



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE POLIMORFISMOS
DEL GEN *NKX2-5* EN POBLACION MESTIZA MEXICANA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A :

DR. COZTLI OCELOTL AZOTLA VILCHIS

TUTORA: Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso

Asesores de Tesis:

Dra. Constanza García Delgado

M. en C. Benjamín Antonio Rodríguez Espino



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D.F.

Febrero 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Directora de tesis:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
Profesor titular de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Asesores de tesis:

Dra. Constanza García Delgado
Profesor adjunto de la Especialidad de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

M. en C. Benjamín Antonio Rodríguez Espino
Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Jaime Nieto Zermeño
Director de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Agradecimientos

Son tantas personas a las cuales debo este trabajo, agradezco profundamente a la Dra. Verónica Morán y al M. en C. Benjamín Rodríguez por su paciencia, labor y dirección de esta tesis.

A la Maestra Alicia Cervantes por su extraordinaria enseñanza y apoyo.

A los pacientes del Hospital Infantil de México por permitirme aprender de ellos.

A la Dra. García Delgado, a la Dra. Ortiz De Luna y al Dr. Flores por ayudarme a crecer y formar un criterio clínico.

A los compañeros amigos residentes por compartir conmigo esta experiencia.

Definitivamente a todo el personal del Departamento de Genética por permitirme ser parte del equipo.

A mi madre y hermano por el apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Página
Resumen.....	6
1.- Introducción.....	7
1.1.- El gen <i>NKX2-5</i>	8
1.2.- Estructura y función del factor de transcripción <i>NKX2-5</i>	8
1.3.- Los polimorfismos.....	11
1.4.- Polimorfismos en <i>NKX2-5</i>	13
1.5.- Cardiopatías asociadas a mutaciones en <i>NKX2-5</i>	13
1.6.- Redes génicas en el desarrollo cardiaco.....	17
1.7.- Cardiopatías congénitas y bases embriológicas del desarrollo cardiaco...	19
1.7.1.- Cardiogénesis.....	20
1.7.2.- Establecimiento de la lateralidad del embrión.....	22
1.8.- Heterotaxia Visceral.....	23
1.9.- Genética de poblaciones.....	26
1.10.- Análisis de las distribuciones de las frecuencias.....	27
1.10.1.- Cálculo de las frecuencias alélicas.....	27
1.10.2.- Comprobación del equilibrio.....	29
2.- Planteamiento del Problema.....	30
3.- Justificación.....	30
4.- Objetivo General.....	31
4.1.- Objetivos específicos.....	31
5.- Material y Métodos.....	32
5.1.- Diseño del estudio.....	32
5.2.- Población de estudio y tamaño de la muestra.....	32
5.3.- Criterios de selección.....	32

5.3.1.- Criterios de inclusión.....	32
5.3.2.- Criterios de exclusión y/o de eliminación.....	32
6.- Descripción de la metodología.....	33
6.1.-Características del banco de ADN.....	35
6.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	36
6.2.1.- Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa...	38
6.3.- Método de secuenciación.....	39
6.3.1.- Purificación de los productos de PCR.....	39
6.3.2.- Método de reacción de secuenciación por dideoxi.....	40
6.3.3.- Purificación de la reacción de secuenciación.....	41
6.3.4.- Preparación de la muestra para el secuenciador.....	41
6.3.5.- Análisis de electroferogramas y secuencias.....	42
7.- Resultados.....	43
7.1.-Resultados de la PCR.....	43
7.2.- Resultados de secuenciación automatizada.....	47
8.- Análisis de los resultados.....	52
8.1.- Frecuencias del polimorfismo g.5292A>G, (rs2277923).....	52
8.2.- Frecuencias del polimorfismo g.3404G>T, (rs703752).....	56
9.- Discusión.....	58
10.- Conclusiones.....	64
11.- Bibliografía.....	65
12.- Anexos.....	69

Resumen

Antecedentes: El presente trabajo surge como parte de la investigación del protocolo “Caracterización de mutaciones en el Gen *NKX2-5* en pacientes con tetralogía de Fallot o síndrome de heterotaxia visceral” HIM2005/016 Como parte de la metodología del protocolo, se requería determinar si estas variantes estaban presentes en un número significativo de la población general sana y así clasificarlas como polimorfismos o mutaciones.

El gen *NKX2-5* con locus 5q34, codifica para un factor de transcripción que se expresa en células progenitoras cardíacas antes de la cardiomiogénesis e interactúa con otros factores de transcripción. Entre sus funciones está mantener la homeostasis y supervivencia de cardiomiocitos. Mutaciones en este gen se han asociado a cardiopatías congénitas (CC), entre ellas se han relacionado a SHV.

Planteamiento del Problema: ¿Cuáles son y qué frecuencia tienen los polimorfismos del gen *NKX2-5* en una muestra de población mexicana aparentemente sana?

Justificación: Se han asociado diversas mutaciones en la secuencia del gen *NKX2-5* con la formación de cardiopatías congénitas, como es el caso de la Heterotaxia Visceral. No se conocen la frecuencia y el tipo de variaciones en la secuencia del gen en relación a estos polimorfismos o mutaciones en población Mexicana sin cardiomiopatía. **Objetivo**

General: Identificar y determinar la frecuencia de variantes alélicas en el gen *NKX2-5* en individuos mestizos mexicanos. **Objetivos específicos:** Determinar los polimorfismos en *NKX2-5* en una muestra de individuos sanos representativos de la población mestiza mexicana. Crear una referencia para el análisis molecular de posibles patologías asociadas a mutaciones en *NKX2-5*, en población mexicana. Comparar la distribución de la frecuencia de los polimorfismos en *NKX2-5* en población mexicana contra otras poblaciones a nivel mundial.

Material y métodos

Diseño del estudio: Estudio de casos; es un estudio observacional, transversal y descriptivo.

Población de estudio y tamaño de la muestra: Se seleccionaron aleatoriamente 51 muestras de controles sanos del banco de DNA del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Criterios de selección Criterios de inclusión: DNA con índice de pureza $\lambda_{260/280}$ igual a 1.8 – 2. **Criterios de exclusión y/o eliminación:** Muestra de DNA inadecuada para el análisis, por calidad o cantidad disponible para el estudio.

Método: Se amplificaron por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los dos exones del gen *NKX2-5* de acuerdo a condiciones previamente reportadas y se rediseñaron oligonucleótidos cuando fue necesario, se secuenciaron directamente. Se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas para los dos SNP y se analizaron para ver si la población estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg (HW).

Resultados: Se encontraron solo 2 polimorfismos de 11 previamente reportados en otras poblaciones. De éstos, el polimorfismo rs22779234 presentó las frecuencias genotípicas: A/A = 0.078, A/G = 0.549 y G/G = 0.373; y para el polimorfismo rs703752 se encontró: T/T = 0, G/T = 0.333 y G/G = 0.666. Ambos polimorfismos encontrados en población mestiza mexicana están en equilibrio de HW.

Discusión y conclusiones: se encontraron 2 polimorfismos (de 11 reportados en la literatura) lo que sugiere que los otros polimorfismos reportados de *NKX2-5* deben estar en frecuencias muy bajas en la población mestiza mexicana, Es el primer estudio de polimorfismos en población mexicana del gen *NKX2-5*, por lo cual los resultados obtenidos servirán como referencia para análisis de asociación de variantes de *NKX2-5* y enfermedades cardíacas congénitas en la población mexicana. Los dos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

1.- Introducción

El gen *NKX2-5* ha sido asociado a patologías cardíacas, entre ellas a la heterotaxia visceral. Una consideración importante es que las cardiopatías congénitas (CC) en particular las no sindrómicas, son enfermedades complejas con patrón de herencia multifactorial.¹ En esta forma de herencia participan componentes tanto génicos como ambientales. Hay otras patologías como el Síndrome de Heterotaxia Visceral (SHV) en el que no se conoce su etiología exacta, existen varios genes identificados y otros candidatos ² y uno de los genes cuyas mutaciones se han asociado con la presentación del SHV es *NKX2-5*.³

El presente trabajo describe la frecuencia y tipo de polimorfismos encontrados en el gen en *NKX2-5* en población mexicana, fue realizado como parte del protocolo de investigación: “Caracterización de mutaciones en el Gen *NKX2-5* en pacientes con tetralogía de Fallot o síndrome de heterotaxia visceral”, el cual fue autorizado por el Comité de Investigación de nuestra institución con número de registro HIM2005/016.

El SHV se ve con relativa frecuencia en la consulta del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Se estableció investigar si mutaciones en *NKX2-5* estaban presentes en los pacientes del HIMFG. Para ello, es necesario saber si los cambios que pudiesen encontrarse en los pacientes, corresponden a mutaciones o polimorfismos, por tanto era necesario contar con un grupo de referencia en donde se hubiese establecido la presencia o ausencia de las mutaciones y su frecuencia, para poder así establecer una asociación de *NKX2-5* con las cardiopatías estudiadas. Se han descrito mutaciones en *NKX2-5* en las CC pero no se ha definido una clara correlación genotipo-fenotipo, y los mecanismos que conducen a la enfermedad cardíaca aún no están claros.³⁻⁴

Si bien existen algunos reportes en donde se han encontrado diversos polimorfismos de *NKX2-5* en varias poblaciones a nivel mundial, no existe ningún estudio de este tipo en poblaciones mexicanas. El objetivo de trabajo en esta tesis fue responder la pregunta: ¿Cuáles son y cuál es la frecuencia de los variantes del gen *NKX2-5* en población mestiza mexicana sana?.

1.1.- El gen *NKX2-5*

El gen *NKX2-5* (OMIM *600584) es miembro de la familia de genes homeobox clase NK, fue clonado en 1996,⁵ se encuentra localizado en 5q34 y consiste de 2 exones que codifican una proteína del mismo nombre (*NKX2-5*). También es llamado CSX por las siglas en inglés de Cardiac-Specific Homeobox 1. Mutaciones heterocigotas en *NKX2-5* constituyen las primeras evidencias de una causa genética para las cardiopatías congénitas no sindrómicas en humanos.⁶

1.2.- Estructura y función del factor de transcripción *NKX2-5*

NKX2-5 es un factor de transcripción de la clase NK-2 de 324 aminoácidos. Originalmente fue aislado como un homólogo de Tinman en *Drosophila*, el gen *tinman* en moscas se expresa inicialmente en todas las células del mesodermo, pero subsecuentemente su expresión es restringida al vaso dorsal, un equivalente en insectos al corazón de vertebrados, y es esencial para la cardiogénesis en *Drosophila*.⁷

NKX2-5 se expresa en las células progenitoras cardíacas antes de la cardiomiogénesis y a través de la vida adulta. Regula la extensión del tubo cardíaco, tiene un papel crítico en controlar el número de cardiomiocitos, manteniendo su homeostasis y supervivencia.⁸⁻¹¹ Está implicado en el desarrollo de todo el sistema de conducción y actúa como un represor del nodo sinoatrial.¹²⁻¹³ Regula múltiples aspectos de la estructura celular, función y desarrollo cardíaco.¹⁴

En modelos animales los transcritos de *Nkx2.5* son primero detectados durante la gastrulación como dos manchas simétricas del mesodermo anterior lateral. Su expresión persiste durante la expresión ventral de progenitores cardíacos y después en la formación del tubo cardíaco y en la morfogénesis del corazón. También se expresa en tejido del endodermo anterior. Las señales que regulan su expresión no han sido totalmente exploradas, ligandos de BMP

(proteína morfogenética ósea) están implicados en el mantenimiento de la expresión de *Nkx2.5* en el mesodermo anterior-lateral en *Xenopus*.¹⁰ También es expresado en progenitores del endotelio cardiaco y en músculo liso.¹⁵

El factor de crecimiento de fibroblastos inicia la expresión de *Nkx2.5* sin afectar a *GATA4*. La activación de factores de transcripción MAPK, p38y CREB es necesaria y suficiente para la iniciar la expresión de *NKX2-5*.¹⁰

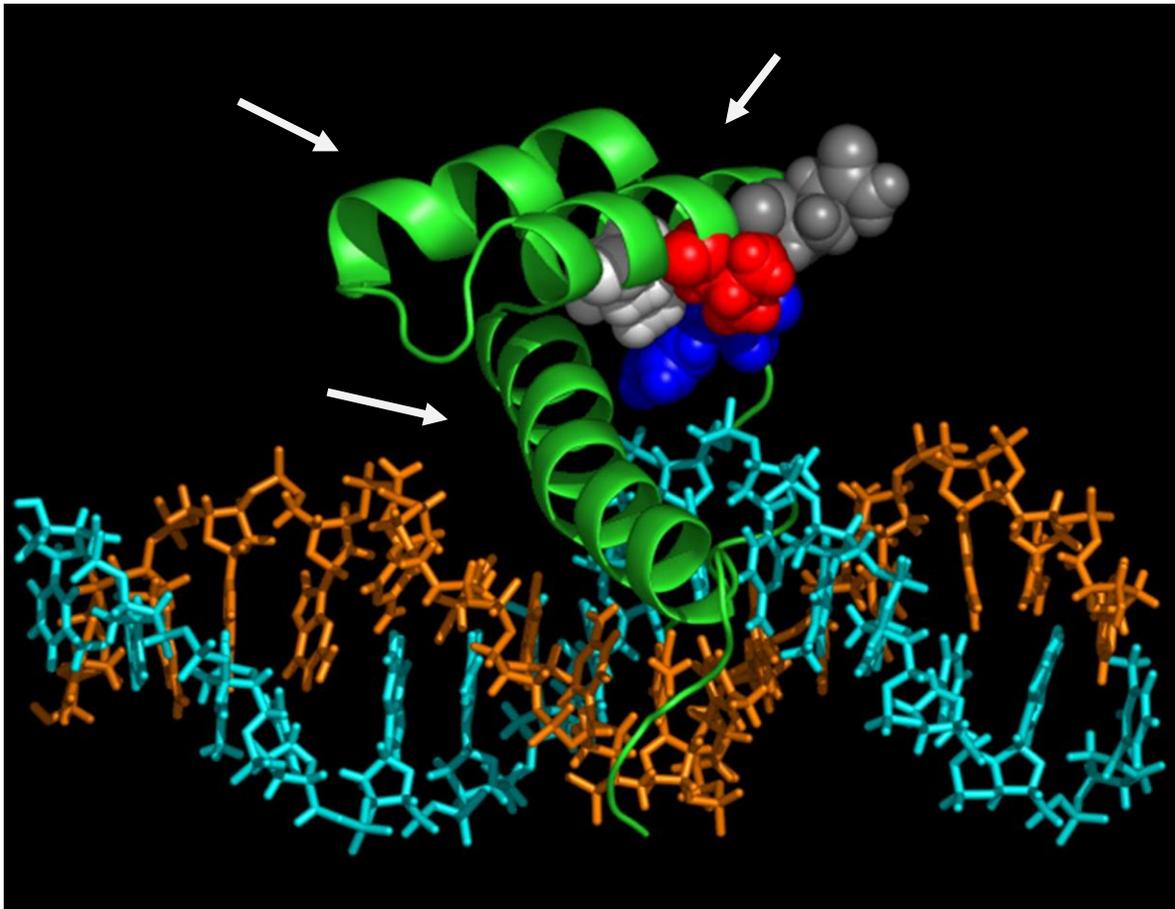


Figura 1.1.- Modelo de la proteína NKX2-5 (representada en verde). Se observan las 3 alfa-hélices (flechas blancas) y se representa la interacción con la doble hélice de ADN unida al andamiaje proteico estructural.¹⁶

NKX2-5 contiene un homeodominio tejido específico cardiaco. El homeodominio forma tres alfa hélices, y la hélice 3 es responsable para la especificidad de unión a ADN (Figura 1.1). Otras regiones conservadas de NKX2-5

son las regiones TN del dominio de transactivación y el dominio específico de NK2, con funciones autoregulatorias.^{8,17} El homeodominio se une preferencialmente a las secuencias de ADN que contienen 5´-T(C/T)AAGTG-3´ y también 5´-CAGAATG-3´ que son conocidos como sitios NKE.^{8,18} Su especificidad de unión única está determinada por el residuo de tirosina en la posición 54 en la tercera hélice del homeodominio, característico de la familia de genes homeobox clase NK-2.⁶

La Figura 1.2 corresponde a un esquema de la proteína NKX2-5, se señalan el homeodominio, el dominio TN y el dominio NK-2 con sus respectivas funciones.

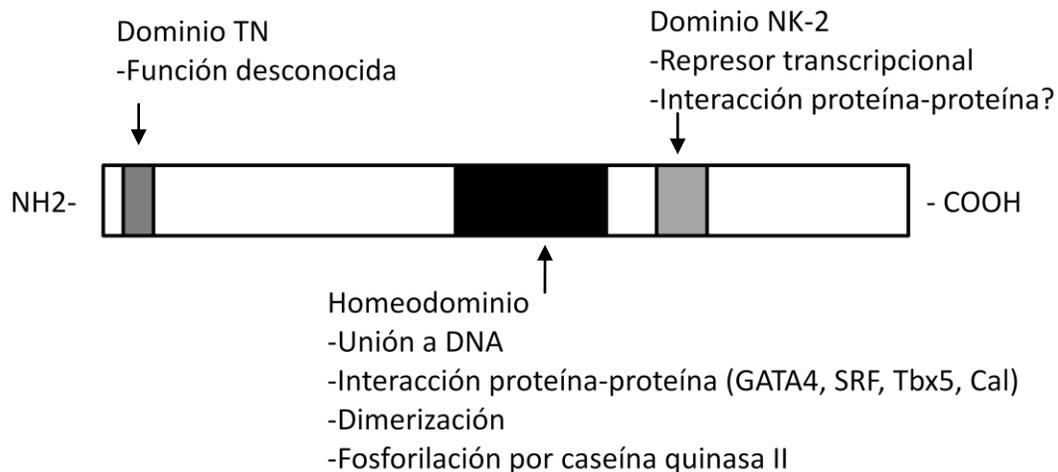


Figura 1.2.- Estructura proteica de NKX2-5. Se muestran sus dominios, con sus funciones conocidas, representados por cuadros grises, señalados con flechas. Modificada de Akazawa et al. (2005)⁶

Las regiones N y C-terminales son ricas en alanina y prolina. La región N-terminal proximal al homeodominio es un dominio de activación altamente cargado, pero la región C-terminal es un dominio autoinhibitorio. Deleción de la región C-terminal libera al dominio de activación, aumentando la actividad de unión a ADN, o potenciando interacciones con sus proteínas afines.⁸

NKX2-5 interactúa con las siguientes proteínas identificadas: GATA4, SRF, Tbx5, Tbx20, Tbx 2, dHAND/HAND2, PITX2, Hey2⁷ y juega un papel crucial en la regulación transcripcional de diferentes genes cardiacos: *ANP*, *Conexinas 43, 45, 40, 37*, *alfa-actina*, *CARP*, *β-catenina*.^{14,19}

La hélice 3 del homeodominio de NKX2-5 interactúa directamente con el dedo de zinc C-terminal de GATA4 para regular la expresión del factor atrial natriurético y el promotor alfa-actina cardiaco.⁸ NKX2-5 y GATA4 regulan la expresión de los canales de Ca²⁺ en los cardiomiocitos.²⁰ El dominio HAT de p300 es parcialmente requerido para la coactivación de NKX2-5.⁸

1.3.- Los polimorfismos

Cada individuo es genéticamente único, la diferencia fenotípica entre dos individuos está dada por factores genómicos y factores ambientales. Las variantes genéticas más comunes corresponden a los polimorfismos, definidos como variantes genéticas que tienen una frecuencia del alelo menor, de al menos uno por ciento en la población general, mientras que las variantes raras tienen una frecuencia menor al 1%.²¹

Estas variantes pueden ser divididas en 2 clases diferentes según su composición de nucleótidos: variantes estructurales y los SNPs que son polimorfismos en una única base par en la secuencia de ADN genómico que se presentan en individuos normales con al menos una frecuencia alélica del 1% o más en una población específica.²²

La mayoría de las variantes genéticas se cree que son neutrales y no contribuyen a una variación fenotípica, logrando frecuencias significativas en la población humana simplemente por casualidad. Cualquier tipo de variación genómica puede contribuir a enfermedades genéticas, y todas son sustratos

potenciales para la selección natural, como resultado de las diferencias fenotípicas entre individuos o poblaciones. La investigación del impacto médico y evolutivo de una variación estructural requiere comprender la distribución dentro de una especie, así como los factores que influyen en ésta, todo en conjunto es estudiado por la Genética de Poblaciones. Del 5 al 15% de la variación genética ocurre entre grandes grupos que viven en continentes diferentes y el resto ocurre al interior de los mismos grupos.²³

De acuerdo al proyecto HapMap los SNPs representan cerca del 90% de los polimorfismos de genoma y ocurren cada 400 nucleótidos en promedio.²⁴ Se calcula que la población humana tiene cerca de 11 millones de SNPs, de estos 7 millones ocurren con una frecuencia de más del 5% y el resto entre el 1 y el 5%.²⁵⁻

26

Se cree que son los principales contribuyentes a la variación entre individuos en la susceptibilidad genética a enfermedades humanas comunes.²⁷

Los SNPs por lo general no ocurren al azar, en algunas regiones del genoma su densidad es alta y en otras baja, la selección negativa opera para el caso de los SNPs no sinónimos.²⁷ Otros polimorfismos como los STRs del inglés *Short Tandem Repeats* típicamente mutan más rápido que los SNPs, produciendo mayores niveles de variación genómica.²⁸

La mayoría de los SNPs humanos son bialélicos, esto es que sólo dos variantes alélicas se segregan en la población. Sin embargo algunos sitios presentan 3 o incluso 4 nucleótidos segregados en la población.²⁹

La principal base de datos disponible con la información de los SNPs a nivel mundial se encuentra disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP> bajo el nombre de dbSNP (Single Nucleotide Polymorphism database).³⁰

1.4.- Polimorfismos de *NKX2-5*

Se han reportado diversos polimorfismos en la secuencia del gen *NKX2-5* en diferentes poblaciones, los cuales se muestran en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Polimorfismos del gen <i>NKX2-5</i>					
	Ref SNP ID	Posición mRNA	Alelos	Aminoácidos	Mutación
Exón 1	rs3729937	134	Y = C/T	5' UTR	
	rs3729934	197	M = A/C	7 Leu [L]	
	rs17052019	223	M = A/C (C)	16 Asp [D]	Ala [A]
	rs2277923	239	R = A/G	21 Glu [E]	
	rs28936670	249	Y = C/T (T)	25 Arg [R]	Cys [C]
Exón 2	rs3729938	712	S = C/G (G)	179 Ser [S]	Cys [C]
	rs7728764	770	Y = A/G	198 Gln [Q]	
	rs3729753	782	S = C/G	202 Leu [L]	
	rs3729754	808	Y = C/T (T)	211 Pro [P]	Leu [L]
	rs703752	1212	K = G/T	3' UTR	
	rs11552707	1486	K = G/T	3' UTR	

Fuente: NCBI (National Center for Biotechnology Information), dbSNP.³⁰

1.5.- Cardiopatías asociadas a mutaciones en *NKX2-5*

La mayoría de las mutaciones reportadas se encuentran en el homeodominio y se han encontrado en familias con defectos del septum atrial y bloqueos de la conducción atrioventricular con un patrón de herencia autosómica dominante. Otras anomalías cardíacas han sido observadas con baja penetrancia en estas familias, incluyendo defecto septal ventricular, anomalía de Ebstein, alteraciones del tracto de salida (doble salida del ventrículo derecho y tetralogía de

Fallot), estenosis aórtica subvalvular, y alteraciones de la válvula tricúspide.^{4,11,31} (Tabla 1.2.)

Una variedad de mutaciones heterocigotas diferentes de *NKX2-5* en línea germinal han sido identificadas en pacientes que padecen cardiopatía congénita (Figura 1.3). Se ha sugerido un mecanismo de haploinsuficiencia como la causa de las cardiopatías, esto es apoyado por la delección heterocigota de 5q34, la cual incluye a *NKX2-5* que fue encontrada en un paciente con defecto del septum atrial y bloqueo atrioventricular. *NKX2-5* modula la matriz extracelular de la aorta durante el desarrollo embrionario.³²

Las siguientes mutaciones se han descrito en más de una familia: p.Glu21Gln, p.Arg25Cys, p.Thr178Met, p.Arg190Cys, p.Gln198Stop, p.Arg216Cys, and p.Ala219Val (Tabla 3.3.1.)⁴

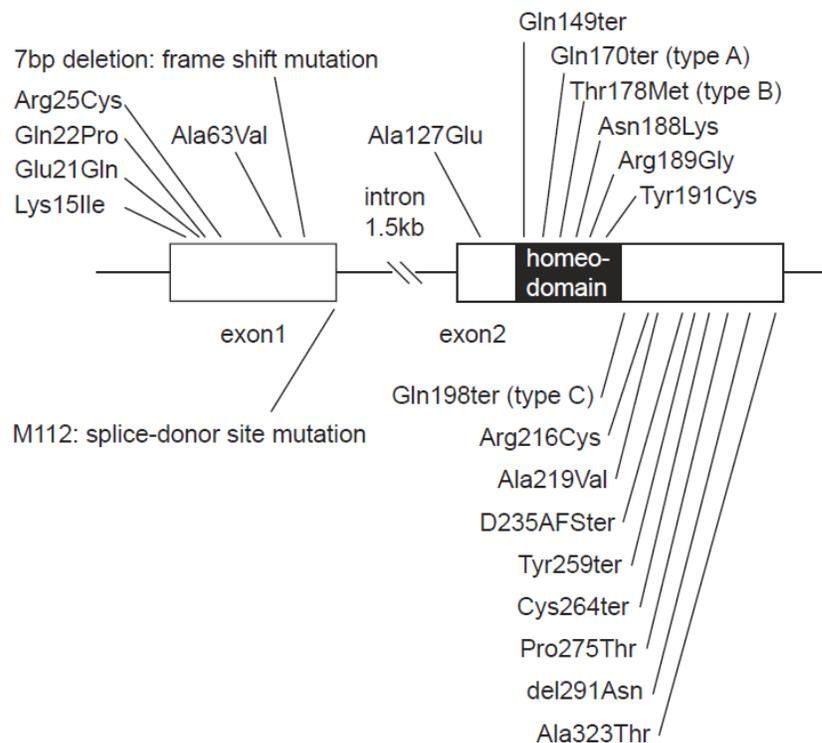


Figura 1.3.- Mutaciones en *NKX2-5*. Localizaciones de las mutaciones identificadas. Los 2 exones están separados por un intrón de 1.5-Kb.⁶

Mutaciones en *NKX2-5* ocurren en 8-19 % de los defectos septales atriales familiares y en 1-4 % de los casos esporádicos,³³ se encuentran en cerca del 4% de los individuos con tetralogía de Fallot aislada,³⁴ y en cerca del 3% de individuos con varias formas de cardiopatías.^{4,35} Es gen candidato de etiología de foramen oval permeable, sin embargo no se han encontrado mutaciones en los pacientes analizados.³⁶⁻³⁷

Variantes de la secuencia de *NKX2-5* somáticas fueron encontradas en >95% de los corazones humanos con defectos septales y detectadas por secuenciación directa. Estas variantes fueron identificadas primariamente en regiones malformadas y no en las regiones no afectadas tomadas del mismo corazón, indicando una naturaleza somática y en mosaico de estas variantes. También se encontraron variantes somáticas en otros factores de transcripción como *TBX5*, *GATA4*, y *HEY2*, simultáneamente en el mismo paciente, lo que podría sugerir una condición de inestabilidad genética. Sin embargo esto no se ha demostrado en otros estudios y pudiera tratarse de artefactos postmortem.⁷

Tabla 1.2- Correlación fenotipo genotipo de mutaciones en *NKX2-5*.

Fenotipo	OMIM*	Mutaciones
Defecto septal atrial con defectos en la conducción atrioventricular	#108900	THR178MET; GLN170TER; GLN198TER
Tetralogía de Fallot	#187500	ARG25CYS; GLU21GLN; ARG216CYS; ALA219VAL
Bloqueo atrioventricular, Segundo grado idiopático		IVS1DS, G-T, +1
Defecto septal atrial con defectos de la conducción atrioventricular		7-BP DEL, 2-BP DEL, 223CG; ASP299GLY; 1-BP DEL, 262G; ARG190CYS; TYR256TER
Hipotiroidismo congénito, no gotoso, 5	#225250	ALA119SER; ARG161PRO
Defecto septal atrioventricular, somático		LYS183GLU

*Adaptado de OMIM.³⁸

En 5 miembros de una familia, quienes presentaban defectos del septum atrial, se encontró que presentaban una delección de 7 pb en el exón 1 de *NKX2-5*, en el nucleótido 215, lo que resultaba en una proteína truncada, sin el homeodominio. Algunos de ellos tenían además bloqueo auriculoventricular, fibrilación atrial, uno presentaba doble orificio de la válvula mitral. Y un individuo presentaba fibrilación atrial, defecto del septum atrial, poliesplenia, hígado simétrico, y malrotación intestinal. (Síndrome de Heterotaxia Visceral variedad poliesplenia). Se sabe que *NKX2-5* tiene un sitio de unión en *PITX2*, y es esencial para el mantenimiento de la expresión asimétrica de *PITX2*. *PITX* es un gen importante para el establecimiento de la lateralidad, se propuso que este gen u otro regulado por *NKX2-5* pudiera haber estado involucrado en esta familia, se mostró que la misma mutación estaba relacionada con los diferentes fenotipos.³

1.6.- Redes génicas en el desarrollo cardiaco

A lo largo del desarrollo un único gen puede controlar un proceso morfogénético básico, como la síntesis o la degradación de una proteína. Esa proteína puede ser fundamental para el desarrollo de órganos diferentes y activarse durante la embriogénesis en tiempo y lugares diferentes. Su inactivación resultará en una serie de defectos en órganos distantes entre sí y la gravedad de la presentación dependerá de la capacidad de cada órgano para suplir o compensar el defecto genético.³⁹ Mutaciones asociadas con CC pueden afectar determinados linajes celulares específicos resultando en defectos en estructuras cardiacas determinadas. Los genes involucrados deben estar estrechamente controlados para que haya diferenciación de los linajes correctos en el momento correcto y en la ubicación correcta.⁴⁰

Diversos factores de transcripción intervienen en el desarrollo cardiaco. NKX2-5 limita la expansión de los progenitores cardiacos y promueve su diferenciación potencial. GATA4 es un factor de transcripción del tipo dedo de zinc, regula expresión de genes cardiacos, tanto GATA4 como TBX5 interactúan NKX2-5 y los tres han sido identificados como reguladores de la cardiogénesis sensibles a dosis. Otros factores de transcripción están asociados al desarrollo cardiaco como *Tbx1* (involucrado en la región crítica del síndrome de del22q11), *SALL4* (que causa el síndrome de Okihiro e interactúa con TBX5) y *TBX20* (relacionado con defectos valvulares, del septum atrial y ventricular).⁴⁰

Parte del desarrollo normal del corazón está dado por fuerzas hemodinámicas por lo que alteraciones en el flujo cardíaco pueden originar defectos estructurales secundarios. como ejemplo mutaciones en *MYH6*, (que codifica la cadena pesada de la miosina-alfa) se han encontrado en casos familiares de defectos del septum atrial.⁴⁰

La vía de señalización de Notch está en relación al desarrollo vascular. *NOTCH1* se expresa en el endocardio de los grandes vasos del corazón. Promueve la transformación epitelio-mesénquima durante el desarrollo cardíaco y

está involucrado en angiogénesis y determinación celular arterio-venosa, así como en la formación valvular. ⁴⁰⁻⁴¹ Mutaciones en *miR-1-1* y *miR-1-2* que codifican miR-1 causan defectos del septum ventricular. ⁴⁰

Algunos de los genes identificados que se han relacionado con cardiopatías congénitas se muestran en la tabla 1.3, muchos corresponden a factores de transcripción y varios a genes que regulan múltiples aspectos de la función celular. La importancia de estas redes en la medicina regenerativa es que su manipulación contribuirá al éxito de la ingeniería de tejidos y la terapia con células madre. ⁴²

Tabla 1.3.- Genes asociados con cardiopatías congénitas		
Condición	Gen(es)	Localización cromosómica
Defectos cardiacos congénitos		
Cardiopatía congénita familiar	<i>NKX2-5</i>	5q34-q35
Transposición de grandes vasos, DSVD	<i>CFC1</i>	2q21
Transposición de grandes vasos	<i>PROSIT240</i>	12q24
Tetralogía de Fallot	<i>ZFPM2/FOG2</i>	8q23
	<i>NKX2.5</i>	5q34-q35
	<i>JAG1</i>	20p12
Defecto septal atrioventricular	<i>CRELD1</i>	3p21
Defecto septal atrial/ventricular	<i>GATA4</i>	8p23
Heterotaxia	<i>ZIC3</i>	Xq26
	<i>CFC1</i>	2q21
	<i>ACVR2B</i>	3p21.3-p22
	<i>LEFTYA</i>	1q42.1
Estenosis aórtica supravalvular	<i>ELN</i>	7q11
Síndromes		
Síndrome de Holt-Oram	<i>TBX5</i>	12q24
Síndrome de Alagille	<i>JAG1</i>	20p12
Síndrome de Char (PCA)	<i>TFAP2B</i>	6p12
Síndrome de Noonan	<i>PTPN11</i>	12q24
	<i>KRAS</i>	12p1.21
	<i>SOS1</i>	2p21
Asociación CHARGE	<i>CHD7</i>	8q12
Ellis-van Creveld	<i>EVC, EVC2</i>	4p16
Síndrome de Marfan	<i>FBN1</i>	15q21.1
Síndrome de LOEYS-DIETZ	<i>TGFBR2</i>	3p22
Cardiofaciocutáneo	<i>KRAS</i>	12p12.1
	<i>BRAF</i>	7q34
	<i>MEK1</i>	15q21
	<i>MEK2</i>	7q32
Síndrome de Costello	<i>HRAS</i>	11p15.5

DSVD=doble salida de ventrículo derecho. Modificada de Pierpont, et al. (2007)¹

1.7.- Cardiopatías congénitas y bases embriológicas del desarrollo cardiaco

Las cardiopatías congénitas (CC) ocurren en más del 1-2% de los recién nacidos vivos y en 10% de los fetos abortados espontáneamente.^{11,43} Entre los defectos del nacimiento son la causa más común de muerte neonatal.⁷ La verdadera prevalencia, podría ser mucho mayor, ya que no se incluye la válvula aórtica bicúspide que corresponde a la más común de las cardiopatías.¹ También se excluyen cardiomiopatías, enfermedad en el sistema de conducción y defectos de la lateralidad, que aunque son heredadas y están presentes al nacimiento se consideran aparte por su distinta presentación clínica.⁴⁰ La Secretaría de Salud de México a través de la Dirección General de Información en Salud demuestra en las diez principales causas de mortalidad en hombres y mujeres, por grupos de edad que las malformaciones congénitas del corazón en México son la segunda causa de mortalidad en hombres y mujeres menores de un año, la tercera causa en edad preescolar (1 a 4 años), la quinta causa en mujeres en edad escolar (5 a 14 años) y la novena en hombres en esta misma etapa.⁴⁴ Durante el primer año de vida se diagnostican cerca del 40% de las CC.

En base a los riesgos de recurrencia se propuso una etiología multifactorial, en este tipo de herencia, la predisposición genética del individuo interactúa con el medio ambiente para causar el defecto cardiaco congénito, esta predisposición está dada por una combinación de variantes en genes que intervienen en el desarrollo embrionario del corazón. En algunas familias se han descrito CC con herencia clásica.

Las CC frecuentemente ocurren como parte de múltiples anomalías congénitas. El análisis cromosómico estándar revela aberración cromosómica en 8-13% de los neonatos con defectos cardiacos congénitos y de todos los niños con anomalías cromosómicas al menos 30% presentan cardiopatía congénita.¹ Por estas razones se recomienda realizar cariotipo a los niños con

cardiopatía congénita, especialmente si presentan dismorfias u otra anomalía en otro órgano sistémico.

1.7.1.- Cardiogénesis

El corazón es el cebador órgano en formarse en el embrión.⁴⁵ En la tercera semana las células mesenquimatosas espláncnicas, ventrales al celoma pericárdico, se agregan y se disponen juntas para formar **los cordones angioblásticos**, que se canalizan para formar dos tubos cardiacos endoteliales. A medida que ocurre el plegamiento embrionario lateral estos tubos se aproximan entre sí y se fusionan para formar un solo tubo cardiaco endotelial. Conforme se fusionan, se forma el miocardio primitivo a partir de mesodermo espláncnico que rodea al celoma pericárdico.⁴⁶

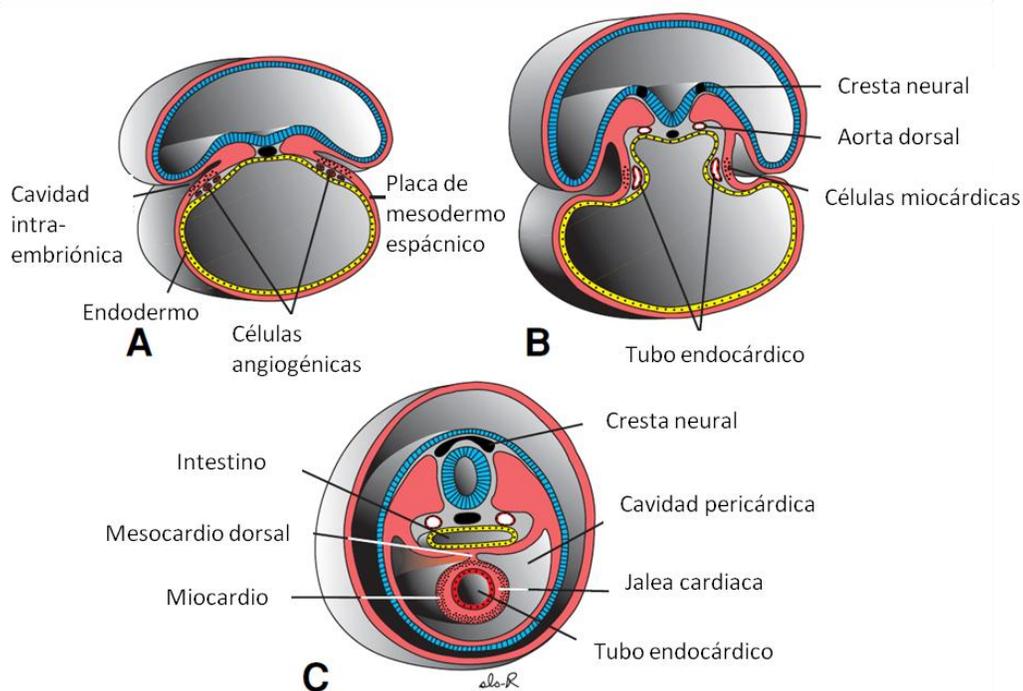


Figura 1.4.- Desarrollo embrionario. Se muestran secciones transversas de embriones en diferentes estadios del desarrollo. A. 17 días. B. 18 días. C. 22 días (estadio de ocho somitas). Modificada de Sadler et al., 2006.⁴⁷

En esta etapa, el corazón se compone de un delgado tubo endotelial separado por tejido conjuntivo gelatinoso o jalea cardíaca de otro tubo muscular grueso que constituirá al miocardio (Figura 1.4). El epicardio deriva de las células

mesoteliales que surgen de la superficie externa del seno venoso y se diseminan sobre el miocardio. El corazón tubular se alarga y desarrolla dilataciones y constricciones alternas que formarán las estructuras del tronco arterioso, bulbo arterioso, ventrículo, aurícula y seno venoso. De manera craneal, el tronco arterioso se continúa con el saco aórtico del cual surgen los arcos aórticos.^{46,48}

Debido a que el bulbo arterioso y el ventrículo crecen más rápido que otras regiones, el corazón se dobla sobre sí mismo y se forma el asa bulboventricular, la aurícula y el seno venoso desarrollan expansiones laterales que corresponden a los cuernos derecho e izquierdo del seno venoso. Los cojinetes endocárdicos forman las paredes dorsal y ventral del conducto auriculoventricular y sirven como válvulas primitivas que ayudan en la propulsión de sangre a través del corazón. Más tarde se forman las hojas valvulares, la válvula que protege el canal auriculoventricular derecho desarrolla tres valvas (válvula tricúspide), mientras que la del canal izquierdo (válvula mitral) solo desarrolla dos.⁴⁷⁻⁴⁸

En la quinta semana conforme se forman los canales auriculoventriculares un crecimiento descendente del septum primum interauricular divide la aurícula común en dos cámaras septadas. En este momento, cerca de su extremo cefálico, un área de apoptosis causa la aparición de múltiples perforaciones las cuales formarán el foramen secundum interauricular. El foramen oval se forma del septum secundum. Cuando los tabiques interauriculares se están formando, un tabique interventricular muscular empieza a crecer desde el vértice del ventrículo común hacia los cojinetes endocárdicos auriculoventriculares (tabicación). Al comienzo existe un agujero interventricular, que al final se cierra.⁴⁸

El marcapasos (nodo sinoauricular) se desplaza desde el extremo caudal del tubo izquierdo del corazón y es fusionado al seno venoso, da lugar al nodo auriculoventricular en la zona del tabique interauricular. Los nodos se conectan a través de haces de células musculares cardíacas modificadas. Un haz auriculoventricular pasa de la aurícula al ventrículo y se divide en ramas fibras de Purkije.⁴⁸

1.7.2.- Establecimiento de la lateralidad del embrión

En los estadios iniciales del desarrollo, el embrión es simétrico respecto a la línea media, la simetría se rompe durante la gastrulación y el eje derecha-izquierda se establece subsecuente al desarrollo del eje anteroposterior y dorsoventral. La primera evidencia clara de asimetría morfológica surge con la formación del asa cardíaca. El corazón se incurva para formar un asa a la derecha. Al continuar el desarrollo embrionario, el resto de los órganos adquiere progresivamente su distribución asimétrica característica.²

La mayor parte del estudio del establecimiento de la lateralidad se ha realizado en embriones de aves y mamíferos, su extrapolación proporciona un modelo de trabajo razonable para conocer lo que sucede en el humano.⁴⁹

Numerosos genes se expresan asimétricamente, a la izquierda o a la derecha, la mayoría codifican para moléculas que interaccionan estableciendo cascadas de señalización.³⁹ Estas cascadas de expresión asimétrica se inician alrededor del nodo para establecer amplios dominios de expresión génica asimétrica en el mesodermo lateral. En mamíferos, las estructuras organizadoras contienen células monociliadas en su superficie ventral y generan el "flujo nodal".^{2,50}

Existen dos poblaciones de cilios localizados en el nodo del ratón, consisten en el cilio central móvil, y el cilio periférico sensible. El cilio sensible carece de brazos de dineína y son inmóviles. El cilio móvil, contiene nueve microtúbulos dobles y proteínas de dineína codificada por *DNAH11*. Estos cilios tienen un movimiento vorticial en sentido de las manecillas del reloj, que, en conjunto, produce un flujo del fluido perinodal hacia la izquierda.² Se postula que este flujo causa una distribución asimétrica de un morfógeno aún no identificado, responsable del comienzo de la vía de señalización izquierda-derecha. Se ha demostrado que algunos genes se expresan de manera asimétrica antes de la formación del nodo.^{2,39,50}

1.8.- Heterotaxia Visceral

La heterotaxia visceral o *situs ambiguus* corresponde a un grupo de anomalías en el cual los órganos toracoabdominales muestran una disposición anormal con respecto al patrón normal de asimetría corporal, resultan de una falla en el desarrollo embrionario para establecer la disposición en el eje derecha-izquierda normal. La palabra heterotaxia deriva del griego “heteros” que significa otro y “taxis” que significa orden, arreglo o disposición, también se conoce con el epónimo de síndrome de Ivemark. Las anomalías del situs visceral son caracterizadas por una tendencia a la simetría anormal de vísceras y venas que normalmente son asimétricos. Existe discordancia entre la orientación derecha-izquierda de varios órganos, así como también de varios segmentos del corazón (Figura 1.5).⁵⁰⁻⁵¹



Figura 1.5.- Radiografía de un lactante con síndrome de heterotaxia. Demuestra varias de las características clínicas, incluyendo corazón en lado derecho, campos pulmonares anormales, por conexión anómala total de venas pulmonares, hígado central y malrotación intestinal.⁵¹

La heterotaxia tiene una prevalencia estimada de 1 en 10,000, representa aproximadamente el 3% de todas las CC y si los abortos y los óbitos son incluidos se encuentra en el 0.03 al 1.1% de los fetos.⁵² Entre los factores ambientales

asociados a la etiología del SHV se encuentran el antecedente de diabetes materna y el uso de cocaína durante el tercer trimestre del embarazo, se ha reportado una mayor asociación de heterotaxia en gemelos monocigotos con respecto a los nacimientos únicos.⁵³⁻⁵⁵

Mutaciones en genes que causan formas clásicas de heterotaxia también pueden resultar en malformaciones cardiovasculares sin evidencia de anomalías viscerales, lo que nos habla de expresividad variable.⁵⁶ El SHV se asocia típicamente con malformaciones cardiovasculares complejas y frecuentemente es diagnosticado en el periodo neonatal por las manifestaciones de la cardiopatía congénita tipo cianótica, que presentan la mayoría de los casos. La heterotaxia incluye también al isomerismo o secuencia de isomerismo que se refiere a estructuras que anatómicamente se encuentran conformadas como una imagen en espejo, y que en el tórax afecta principalmente a bronquios, pulmones y aurículas. Grados diferentes de heterotaxia se observan también en síndromes de la línea media como el síndrome de Meckel (*situs inversus* y poliesplenia), o en el síndrome de Kartagener.⁵⁶⁻⁵⁷

En el caso de isomerismo de los apéndices atrial izquierdo o síndrome poliesplenia, la vena cava inferior usualmente no se conecta directamente con el atrio derecho, su curso suprarrenal frecuentemente está interrumpido, con la sangre retornando al corazón a través de la vena tributaria ácigos o hemiacigos, de tal manera que la aorta está en la línea media y la vena ácigos es localizada en una posición posterolateral (Figura 1.6).⁵⁷

La morfología de los pulmones, y la relación entre el árbol bronquial y las arterias pulmonares, son útiles para determinar el "situs". Un pulmón derecho típicamente tiene tres lóbulos, y uno morfológicamente izquierdo típicamente tiene dos lóbulos. El lado derecho tiende a tener un bronquio epiarterial, mientras que el bronquio izquierdo es hiparterial.⁵⁷⁻⁵⁸

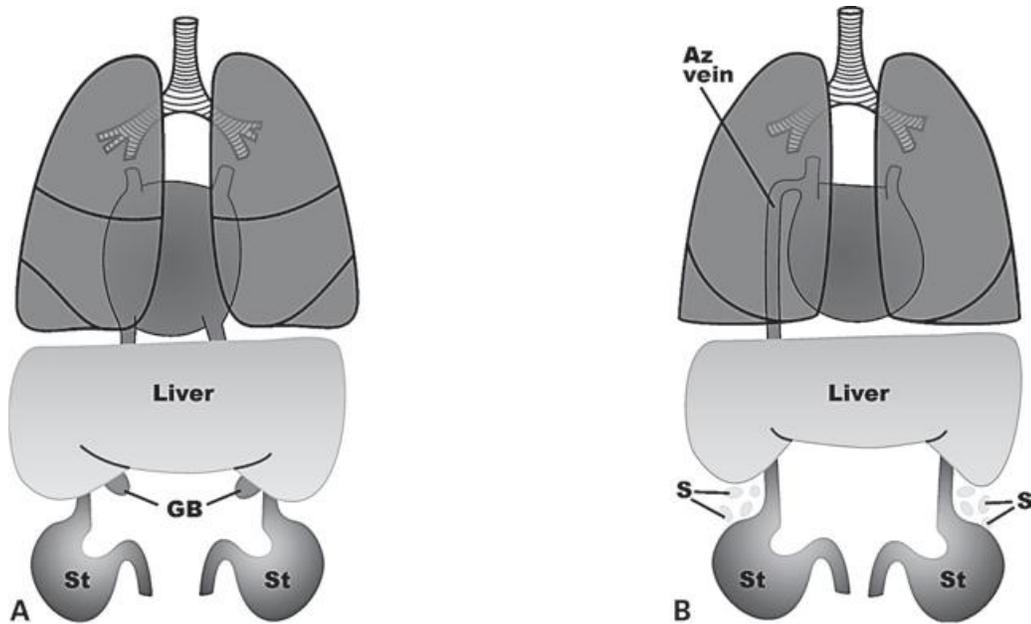


Figura 1.6.- Patrones de orientación viscerotaxial en el síndrome de heterotaxia visceral. Existe simetría anormal de las vísceras con una orientación derecha-izquierda discordante de diferentes órganos (situs ambiguo). **A.-** Características del síndrome variedad asplenia, los pulmones son bilateralmente trilobulados. Hay vena cava superior bilateral u venas sistémicas bilaterales entrando a la aurícula. El hígado es grande y en línea media. El estómago y la vesícula biliar pueden estar del lado derecho o izquierdo, el bazo es ausente. **B.-** Características del síndrome poliesplenia. Los pulmones son bilateralmente bilobulados. Hay típicamente interrupción de la vena cava inferior con extensión de la ácigos. El hígado es grande y simétrico, la vesícula biliar puede estar ausente. El estómago y los múltiples bazos son encontrados en el lado izquierdo o en el derecho. Az = vena ácigos; S = Bazo; St = estómago; GB = vesícula biliar.⁵⁶

La anatomía del bazo es frecuentemente utilizada para clasificar a los pacientes con heterotaxia. En la mayoría de los casos el isomerismo derecho está asociado con la ausencia del bazo y el isomerismo izquierdo con la presencia de múltiples bazos. En el SHV variedad asplenia es posible encontrar un bazo de diferente morfología, que va desde hipoplasia (bazo rudimentario) o bazo accesorio, a bazos múltiples de diferentes tamaños.⁵⁸ No todos los pacientes con múltiples bazos tienen isomerismo de los apéndices atriales izquierdos, y no todos los pacientes con asplenia tienen isomerismo de los apéndices atriales derechos. Por esta razón se recomienda utilizar la palabra síndrome, ya que, síndrome engloba signos y síntomas que ocurren juntos y que caracterizan una enfermedad, y los hallazgos pueden no estar presentes en todos los casos.⁵⁷

1.9.- Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es el estudio matemático de la dinámica de la variación genética. Su principal propósito es entender la forma en que las fuerzas evolutivas de mutación, selección natural, deriva génica y estructura poblacional interactúan para producir y mantener los patrones complejos de variación genética que son observados entre individuos de una población y entre diferentes poblaciones en una especie.^{59,60} Una población se define como un grupo de individuos de la misma especie que habitan dentro de una zona geográfica restringida, que comparten un acervo genético común y que tienen la posibilidad de aparearse entre sí. La mayor herramienta de investigación que utiliza son los polimorfismos de ADN.²²

Las mutaciones son una de las fuerzas fundamentales de la evolución, ya que alimentan la variabilidad en las poblaciones, permitiendo así el cambio evolutivo. Existen diferencias marcadas entre grupos poblacionales en las frecuencias alélicas, tanto para genes causantes de enfermedades como para marcadores genéticos neutrales selectivos, como lo son ciertos grupos sanguíneos. Las poblaciones que han sufrido reducciones drásticas de tamaño o una rápida expansión en el pasado y las poblaciones formadas por la mezcla de grupos ancestrales, previamente separados, usualmente tienen niveles altos de desequilibrio de ligamiento.²³

Muchos otros factores geográficos, climáticos e históricos han contribuido a los patrones de variación genética humana vistos en el mundo, actualmente.²³

La serie de informaciones genéticas que llevan todos los miembros que se cruzan en una población se llama acervo genético. Las poblaciones son dinámicas; pueden crecer y expandirse o disminuir y contraerse mediante cambios en las tasas de nacimientos o fallecimientos, por migración o por fusión con otras poblaciones. Tanto la selección natural como la conversión génica sesgada

pueden afectar el proceso de fijación de mutaciones en una población, conduciendo a diferencias en la distribución de frecuencias alélicas.⁶¹

Para que un marcador polimórfico sea considerado como tal, este debe tener una frecuencia mayor del 1% en población general, así que quedan descartadas las mutaciones esporádicas recientes.

1.10.- Análisis de las distribuciones de las frecuencias

Los SNPs se utilizan como marcadores para el mapeo de loci de enfermedades poligénicas en las poblaciones. El conocimiento de la frecuencia y patrones subyacentes de la asociación entre los SNPs no vinculados a la enfermedad es esencial para la interpretación de los patrones de desequilibrio de ligamiento entre marcadores y genes candidatos de enfermedad. Los SNPs pueden arrojar luz sobre la historia humana, incluyendo las relaciones entre los grupos étnicos, las migraciones y los cambios del tamaño de la población. La distribución de la variación puede enseñarnos acerca de la importancia relativa de fuerzas como la selección, mutación, migración, recombinación y deriva genética, y por lo tanto puede ayudarnos a comprender la naturaleza del proceso evolutivo a nivel molecular.⁶² El proceso de fijación de ciertas clases de mutaciones puntuales parece ser más atribuido a la conversión génica.⁶¹

1.10.1.- Cálculo de las frecuencias alélicas

La Ley de Hardy-Weinberg corresponde a un modelo matemático desarrollado independientemente por el matemático inglés Godfrey H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg, en 1908, para calcular frecuencias alélicas. Sigue siendo fundamental para la genética de poblaciones.⁶³

Una frecuencia es una proporción o un porcentaje, expresado de manera habitual como una fracción decimal.

En el caso de poblaciones grandes, en las que no es práctico determinar los genes de todos los individuos, suele tomarse una muestra de individuos provenientes de la población y se calculan las frecuencias genotípicas y alélicas para esta muestra.

El modelo Hardy-Weinberg considera lo que sucede en una población ideal con características bien definidas. La población ideal está formada por organismos diploides con reproducción sexual y el gen considerado es autosómico por lo que no hay diferencias de frecuencias alélicas entre los sexos.

La ley de Hardy-Weinberg (HW) tiene tres propiedades importantes:

- Las frecuencias alélicas predicen las frecuencias genotípicas.
- En el equilibrio, las frecuencias alélicas y genotípicas no cambian de generación en generación.
- Y el equilibrio se alcanza con una sola generación de apareamiento al azar.

Para alcanzar el equilibrio se deben cumplir las siguientes condiciones de la ley de Hardy-Weinberg:

1. Población suficientemente grande como para que los errores de muestreo o efectos aleatorios sean bajos
2. El apareamiento dentro de la población se dé al azar
3. No exista ventaja selectiva de ningún genotipo; es decir, que todos los genotipos producidos por la recombinación al azar son igualmente viables y fértiles
4. Que no existan otros factores, como mutación, migración y deriva genética.

Estas condiciones definen a una población panmíctica. Ninguna población humana cumple estos postulados ya que las probabilidades de apareamiento no son aleatorias, sino que se ven afectadas por factores sociales, geográficos, y muchos otros), ni está completamente libre de inmigración, ni es de tamaño infinito. Sin embargo, las frecuencias genotípicas tienen una tendencia a aproximarse.⁶⁴

Para el cálculo de las frecuencias de los alelos, se utilizan las letras p y q para representar cada alelo.

Debido a que la suma de p y q representa el 100 por ciento de los alelos de dicho gen en la población, se puede decir que $p + q = 1$. Se puede utilizar un esquema para representar la combinación al azar de los gametos que llevan estos alelos y de los genotipos resultantes.

La distribución de los genotipos homocigotos y heterocigotos en una generación se puede expresar como $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Si se asumen las condiciones de Hardy-Weinberg anteriormente descritas, se pueden calcular las frecuencias alélicas de un genotipo.

Se dice que una población, en la que la frecuencia de un alelo dado permanece constante de generación en generación, está en equilibrio genético. En este caso, las frecuencias para cada alelo permanecen constantes.

Una vez establecida en la población, la frecuencia de los alelos se mantiene constantemente en el equilibrio.⁶⁵

1.10.2.- Comprobación del equilibrio

A partir de las frecuencias alélicas para p y q se pueden calcular las frecuencias esperadas para homocigotos pp , heterocigotos pq y homocigotos qq .⁶⁵

Si después de realizar el análisis de X-cuadrada de Pearson que compara las frecuencias esperadas con las frecuencias observadas y la p es mayor a 0.05 se confirma que la población está en equilibrio, que significa que la diferencia es por azar.

2.- Planteamiento del Problema

¿Cuáles son y qué frecuencia tienen los polimorfismos del gen *NKX2-5* en una muestra de población mexicana aparentemente sana?

3.- Justificación

Se han asociado diversas mutaciones en la secuencia del gen *NKX2-5* con la formación de cardiopatías congénitas, como la Heterotaxia Visceral.³⁻⁴ No existen antecedentes de estudios en relación a estos polimorfismos o mutaciones del gen *NKX2-5* en población Mexicana sana. Estos datos son necesarios para poder establecer estudios de asociación entre los hallazgos en pacientes con cardiopatías congénitas y variaciones en la secuencia del gen estudiado.

4.- Objetivo General

Identificar y determinar la frecuencia de variantes alélicas en el gen *NKX2-5* en individuos mestizos mexicanos sin cardiomiopatía/sin Heterotaxia Visceral.

4.1.- Objetivos específicos

- Determinar los polimorfismos en *NKX2-5* en una muestra de individuos sanos representativos de la población mestiza mexicana.

- Crear una referencia para el análisis molecular de posibles patologías asociadas a mutaciones en *NKX2-5*, en población mexicana.

- Comparar la distribución de la frecuencia de los polimorfismos en *NKX2-5* en población mexicana contra otras poblaciones a nivel mundial.

5.- Material y métodos

5.1.- Diseño del estudio

La presente investigación corresponde a un estudio de casos; es un estudio observacional, transversal y descriptivo.

5.2.- Población de estudio y tamaño de la muestra

Se seleccionaron aleatoriamente 51 muestras control de voluntarios aparentemente sanos del banco de ADN del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

5.3.- Criterios de selección del banco de ADN

- Población mestiza mexicana de la zona centro del país.
- Mexicanos en al menos tres generaciones.
- Individuos aparentemente sanos y sin antecedentes familiares de cardiopatías congénitas.
- Voluntarios que firmaron carta de consentimiento informado aprobada por el Comité de Ética del HIMFG. (Anexo 2)

5.3.1.- Criterios de inclusión:

Muestras de ADN con índice de pureza $\lambda_{260/280}$ igual a 1.8 – 2.

Muestras de ADN no degradado.

5.3.2.- Criterios de exclusión y/o eliminación

Muestra de ADN inadecuada para el análisis.

6.- Descripción de la metodología

Se amplificaron mediante la técnica de PCR los dos exones del gen *NKX2-5*, empleando oligonucleótidos específicos (cebadores) previamente diseñados con el programa PRIMER3.⁶⁶

Los productos obtenidos de la PCR fueron purificados y posteriormente secuenciados, por el método dideoxi de Sanger conjuntamente con un sistema de secuenciación automatizada de capilar, para la búsqueda de los polimorfismos reportados en la literatura (Tabla 1.1). Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante su alineamiento con una secuencia de referencia del gen *NKX2-5* (ENSG00000183072) obtenida de la base de datos Ensembl.⁶⁷ Se registraron los alelos obtenidos por cada muestra analizada en una tabla de resultados.

La frecuencia de los SNPs encontrados fue determinada y analizada por medio de la ecuación de Hardy-Weinberg,⁶⁵ los datos obtenidos fueron comparados con los datos reportados en otras poblaciones.

En la Figura 6, se muestra el diagrama de flujo de la metodología empleada.

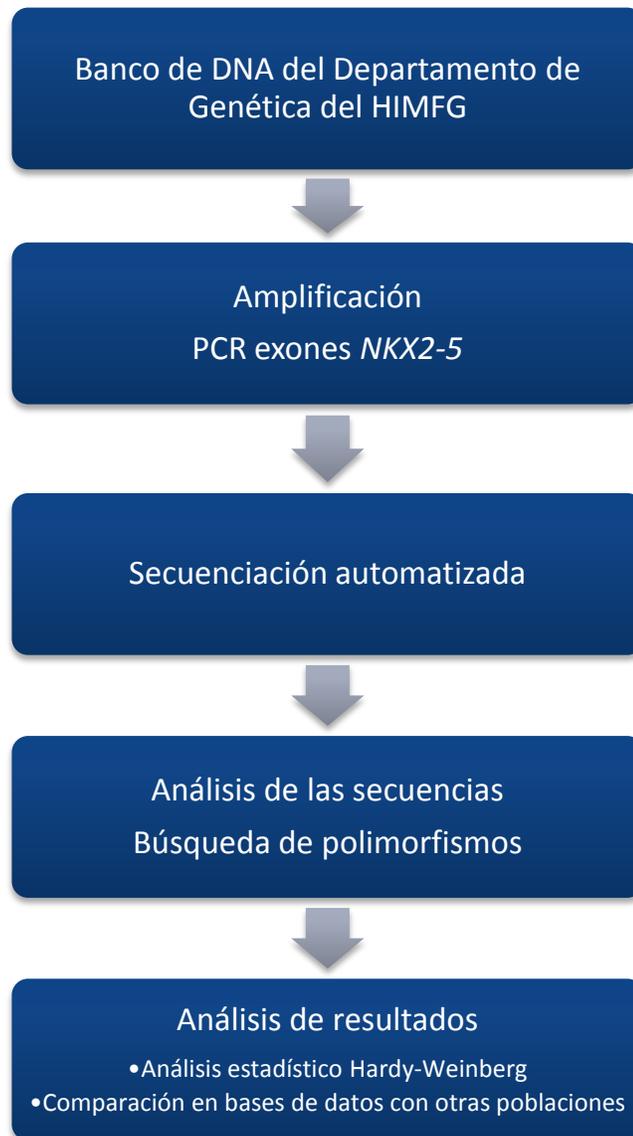


Figura 6.- Diagrama de flujo de la metodología experimental empleada.

6.1.-Características del banco de ADN

ADN con índice de pureza $\lambda_{260/280}$ igual a 1.8 – 2.

El ADN genómico seleccionado de los 51 controles se amplificó mediante PCR, para posteriormente ser secuenciado. Se evaluó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6.1) y por espectrofotometría se cuantificó la concentración y se evaluó la pureza de la muestra extraída.

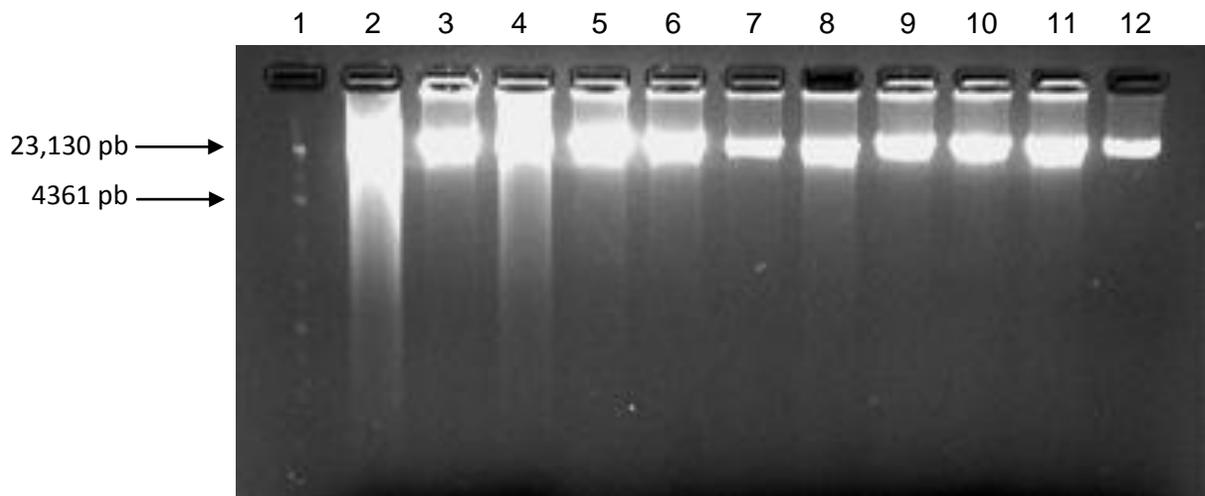


Figura 6.1.- Corrimiento electroforético del ADN genómico en gel de agarosa de algunas muestras empleadas. Gel con una concentración al 1% peso/volumen de agarosa. Las muestras fueron cargadas y se aplicaron 100v por 40 min. Carril 1: Marcador de peso molecular Lambda ADN/HindIII; carriles 2-12: muestras del Banco de ADN, la concentración varía de 1-1.5 μ g por muestra (flecha).Las flechas indican el peso molecular en pares de bases de las bandas del marcador.

6.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El método por PCR, consistió en la amplificación inicial completa de ambos exones del gen *NKX2-5*. Los productos obtenidos fueron usados a su vez como molde para amplificaciones subsecuentes más cortas o anidados dentro de cada exón. Esta estrategia se estableció así, debido a que el sistema de secuenciación disponible solo permite un análisis de fragmentos promedio de 500 pb. En la tabla 6.1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, así como el tamaño del producto y la Temperatura media de fusión (T_m) en grados centígrados requerida.

Tabla 6.1.- Oligonucleótidos empleados en el estudio del gen *NKX2-5*. Se detalla la secuencia de los oligonucleótidos (cebadores), el tamaño del producto final y la temperatura media de fusión. EXT1F y EXT1R corresponden al exón 1 completo y EXT2F, EXT2R para el exón 2.

Exón	Cebador	Secuencia	Tamaño producto(pb)	T_m (°C)		
1	EXT1F	5' TAG GTG ACA CGA AAC TGC TC 3'	800	57		
	EXT1R	5' GCT TCT GAT CCT TTC AAT CC 3'				
	1aF	5' TAG GTG ACA CGA AAC TGC TC 3'	544	57		
	1aR	5' TGT AGG CAC GTG GAT AGA AG 3'				
	1bF	5' ACG CCC TTC TCA GTC AAA 3'				
	1bR	5' CTG GCC CTG AGT TTC TTG 3'				
2	EXT2F	5' ACG AGG ATC CCT TAC CAT TAC 3'	1217	57		
	EXT2R	5' AAG CTG AAA GAA GCA CAC G 3'				
	2aF	5' GTA GGT CAA GCC GCT CTT 3'			470	55
	2aR	5' TAT AAC CGT AGG GAT TGA GG 3'				
	2bF	5' CAG CGT GCT GAA ACT CAC 3'			518	56
	2bR	5' AGA GTC AGG GAG CTG TTG A 3'				
	2cF	5' GCC AAC AAC TTC GTG AAC 3'			549	61
	2cR	5' GGG ATC GTC ATT TCT TAC AGC A 3'				
2dF	5' AGC CTG CTG TCT TAG CTG TC 3'	271	57			
2dR	5' AAG CTG AAA GAA GCA CAC G 3'					

En la Figura 6.2 se muestra la secuencia de referencia del gen *NKX2-5* (ENSG00000183072), en donde se ubica la posición de los oligonucleótidos empleados en el estudio.

TTTTTTTTTGGCCGATGACTATAT **ASSTGACAGCAAAGTGGTC** ATCGCTCCTGTCATCGAGGCCCT
GGCCCAATGGCAGGCTGAGTCCCCCTCCTCTG **GCCTGGTCCC**GCCTCTCCTGCCCTTGTGCTCA
GCGCTACCTGCTGCCCGGACACATCCAGAGCTGGCCGACGGGTGCGCGGGCGGGCGGGCAC
CATGCAGGGAAGCTGCCAGGGGCCGTGGGCAGCGCCGYTTTCTGCCGCCACCTGGCGCTGTGA
GACTGGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCTGCTCT**MACGCC****ACGCCCTTCTCAGTCAA****GMCA**
TCCTAAACCTGGARCAGCAGCAG**YGCAGCCTGGCTGCCCGGAGAGCTCTCTGCCCGCCTGGA**
GGCGACCCTGGCGCCCTCCTCTGCATGCTGGCCGCTTCAAGCCAGAGGCCTACGCTGGGCC
GAGGCGCTGCGCCGGCCCTCCAGAGCTGCGCGCAGAGCTGGGCCGCGCCTTACC**SGCC**
AAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCGCCGCCCCCGCY**TTCTATCCACGTGCCTACA****GCGACCCCGACCC**
AGCCAAGGACCCTAGAGCCGAAAAGAAAGGTGAGGAGGAAACACAGGCCCCCTTCTCCCCTCCT
GGGTGCTTTTCGTCCC **CAAGAAACTCAGGGCCAG** GAGGAGGAGACACGCGCCCTTGGGCCGAGG
GCTGGGCTGCGGCGGGGGTTT CAGAATGTAAGATGCCTGGTGTGTCGCCAGGCTCCC GCGCCC
CGCGTCCAATCGGAGTT CAGAGGAAATGCC **NSATGTAAGGATCACAAAGC** AAGAGACCAAAAAAC
GTTTCCCCCGGCCATAACAAAGCCCCGGGCGGCTTCGGCTCTGCTCCTGGGTCTGGTAGGAAGTT
GAGAAATCGGTTTATGGTAGACAGAACAGAGAGACAAGCAGATAATCTCTGTTTTTAAATCTCCTTTG
GATTTACGAATCTTTTTAAAGATCTGATGAGAACCCTAAACAGAAATTGAAATGTTGCTCACCAGAC
AGCTTTTTCGATAAATCGGAGGAGGGTCCCTGGACCTTCTTTCTGCAGCCACCCACGACCCGGGTT
TCTGGTGCCTTTCTTTCTTTCGCGCCAGGAAAGTGGAGTCTGGGATCGAGGGCCTTGAATTTAAAATG
GGATACTGCGGACCCCTCAGGAATCTGACTTCACTTTATTTTTTTCAGCACAACTTGCCGCGCGGCCA
GGGCGGAGAGGTTCCCTCGTGAAAAGTTAGGAAATGCTGCGCTACCGCGGGCACAAGGGAGTGG
ACGAGATGAGTGCGGGATCATCCCGCAGGCCATCCAGGATCGGGGAGGGAGGCCGGCCCGCT
GCAGAAAGGGGCTTCTGGGAGACCCCCAGCCCAAGGCAGGAGCCCGGGCGATTCCCGGGAGG
CCGCAGGCGCTGGGCGAAGCGCTGGGCGAAGGGCC**S**CTGC**S**AGCCGGGAGAGAATTCATAGGTT
TGTTGAGGAGCAGAGGCCTGGGAACAAATTCGGGCGGGCACGGCGGCTAGA ACTGATCGCTACCA
ATTCGAGGAAGCCAGCAAGGCAGGTTCCGAGGCCGCTGCCACCCGCAGCTTCTTGGACTGCTC
GCAAACCCTGCTGCGGCCAGGCTGGAGCCTCCGATCACCAAACCAACACTCCCTGGCCTTCTGTTT
CTTGATTCCTTAATTTTTGAGATAAGACCGTCCCTAGCAGTGAGGCCTCGGCCTCTGTTCAATTA
ACTCTCAAACCAAACCTAGCCCTAATTCAGTTCACCCAGAGCATCACCTGTTTTATTTTTATTTTTT **W**TT
TTTT**W**TTTT**W**TTTTTTTTTTTTTGCAGCCTGAAATTTTAAAGTCAACCGTCTGTCCCTCACCAGGGT
GTGAACCTGCCCGAGGGCAGAGACCTCCCGTTTTGTTCTCCAGCGCCTTGAGCCAGCCTGACTTTT
TACAAATGCTGAGTGAGACGTGTCGGTGGCTCCAGTGCACTTGGCAGAGTGAGCCGCAGCCAGC
TGGGCGCTCCAGGCAGGACACAGTGGCTCC **ACGAGGATCCCTTACCATTAC** TGTCGGGCCGCGC
TCC **GTAGGTCAAGCCGCTCT** ACCAAGCGTCTCTCTGCCTCTCTGTTCCCCCTCAG **AGCTGTGCGC**
GCTGCAGAAGGCGGTGGAGCTGGAGAAGACAGAGGCGGACAACGCGGAGCGGCCCGGGCGC
GACGGCGGAGGAAGCCGCGCGTGTCTYCTCGCAGGCGCAGGTCTATGAGCTGGAGCGGCGCTT
CAAGCAGCAGCGGTACCTGTCCGGCCCCGAACGCGACCAGCTGGC **CAGCGTGTGAAACTCAG**
TSCACGCAR**GT**CAAGATCTGGTTCAGAACC GGCGCTACAAGTGCAAGCGGCAGCGGCARGACC
AGACTCT**SG**AGCTGGTGGGGCTGCCCCCGCCGCYGCCGCCGCTGCCCGCAGGATCGCGGTGCC
AGTGTGTTGCGCGATGGCAAGCCATGCCTAGGGGACTCGGCGCCCTACGCGCCTGCCTACGGC
GTGG**CCCTCAATCCCTACGGTTATA**AGCCTACCCCGCTATCCGGGTTACGGCGCGCGGCCT
GCAGCCCTGGCTACAGCTGCACTGCCGCTTACCCCGCCGGCCTTCCCGAGCGCAGCCGCCAC
TGCCGCC **GCCAACAACA**ACTTCGTGAAC**TT**CGGCGTCCGGGACTTGAATGCGGTT CAGAGCCCC
GGGATTCGCGAGAGCAACTCGGGAGTGTCCACGCTGCATGGTATCCGAGCCTGGTAGGGAAGGG
ACCCGCGTGGCGGACCCCTGACCGATCCACC **TCAACAGCTCCCTGACTCT**CG**K**GGGGAGAAGG
GGCTCCCAACATGACCCTGAGTCCCTGGATTTTGCATTCACTCCTGCGGAGACCTAGGAACTTTT
TCTGTCCACGCGCGTTTGTCTTTCGCGCACGGGAGAGTTTGTGGCGGCGATTATGCAGCGTGCAA
TGAGTGATCCTGC **AGCCTGGTGTCTTAGCTGTC**CCCCAGGAGTGCCCTCCGAGAGTCCATGGGC
ACCCCGGTTGGA ACTGGGACTGAGCTCGGGCACGCAGGGCCTGAGATCTGGCCGCCATTCCG
CGA**K**CCAGGGCCGGGCGCCCGGGCCTTTGCTATCTCGCCGTCGCCCGCCACGCACCCACCCGT
ATTTATGTTTTTACCTATT**GTCTGTAAGAAATGACGATCCC**CTTCCATTAAAGAGAGTGCGTTGACC
CCGCA **CGTGTGCTTCTTT**CAGCTT**G**CGGCGCTT CAGAAGCAGGAGAGA

Figura 6.2.-. Secuencia de nucleótidos del gen *NKX2-5* tomada de la base de datos de ensambl, (ENSG00000183072). La secuencia de ambos exones esta sombreada en azul y el intrón intermedio sin sombra. Se muestra la ubicación de cada oligonucleótido sombreado con color de acuerdo a lo ilustrado en la Tabla 8.1. También se muestran sombreados en verde, los SNPs reportados en la misma base de datos *Ensembl*.⁶⁷

6.2.1.- Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizó una concentración total de 50 ng de ADN para un volumen final de reacción de 25 μ l. Las concentraciones de los reactivos utilizados se señalan en la Tabla 6.2. Fue necesario ajustar la concentración del cloruro de magnesio ($MgCl_2$) para algunos oligonucleótidos en particular, como se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.2.- Concentración de cada reactivo utilizado para las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración
Buffer	1X
DNTPs	0.2 mM
$MgCl_2$	Variable
Taq polimerasa	1 U
Cebador Forward	3 μ M
Cebador Reverse	3 μ M
Agua	Variable

Tabla 6.3.- Concentraciones de $MgCl_2$ utilizadas para cada reacción de acuerdo a los oligonucleótidos empleados.

Reacción	Concentración de $MgCl_2$
EXT1	2mM
Exón 1a	2mM
Exón 1b	2.5mM
EXT2	2mM
Exón 2a	3.5mM
Exón 2b	2-5mM
Exón 2c	2.5mM
Exón 2d	2.5mM

La PCR se realizó con las siguientes condiciones:

- Desnaturalización inicial 94°C/2min
- Más 35 ciclos
 - desnaturalización de 94°C/30s
 - alineamiento Tm/1min
 - extensión a 72°C/1min
- Extensión final de 72°C por 2 min.

Los productos de cada reacción se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.5%, para verificar si la amplificación fue exitosa y el tamaño esperado del producto.

6.3.- Método de secuenciación

6.3.1.- Purificación de los productos de PCR para secuenciación

Los productos obtenidos de las reacciones de PCR fueron purificados mediante el Kit QIAquick PCT purification marca QIAGEN, como se describe brevemente.

1. A los tubos que contenían las muestras de PCR se colocaron por cada 20 µl se agregaron 100 µl de amortiguador PB. Y se mezclaron cuidadosamente.
2. La mezcla fue pipeteada dentro de una columna QIAquick, colocada en un tubo receptor de desechos. Y se centrifugó por 60 seg. a 13,000 rpm.
3. Se desechó el flujo expulsado de la columna al tubo receptor. Se agregaron 750 µl del amortiguador PE a la columna para lavar la muestra. Se centrifugó por 60 seg. a 13,000 rpm.
4. Se eliminaron los desechos del tubo colector y se centrifugó nuevamente la columna por un minuto adicional.

5. La columna fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Y se agregaron 50 μ l de amortiguador EB para rehidratar el ADN contenido en la membrana de la columna. Se centrifugó por 60 seg. a 13,000 rpm.
6. La muestra fue cuantificada por espectrofotometría y conservada a - 20° hasta su procesamiento.

6.3.2.- Método de reacción de secuenciación por dideoxi

Para la reacción de secuenciación se utilizó el kit BigDye 3.1 de Applied Biosystems. Para una mezcla de reacción de 20 μ l de volumen total se agregaron los siguientes reactivos:

- 8 μ l de BygDye 3.1
- 20 ng totales de muestra de PCR purificado
- 10 pmoles totales de oligonucleótido (sentido o antisentido)
- La mezcla fue ajustada con agua bidestilada estéril para alcanzar el volumen final
- Todo fue mezclado cuidadosamente

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

- Una desnaturalización inicial a 96°C por 5 min
- Más 25 ciclos de:
 - 96° C por 10 seg.
 - Tm°C del oligonucleótido por 5 seg.
 - 60° por 4 min.

6.3.3.- Purificación de la reacción de secuenciación

Los productos obtenidos de la reacción de secuenciación fueron purificados mediante columnas CENTRI-SEP marca Princeton separation. Como se describe a continuación:

Cada columna de purificación fue preparada previamente agregando 800 μ l de agua estéril bidestilada, fue mezclada homogéneamente y se colocó en un tubo receptor de desechos, para centrifugarla a 3,000 rpm por 2 min. Con lo que se eliminó el exceso de agua.

La columna fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 ml nuevo y se procedió a pipetear en la matriz de resina ubicada dentro de la columna la muestra de reacción de secuenciación. Se centrifugó a 3,000 rpm por 2 min. La muestra purificada en el tubo Eppendorf fue deshidratada por 20 min. a temperatura ambiente en un sistema de secado por centrifugación y vacío marca Thermo electron corporation.

6.3.4.- Preparación de la muestra para el secuenciador

La muestra purificada de la reacción de secuenciación fue resuspendida en 20 μ l de formamida grado molecular y puesta en incubación a 96 °C durante 3 min. Inmediatamente a la incubación se puso a enfriar a 4 °C por 5 min. La muestra fue inyectada en el secuenciador automatizado de capilar ABI Prism 310 de Applied Biosystems.

6.3.5.- Análisis de electroferogramas y secuencias

Se revisaron base por base los electroferogramas generados en el sistema de secuenciación para cada una de las muestras, con el fin de detectar posibles errores resultantes de la reacción misma o del equipo. Las secuencias obtenidas fueron alineadas con ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).⁶⁶ Se empleó la secuencia de nucleótidos del gen *NKX2-5* tomada de la base de datos de ensembl (ENSG00000183072). Figura 6.3.

En caso de que alguna de las bases no alineara con la secuencia de referencia produciéndose un hueco o “gap” en el resultado, la base fue revisada con el fin de ver si se trataba de un SNP reportado (Tabla 1.1). De igual forma se buscaba la posición de los polimorfismos reportados y se registraban los alelos correspondientes de cada muestra para su posterior análisis de frecuencias.

```
Optimal alignment of DNA sequences SEC NKX2-5 EXON 1 CONSENSO and SEC NK
Gap_Open_Penalty=10 Gap_Extend_Penalty=5
Upper line: SEC NKX2-5 EXON 1 CONSENSO, from 140 to 510
Lower line: SEC NKX2-5 PRUEBA 1, from 1 to 371
SEC NKX2-5 EXON 1 CONSENSO:SEC NKX2-5 PRUEBA 1 identity= 99%
140  GCCGCCACCTGGCGCTGTGAGACTGGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCTGCTCTCAC
    |||
1   GCCNCCCACCTGGNGCTGTGAGACTGGCGCTGCCACCATGTTCCCCAGCCCTGCTCTCAC
    |||
200  GCCCACGCCCTTCTCAGTCAAAGACATCCTAAACCTGGAACAGCAGCAGCGCAGCCTGGC
    |||
61  GCCCACGCCCTTCTCAGTCAAAGACATCCTAAACCTGGANCAGCAGCAGCGCAGCCTGGC
    |||
260  TGCCCGCGGAGAGCTCTCTGCCCGCCTGGAGGGCAGCCCTGGCGCCCTCCTCCTGCATGCT
    |||
121  TGCCCGCGGAGAGCTCTCTGCCCGCCTGGAGGGCAGCCCTGGCGCCCTCCTCCTGCATGCT
    |||
320  GGCCGCCTTCAAGCCAGAGGCCTACGCTGGGCCCGAGGGGCTGCGCCGGGCTCCAGAG
    |||
181  GGCCGCCTTCAAGCCAGAGGCCTACGCTGGGCCCGAGGGGCTGCGCCGGGCTCCAGAG
    |||
380  GCTGCGCGCAGAGCTGGGCCGCGCCTTACCCGGCCAAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCGC
    |||
241  GCTGCGCGCAGAGCTGGGCCGCGCCTTACCCGGCCAAGTGTGCGTCTGCCTTTCCCGC
    |||
440  CGCCCCCGCCTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCGACCCAGCCAAGGACCCTAGAGC
    |||
301  CGCCCCCGCCTTCTATCCACGTGCCTACAGCGACCCGACCCAGCCAAGGACCCTAGAGC
    |||
500  CGAAAAGAAAAG
    |||
361  CGAAAAGAAAAG
```

Figura 6.3.- Ejemplo de un alineamiento de secuencias. Alineamiento de la secuencia de referencia *NKX2-5* del segmento 1a (exón 1), contra la secuencia obtenida de una de muestra del banco de ADN, realizado con el programa BLAST, el círculo señala una variación en la secuencia o “gap”.⁶⁶

7.- Resultados

7.1.-Resultados de la PCR

Los resultados de la PCR se muestran en las Figuras 7.1.1 - 7.1.6.

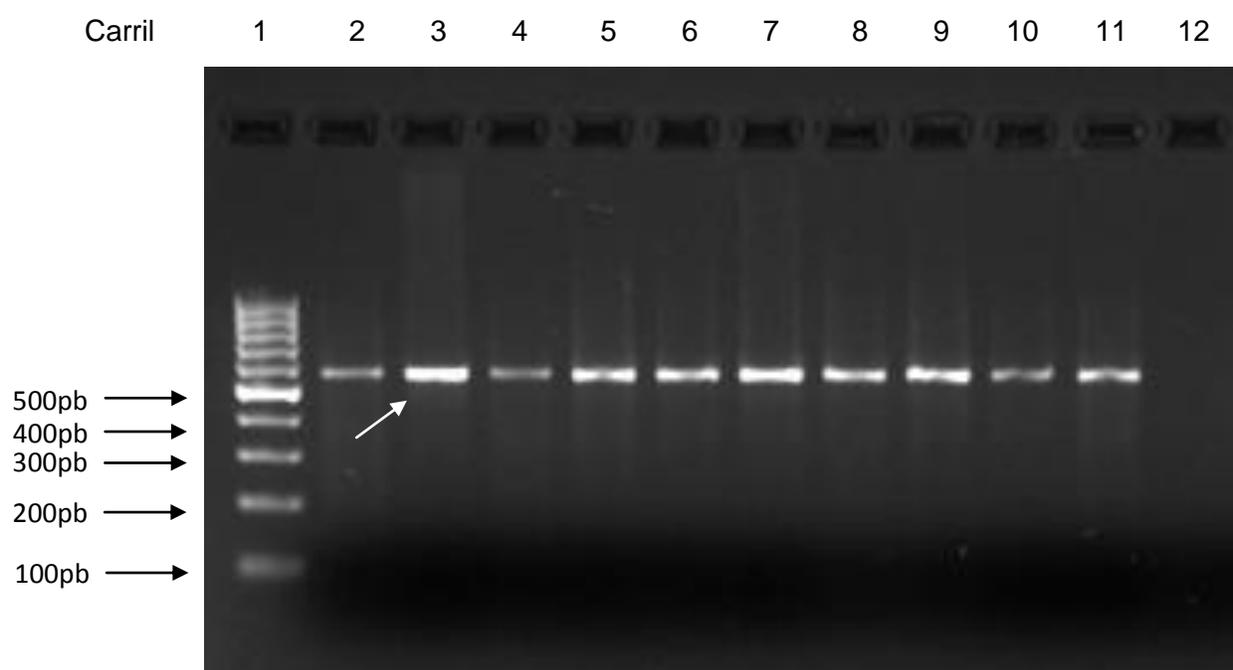


Figura 7.1.1.- Electroforesis en un gel de agarosa al 2% con el producto de PCR (X1A). Realizado con los cebadores 1aF y 1aR, carril 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; las flechas negras señalan el tamaño en pares de bases, carriles 2-11: producto de 10 diferentes muestras, carril: 12 control negativo. El tamaño del fragmento esperado es de 544 pares de bases (flecha blanca).

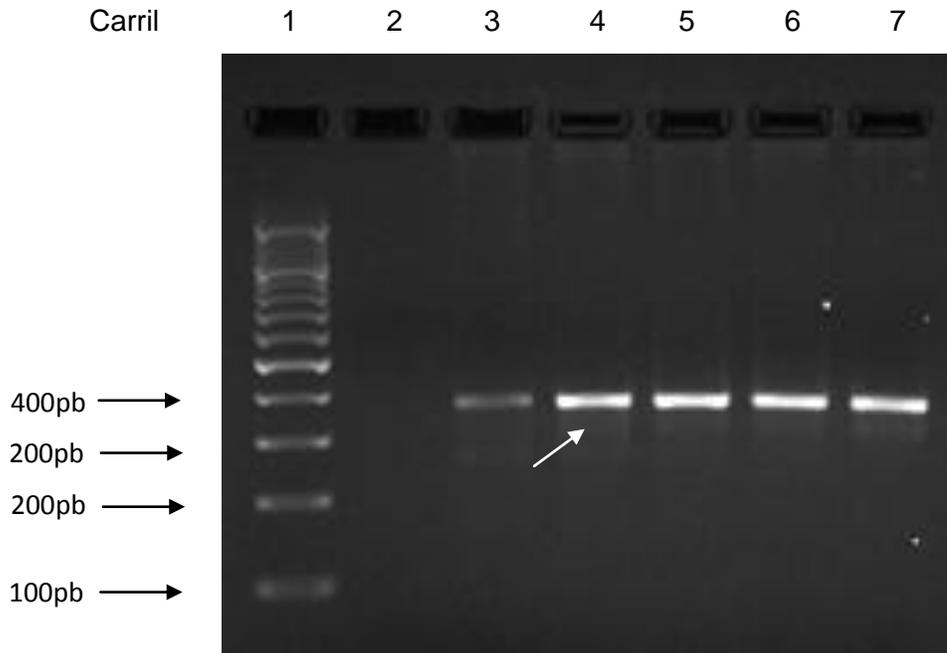


Figura 7.1.2.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el producto de PCR (X1B). Obtenido con los cebadores 1bF y 1bR, carril 1: marcador de peso molecular; carril 2 control negativo *Ladder* 100 pb; carriles 3-7: la banda contiene el producto de 376 pares de bases (flecha blanca).

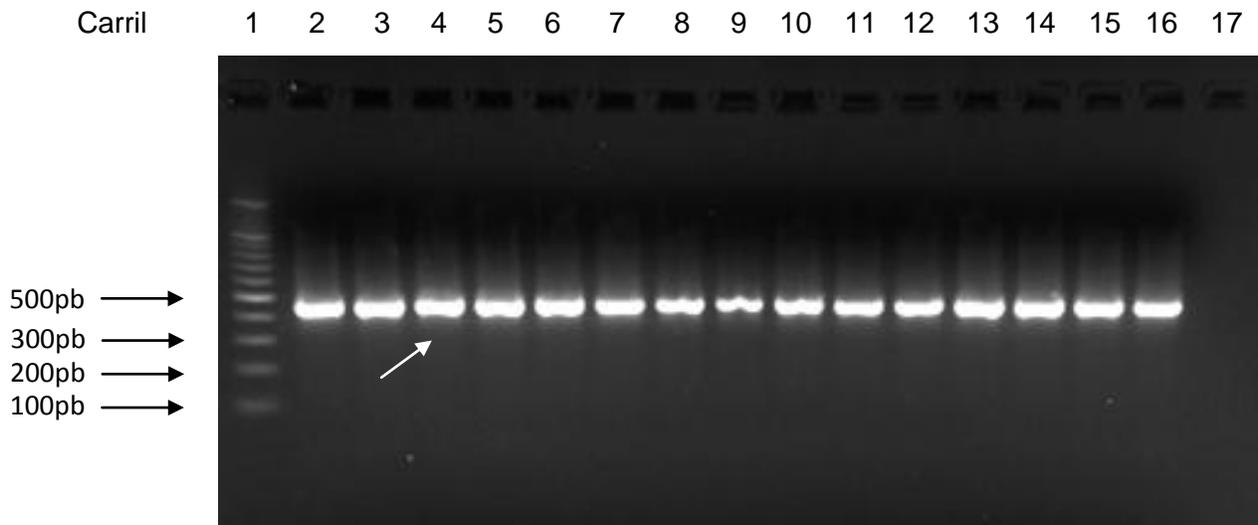


Figura 7.1.3.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% con el producto de PCR (X2A). Carril 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; carriles 2-16: banda con el producto obtenido con los cebadores 2aF y 2aR, tamaño esperado de 470 pares de bases (flecha blanca), carril 17: control negativo. Las flechas negras indican el peso molecular en pares de bases de las bandas del marcador.

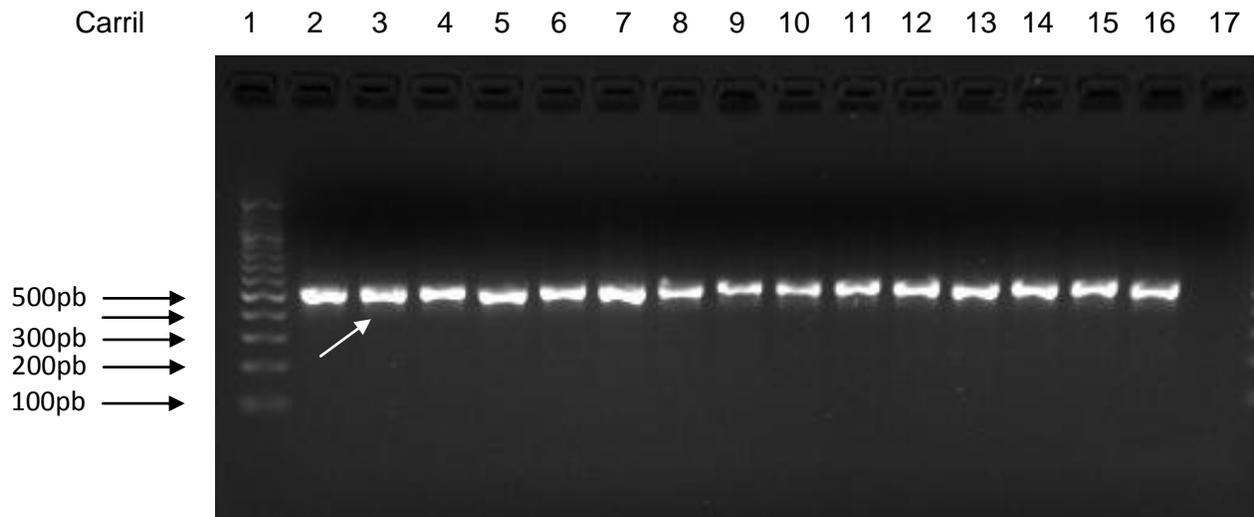


Figura 7.1.4.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el producto de PCR (X2B). Carril 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; carriles 2-16: banda con el producto de los cebadores 2bF y 2bR (flecha blanca) tamaño esperado de 518 pb de 15 muestras analizadas; carril 17: control negativo. Las flechas negras indican el peso molecular en pares de bases de las bandas del marcador.

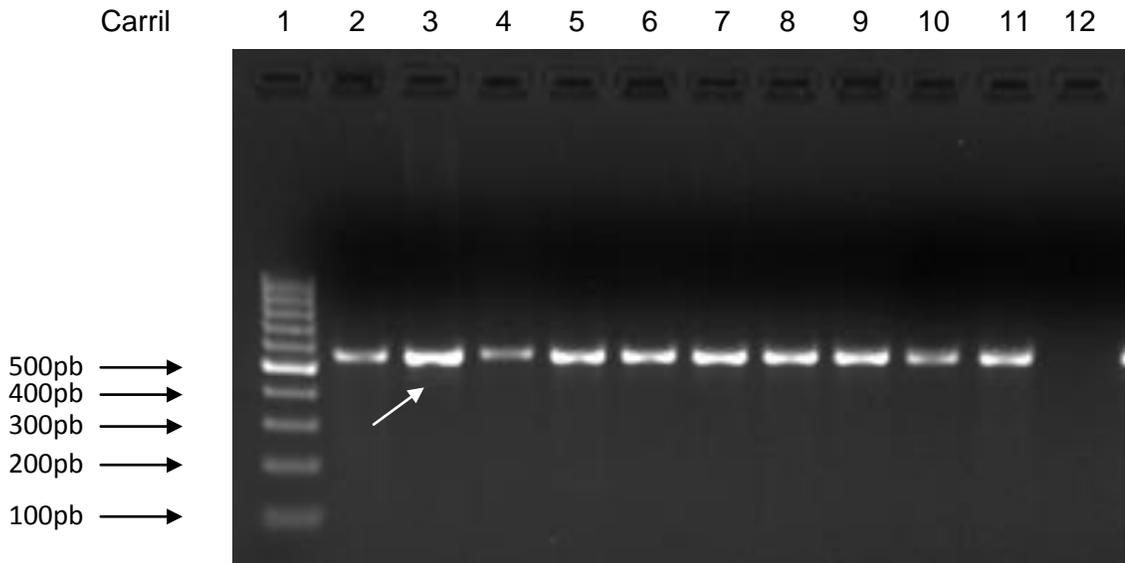


Figura 7.1.5.- Electroforesis en gel de agarosa al 2% con el producto de PCR (X2C). Carril 1: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; carriles 2-11: banda con el producto de los cebadores 2cF y 2cR con un tamaño esperado de 549 pb (flecha blanca); carril 12: control negativo. Las flechas negras indican el peso molecular en pares de bases de las bandas del marcador.

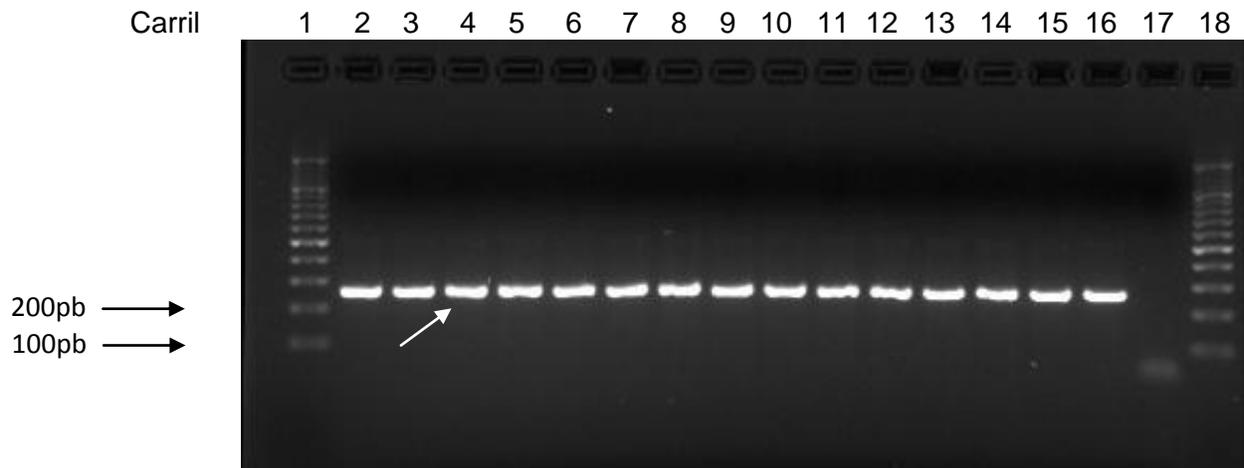


Figura 7.1.6.- Electroforesis en gel de agarosa al 2%, con el producto de PCR (X2D). Carriles 1,18: marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb; carriles 2-16: bandas con el producto de los cebadores 2dF y 2dR con un tamaño esperado de 271 pb (flecha blanca), carril 17: control negativo.

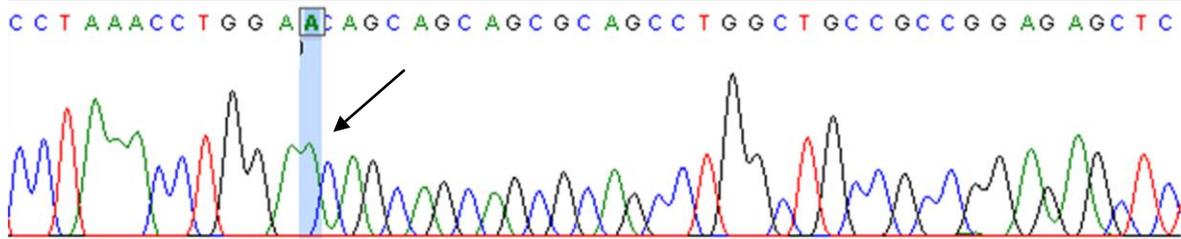
7.2.- Resultados de secuenciación automatizada

Fue posible la secuenciación de *NKX2-5* de las 51 muestras seleccionadas, los resultados se describen a continuación.

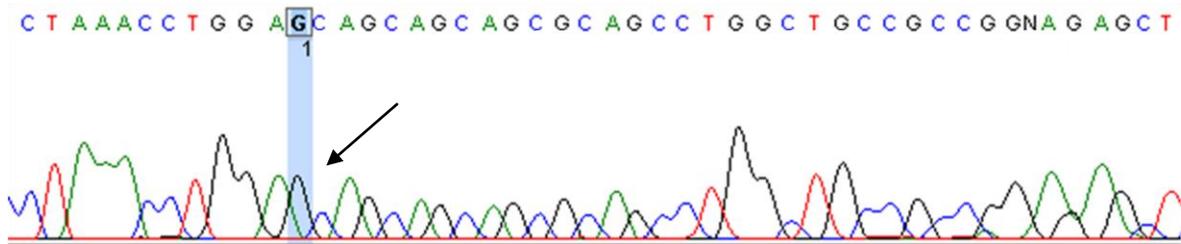
Los dos polimorfismos que se encontraron correspondieron a los SNPs con referencias rs2277923 y rs703752. El concentrado de polimorfismos encontrados en los 51 controles se expone en la Tabla 7.1. Se hace referencia a los 11 polimorfismos reportados en la literatura.

En la Figura 7.2 se muestran tres imágenes que corresponden a un segmento de electroferogramas de 3 diferentes controles, para el polimorfismo rs2277923 (g.5292A>G) el cual consiste en un cambio de guanina por adenina en la posición 292 del RNAm, el codón GAA pasa a GAG en donde el residuo de glutamato no cambia y por lo cual se considera una mutación silente.

Homocigoto A



Homocigoto G



Heterocigoto A/G

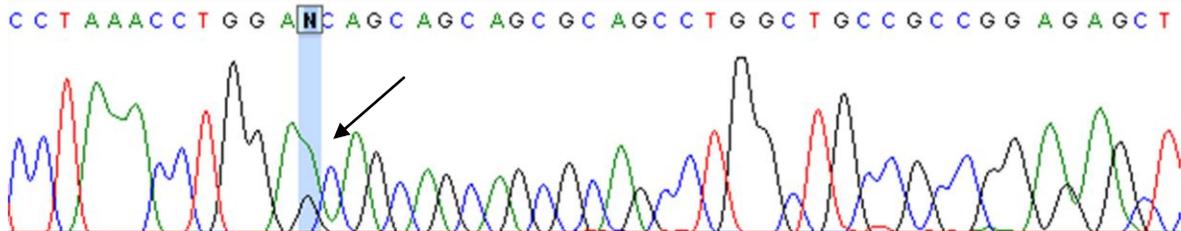


Figura 7.2.- Electroferogramas de un control homocigoto A/A, un control homocigoto G/G y uno heterocigoto A/G para el polimorfismo rs2277923. Las flechas negras señalan la localización del nucleótido la onda verde representa una Adenina mientras que la negra a una guanina. En el caso del heterocigoto se encuentran ambas ondas en dicha posición.

Tabla 7.1.- Parte A. Concentrado de polimorfismos de *NKX2-5* controles 1 al 22. Los datos utilizados sobre los alelos fueron obtenidos de la base de datos dbSNP, se exponen los controles con un número asignado aleatoriamente del 1 al 51, cada columna muestra el genotipo encontrado para cada alelo. Para el polimorfismo rs2277923, en color azul se muestran a los homocigotos A/A, en color rosa los heterocigotos A/G y en verde los homocigotos G/G. De la misma forma para el polimorfismo rs703752 se señalan en verde los homocigotos G/G y en rosa los heterocigotos G/T.

	EXON 1					EXON 2					
	X1A	X1A	X1A	X1A/X1B	X1A/X1B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2C	X2C/X2D
Ref SNP ID:	rs3729937	rs3729934	rs17052019	rs2277923	rs28936670	rs3729938	rs7728764	rs3729753	rs3729754	rs703752	rs11552707
Posición mRNA	134	197	223	239	249	712	770	782	808	1212	1486
Alelos	Y = C/T	M = A/C	M = A/C (C)	R = A/G	Y = C/T (T)	S = C/G (G)	Y = A/G	S = C/G	Y = C/T (T)	K = G/T	K = G/T
Aminoácidos	5' UTR	7 Leu [L]	16 Asp [D]	21 Glu [E]	25 Arg [R]	179 Ser [S]	198 Gln [Q]	202 Leu [L]	211 Pro [P]	3' UTR	3' UTR
Mutación			Ala [A]		Cys [C]	Cys [C]			Leu [L]		
Controles											
1	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
2	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
3	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
4	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
6	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
7	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
8	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
9	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
10	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
11	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
12	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
13	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
14	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
15	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
16	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
17	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
18	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
19	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
20	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
21	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
22	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G

Tabla 7.1.- Parte B. Concentrado de polimorfismos de *NKX2-5* de los controles 23 al 51. (Continuación)

Ref SNP ID:	EXON 1					EXON 2					
	X1A	X1A	X1A	X1A/X1B	X1A/X1B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2A/X2B	X2C	X2C/X2D
	rs3729937	rs3729934	rs17052019	rs2277923	rs28936670	rs3729938	rs7728764	rs3729753	rs3729754	rs703752	rs11552707
23	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
24	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
25	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
26	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
27	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
28	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
29	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
30	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
31	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
32	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
33	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
34	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
35	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
36	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
37	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
38	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
39	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
40	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
41	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
42	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
43	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
44	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
45	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
46	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
47	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G
48	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
49	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
50	C/C	C/C	A/A	A/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/T	G/G
51	C/C	C/C	A/A	G/G	C/C	C/C	G/G	G/G	C/C	G/G	G/G

Se contabilizaron los genotipos de los polimorfismos encontrados, los cuales se exponen en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2.- Genotipos de los polimorfismos encontrados

Polimorfismo	rs2277923	rs703752
	A/A = 4	T/T = 0
	A/G = 28	G/T = 17
	G/G = 19	G/G = 34
Total	51	51
Total de alelos	102	102

El número asignado corresponde al secuencial de los 11 polimorfismos reportados en la base de datos dbSNP, en total 51 controles, 102 alelos. A: adenina, G: guanina, T: timina.

8.- Análisis de resultados

8.1.- Frecuencias del polimorfismo g.5292A>G, (rs2277923)

Para calcular la frecuencia genotípica del polimorfismo rs2277923 sumamos la cantidad de individuos que poseen cada genotipo y lo dividimos por el número total de individuos, en este caso 51, por lo tanto la frecuencia de cada genotipo es:

$$A/A = 4 \quad f = 4/51 = 0.078$$

$$A/G = 28 \quad f = 28/51 = 0.549$$

$$G/G = 19 \quad f = 19/51 = 0.373$$

En la Figura 8.1 se grafica la proporción obtenida para cada genotipo.

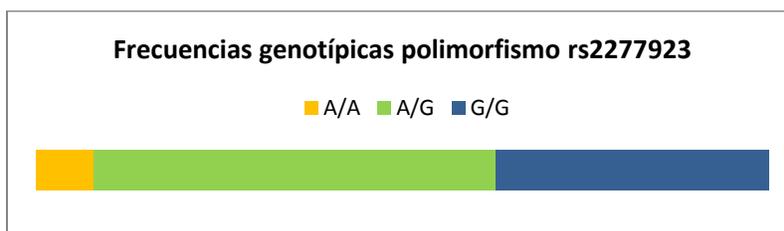


Figura 8.1.- Representación gráfica de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs2277923.

La suma de todas las frecuencias genotípicas siempre es igual a 1:

Para calcular la frecuencia alélica a partir de los números de genotipos, contamos el número de copias de un alelo particular y dividimos por el número total de todos los alelos en la muestra, en este caso p representa al alelo A y q al alelo G:

$$p = f(A) = \frac{2n_{AA} + n_{AG}}{2N} = \frac{2(4) + 28}{2(51)} = 0.352$$

$$q = f(G) = \frac{2n_{GG} + n_{AG}}{2N} = \frac{2(19) + 28}{2(51)} = 0.647$$

En la siguiente tabla 8.1 se muestra el porcentaje de genotipos y la frecuencia de los alelos:

Tabla 8.1 Porcentaje de genotipos y frecuencia de alelos del SNP rs2277923.

Genotipo	Observado (n)	alelos	%	Frecuencia alélica o del SNP rs2277923
A/A	4	A=8	7.8	A=0.3529
A/G	28	A=28 G=28	54.9	G=0.6471
G/G	19	38	37.3	
Total	51	102		

La suma de las frecuencias alélicas siempre es igual a 1:

$$p + q = 1$$

La suma de p y q representan el 100% de los alelos del gen en la población:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

La probabilidad de que un individuo sea homocigoto para el alelo p es $p \times p = p^2$, la probabilidad de que los gametos lleven alelos diferentes es $(p \times q) + (p \times q) = 2pq$, y la probabilidad de que se obtenga un individuo homocigoto q , es $q \times q = q^2$.

Las frecuencias esperadas de los genotipos en equilibrio de Hardy-Weinberg entonces se calculan mediante el empleo de p^2 , $2pq$ y q^2 :

$$p^2 = (0.352)^2 = 0.1239$$

$$2pq = 2 (0.352)(0.647) = 0.4554$$

$$q^2 = (0.647)^2 = 0.4186$$

Al multiplicar cada una de estas frecuencias genotípicas esperadas por el número total de genotipos observados en la muestra obtenemos los valores esperados para cada genotipo:

$$P^2 = 0.1239 \times 51 = 6.318$$

$$2pq = 0.4554 \times 51 = 23.22$$

$$q^2 = 0.4186 \times 51 = 21.34$$

Se utiliza una prueba de la bondad del ajuste de X^2 para determinar si las diferencias entre los valores observados y esperados de cada genotipo se deben al azar:

$$X^2 = \sum \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}}$$

Observados	Esperados
A/A: 4	6.318
A/G: 28	23.22
G/G: 19	21.34

$$X^2 = \frac{(4 - 6.318)^2}{6.318} + \frac{(28 - 23.22)^2}{23.22} + \frac{(19 - 21.34)^2}{21.34}$$

$$X^2 = 0.850 + 0.983 + 0.256 = 2.089$$

El valor de la prueba de la X^2 calculado es de 2.089, para obtener la probabilidad asociada con este valor de la prueba de la X^2 determinamos los grados de libertad adecuados.

En general los grados de libertad para una prueba de la X^2 del equilibrio de Hardy-Weinberg igualan el número de clases genotípicas esperadas menos el número de alelos asociados. En el caso de esta prueba de Hardy-Weinberg particular los grados de libertad son $3 - 2 = 1$.

Al buscarse en una tabla de X^2 , el valor de X^2 de 2.089 con 1 grado de libertad. El valor de X^2 de 2.089 tiene una p cercana a 0.15, (Anexo 1) lo que nos habla de la probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el X cuadrado tabulado, por lo que es probable que los genotipos observados se encuentren en proporciones de Hardy-Weinberg.

8.2.- Frecuencias del polimorfismo g.3404G>T, (rs703752)

Para el caso del polimorfismo **rs703752** el cálculo de la frecuencia genotípica al sumar la cantidad de individuos que poseen el genotipo y dividirla por el número total de individuos, la frecuencia de cada genotipo es:

$$T/T = 0 \quad f = 0/51 = 0$$

$$G/T = 17 \quad f = 17/51 = 0.333$$

$$G/G = 34 \quad f = 34/51 = 0.666$$

Los porcentajes se representan en la gráfica de la Figura 8.2.

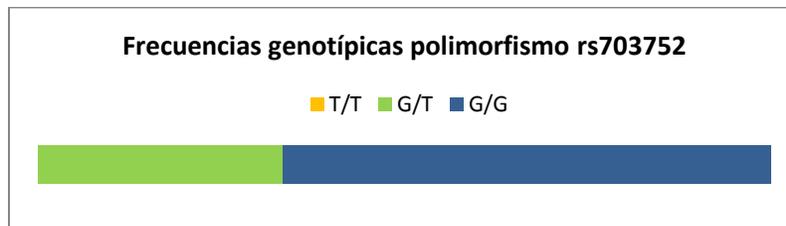


Figura 8.2.- Representación gráfica de las frecuencias genotípicas del polimorfismo rs703752.

En el cálculo de la frecuencia alélica a partir de los números de genotipos, contando el número de copias de cada alelo y dividiéndolo entre 102 que corresponde al número total de alelos estudiados el resultado fue el siguiente, tomando en cuenta la letra p corresponde al alelo T y q al alelo G:

$$p = f(T) = \frac{2n_{TT} + n_{TG}}{2N} = \frac{2(0) + 17}{2(51)} = 0.167$$

$$q = f(G) = \frac{2n_{GG} + n_{TG}}{2N} = \frac{2(34) + 17}{2(51)} = 0.833$$

En la tabla 8.2 se muestra el porcentaje de genotipos y la frecuencia de sus alelos para el SNP rs703752.

Tabla 8.2.-Frecuencias genotípicas y alélicas del SNP rs703752:

Genotipos	Observado (n)/ %	No. alelos	Frecuencia alélicas para SNP rs703752:
T/T	0/0	T=0	T=0.167
G/T	17/33.3	G=17 T=17	G=0.833
G/G	34/66.7	G=68	
Total	51/100	102	

Las frecuencias esperadas de los genotipos en equilibrio de Hardy-Weinberg calculadas mediante el empleo de p^2 , $2pq$ y q^2 fueron las siguientes:

$$p^2 = (0.167)^2 = 0.0279$$

$$2pq = 2 (0.167)(0.833) = 0.2782$$

$$q^2 = (0.833)^2 = 0.6939$$

Y los valores esperados para cada genotipo fueron:

$$0.0279 \times 51 = 1.422$$

$$0.2782 \times 51 = 14.188$$

$$0.6939 \times 51 = 35.389$$

En cuanto a la prueba de bondad del ajuste de X^2 :

$$X^2 = \sum \frac{(\text{observado} - \text{esperado})^2}{\text{esperado}}$$

Observados	Esperados
T/T: 0	1.422
G/T: 17	14.188
G/G: 34	35.389

$$X^2 = \frac{(0 - 1.402)^2}{1.402} + \frac{(17 - 14.188)^2}{14.188} + \frac{(34 - 35.389)^2}{35.389}$$

$$X^2 = 1.402 + 0.5573 + 0.0545 = 2.013$$

El valor de la prueba de la X^2 calculada fue de 2.013.

Al buscarse en una tabla de X^2 , el valor de X^2 de 2.013 con 1 grado de libertad. El valor de X^2 de 2.013 tiene una p cercana a 0.15, (Anexo 1) no significativa, esto es que la diferencia se debe al azar y la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg.

9.- Discusión

El presente trabajo es el primero en estudiar los polimorfismos del gen *NKX2-5* en la población mestiza mexicana. Éste gen codifica para un factor de transcripción, cuyas funciones principales son la regulación de la cardiogénesis y el mantenimiento de la homeostasis en los cardiomiocitos²⁸⁻³⁰. En pacientes con diversas cardiopatías se han reportado mutaciones en *NKX2-5*.⁶

Este trabajo es parte del protocolo denominado “Caracterización de mutaciones en el Gen *NKX2-5* en pacientes con tetralogía de Fallot o síndrome de heterotaxia visceral” del HIMFG. El conocimiento de los polimorfismos del gen *NKX2-5* en individuos sanos es necesario para poder establecer si existe asociación entre ellos y la presencia de cardiopatías.

Las muestras controles utilizadas pertenecen al banco de DNA del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se tomó la decisión de realizar el trabajo con estas muestras con el argumento de que corresponden a una muestra representativa de la población mestiza mexicana de la zona centro del país, de individuos aparentemente sanos, mexicanos en tres generaciones, sin antecedentes familiares de importancia.

Para un adecuado estudio de frecuencias alélicas es necesario analizar al menos 100 alelos de una muestra representativa de la población blanco. En este caso basamos el estudio en 51 muestras de DNA que corresponden a individuos pertenecientes a la zona centro del país, aparentemente sanos, sin antecedentes familiares de cardiopatías congénitas y con nacionalidad mexicana en al menos tres generaciones.

Al momento del análisis solo habían sido reportados 11 polimorfismos de un solo nucleótido que caen en regiones exónicas del gen *NKX2-5*.⁶⁷ Nosotros encontramos únicamente dos de ellos, referidos en dbSNPs como rs2277923 y rs703752 (Tabla 9.1).

Tabla 9.1.- Frecuencias genotípicas de los polimorfismos encontrados

SNP	Alelo	Frecuencia
rs2277923	A	0.3529
	G	0.6471
rs703752	T	0.3333
	G	0.6667

Por otra parte, no se encontraron otros SNP en ninguna muestra estudiada, lo que sugiere que su frecuencia puede estar por debajo del 1% en la población mestiza mexicana.

Se calcularon las frecuencias alélicas y genotípicas para los dos polimorfismos encontrados y se analizaron las frecuencias esperadas a través del equilibrio de Hardy-Weinberg. Los resultados fueron examinados con la prueba de X^2 de Pearson, utilizando las frecuencias genotípicas esperadas obtenidas mediante la ecuación de HW, como un método para comprobar que la diferencia entre los resultados obtenidos y los esperados fue causada por el azar. Los resultados de estas pruebas nos permiten afirmar que ambos polimorfismos se encuentran en equilibrio poblacional de HW.

El análisis de los cambios en la secuencia y estructura de una proteína es útil para predecir los efectos funcionales de las variantes alélicas.⁶⁸ El hecho de que las variantes se encuentren presentes en más del uno por ciento de la población en general y que no estén relacionadas con enfermedad, nos demuestra que estos cambios o polimorfismos cuentan con cierta estabilidad a nivel de la población y la función de la proteína se conserva.

Con los resultados obtenidos es posible determinar si los cambios en la secuencia de nucleótidos del gen *NKX2-5* encontrados en pacientes portadores de tetralogía de Fallot y/o síndrome de heterotaxia visceral, son los responsables del desarrollo de la enfermedad.

Esta tesis se centra en la genética de poblaciones, que es el estudio de la distribución de los genes en las poblaciones y de la manera en que se comportan las frecuencias genotípicas y alélicas. La genética de poblaciones se ocupa de los factores genéticos, como la mutación y la reproducción, y de los factores ambientales y sociales, como la selección y la migración, que conjuntamente determinan la frecuencia y distribución de las enfermedades genéticas en las familias y en la comunidad.

Después de analizar los resultados obtenidos de las frecuencias alélicas y genotípicas, se compararon con los datos informados en la base de datos sbSNP que concentra para cada SNP, resultados de varios estudios realizados en otras poblaciones (Tablas 9.2 y 9.3).

Tabla 9.2A.- Frecuencias alélicas y genotípicas en diferentes estudios realizados en diversas poblaciones para el polimorfismo rs2277923. Adaptada de la base de datos dbSNP.⁶⁹

Diversidad de población									
ss#	Determinación de la muestra			Detalle de genotipos				Alelos	
	Población	Grupo individual	No. de crom.	A/A	A/G	G/G	HWP	A	G
ss10255267	HapMap-CEU	Europeo	116	0.448	0.517	0.034		0.707	0.293
	HapMap-HCB	Asiático	90	0.200	0.467	0.333		0.433	0.567
	HapMap-JPT	Asiático	88	0.114	0.386	0.500		0.307	0.693
	HapMap-YRI	Sub-Saharan Africano	118	0.068	0.305	0.627		0.220	0.780
ss105110117	PA156094507		50					0.800	0.200
ss120635898	pilot.1.CEU		72					0.722	0.278
	pilot.1.CHB+JPT		88					0.466	0.534
	pilot.1.YRI		50					0.240	0.760
ss143629097	ENSEMBL_Watson		2			1.000			1.000
ss23955966	AFD_EUR_PANEL	Europeo	46	0.435	0.478	0.087	0.752	0.674	0.326
	AFD_AFR_PANEL	Afro-Americano	44	0.045	0.500	0.455	0.371	0.295	0.705
	AFD_CHN_PANEL	Asiático	48	0.125	0.500	0.375	0.752	0.375	0.625
ss3214940	JBIC-allele		1496					0.332	0.668

Tabla 9.2B.- Frecuencias genotípicas encontradas en población mestiza mexicana para el polimorfismo rs2277923

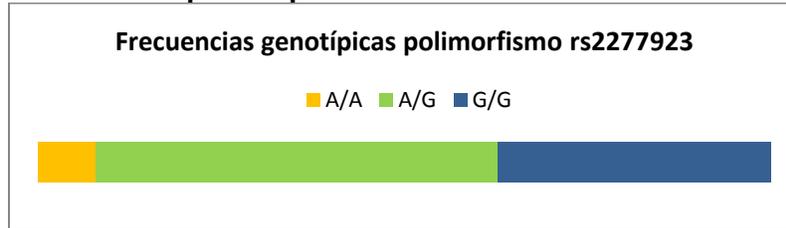
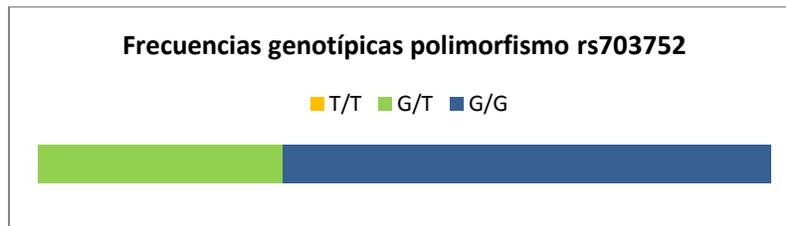


Tabla 9.3A.- Frecuencias alélicas y genotípicas en diferentes estudios realizados en diversas poblaciones para el polimorfismo rs703752. Modificada de la base de datos dbSNP.⁶⁹

Diversidad de población									
Determinación de la muestra				Detalle de genotipos				Alelos	
ss#	Población	Grupo individual	No. de crom.	T/T	T/G	G/G	HWP	T	G
ss105110122	PA156051089		46					0.217	0.783
ss120635895	pilot.1.CEU		72					0.347	0.653
	pilot.1.CHB+JPT		88					0.057	0.943
	pilot.1.YRI		50					0.240	0.760
ss1317085	HapMap-CEU	Europeo	116	0.086	0.466	0.448	0.752	0.319	0.681
	HapMap-HCB	Asiático	90		0.133	0.867	0.655	0.067	0.933
	HapMap-JPT	Asiático	88	0.023	0.159	0.818	0.294	0.102	0.898
	HapMap-YRI	Sub-Saharan Africano	118	0.051	0.322	0.627	1.000	0.212	0.788
ss143044837	ENSEMBL_Venter		2		1.000			0.500	0.500
ss3177219	MITOGPOP6	múltiple	30	0.400	0.067	0.533	0.001	0.433	0.567
ss68959410	HapMap-CEU	Europeo	120		1.000			0.500	0.500
	HapMap-HCB	Asiático	90		1.000			0.500	0.500
	HapMap-JPT	Asiático	90		1.000			0.500	0.500
	HapMap-YRI	Sub-Saharan Africano	120		1.000			0.500	0.500
ss98788566	J. Craig Venter		2		1.000			0.500	0.500

Tabla 9.2B.- Frecuencias genotípicas encontradas en población mestiza mexicana para el polimorfismo rs2277923



Polimorfismo rs2277923, la frecuencia de genotipos obtenida en población mestiza mexicana es muy similar a la reportada en los estudios HapMap-JPT y AFD_CHIN_PANEL ambos en población asiática.

Y las frecuencias de genotipos difieren de AFD_EUR_PANEL y HapMap-CEU ambos estudios de población europea.

Para el caso del polimorfismo rs703752 la frecuencia de genotipos obtenida en población mestiza mexicana es muy similar a la reportada en el estudio del HapMap-JPT en población asiática y al estudio HapMap-YRI en población africana subsahariana. Las frecuencias difieren de HapMap-CEU, HapMap-HCB de poblaciones europeas, HapMap-JPT de población asiática. Y del HapMap-YRI en población africana.

El hecho de conocer la frecuencia y patrones de distribución subyacentes de la asociación entre los SNPs no vinculados a la enfermedad en *NKX2-5* es esencial para la interpretación de los patrones de dichas variantes en los casos de enfermedades producidas por *NKX2-5*. Un ejemplo de lo anterior es el análisis de la cardiopatía tipo Conexión Anómala Total de Venas Pulmonares, en donde se han descrito mutaciones de *NKX2-5* de sentido equivocado en un grupo de pacientes mexicanos,⁷⁰ es necesario saber si la presencia de estas variantes están relacionadas con las cardiopatías, o si se presentan con las mismas frecuencias que se presentaron en los controles estudiados en esta investigación.

10.- Conclusiones

Se secuenció el gen *NKX2-5* de un total de 51 muestras de controles del banco de ADN del Departamento de Genética del Hospital Infantil de México Federico Gómez. La muestra es representativa de población mestiza mexicana de la zona centro del país.

Se puso énfasis en analizar los polimorfismos ya reportados que sumaban un total de 11, de los cuales únicamente se encontraron 2, lo que sugiere que los otros polimorfismos reportados de *NKX2-5* deben estar en frecuencias muy bajas en la población mestiza mexicana, y puede compararse (a pesar de las diferencias en cuanto al tamaño de la muestra) con otras poblaciones (ver Tablas 9.2 y 9.3 A y B).

Los datos anteriores además de ser el primer estudio de polimorfismos en población mexicana del gen *NKX2-5*, pueden ser utilizados como controles de referencia para el protocolo realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez que lleva por título "Caracterización de mutaciones en el Gen *NKX2-5* en pacientes con tetralogía de fallot o síndrome de heterotaxia visceral", el cual se realizó en pacientes mexicanos. por lo cual los resultados obtenidos servirán como referencia para análisis de asociación de variantes de *NKX2-5* y enfermedades cardíacas congénitas en la población mexicana.

Los dos polimorfismos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

11.- Bibliografía

1. Pierpont, M.E., *et al.* Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* **115**, 3015-3038 (2007).
2. Sutherland, M.J. & Ware, S.M. Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **151C**, 307-317 (2009).
3. Watanabe, Y., *et al.* Two novel frameshift mutations in NKX2.5 result in novel features including visceral inversus and sinus venosus type ASD. *J Med Genet* **39**, 807-811 (2002).
4. Akcaboy, M.I., *et al.* The effect of p.Arg25Cys alteration in NKX2-5 on conotruncal heart anomalies: mutation or polymorphism? *Pediatr Cardiol* **29**, 126-129 (2008).
5. Turbay, D., Wechsler, S.B., Blanchard, K.M. & Izumo, S. Molecular cloning, chromosomal mapping, and characterization of the human cardiac-specific homeobox gene hCsx. *Mol Med* **2**, 86-96 (1996).
6. Akazawa, H. & Komuro, I. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther* **107**, 252-268 (2005).
7. Draus, J.M., Jr., *et al.* Investigation of somatic NKX2-5 mutations in congenital heart disease. *J Med Genet* **46**, 115-122 (2009).
8. Li, T., *et al.* Carboxyl terminus of Nkx2.5 impairs its interaction with p300. *J Mol Biol* **370**, 976-992 (2007).
9. Monzen, K., *et al.* Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 493-500 (2002).
10. Keren-Politansky, A., Keren, A. & Bengal, E. Neural ectoderm-secreted FGF initiates the expression of Nkx2.5 in cardiac progenitors via a p38 MAPK/CREB pathway. *Dev Biol* **335**, 374-384 (2009).
11. Targoff, K.L., Schell, T. & Yelon, D. Nkx genes regulate heart tube extension and exert differential effects on ventricular and atrial cell number. *Dev Biol* **322**, 314-321 (2008).
12. Boldt, L.H., *et al.* Mutational analysis of the PITX2 and NKX2-5 genes in patients with idiopathic atrial fibrillation. *Int J Cardiol* (2009).
13. Meysen, S., *et al.* Nkx2.5 cell-autonomous gene function is required for the postnatal formation of the peripheral ventricular conduction system. *Dev Biol* **303**, 740-753 (2007).
14. Riazi, A.M., *et al.* NKX2-5 regulates the expression of beta-catenin and GATA4 in ventricular myocytes. *PLoS One* **4**, e5698 (2009).
15. Ma, Q., Zhou, B. & Pu, W.T. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol* **323**, 98-104 (2008).
16. De Luca, A., *et al.* Familial transposition of the great arteries caused by multiple mutations in laterality genes. *Heart* **96**, 673-677 (2010).
17. Gioli-Pereira, L., *et al.* NKX2.5 mutations in patients with non-syndromic congenital heart disease. *Int J Cardiol* **138**, 261-265 (2010).
18. Nakashima, Y., *et al.* The search for Nkx2-5-regulated genes using purified embryonic stem cell-derived cardiomyocytes with Nkx2-5 gene targeting. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 821-826 (2009).
19. Dupays, L., *et al.* Dysregulation of connexins and inactivation of NFATc1 in the cardiovascular system of Nkx2-5 null mutants. *J Mol Cell Cardiol* **38**, 787-798 (2005).

20. Wang, Y., *et al.* Transcription factors Csx/Nkx2.5 and GATA4 distinctly regulate expression of Ca²⁺ channels in neonatal rat heart. *J Mol Cell Cardiol* **42**, 1045-1053 (2007).
21. Johnson, A.D. Single-nucleotide polymorphism bioinformatics: a comprehensive review of resources. *Circ Cardiovasc Genet* **2**, 530-536 (2009).
22. Brookes, A.J. The essence of SNPs. *Gene* **234**, 177-186 (1999).
23. The use of racial, ethnic, and ancestral categories in human genetics research. *Am J Hum Genet* **77**, 519-532 (2005).
24. Varela, M.A. & Amos, W. Heterogeneous distribution of SNPs in the human genome: microsatellites as predictors of nucleotide diversity and divergence. *Genomics* **95**, 151-159 (2010).
25. Kurova, V.S., *et al.* Structural and catalytic polymorphism of human enzymes: Novel potential platforms for biomedical diagnostics. *Biotechnol Adv* **27**, 945-959 (2009).
26. Frazer, K.A., Murray, S.S., Schork, N.J. & Topol, E.J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* **10**, 241-251 (2009).
27. Gorlov, I.P., Gorlova, O.Y. & Amos, C.I. Relative effects of mutability and selection on single nucleotide polymorphisms in transcribed regions of the human genome. *BMC Genomics* **9**, 292 (2008).
28. Payseur, B.A. & Cutter, A.D. Integrating patterns of polymorphism at SNPs and STRs. *Trends Genet* **22**, 424-429 (2006).
29. Hodgkinson, A. & Eyre-Walker, A. Human triallelic sites: evidence for a new mutational mechanism? *Genetics* **184**, 233-241 (2010).
30. Vela-Ojeda, J., *et al.* Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using reduced intensity versus myeloablative conditioning regimens for the treatment of leukemia. *Stem Cells Dev* **13**, 571-579 (2004).
31. Elliott, D.A., *et al.* Cardiac homeobox gene NKX2-5 mutations and congenital heart disease: associations with atrial septal defect and hypoplastic left heart syndrome. *J Am Coll Cardiol* **41**, 2072-2076 (2003).
32. Majumdar, R., Yagubyan, M., Sarkar, G., Bolander, M.E. & Sundt, T.M., 3rd. Bicuspid aortic valve and ascending aortic aneurysm are not associated with germline or somatic homeobox NKX2-5 gene polymorphism in 19 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* **131**, 1301-1305 (2006).
33. Leong, F.T., Freeman, L.J. & Keavney, B.D. Fresh fields and pathways new: recent genetic insights into cardiac malformation. *Heart* **95**, 442-447 (2009).
34. Goldmuntz, E., Geiger, E. & Benson, D.W. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation* **104**, 2565-2568 (2001).
35. McElhinney, D.B., Geiger, E., Blinder, J., Benson, D.W. & Goldmuntz, E. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* **42**, 1650-1655 (2003).
36. Elliott, G.C., *et al.* Genetics of patent foramen ovale-NKX2-5 and beyond. *Clin Neurol Neurosurg* (2010).
37. Belvis, R., *et al.* Mutations in the NKX2-5 gene in patients with stroke and patent foramen ovale. *Clin Neurol Neurosurg* **111**, 574-578 (2009).
38. . Online Mendelian Inheritance in Man, O.T.M.-N.I.o.G.M., Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), Julio 2010. URL: & <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.

39. Icardo, J.M., Garcia Rincon, J.M. & Ros, M.A. [Congenital heart disease, heterotaxia and laterality]. *Rev Esp Cardiol* **55**, 962-974 (2002).
40. Bruneau, B.G. The developmental genetics of congenital heart disease. *Nature* **451**, 943-948 (2008).
41. Niessen, K. & Karsan, A. Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* **293**, C1-11 (2007).
42. Lage, K., *et al.* Dissecting spatio-temporal protein networks driving human heart development and related disorders. *Mol Syst Biol* **6**, 381 (2010).
43. Zhang, W.M., *et al.* GATA4 and NKX2.5 gene analysis in Chinese Uygur patients with congenital heart disease. *Chin Med J (Engl)* **122**, 416-419 (2009).
44. Dirección General de Información en Salud (DGIS). Base de datos de defunciones 1979-2007. [en línea]: Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). [México]: Secretaría de Salud. <<http://www.sinais.salud.gob.mx>> [Consulta: 4 julio 2010].
45. Ransom, J. & Srivastava, D. The genetics of cardiac birth defects. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 132-139 (2007).
46. Moore, K.L. & Persaud, T.V.N. *The developing human : clinically oriented embryology*, (Saunders, Philadelphia, 1998).
47. Sadler, T.W. & Langman, J. *Langman's medical embryology*, (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2006).
48. Carlson, B.M. *Human embryology and developmental biology*, (Mosby, St. Louis, Mo., 2004).
49. Carlson, B.M. *Human embryology and developmental biology*, (Mosby/Elsevier, Philadelphia, PA, 2009).
50. Peeters, H. & Devriendt, K. Human laterality disorders. *Eur J Med Genet* **49**, 349-362 (2006).
51. Cohen, M.S., *et al.* Controversies, genetics, diagnostic assessment, and outcomes relating to the heterotaxy syndrome. *Cardiol Young* **17 Suppl 2**, 29-43 (2007).
52. Lin, A.E., Ticho, B.S., Houde, K., Westgate, M.N. & Holmes, L.B. Heterotaxy: associated conditions and hospital-based prevalence in newborns. *Genet Med* **2**, 157-172 (2000).
53. Kuehl, K.S. & Loffredo, C. Risk factors for heart disease associated with abnormal sidedness. *Teratology* **66**, 242-248 (2002).
54. Hwang, M.S., Su, W.J. & Lin, J.L. Asplenia syndrome in a pair of monozygotic twins. *Acta Paediatr* **95**, 500-501 (2006).
55. Thacker, D., Gruber, P.J., Weinberg, P.M. & Cohen, M.S. Heterotaxy syndrome with mirror image anomalies in identical twins. *Congenit Heart Dis* **4**, 50-53 (2009).
56. Bartram, U., Wirbelauer, J. & Speer, C.P. Heterotaxy syndrome -- asplenia and polysplenia as indicators of visceral malposition and complex congenital heart disease. *Biol Neonate* **88**, 278-290 (2005).
57. Jacobs, J.P., *et al.* The nomenclature, definition and classification of cardiac structures in the setting of heterotaxy. *Cardiol Young* **17 Suppl 2**, 1-28 (2007).
58. Duran, M.A. & Guarena, A. Sequence of right laterality with spleen: widening the spectrum of heterotaxy. *Pediatr Pathol Mol Med* **21**, 461-465 (2002).
59. Bustamante, C.D., Nielsen, R. & Hartl, D.L. Maximum likelihood and Bayesian methods for estimating the distribution of selective effects among classes of mutations using DNA polymorphism data. *Theor Popul Biol* **63**, 91-103 (2003).

60. Wakeley, J. The limits of theoretical population genetics. *Genetics* **169**, 1-7 (2005).
61. Webster, M.T. & Smith, N.G. Fixation biases affecting human SNPs. *Trends Genet* **20**, 122-126 (2004).
62. Nachman, M.W. Single nucleotide polymorphisms and recombination rate in humans. *Trends Genet* **17**, 481-485 (2001).
63. Zhou, J.J., Lange, K., Papp, J.C. & Sinsheimer, J.S. A heterozygote-homozygote test of Hardy-Weinberg equilibrium. *Eur J Hum Genet* **17**, 1495-1500 (2009).
64. Lessa, E. *Guía de estudio de genética de poblaciones*, (Montevideo, Uruguay, 2004).
65. Pierce, B.A. *Genetics : a conceptual approach*, (W.H. Freeman, New York, 2005).
66. Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7**, 203-214 (2000).
67. Fernández-Suárez XM, S.M. Using the ensembl genome server to browse genomic sequence data. *Current protocols in bioinformatics* (2010).
68. Jordan, D.M., Ramensky, V.E. & Sunyaev, S.R. Human allelic variation: perspective from protein function, structure, and evolution. *Curr Opin Struct Biol* (2010).
69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>.
70. Medina, D. Búsqueda y caracterización de mutaciones en el gen NKX2-5 en 12 pacientes con conexión anómala total de venas pulmonares. (UNAM, México, D.F., 2009).

12.- Anexos

Anexo 1. Tabla de χ^2 utilizada

P = Probabilidad de encontrar un valor mayor o igual que el chi cuadrado tabulado, v = Grados de Libertad

v/p	0,001	0,0025	0,005	0,01	0,025	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5
1	10,8274	9,1404	7,8794	6,6349	5,0239	3,8415	2,7055	2,0722	1,6424	1,3233	1,0742	0,8735	0,7083	0,5707	0,4549
2	13,8150	11,9827	10,5965	9,2104	7,3778	5,9915	4,6052	3,7942	3,2189	2,7726	2,4079	2,0996	1,8326	1,5970	1,3863
3	16,2660	14,3202	12,8381	11,3449	9,3484	7,8147	6,2514	5,3170	4,6416	4,1083	3,6649	3,2831	2,9462	2,6430	2,3660
4	18,4662	16,4238	14,8602	13,2767	11,1433	9,4877	7,7794	6,7449	5,9886	5,3853	4,8784	4,4377	4,0446	3,6871	3,3567
5	20,5147	18,3854	16,7496	15,0863	12,8325	11,0705	9,2363	8,1152	7,2893	6,6257	6,0644	5,5731	5,1319	4,7278	4,3515
6	22,4575	20,2491	18,5475	16,8119	14,4494	12,5916	10,6446	9,4461	8,5581	7,8408	7,2311	6,6948	6,2108	5,7652	5,3481
7	24,3213	22,0402	20,2777	18,4753	16,0128	14,0671	12,0170	10,7479	9,8032	9,0371	8,3834	7,8061	7,2832	6,8000	6,3458
8	26,1239	23,7742	21,9549	20,0902	17,5345	15,5073	13,3616	12,0271	11,0301	10,2189	9,5245	8,9094	8,3505	7,8325	7,3441
9	27,8767	25,4625	23,5893	21,6660	19,0228	16,9190	14,6837	13,2880	12,2421	11,3887	10,6564	10,0060	9,4136	8,8632	8,3428
10	29,5879	27,1119	25,1881	23,2093	20,4832	18,3070	15,9872	14,5339	13,4420	12,5489	11,7807	11,0971	10,4732	9,8922	9,3418
11	31,2635	28,7291	26,7569	24,7250	21,9200	19,6752	17,2750	15,7671	14,6314	13,7007	12,8987	12,1836	11,5298	10,9199	10,3410
12	32,9092	30,3182	28,2997	26,2170	23,3367	21,0261	18,5493	16,9893	15,8120	14,8454	14,0111	13,2661	12,5838	11,9463	11,3403
13	34,5274	31,8830	29,8193	27,6882	24,7356	22,3620	19,8119	18,2020	16,9848	15,9839	15,1187	14,3451	13,6356	12,9717	12,3398
14	36,1239	33,4262	31,3194	29,1412	26,1189	23,6848	21,0641	19,4062	18,1508	17,1169	16,2221	15,4209	14,6853	13,9961	13,3393
15	37,6978	34,9494	32,8015	30,5780	27,4884	24,9958	22,3071	20,6030	19,3107	18,2451	17,3217	16,4940	15,7332	15,0197	14,3389
16	39,2518	36,4555	34,2671	31,9999	28,8453	26,2962	23,5418	21,7931	20,4651	19,3689	18,4179	17,5646	16,7795	16,0425	15,3385
17	40,7911	37,9462	35,7184	33,4087	30,1910	27,5871	24,7690	22,9770	21,6146	20,4887	19,5110	18,6330	17,8244	17,0646	16,3382
18	42,3119	39,4220	37,1564	34,8052	31,5264	28,8693	25,9894	24,1555	22,7595	21,6049	20,6014	19,6993	18,8679	18,0860	17,3379
19	43,8194	40,8847	38,5821	36,1908	32,8523	30,1435	27,2036	25,3289	23,9004	22,7178	21,6891	20,7638	19,9102	19,1069	18,3376
20	45,3142	42,3358	39,9969	37,5663	34,1696	31,4104	28,4120	26,4976	25,0375	23,8277	22,7745	21,8265	20,9514	20,1272	19,3374
21	46,7963	43,7749	41,4009	38,9322	35,4789	32,6706	29,6151	27,6620	26,1711	24,9348	23,8578	22,8876	21,9915	21,1470	20,3372
22	48,2676	45,2041	42,7957	40,2894	36,7807	33,9245	30,8133	28,8224	27,3015	26,0393	24,9390	23,9473	23,0307	22,1663	21,3370
23	49,7276	46,6231	44,1814	41,6383	38,0756	35,1725	32,0069	29,9792	28,4288	27,1413	26,0184	25,0055	24,0689	23,1852	22,3369
24	51,1790	48,0336	45,5584	42,9798	39,3641	36,4150	33,1962	31,1325	29,5533	28,2412	27,0960	26,0625	25,1064	24,2037	23,3367
25	52,6187	49,4351	46,9280	44,3140	40,6465	37,6525	34,3816	32,2825	30,6752	29,3388	28,1719	27,1183	26,1430	25,2218	24,3366
26	54,0511	50,8291	48,2898	45,6416	41,9231	38,8851	35,5632	33,4295	31,7946	30,4346	29,2463	28,1730	27,1789	26,2395	25,3365
27	55,4751	52,2152	49,6450	46,9628	43,1945	40,1133	36,7412	34,5736	32,9117	31,5284	30,3193	29,2266	28,2141	27,2569	26,3363
28	56,8918	53,5939	50,9936	48,2782	44,4608	41,3372	37,9159	35,7150	34,0266	32,6205	31,3909	30,2791	29,2486	28,2740	27,3362
29	58,3006	54,9662	52,3355	49,5878	45,7223	42,5569	39,0875	36,8538	35,1394	33,7109	32,4612	31,3308	30,2825	29,2908	28,3361

Anexo 2.- Carta de consentimiento utilizado para el banco de ADN.



**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ**
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MARQUEZ NO. 162C.P. 06720MEXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MEDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

☎ 52-28-99-17

Hoja de consentimiento informado Número: _____

DEPARTAMENTO DE GENETICA

Carta de consentimiento para donar altruistamente una muestra de sangre/saliva para extracción de DNA:

INVESTIGADORES:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso Investigador Principal Departamento de Genética	M. en C. Rocio Sánchez Urbina Investigador Suplente Departamento de Genética
---	--

Estimado donador:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado, el cual es un procedimiento que pretende obtener muestras de sangre o saliva para extraer una sustancia llamada ácido desoxribonucleico también conocida como DNA, y la cual contiene nuestra información genética, es decir la información sobre como nos desarrollamos y nuestras características. El objetivo de este estudio es contar con muestras de DNA anónimas de sujetos femeninos y masculinos, mexicanos al menos en tres generaciones anteriores, mayores de edad, que puedan usarse como controles para buscar variaciones o cambios de la secuencia habitual que tiene el DNA en nuestra población y que se llaman por ejemplo polimorfismos o mutaciones y utilizarse como controles de referencia al analizar muestras de DNA procedentes de pacientes.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO:

Para este estudio necesitamos tomarle a Usted una muestra de 3ml de sangre o unos mililitros de saliva con células de la mucosa bucal. Con una jeringa desechable se le tomará una muestra de sangre de la vena del brazo, aproximadamente 3 ml que será usada para el análisis de la molécula de DNA. En su caso podría pedirle deposite una muestra de saliva en un pequeño contenedor de la cual podrá igualmente extraerse por medio de otro procedimiento DNA.

RIESGOS Y MOLESTIAS: Los posibles riesgos de la extracción de sangre son los siguientes: molestia leve en el sitio de la punción por donde se extrajo la sangre; a veces, la formación de moretones, desmayos y rara vez infección.

Le manifestamos que de estar de acuerdo en donar una muestra, esta donación será altruista, por lo que Usted no recibirá beneficio o compensación alguna económica o de otra forma, le reafirmamos que la donación es voluntaria y altruista.

Los requisitos que pedimos para que pueda participar es que sus ancestros sean mexicanos en las tres últimas generaciones y Usted esté de acuerdo en que las



HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GOMEZ

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MARQUEZ NO. 162C.P. 06720MEXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MEDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

☎ 52-28-99-17

muestras se utilicen para los fines de investigación como muestra control. Le reafirmamos que la muestra no se usará para experimentos de donación ni transgénicos, ni cualquier otro proyecto que no sea sancionado por un comité de ética e investigación.

El número progresivo que aparece en esta hoja es para llevar el control de cantidad de muestras donadas y para los fines éticos y legales que la donación de la muestra pudiese implicar. No se señalará en los viales ni en las muestras archivadas la **identidad ni el número de muestra** con respecto a la hoja de consentimiento informado, de manera que por esta vía, será imposible establecer en relación a la muestra la identidad del donante.

Dado que carecemos de la posibilidad de identificar al donante de manera directa y ya que la única finalidad de la donación es participar de manera altruista en la investigación científica, no se darán a conocer resultados específicos ni mutaciones ni ninguna otra información resultado de las investigaciones en que las muestras hubiesen participado a ninguno de los donantes. Las muestras de DNA serán conservadas a resguardo en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de nuestra Institución.

Al aceptar participar Usted en este estudio si bien no recibirá un beneficio económico ni información sobre los resultados particulares de los estudios en que las muestras hubiesen sido analizadas, su participación representará un aporte significativo en la obtención de conocimiento científico que ayude a entender mejor las alteraciones y variaciones que puede tener el DNA en muestras procedentes de pacientes. De esta manera, el beneficio del conocimiento científico obtenido del uso de estas muestras sería extensivo para la sociedad en su conjunto.

Si Usted esta de acuerdo en esta donación, le pedimos que firme esta hoja de consentimiento informado en presencia de dos testigos, le entregaremos además una copia de esta hoja de consentimiento para que Usted la conserve.

Si tuviese Usted una pregunta con respecto a este estudio, a sus derechos como participante en la investigación o a cualquier lesión relacionada con la investigación, deberá Usted comunicarse con los médicos del departamento de Genética o con el investigador principal al teléfono 52 28 99 17 ext. 1495. Si deseara hablar con alguien más acerca del protocolo, aparte de los investigadores relacionados, puede Usted dirigirse a la Dra. Celia M. Alpuche Aranda, Subdirectora de investigación a la ext. 1482.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutir las y de hacer preguntas. Por este medio otorgo mi consentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. _____ de _____ del _____



**HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ**

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MARQUEZ NO. 1620.P. 06720MEXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MEDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

☎ 52-28-99-17

Nombre y firma del donante _____

Nombre y firma de testigo 1

2

Parentesco con el paciente

Nombre y firma de testigo

Parentesco con el paciente

EL PRESENTE DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO HA SIDO
APROBADO PARA USARSE EN EL PERIODO COMPRENDIDO DEL 1 DE
OCTUBRE DE 2005 AL 30 DE SEPTIEMBRE DE 2006