



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

**“Análisis de la Frecuencia en el Polimorfismo G5738C del Gen *HOXA2* en Pacientes Mestizos Mexicanos con Pie Equino Varo Aducto Congénito”**

Áreas: Biología Molecular y Genética

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO

Presenta:

*Jorge Mauricio Tenería Palomino*

Director de Tesis: Biól. Exp. Juan Carlos Pérez Razo  
Asesor Interno: Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez



México, D.F. a Octubre de 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## ***Agradecimientos:***

A mi familia por su enorme e incondicional apoyo, en especial a mis padres por tener fe y confianza en mí.

Además, hago extensivo mi agradecimiento hacia el Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez y a la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por su enorme y valioso apoyo, a mi amiga, compañera y maestra: Dra. Alejandra Camacho Molina.

A mi tutor Biól. Exp. Juan Carlos Pérez Razo por sus atenciones y recomendaciones para mejorar mis experimentos así como por las sugerencias para la redacción de mi trabajo escrito. A mi tutor interno Biól. José Misael Vicente Hernández Vázquez a quien agradezco sus observaciones y sugerencias hacia mi tesis, además por despertar en mí el interés hacia las apasionantes Biología Molecular y Genética.

Para mis compañeros que forman y en su momento formaron parte de los equipos de Investigación Biomédica y Medicina Genómica del CMN 20 de Noviembre- ISSSTE a cargo de la Dra. Patricia Canto y el Dr. Ramón Coral: Agustín, Alma, Andrea, Berenice, Bladimir, Carlos, Cynthia, David, Eder, Eliganty, Elith, Geneve, Guillermo, Javier, Jesús, Karen, Lizbeth, Mauricio, Mónica, Olga, Oriana, Paulina, Rosa, Sergio, Silvia, Tania y Viridiana, porque de todos he aprendido mucho.

Al personal de la Unidad de Análisis y Referencia Viroológica del CMN 20 de Noviembre- ISSSTE por su valioso apoyo: Zamsi Sánchez, Diana Martin, Julio César Ávila, Alejandro, Carmina y por supuesto nuevamente a mi tutor.

A mis amigos y colegas incondicionales de la Facultad: Abigail, Christian, Cristina, Diana, Ericka, Edith, José, Humberto, Karina, Rubén, Víctor y Tonatiuh.

A mis amigas y amigos fuera de la FES: Ximena, Paulina, Lorena, Javier, Iván, Juan, Oswaldo y Marco.

Además a la M. en C. Catalina Machuca Rodríguez, Biól. Cristina Alvarado Domínguez y Dra. María del Carmen García Rodríguez, de quienes agradezco sus observaciones y sugerencias para la mejora de éste trabajo.

Y por supuesto a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como al CMN de Noviembre- ISSSTE, en donde se realizó el presente trabajo.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

**ESTIMADOS MAESTROS:**

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", los ha nombrado como Sinodales del Examen Profesional del alumno:

**TENERÍA PALOMINO JORGE MAURICIO**

Quien presenta como trabajo recepcional: **Análisis de la Frecuencia en el Polimorfismo G5738C del Gen HOXA2 en Pacientes Mestizos Mexicanos con Pie Equino Varo Aducto Congénito.**

- PRESIDENTE** M en C. CATALINA MACHUCA RODRÍGUEZ
- VOCAL** BIÓL. EXP. JUAN CARLOS PÉREZ RAZO \*
- SECRETARIO** BIÓL. JOSÉ MISAEL VICENTE HERNÁNDEZ VÁZQUEZ
- SUPLENTE** DRA. MA. DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ
- SUPLENTE** BIÓL. CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarles.

**A T E N T A M E N T E**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 México, D.F., a 23 de enero de 2012.  
**DR. CARLOS CASTILLEJOS CRUZ**  
**JEFE DE LA CARRERA**



c.c.p. Departamento de Control de Escolar  
c.c.p. Interesado

Toda nuestra ciencia, comparada con la realidad, es primitiva e infantil... y sin embargo es lo máspreciado que tenemos.

ALBERT EINSTEIN

(1879 – 1955)

La percepción, sin comprobación ni fundamento, no es garantía suficiente de la verdad.

BERTRAND RUSSELL, *Misticismo y Lógica*

(1929)

## **Abreviaturas**

**PEVAC:** Pie Equino Varo Aducto Congénito

**TEV:** Talipes equinovarus

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNg:** Ácido Desoxirribonucleico genómico

**ADNc:** ADN complementario

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**HOX:** Familia de Genes Homeobox

**IGFBP3:** Proteína 3 de Unión al Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina

**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de un sólo Nucleótido)

**rs:** reference SNP (SNP de referencia)

**dbSNP:** data base SNP (Identificación del SNP en bases de datos)

**pb:** Pares de bases

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

**qRT-PCR:** Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real)

**SDS:** Sulfato Dodecílico de sodio

**EDTA:** Etilendiamino-Tetraacetato

**TBE:** Tris/Borato/EDTA

**UV:** Rayos Ultravioleta

**mM:** milimolar

**nm:** nanómetros

**µl:** microlitros

**ng:** nanogramos

**rpm:** Revoluciones por minuto

**C:** Citosina

**G:** Guanina

**Fwd:** Cebador sentido

**Rev:** Cebador antisentido

**VIC® dye:** (marcador para detectar el alelo ancestral)

**FAM™ dye:** 6-Carboxifluoresceína (marcador para detectar el alelo alterno)

**MGB-NFQ:** Minor Groove Binder - Non Fluorescent Quencher (Atenuador de fluorescencia de unión al surco menor)

**EHW:** Equilibrio Hardy-Weinberg

**DL:** Desequilibrio de Ligamiento

**HapMap:** International HapMap Project (Proyecto Internacional del Mapa de Haplotipos)

**OR:** Odds Ratio (Razón de Odds)

**IC:** Intervalo de Confianza

## Índice de Tablas y Figuras

<b>Fig. 1.</b> Deformidades características del PEVAC.....	13
<b>Fig. 2.</b> Modelo Multifactorial para el PEVAC.....	19
<b>Fig. 3.</b> Locus correspondiente al grupo de genes <i>HOXA</i> .....	21
<b>Fig. 4.</b> Localización del SNP rs2428431.....	21
<b>Fig. 5.</b> Cuantificación de la muestra 106.....	34
<b>Fig. 6.</b> Dilución de la muestra 106.....	35
<b>Fig. 7.</b> Esquema representativo del ensayo de discriminación alélica con sondas <i>TaqMan</i> ®.....	36
<b>Fig. 8.</b> Verificación de integridad del ADNg por electroforesis en gel de agarosa (Muestras 91-100).....	42
<b>Fig. 9.</b> Verificación de integridad del ADNg por electroforesis en gel de agarosa (Muestras 101-109).....	42
<b>Fig. 10.</b> Verificación de integridad del ADNg en diluciones.....	43
<b>Tabla 1.</b> Prevalencia al nacimiento del PEVAC en diferentes poblaciones.....	14
<b>Tabla 2.</b> Componentes y concentraciones requeridas para la qRT-PCR.....	38
<b>Tabla 3.</b> Condiciones requeridas para efectuar la qRT-PCR.....	39
<b>Tabla 4.</b> Casos y controles analizados en el estudio.....	41
<b>Tabla 5.</b> Descripción del SNP G5738C.....	44
<b>Tabla 6.</b> Resultados de la Genotipificación para el SNP G5738C.....	46
<b>Tabla 7.</b> Comparación entre las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP G5738C.....	47
<b>Gráfica 1.</b> Ejemplo de Homocigoto para el Alelo Ancestral (C/C).....	44
<b>Gráfica 2.</b> Ejemplo de Homocigoto para el Alelo Alterno (G/G).....	45
<b>Gráfica 3.</b> Ejemplo de Heterocigoto (C/G).....	46

# ÍNDICE

<b>Resumen.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Generalidades y Marco Teórico.....</b>	<b>12</b>
1.1 Introducción al Pie Equino Varo Aducto Congénito.....	13
1.2 Prevalencia del PEVAC en Diferentes Poblaciones.....	14
1.3 Etiología del PEVAC.....	14
1.3.1 Compresión Intrauterina.....	15
1.3.2 Anormalidades de la Miogénesis u Osificación.....	16
1.3.3 Anormalidades Neurológicas.....	16
1.3.4 Insuficiencia Vascular.....	16
1.3.5 Factores Ambientales.....	17
1.3.6 Factores Genéticos.....	17
1.4 Estudios Genéticos.....	18
1.4.1 Genes <i>HOX</i> y PEVAC.....	18
1.5 Genes Homeobox ( <i>HOX</i> ).....	20
1.5.1 Grupo de genes <i>HOX</i> .....	20
1.5.2 Gen <i>HOXA2</i> .....	21
1.5.3 Polimorfismo de un sólo nucleótido rs2428431.....	21
<b>II. Planteamiento del Problema y Justificación.....</b>	<b>23</b>
2.1 Planteamiento del Problema.....	24
2.2 Justificación.....	24
<b>III. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>25</b>
3.1 Hipótesis.....	26
3.2 Objetivos.....	26
3.2.1 Objetivo General.....	26
3.2.3 Objetivos Específicos.....	26

<b>IV. Diseño del Estudio</b> .....	<b>27</b>
4.1 Universo de la muestra.....	28
4.2 Aspectos éticos.....	28
4.3 Obtención de Muestras.....	28
4.4 Criterios para los casos con PEVAC.....	29
4.4.1 Criterios de Inclusión.....	29
4.4.2 Criterios de Exclusión.....	29
4.4.3 Criterios de Eliminación.....	29
4.5 Criterios para los controles sin PEVAC.....	29
4.5.1 Criterios de Inclusión.....	30
4.5.2 Criterios de Exclusión.....	30
4.5.3 Criterios de Eliminación.....	30
<b>V. Material y Método</b> .....	<b>31</b>
5.1 Extracción y Purificación de ADN genómico.....	32
5.2 Verificación de Integridad de ADNg por Electroforesis.....	33
5.2.1 Preparación del gel de agarosa.....	33
5.2.2 Carga de muestras de ADNg.....	33
5.2.3 Visualización del ADNg.....	34
5.3 Cuantificación de muestras de ADNg.....	34
5.3.1 Realización de diluciones de ADNg.....	35
5.4 Ensayo de discriminación alélica para la detección del SNP rs2428431.....	36
5.4.1 Genotipificación.....	37
5.5 Análisis Estadístico.....	39
<b>VI. Resultados</b> .....	<b>40</b>
<b>VII. Discusión</b> .....	<b>48</b>

<b>VIII. Conclusiones y Perspectivas.....</b>	<b>52</b>
8.1 Conclusiones.....	53
8.2 Perspectivas.....	54
<b>IX. Anexos.....</b>	<b>55</b>
Anexo I (Carta de consentimiento informado para los casos).....	56
Anexo II (Ficha de identificación).....	58
Anexo III (Carta de consentimiento informado para los controles).....	59
Anexo IV (Soluciones y reactivos).....	61
Anexo V (Diagrama de flujo).....	62
<b>X. Glosario.....</b>	<b>63</b>
<b>XI. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>67</b>

## RESUMEN

**ANTECEDENTES:** El “Pie equino varo aducto congénito” (PEVAC), es una deformidad muy común que afecta alrededor de 135,000 nacidos vivos por año a nivel mundial; en México su incidencia aproximada es de 5600 casos/año, con una prevalencia de 2.32/1000 nacidos vivos. Se caracteriza por el talón en varo, el tobillo en equino, y el antepié en aducto y supino. Su etiología aún no es muy clara, los últimos estudios realizados en casos esporádicos y familiares sugieren una causa multifactorial, ya que se ha observado asociación con algunas variantes de genes que contribuyen al desarrollo embrionario de las extremidades inferiores. Es por esto que en el presente estudio se consideró como candidato al gen *HOXA2*, ya que la familia de genes *HOX* participan directamente en la morfogénesis de extremidades inferiores, esqueleto axial y músculos, durante etapa embrionaria. En población mexicana, no se ha estudiado la posible asociación de variantes ubicadas en el gen *HOXA2*, por lo que este trabajo es relevante ya que caracteriza el polimorfismo rs2428431 (G5738C) del gen *HOXA2* en pacientes de población mestiza mexicana con PEVAC y controles sanos. **MÉTODO:** Se realizó un estudio de casos y controles, determinando el tamaño de la muestra a través del programa *Quanto v.1.2.3*, tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad y del SNP, teniendo un total de 200 casos y 400 controles, los cuales fueron seleccionados de acuerdo a criterios de inclusión específicos. Se aisló y purificó el ADNg de sangre periférica, se verificó integridad por la técnica de electroforesis, la concentración del ADNg fue determinada por espectrofotometría. El contexto genómico del SNP se confirmó utilizando los sitios web: *ensembl.org* y *NCBI Entrez SNP Database*, se genotipificó con sondas *Taqman® SNP Genotyping Assays* por qRT-PCR y el análisis de discriminación alélica se realizó a través del programa *7500 Fast System SDS Software V1.4 (Applied Biosystems®)*. Las frecuencias alélicas y genotípicas, el Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), y pruebas de asociación fueron calculadas utilizando el programa *ihg2.helmoltz-muenchen.de*. **RESULTADOS:** No se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio ( $p=0.804$ ), lo cual sugiere que el polimorfismo se encuentra en EHW. La frecuencia alélica observada para el SNP G5738C fue de 0.42, es similar a la reportada en población hispana (0.409) y población blanca no hispana (0.367) en un estudio previo. **CONCLUSIONES:** Debido a que no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el SNP G5738C y el PEVAC, los datos de los pacientes deben ser estratificados de acuerdo a su historia familiar en casos simplex y multiplex para ser analizados por separado, y éstos a su vez de acuerdo a la presentación clínica de la enfermedad (unilateral y bilateral) esto podría mostrar diferencias entre las frecuencias. Finalmente se sugiere establecer las frecuencias de otros polimorfismos en genes involucrados con el desarrollo de las extremidades inferiores, lo cual permitiría analizar la asociación entre variantes génicas con el PEVAC.

## ***I. Generalidades y Marco Teórico***

## 1.1 Introducción al Pie Equino Varo Aducto Congénito

A la deformidad conocida como “Pie Equino Varo Aducto Congénito” (PEVAC), es también conocida como Talipes Equinovarus (TEV) o pie zambo. Es el defecto congénito músculo-esquelético más frecuente del pie y se caracteriza por el talón en varo, el tobillo en equino, y el antepié en aducto y supino, en algunos casos se acompaña de cavo y torsión tibial interna (*Fig. 1*)<sup>1,2,3</sup>.



*Fig. 1. Deformidades características del PEVAC: Equino y varo del tobillo, aducción y supinación del antepié. Puede asociarse a cavo y/o torsión tibial. La presencia de un pliegue en una planta es un indicador de rigidez interna<sup>4</sup>.*

El PEVAC ha sido documentado desde los tiempos de Hipócrates alrededor de los 400 a. de C. y por varios investigadores que han contribuido a las descripciones de la causa del mismo. Éstas descripciones entran en dos grupos: 1) Compresión del feto *in utero*, 2) Teorías anatómicas y actualmente se hace referencia a la contribución genética<sup>5</sup>.

Asimismo, aproximadamente el 80% de los casos del PEVAC se han asociado a múltiples malformaciones congénitas como la displasia del desarrollo en la cadera (del 1% al 16%); tortícolis congénita, aunque estudios recientes atribuyen al azar esta última asociación y que ha sido además relacionada al síndrome de Larsen<sup>5</sup>, Freeman-Sheldon<sup>6</sup>, displasia diastrófica<sup>7</sup>, artrogriposis múltiple congénita<sup>8</sup>, distrofias musculares, bandas amnióticas o de Streeter<sup>9</sup> y deficiencia de carboxil-hidrato sulfoniltransferasa-3<sup>10</sup>.

## 1.2 Prevalencia del PEVAC en Diferentes Poblaciones

EL PEVAC tiene una incidencia aproximada de 1-7 por cada 1000 nacidos vivos, dependiendo de la población a la que hagamos referencia: así, la menor prevalencia se encuentra en los afroamericanos (1/2500) y la mayor con los polinesios (1/150)<sup>11,12,13</sup> (Ver *Tabla 1*). La prevalencia del pie equino varo aducto congénito en la población mexicana en un estudio fue de 2.32 por cada 1000 nacidos vivos (IC<sub>95%</sub>: 0.86 - 3.77), por lo que se estima que al año hay 5600 nuevos casos con esta deformidad en nuestro país<sup>14</sup>.

*Tabla 1. Prevalencia al nacimiento del PEVAC en diferentes poblaciones*

<b>Población</b>	<b>Prevalencia al nacimiento del PEVAC</b>
Reino Unido	1.2 por 1000
Escocia	2 por 1000
<b>México</b>	<b>2.3 por 1000</b>
Afroamericanos	1 por 2500
Maori	6-7 por 1000
Hawaii	6-7 por 1000
Polinesia	6.8 por 150
Tonga	6-7 por 1000
China	0.3 por 1000

Modificado de Miedzybrodzka, 2003<sup>11</sup>

Es más frecuente en varones (2:1) y en la mitad de los pacientes es bilateral y en caso de presentación unilateral el lado más afectado es el derecho. Se estima que cada año nacen en el mundo 135,000 niños con PEVAC, de los cuales el 80% nacen en países subdesarrollados<sup>3</sup>.

## 1.3 Etiología del PEVAC

El PEVAC tiene una gran variabilidad en su presentación clínica, que va desde una deformidad dúctil como en el PEVAC de origen postural hasta una deformidad rígida como en la artrogriposis múltiple. La extremidad afectada es más corta y delgada: cuando la deformidad es unilateral, el pie es en promedio 1.3 cm más pequeño, 4 mm

más angosto y la pantorrilla es 2 cm más delgada<sup>15</sup>. Puede acompañarse de genu valgo, torsión tibial interna, y además se puede asociar a pie plano en la extremidad contralateral<sup>16</sup>, la presencia de un pliegue en la planta, el acortamiento del primer radio del pie y la pérdida del contorno normal del talón, también son característicos del PEVAC<sup>16</sup>.

En el PEVAC existe una displasia de toda la extremidad por lo que todos los tejidos, desde la piel hasta el hueso, están afectados: las fascias, los tendones y los ligamentos se encuentran retraídos; los huesos del pie son hipoplásicos y existen alteraciones en las articulaciones de los huesos del tarso<sup>1</sup>.

La alteración articular más importante es la pérdida parcial o total de la relación articular en la articulación talonavicular. Esta anomalía determina el aducto del antepié. El astrágalo y el calcáneo se encuentran en flexión plantar, y están rotados externamente. Esta variación espacial de los huesos en los tres planos y la retracción del tendón del tibial posterior explican el varo del talón. En la articulación calcáneo cuboidea existe una pérdida parcial o total de las relaciones articulares. La manifestación clínica de esta alteración es la curvatura convexa del borde externo del pie<sup>17,18</sup>.

La retracción de la fascia plantar, de los ligamentos plantares largos y cortos, así como de los músculos intrínsecos y extrínsecos del pie, son los responsables de la presencia del cavo. El acortamiento del tendón del tibial anterior hace que se produzca la supinación del antepié. Estudios de la anatomía vascular del PEVAC han demostrado que hasta en un 75% de los casos está ausente la arteria tibial anterior<sup>1</sup>.

Los mecanismos para entender el desarrollo del PEVAC aún no están bien comprendidos, sin embargo numerosas causas han sido sugeridas; incluyendo compresión intrauterina, anomalías en la miogénesis u osificación, anomalías neurológicas, insuficiencia vascular, factores ambientales y factores genéticos<sup>19,20</sup>.

### **1.3.1 Compresión Intrauterina**

La teoría más antigua es la compresión intrauterina la cual menciona que la presión mecánica mantiene el pie en una posición no anatómica generado por oligoamnios, algunos autores mencionan el útero pequeño en las primigestas y en algunas ocasiones por miomatosis uterina<sup>19</sup>. Refiriéndonos al oligoamnios, la hipótesis

es que ésto genera restricción uterina lo que lleva a la disminución de los movimientos fetales y en consecuencia la formación de PEVAC; lo mismo ocasionaría una miomatosis uterina de grandes elementos<sup>11</sup>. Aunque la compresión intrauterina ha sido apoyada durante siglos (desde Hipócrates), no hay estudios que la expliquen claramente<sup>19</sup>.

### **1.3.2 Anormalidades de la miogénesis u osificación**

Varios estudios han demostrado un desarrollo muscular anormal, incluyendo predominio de fibras musculares tipo I. Sí esto es debido a factores genéticos, neuropáticos o denervación; aún no es claro. Algunos autores han examinado la histología del PEVAC por microscopio electrónico observando las propiedades del tejido blando en donde describen predominio de fibras musculares tipo I y deficiencia de tipo IIB con agrupaciones de fibras anormales. Aunque no es una evidencia directa de innervación anormal; el agrupamiento de fibras es una consecuencia de denervación y reinervación. Por otro lado, la osificación endocondral coordinada con la osificación pericondral está desorganizada<sup>21</sup>.

### **1.3.3 Anormalidades neurológicas**

El PEVAC frecuentemente es una característica de síndromes neurológicos; como ejemplo: frecuentemente se asocia con defectos en el cierre del tubo neural como anomalía secundaria de espina bífida. Se realizó un estudio en donde se reportaron anomalías de la conducción nerviosa en 18 de 44 casos con PEVAC; y 8 de esos 18 tienen anomalía a nivel espinal<sup>11</sup>.

### **1.3.4 Insuficiencia vascular**

Atlas *et al.* (1980) documentaron anomalías vasculares en todos los pies deformados de 12 fetos, a nivel del seno tarsal hay bloqueo de una o más ramas del árbol vascular del pie. Individuos con PEVAC presentan debilidad muscular de la pantorrilla ipsilateral, lo cual puede estar relacionado con la reducción de perfusión a través de la arteria tibial anterior en el desarrollo<sup>11</sup>.

### 1.3.5 Factores Ambientales

Otros factores relacionados con la condición del PEVAC incluye a la amniocentesis, en donde se tiene la idea de que al extraer líquido amniótico se podría alterar la posición del feto. Se incluye además al tabaquismo, cambios estacionales, factores relacionados a la madre; y algunos otros reportes hacen referencia a enfermedad tiroidea, vacunación por viruela, salicilatos y barbitúricos<sup>19</sup>.

### 1.3.6 Factores Genéticos

No hay un patrón de herencia descrito para el PEVAC y aún no está dilucidado completamente que factores genéticos están implicados en el desarrollo de la enfermedad<sup>18</sup>. La sospecha de la contribución genética ha sido alimentada por las descripciones de diversos reportes: uno de los primeros autores en describir una contribución genética fue Wynne-Davies (1964) quien sugiere que la causa del PEVAC es tanto genética como ambiental<sup>4</sup>.

Las evidencias que soportan una contribución genética a la presencia del PEVAC es: a) Agregación familiar: En una revisión sistemática de la literatura se encontró que una historia familiar del PEVAC estuvo presente del 24 al 50% de los casos dependiendo de la población estudiada<sup>19</sup>; b) Estudios realizados en gemelos que han demostrado una concordancia en gemelos monocigotos del 32.5% y en dicigotos del 2.9%<sup>19,22</sup> y c) Análisis de segregación: numerosos estudios han apoyado la hipótesis de un solo gen con patrón de herencia Mendeliano lo que explicaría las familias con PEVAC. Wang *et al.* (1988) menciona que el PEVAC podría explicarse con una segregación autosómica dominante con una penetrancia incompleta, así como otros factores poligénicos<sup>23</sup>.

Otra característica que apoya la contribución genética es la variación en la incidencia de PEVAC en diferentes poblaciones (Ver tabla 1).

Por otro lado, los análisis de genealogías en donde se observa una mayor incidencia del PEVAC en individuos del sexo masculino (2:1) proponen que el modo de herencia no se comporta como un patrón Mendeliano clásico y que esto se debe al efecto Carter, el cual sugiere que cuando el género de menor incidencia es afectado se debe a una mayor susceptibilidad genética, ya que requiere mayor índice de

heredabilidad para que se manifieste. El análisis de segregación compleja sugiere un patrón de herencia con un solo gen de efecto mayor contra una herencia poligenica<sup>22</sup>.

#### 1.4 Estudios Genéticos

Las anomalías de la extremidad inferior son comunes y altamente visibles, que además limitan el desarrollo motor de los individuos. Muchas de estas alteraciones son el reflejo de problemas celulares específicos o interacciones moleculares que son fundamentales para el desarrollo de las extremidades inferiores; ambas bajo control genético.

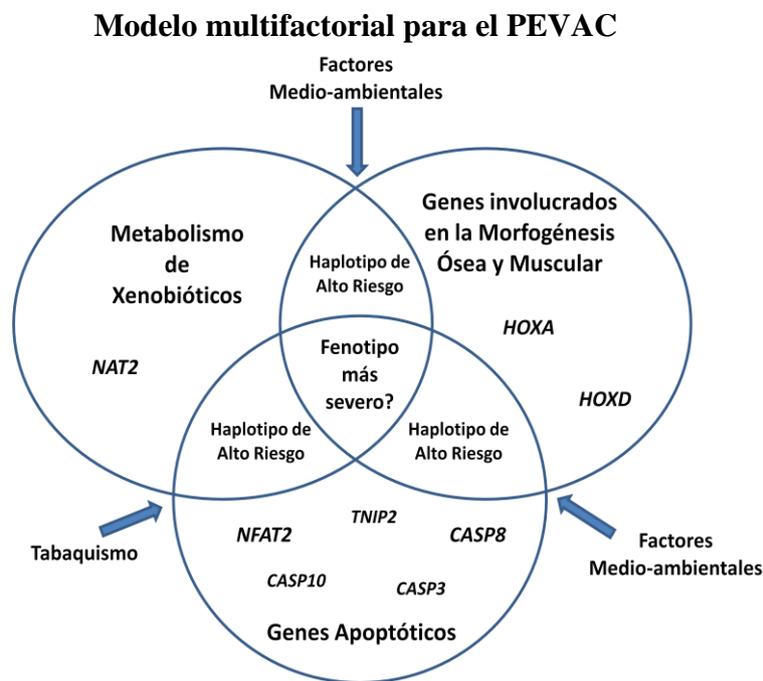
Dada la evidencia de la contribución genética para el desarrollo del PEVAC la atención se ha centrado en los genes implicados con el desarrollo de la extremidad inferior. Gurnett *et al.* (2008), describió una familia norteamericana descendiente de europeos compuesta por 5 generaciones con PEVAC unilateral de predominio derecho, con segregación autosómica dominante y penetrancia incompleta, que presenta una mutación (c.388G→A) en el gen *PITX1*. La mutación afecta la expresión de la proteína PITX1 en un homeodominio altamente conservado (E130K)<sup>24</sup>.

A partir de la implicación de *PITX1* con la presencia del PEVAC, varios investigadores han evaluado la participación de otros genes (*TNNT3*<sup>25</sup>, *MYH340*<sup>26</sup>, *TPM240*<sup>27</sup>, *CAND2*<sup>28</sup>, *WNT741*<sup>29</sup>, *Gli3*<sup>30</sup>, *HOXD13*<sup>31</sup>) implicados en el proceso de la formación de la extremidad inferior y la presentación del PEVAC; pero hasta el momento no se han asociado de manera directa con esta patología.

##### 1.4.1 Genes *HOX* y PEVAC

Ester, *et al.*, (2009)<sup>32</sup>. Publicaron un estudio donde hacen hincapié en el desconocimiento de la causa del desarrollo del PEVAC mencionando que lo más aceptado es que es una patología de origen multifactorial. En este contexto ellos evaluaron 32 polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs), de los cuales encontraron 12 polimorfismos para el gen *IGFBP3* (Insulin-like growth factor binding protein 3) quien participa en apoptosis, 11 para *HOXD* y 9 para *HOXA*, estos dos grupos de genes codifican para factores de transcripción que tienen una participación en la formación del esqueleto axial y en el desarrollo de las extremidades y músculo. La muestra en estudio se dividió en dos grupos: Blancos No Hispánicos (BNH) e Hispánicos (H), encontrando

asociación de 5 SNPs de *HOXA* y 1 en *HOXD* con el PEVAC. Un dato interesante es que el SNP rs2428431, ubicado en la región del intrón de *HOXA2*, se asoció con la presencia del PEVAC únicamente con la población hispana ( $p=0.008$ ), al combinar ambas etnicidades rs2428431 no mostró diferencias significativas ( $p=0.006$ ). Posteriormente, para predecir posibles sitios de unión a factores de transcripción utilizaron tres algoritmos (*Alibaba2*, *Patch* y *Transcription Element Search Software*), dicho análisis *in silico* sugirió que el SNP rs2428431 puede alterar los sitios de unión a factores de transcripción<sup>31</sup>. Con base en su análisis proponen un modelo multifactorial para explicar el origen del PEVAC (Fig. 2).



**Fig. 2. Modelo multifactorial para el PEVAC que incorpora la asociación de genes con la enfermedad y sus posibles interacciones con el medio ambiente. En este modelo las variaciones pueden ser necesarias, pero no son suficientes para causar la enfermedad. Interacciones en estas variantes pueden conducir al PEVAC, o posiblemente a un fenotipo más severo dependiendo del número de variantes asociadas con el PEVAC<sup>32</sup>.**

## 1.5 Genes Homeobox (*HOX*)

En humanos, las proteínas de los genes *HOX* son factores de transcripción que directamente participan en el desarrollo del esqueleto axial, músculos y extremidades inferiores. La familia de genes *HOX* consiste en 39 genes distribuidos en cuatro grupos parálogos (A, B, C y D) ubicados en distintos cromosomas (7p15-14, 17q21.3, 12q13.3 y 2q31.1, respectivamente)<sup>33,34</sup>.

Los grupos de genes *HOX* son regulados temporal y espacialmente por promotores globales, ARN no codificante, factores de transcripción y otros elementos regulatorios durante la embriogénesis<sup>33,34</sup>. La expresión de los genes ubicados hacia el extremo 3' comienza en las regiones superiores del embrión y progresa la expresión de los genes ubicados hacia la región 5' en la parte inferior del embrión<sup>35</sup>. Por ejemplo, *HOXD9* localizado cerca del extremo 5' al final del grupo, es expresado proximalmente en el miembro inferior extendido y diferenciado<sup>33</sup>.

Los grupos de genes *HOXA* y *HOXD*, son expresados en el mesodermo y músculos de las extremidades en desarrollo. Los genes del extremo 5' se empiezan a expresar tardíamente con *HOXA13* y *HOXD13*, en el autópodo distal<sup>36</sup>.

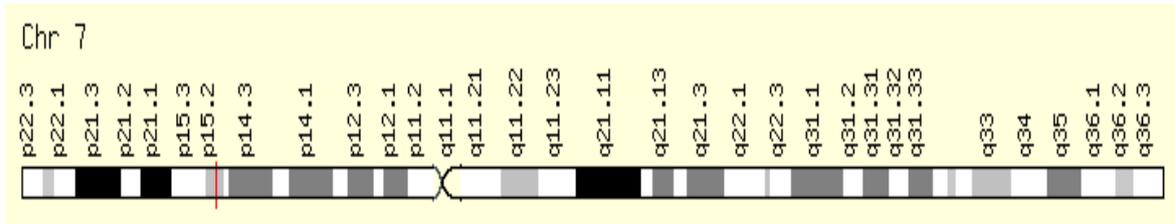
Mutaciones en *HOX* se traducen en un desarrollo anormal de las extremidades, y cada una correlaciona con algún segmento faltante del miembro<sup>36</sup>. Una delección de *HOXA11* y *HOXD11* resulta en la eliminación del zeugópodo sin embargo, la delección de *HOXA13* y *HOXD13* causan ausencia del autópodo<sup>36</sup>.

### 1.5.1 Grupo de genes *HOXA*

El grupo *HOXA* se encuentra localizado en el cromosoma 7p15-14 (*Fig. 3*), incluye 8 homeobox en 90 Kb y tiene una función redundante con *HOXD*; mutaciones en los genes *HOXA* y *HOXD* tienen asociación con seis síndromes que involucran anomalías en los miembros que incluyen sinpolidactilia y braquidactilia<sup>36</sup>.

Los genes *HOXA* del extremo 5' son expresados en los músculos de los miembros superiores e inferiores, además están involucrados en la forma y diferenciación de los músculos en ambos miembros en la etapa embrionaria y en los adultos durante la reparación del músculo<sup>37</sup>.

Se ha demostrado que los genes *HOXA11* y *HOXA13* participan en el desarrollo del cartílago, y *HOXA13* regula la adhesión celular durante el paso de condensación de la esquelotogénesis<sup>37</sup>. El desarrollo sincronizado de los músculos, tendones y cartílagos son cruciales para la apropiada formación de los miembros y los genes *HOXA* del extremo 5` regulan cada una de esas funciones<sup>39,40</sup>.



**Fig. 3.** En rojo, el locus correspondiente al grupo de genes *HOXA*: 7p15-14<sup>41</sup>

### 1.5.2 Gen *HOXA2*

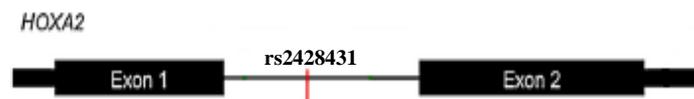
Pertenciente al grupo A de la familia de los genes Homeobox (*HOX*), el gen *HOXA2* se localiza en el cromosoma 7p15.2 y su secuencia consta de 2710 pb, se encuentra conformado por 2 exones de 702 pb y 1364 pb respectivamente y su único intrón es un fragmento de 644 pb, produce un transcrito (*HOXA2*-001) de 2066 bases para codificar una proteína de 376 aa (41002 Da)<sup>42</sup>.

Alasti *et al.*, (2008) reportó una mutación en el gen *HOXA2* en una familia de origen Iraní con *Microtia*, en su estudio detectó la variante en los miembros de la familia que se traduce en un cambio de un aminoácido altamente conservado (p.Q186K), la variante no se detectó en sujetos sanos, por lo que se presume que la mutación contribuye con la presencia de *Microtia*<sup>43</sup>.

### 1.5.3 Polimorfismo de un sólo nucleótido rs2428431

El polimorfismo rs2428431 (G5738C) se encuentra situado en la región del único intrón del gen *HOXA2* (Fig. 4), y consiste en un cambio de Citosina (C) por Guanina (G) en la posición 5738, donde el alelo ancestral lo representa “C” y el alelo alterno “G”<sup>42,44</sup>.

**Fig. 4.** En rojo, la localización del SNP rs2428431 (región del intrón en el gen *HOXA2*)<sup>42,44,45</sup>



El SNP rs2428431 se ha descrito básicamente en dos estudios: uno relacionado con Microtia y el otro con el PEVAC. En México no existen antecedentes directos, en los que se haya estudiado la presencia de éste polimorfismo.

Como se mencionó anteriormente el polimorfismo rs2428431, se ha estudiado en población hispana con PEVAC, en la cual se encontró una asociación ( $p=0.008$ ) de esta patología con el SNP, en el mismo estudio también se evaluó la contribución del polimorfismo con población blanca no hispana en la que no se encontró asociación ( $p=0.345$ ).

El primer estudio, comentado anteriormente, se basó en una familia Iraní con Microtia donde analizaron el gen *HOXA2* en una población del Bronx, su muestra consistió en sujetos afroamericanos e hispanos afectados con Microtia. Para determinar si mutaciones en los genes *SIX2* y *HOXA2* son causales de Microtia, realizaron un análisis de secuenciación en éstos dos genes, la muestra consistió en 8 pacientes y 100 controles. No identificaron variantes en regiones codificantes, sin embargo detectaron 4 SNPs (2 para cada gen) en la región del intrón en las muestras de pacientes. Entre los polimorfismos detectados se encontró rs2428431 sólo en un paciente, por lo que no se le puede atribuir una asociación con Microtia debido a que su muestra no es muy extensa y sólo se detectó en un caso, un análisis realizado *in silico* a través del software *SMARCA3* sugiere que éste SNP puede alterar los sitios de unión a factores de transcripción <sup>45</sup>.

## *II. Justificación y Planteamiento del Problema*

## 2.1 Planteamiento del problema

El Pie Equino Varo Aducto Congénito (PEVAC), es un defecto que afecta a 135,000 nacidos vivos/año a nivel mundial. En México su incidencia aproximada es de 5600 casos/año, con una prevalencia de 2.32/1000 nacidos vivos.

Actualmente se plantea una etiología multifactorial, por lo que factores medio ambientales y genéticos participan en el desarrollo del mismo.

Por su parte, los genes *HOX* participan en la morfogénesis ósea y muscular de las extremidades inferiores. Ester *et. al.*, (2009), identificó una asociación del polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) rs2428431 del gen *HOXA2*, en casos con PEVAC de población hispana ( $p=0.008$ ) a diferencia de los blancos no hispanos en donde no encontraron asociación ( $p=0.345$ ).

Por tal motivo surge la necesidad de evaluar la posible asociación del SNP rs2428431 con la presencia del PEVAC en pacientes con esta patología, ya que en población mestiza mexicana no se ha estudiado la presencia de este polimorfismo.

## 2.2 Justificación

Dado el desconocimiento que se tiene de las causas genéticas que están involucradas con la presencia del PEVAC, es que resulta importante identificar la contribución del polimorfismo rs2428431 (G5738C) del gen *HOXA2*, ya que participa en la morfogénesis del esqueleto axial y músculos de las extremidades inferiores.

En México no existe línea de investigación alguna, dirigida hacia el estudio de polimorfismos en el gen *HOXA2* como candidato para el desarrollo del PEVAC, por lo cual es necesario realizar el presente estudio en población mestiza mexicana.

### ***III. Hipótesis y Objetivos***

### 3.1 HIPÓTESIS

El gen *HOXA2* al pertenecer a la familia de los genes Homeobox, se involucra en la morfogénesis ósea y muscular de las extremidades inferiores, por lo tanto la presencia del polimorfismo G5738C localizado en el gen *HOXA2* puede encontrarse asociado con la presencia del PEVAC en población mestiza mexicana.

### 3.2 OBJETIVOS

#### 3.2.1 Objetivo General

- Determinar la asociación del SNP *HOXA2* rs2428431 (G5738C), con la presencia del PEVAC en población mestiza mexicana.

#### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar los casos con PEVAC y controles sin PEVAC, estableciendo criterios de inclusión, exclusión y eliminación.
- Crear un banco de ADN a partir de la inclusión de casos con PEVAC y controles sin PEVAC, para determinar las causas genéticas de la enfermedad.
- Identificar el SNP G5738C del gen *HOXA2* en los casos y controles a través de un análisis de discriminación alélica.
- Estimar y comparar las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP G5738C entre los dos grupos de estudio, empleando el programa *ihg2 Hardy-Weinberg Equilibrium*.
- Evaluar la contribución del SNP con la presencia del PEVAC mediante el análisis estadístico.

## ***IV. Diseño del Estudio***

#### **4.1 Universo de la muestra**

Se trató de un estudio de casos y controles, analítico observacional con muestreo y asignación no probabilístico, consecutivo.

El tamaño de la muestra fue calculado por un programa específico para estudios de genética de poblaciones denominado *Quanto version 1.2.3*, se consideró su incidencia (5600 casos/año), así como su prevalencia en México (2.32/1000 nacidos vivos).

Para la realización del presente estudio, se eligieron casos y controles mestizos mexicanos, cabe mencionar que se considera como mestizo a cualquier individuo Latinoamericano que tiene ancestros amerindios y europeos.

La población mexicana moderna resulta de una mezcla de más de 65 grupos étnicos amerindios con grupos españoles y algunos grupos de origen africano, resultando en una estructura genética única, con patrones específicos de susceptibilidad y resistencia a enfermedades comunes<sup>46</sup>.

#### **4.2 Aspectos éticos**

El proyecto fue revisado y aprobado por la comisión de investigación y ética del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre-ISSSTE; así como también por parte del Hospital Shriners para Niños, Cd. de México.

Se solicitó que padres o tutores de los pacientes y controles participantes, firmaran un consentimiento informado (*Anexos I y III*) y una hoja de datos generales (*Anexo II*), en el que autorizaron el uso de su material genético para éste y futuros estudios, su muestra formó parte de un banco de ADN. Los sujetos con mayoría de edad decidieron sobre su participación, la etnicidad fue confirmada por los sujetos mismos y firmaron el consentimiento informado. Se realizó un árbol genealógico (Genetista) que incluyó tres generaciones ascendentes nacidas en México.

#### **4.3 Obtención de las muestras (Pacientes y controles)**

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes que acudieron a la clínica de Ponseti del Hospital Shriners para Niños de la Ciudad de México, A. C., de Octubre de 2010 a Junio de 2011. Este hospital es un centro de concentración de pacientes con problemas ortopédicos, por lo que en el transcurso de este tiempo se

obtuvieron 200 muestras de casos PEVAC. Mientras tanto las 400 muestras de los sujetos control, se obtuvieron en el servicio de Banco de Sangre del Centro Médico Nacional “20 de Noviembre-ISSSTE”.

Para ambos grupos se eligieron sujetos de cualquier edad, de ambos sexos y de diferentes estados de la República Mexicana.

#### **4.4 Criterios para los casos con PEVAC**

Los principios para la inclusión de los casos se definieron de acuerdo a lineamientos que permitieran la obtención de muestras de sangre a partir de sujetos que fueran representativos de ésta patología, para lo cual la muestra de estudio se obtuvo estableciendo los siguientes puntos.

##### **4.4.1 Criterios de Inclusión**

Todos los pacientes con diagnóstico de la enfermedad (PEVAC) que acudieron a la Clínica de Ponseti del Hospital Shriners para Niños, Ciudad de México; cuyos padres o tutores estuvieron de acuerdo en participar y firmaron el consentimiento informado. El diagnóstico del PEVAC fue clínico (Ortopedista Pediatra y/o Genetista) de acuerdo a la escala de Diméglio que valora el plano sagital (equino), plano frontal (desviación del varo), rotación (del talo) y plano horizontal (aducción del antepié sobre el retropié).

##### **4.4.2 Criterios de Exclusión**

Todos los pacientes con diagnóstico de la enfermedad (PEVAC) que acudieron a la Clínica de Ponseti del Hospital Shriners para Niños, Ciudad de México; que tuvieran una patología que predispusiera ó que parte de sus manifestaciones clínicas fueran el PEVAC (por ejemplo: distrofia miotónica, distrofia muscular congénita, neuropatía Charcot-Marie-Tooth; etc.), fueron excluidos.

##### **4.4.3 Criterios de Eliminación**

Muestras de pacientes que por algún motivo, ya sea logístico o metodológico se perdieron.

#### **4.5 Criterios para los controles sin PEVAC**

Para establecer una mayor comparabilidad posible entre ambos grupos y obtener una muestra representativa de la población sana, se elaboraron los siguientes criterios de

selección en el cual el grupo control se integró básicamente por sujetos que no tuvieran antecedentes personales y/o familiares de la enfermedad.

#### **4.5.1 Criterios de inclusión**

Individuos sin antecedentes personales y/o familiares de PEVAC, que estuvieron de acuerdo en participar y firmaron el consentimiento informado.

#### **4.5.2 Criterios de exclusión**

Individuos con antecedentes personales y/o familiares de PEVAC.

#### **4.5.3 Criterios de eliminación**

Muestras de individuos que por algún motivo, ya sea logístico o metodológico se perdieron.

## ***V. Material y Método***

## 5.1 Extracción y Purificación del ADN Genómico

La extracción del ADN genómico (ADNg) fue realizada a través del equipo: *FujiFilm™ QuickGene-810* siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante, también se utilizó un método que se modificó a partir del propuesto por Miller, *et al.* (1988)<sup>47</sup> como se describe a continuación:

Se procedió a la toma de muestra, consistente en 5 ml de sangre periférica, obtenida por venopunción al donante. La muestra se depositó en tubos *Vacutainer™* de 5 ml (previamente rotulados), los leucocitos fueron separados por centrifugación a 2500 rpm durante 15 min., fue separada la capa de plasma (se inactivó en cloro) y se trasladó la capa de leucocitos con ayuda de una micropipeta de 1000 µl, a tubo *Falcon™* de 5 ml.

Fueron agregados 2 ml de Sacarosa-Tritón 2X (Sacarosa 0.64 M, Tris-base 0.02 M, MgCl<sub>2</sub> 0.01 M y Tritón X-100 al 2%) por 1 ml de agua bidestilada, ambos a 4 °C; se agitó con vortex y se incubaron a 4 °C por 10 min., los leucocitos fueron separados por centrifugación a 2300 rpm por 10 min., transcurrido el tiempo se decantó el sobrenadante y se repitió la operación 2 veces más, hasta obtener el botón celular libre de eritrocitos.

El botón celular fue resuspendido en 72 µl de NaCl 5 mM, y transferido a un tubo *Eppendorf™* de 1.6 ml., después fueron agregados 36 µl de SDS (Sulfato dodecílico de sodio) al 10 %, se agitó con vortex e incubado por 5 min. a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se agregaron 246.36 µl de NaCl saturado, se agitó con vortex y fue incubado nuevamente a temperatura ambiente por 5 min, las muestras fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 min., fue recuperada la fase líquida y se repitió la centrifugación.

Para precipitar el ADN, se agregaron dos volúmenes de etanol absoluto a 4 °C (de acuerdo al volumen de la fase líquida) para resuspenderlo manualmente. Se trasladó el ADN a un tubo *Eppendorf™* de 1.6 ml, se eliminó exceso de sales y proteínas con etanol al 70% (2 o 3 veces), las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 2 min., se dejaron secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. Transcurrido el tiempo, se agregaron de 60 a 100 µl (dependiendo del tamaño) de agua inyectable a una temperatura de 60 °C para obtener la solución de ácido nucleico, las muestras fueron rotuladas y almacenadas a -20 °C.

## **5.2 Verificación de Integridad del ADNg por Electroforesis**

La integridad del ADNg obtenido, para cada una de las muestras, fue verificada por electroforesis en gel de agarosa al 1%, para lo cual se modificó el protocolo sugerido por Yábar Varas (2003)<sup>48</sup>, posteriormente fueron cuantificadas por espectrofotometría, ambos procesos se realizaron para verificar integridad, pureza y concentración.

### **5.2.1 Preparación del gel de agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1 %, en matraz Erlenmeyer de 250 ml, en donde se colocaron 100 ml de TBE 1X (Tris-base, Ácido bórico y EDTA) por 1 g. de agarosa, se calentó la mezcla a ebullición (60 °C) hasta disolver completamente la agarosa; se agregaron 3.5 µl de bromuro de etidio y se agitó la mezcla suavemente, la mezcla fue vertida en el molde y se colocó el peine para moldear los pozos, el gel se dejó polimerizar durante 40 minutos, transcurrido el tiempo; se retiró el peine y el sistema que contenía el gel polimerizado, éste fue sumergido en la cámara de electroforesis el cual llevó dos electrodos: uno de polo positivo y otro de polo negativo, estos se conectaron a una fuente de poder. Asimismo, la cámara contenía el buffer de electroforesis para ADN, (Buffer TBE 1X). Al momento de sumergir el gel en la cámara, se aseguró de que los pozos del gel estuvieran totalmente saturados de buffer.

### **5.2.2 Carga de muestras de ADNg**

Para colocar el ADNg en los pozos, las muestras fueron mezcladas, utilizando cinco volúmenes de solución que contenía la muestra del ácido nucleico con un volumen del buffer de carga 6X (*Gel Loading Dye Blue 6X, BioLabs, Inc.*). Se añadió un volumen de buffer de carga repartidos en alícuotas (de acuerdo al número de muestras que se colocaron en los pozos) sobre un pedazo de lámina extensible de parafina. Después fueron añadidos los cinco volúmenes de cada una de las muestras de ADNg sobre las alícuotas de buffer carga 6X para mezclarlos totalmente.

Mediante el uso de puntas de 20 µl, se procedió a cargar cuidadosamente las muestras en los pozos, evitando la contaminación del pozo contiguo. Al ser finalizada la colocación del ADNg en los pozos, la cámara fue cubierta con la tapa y se conectaron los cables correspondientes de los electrodos en la fuente de poder. Se encendió la fuente de poder y fueron seleccionados 80 Volts y 300 mA durante 50 min.

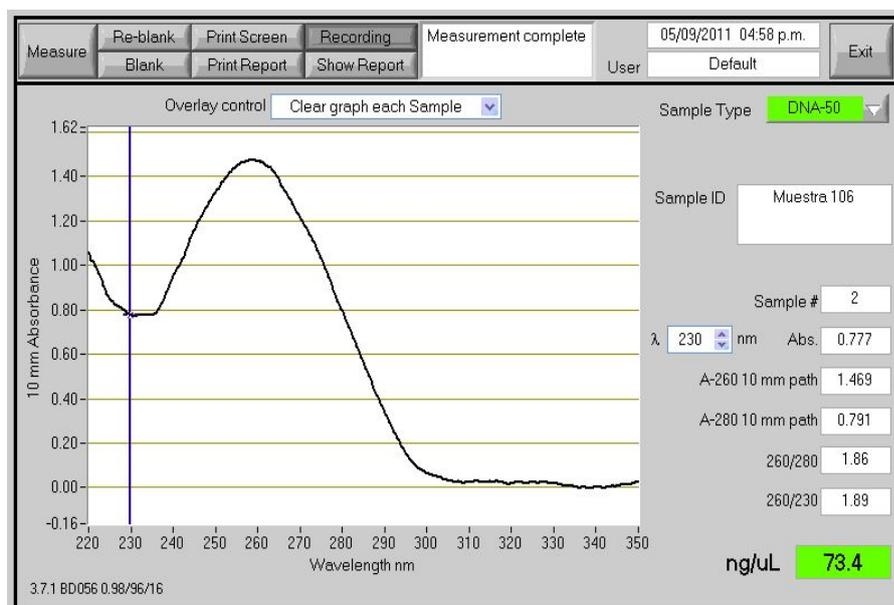
### 5.2.3 Visualización del ADNg

Finalizada la electroforesis se procedió al desmontaje del equipo comenzando con la desconexión de los electrodos de la fuente de poder, el sistema que contenía el gel de agarosa, fue trasladado al transiluminador de rayos UV (*Gel Logic 1500 Imaging System™*) para la visualización de las bandas de ADNg. Se tomó una fotografía a las bandas obtenidas para su interpretación y análisis, utilizando el programa *Kodak® Molecular Imaging Software, version 4.5*.

### 5.3 Cuantificación del ADNg

La cuantificación de las muestras, se realizó por espectrofotometría utilizando el equipo *Thermo Scientific NanoDrop-1000™*, éste aparato nos permitió determinar la concentración en ng/μl del ADNg aislado, con una longitud de onda de 230 nm. Los resultados producto de la cuantificación fueron proyectados a través del programa *ND-1000 V3.7.1*.

En el procedimiento, se colocó 1 μl de H<sub>2</sub>O desionizada en el lector del aparato, cerrando el brazo del lector para realizar la asignación del elemento considerado blanco. Limpiando el lector utilizando solamente material apropiado (*kim wipes*). Posterior a esto se colocó 1 μl de la muestra problema para registrar los datos referentes a la lectura (*Fig. 5*).



**Fig. 5. Cuantificación en la muestra 106 (73.4 ng/μl)**

### 5.3.1 Realización de diluciones de ADNg

A partir de la concentración stock de las muestras de ADNg, se realizaron diluciones, llevando nuestra muestra de ácido nucleico a una concentración de entre 10 y 12 ng/μl. Para ajustar las muestras a ésta concentración, se utilizó la siguiente ecuación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

donde:

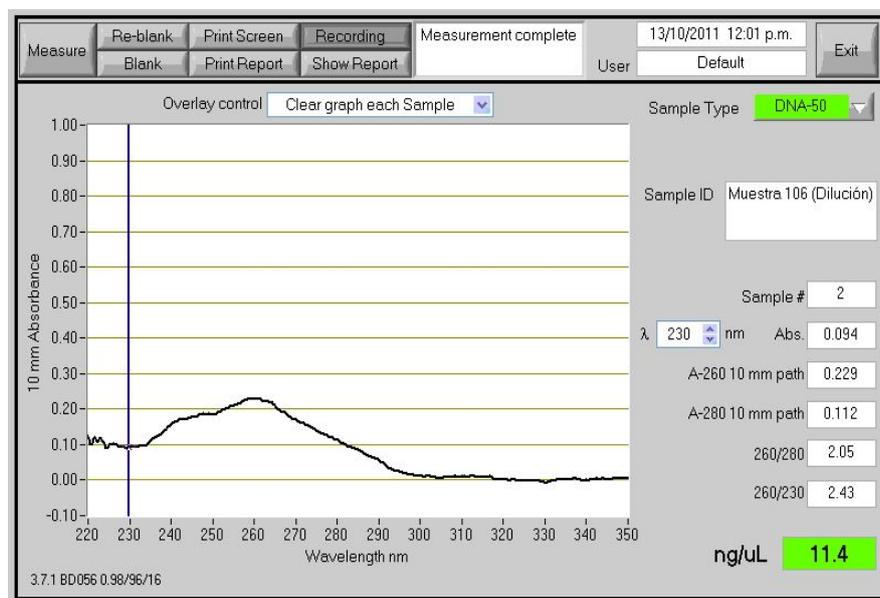
$C_1$  = Concentración inicial de la muestra stock de ADNg

$V_1$  = Volumen requerido, a partir de la solución stock

$C_2$  = Concentración final de la dilución (10-12 ng/μl)

$V_2$  = Volumen final de la dilución (100 μl)

La concentración de las diluciones se confirmó por espectrofotometría (Fig. 6), utilizando el protocolo antes descrito.



**Fig. 6. Dilución de la muestra 106 (11.4 ng/μl)**

Se verificó la integridad de las diluciones de ADNg por la técnica de electroforesis, siguiendo el protocolo antes descrito. Las diluciones fueron rotuladas y almacenadas a -20 °C, para su posterior utilización en el ensayo de discriminación alélica.

#### 5.4 Ensayo de Discriminación Alélica para la detección del SNP rs2428431

La tecnología *Taqman*® de *Applied Biosystems*™, es muy útil para la detección de SNPs. Este ensayo tiene su fundamento en la utilización de la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa (ADNpol), en éste caso las dos sondas *Taqman*® presentes en el ensayo, son cada una de ellas complementaria para cada uno de los SNP. Cada una posee un fluoróforo (marcador *VIC*® dye ó *FAM*™ dye) diferente en el extremo 5' y un atenuador de fluorescencia de unión al surco menor (NFQ-MGB) en el extremo 3'. Durante la fase de extensión de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la enzima *AmpliTaq Gold*® rompe la sonda/as hibridada con el ADN, separando el fluoróforo del atenuador y a su vez se detecta la emisión de la fluorescencia por una de las sondas (homocigoto para el alelo alterno ó ancestral, ó de ambas (heterocigoto)) (Fig. 7).

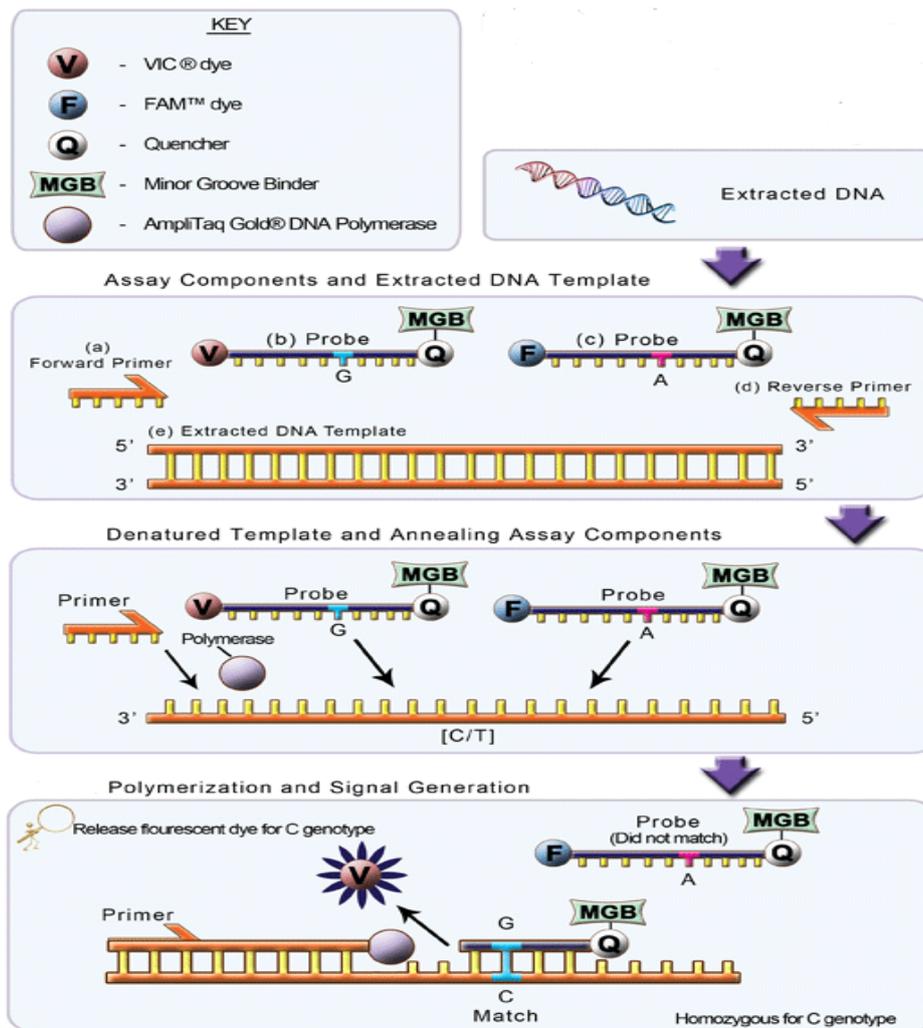


Fig. 7. Esquema representativo del ensayo de discriminación alélica utilizando sondas *Taqman*®, éste ensayo se basa en la actividad 5' exonucleasa de la ADNpol.

### 5.4.1 Genotipificación

El SNP rs2428431 (G5738C), previamente identificado (Ester AR *et al.*, 2010); así como su contexto genómico, fueron confirmados utilizando los sitios web: *Ensembl Genome Browser* ([ensembl.org](http://ensembl.org)) y el perteneciente al National Center for Biotechnology Information: *NCBI Entrez SNP Database* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), ya ubicado el SNP las sondas se sintetizaron a través de la compañía *Applied Biosystems*<sup>TM</sup>, Foster City CA.

Para identificar la secuencia contexto durante el ensayo, las sondas utilizadas fueron *TaqMan*<sup>®</sup> *SNP Genotyping Assays*: La secuencia que contiene el cambio C/G, y que está marcada con fluoróforos específicos, es la siguiente:

5' - CTC CCA GCC CAC TCT CCC CTC CCCC [C/G] ACA GCC ACT CTC GGG  
GCA GCC CGGA - 3' - MGB - NFQ

#### **Donde:**

**C** = Homocigoto para el alelo ancestral (marcador *VIC*<sup>®</sup> *dye*)

**G** = Homocigoto para el alelo alterno (marcador *FAM*<sup>TM</sup> *dye*)

**C/G** = Heterocigoto (ambos marcadores)

**MGB - NFQ** = Atenuador de fluorescencia de unión al surco menor

El ADN para cada una de las muestras fue sometido a análisis del SNP rs2428431; a través de un ensayo de discriminación alélica utilizando una variante de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), denominada como: PCR en Tiempo Real (qRT-PCR) utilizando sondas *TaqMan*<sup>®</sup> *SNP Genotyping Assays*.

Los ensayos fueron realizados de acuerdo al protocolo sugerido por *Applied Biosystems*<sup>TM</sup>, los componentes de la mezcla de reacción y las cantidades requeridas para cada muestra se encuentran descritas en la *Tabla 2*, así como también el cálculo para la reacción.

**Tabla 2. Componentes y concentraciones requeridas para la reacción**

<b>Componente</b>	<b>Concentración 1X</b>	<b>Concentración 96X</b>
<i>Taqman® Genotyping Master Mix 2X</i>	5 µl	480 µl
Sonda <i>TaqMan® 40X</i>	0.25 µl	24 µl
Agua libre de ADNasa	2.25 µl	216 µl
ADNg [10-12 ng/µl]	2.5 µl	-
<b>Vol. de reacción</b>	<b>10 µl</b>	<b>720 µl</b>

Se realizó la preparación de la mezcla de reacción, para cada uno de los ensayos en tubos *Eppendorf™* de 1.6 µl. Añadiendo cada uno de los componentes requeridos para la reacción. Los ensayos se efectuaron en microplacas de 96 pozos (*MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate*). A cada pozo se le agregó 7.5 µl de mezcla de reacción, después se adicionó la muestra de ADNg (paciente ó control) a procesar. En todos los ensayos se incluyeron 3 controles positivos y 2 negativos. Para evitar la evaporación y contaminación de la mezcla de reacción, las microplacas fueron cubiertas con una película adhesiva (*MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems™*). Finalmente la microplaca fue centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto.

Los ensayos se efectuaron a través del termociclador en Tiempo Real: *7500 Fast-Real Time PCR System (Applied Biosystems™)*, en éste equipo se insertó la microplaca y las condiciones fueron programadas en el software, como sigue: una incubación de 95 °C por 10 min., que corresponde a la activación de la enzima *AmpliAq Gold®*; y después la PCR que consistió en 40 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 0:15 seg. y alineamiento/extensión a 60 °C por 1:30 min., (ver *Tabla 3*).

**Tabla 3. Condiciones requeridas para efectuar la qRT-PCR**

	Activación de la Enzima <i>AmpliTaq Gold</i> ®	PCR	
		40 Ciclos	
	Incubación	Desnaturalización	Alineamiento/Extensión
<b>Tiempo</b>	10:00 min	0:15 seg.	1:30 min.
<b>Temperatura</b>	95 °C	95 °C	60 °C

Se utilizó el paquete de software, proporcionado por *Applied Biosystems: 7500 Fast System SDS Software V1.4*. Este software utiliza un algoritmo para calcular distintas señales alelo/marcador desde la fluorescencia emitida para cada muestra, durante la lectura en el transcurso del ensayo. La función que detecta el SNP, automáticamente determina los genotipos de la muestra y genera un grupo en el cuadro que ayuda a visualizar los datos de estas, a manera de gráficas.

### 5.5 Análisis estadístico

Los genotipos resultantes a partir del ensayo de discriminación alélica fueron almacenados en una base de datos. Las frecuencias alélicas y genotípicas, Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) y pruebas de asociación fueron calculadas a través del software en línea: *IHG2 Hardy-Weinberg Equilibrium*<sup>49</sup>, perteneciente al *Institut für HumanGenetik* (Alemania).

## ***VI. Resultados***

## 6. RESULTADOS

Para la realización del presente estudio, se obtuvo la aprobación del Comité de Investigación y Ética del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre-ISSSTE, así como por parte del Hospital Shriners para Niños Cd. de México.

Todos los sujetos (casos y controles) con el previo consentimiento de los padres o tutores que aceptaron participar en el estudio, firmaron una carta de consentimiento escrito informado que permitió disponer de la información y las muestras de su ADN. La forma del consentimiento informado (*Anexos I y III*), se estructuró acorde a las disposiciones establecidas por el “Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud”.

Para conservar la privacidad y confidencialidad de los datos obtenidos en la hoja de datos generales (*Anexo II*) que se aplicó, así como los datos obtenidos en el estudio del polimorfismo, se realizó una base de datos utilizando el software *IBM SPSS Statistics 20*.

Para la identificación de los sujetos participantes durante el estudio se les asignó una clave, en ningún momento se utilizó su nombre para conservar su anonimato, las muestras se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

De acuerdo a los criterios de selección para la inclusión de casos y controles en el estudio, se obtuvieron 600 muestras de sangre periférica, de las que se aisló y purificó el ADN genómico (ADNg), las cuales consistieron en 200 casos con PEVAC (140 hombres y 60 mujeres) y 400 controles (280 hombres y 120 mujeres) (Ver *Tabla 4*). La proporción caso-control fue de 1:2. Las muestras de los casos se obtuvieron en el Hospital Shriners para niños: Cd. de México, mientras tanto las muestras de los sujetos control, se obtuvieron en el servicio de “Banco de Sangre” del CMN 20 de Noviembre-ISSSTE.

	Sexo		n
	Masculino	Femenino	
Casos	140 (70%)	60 (30%)	<b>200</b>
Controles	280 (70%)	120 (30%)	<b>400</b>

*Tabla 4. Casos y Controles analizados en el estudio*

Los sujetos del sexo masculino comprendieron el 70% de los casos, mientras tanto el sexo femenino comprendió el 30% de los casos, para los controles se consideró el doble de individuos para cada género de acuerdo a los casos.

Una vez concluida la extracción y purificación del ADNg, en las muestras antes descritas, la concentración del ácido nucleico para cada muestra fue determinada por espectrofotometría (Fig. 6).

La integridad del ADNg aislado se verificó a través de la técnica de electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, para la tinción del ADNg se utilizó un agente incluyente como el bromuro de etidio, a través de un transiluminador de rayos UV se visualizaron las bandas y éstas se fotografiaron para su interpretación y análisis (Fig. 8 y 9).

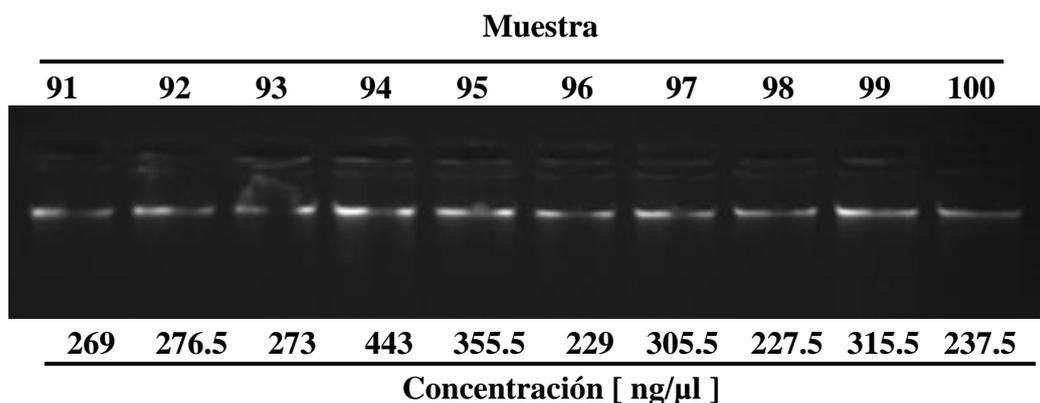


Fig . 8. Verificación de Integridad del ADNg por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Muestras 91 a 100)

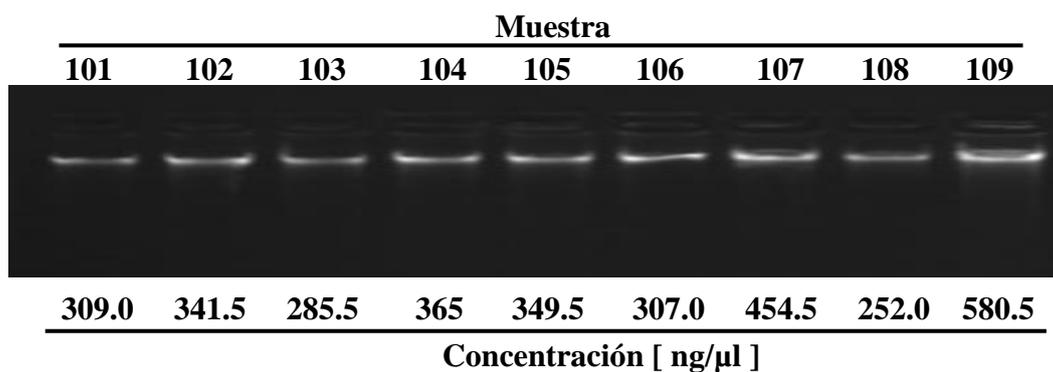


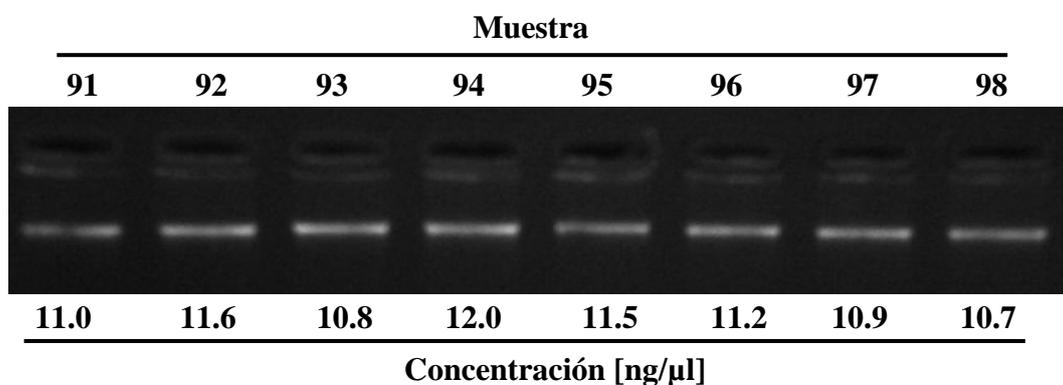
Fig. 9. Verificación de Integridad de ADNg por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Muestras 101 a 109)

Como se puede observar en las *figuras 8 y 9*, cada muestra de ADN<sub>g</sub> produce una banda clara y distinguible, ésto indica que las muestras se encuentran íntegras, lo cual demuestra que el proceso de extracción y purificación de ADN<sub>g</sub> se efectuó satisfactoriamente, además de comprobar su viabilidad para pruebas futuras.

Por otra parte, debido a que las muestras se encuentran a una concentración que no varía significativamente entre ellas, las bandas muestran la misma intensidad, lo cual también es demostrado por la concentración en cada una de las muestras.

Ahora bien, debido a que el protocolo sugerido por la tecnología *Taqman*<sup>®</sup>, requiere de una concentración entre 2 y 20 ng/μl de ADN<sub>g</sub> para efectuar el ensayo de discriminación alélica por qRT-PCR, se realizaron diluciones a partir de la solución stock del ácido nucleico, en las que se llevó cada una de las muestras a una concentración comprendida entre 10 y 12 ng/μl en 100 μl.

La integridad del ADN<sub>g</sub> de las diluciones se verificó por la técnica de electroforesis siguiendo el protocolo antes descrito, la concentración requerida fue determinada y comprobada por espectrofotometría (*Fig. 10*).



**Fig. 10. Verificación de la Integridad del ADN<sub>g</sub> por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Muestras 91 a 98)**

Este procedimiento permitió comprobar la viabilidad de las diluciones para la experimentación por qRT-PCR y de esta forma descartar la posibilidad de que las muestras de ADN, pudieran tener mala calidad y afectar la reacción.

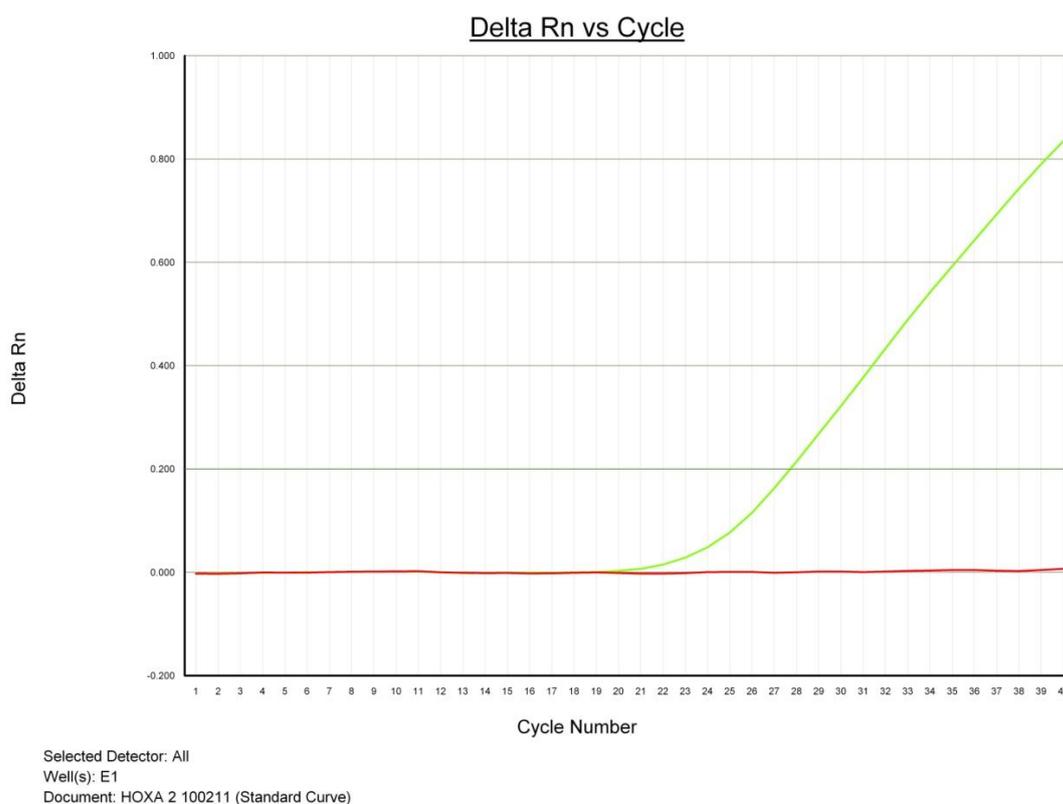
Por otra parte, la localización del SNP G5738C (*Tabla 5*), así como su contexto genómico fueron confirmados utilizando los sitios web: *Ensembl Genome Browser* y *NCBI Entrez SNP Database*. A partir de esta información, fueron sintetizadas las sondas

de marca comercial: *Taqman® SNP Genotyping Assays* a través de *Applied Biosystems™* (Foster City, CA).

Gen	dbSNP	Par de Base No.	Alelos	Localización	Cambio ADNc
<i>HOXA2</i>	rs2428431	27141657	C/G	Intrón	5738G>C

**Tabla 5. Descripción del SNP G5738C**

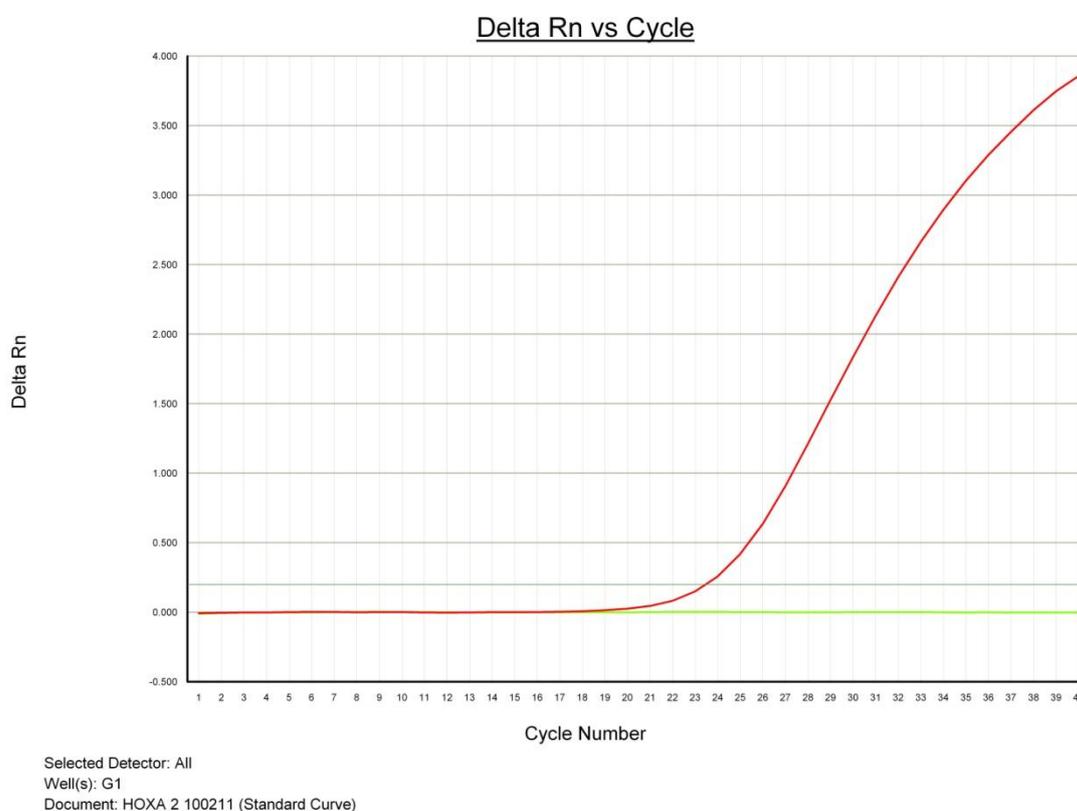
De este modo, para determinar si el polimorfismo G5738C, se encuentra asociado con la presencia del PEVAC: 200 casos y 400 controles sin parentesco de población mestiza mexicana, fueron genotificados a través del ensayo de discriminación alélica utilizando sondas *Taqman®*. Los genotipos se detectaron en el equipo *7500 Fast-Real Time PCR System Applied Biosystems™*, la fluorescencia emitida por el marcador fue proyectada a través del programa: *Applied Biosystems™: 7500 Fast System SDS Software V1.4.*, como se muestra a continuación:



**Gráfica 1. Ejemplo de Homocigoto para el Alelo Ancestral (C/C), marcado con VIC® dye (muestra 92)**

Como puede observarse en la gráfica, la emisión de fluorescencia se incrementa de manera exponencial conforme transcurren los ciclos de la qRT-PCR. Esto se debe precisamente, a que durante la fase de polimerización, la enzima *AmpliTaq Gold®* desprende el fluoróforo *VIC® dye* de la sonda ya hibridada con el alelo (C/C) y el atenuador (NFQ-MGB), éste rompimiento emite una fluorescencia durante cada ciclo de amplificación. Ésta tendencia se observó en el 36% de los casos (72 muestras) y en el 32.75% de los controles (131 muestras).

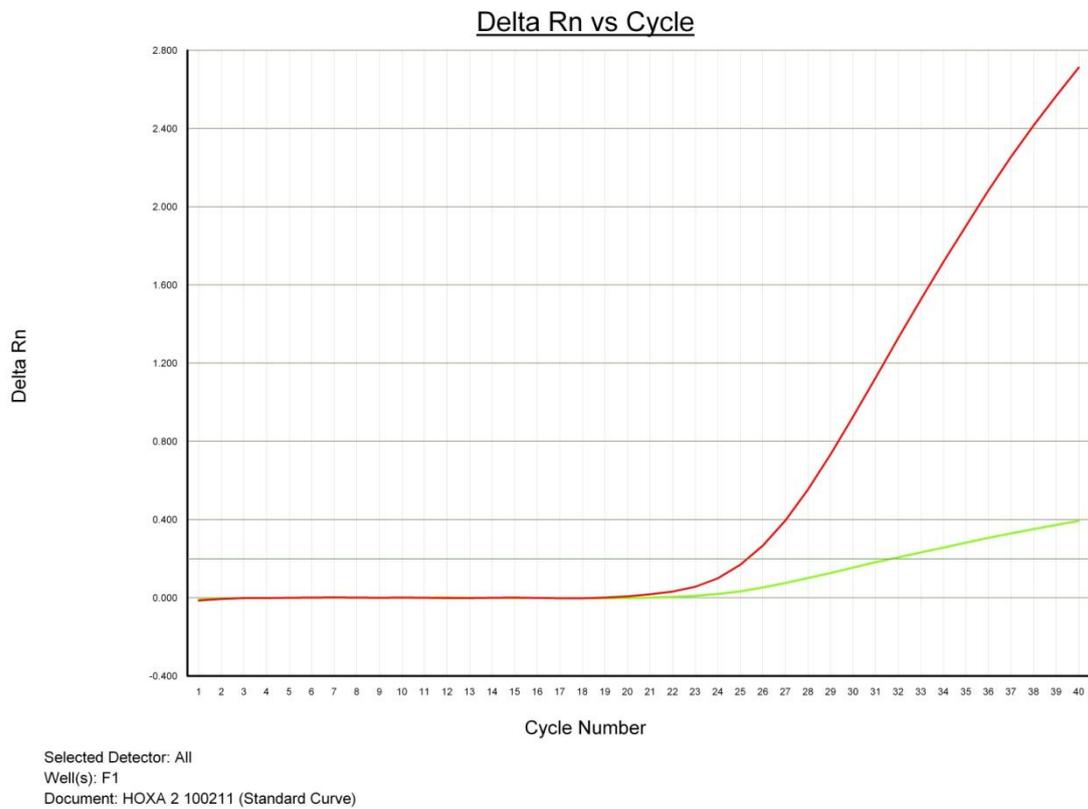
Bajo el principio anterior, la gráfica siguiente muestra la detección del alelo alterno (G/G), marcado con el fluoróforo *FAM™ dye*, ésta tendencia se observó en el 19% de los casos (38 muestras) y en el 17.25% de los controles (69 muestras).



**Gráfica 2. Ejemplo de Homocigoto para el Alelo Alterno (G/G), marcado con *FAM™ dye* (muestra 94)**

Mientras tanto los individuos heterocigotos (C/G), fueron detectados en el ensayo al emitirse ambas fluorescencias, la gráfica siguiente muestra la detección de los marcadores *FAM™ dye* y *VIC® dye*, lo que indica un individuo con ambos alelos. Ésta

tendencia se observó en el 45% de los casos (90 muestras) y en el 50% de los controles (200 muestras).



**Gráfica 3. Ejemplo de Heterocigoto (C/G), marcado con FAM™ dye y VIC® dye (muestra 96)**

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de discriminación alélica, fueron almacenados en una base de datos, donde a partir de esta información se obtuvo la relación para cada uno de los alelos en casos y controles, como se describe en la *Tabla 6*.

**Tabla 6. Resultados de la Genotipificación para el SNP rs2428431**

	Alelo Ancestral (C/C)	Heterocigoto (C/G)	Alelo Alterno (G/G)	Total
<b>Casos</b>	72 (36%)	90 (45%)	38 (19%)	200
<b>Controles</b>	131 (32.75%)	200 (50%)	69 (17.25)	400

Los genotipos mostrados en la *Tabla 6* fueron ingresados al software *ihg2 Hardy-Weinberg Equilibrium (ihg2.helmoltz-muenchen.de)*. Las pruebas de

asociación de acuerdo al programa se realizaron con un intervalo de confianza del 95% (IC<sub>95%</sub>).

A partir de los resultados de la genotipificación, se estimaron las frecuencias de los alelos y genotipos del polimorfismo estudiado, las cuales se muestran en la *Tabla 7*.

**Tabla 7. Comparación entre las frecuencias alélicas y genotípicas para el SNP G5738C en casos con PEVAC y controles.**

Polimorfismo	Grupo	Frecuencias Alélicas		Frecuencias Genotípicas		
		C5738	G5738	C5738/C5738	C5738/G5738	G5738/G5738
rs2428431	<b>Casos</b>	0.585	0.415	0.36	0.45	0.19
	<b>Controles</b>	0.575	0.425	0.32	0.5	0.17

Al compararse las frecuencias alélicas entre los dos grupos de estudio los valores son similares, no muestran diferencias significativas entre ellos. Por su parte con las frecuencias genotípicas ocurre lo mismo, al comparar los valores entre los casos y controles, estos no muestran diferencias entre ambos grupos.

Cabe señalar que el polimorfismo estudiado tanto en casos y controles, se encontró en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).

## ***VII. Discusión***

## 7.1 DISCUSIÓN

Los mecanismos para entender la etiología del PEVAC no son del todo claros, ya que diversos factores pueden contribuir al desarrollo del mismo. Estos incluyen principalmente: compresión intrauterina, anormalidades en la miogénesis u osificación, anormalidades neurológicas, insuficiencia vascular, factores ambientales y en época reciente se han mencionado los factores genéticos<sup>19,20</sup>. Lo último, apoyado por estudios en gemelos, estudios en diferentes poblaciones y análisis de genealogía<sup>11</sup>. Dietz (2002), sugiere que una parte significativa del riesgo del PEVAC puede atribuirse a variantes aún no identificadas en distintos genes<sup>50</sup>.

Por lo anterior, se propone que el PEVAC sea un desorden complejo-multifactorial por lo que factores medio-ambientales y genéticos contribuyen al desarrollo del mismo.

A partir de la implicación genética como causa del PEVAC, se ha centrado la atención en genes involucrados con la formación de las extremidades inferiores. La familia de genes Homeobox (*HOX*) se involucran en la morfogénesis ósea y muscular de las extremidades inferiores, por lo que variaciones en la secuencia de estos genes pueden alterar su expresión y de ésta forma perturbar el desarrollo normal de las extremidades inferiores durante la etapa embrionaria.

Los genes *HOX* son controlados por diferentes factores regulatorios por lo que SNPs en las regiones del intrón de los grupos *HOX* pueden actuar como potenciadores o en su defecto como supresores de los sitios de unión<sup>31</sup>, de éste modo, perturbaciones en estas vías regulatorias pueden contribuir con la presencia del PEVAC; en relación a esto, el SNP rs2428431 localizado en la región del intrón del gen *HOXA2*, puede alterar los sitios de unión a factores de transcripción como lo sugirió un análisis *in silico* a través de tres programas distintos (*Alibaba2*, *Patch* y *Transcription Element Search Software*)<sup>32</sup>.

Asimismo, no puede excluirse la posibilidad de que rs2428431 puede regular los niveles de expresión río arriba en los genes ubicados hacia el extremo 5', o bien encontrarse en desequilibrio de ligamiento (LD) con otros SNPs<sup>51</sup>.

Con base en lo anterior, el presente estudio se llevó a cabo para determinar sí el polimorfismo rs2428431 (G5738C), localizado en la región del intrón del gen *HOXA2*,

se encontraba asociado con la presencia del PEVAC en pacientes de población mestiza mexicana y controles sanos.

Aún cuando los casos y controles se identificaron en dos centros hospitalarios distintos, es razonable suponer que forman parte de una muestra representativa del área geopolítica de estudio, debido a que en ambas instituciones se concentran pacientes provenientes de toda la república mexicana. Para redundar en beneficios estadísticos, se definió una proporción caso-control de 1:2.

Lo siguiente fue evaluar si el polimorfismo G5738C se encontraba asociado con el PEVAC, para lo cual se determinó el genotipo para cada uno de los sujetos incluidos en el estudio a través de un análisis de discriminación alélica por qRT-PCR.

Para realizar las pruebas de asociación entre el polimorfismo y el PEVAC para ambos grupos, los genotipos resultantes fueron ingresados al programa *IHG Hardy-Weinberg Equilibrium*.

El SNP G5738C fue detectado en casos y controles. Al comparar las frecuencias alélicas y genotípicas entre los dos grupos de estudio, éstos no mostraron diferencias significativas con un valor de  $p=0.804$ ; así mismo este polimorfismo se encontró en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW).

El valor obtenido para la Razón de Odds ( $OR=1.031$ ;  $\chi^2=0.06$ ) con un intervalo de confianza del 95% ( $IC_{95\%}=0.809-1.315$ ), indica que la frecuencia del alelo alterno en los casos y controles es la misma, por lo que no hay asociación entre la variante génica G5738C y la presencia del PEVAC.

Ester, *et al.* (2009). Reportó la asociación del mismo polimorfismo con el PEVAC, en población hispana de Estados Unidos. Sin embargo, cabe precisar que en su estudio estratificaron los grupos étnicos en blancos no hispanos e hispanos y éstos a su vez de acuerdo a su historia familiar (simplex y multiplex). La asociación más fuerte fue observada con la población hispana ( $p=0.008$ ), sin evidencia de asociación para los blancos no hispanos. Al combinar los valores de ambas etnicidades el valor de  $p$  no cambió significativamente ( $p=0.006$ )<sup>32</sup>.

La frecuencia alélica observada para el polimorfismo G5738C en población mestiza mexicana tuvo un valor de 0.425 (ver *Tabla 7*), es parecida a la reportada en un estudio previo (Ester, *et al.*, 2009) en población hispana (0.409) y población blanca no hispana (0.367). El valor para los OR de 0.866 (IC<sub>95%</sub>=0.606-1.236), sugiere que G5738C puede ser un factor de protección, sin embargo éste dato debería tomarse bajo reserva, puesto que el valor de las OR obtenido es muy cercano a 1.

En el Proyecto Internacional del Mapa de Haplotipos (HapMap Project), se han estimado las frecuencias alélicas para éste polimorfismo en distintos grupos étnicos: Caucásicos (0.32), Chinos (0.11) y Japoneses (0.14), sin embargo cabe señalar que únicamente se ha detectado la presencia de éste polimorfismo en una muestra de población sana y hasta el momento no existen estudios que relacionen la presencia de éste polimorfismo con el PEVAC en estas poblaciones.

Son necesarios estudios funcionales para evaluar si los SNPs podrían potencialmente alterar los sitios de unión al ADN, así como alterar la expresión de las proteínas y de este forma afectar el desarrollo normal de las extremidades inferiores<sup>52</sup>.

## ***VIII. Conclusiones y Perspectivas***

## 8.1 CONCLUSIONES

Debido a que no se encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo G5738C y el PEVAC, los datos en los pacientes, deben ser estratificados de acuerdo a su historia familiar en casos simplex y multiplex, así como también de acuerdo a la presentación clínica de la enfermedad (bilateral y unilateral) para ser analizados por separado, esto podría mostrar diferencias entre las frecuencias.

Así mismo, es necesario establecer las frecuencias genéticas de otros polimorfismos, principalmente localizados en genes involucrados con el desarrollo embriológico de las extremidades inferiores, esto permitiría analizar la asociación de los genes con la presencia del PEVAC.

## 8.2 PERSPECTIVAS

Finalmente, debido a que existen otros genes que pueden implicarse con la presencia del PEVAC, es evidente la necesidad de continuar evaluando la contribución de mutaciones y polimorfismos en genes involucrados con el desarrollo embriológico de las extremidades inferiores, así como también valorar el aumento en el tamaño de la muestra.

Nuestro grupo se encuentra evaluando cinco SNPs, en genes *HOX*: rs2462907 (*HOXA1*), rs3757640 (*HOXA5*), rs3801776 (*HOXA9*), rs6968828 (*HOXA11*) y rs1318778 (*HOXD3*), un SNP en el gen apoptótico *CASP3* (rs4647602), así como la detección de variantes en los genes *PITX1* y *TBX4* por análisis de secuenciación.

## ***IX. Anexos***



(ANEXO I)



**CARTA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“Prevalencia de Mutaciones en los genes *PITX1*, *TBX4* y *HOX* en Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito”**

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_

Yo \_\_\_\_\_  
autoriza la participación de mi hijo de nombre:

\_\_\_\_\_ en el

Proyecto de investigación titulado “Prevalencia de Mutaciones en los genes *PITX1*, *TBX4* y *HOX* en Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito”.

El objetivo de este estudio es mediante un estudio de laboratorio acerca de la modificación en diversos genes (estructuras que poseen el material de herencia) que pudieran condicionar o predisponer para padecer el Pie Equino Varo Aducto 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 Aducto 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 la 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 Aducto Congénito, lo que permitiría (dependiendo de los resultados obtenidos), conocer más acerca de esta enfermedad, identificar ciertos factores de riesgo que puedan ayudar a predecir el curso de la enfermedad, 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 Genómica 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 desechada por dicha 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 carnet (**No se empleará mi nombre**) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

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

En el **Centro Médico ABC, IAP: Dr. Armando Torres Gómez**, correo electrónico: [atorresmd@yahoo.com](mailto:atorresmd@yahoo.com)

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; dirección electrónica: [rmcoralv@gmail.com](mailto:rmcoralv@gmail.com).

En el **Hospital Shriners para Niños, Ciudad de México, AC: Dr. Nelson Cassis Zacarías**, correo electrónico: [nelsoncassis@yahoo.com](mailto:nelsoncassis@yahoo.com)

---

Investigador Responsable

---

(Nombre completo y firma)  
Padre o tutor del paciente

---

(Nombre completo y firma)  
Testigo

---

(Nombre completo y firma)  
Testigo



(ANEXO II)



**Cuestionario**

**“Prevalencia de Mutaciones en los genes *PITX1*, *TBX4* y *HOX* en Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito”**

**Ficha de identificación:**

Nombre completo del paciente \_\_\_\_\_

No Expediente \_\_\_\_\_

Fecha de Nacimiento \_\_\_\_\_

Nombre del Padre: \_\_\_\_\_

Nombre de la Madre: \_\_\_\_\_

Genero: (Fem.) (Mas).

Número de generaciones ascendentes nacidas en México: \_\_\_\_\_

Lugar de nacimiento \_\_\_\_\_

Lugar de residencia \_\_\_\_\_

Dirección: \_\_\_\_\_

Teléfono: \_\_\_\_\_

Teléfono de algún familiar: \_\_\_\_\_



(ANEXO III)



**CARTA DE CONSENTIMIENTO ESCRITO INFORMADO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“Prevalencia de Mutaciones en los genes *PITX1*, *TBX4* y *HOX* en Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito”**

México, D.F., a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_

Yo \_\_\_\_\_  
autorizo mi participación en el Proyecto de investigación titulado “Prevalencia de Mutaciones en los genes *PITX1*, *TBX4* y *HOX* en Pacientes con Pie Equino Varo Aducto Congénito”.

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

**c. Por la toma de sangre:**

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

**d. 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 Aducto Congénito, lo que permitiría (dependiendo de los resultados obtenidos), conocer más acerca de esta enfermedad, identificar ciertos factores de riesgo que puedan ayudar a predecir el curso de la enfermedad, 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 Genómica 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 desechada por dicha 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 carnet (**No se empleará mi nombre**) para identificarme y de esa forma conservar mi anonimato.

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

En el **Centro Médico ABC, IAP: Dr. Armando Torres Gómez**, correo electrónico: [atorresmd@yahoo.com](mailto:atorresmd@yahoo.com)

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; dirección electrónica: [rmcoralv@gmail.com](mailto:rmcoralv@gmail.com).

En el **Hospital Shriners para Niños, Ciudad de México, AC: Dr. Nelson Cassis Zacarías**, correo electrónico: [nelsoncassis@yahoo.com](mailto:nelsoncassis@yahoo.com)

---

Investigador Responsable

---

(Nombre completo y firma)  
Padre o tutor del paciente

---

(Nombre completo y firma)  
Testigo

---

(Nombre completo y firma)  
Testigo

## Soluciones y Reactivos: (Anexo IV)

### Sacarosa-Tritón 2X

Componente	1 Litro	½ Litro	Conc. Final
Sacarosa	219 g	109.5 g	0.64 M
Tris-base	2.42 g	1.21 g	0.02 M
MgCl <sub>2</sub>	2.03 g	1.015 g	0.01 M
Tritón X-100	20 ml	10 ml	2 %

- Llevar a pH 7 con HCl 6N
- Esterilizar por filtrado
- Estable a 4 °C durante 3 meses

### Solución Amortiguadora TBE 5X\*

Componente	1000 ml	500 ml	250 ml
Tris-Base	54 g	27 g	13.5 g
Ácido Bórico	27.5 g	13.75 g	6.875 g
EDTA	3.35 g	1.675 g	0.83 g

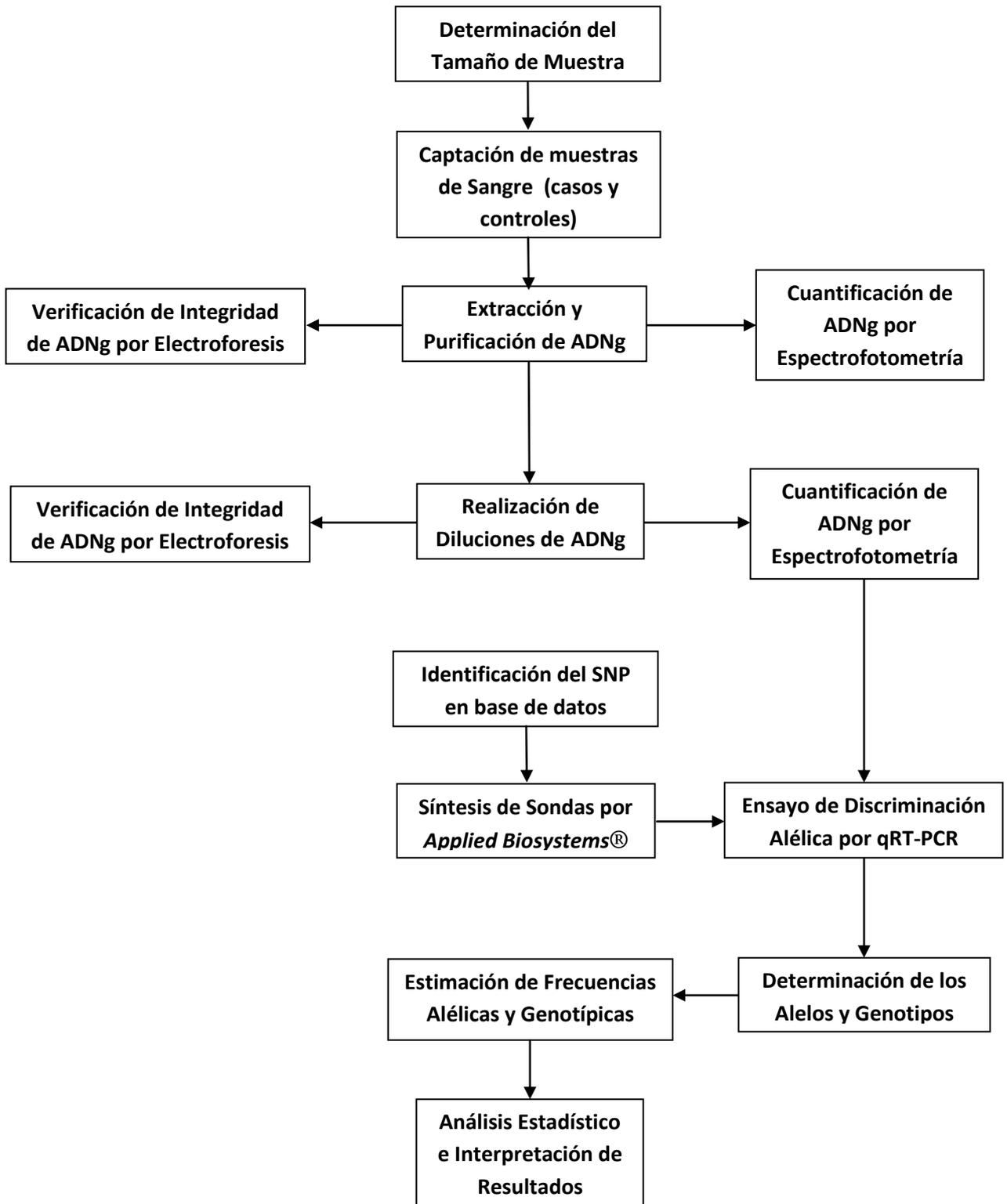
\* Ajustar a pH 7.0 con HCl 6N

NaCl 5 mM = 0.0438 g en 150 ml

NaCl Saturado = 52.596 g en 150 ml

SDS 10 % = 15 g en 150 ml (esterilizar por filtrado)

## Diagrama General de Flujo: (ANEXO V)



## **X. Glosario**

**ADN genómico:** ADN cromosómico nuclear que ha sido aislado directamente de células o tejidos. Habitualmente se extrae de sangre periférica o células descamantes de la mucosa yugal. Se utiliza para pruebas genéticas.

**Alelo:** Versión específica de un gen que ocupa una localización determinada en el genoma. Se diferencia de otros alelos del mismo gen por ser distinta su secuencia de nucleótidos. En general, uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

**Autópodo:** La extremidad está organizada en tres regiones, de extremo proximal a distal: estilópodo, zeugópodo y autópodo. En las dos regiones más distales el esqueleto contiene varios motivos o patrones periódicos o cuasiperiódicos el autópodo consta de entre 3 y 5 elementos (en la mayoría de los casos) a lo largo del mismo eje.

**Congénito:** de carácter hereditario

**Cromosoma:** Elemento que existe en el núcleo de las células en el momento de su división o mitosis, que contiene el material genético.

**Delección:** Pérdida de material genético de un cromosoma que puede ir desde la pérdida de un solo nucleótido (delección puntual) hasta la pérdida de grandes regiones visibles citogenéticamente.

**Exón:** Porción de una molécula de ADN, que produce aquellas partes del ARN precursor que no son eliminadas durante la transcripción, forman el ARN mensajero y por tanto especifican la estructura primaria de una proteína. En definitiva es la región de un gen que contiene la información para producir una proteína (se denomina región codificante). Cada exón codifica una porción específica de la proteína completa.

**Factor de Transcripción:** Los factores de transcripción son proteínas que coordinan y regulan la expresión de un gen o de un grupo de genes. En muchos casos regulan su propia expresión y también es frecuente que regulen a otros factores de transcripción. Los factores de transcripción interactúan con regiones específicas del ADN, con elementos de la maquinaria de transcripción como la ARN polimerasa, con otros factores de transcripción o con moléculas que activan o inhiben su actividad. Conectan

los estímulos externos e internos con las respuestas biológicas actuando como transductores de señales.

**Familia Simplex:** Familia en la que sólo uno de sus miembros se encuentra afectado por una patología.

**Familia Multiplex:** Familia en la que varios de sus miembros se encuentran afectados por herencia.

**Gen:** Secuencia de nucleótidos que codifica un producto. Incluye regiones anteriores (5' no traducida; 5' UTR) posteriores (3' no traducida; 3' UTR) a la región codificante, así como secuencias interpuestas (intrones) entre segmentos (exones). Unidad de transmisión hereditaria; ocupa un sitio determinado en los cromosomas llamado *locus*.

**Genoma:** Todo el DNA contenido en un organismo o célula, que incluye tanto los cromosomas dentro del núcleo (genoma nuclear) como el ADN en las mitocondrias (genoma mitocondrial).

**Genotipo:** Conjunto de genes de una persona que puede o no expresarse. La contribución genética a la descendencia. La constitución génica de un *locus* particular. Constitución genética de un organismo.

**Heterocigoto:** Un individuo que ha recibido información genética diferente de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos diferentes de un gen específico.

**Homocigoto:** Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

**Homeodominio:** Es un dominio de unión al ADN que consta de unos 60 aminoácidos, presente en las denominadas homeoproteínas. Este dominio está codificado por una región de 180 pb del DNA conocido como homeobox.

**Homeobox:** La familia de genes *HOX* codifican para un grupo de factores de transcripción responsables de regular la morfogénesis y de conferir la identidad axial para el desarrollo del embrión. Los genes *HOX* tienen en común una secuencia de DNA

conocida como caja homeótica, la cual está constituida por 180 pares de bases nitrogenadas.

**Homocigoto:** Un individuo que ha recibido la misma información genética de cada uno de los padres, para la unidad en cuestión. Tener dos alelos idénticos de un gen específico.

**Intrón:** En eucariotas los exones de un gen se separan por regiones largas de ADN (llamadas **intrones**) que no codifican, ya que se escinde durante el procesamiento del ARN y que no formará parte del RNA mensajero maduro.

**Kilobases (Kb):** Unidad de tamaño de los ácidos nucleicos, correspondiente a una longitud de 1.000 de nucleótidos o Megabases (Mb): correspondiente a 1.000.000 de nucleótidos.

**Loci:** en latín, plural de locus

**Locus:** (plural=**Loci**): Posición que ocupa un gen en un cromosoma

**Multifactorial:** Causado por la interacción de múltiples genes y factores del medio ambiente.

**Mutación:** Cambio en la secuencia de bases nitrogenadas en la molécula de DNA. Variación espontánea o inducida del genoma.

**Polimorfismo de un solo Nucleótido (SNP):** Polimorfismos en los que cambia una base por otra en el ADN. En general son bialélicos, es decir, se pueden encontrar alternativamente dos bases A, T, G ó C.

**Polimorfismo Genético:** Presencia en una población de dos o más alelos de cualquier sistema, en la que la frecuencia del más raro de ellos no puede explicarse por mutación recurrente.

**Quencher:** Una entidad molecular que apaga un estado excitado de otra entidad molecular ya sea por transferencia de energía, transferencia de electrones, o por un mecanismo químico.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** I. Amplificación enzimática de fragmentos de ADN localizado entre un par de iniciadores. II. Reacción de la polimerasa en cadena, en la que la ADN polimerasa copia un segmento de ADN, resultando en una enorme amplificación de una muy pequeña muestra. La técnica es ampliamente utilizada en investigación, diagnóstico médico y medicina forense.

**Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qRT-PCR):** Es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ácido desoxirribonucleico (ADN).

**Variantes de DNA:** Son cambios en la secuencia del DNA que existen como variaciones estables en la población humana. Pueden ser desde cambios mínimos en el DNA (SNPs), hasta deleciones visibles a nivel citogenético. Desde el punto de vista molecular la mayoría de esta variabilidad humana está dada por los denominados SNPs (Polimorfismos de un solo nucleótido). El resto está dado por variaciones del tipo microsatélites, minisatelites (VNTR), inserciones/deleciones y variaciones en el número de copias de regiones genómicas más extensas. Todas estas variaciones pueden ser subyacentes en la etiología tanto de “afecciones genéticas” como en el componente genético de susceptibilidad en patologías multifactoriales.

**Zeugópodo:** La extremidad está organizada en tres regiones, de extremo proximal a distal: estilópodo, zeugópodo y autópod. En las dos regiones más distales el esqueleto contiene varios motivos o patrones periódicos o cuasiperiódicos consta de dos elementos paralelos a lo largo del eje anteroposterior

## ***XI. Referencias Bibliográficas***

1. Herring, Tachdjians. (2002). Pediatric Orthopaedics. WB Saunders, 3rd Ed. p. 922-958
2. Morrissy, Weinstein (2002) Pediatric Orthopaedics. Volume 2, 5th Ed. Williams and Wilkins p. 1153-1161
3. Turco V. 1981. Clubfoot. Current problems in Orthopaedics. Churchill Livingstone
4. Pagnotta G. et al. (2010) Bilateral Clubfoot in Three Homozygous Preterm Triplets. The Journal of foot & Ankle Surgery,). A1-A30, e1-e16, 633-786
5. Wynne-Davies. 1964. Family Studies and the Cause of Congenital Clubfoot, Talipes equinovarus, Talipes calcaneo-valgus and metatarsius varus. J. Bone Joint Surg. 46:445-63
6. Sugarman, Cl. 1975. The Larsen Syndrome, autosomal dominant form. Birth Defects Orig Artic Ser, 11:121-9
7. Hollister, DW. 1976. Diatrophic Dwarfism. Clin Orthop Relat Res 114:61-9
8. Bernstein RM. 2002. Arthrogriphosis and Amyoplasia. J Am Acad Ortho Surg 10:417-24
9. Chang CH, Huang SC. 1998. Clubfoot deformity in congenital constriction band syndrome manifestations and treatment. J. Formos Med Assoc. 97: 328-34
10. Hermanns, P. y otros. 2008. Congenital joint dislocations caused by carbohydrate sulfotransferase 3 deficiency in recessive Larsen Syndrome and humero-spinal disostosis. Am J Hum Genet 82:1368-74
11. Miedzybrodzka Z. Congenital talipes equinovarus (clubfoot): a disorder of the foot but not the hand. J Anat 2003, 202:37-42.
12. Porter RW. Clubfoot: congenital talipes equinovarus. J R Coll Surg Edinb 1995, 40:66-71.
13. Honein MA, Paulozzi LJ, Moore CA. Family history, maternal smoking, and clubfoot: an indication of a gene-environment interaction. Am J Epidemiol. 2000;152:658-65.
14. Armando Torres-Gómez, Diego Pérez-Salazar-Marina, Dr. Nelson Cassis-Zacarías. 2010. Pie equino varo aducto congénito, prevalencia en una población mexicana Revista Mexicana de Ortopedia Pediátrica Vol. 12, 1:15-18
15. Bohm M. 1929. The embryologic origin of clubfoot. J. Bone Joint Surg 11A:229

16. Ochoa G. 1996. Pie equino varo congénito idiopático. *Revista Colombiana de Ortopedia y Traumatología* 10:27-29
17. Zimmy M, y otros. 1985. An Electronic microscopic study of the fascia form the medial and lateral sides of clubfoot. *J Pediatric Orthop*, 5:557
18. Tachdjian, MO. 1990. Congenital talipes equinovarus. *Pediatric Orthopaedics 2nd Philadelphia*, 2517
19. Moorthi RN, Hashmi SS, Langois P, Canfield M, Waller DK, Hecht JT. Idiopathic talipes equinovarus (ITEV) (clubfeet) in Texas. *Am J Med Genet A* 2005, 132:376-80.
20. Wynne-Davies R. Family studies and etiology of clubfoot. *J Med Genet* 1965, 2:227-32.
21. Sugarman GI. The Larsen syndrome, autosomal dominant form. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975, 11:121-9.
22. Tripathi RP, Chaturvedi SN. Treatment of club-foot by one stage medial soft tissue release operation. *J Indian Med Assoc* 1979, 73:33-5.
23. Wang JH, Palmer RM, Chung CS. The role of major gene in clubfoot. *Am J Hum Genet* 1988, 42:772-6.
24. Gurnett CA, Alaee F, Kruse, L, Desruisseau D, Hecht J, Wise C, Bowcock A, Dobbs M. 2008. Asymetric Lower-Limb Malformations in Individuals with Homeobox *PITX1* Gene mutation, *The American Journal of Human Genetics* 83:616-622
25. Gurnett CA, Alaee F, Desruisseau D, Boehm S, Dobbs MB. Skeletal muscle contractile gene (TNNT3, MYH3, TPM2) mutations not found in vertical talus or clubfoot. *Clin Orthop Relat Res* 2009, 467:1195-200.
26. Wang LL, Fu WN, Li-Ling J, Li ZG, Li LY, Sun KL. HOXD13 may play a role in idiopathic congenital clubfoot by regulating the expression of FHL1. *Cytogenet Genome Res* 2008, 121:189-95.
27. Shyy W, Dietz F, Dobbs MB, Sheffield VC, Morcuende JA. Evaluation of CAND2 and WNT7a as candidate genes for congenital idiopathic clubfoot. *Clin Orthop Relat Res* 2009, 467:1201-5.
28. Bruce M. Carlson. Chapter 10. Limb Development. In: *Human Embryology and Developmental Biology* 2004, 3rd Edition. China pp. 209-18.
29. Cao D, Jin C, Ren M, Lin C, Zhang X, Zhao N. The expression of Gli3, regulated by HOXD13, may play a role in idiopathic congenital talipes equinovarus. *BMC Musculoskelet Disord* 2009, 10:142.
30. Szeto DP, Ryan AK, O'Connell SM, Rosenfeld MG. P-OTX: a PIT-1-interacting homeodomain factor expressed during anterior pituitary gland development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:7706-10.

31. Cao D, Jin C, Ren M, Lin C, Zhang X, Zhao N. The expression of Gli3, regulated by HOXD13, may play a role in idiopathic congenital talipes equinovarus. *BMC Musculoskelet Disord* 2009, 10:142.
32. Ester AR, Weymouth KS, Burt A, Wise CA, Scott A, Gurnett CA, Dobbs MB, Blanton SH, Hecht JT. 2009. Altered Transmission of HOX and apoptotic SNPs identify a potential common pathway for clubfoot. *American of Journal of Medical Genetics Part A* 149A: 2745-2752
33. McGinnis W, Krumlauf R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68:283-304
34. Mark M, Rijli F, Chambon P. 1997. Homeobox genes in embryogenesis and pathogenesis. *Pediatr Res*; 42:421-429
35. Shaut CA, Keene OR, Sorensen LK, Li DY, Stadler HS. 2008. HOXA13 is Essentials for placental vascular patterning and labyrinth endotelial specification. *PLoS Genet* 4:e1000073
36. Zakany J, Duboule D. 2007. The rol of Hox genes during vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*; 17:359-366
37. Houghton L, Rosenthal N. 1999. Regulation of a muscle specific transgenes by persistent expresión of Hox genes in postnatal murine limb muscle. *Dev Dyn*; 216: 385-397
38. Hall B, Miyake T. 2000. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*; 2000:138-147
39. Kardon, G. 1998. Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. *Development* 1998:4019-4032
40. Shaut CA, Keene OR, Sorensen LK, Li DY, Stadler HS. 2008. HOXA13 is Essentials for placental vascular patterning and labyrinth endotelial specification. *PLoS Genet* 4:e1000073
41. Weizmann Institute of Science. *Homeobox A2* [En línea] 2012. 16 de Enero [9 de Noviembre de 2011]. URL disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HOXA2&search=rs2428431>.
42. Ensembl Genome Browser. *Gene: HOXA2 ENSG00000105996* [En línea] 2012. Febrero [Diciembre de 2011]. URL disponible en: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Location/View?g=ENSG00000105996;r=7:27139721-27142430;t=ENST00000222718](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?g=ENSG00000105996;r=7:27139721-27142430;t=ENST00000222718).
43. Fatemeh Alasti, *et al.* 2008. A mutation in *HOXA2* is responsible for autosomal-recessive Microtia in an Iranian Family. *The American Journal of Human Genetics* 82, 982-991.
44. National Center for Biotechnology Information: NCBI Entrez SNP Database. [En línea] 2011. 10 de Diciembre [26 de Febrero de 2012]. URL Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=rs2428431>. Última actualización: Enero de 2012

45. Dennis C. Monks, *et al.* 2010. Mutational Analysis of *HOXA2* and *SIX2* in a Bronx Population with isolated Microtia, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol*
46. Irma Silva-Solezzi, *et al.* 2009. Analysis of genomic diversity in Mexican Mestizo populations to develop genomic medicine in Mexico. *PNAS*
47. Miller SA, *et al.* 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215
48. Yábar Varas, Carlos. 2003. Manual de Procedimientos de Electroforesis para ADN y Proteínas, Serie de Normas Técnicas No. 38. Instituto Nacional de Normas, Lima-Perú, p.p. 21-32
49. Institut für HumanGenetik: *IHG2 Hardy-Weinberg Equilibrium* [En línea] 2011. [Noviembre de 2011]. URL disponible en: en <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>.
50. Dietz, FMD. 2002. The Genetics of Idiopathic Clubfoot. *Clin Orthop Relat Res.* 401:39-48
51. Tarchini B, Duboule D. 2006. Control of Hoxd genes collinearity during early limb development. *Dev cell* 10:93-103
52. Wolters VM, Wijmenga C. 2008. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 103:190-195