR

GATA4

Cardiopatía congénita

RESUMEN

Introducción y objetivos: Los polimorfismos de nucleótido único situados en un lugar de unión de microácidos ribonucleicos (miARN) pueden tener diferentes efectos en la expresión génica, y ello puede influir en el riesgo de enfermedad. Este estudio tiene como objetivo evaluar la asociación existente entre los polimorfismos de nucleótido único y los haplotipos presentes en la región 3'UTR del gen *GATA4* y el riesgo de cardiopatía congénita.

Métodos: Se utilizaron algoritmos de bioinformática para analizar los polimorfismos de nucleótido único en los presuntos lugares de unión de miARN en la región 3'UTR del gen *GATA4* y para calcular la diferencia de energía de hibridación libre (ΔFE , kcal/mol) para cada alelo de tipo natural (*wild-type*) en comparación con cada variante alélica.

Resultados: Formaron la población de estudio 146 pacientes caucásicos (73 varones; edad, $6,68 \pm 7,79$ años) y 265 recién nacidos sanos (147 varones). Se consideró que la suma de todos los ΔFE predecía la importancia biológica de los polimorfismos de nucleótido único al unirse a más miARN. A continuación se determinó el genotipo de los 4 polimorfismos (+1158 C > T, +1256 A > T, +1355 G > A, +1521 C > G) que tenían el valor predicho de ΔFE total más alto (9,91, 14,85, 11,03 y 21,66 kcal/mol respectivamente) en un estudio de casos y controles (146 pacientes y 250 controles). Al aplicar una corrección por multiplicidad de pruebas, tan solo el alelo +1158 T mostró una diferencia significativa entre los pacientes y los controles. El análisis de los haplotipos puso de manifiesto que el haplotipo T-T-G-C (más infrecuente en los pacientes con cardiopatías congénitas que en los controles) se asociaba a una disminución del riesgo significativa ($p = 0,03$), mientras que el haplotipo muy infrecuente C-A-A-C, que se daba de manera muy poco común en los controles (0,3%) en comparación con los pacientes con la enfermedad (2,4%), se asociaba a un aumento de 4 veces en el riesgo de enfermedad ($p = 0,04$).

Conclusiones: Las variantes frecuentes de la región 3'UTR del gen *GATA4* interaccionan de manera conjunta y con ello afectan a la susceptibilidad a la cardiopatía congénita, probablemente mediante la alteración de la regulación postranscripcional de los miARN.

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

3'UTR SNPs and Haplotypes in the *GATA4* Gene Contribute to the Genetic Risk of Congenital Heart Disease

ABSTRACT

Introduction and objectives: Single-nucleotide polymorphisms within a microRNA binding site can have different effects on gene expression, influencing the risk of disease. This study aimed to evaluate the association between single-nucleotide polymorphisms and haplotypes in the 3'UTR of the *GATA4* gene and congenital heart disease risk.

Methods: Bioinformatics algorithms were used to analyze single-nucleotide polymorphisms in putative microRNA-binding sites of *GATA4* 3'UTR and to calculate the difference in free energy of hybridization (ΔFE , kcal/mol) for each wild-type vs the variant allele.

Results: The study population comprised 146 Caucasian patients (73 males; 6.68 ± 7.79 years) and a 265 healthy newborn participants (147 males). The sum of all $|\Delta FE|$ was considered to predict the biological importance of single-nucleotide polymorphisms binding more microRNAs. Next, the 4 polymorphisms (+1158 C > T, +1256 A > T, +1355 G > A, +1521 C > G) with the highest predicted $|\Delta FE_{\text{tot}}|$ (9.91, 14.85, 11.03, 21.66 kcal/mol, respectively) were genotyped in a case-control study (146 patients and 250 controls). Applying a correction for multiple testing only the +1158 T allele was found to be associated with a

Keywords:

Haplotype

Single nucleotide polymorphisms

3'UTR

GATA4

Congenital heart disease

* Autor para correspondencia: CNR-Institute of Clinical Physiology, Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italia.
Correo electrónico: vecoli@icf.cnr.it (C. Vecoli).

reduced risk showing significant difference between patients and controls. Haplotype analysis showed that the T-T-G-C haplotype (more uncommon in congenital heart diseases than in controls) was associated with a significantly decreased risk ($P = .03$), while the rare C-A-A-C haplotype, which was very uncommon in controls (0.3%) compared with the disease (2.4%), was associated with a 4-fold increased risk of disease ($P = .04$).

Conclusions: Common variants in 3'UTR of the *GATA4* gene jointly interact, affecting the congenital heart disease susceptibility, probably by altering microRNA posttranscriptional regulation.

Full English text available from: www.revespcardiol.org/en

© 2016 Sociedad Española de Cardiología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Abreviaturas

3'UTR: región 3' no traducida
 ARN: ácido ribonucleico
 CC: cardiopatía congénita
 PCR: reacción en cadena de polimerasa
 SNP: polimorfismo de nucleótido único
 Δ FE: diferencia de energía de hibridación libre

INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías congénitas (CC) son los defectos neonatales de mayor prevalencia (entre 75 y 90 de cada 10.000 nacidos vivos en los últimos 20 años) y la principal causa de muerte por malformaciones congénitas durante el periodo neonatal y en el primer año de vida¹. Las CC comprenden un grupo heterogéneo de defectos cardiacos que surgen durante el desarrollo fetal. Hasta la fecha, los mecanismos moleculares que intervienen en esta cardiogénesis anormal continúan siendo en gran parte desconocidos. Se acepta que las variaciones genéticas y epigenéticas son la causa predominante de las CC, si bien la identificación de las alteraciones precisas ha resultado difícil, principalmente porque la CC es un proceso complejo².

Se ha identificado que los genes que participan en los controles transcripcionales, denominados factores de transcripción, desempeñan un papel importante en el desarrollo cardiaco^{3,4}. Concretamente, se ha señalado que el factor de transcripción *GATA4* es crucial para la especificación y el desarrollo normales del corazón^{5,6}. Por lo que respecta a los demás factores de transcripción, se ha identificado una larga lista de mutaciones del gen *GATA4* en los pacientes con CC, pero la contribución que cada una de estas mutaciones hace al riesgo de la enfermedad, sobre todo en lo relativo a las formas esporádicas, es muy pequeña y no está bien definida^{2,7,8}. Recientemente, en estudios experimentales se ha puesto de manifiesto que los microácidos ribonucleicos (miARN) (moléculas de ARN pequeñas, de ~20-22 nucleótidos, que no codifican proteínas) pueden modular la cardiogénesis alterando la expresión de esenciales proteínas reguladoras cardiacas^{7,9,10}. En consonancia con estas observaciones, los datos de nuestro grupo han indicado que los frecuentes polimorfismos de nucleótido único (SNP) que se dan en la región 3'UTR del gen *GATA4* alteran la unión de miARN-miARN y con ello causan una desregulación de la expresión del gen *GATA4*¹¹. El objetivo del presente trabajo es ampliar el análisis de la región 3'UTR del gen *GATA4* mediante el análisis de SNP seleccionados y de haplotipos relacionados en esta región, con objeto de confirmar su importante papel en la modulación del riesgo de CC.

MÉTODOS

Población en estudio

Formaron la población en estudio 146 pacientes caucásicos (73 varones; edad, $6,68 \pm 7,79$ años) a los que se había diagnosticado una CC no sindrómica aislada y el grupo de control, 265 recién nacidos sanos (147 varones). Se obtuvo una muestra de sangre venosa de los participantes adultos, mientras que de los recién nacidos (tanto los que tenían una CC como los controles) se obtuvo una muestra de sangre del cordón umbilical. Este estudio se llevó a cabo tras obtener el consentimiento informado de todos los participantes o sus progenitores, y fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación local.

Determinación del genotipo

Se aisló ADN genómico a partir de las muestras de sangre utilizando métodos estándar, según las instrucciones del fabricante (QIAGEN BioRobot EZ1 System). Se amplificó la secuencia de la región 3'UTR mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) empleando cebadores específicos según un método descrito con anterioridad¹². Los productos de la PCR se utilizaron para las reacciones de secuenciación de PCR mediante el CEQ DTCS Quick Start Kit. Después de la purificación, los productos de las reacciones de secuenciación se analizaron con una secuencia capilar CEQ 8800 (Beckman Coulter; Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante. Las secuencias resultantes se analizaron empleando el *software* CEQ 8800 y se alinearon frente a una secuencia de referencia obtenida del banco genético *Gen Bank BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*.

Selección del polimorfismo de nucleótido único

Las 10 variantes genéticas frecuentes localizadas en la región 3'UTR del gen *GATA4* que se observaron en nuestra población se analizaron para determinar presuntos lugares de unión de miARN empleando algoritmos de bioinformática, con objeto de calcular la diferencia de energía de hibridación libre (Δ FE, en kcal/mol) para cada alelo de tipo natural (*wild-type*) frente a la variante alélica, según un método descrito con anterioridad^{11,13}. De manera resumida, se utilizó el MicroSNiPer¹⁴ para predecir la repercusión de cada SNP en las presuntas dianas de miARN. Los dúplex de miARN/diana muy estables se caracterizan por tener una energía libre mínima (kcal/mol) muy baja, que se ha calculado tanto para los alelos comunes como para las variantes alélicas mediante el programa RNACofold¹⁵, del paquete Vienna RNA (versión 1.8.5). La diferencia de energía libre entre los 2 alelos se calculó como «variación de FE» (Δ FE). Se calculó la suma de todos los Δ FE

Tabla 1
Características de la población en estudio

Características	CC (n = 146)	Controles (n = 265)
Edad (años)	6,68 ± 7,79	0 ± 0
Varones/mujeres	73/73	147/118
Diagnóstico		
Cardiopatía congénita cianótica	56	
Defecto del tabique	52	
Lesión obstructiva en el lado izquierdo	6	
Lesión mixta	30	
Ventrículo único	2	

CC: cardiopatías congénitas.

Los valores expresan n o media ± desviación estándar.

($|\Delta FE_{tot}|$) para predecir la importancia biológica de los SNP que se unían a un mayor número de miARN.

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo pruebas de asociación de *locus* único entre las frecuencias de alelos de los SNP y el carácter de caso-control

mediante la prueba estándar de la t de Student para datos no apareados y el análisis de la χ^2 , utilizando para ello el paquete informático estadístico StatView, versión 5.0.1 (Abacus Concepts; Berkeley, California). Se aplicó un análisis de regresión logística para estimar la *odds ratio* (OR) y el intervalo de confianza del 95% (IC95%) correspondientes a la asociación entre la CC y la presencia del polimorfismo. En este análisis, se aplicó una corrección de Bonferroni para multiplicidad de pruebas (4 genotipos) en la evaluación de la significación estadística con un umbral del valor de p ajustado ($p = 0,05 / 4 \leq 0,0125$).

Se realizaron pruebas de evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los *loci* en casos y controles por separado. Las medidas del desequilibrio de ligamiento, designadas como D' y r^2 , y posterior determinación de las frecuencias de los haplotipos, se calcularon con los programas informáticos SNPAnalyzer 2.0¹⁶ y SNP Stats¹⁷. Para el análisis de haplotipos, se empleó el algoritmo basado en la maximización de la expectativa¹⁸ y el algoritmo de ligadura de partición¹⁹, que permiten superar la existencia de datos de información de fase no disponibles mediante el examen de la fase de los polimorfismos de GATA4 y generar las estimaciones de máxima probabilidad de frecuencias de genotipos²⁰.

Se consideró significativa una asociación si el valor de p bilateral era < 0,05.

Tabla 2
 ΔFE y ΔFE_{tot} para los SNP de la región 3'UTR del gen GATA4

SNP	Posición del SNP (3'UTR)	miARN	FE tipo natural (<i>wild type</i>)	FE variante	$ \Delta FE $	$ \Delta FE_{tot} $
rs867858	+354 A > C	miR-2117	-15,41	-14,41	1,27	
		miR-4299	-5,71	-11,42	5,71	6,98
rs1062219	+426 C > T	miR-324-5p	-21,34	-19,31	2,03	2,03
		miR-590-3p	-3,14	-2,22	0,92	
rs884662	+517 T > C	miR-4328	-6,16	-8,43	2,27	3,19
		miR-643	-15,71	-11,75	3,96	
		miR-592	-11,97	-13,93	1,96	
rs904018	+532 T > C	miR-581	-10,11	-11,93	1,82	
		miR-3650	10,68	-12,58	1,90	9,64
		miR-3137	-19,68	-15,90	3,78	
rs12825	+563 C > G	miR-1274b	-17,38	-14,18	3,20	6,98
		miR-604	-11,61	-17,35	5,74	5,74
rs11785481	+1158 C > T	miR-3173-5p	-20,96	-18,96	2,00	
		miR-4722-3p	-16,01	-14,01	2,00	
		miR-4763-5p	-14,25	-12,33	1,92	
		miR-3162-3p	-11,77	-14,14	2,37	
		miR-5195-5p	-15,02	-13,40	1,62	9,91
rs12458	+1256 A > T	miR-362-5p	-16,81	-12,95	3,86	
		miR-526b	-13,73	-10,52	3,21	
		miR-502-5p	-14,25	-10,50	3,75	
		miR-500b	-11,96	-10,09	1,87	
		miR-4279	-15,23	-14,14	1,09	
rs1062270	+1355 G > A	miR-556-5p	-15,04	-16,11	1,07	14,85
		miR-548v	-15,52	-9,84	5,68	
rs3203358	+1521 C > G	miR-139-5p	-13,89	-8,54	5,35	11,03
		miR-3125	-13,46	-9,09	4,37	
rs3203358	+1521 C > G	miR-877	-12,90	-11,55	1,35	
		miR-613	-7,10	-4,11	2,99	
		miR-3928	-13,85	-9,47	4,38	
		miR-583	-11,13	-6,76	4,37	
		miR-483-5p	-12,47	-11,01	1,46	
		miR-208a	-7,75	-10,49	2,74	21,66

3'UTR: región no traducida 3'; FE: energía libre; SNP: polimorfismo de nucleótido único; ΔFE : diferencia de energía de hibridación libre.

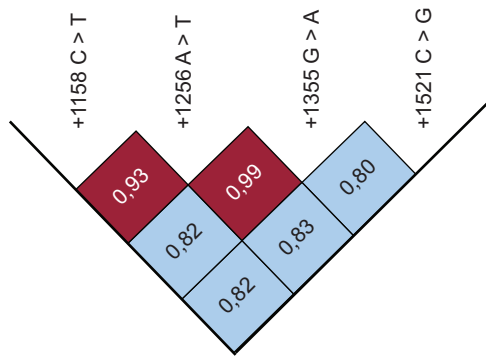


Figura. Estimaciones del desequilibrio de ligamento de pares de pacientes con cardiopatía congénita y controles.

RESULTADOS

Las características demográficas y clínicas de la población en estudio se muestran en la [tabla 1](#). Cuatro SNP, +1158 C > T (rs11785481), +1256 A > T (rs12458), +1355 G > A (rs1062270) y +1521 C > G (rs3203358), situados en una región de 970 pb, mostraron los valores más altos de $|\Delta F_{Etot}|$ ([tabla 2](#)). Se satisfizo la HWE respecto a cada polimorfismo analizado.

La distribución de los genotipos de las variantes +1158 C > T y +1521 C > G fue significativamente diferente en los casos y los controles. Concretamente, las frecuencias de +1158 CC, CT y TT fueron del 84, el 15 y el 1% de los pacientes en comparación con el 73, el 24 y el 3% de los controles ($p < 0,04$), mientras que las frecuencias de los genotipos +1521 CC, CG y GG fueron del 59, el 33 y el 8% de los pacientes en comparación con el 51, el 35 y el 14% de los controles ($p < 0,05$). Aunque el valor del desequilibrio de ligamento emparejado (D'), corregido respecto a las frecuencias de los alelos (r^2), mostró que los *loci* estaban en un desequilibrio intenso ([figura](#)), no se observaron diferencias significativas en la distribución de los genotipos y la frecuencia de los alelos entre los casos y los controles por lo que respecta a las variantes +1256 A > T y +1355 G > A.

El análisis de regresión logística reveló que el alelo T mutado del SNP +1158 C > T y el alelo G del SNP +1521 C > G se asociaban a una disminución del riesgo de CC, en modelos genéticos dominante y recesivo respectivamente (respectivamente, OR = 0,44; IC95%, 0,23-0,84; $p = 0,01$; y OR = 0,57; IC95%, 0,35-0,94; $p = 0,03$). No obstante, al aplicar una corrección por multiplicidad de pruebas, tan solo el alelo +1158 T mostró una diferencia significativa entre los pacientes y los controles.

El análisis de los haplotipos puso de manifiesto 6 asociaciones de haplotipos en el grupo de casos y controles ([tabla 3](#)). El haplotipo T-T-G-C (el 8% de los casos de CC y el 13% del grupo de control) mostró un efecto protector en cuanto a la aparición de CC (OR = 0,59; IC95%, 0,36-0,96; $p = 0,03$) en comparación con el

haplotipo más frecuente C-A-G-C. Tiene interés señalar que el haplotipo C-A-A-C, que era muy poco frecuente en los controles (0,3%) en comparación con los participantes que tenían una CC (2,4%), se asoció a un aumento de aproximadamente 4 veces en el riesgo de CC (OR = 4,31; IC95%, 1,1-12,5; $p = 0,04$).

DISCUSIÓN

El presente estudio confirma el importante papel que desempeña la región 3'UTR del gen *GATA4* como factor de riesgo de CC. De hecho, las variantes genéticas frecuentes de esta región pueden interactuar de manera conjunta, y afectar con ello la susceptibilidad a la CC y probablemente alterar el control postranscripcional del miARN. Además, hasta donde sabemos, este es el primer estudio que ha logrado identificar un *locus* de la región 3'UTR del *GATA4* que tiene una utilidad potencial como biomarcador molecular para un diagnóstico precoz de las CC.

Se sabe que el factor de transcripción *GATA4* es un regulador crucial de la expresión génica y la actividad celular en el corazón embrionario y posnatal^{6,21,22}. El gen *GATA4* contiene el código correspondiente a un componente de la familia de proteínas de unión GATA que se expresa en el endodermo del saco vitelino y el corazón embrionario que regula genes que intervienen posteriormente y son cruciales para la diferenciación y la función del miocardio. El *GATA4* actúa de manera asociada a otros factores de transcripción, como NKX2-5 y TBX5, en un complejo transcripcional específico que confiere la expresión de genes específicos tisulares durante la cardiogénesis²³. Las deleciones y mutaciones puntuales de *GATA4*, así como las duplicaciones del gen, se han asociado a CC²⁴⁻²⁶, si bien su frecuencia es muy baja, entre 0 y el 3%^{8,27}. Hay un conjunto de evidencias que indican un papel importante de las modificaciones epigenéticas en los genes de factores de transcripción, incluida la regulación postranscripcional de los miARN. Hasta donde sabemos, no existen estudios sobre la expresión del perfil de miARN en el tejido cardíaco durante su desarrollo. Hay diferentes instrumentos bioinformáticos (como ESADB o miRbase) que son capaces de predecir la expresión de miARN en diversos tejidos. El perfil de miARN tiene una naturaleza dinámica que se ve influida por múltiples factores, entre los que se encuentran la edad y las condiciones ambientales. De modo análogo, la regulación de la diana está bajo la influencia de mecanismos específicos espaciales y temporales. El tipo de célula, el estado de diferenciación de la célula y que la célula esté sometida a estrés o no son factores que parecen influir en que el miARN regule una diana o no²⁸. Así pues, serán necesarios nuevos estudios *ad hoc* para identificar la expresión del perfil de miARN durante las primeras fases del desarrollo del corazón. Recientemente, hemos puesto de manifiesto que el miR-583 va dirigido específicamente al mRNA de *GATA4* y que, de manera más específica, los SNP frecuentes localizados en la región 3'UTR afectan a la regulación del gen *GATA4* dependiente de miARN. De hecho, en células con

Tabla 3

Distribución de haplotipos de los 4 polimorfismos de *GATA4* investigados en los casos de cardiopatía congénita y los controles

N.º	+1558 C > T	+1256 A > T	+1355 G > A	+1521 C > G	Controles frecuencia [*]	CC frecuencia [*]	OR (IC95%)	p
1	C	A	G	C	0,36	0,44	Ref.	—
2	C	A	G	G	0,23	0,21	0,80 (0,55-1,15)	0,2
3	C	T	G	C	0,17	0,21	0,98 (0,65-1,46)	0,9
4	T	T	G	C	0,13	0,08	0,59 (0,36-0,96)	0,03
5	C	A	A	G	0,07	0,04	0,54 (0,26-1,10)	0,09
6	C	A	A	C	0,003	0,024	4,31 (1,1-12,5)	0,04

CC: cardiopatía congénita; IC95%: intervalo de confianza del 95%; OR: odds ratio.

^{*} Los haplotipos con frecuencia < 1% no se incluyen en el análisis.

transfección del alelo de tipo natural (*wild*) del +1521 C de la región 3'UTR de *GATA4*, el miR-583 redujo la actividad de luciferasa¹¹. Por el contrario, no se detectó efecto alguno en las células con transfección del alelo mutante del +1521 G. Esto se debía a que un miARN de una longitud de 20–25 nucleótidos se une a un lugar diana de la región 3'UTR a través de la complementariedad de su región de semilla que incluye 2–8 nucleótidos²⁹. En consecuencia, los SNP de la región 3'UTR correspondientes a la región de semilla pueden afectar a la fuerza de unión de un miARN específico, de tal manera que un alelo puede reducir, eliminar o crear la unión que modula la expresión génica^{11,13}. Como resultado de ello, de manera similar a lo que ocurre con las «variantes funcionales» exónicas, las variantes situadas en regiones genómicas reguladoras pueden modificar también profundamente la expresión de los genes. En este estudio, se observa que otros 3 SNP (+1158 C > T, +1355 G > A y +1256 A > T) que tienen los valores más altos de $|\Delta FE_{tot}|$ predichos están situados muy cerca del SNP +1521 C > G. Una región específica, situada en el extremo de la región 3'UTR del gen *GATA4* que cubre 970 pb, podría ser la más sensible a la regulación por el miARN. Se confirmó que 2 de estos SNP (que muestran una heredabilidad conjunta en el 80% de las veces), +1158 C > T y +1521 C > G, mostraban una asociación independiente con la susceptibilidad a la CC. Aparentemente, los otros 2 SNP no presentaban asociación directa con la CC pese a estar en desequilibrio de ligamiento con los otros 2. El efecto de estos SNP en el fenotipo como marcadores aislados parece desdeñable, pero se manifiesta un efecto sinérgico en conjunto con los otros SNP. De hecho, el análisis de los haplotipos mostró claramente que el haplotipo T-T-G-C se asociaba a disminución del riesgo de CC. Por el contrario, el haplotipo C-A-A-C pudo aumentar este riesgo en 4 veces, lo cual confirma que estas 4 variantes de la región 3'UTR del *GATA4* intervenían de manera sinérgica en la etiopatogenia de la CC de modo específico según el haplotipo en vez de como variante genética aislada.

Aunque nuestras observaciones respaldan claramente que hay una asociación bien definida entre la región 3'UTR de *GATA4* y el riesgo de CC de un individuo, deben interpretarse teniendo en cuenta al menos 3 limitaciones importantes. En primer lugar, el estudio no tiene la potencia estadística suficiente para examinar la relación entre el haplotipo y el riesgo de CC. De hecho, incluso para el haplotipo que mostraba la asociación más intensa (0,13 frente a 0,08; $p = 0,03$), sería necesaria una población en estudio de 589 pacientes y 589 controles para disponer de una potencia estadística de 80. En segundo lugar, el estudio no dispuso de una validación externa en una población independiente. En tercer lugar, no realizamos análisis *in vitro* para evaluar el papel específico de los diferentes contextos de haplotipos y de los distintos miARN. A pesar de estas limitaciones, este estudio indica un papel importante de esta región genética y proporciona un punto de partida para un trabajo más amplio en este campo.

CONCLUSIONES

Nuestros datos muestran que ciertas variantes frecuentes de la región específica de 3'UTR de *GATA4* tienen la capacidad de influir en la susceptibilidad a la CC, probablemente a través de una modificación de la regulación génica postranscripcional de los miARN. Serán necesarios nuevos estudios de mayor tamaño muestral para confirmar las repercusiones clínicas de la región 3'UTR de *GATA4* como factor genético de riesgo de diagnóstico precoz de CC. Además, será útil llevar a cabo estudios *in vitro* sobre el efecto de ciertas variantes frecuentes de zonas de unión de miARN para definir mejor la regulación postranscripcional de la expresión génica de factores de transcripción por los miARN en la cardiogénesis.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a cada una de las enfermeras y médicos de la Fondazione G. Monasterio CNR, Regione Toscana, por su continuo apoyo a este estudio. Damos las gracias también a nuestros pacientes y sus familias.

CONFLICTO DE INTERESES

Ninguno.

QUÉ SE SABE DEL TEMA

- La cardiopatía congénita (CC) es el defecto neonatal más prevalente
- Se ha señalado que el factor de transcripción *GATA4* es crucial para la especificación y el desarrollo normales del corazón
- Los miARN (moléculas de ARN de 20-22 nucleótidos que no codifican proteínas) pueden modular la cardiogénesis modificando la expresión de proteínas reguladoras cardíacas cruciales
- Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) frecuentes de la región 3'UTR del gen *GATA4* pueden alterar la unión de miARN-miARN, con lo que producen una disregulación de la expresión génica del *GATA4*

¿QUÉ APORTA DE NUEVO?

- Los alelos mutantes de los polimorfismos de *GATA4* +1158 T y +1521 G mostraron asociación significativa con una reducción del riesgo de CC
- El haplotipo T-T-G-C (más infrecuente en los pacientes con CC que en los controles) se asoció a una disminución significativa del riesgo de CC, mientras que el haplotipo muy infrecuente C-A-A-C, que se daba de manera muy poco común en el grupo de control, se asoció a un aumento de 4 veces en el riesgo de enfermedad
- La región 3'UTR de *GATA4* puede ser un *locus* genético de posible utilidad como biomarcador molecular para el diagnóstico precoz de CC

BIBLIOGRAFÍA

1. Kahr PC, Diller GP. Almanac 2014: congenital heart disease. *Heart*. 2015;101:65–71.
2. Vecoli C, Pulignani S, Foffa I, Andreassi MG. Congenital heart disease: the crossroads of genetics, epigenetics and environment. *Curr Genomics*. 2014;15:390–9.
3. Olson E. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313:1922–7.
4. Fahed AC, Gelb BD, Seidman JG, Seidman CE. Genetics of congenital heart disease: the glass half empty. *Circ Res*. 2013;12:707–20.
5. Bisping E, Ikeda S, Kong SW, Tarnavski O, Bodyak N, McMullen JR, et al. *Gata4* is required for maintenance of postnatal cardiac function and protection from pressure overload-induced heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:14471–6.
6. Zhou P, He A, Pu WT. Regulation of *GATA4* transcriptional activity in cardiovascular development and disease. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:143–69.
7. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets *Hand2* during cardiogenesis. *Nature*. 2005;436:214–20.
8. Posch MG, Perrot A, Schmitt K, Mittelhaus S, Esenwein EM, Stiller B, et al. Mutations in *GATA4*, *NKX2.5*, *CRELD1*, and *BMP4* are infrequently found in patients with congenital cardiac septal defects. *Am J Med Genet A*. 2008;15:251–3.

9. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miR-1-2. *Cell*. 2007;129:303–17.
10. Morton SU, Scherz PJ, Cordes KR, Ivey KN, Stainier DY, Srivastava D. microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:17830–5.
11. Sabina S, Pulignani S, Rizzo M, Cresci M, Vecoli C, Foffa I, et al. Germline hereditary, somatic mutations and microRNAs targeting-SNPs in congenital heart defects. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;60:84–9.
12. Reamon-Buettner SM, Cho SH, Borlak J. Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease (CHD). *BMC Med Genet*. 2007;8:38.
13. Sabina S, Vecoli C, Borghini A, Guarino R, Andreassi MG. Analysis of miRNAs targeting 3'UTR of H2AFX gene: a general in silico approach. *Microna*. 2015;4:41–9.
14. Barenboim M, Zoltick BJ, Guo Y, Weinberger DR. MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. *Hum Mutat*. 2010;31:1223–32. Disponible en: <http://epicenter.ie-freiburg.mpg.de/services/microsniper/>
15. Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neubock R, Hofacker IL. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:W70–4.
16. SNPAnalyzer-2TM Freeware Start Page [citado 17 Dic 2015] Disponible en: <http://snp.istech21.com/snpanalyzer/2.0/>.
17. Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*. 2006;22:1928–9. Disponible en: <http://bioinfo.iconcologia.net/SNPstats>
18. Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol*. 1995;12:921–7.
19. Niu T, Qin ZS, Xu X, Liu JS. Bayesian haplotype inference for multiple linked single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet*. 2002;70:157–69.
20. Fallin D, Schork NJ. Accuracy of haplotype frequency estimation for biallelic loci, via the expectation-maximization algorithm for unphased diploid genotype data. *Am J Hum Genet*. 2000;67:947–59.
21. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 1997;11:1061–72.
22. Yilbas AE, Hamilton A, Wang Y, Mach H, Lacroix N, Davis DR, et al. Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification. *Front Chem*. 2014;2:12.
23. McCulley DJ, Black BL. Transcription factor pathways and congenital heart disease. *Curr Top Dev Biol*. 2012;100:253–77.
24. Garg V, Kathiriyi IS, Barnes R, Schluterman MK, King IN, Butler CA, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature*. 2003;424:443–7.
25. Rojas A, Kong SW, Agarwal P, Gilliss B, Pu WT, Black BL. GATA4 is a direct transcriptional activator of cyclin D2 and cdk4 and is required for cardiomyocyte proliferation in anterior heart field-derived myocardium. *Mol Cell Biol*. 2008;28:5420–31.
26. Joyce JM, Fiedler SD, Brawner SJ, Liu H-Y, Zhou XG, Yu S. Cardiac defects are infrequent findings in individuals with 8p23.1 genomic duplications containing GATA4. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4:620–5.
27. Pulignani S, Cresci M, Andreassi MG. Genetics of congenital heart defects: is it not all in the DNA? *Transl Res*. 2013;161:59–61.
28. Van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res*. 2011;108:219–34.
29. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–97.