



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE”
INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO**

**“MUTACIONES EN EL GEN *PITX1* EN PACIENTES CON PIE EQUINO
VARO ADUCTO CONGÉNITO FAMILIAR”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MÉDICO ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

PRESENTA:

LEONARDO PÉREZ MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. EN C. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ

ASESORA METODOLÓGICA: DRA ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI

MÉXICO, D.F.

JULIO 2010



No. de Registro. 467.2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

No. de Registro. 467.2009

Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de Enseñanza e Investigación

Dra. Yuritzi Santillán Hernández
Titular del Curso de Genética Médica

Dr. En C. Ramón Mauricio Coral Vázquez
Director de Tesis

Dra. Alessandra Carnevale Cantoni
Asesora Metodológica de Tesis

Dr. Leonardo Pérez Mejía
Autor de Tesis

DEDICATORIA

A mi esposa. Por ser la compañera de mi vida, por su apoyo y amor únicos.

A mi madre. Por todo su esfuerzo, sacrificio y amor incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Mi alma mater formadora de conciencias. Por mi raza hablará el espíritu.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Margarita Valdés Flores
Instituto Nacional de Rehabilitación - Genética Médica
Por el apoyo para la captación de pacientes.

Dra. Alessandra Carnevale, Dra. Yuritzi Santillán
Por el apoyo y ánimo que me brindaron desde el principio.

Dra. Liliana García Ortiz, Dra. María del Carmen Chima Galán
Por su orientación y todas las enseñanzas.

Biol. Exp. Juan Carlos Pérez Razo

Dra Sandra Romero Hidalgo

Dra Patricia Canto Cetina

Dra Alejandra Camacho

A mis compañeros: Alejandra, Marcela, Karla, Carlos, Jesús,
Maryangel e Ivonne.

Por pertenecer a la generación inicial y por toda la
retroalimentación en esta especialidad tan inmensa.

A cada uno de los que recibí alguna enseñanza para alcanzar
esta meta.

INDICE

1. Resumen	6
2. Antecedentes	7
3. Características de <i>PITX1</i>	10
3.1. Estructura proteica	11
4. Objetivos	12
4.1 Objetivo General	12
4.2 Objetivos Específicos	12
5. Justificación	12
6. Métodos	14
6.1 Criterios de Inclusión	14
6.2 Criterios de Exclusión	15
6.3 Criterios de Eliminación	15
6.4 Población de Estudio	16
6.5 Estudio Molecular	16
7. Resultados	18
8. Discusión	23
9. Conclusión	24
10. Bibliografía	25
11. Anexos	27

Resumen

Palabras Clave:

Pie Equino Varo Congénito, Mutaciones *PITX1*

Antecedentes

El pie equino varo aducto congénito (PEVAC), es una alteración común del desarrollo, afecta entre 1 y 4.5 de cada 1000 nacidos vivos. No se ha definido con certeza la etiología del PEVAC, muchos años se propuso que era secundario a la posición del feto *in útero*; en 2008 Gurnet et. al. describieron una familia con PEVAC y alteraciones de extremidades inferiores, con una mutación de sentido equivocado (c.388G→A) en el gen *PITX1* en 5q31. Dado el gran desconocimiento que se tiene de las causas genéticas que están involucradas en el desarrollo del PEVAC, es importante identificar las potenciales variantes génicas o mutaciones asociadas a este padecimiento.

Objetivo

Analizar la relación entre mutaciones en *PITX1* y el Pie Equino Varo Aducto Congénito familiar asociado o no a otras malformaciones de extremidad inferior.

Métodos

Se realizó análisis en busca de mutaciones mediante secuenciación del gen *PITX1*, en familias con PEVAC del ISSSTE y del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Resultados

No se encontraron mutaciones deletéreas en el gen *PITX1*. En dos individuos de familias diferentes se encontró una mutación sinónima, la cual podría predisponer al PEVAC.

Mutaciones en el gen *PITX1* en pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito Familiar

Palabras Clave:

Pie Equino Varo Congénito, Mutaciones *PITX1*

Antecedentes

El pie equino varo aducto congénito (PEVAC), también conocido como “pie zambo”, es una alteración común del desarrollo de las extremidades inferiores, pero poco estudiada. Es definida como fijación del pie en aducción, en supinación y en varo, es decir, inclinado hacia adentro, rotado axialmente hacia fuera y señalando hacia abajo. El hueso calcáneo, navicular y cuboide están medialmente rotados en relación al talón, y permanecen en aducción e inversión por los ligamentos y tendones. Aunque el pie está supino, el frente del pie está pronado en relación a la parte posterior del pie, causando cavus. Además, el primer metatarso está más flexionado hacia la planta.

El PEVAC es considerado “sindrómico” cuando se asocia con otras características entre las que se incluyen alteraciones neurológicas y neuromusculares y forman parte de algún síndrome genético; o puede ser “idiopático” cuando ocurre en forma aislada y las extremidades superiores son normales; siendo esta última la forma más común.

El PEVAC afecta entre 1 y 4.5 de cada 1000 nacidos vivos; Nazer (2001) en el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas, reportó una tasa de prevalencia al nacimiento del 16%. En México Hernández (2000) encontró que de los defectos congénitos externos, los defectos osteomioarticulares ocupaban el segundo lugar, siendo el PEVAC el más importante.

El PEVAC puede afectar uno o ambos pies. Cardy (2001) en pacientes del Reino Unido encontró que 49% de los casos tenía PEVAC bilateral, 29% tenía el pie derecho afectado y el 22% el pie izquierdo afectado. Estas proporciones son muy similares en todas las poblaciones, con el pie derecho afectado ligeramente más que el pie izquierdo (Miedzybrodzka, 2003).

Dependiendo de la población estudiada, el PEVAC es 2.0-2.5 veces más frecuente en hombres que en mujeres (Miedzybrodzka, 2003). En el estudio del Reino Unido, encontró que cuando los probandos eran hombres, 5.7 % de los familiares varones en primer grado estaba afectado, comparados al 2.5% de familiares mujeres. Cuando el probando era mujer, 2.5% de familiares varones y 2.5% de familiares mujeres estaba afectado.

Las causas del PEVAC son poco comprendidas al día de hoy (Miedzybrodzka, 2003), debido a que no se ha definido con certeza la etiología del PEVAC, por muchos años se propuso que era secundario a la posición del feto *in útero*, pero otros investigadores han propuesto un posible origen genético del PEVAC.

En un estudio en gemelos Idelberg (1939), encontró concordancia para PEVAC en 32% de gemelos monocigotos, comparado al 2.9% de concordancia en gemelos dicigotos. La proporción en gemelos dicigotos es similar a la frecuencia en la población. El antecedente de un familiar con PEVAC es común, aunque la heredabilidad varía entre las poblaciones. En poblaciones Caucásicas, 24-30% de los casos reporta una historia familiar positiva (Cartildge, 1984; Lochmiller et al. 1998), en comparación con más del 54% de los Polinesios (Chapman et al. 2001).

La prevalencia de nacimientos con PEVAC varía en el mundo entero, sugiriendo que el trasfondo genético es importante (Miedzybrodzka, 2003). El análisis genealógico y la diferencia en la proporción según el sexo, implica que el patrón de herencia no ocurre conforme a la herencia clásica Mendeliana. El análisis de segregación sugiere que el patrón de herencia es más concordante con la hipótesis de un gen único de efecto mayor, operando en un trasfondo poligénico. Tanto el modelo recesivo como el dominante son consistentes con estos datos, así como la heterogeneidad de locus. (Wang et al. 1998; Chapman et al. 2000).

En 2008 Gurnet et. al. describieron una familia de cinco generaciones con PEVAC derecho y alteraciones de extremidades inferiores asociadas, las cuales segregaban de acuerdo a una herencia autosómica dominante con penetrancia incompleta. En dicha familia los autores encontraron en 5q31 una mutación de sentido equivocado (c.388G→A) en el gen *PITX1*, la cual segregaba con el padecimiento en esa familia.

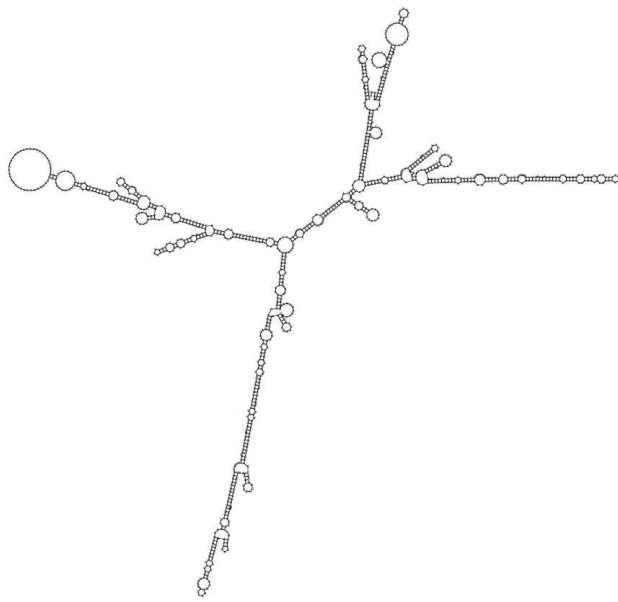
El probando además de PEVAC bilateral, presentó polidactilia preaxial bilateral, hemimelia tibial derecha y un apéndice pequeño preauricular del lado izquierdo. Cinco miembros de la familia estaban afectados de PEVAC; tres de los cuales tuvieron una gravedad mayor en el lado derecho. Un varón presentó PEVAC izquierdo. Dos individuos tuvieron talus oblicuo bilateral, manifestado como pie plano. Tres individuos con rótula hipoplásica sufrieron luxación de la misma en la niñez.

Características de *PITX1*

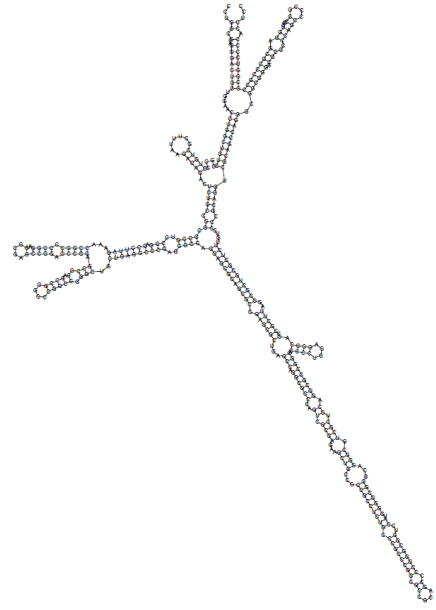
El gen *PITX1*, codifica para un factor transcripcional homeodominio bicoidal, con un peso molecular de 34,142 Da, crítico para el desarrollo de las extremidades inferiores.

Pitx1 y *Tbx4* codifican factores de transcripción que son expresados durante el desarrollo de extremidades pélvicas, pero no en primordios de extremidades torácicas. En 1999 Logan y Tabin inyectaron un vector retroviral portador de *Pitx1* en el área de las alas de embriones de pollo. La expresión aberrante de *Pitx1* en el primordio de las alas de pollo indujo la expresión distal de *Tbx4*, así como la de *HoxC10* y *HoxC11*, los cuales normalmente están restringidos a dominios de expresión de extremidades pélvicas. Los primordios de las alas de los pollos en los que se provocó la expresión aberrante de *Pitx1* se desarrollaron hacia extremidades con algunas características de extremidades pélvicas: la flexión se alteró a lo observado normalmente en piernas, los dedos eran más parecidos a los dedos de las patas en tamaño y forma, y el patrón muscular fue transformado a el de una pierna.

PITX1 es un gen situado en el cromosoma 5 humano en la región 5q31, consta de un total de 6541 pb y consta de 3 exones flanqueados por UTR's 5' y 3' respectivamente. El primer exón contiene la UTR 5' y abarca desde el nucleótido 394 hasta el 562, el exón 2 del nucleótido 2767 hasta el 2999, y el exón 3 desde el nucleótido 4954 hasta el 5496, conteniendo en sus últimas 2 /3 partes la UTR 3'. Su mRNA está compuesto de 945 nucleótidos, las cuales pueden formar dos estructuras secundarias alternativas:



PITX1 (uc010jea.2) foldUtr3 energy -514.36



PITX1 (uc010jea.2) foldUtr5 energy -244.40

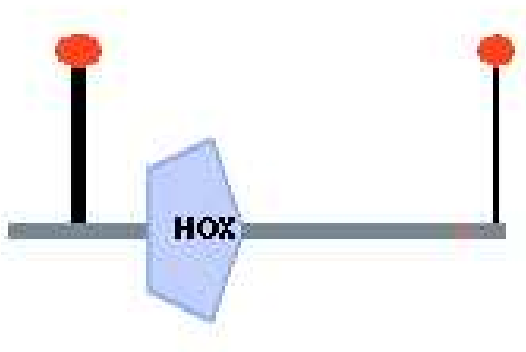
Secuencia de la estructura proteica.

Traducción (314 aa):

MDAFKGGMSLERLPEGLRPPPPPHDMGPAFHLPADPREPLENSASESSDTELP**EKERGGGEPKGPEDS**
GAGGTGCGGADDDPAKKKKQRRQRTHTFSQQLQELEATFQRNRYPDMSMREEIAVWTNLTEPRVRVWFKNR
 RAKWRKRERNQQDLCKGGYVPQFSGLVQPYEDVYAAGYSYNNWAAKSLAPAPLSTKSFTFFNSMSPLSS
 QSMFSAPSSISSMTMPSSMGPGAVPGMPNSGLNNINNLTGSSLNSAMSPGACPYGTPASPYSVYRDCNS
 SLASLRLKSKQHSSFGYGGLQGPASGLNACQYNS

Dando lugar a una proteína con la siguiente forma teóricamente propuesta:

Paired-like homeodomain 1



http://www.hprd.org/summary?hprd_id=03688&isoform_id=03688_1&isoform_name=Isoform_1

Objetivos:

*General: Analizar la relación entre mutaciones en *PITX1* y el Pie Equino Varo Adueto Congénito familiar asociado o no a otras malformaciones de extremidad inferior.

***Específicos:**

1. Identificar mutaciones en *PITX1* en familias con Pie Equino Varo Adueto Congénito asociado o no a otras malformaciones de extremidad inferior.
2. Investigar la relación de las posibles mutaciones en *PITX1* con el grado de gravedad del PEVAC, el pronóstico y la respuesta al tratamiento.
3. Sentar bases para proporcionar un adecuado asesoramiento genético a las familias afectadas.

Justificación

Se estima que el pie equino varo afecta entre 1 y 4.5 de cada 1000 nacidos vivos a nivel mundial y la tasa de prevalencia al nacimiento en Latinoamérica es del 16%. En 2000 Hernández y col. encontraron que de los defectos congénitos externos, los defectos osteomioarticulares ocupan el segundo lugar, siendo el pie equino varo el más importante. Debido a que hasta este momento no existe algún reporte de la prevalencia específica a nivel Nacional ni en el ISSSTE este estudio aportará datos al respecto.

Dado el gran desconocimiento que se tiene de las causas genéticas que están involucradas en el desarrollo del PEVAC, es importante identificar las potenciales variantes génicas o mutaciones asociadas a este padecimiento. De particular interés es el gen *PITX1* debido a que es esencial en la cascada de señalización de la formación embriológica de las extremidades inferiores. El identificar variantes génicas involucradas en PEVAC – ya sea determinando mutaciones que den origen a la misma o polimorfismos genéticos que predispongan a su desarrollo - permitirá realizar diagnósticos más tempranos en las familias con antecedentes de la enfermedad, así como determinar marcadores genéticos de predisposición. Todo esto será útil para el desarrollo de pruebas moleculares diagnósticas tempranas, que en asociación con el grado de gravedad de la enfermedad, permitieran tomar decisiones encaminadas a elegir el mejor tratamiento para los pacientes.

El tener una prevalencia elevada, las repercusiones económicas son de gran importancia, ya que los costos por la atención médica, así como el manejo de alta especialidad que en muchos casos incluyen procedimientos quirúrgicos, son de impacto en la economía familiar e institucional, por lo que encontrar las causas relacionadas con PEVAC nos permitirá conocer la importancia de los genes en el desarrollo de la enfermedad para el desarrollo de pruebas moleculares diagnósticas tempranas, que puedan asociarse al grado de gravedad de la enfermedad, permitiendo tomar medidas terapéuticas mejor adecuadas que permitan la disminución de costos, e incluso, la implementación de medidas preventivas.

El dilucidar los mecanismos genéticos que contribuyen a este defecto, nos permitirá también proporcionar un adecuado asesoramiento genético a las familias involucradas con este tipo de afección, las que sin lugar a duda tienen una gran preocupación de que cualquier alteración se repita en las siguientes generaciones. Al ser un estudio que se realice en familias afectadas nos dejará, evaluar la heterogeneidad y el grado de penetrancia relacionados con PEVAC. Así mismo, esto podría sentar las bases para el desarrollo de estrategias para modificar los efectos patológicos de los genes mediante el desarrollo de drogas, ingeniería de tejidos y también de terapia génica.

Métodos

Se realizó un estudio Prospectivo, Descriptivo, Prolectivo, Transversal, Observacional.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito unilateral o bilateral con al menos un familiar de primer, segundo o tercer grado afectado por Pie Equino Varo Aducto Congénito asociado o no a otra malformación de extremidades inferiores.
- Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito unilateral o bilateral mas otra malformación de miembros inferiores con o sin otros familiares afectados.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes con PEVAC unilateral o bilateral que presenten cualquier otro síndrome conocido asociado o enfermedad neuromuscular.
- Pacientes con PEVAC unilateral o bilateral más otra deformación de miembros inferiores sin ningún familiar afectado, que tenga antecedentes durante su gestación de factores mecánicos predisponentes para desarrollar la deformidad.

Criterios de Eliminación:

- Pacientes incluidos en el presente estudio, que durante la duración del mismo decidan retirarse del estudio.
- Pacientes incluidos en el presente estudio, en los que las muestras no tengan la cantidad o las condiciones necesarias de DNA.

Para la inclusión de los pacientes se obtuvo el consentimiento informado, solicitándoles firmen la carta del mismo (Ver Anexo 3).

Se realizó Historia Clínica (Ver Anexo 1), árbol genealógico, así como exploración física para descartar algún síndrome conocido o enfermedad neuromuscular. Se clasificó la gravedad del pie equino varo aducto congénito por medio de la clasificación de Diméglio (Ver anexo 2).

Población de estudio

Se realizó la invitación de pacientes en el servicio de Genética Médica del CMN “20 de Noviembre” ISSSTE, Ortopedia Pediátrica del Hospital Adolfo López Mateos ISSSTE, e Instituto Nacional de Rehabilitación durante el periodo que comprendió de Agosto del 2009 a Mayo de 2010.

Estudio molecular

Toma de muestras. Se realizó la toma de muestra sanguínea de vena periférica en tubos con EDTA previo consentimiento informado por escrito del padre o tutor.

Extracción de DNA. El DNA se extrajo de las muestras de sangre periférica utilizando el método de precipitación salina como lo descrito por S.C Tan y B.C. Yiap (2009). Posteriormente el DNA se cuantificó a través de un espectrofotómetro marca “Nanodrop” y se evaluó su calidad por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las muestras de DNA se conservaron a -20°C hasta su uso.

Amplificación de fragmentos específicos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para flanquear las regiones de interés del gen *PITX1*, los cuales corresponden al exón 2 y exón 3 que se relacionan con la secuencia codificante de la proteína funcional.

Los oligonucleótidos fueron diseñados como sigue:

Exón 2 oligonucleótido sentido: CAGTTCCCAGGAACCCTAGA

Exón 2 oligonucleótido antisentido: AGGGAGCAGGTCTGAATGGT

Exón 3.1 oligonucleótido sentido: GAACCATTGTGGAGGGAATG

Exón 3.1 oligonucleótido antisentido: GTAGCCAAACGACGAGTGCT

Exón 3.2 oligonucleótido sentido: CGGCTCCTCGCTCAACTC

Exón 3.2 oligonucleótido antisentido: AGGGGCAACTTGGTTTGTACG

Dando como resultado un fragmento de 492 pb para el exón 2, un fragmento de 651 pb para la primera porción del exón 3 (3.1), y un fragmento de 713 pb para la segunda porción del exón 3 (3.2). Con una TM promedio de 62°C para el exón 2, de 66°C para 3.1, y de 65°C para 3.2.

La amplificación de los segmentos mencionados se realizó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con aproximadamente 100 ng de DNA, 10 pmoles de cada par de oligonucleótidos, 2mM de MgCl₂, 1U de enzima Taq Platinum® y 0.2mM de la mezcla de dNTP's, en un volumen final de 25 µl.

Se utilizó un termociclador con las siguientes condiciones:

Exón 2. Desnaturalización inicial a 94°C por 5 min., seguido de 35 ciclos a 94°C por 1 min, alineamiento a 57°C por 1 min. y una incubación a 72°C por 1 min 30 segundos, extensión final a 72°C por 7 min.

Exón 3; Fragmentos 3.1 y 3.2. Desnaturalización inicial a 95°C por 4 min., seguido de 35 ciclos a 95°C por 30 seg, alineamiento a 57°C por 30 seg. y una incubación a 72°C por 45 segundos, extensión final a 72°C por 5 min.

Los productos amplificados fueron corridos en electroforesis en gel de agarosa al 1% y buffer TBE IX, por 45 minutos a 80 V. Los productos amplificados fueron visualizados con bromuro de etidio en un transiluminador ultravioleta.

Los productos de PCR fueron purificados mediante un estuche comercial específico para productos de PCR (QIAquick® Gel Extraction Kit), para secuenciar posteriormente.

Secuenciación del DNA. La detección de potenciales mutaciones patogénicas se llevará a cabo mediante la secuenciación de los productos de la PCR de los distintos exones del gen *PITX1*. Las secuencias de DNA se realizaron con el kit Big Dye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando los mismos oligonucleótidos de las reacciones de PCR y el secuenciador automatizado Applied Biosystems 3700. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia del gen humano accesibles en la página de NCBI (*PITX1* gi:51511721).

Resultados

Se logró la participación previo consentimiento informado por escrito de un total de 7 pacientes de 5 familias diferentes que cumplieron con los criterios de inclusión.

Plots

Report

Test type: Nucleic Acid

07/06/2010 09:56 a.m.

Exit

Report Name

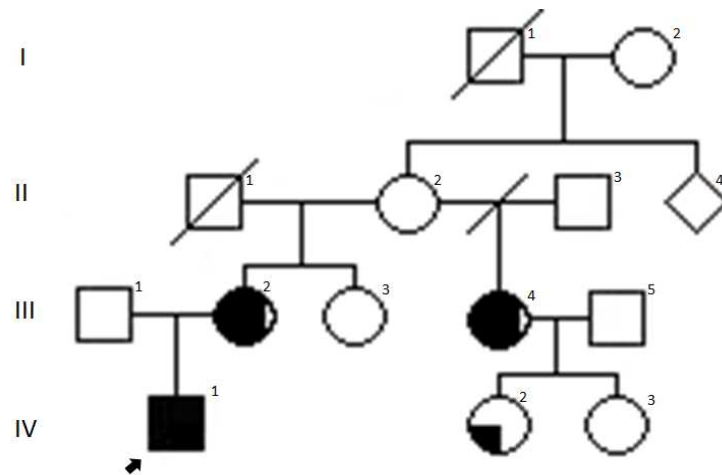
Report Full Mode Ignore

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw	▲
001	Default	07/06/2010	09:47 a.m.	319.59	6.392	3.485	1.83	2.19	50.00	230	2.913	0.038	
002	Default	07/06/2010	09:48 a.m.	368.10	7.362	4.054	1.82	2.34	50.00	230	3.147	0.037	
003	Default	07/06/2010	09:49 a.m.	448.78	8.976	4.943	1.82	2.02	50.00	230	4.453	0.114	
005	Default	07/06/2010	09:51 a.m.	339.51	6.790	3.733	1.82	2.26	50.00	230	3.004	0.928	
006	Default	07/06/2010	09:52 a.m.	199.62	3.992	2.154	1.85	2.29	50.00	230	1.741	0.029	
007	Default	07/06/2010	09:53 a.m.	161.80	3.236	1.755	1.84	2.20	50.00	230	1.469	0.044	
04	Default	09/06/2010	10:42 a.m.	119.78	2.396	1.297	1.85	2.42	50.00	230	0.991	0.014	

Tabla 1. Cuantificación de muestras de pacientes con PEVAC



Familia 3
Pacientes 03, 04 y 05

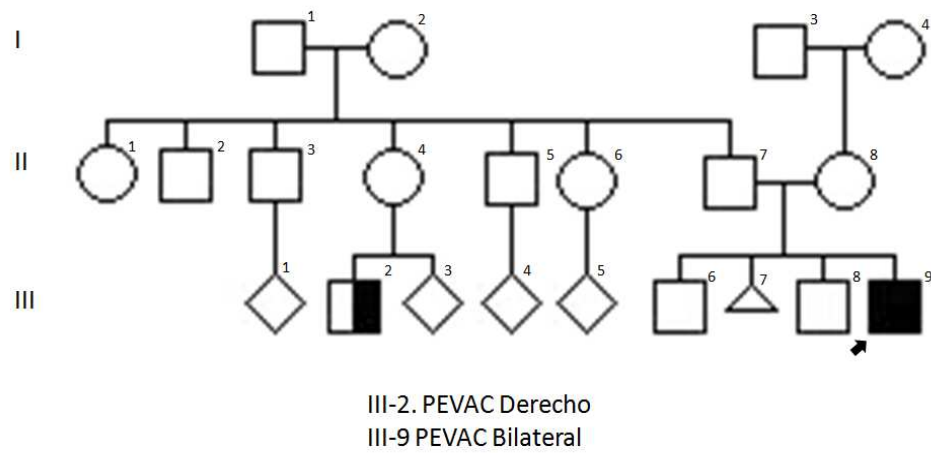


III-2, III-4. PEVAC Bilateral, Hexadactilia preaxial Bilateral
IV-1. PEVAC Bilateral, Heptadactilia preaxial Bilateral
IV-2. Pie Varo Bilateral

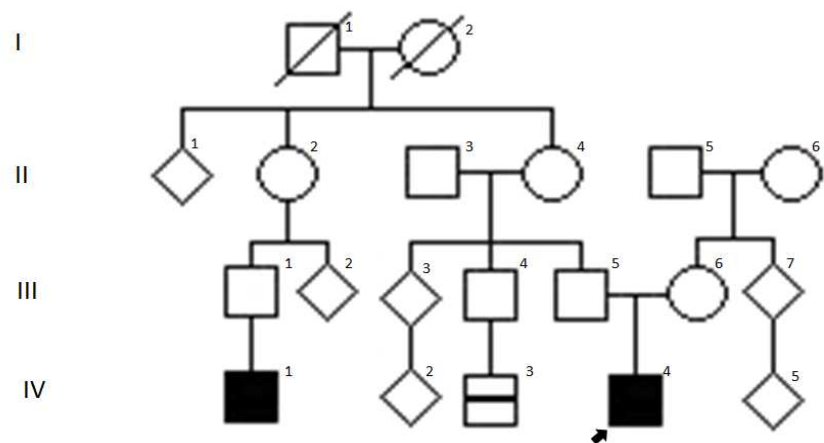


Caso índice de Familia 3. (IV-1)

Familia 4



Familia 5

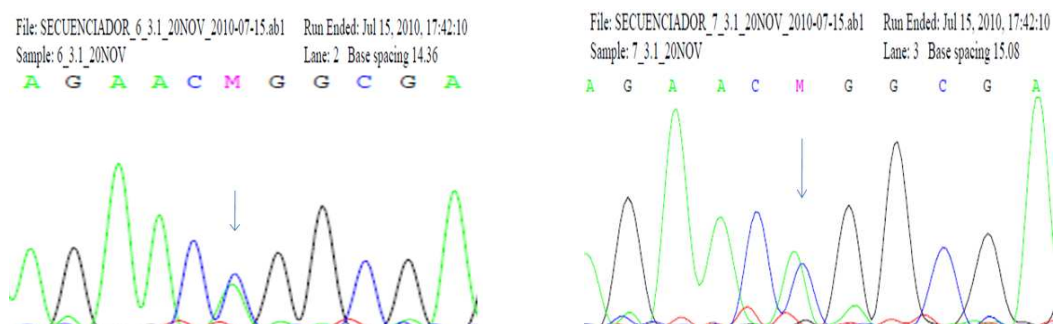


Paciente	Fecha	Nombre	Edad	Sexo	Dx	Origen	Posición Fetal	Vol. Líquido Amniótico	EF	Manejo Actual	Manejo previo
1	260809	Gonzalez Ochoa Joshua Nahim	6 ^a 8m	Masculino	Pie Equino Varo Congénito Bilateral + Astrágalo Vertical Bilateral Congénito	Nezahualcóyotl, Estado de México	Cefálica	Normal	Corregido	En Tx OX	Aparato de yeso de los 5 días de Nacido a los 8 meses. Ferulas de acrílico hasta el año de edad, Qx en 4 ocasiones.
2	181109	Mendoza López Hermilio	5m	Masculino	PEVAC Bilateral	Jilotepec, Estado de México	Cefálica	Oligohidramnios	Yeso	En Tx OX	Tx OX desde los 2 m 15d
3	060110	Peña Barrera Carlos Antonio	5m	Masculino	PEVAC Bilateral, heptadactilia preaxial bilateral	Quatitlán Izcalli, Estado de México.	Cefálica	Normal	15 Diméglio	En Tx OX y QX	Yeso desde 1m
4	060110	Barrera Salazar Noemí Sarai	17 a	Femenino	PEVAC Bilateral, hexadactilia preaxial derecha	Quatitlán Izcalli, Estado de México.	?	?	Corregido		Tx OX a los 2 m
5	060110	Barrera Salazar Flor Angelina	27 a	Femenino	PEVAC Bilateral, hexadactilia preaxial derecha	Quatitlán Izcalli, Estado de México.	?	?	Acortamiento de MPD		Tx OX en 12 ocasiones
6	170310	Cruz García José Alberto	5m	Masculino	PEVAC Izquierdo	Michoacán	Cefálica	Normal	11 Diméglio	En Tx OX	Tx OX desde los 3m
7	210410	Velazquez Torres Juan Carlos	7 m	Masculino	PEVAC Bilateral	Tenayuca, Estado de México	Cefálica	Normal	11 Diméglio	En TX OX	Tx OX en 2 ocasiones

Tabla 1. Características de pacientes con PEVAC

Se realizó la búsqueda de mutaciones en los exones 2 y 3 *PITX1* en 7 pacientes de 5 familias diferentes; en 3 de 5 familias no se encontró cambios sugerentes de mutaciones o polimorfismos con relación a la presencia de Pie Equino Varo Adueto Congénito.

En los pacientes 6 y 7 pertenecientes a la familia 4 y 5 respectivamente se encontró una mutación sinónima en el exón 3 CCG→ACG, siendo ambos codones codificantes para el aminoácido Arginina en la posición 140.



Electroferogramas de pacientes con PEVAC y mutación sinónima.

Discusión

Durante muchos años se enfatizó la creencia de que el PEVAC era causado principalmente por efectos del matroambiente sobre el feto en formación como el oligohidramnios, la presencia de miomas uterinos, o incluso la posición pélvica del feto afectado, pero los últimos estudios de incidencia y prevalencia a nivel mundial de este defecto congénito, los cuales revelan que el PEVAC tiene una incidencia muy alta en ciertas poblaciones independientemente de la posición *in utero* o de la ausencia de insultos matroambientales, permiten inferir la existencia de un trasfondo genético en el origen del mismo.

La presencia de varios individuos afectados con PEVAC en una misma familia y lo reportado previamente en la literatura, sugieren la presencia de un gen causal con un trasfondo multifactorial. Lo encontrado en diferentes poblaciones difiere en cuanto a la forma de herencia encontrada en la familia reportada por Gurnet et. al., (2008) en la que claramente se observa una forma autosómica dominante, con una expresividad variable; ya que se ha observado la presencia de una proporción diferente de afectados dependiendo del sexo, lo cual podría hacer suponer un mecanismo de impronta genética o un fenómeno epistásico.

El hallazgo de la mutación en *PITX1* en la familia estadounidense de origen europeo, señalan a este gen como máximo candidato en la causalidad del PEVAC. En este estudio no se encontró la relación del PEVAC con mutaciones deletéreas en los exones estudiados del gen *PITX1*, sin embargo se encontró una mutación sinónima, en la que cambia el primer

nucleótido del codón, lo cual podría disminuir la disponibilidad de tRNA's para ese codón específico, predisponiendo a la presencia de PEVAC.

Aún así habrá que descartar la presencia de mutaciones deletéreas en las regiones no analizadas del gen incluyendo la región del promotor, para constatar la falta de relación en la causalidad de este gen con el trastorno en estos pacientes. Una vez descartada, es necesario analizar la presencia de mutaciones en *TBX4*, otro gen candidato arriba de la cascada de *PITX1*, expresado en las extremidades pélvicas durante el desarrollo embrionario en diferentes modelos animales, ya que debido a que ambos genes se encuentran altamente conservados desde el punto de vista evolutivo, pudiera también estar implicado con la patogénesis del PEVAC. También cabe señalar la importancia de realizar un análisis con un mayor número de pacientes para determinar la relación de este polimorfismo con la predisposición a la enfermedad.

Conclusión

En este estudio de 5 familias diferentes con 7 individuos afectados con PEVAC, no se encontraron mutaciones deletéreas en los exones 2 y 3 del gen *PITX1*. En dos individuos de familias diferentes se encontró una mutación sinónima, la cual podría predisponer al PEVAC.

Bibliografia

Andriess H, Roos E, Hägglund G, Jarnlo G. **Validity and responsiveness of the Clubfoot Assessment Protocol (CAP). A methodological study.** *BMC Musculoskeletal Disorders* [serial online]. 2006;7:28.

Bensahel H, Huguenin P, Themar-Noel C., **The functional anatomy of clubfoot.** *J Pediatr Orthop.* 1983 May;3(2):191-5.

Böhm M. **The embriologyc origin of club-foot.** *JBJS XI*, 229-259.

Cardy, A.H.; Barker S.; Chesney D.; Sharp L.; Maffulli N. et. al. **Pedigree analisys and epidemiological features of idiopathic congenital talipes equinovarus in the United Kingdom: a case-control study.** *J. Med. Genet.* 2001. 38, S34.

Chapman C.; Stott N.S.; Port R.V.; Nicol R.O. **Genetics of club foot in Maori and Pacific people.** *J Med Genet.* 2000 Sep; 37(9):680-3.

Gurnet C, Alae F, Kruse L, et. al. **Asymmetric Lower-Limb Malformations in individuals with Homeobox *PITX1* Gene Mutation.** *Ame. J. Hum. Genet.* 2008. 83,616-622.

Hernandez, H. R.; Cerda-Flores RM.; Ortiz-Jalomo R.; Velazco-Campos R.; Martinez de Villarreal L. **Defectos congénitos en 132, 360 Nacimientos consecutivos. Prevalencia de 5 años en el Hospital de Gineco-Obstetricia No.23 IMSS, Monterrey N.L.** Revista Salud Pública y Nutrición. México. 2000. Genética y Biomedicina Molecular 2000. Monterrey Nuevo León, México. No.2. Edición especial.

Idelberger K. Z. *Orthop.* 1939. **69**, 1–3

Irani RN, Sherman MS., **The pathological anatomy of idiopathic clubfoot.** Clin Orthop Relat Res. 1972 May;84:14-20.

Logan, M., Tabin, C. J. **Role of Pitx1 upstream of Tbx4 in specification of hindlimb identity.** Science 283: 1736-1739, 1999.

Miedzybrodzka Chesney D. **Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand.** *J. Anat.* 2003. 202, pp37–42.

Tan SC, Yiap BC. **DNA, RNA and protein extraction: the past and the present.** J. Biomed Biotechnol.2009;2009:57 4398. Epub. Review. PMID 20011662

Wang J. H.; Palmer R. M.; Chung C.S. **The role of major gene in clubfoot.** Am J Hum Genet. 1988 May;42 (5):772-6.

Anexo 1

Historia clínica de genética

Ficha de identificación

Fecha:

No. De expediente o registro:

Nombre:

Edad:

Sexo:

Domicilio:

Teléfono:

Persona responsable del paciente:

Idx:

Antecedentes heredofamiliares.

Nombre del padre:

Edad:

Lugar de nacimiento:

Lugar de residencia:

Antecedentes o manifestaciones de PEVAC (clasificar):

Nombre de la madre:

Edad:

Lugar de nacimiento:

Lugar de residencia:

Antecedentes o manifestaciones de PEVAC (clasificar):

Árbol genealógico de al menos tres generaciones

Antecedentes de pie equino varo aducto congénito

Énfasis en

Laxitud articular

Displasia del desarrollo de la cadera

Luxación de rodilla

Oligodactilia, polidactilia

Ausencia de huesos de extremidad inferior (tarso, peroné, etc.)

Lado afectado (derecho, izquierdo, bilateral)

Otras malformaciones congénitas.

Síndromes asociados (Larsen, Artrogriposis, etc)

En caso de antecedentes familiares positivos tipo de terapéutica empleada en cada familiar afectado

Antecedentes perinatales:

Gestas: Paras: Abortos: (causa) Cesáreas: (causa)

Duración del embarazo en semanas de gestación.

Inicio y número de consultas de control prenatal.

Enfermedades y complicaciones durante el embarazo.

Uso de alcohol, tabaco, drogas o alguna otra sustancias durante el embarazo.

Medicamentos usados durante el embarazo.

Alteraciones detectadas por ultrasonidos realizados durante el embarazo (higroma quístico).

Volumen de líquido amniótico. (oligohidramnios, polihidramnios).

Edad de los padres al momento de nacimiento.

Tipo de parto (eutócico, distócico).

Hospital o clínica de atención del parto:

Apgar: peso: talla:

Complicaciones perinatales.

Condiciones del alta.

Edad de caída del cordón umbilical

Desarrollo psicomotor (si aplica por edad)

Sonrisa social

Sostén cefálico

Balbuceo

Gateo

Bisílabos

Sedestación sin apoyo

Frases

Bipedestación sin ayuda

Control de esfínteres

Ocupación

Escolaridad

Promedio

Antecedentes Personales no Patológicos.

Antecedentes Personales Patológicos

Antecedentes gineco-obstetricos.

(en caso de incluir pacientes adultas)

Menarca:

G: P: A: C:

Padecimiento actual

Fecha del diagnóstico

Terapéutica utilizada (conservadora, quirúrgica)

Partes anatómicas afectadas o ausentes (músculos, huesos, arterias)

En caso de hemimelia; agenesia o hipoplasia de falanges

Ausencia de pie o de alguna extremidad completa (pie)

Ausencia de fémur tibia peroné con pie normal

Ausencia de eje radial / ulnar

Ausencia de metatarsianos centrales

Tanto en el sujeto de estudio como en sus

Parientes

Anexo 2

Clasificación de Diméglio

Puntaje	4	3	2	1	0
1. Equino	45°-90°pltf	20°-45°pltf	20°pltf-0°	0°-20°dorsx	> +20°dorsx
2. Varo	45°-90°var	20°-45°-var	20°var-0°	0°-20°vlg	>20°vlg
3. Supinación	45°-90°sup	20°-45°sup	20°sup-0°	0°-20°pron	>20°pron
4. Aducto	45°-90°add	20°-45°add	20°add-0°	0°><20°abd	>20°abd
5. Pliegue posterior				Si	No
6. Pliegue medial				Si	No
7. Cavo				Si	No
8. Función muscular deformante				si	No

pltf=flexión plantar, dorsx=dorsiflexión, var=valgo, sup=supinación, pron=pronación, add=aducción, abd=abducción

ANEXO 3

CARTA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:

“Prevalencia de Mutaciones en los genes PITX1 en Pacientes con Pie Equino Varo Adueto Congénito Familiar”

México, D. F., a _____ de _____ del año _____

Yo _____
autorizo la participación de mi hijo de nombre: _____

_____ en el proyecto
de investigación titulado “Prevalencia de Mutaciones en los genes PITX1 en Pacientes con Pie Equino Varo Adueto Congénito Familiar”

El objetivo de este estudio es conocer -mediante un estudio de laboratorio- acerca de la modificación en diversos genes (estructuras que poseen el material de la herencia) que pudieran condicionar o predisponer para padecer el Pie Equino Varo Adueto Congénito.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en: **aportar la información para un cuestionario acerca de diversos factores de riesgo para desarrollar Pie Equino Varo Adueto Congénito, la toma de una muestra única de 10 ml de sangre, procedimientos que serán realizados por los Investigadores Responsables del Estudio.**

Declaro que se me ha informado ampliamente sobre los posibles riesgos, inconvenientes, molestias y beneficios derivados de mi participación en el estudio, que son los siguientes:

Riesgos y molestias:

a. Por la toma de sangre:

Malestar y dolor leve, formación de hematoma o morete en el sitio donde se extraiga a sangre (del piquete de la vena).

b. por la extracción de sangre:

Ninguna

Beneficios:

Se generará información para determinar la asociación entre modificaciones (polimorfismos y/o mutaciones) en genes y el desarrollo del Pie Equino Varo Adueto Congénito, lo que permitiría (dependiendo de los resultados obtenidos), conocer más acerca de esta anomalía, identificar ciertos factores de riesgo que puedan ayudar a predecir el curso de la anomalía, identificar a las familias en riesgo y poder dar un consejo genético.

Entiendo que conservo el derecho de retirarme o retirar mi muestra biológica (sangre) del estudio en cualquier momento en que lo considere conveniente, sin que ello afecte la atención médica que recibo.

Asimismo, se me ha informado que esta muestra será tomada por personal calificada en el **Hospital Shriners para niños, Ciudad de México, AC** y será almacenada a -20°C durante un período de 10 años en la **División de Medicina Geonómica del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE, México, D. F.**, para su uso en el citado proyecto o en algún otro que implique la valoración de polimorfismos genéticos. A partir de la toma

de la muestra y pasado el periodo mencionado las muestras serán desechadas por la División de Medicina Genómica, antes mencionada.

El investigador responsable se ha comprometido a darme información oportuna sobre cualquier información que pudiera ser ventajoso para el tratamiento, evolución o pronóstico de mi hijo, así como a responder cualquier pregunta y aclarar las dudas que le plantee acerca de los procedimientos que se llevarán a cabo, los riesgos, beneficios o cualquier otro asunto relacionado con la investigación o con su tratamiento.

Los investigadores responsables han brindado la seguridad de que no se me identificará en las presentaciones o publicaciones que deriven de este estudio y que los datos relacionados con mi privacidad serán manejados en forma absolutamente confidencial. Para cumplir lo anterior, el investigador utilizará para la creación de la base de datos (que tendrán mi información clínica, así como las respuestas del cuestionario acerca de mis datos que se me aplicará), número de identificación (**NO se empleará mi nombre**) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato. Esta información y la derivada del estudio serán manejadas únicamente por los investigadores responsables y solamente se dará a conocer a otra persona si yo lo solicito por escrito

Datos de los **investigadores responsables** a los cuales puede comunicarse en caso de dudas o preguntas relacionadas con el estudio.

En el **Centro Médico Nacional “20 de Noviembre” ISSSTE: Dr. en C Ramón Mauricio Coral Vázquez**, Coordinación de Investigación 1er. Piso del edificio D, Subdirección de Enseñanza e Investigación, Calle San Lorenzo 502, esquina Av. Coyoacán, Col. Del Valle, Delegación Benito Juárez, C.P. 03100 Teléfono: 52003530, ext. 14603 ; dirección electrónica: **rmcoralv@gmail.com**.

Dr. Abel Archundia García, Presidente del Comité de Ética. Teléfono: 52003530, ext. 14629.

Investigador Responsable

(Nombre completo y firma)
Padre o tutor del paciente

(Nombre completo, Dirección y firma)
Testigo

(Nombre completo, Dirección y firma)
Testigo