



Epidemiología molecular de la esclerocórnea autosómica recesiva en una población endogámica del Estado de Tlaxcala.

**Maestría en Ciencias Médicas
Facultad de Medicina, UNAM**

Presenta: Carlos Alberto Pantoja Meléndez

Tutor: Juan Carlos Zenteno Ruíz





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.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Clasificación de las enfermedades hereditarias	5
1.1.1 Enfermedades multifactoriales.....	5
1.1.2 Enfermedades monogénicas.....	6
1.2 Desarrollo embrionario del ojo.....	7
1.3 Desarrollo del Segmento Anterior del Ojo.....	10
1.4 Malformaciones oculares	13
1.5 Epidemiología de los desordenes oculares hereditarios.....	13
1.6 El rol de la los padecimientos oculares de origen genético en la discapacidad visual	15
1.7 Anomalías del segmento anterior del ojo	16
1.7.1 Esclerocórnea	18
1.7.2 Defectos genéticos asociados a esclerocórnea.....	19
1.7.3 Esclerocornea hereditaria en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala	21
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION	23
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS.....	25
7. METODOLOGÍA	27
7.1 ANALISIS GENÉTICO.....	29
7.1.1 SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DIRECTA DE LOS GENES FOXC1 y FOXE3	32
7.1.2 ANALISIS DE PREDICCIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES.....	33
7.2 Determinación de portadores en el Municipio.	34
7.3 Variables	38

7.4 Esquema general	40
8. ÉTICA.....	41
9. RESULTADOS.....	42
9.1 Fenotipo.....	42
9.2 Actividades de Campo.....	45
9.3 Referenciación geográfica de los casos de esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.....	46
9.4 SEGUNDA FASE	48
9.4.1 Análisis molecular	48
9.5 Análisis de Predicción funcional de la mutación Tir98His (p.Y98H) en FOXE3.....	49
9.6 TERCERA FASE	50
9.7 Migración	52
9.7.1 Inmigración	52
9.7.2 Emigración	53
9.8 Origen de los heterocigotos.....	53
9.9 Patrón de segregación	53
9.9.1 Determinación de la ley de Hardy-Weinberg.....	53
9.9.2 Definición de Generación.....	54
9.9.3 Endogamia.....	54
9.10 CUARTA FASE.....	55
10. DISCUSIÓN	57
11. ANEXOS	69
12. BIBLIOGRAFÍA	80

RESUMEN

ANTECEDENTES: Las enfermedades hereditarias producidas por una mutación en la secuencia de ADN de un solo gen son conocidas como monogénicas o también como enfermedades hereditarias mendelianas. La consanguinidad aumenta la probabilidad de la aparición de enfermedades monogénicas de tipo autosómico recesivo, ya que es mayor el riesgo de que ambos progenitores de un afectado hayan heredado el gen anormal de un antepasado común. Dentro de este tipo de estos padecimientos, los trastornos oculares presentar un riesgo importante debido a la gran cantidad de genes que intervienen en su formación. Entre éstos se encuentran varias malformaciones del segmento anterior del ojo, en las que se incluye una condición conocida como esclerocórnea. Esta es una malformación poco frecuente y en la actualidad no se ha asociado a mutaciones en algún gen específico. Observaciones preliminares indican que en una población endogámica del Estado de Tlaxcala existe un número aparentemente elevado de casos de esclerocórnea autosómica recesiva. Se desconocen las características epidemiológicas y moleculares de esta enfermedad en la población referida.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN: ¿Cuál es la prevalencia de sujetos con esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Cuál es la alteración genética responsable de la esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Cuál es la prevalencia de portadores (heterocigotos) de la mutación genética responsable de la esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Hace cuanto tiempo se generó o cuando ingreso la mutación que ocasiona la esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

OBJETIVOS: Determinar la prevalencia de enfermos de esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan.

Determinar la mutación genética responsable de los casos de esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan.

Estimar la prevalencia de portadores (heterocigotos sanos) de la mutación genética causante de la esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan.

Establecer el tiempo transcurrido (“fechaje”) desde que la mutación causante de esclerocórnea apareció o ingresó en esta población.

METODOLOGÍA: Se realizó un estudio en cuatro fases, la primera fue un censo de casos en la población de San Francisco Tetlanohcan para determinar la prevalencia de esclerocórnea, de esta fase se obtuvo la prevalencia así como las características sociodemográficas de los casos y se construyeron los árboles genealógicos de los pacientes. En la segunda fase se realizó la búsqueda de la mutación por medio de estudios de los genes candidatos, *FOXC1* y *FOXE3* por estar relacionados previamente a malformaciones del segmento anterior de ojo. La tercera fase, una vez determinada la mutación se buscó en la población sana (heterocigotos) para determinar la prevalencia en la población, ésta será realizada por medio de un muestreo aleatorio de personas de la localidad. Finalmente en una cuarta fase se determinaron los haplotipos de la mutación y se realizó un estudio del desequilibrio del ligamiento para poder determinar la fecha en que se presentó o se introdujo esta mutación a la población.

RESULTADOS: Se observó una prevalencia de 2.96 casos de esclerocórnea por cada 1,000 habitantes. Se demostró que el padecimiento es causado por la mutación recesiva c.292 T>C en el gen *FOXE3*. La prevalencia de portadores (heterocigotos) fue de 2.46 (1.26-4.35) por cada 100 habitantes. El padecimiento fue “fechado como introducido o generado en la población hace aproximadamente 113 a 130 años de acuerdo a la frecuencia de haplotipos (recombinación) y a la frecuencia de portadores en la población.

1. INTRODUCCIÓN

El humano al igual que cualquier organismo vivo transmite el material genético a su descendencia, el cual contiene la información requerida para la formación y el desarrollo de un nuevo individuo. A la totalidad de estos factores genéticos se le denomina genotipo y es responsable de la apariencia y características bioquímicas de un organismo que en conjunto se conocen como fenotipo. A excepción de la mayoría de genes situados en el X y el Y en un varón, el humano tiene dos copias de cada gen, una de origen paterno y otro de origen materno. Estos dos genes, conocidos con el nombre de alelos, determinan la presentación de una característica específica y son los responsables de la expresión de los rasgos en el individuo. Se estima que el genoma humano contiene aproximadamente 25,000 genes. Las alteraciones en la secuencia o en la expresión de los genes originan numerosos padecimientos genéticos que afectan al humano y que pueden transmitirse a la descendencia como enfermedades hereditarias (Griffiths, 2002)

1.1 Clasificación de las enfermedades hereditarias

1.1.1 Enfermedades multifactoriales

Este grupo de enfermedades, también llamadas enfermedades poligénicas o complejas, se origina por una combinación de factores genéticos y factores ambientales. Por esta razón son mucho más difíciles de analizar que las enfermedades monogénicas o las alteraciones cromosómicas. Algunas de las enfermedades crónicas más frecuentes son de herencia multifactorial, como por ejemplo la hipertensión arterial esencial, la enfermedad de Alzheimer, la Diabetes mellitus II, la obesidad y varios tipos de cáncer. De manera importante, la gran mayoría de las malformaciones congénitas tienen también una herencia multifactorial. Este tipo de herencia también es responsable de rasgos fenotípicos normales tales como la talla, el color de los ojos y de la piel y la inteligencia, entre muchos otros (Griffiths, 2002).

1.1.2 Enfermedades monogénicas

Son enfermedades hereditarias producidas por la mutación o alteración en la secuencia de ADN de un solo gen. También se llaman enfermedades mendelianas, por transmitirse a la descendencia según las leyes descritas por Gregorio Mendel en 1866. Se conocen más de 7,000 enfermedades hereditarias monogénicas (OMIM, <http://omim.org/statistics/entry>, Enero de 2012) y tienen una prevalencia de entre 3 a 7 casos por cada 100 sujetos (Jorde, 2010).

Las enfermedades monogénicas se transmiten según los patrones hereditarios mendelianos y se clasifican de la siguiente manera:

- Enfermedades autosómicas recesivas
- Enfermedades autosómicas dominantes
- Enfermedades ligadas al cromosoma X recesivas
- Enfermedades ligadas al cromosoma X dominantes

Cuando existe una mutación en uno solo de los 2 alelos de un gen particular (estado heterocigoto) y ésta dar lugar a la presentación de un fenotipo específico o a una enfermedad, se le considera una mutación dominante; cuando se requiere que ambos alelos presenten mutaciones (estado homocigoto) para que se exprese el fenotipo o la enfermedad, se le considera una mutación recesiva (Jorde, 2010). Por lo tanto, para que se presente un padecimiento autosómico recesivo se requiere que la mutación esté en doble dosis, es decir en estado homocigoto; generalmente, el individuo homocigoto recibe un alelo mutado de cada progenitor, que es un portador (heterocigoto) fenotípicamente normal. Cada padre heterocigoto aporta un gen mutado por lo que tiene un 50% de posibilidades de transmitir el gen. Por ello, cuando dos sujetos heterocigotos se unen, existe un 25% de riesgo de afectación (homocigosidad) en la descendencia, por cada embarazo (Robert et.al, 2005). Los rasgos o enfermedades autosómicos recesivos tienen un patrón hereditario horizontal y pueden encontrarse varios hermanos afectados. Es importante señalar que la endogamia o uniones entre consanguíneos aumenta

considerablemente la probabilidad de aparición de enfermedades recesivas. Cuanto más próxima sea la relación familiar entre los padres, mayor será el riesgo de que ambos miembros de la pareja hayan heredado el gen anormal de un antepasado común (Oliva et al, 2004).

1.2 Desarrollo embrionario del ojo

En el humano, el desarrollo del ojo inicia a principios de la cuarta semana de vida intrauterina y es consecuencia de una serie de señales inductoras genéticas y celulares finamente reguladas a nivel molecular. Los ojos derivan de cuatro estructuras embrionarias:

- Neuroectodermo del prosencéfalo
- Ectodermo de superficie cefálico
- Mesodermo
- Mesénquima (células de la cresta neural)

El neuroectodermo del prosencéfalo se diferenciará en la retina, las caras posteriores del iris y el nervio óptico. El ectodermo de superficie de la cabeza formará el cristalino y el epitelio corneal. El mesodermo comprendido entre el neuroectodermo y el ectodermo de superficie dará lugar a la capa vascular (coroides) del ojo y a la porción temporal de la esclera. Las células mesenquimales proceden de la cresta neural y originarán la coroides, la esclera (excepto su porción temporal), el estroma y el endotelio corneal, así como casi todas las estructuras del segmento anterior del ojo (Gehring, 2002).

Durante la cuarta semana de vida intrauterina, en los pliegues neurales del extremo craneal del embrión aparecen los surcos ópticos y a medida que los pliegues neurales se unen para formar el prosencéfalo, estos surcos se evaginan para dar lugar a las vesículas ópticas, que se proyectan desde la pared del prosencéfalo hacia el mesénquima adyacente (Fig.1A). La formación de estas vesículas es inducida por el mesénquima adyacente hacia el encéfalo en desarrollo; a medida que las vesículas ópticas crecen, sus extremos distales se expanden y sus conexiones con el prosencéfalo se contraen para formar los tallos ópticos huecos (Fig.1A). En poco tiempo, las vesículas ópticas hacen

contacto con el ectodermo de superficie. Simultáneamente, el ectodermo de superficie adyacente a las vesículas sufre un engrosamiento que da lugar a las placodas cristalinas que son los primordios del cristalino. Las vesículas ópticas inducen la formación de estas placodas cuando el mesénquima subyacente ha condicionado al ectodermo de superficie (Fig.1A). El mensaje inductor pasa desde las vesículas, estimulando la formación de los primordios del cristalino por parte de las células del ectodermo de superficie formando la fovea del cristalino. Los bordes de la fovea se acercan entre sí y se fusionan para formar las vesículas cristalinas esféricas que más tarde perderán su conexión al ectodermo de superficie (Beebe, 2003) (Fig.1B).

A medida que se desarrollan las vesículas del cristalino, las vesículas ópticas se invaginan y forman copas ópticas de pared doble. La apertura de cada copa es grande al principio, pero su borde se pliega después hacia dentro alrededor del cristalino; En esta fase, las vesículas cristalinas han perdido su conexión con el ectodermo de superficie ventral de las copas ópticas y de los tallos ópticos se desarrollan unos surcos lineales que se conocen como las cisuras retinianas (Fig. 1B).

La fisura coroidea contiene el mesénquima vascular a partir del cual se originan los vasos sanguíneos hialoideos. La arteria hialoidea, una rama de la arteria oftálmica, irriga la capa interna de la copa óptica, la vesícula cristalina y el mesénquima de la copa óptica; a medida que se produce la fusión de los bordes de la cisura retiniana, los vasos hialoideos se engloban dentro del nervio óptico primitivo. Finalmente, las porciones distales de los vasos hialoideos degeneran pero sus partes proximales se mantienen y forman la arteria y la vena de la retina. La retina se desarrollará a partir de las paredes de la copa óptica. La capa externa de la copa óptica, que es más delgada, se convertirá en el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la capa interna, de mayor grosor, se transformará en la retina neural (Graw, 2003) (Fig 1B).

Bajo la influencia del cristalino en desarrollo, la capa interna de la copa óptica prolifera para formar un neuroepitelio grueso que contendrá a los fotorreceptores (conos y bastones) y cuerpos celulares de las neuronas

(células bipolares y ganglionares). La retina neural se “invierte” dado que la vesícula cristaliniiana se invagina a medida que forma la copa óptica y de ésta forma, las partes de los fotorreceptores sensibles a la luz se sitúan junto al EPR (Fig.1B). Los axones de las células ganglionares de la capa superficial de la retina neural crecen próximamente en la pared del tallo óptico hacia en encéfalo. Como resultado, la cavidad del tallo óptico se obstruye de modo gradual, lo que origina el nervio óptico (Larsen, 2001).

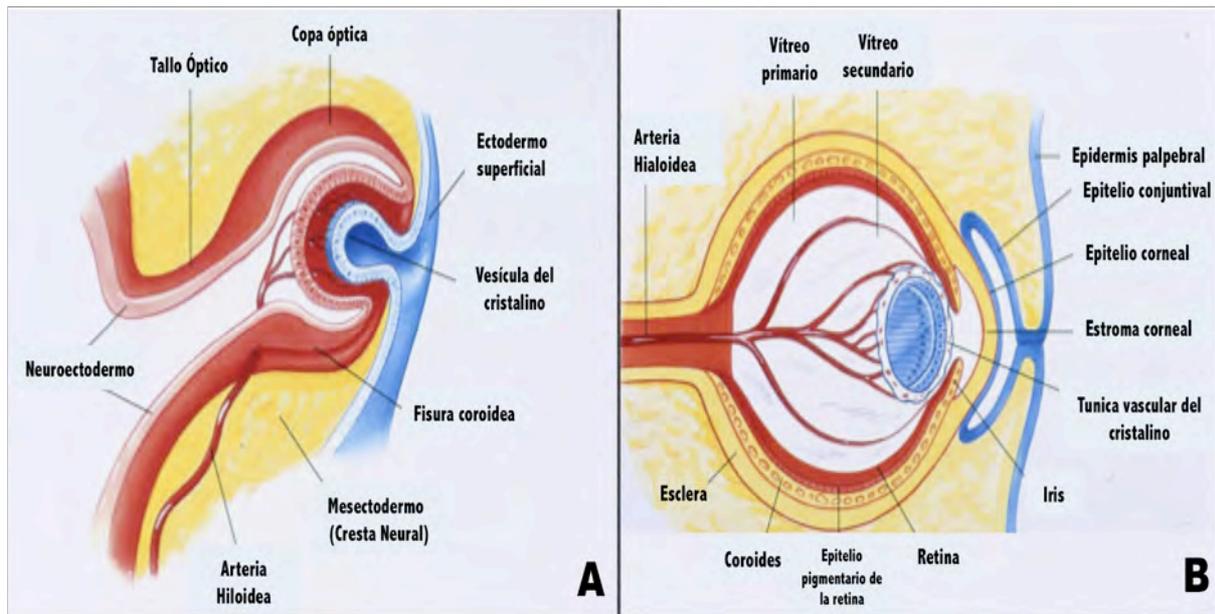


Figura 1. Desarrollo embrionario del ojo (Modificado de Danton H. O'Day). **A.-** Desarrollo embrionario a los 33 días; en rojo se muestra la vesícula óptica y el tallo óptico, en el que se aprecia la fisura coroidea que contiene la arteria hialoidea. Se observan también la vesícula que dará origen al cristalino y que deriva del ectodermo de superficie (azul). **B.-** En esta etapa se observa el cristalino separado del ectodermo de superficie (azul), así como la diferenciación de la copa óptica en retina neural y en epitelio pigmentario de la retina (rojo). Se aprecian también otras estructuras de segmento anterior (córnea, iris, cámara anterior) así como la cavidad vítrea y la esclera.

1.3 Desarrollo del Segmento Anterior del Ojo

Durante el desarrollo de los diferentes tejidos en el segmento anterior del ojo, las células que se originan en el epitelio superficial o del neuroepitelio requieren de la interacción con las células mesenquimales, que principalmente provienen de la cresta neural (ectodermo). Esta interacción está bajo control de una amplia gama de factores de transcripción que se expresan en las células epiteliales y mesenquimales (Faber et al, 2001). Las células mesenquimales comienzan a migrar hacia el espacio entre la vesícula óptica y el ectodermo de superficie poco después que la vesícula óptica se ha separado del ectodermo superficial (Fig. 2A). A medida que el número de células entre el cristalino y el ectodermo superficial aumenta continuamente, las células se condensan para formar varias capas en las células mesenquimales que están separadas entre sí por una matriz fibrilar extracelular. Al mismo tiempo, la cavidad de la vesícula del cristalino se cierra completamente ya que es llenado por las fibras del cristalino primario. Las células del mesénquima posterior más cercano a la lente se aplanan y se extienden para formar contactos con las células adyacentes. Al final de este proceso, las células se conectan a entre sí a través de bandas continuas de complejos de unión y forman una monocapa endotelial. La monocapa endotelial que se ha originado a partir de células del mesénquima posterior se convertirá en el endotelio corneal, mientras que el ectodermo superficial que cubre la parte anterior del mesénquima se convertirá en el epitelio de la córnea (Fig. 2B). Al mismo tiempo, las células del mesénquima entre el epitelio corneal y el endotelio comienzan a diferenciarse en fibroblastos del estroma corneal o queratinocitos, que es responsable de la síntesis de la matriz extracelular muy especializada del estroma corneal. Como resultado, la córnea se convierte en un tejido transparente (Yoshimoto et al, 2005) (Fig. 2C).

El músculo ciliar, que esta a cargo del enfocamiento del cristalino, se desarrolla a partir de la mesénquima que se encuentra en el borde la copa óptica, el cual da lugar también al iris. La formación del iris separa la cavidad entre el cristalino y la córnea en la cámara anterior y posterior (Fig. 2C). La diferenciación adecuada del endotelio corneal parece ser un requisito esencial

para la separación del cristalino de la córnea y la ulterior formación de la cámara anterior. Mientras que el endotelio corneal se diferencia y el cristalino y la córnea se separan, un nuevo grupo de células del mesénquima migra a la anterior del ojo en una segunda oleada. Estas células aparecen en primer lugar en el ángulo entre la córnea, cuando los bordes anteriores de la copa óptica se extienden para formar el estroma del iris y el cuerpo ciliar (Larsen, 2001) (Fig. 2C).

Las últimas estructuras que se diferencian durante el desarrollo del segmento anterior del ojo son los tejidos involucrados en la salida del humor acuoso, la malla trabecular y el canal de Schlemm, que se desarrollan en el ángulo iridocorneal (Fig. 2C). Poco después del inicio de la elongación del iris aproximadamente a las 15-20 semanas, el ángulo de la cámara está ocupado por una densa masa de células mesenquimales, las cuales se alargan, se aplanan y se separan entre sí por pequeños espacios abiertos que se llena parcialmente con fibras extracelulares. La malla trabecular está separada por espacios intertrabeculares a través del cual se filtra el humor acuoso. La morfogénesis de la malla trabecular se completa alrededor del nacimiento. Algunas células mesenquimales con un fenotipo estrellado permanecen entre la malla trabecular y el endotelio del canal de Schlemm. Estas células se desarrollan contactos célula-célula con las células endoteliales del canal de Schlemm, por un lado y las células que cubren las vigas trabecular en el otro lado, y la forma yuxtacanalicular o capa cribosa de la malla trabecular, donde se encuentra la mayor parte de la resistencia a la salida del humor acuoso (Cvekl, 2004).

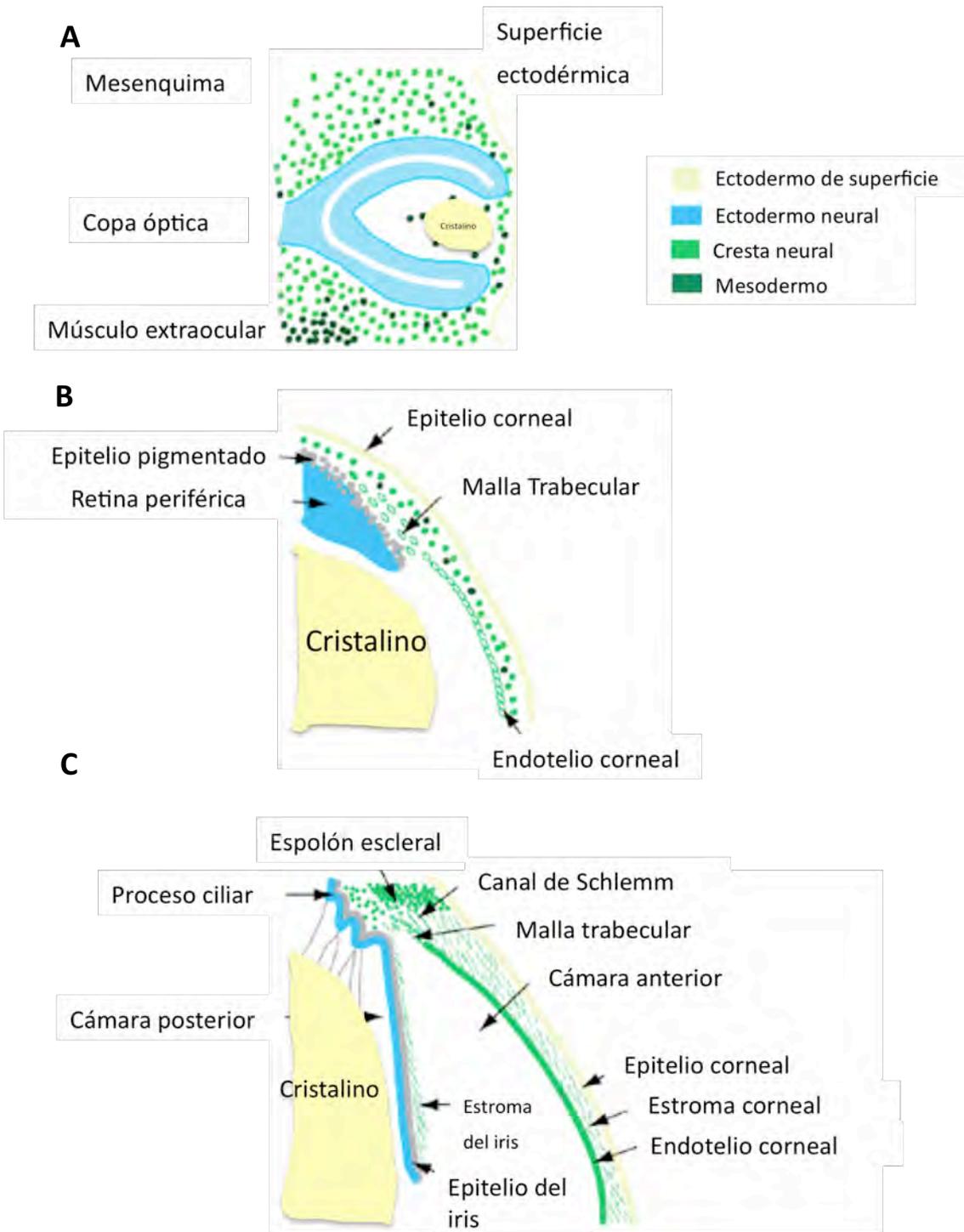


Figura 2. Desarrollo embrionario y fetal del segmento anterior del ojo. Se muestran en colores las 4 capas que contribuyen al desarrollo del segmento anterior (Modificado de Sowden JC). (a) Etapa de copa óptica, a las 5 semanas (b) Etapa de formación de la cámara anterior, correspondiente al 5^o mes. (c) Esquema del segmento anterior maduro mostrando el cristalino, el iris, el ángulo irido-corneal, y la córnea. En la parte derecha se muestra el código de colores utilizado para representar el origen embrionario de los tejidos del segmento anterior

1.4 Malformaciones oculares

El ojo humano es una estructura altamente diferenciada en la que numerosos genes se expresan para lograr su formación y función adecuadas. Debido a la complejidad del desarrollo del ojo, es frecuente la aparición de defectos en la formación de las estructuras oculares. El tipo y la gravedad de cada anomalía dependen de la etapa embrionaria durante la cual se altere el desarrollo ocular. Debido a que las estructuras oculares derivan del ectodermo de superficie, del neuroectodermo, del mesodermo y de las células de la cresta neural, es conveniente identificar la alteración congénita basándose en la subestructura ocular afectada (Matthew, 2002).

Los defectos congénitos del ojo ocurren con relativa frecuencia en la población y fluctúan entre 1.3 a 6.8 casos por cada 10,000 nacidos vivos (Riaño, 2010); Después de la catarata congénita, las anomalías más comunes son la anoftalmía y la microftalmia, las cuáles constituyen una causa común de ceguera en el humano (Reddy, 2009).

1.5 Epidemiología de los desordenes oculares hereditarios

El gran número de genes involucrados en la morfogénesis ocular se refleja en el alto porcentaje de desordenes oculares de origen genético que pueden ocurrir en el humano (Boletín ECEMC, 2004). La prevalencia de padecimientos oculares hereditarios es diversa en el mundo y depende de las características de la población, como la edad, migración, aislamiento y ciertos factores que afectan la forma en que se unen las parejas, como la religión, política etc. Se estima que a nivel mundial 13% de los trastornos oftalmológicos tienen un origen genético y de éstos un 30% se presenta con un patrón autosómico recesivo (Reddy, 2009). De estos casos recesivos, en 22% existe antecedente de consanguinidad (Stoll, 1992).

En países con altos niveles económicos y baja prevalencia de padecimientos oculares prevenibles o curables, se presenta una alta proporción de

padecimientos oculares de origen genético. Muchos padecimientos oculares por ejemplo el glaucoma, la degeneración macular, el estrabismo y la miopía son enfermedades que tienen diferentes etiologías, incluidos los factores genéticos, tanto monogénicos como multifactoriales.

Debido en parte a la dificultad que implica su desarrollo, los estudios epidemiológicos completos acerca de padecimientos oculares de origen genético son poco frecuentes en la literatura mundial. Por un lado, la baja prevalencia de estas enfermedades supone estudios de grandes grupos y largo seguimiento, por lo que es común encontrar estudios de instituciones que no cuentan con un seguimiento adecuado. Por otro lado, la clasificación oftalmológica generalmente utiliza un vocabulario propio a partir de que la oftalmología ha tenido un mayor desarrollo, como por ejemplo, los casos de la retinitis pigmentosa, el nistagmo congénito o la catarata congénita (Jaakko, 2000).

La baja especificidad diagnóstica de los padecimientos oftalmológicos, es en parte debida a la heterogeneidad genética de muchos de estos padecimientos, por lo que la información oftalmológica es enriquecida con contribuciones epidemiológicas concernientes a los desordenes genéticos y por esta razón muchos de las enfermedades oculares de origen genético son referidas solamente en libros de oftalmología genética.

Recientemente los estudios de genética molecular han proporcionado nuevas evidencias para la clasificación de los padecimientos oculares de origen genético y es posible que a futuro ésta se integre como parte del diagnóstico diferencial de padecimientos oculares (Johnson et al, 2003).

El establecimiento del espectro de las mutaciones en los diversos padecimientos oculares no solo permite la correlación fenotipo-genotipo si no que también sirve para determinar algunas características epidemiológicas de la población. Usualmente los padecimientos autosómicos dominantes y los ligados al cromosoma X (como la aniridia y el albinismo ocular, respectivamente) presentan una relativamente alta proporción de mutaciones

de novo, por lo que ocurren con frecuencia similar en poblaciones diferentes; En general esas mutaciones surgen sólo en algunas familias y acorde con esto, tales desordenes se caracterizan por una gran heterogeneidad de mutaciones; sin embargo, pueden ocurrir mutaciones idénticas en sitios llamados “hot spots” en familias no relacionadas con ciertas enfermedades oculares hereditarias (Wissinger, 2003).

1.6 El rol de la los padecimientos oculares de origen genético en la discapacidad visual

El impacto general de la prevalencia de padecimientos hereditarios oculares es aun poco conocido. Se estima que se presentan en una proporción de 100 a 200 casos por cada 100,000 habitantes (datos obtenidos en varias poblaciones de niños) (Foster, 1997), pero pueden variar hasta un 13% (Reddy, 2008), y se ha documentado que en países nórdicos, la etiología genética es la causa del 31 al 40% de los padecimientos oftalmológicos (Rosenberg, 1992; Blohmé, 1997). En estos países fue posible determinar que la proporción de casos que presentan determinantes genéticos en padecimientos oculares es de 19 a 44 casos por cada 100,000 niños. Sin embargo, en los padecimientos oculares donde no había alteraciones sistémicas, las causas genéticas fueron superiores al 61% (Rosenberg, 1992), aún a pesar del bajo índice de consanguinidad en estas poblaciones. En algunos países de Latino America, se ha determinado que los desordenes genéticos son la causa de entre 11-39% de los casos de ceguera en niños (Hae, 2006).

En regiones del Este del mediterráneo es en donde mayor cantidad de casos de ceguera en escolares (59-80%) tienen un factor etiológico genético (Gilbert, 1995). La prevalencia más alta se presentó en países con altos niveles de desarrollo socioeconómico, así como en aquellos con altas tasas de consanguinidad, siendo los padecimientos autosómicos recesivos, como la distrofia retiniana y la amaurosis congénita los padecimientos más comunes.

De acuerdo a lo anterior los padecimientos oculares causados por la afectación de un gen único explican una importante causa de padecimientos y de ceguera en niños y adultos jóvenes en todo el mundo (Francois, 1990).

1.7 Anomalías del segmento anterior del ojo

El segmento anterior del ojo consiste en la córnea, el iris, el cristalino, el cuerpo ciliar y las estructuras de drenaje del humor acuoso (malla trabecular y canal de Schlemm). Las estructuras de drenaje están localizadas en el ángulo iridocorneal, donde el iris y la córnea se unen. Esta región es conocida también como la zona de transición esclerocorneal, ya que en esta localización la pared ocular transita de córnea a esclera. El segmento anterior también incluye a la cámara anterior, que es el espacio entre el iris y la córnea, y a la cámara posterior que es el espacio entre el iris y el cristalino. Estas estructuras se desarrollan por una serie de eventos coordinados que involucran inducción y diferenciación de tres tipos principales de tejidos: ectodermo de superficie, ectodermo neural y mesénquima periocular (Gould et al, 2004). La disgenesia del segmento anterior es una falla del desarrollo normal de los tejidos del segmento anterior del ojo. Estas anomalías llevan a alteraciones de la estructura del segmento anterior y se asocian con frecuencia a un riesgo elevado de glaucoma y de opacidades corneales.

La disgenesia del segmento anterior del ojo incluye un espectro de desordenes clínicos con gran heterogeneidad genética (múltiples genes involucrados) que se originan por malformaciones de los tejidos derivados de la cresta neurales. En años recientes se han identificado mutaciones en numerosos genes como causa de disgenesia del segmento anterior (revisadas en Reis y Semina, 2011). La mayoría de estos genes codifican proteínas con función de factores de transcripción y sus mutaciones provocan un espectro de fenotipos que puede incluir solamente estructuras oculares o bien incluir también alteraciones sistémicas. En la tabla 1 se muestran los principales genes asociados a disgenesia del segmento anterior, su localización cromosómica, su fenotipo asociado y su modo de herencia.

Gen	OMIM	Locus	Fenotipo	Tipo de herencia
<i>PAX6</i>	607108	11p13	Aniridia, anomalía de Peters, queratitis, hipoplasia foveal, catarata congénita	Autosómica Dominante
<i>JAG1</i>	601920	20p12	Síndrome de Alagille con embriotoxon posterior, hpoplasia del iris, microcornea, sinequias irido-corneales y corectopia	Autosómica Dominante
<i>PITX2</i>	601542	4q25-q26	Síndrome de Axenfeld-Rieger, anomalía de Peters e hipoplasia del iris	Autosómica Dominante
<i>FOXC1</i>	601090	6p25	Síndrome de Axenfeld-Rieger, anomalía de Peters e hipoplasia del iris, glaucoma congénito, aniridia	Autosómica Dominante
<i>FOXC2</i>	602402	16q24.3	Linfedema y distiquiasis, disgenesia del segmento anterior	Autosómica Dominante
<i>PITX3</i>	602669	10q25	Catarata congénita polar posterior con o sin disgenesia del segmento anterior	Autosómica Dominante
<i>FOXE3</i>	601094	1p32	Disgenesias del segmento anterior con catarata, anomalía de Peters, microftalmia	Autosómica Dominante/ Autosómica recesiva
<i>BMP4</i>	112262	14q22-q23	Disgenesia del segmento anterior, con o sin anoftalmia o microftalmia, anomalías sistémicas	Autosómica Dominante
<i>COL4A1</i>	120130	13q34	Porencefalia, enfermedad de pequeños vasos cerebrales con aparición temprana de cataratas y disgenesia del segmento anterior	Autosómica Dominante
<i>CYP1B1</i>	601771	2p22-p21	Glaucoma primario congénito, anomalía de Peters, aniridia, disgenesia del segmento anterior	Autosómica recesiva
<i>LAMB2</i>	150325	3p21	Síndrome de Pierson con microcoria, disgenesia del segmento anterior	Autosómica recesiva
<i>B3GALT</i>	610308	13q12.3	Síndrome de Peters Plus	Autosómica recesiva

Tabla 1.- Genes asociados a disgenesia del segmento anterior, de acuerdo al número de catálogo en *On line Mendelian Inheritance in Man* (OMIM). Modificado de Reis y Semina, 2011.

1.7.1 Esclerocórnea

La esclerocórnea es una malformación poco común del segmento anterior del ojo, que se caracteriza por una falla de la delimitación entre el tejido corneal y el escleral, lo que conlleva a opacidad de la córnea y a deficiencia visual severa (Mengual E, Hueso, 2011). Generalmente la esclerocórnea está limitada a la parte periférica de la córnea, pero puede afectar su totalidad como en el caso de la esclerocórnea *totalis*. La esclerocórnea ocurre generalmente de manera esporádica, sin embargo existen casos familiares de herencia autosómica dominante (OMIM #18700) y otros que se heredan de manera autosómica recesiva (OMIM #269400). Típicamente, los casos recesivos manifiestan un fenotipo severo (Tamayo M, Bernal J, 1998).

La esclerocórnea casi siempre afecta a ambos ojos (Bhat, 2005), es una alteración no progresiva, no se asocia a inflamación corneal y puede ser asimétrica. Clínicamente se observa un anillo corneal periférico blanquecino y vascularizado de 1-2 mm que se confunde con la esclera y oblitera el limbo. La esclerótica está muy vascularizada y el limbo se encuentra poco desarrollado. Generalmente la cornea central es normal, pero en la esclerocórnea *totalis* toda la cornea está involucrada aunque la parte central de la cornea es más clara que la periferia. Este dato la distingue de la anomalía de Peters, en la que la opacidad es central.

La opacidad afecta todo el estroma, lo que limita la observación de las estructuras intraoculares. La esclerocornea se asocia con frecuencia a córnea plana aunque ambas alteraciones pueden encontrarse de manera aislada (Khan, 2007).

Los estudios histopatológicos en esclerocornea han revelado la presencia de fibras elásticas y colágena de diámetro aumentado en el estroma corneal anterior, con características de tejido escleral. Pueden observarse además alteraciones del endotelio corneal y de la membrana de Descemet (Harissi-Dhager y Colby, 2008). Es frecuente identificar anomalías oculares coexistentes, entre las que destacan microftalmia, glaucoma, afaquia, cornea plana y alteraciones del iris.

Las alteraciones sistémicas coexistentes con la esclerocórnea pueden incluir anomalías de extremidades, alteraciones craneofaciales y defectos genitourinarios (Cape, 2003; Rezende, 2004). En caso de esclerocórnea totalis debe considerarse la realización de queratoplastia temprana en un esfuerzo para proporcionar visión (Michaeli, 2008). El manejo de la esclerocórnea es habitualmente complicado y de pobres resultados. Es posible realizar el trasplante de córnea y dar tratamiento a las complicaciones asociadas como el glaucoma. Sin embargo, los aloinjertos tienen una alta frecuencia de rechazo en pacientes pediátricos, además de que el manejo de glaucoma en estos casos suele ser quirúrgico debido a anomalías del ángulo de cámara anterior.

1.7.2 Defectos genéticos asociados a esclerocórnea

La esclerocórnea es una anomalía poco frecuente que puede presentarse de manera aislada o asociada a otras anomalías extraoculares (sindrómica) (Harissi-Dagher et al, 2008; Kapur, 2008). Se han descrito algunas alteraciones genéticas, principalmente aberraciones cromosómicas estructurales, en individuos con esclerocórnea sindrómica. Entre otros, un caso de esclerocórnea con aniridia y probable síndrome de Hallermann-Streiff con duplicación de 20p (Schanzlin et al, 1980); un caso caracterizado por esclerocórnea y malformaciones faciales y renales con delección de 9p22 (Ying et al, 1982); y un paciente con esclerocórnea, discapacidad intelectual y malformaciones cráneo-faciales en quien se demostró una delección de 12p (Kivlin et al, 1985). Por otra parte, en 2008 Binembaum et al, describieron 7 casos con esclerocórnea asociados al síndrome de delección 22q11.2. La delección de 22q11.2 ocasiona típicamente los síndromes de DiGeorge, velo-cardio-facial y de Takao (facial/cono-trucal) que incluyen malformaciones cráneo-faciales y cardiovasculares múltiples. De acuerdo a sus observaciones, estos autores sugirieron que la esclerocórnea debería ser considerada como parte del espectro de delección 22q11.2 (Binembaum et al, 2008).

A pesar de que no existen genes identificados asociados a formas monogénicas de esclerocórnea aislada, Besant et al, (1999) describió

ligamiento genético a 14q32 en una familia con microftalmia y esclerocórnea de transmisión autosómica recesiva. Por su parte, Voronina et al, (2004) demostraron heterocigosidad compuesta para las mutaciones Q147X y R192Q en RAX en un paciente con autismo, anoftalmia derecha y esclerocórnea en ojo izquierdo. Los padres portadores no presentaban anomalías oculares. El gen *RAX* está localizado en 18q21.3 y codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo de las células progenitoras de la retina (Mathers et al, 1997).

Wimplinger et al. (2007) describieron un sujeto con microftalmia y esclerocórnea bilaterales asociadas a una mutación heterocigota en el gen *HCSS*, que codifica la enzima sintasa de holocitocromo tipo C mitocondrial, y que se localiza en Xp22. En este paciente se identificó la mutación E159K y los estudios funcionales demostraron que tal cambio afectaba la función de la proteína. Es importante señalar que existe un síndrome conocido como MIDAS, caracterizado por microftalmia, aplasia dérmica y esclerocórnea, que ha sido asociado a deleciones del locus Xp22 (Temple et al, 1990; Ogata et al, 1998) y más recientemente a mutaciones del gen *HCSS* (Prakash et al, 2002; Wimplinger et al, 2006). Finalmente, Valleix et al. describieron en 2006 a 3 hermanos, hijos de un matrimonio consanguíneo y quienes presentaban afaquia bilateral, microftalmia, aplasia del segmento anterior del ojo, ausencia de iris y displasia retiniana. Uno de los pacientes también presentó esclerocórnea bilateral. Utilizando un abordaje de genes candidatos, los autores demostraron que el fenotipo era causado por una mutación sin sentido C240X en el gen *FOXE3*, localizado en 1p32 (Valleix et al, 2006). *FOXE3* codifica un factor de transcripción esencial para el desarrollo del cristalino y, por lo tanto, del segmento anterior del ojo (Blixt et al, 2000).

Es importante resaltar que al momento de iniciar esta investigación (primer semestre de 2009) no se había descrito ningún gen responsable de esclerocórnea no sindrómica y de transmisión hereditaria autosómica recesiva.

1.7.3 Esclerocornea hereditaria en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala

En el estado de Tlaxcala se han identificado un municipio, San Francisco Tetlanohcan, que presenta características endogámicas (alta homonimia entre sus habitantes, aislamiento cultural y geográfico) en el que aparentemente existe una incidencia elevada de esclerocórnea de herencia autosómica recesiva (Vazquez, 2009 y Observaciones Personales, 2009). No se han realizado estudios para identificar la frecuencia real ni la causa genética de esta malformación ocular ni para estimar la frecuencia de portadores del gen mutante en tal población. Esta información sería de gran relevancia para profundizar en el conocimiento de las bases genéticas de las malformaciones congénitas oculares y para conocer las características epidemiológicas moleculares de la enfermedad en esta población.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que México es un país en donde existen ciudades con altas concentraciones humanas, también conserva poblaciones que favorecen la presentación de padecimientos genéticos autosómicos recesivos, que se manifiestan especialmente en poblaciones donde las dinámicas sociales (endogamia, matrimonios consanguíneos etc.) facilitan la perpetuación de éstos. Tal es el caso del municipio de san Francisco Tetlanohcan, en el Estado de Tlaxcala, en el que aparentemente existe una frecuencia elevada de casos con esclerocórnea de herencia autosómica recesiva. Esta anomalía se caracteriza por una falla en la delimitación entre el tejido corneal y el escleral, lo que conlleva a opacidad severa de la cornea y ocasiona ceguera en los afectados. En esta población no se han realizado estudios para identificar la prevalencia real de la enfermedad, para determinar su causa genética (gen responsable), o para estimar la frecuencia de heterocigotos (portadores) con riesgo de procrear hijos con la malformación ocular.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACION

¿Cuál es la prevalencia de sujetos con esclerocórnea en el Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Cuál es la alteración genética responsable de la esclerocórnea hereditaria en el Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Cuál es la prevalencia de portadores (heterocigotos) de la mutación genética responsable de la esclerocórnea en el Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala?

¿Hace cuánto tiempo se generó o cuándo ingresó al Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala la mutación que ocasiona la esclerocórnea?

4. JUSTIFICACIÓN

Los padecimientos que limitan severamente las funciones visuales ocasionan grave discapacidad al paciente y sus costos de atención son elevados, tanto para la familia como para los servicios médicos. En los casos en que estas enfermedades tienen una causa genética, se presenta además el riesgo de la transmisión familiar del padecimiento, con la posibilidad del aumento de la prevalencia de tal enfermedad.

Este estudio contribuirá al conocimiento de las bases genéticas de la esclerocórnea, así como al uso de herramientas genéticas e informáticas que permitan determinar hace cuánto tiempo se produjo o se introdujo la mutación en una población. Este proyecto además servirá como modelo para el estudio epidemiológico molecular de otras poblaciones de nuestro país en las que un efecto de gen fundador es responsable de la alta prevalencia de enfermedades hereditarias en ciertas áreas geográficas.

5. HIPÓTESIS

(De trabajo)

La esclerocórnea que se presenta en el municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala se debe a una mutación monogénica (autosómica recesiva) con efecto fundador y que no sigue los postulados de la Ley de Hardy-Weinberg, debido a las características de aislamiento geográfico y cultural y a la reproducción entre individuos de ascendencia común (endogamia) en esta población.

6. OBJETIVOS

1ª FASE.

Objetivo General

- Determinar la prevalencia de enfermos de esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

2ª FASE.

Objetivo General

- Determinar la mutación genética responsable de los casos de esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

Objetivos Específicos

- Realizar análisis molecular de los genes candidatos de esclerocórnea, *FOXC1* y *FOXE3*
- Confirmar mediante herramientas de análisis molecular, la causa genética de la esclerocórnea.

3ª FASE.

Objetivo General

- Estimar la prevalencia de portadores (heterocigotos sanos) de la mutación genética causante de la esclerocórnea en el municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

4ª FASE.

Objetivo General

- Establecer el tiempo transcurrido (“fechaje”) desde que la mutación causante de esclerocórnea se originó o ingresó a esta población.

Objetivos Específicos

- Determinar la fecha probable de origen de la mutación causante de la esclerocórnea en San Francisco Tetlanohcan, mediante análisis de haplotipos contiguos al locus responsable por los métodos de frecuencias alélicas y Estocástico.
- Evaluar el impacto de la migración y la endogamia en la presentación del padecimiento

7. METODOLOGÍA

1ª FASE.

Diseño de estudio

Censo

Se realizó una visita domiciliaria a todas las viviendas del municipio de san Francisco Tetlanohcan con apoyo de personal del DIF de la localidad. Se investigó acerca de la existencia de personas con deficiencia visual con el fenotipo de interés (con el apoyo de fotografía de un caso) y se realizó el conteo de la población (Unstats, 2010).

Los pacientes identificados con discapacidad visual fueron sujetos a una revisión médica por parte del investigador para determinar si se trataba de un caso de esclerocórnea y fueron confirmados por un médico especialista en oftalmología adscrito al Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana”. A los pacientes con diagnóstico clínico de esclerocórnea se les solicitó una muestra de células de la mucosa oral para obtención de DNA genómico y realización del análisis molecular (previa firma de consentimiento informado, Anexo A).

El instrumento de recolección esta dividido en tres componentes: la ficha de identificación del paciente, la historia clínica genética y el componente de migración. La ficha de identificación del paciente concuerda con los criterios de la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-168-SSA1-1998 (SSA, 1998), del expediente clínico. La historia clínica genética, contiene los apartados propios de una historia clínica concebidos en la norma mencionada anteriormente además del árbol genealógico; el componente de migración está integrado por siete preguntas utilizadas para este fin y validadas por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) (INEGI, 2005).

Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Ser paciente con esclerocórnea, habitante actual del Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.
- Aceptar Participar en el estudio

Criterios de Exclusión

No hay

Criterios de Eliminación

No hay

Análisis

El análisis descriptivo incluyó medidas de tendencia central y de dispersión de los datos de la población (edad y sexo), el análisis de los árboles genealógicos y la determinación del tipo de herencia, y la construcción de la prevalencia.

2ª FASE.

Diseño de estudio

Análisis de gen candidato

Se incluyó al total de los pacientes con esclerocórnea del municipio de san Francisco, Tetlanohcan de los que se obtuvo consentimiento para la toma de muestra de células de la mucosa oral.

De las muestras obtenidas en cada paciente se extrajo DNA genómico para la identificación de la(s) posible(s) alteración(es) genéticas.

Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Muestras de pacientes con esclerocórnea del Municipio de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

- Aceptar Participar en el estudio

Criterios de Exclusión

No hay

Criterios de Eliminación

Retiro del consentimiento

Muestra de DNA insuficiente

7.1 ANALISIS GENÉTICO

Para identificar la causa genética de la malformación ocular en esta población se realizó inicialmente la secuenciación nucleotídica automatizada de la región codificante completa de los genes candidatos, *FOXC1* y *FOXE3*, implicados previamente en malformaciones de segmento anterior del ojo (Valleix et al, 2006; Horsford, 2007; Arsson J, 1995; Lise-Schneider, 2007). *FOXE3* fue elegido dado el antecedente de esclerocórnea bilateral y otras malformaciones oculares en un sujeto con mutación en este gen (Valleix et al, 2006). *FOXC1* fue elegido como candidato debido a que es uno de los principales genes implicados en anomalías del segmento anterior en el humano (Nishimura et al, 2001; Sowden et al, 2007).

AISLAMIENTO DE DNA GENÓMICO: El DNA genómico de cada sujeto participante se aisló a partir de células de mucosa bucal obtenidas por raspado con hisopo y utilizando el Kit Puregene Buccal Cell Core Kit A (Qiagen) de acuerdo al siguiente procedimiento: Se incubó a 65°C por 1 hr el tubo eppendorf de 1.5 ml con 200 microlitros de buffer de lisis celular conteniendo el cepillo con que fue tomada la muestra. posteriormente se le adicionó 1.5 microlitros de Proteinasa K, se invirtió el tubo repetidamente y se incubó a 55°C por 1 hora. Se le adicionó 100 microlitros de Solución de Precipitación d Proteínas y se agito en vortex por 20 segundos. Acto seguido, el tubo se incubó en hielo por 5 minutos, después se centrifugó 3 minutos a 14,000 rpm y se colocó cuidadosamente el sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5 ml

nuevo con una solución de 300 microlitros de Isopropanol y 0.5 microlitros de glicógeno.

Se mezcló invirtiendo el tubo 50 veces y se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos, el sobrenadante se descartó en papel absorbente con cuidado de no perder el botón. Se adicionaron 300 microlitros de etanol al 70%, se invirtió varias veces para lavar el DNA y se centrifugó a 14,000 rpm por un minuto.

El sobrenadante fue desechado al invertir el tubo sobre papel absorbente con cuidado de no perder el botón y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos; se adicionaron 200 microlitros de solución de hidratación de DNA, se agitó en vortex por 5 segundos y se incubó a 65°C por una hora. Se incubó a temperatura ambiente toda la noche en agitación suave. Finalmente, el tubo con el DNA fue guardado a -20°C hasta su utilización. La calidad y concentración del DNA obtenido fue verificada mediante espectrometría a 260/280 nm.

AMPLIFICACIÓN POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):

Se efectuó la amplificación por PCR de cada uno de los exones y de las uniones exón/intrón de los genes candidatos, *FOXC1* y *FOXE3* a partir del DNA de los sujetos afectados y utilizando pares de oligonucleótidos derivados de la secuencia normal de cada gen (Tablas 2 y 3). El gen *FOXE3* está constituido por un solo exón codificante, que fue amplificado en 6 segmentos solapantes. Cada reacción de amplificación de PCR con un volumen final de 15 microlitros contenía buffer para PCR 1X, de 50-100 ngs de DNA genómico, 0.2 mM de cada uno de los cuatro dNTP's, 2.5 unidades de enzima TaqPolimerasa, 1mM del oligonucleótido correspondiente (sentido y antisentido), MgCl₂ entre 1 y 3 mM y agua bidestilada c.b.p. 25 microlitros. Se utilizó un programa de temperaturas que incluye 1 ciclo de 15 min a 95°C para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95°C, 1 min de alineamiento a temperaturas específicas para cada par de oligonucleótidos (Tablas 2 y 3) y 1 min a 72°C para la extensión. Por último, se realizó 1 ciclo a 72°C por 10 min para la extensión final. Los productos obtenidos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con tinción de bromuro de etidio para identificar las bandas

específicas con el producto amplificado, utilizando como referencia un marcador estándar de peso molecular de 100 pares de bases. Se reconocieron las bandas de interés y se cortaron del gel para la purificación del producto de DNA amplificado utilizando el método de purificación por columna (Qiagen).

Exón	Oligonucleótido	Tm	Tamaño amplicón
1	F-5' GCCGGGCCCCGGACTCGGACT 3'	74.3°C	181 pb
	R-5' TTC TCGGTCTTGATGTCCTG 3'		
2	F-5' TGCACCTCAAGGAGCCGCCC 3'	77.7 °C	161 pb
	R-5' TCGTCCACGGCCGAGCCGCC 3'		
3	F-5' TACAGCTCCCCCTGCAGCCA 3'	67 °C	307 pb
	R-5' CGCTGGTGTGGTGAATATTC 3'		

Tabla No. 2. Oligonucleotidos para la amplificación por PCR del gen FOXC1

Exón	Oligonucleótido	TM	Tamaño amplicón
1a	F-5' TTGGGAATGATCCAAAGGAG 3'	59.86 °C	194 pb
	R-5' GGCAGGGAAGCCAGAGAA 3'		
1b	F-5' GGGGCCGTGTCCATATAAAG 3'	59.9 °C	381 pb
	R-5' AAGCTGCCGTTGTCTGAAC 3'		
1c	F-5' AACGACTGCTTCGTCAAGGT 3'	59.1 °C	531 pb
	R-5' GCGCAGGCTCACAGGTAG 3'		
1d	F-5' GCGCAGGCTCACAGGTAG 3'	59.1 °C	237 pb
	R-5' ACTCACTGGAGGCGAGTCA 3'		
1e	F-5' ACAGAAGCGTCCCCTTTGAC 3'	60.1 °C	288 pb
	R-5' AGGCAGCCAGGTGTGTCTAC 3'		
1f	F-5' TCCTGGGTTTCATGACTTACTTG 3'	57.3 °C	244 pb
	R-5' CCATGTGGCAACCCAAGAT 3'		

Tabla No. 3. Oligonucleotidos para la amplificación por PCR del gen FOXE3

7.1.1 SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DIRECTA DE LOS GENES *FOXC1* y *FOXE3*

Se realizaron nuevas reacciones de PCR para la secuenciación nucleotídica de cada uno de los exones de los genes incluyendo las uniones exón/intrón. Cada reacción de 10 microlitros contenía 2 microlitros del reactivo BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) con los cuatro dideoxynucleótidos trifosfatados (ddNTPs) marcados por fluorescencia, deoxynucleótidos trifosfatados (dNTPs) no marcados, Tris-HCl (Ph 9.0), MgCl₂ y la enzima ampliTaQ polimerasa; se agregó además 1 microlitro del oligonucleótido correspondiente (sentido o antisentido) a una concentración de 10 micromolar, 10-20 ngs del DNA de cada producto de PCR como templado y agua bidestilada para un volumen final de 10 microlitros. Para esta reacción de PCR se utilizó un programa de 25 ciclos que incluyeron 30 segundos a 97°C para la desnaturalización, 15 seg a 50°C para el alineamiento y 4 min a 60°C para la extensión.

Los productos de esta segunda amplificación de PCR se purificaron por medio de columnas Centri-Sep (Applied Biosystems) para eliminar el exceso de oligonucleótido y de ddNTPs fluorescentes. Cada muestra se resuspendió en 20 microlitros de formamida y posteriormente la muestra se desnaturalizó a 95°C por 5 min. Los productos se analizaron por electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems) y las secuencias de DNA obtenidas en sujetos enfermos se compararon con las secuencias silvestres de los genes *FOXC1* y *FOXE3* para identificar posibles mutaciones. Para excluir que los cambios identificados correspondieran a polimorfismos no asociados a la enfermedad, se analizó el DNA de 150 sujetos (300 alelos) sin malformaciones oculares procedentes del Banco de DNA de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Conde de Valenciana” de los cuales se realizaron 260 alelos por medio de la enzima de restricción FOKI y 40 alelos por secuenciación directa.

7.1.2 ANALISIS DE PREDICCIÓN FUNCIONAL DE MUTACIONES

La mutación identificada como responsable de la enfermedad fue analizada mediante el programa de computación Polyphen (polymorphism **phenotyping**, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) para estimar la posibilidad de que tal cambio produjera daño a la proteína y por lo tanto fuera causante de la enfermedad. Para fines similares, la conservación entre especies del residuo proteico afectado por la mutación se determinó mediante el alineamiento de proteínas de otras especies con este mismo programa.

Los criterios de patogenicidad de la mutación en este estudio incluyeron:

- La presentación de la mutación del gen en DNA de los sujetos afectados y la ausencia de este cambio en DNAs de referencia de sujetos sin la enfermedad.
- Mutación homocigota en todos los pacientes con la alteración, de acuerdo al patrón de herencia autosómico recesivo.
- Efecto deletéreo de la mutación: este aspecto está relacionado con el efecto de la mutación en la proteína final y se evaluó como se mencionó previamente utilizando el programa *Polyphen*.
- Conservación filogenética del residuo en la proteína: Se analizará si el residuo cambiado (generalmente en las mutaciones de sentido equivocado) está conservado entre la proteína homóloga de diferentes especies. La conservación filogenética apoya que la modificación del residuo particular está implicada en la presentación del fenotipo.

3ª FASE.

Diseño de estudio

Trasversal

Criterios de Selección

Criterios de Inclusión

- Ser habitante de la vivienda de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala seleccionada por el muestreo aleatorio.
- Aceptar Participar en el estudio.
- Ser mayor de edad.

Criterios de Exclusión

No hay

Criterios de Eliminación

Retiro del consentimiento

Se realizó una encuesta domiciliaria así como la toma de muestras de células de mucosa oral las cuales se usaron para el análisis molecular a fin de identificar la alteración en aquellos sujetos sanos que presenten la mutación en estado de portadores (heterocigotos).

7.2 Determinación de portadores en el Municipio.

Tamaño de la muestra

El municipio de San Francisco Tetlanohcan tiene una población de 10,035 habitantes (INEGI Cuéntame, 2005). Estos habitantes viven en 1,998 viviendas de acuerdo a los datos de último conteo de población realizado por el INEGI en el año 2005.

Al conocer la población utilizamos la formula de Poblaciones Finitas (Schaeffer, 1990), de donde se obtuvo un valor de ≈ 408 personas (371 personas + 10%).

$$n = \frac{Z^2 P Q N}{(N - 1) E^2 + Z^2 P Q}$$

Donde:

n= Tamaño de Muestra

Z= Valor Z curva normal (1.96)

P= Probabilidad de éxito (0.50)

Q= Probabilidad de fracaso (0.50)

N= Población (10,035)

E= Error muestral (0.05)

Muestreo

Se realizó un muestreo aleatorio simple sobre las Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEBs) actualizadas del Estado de Tlaxcala/San Francisco Tetlanohcan (SINCE/INEGI, 2010). Se utilizaron las AGEBs ya que son la base del marco muestral nacional oficial y permiten realizar un muestreo objetivo además de facilitar el ejercicio de muestreo sobre una base geoestadística validada (INEGI, 2010). El muestreo se realizó en el total de viviendas del cálculo de la muestra, se aplicó el instrumento de recolección y la toma de muestras del padre, madre de familia o habitante mayor de edad. En las viviendas que no fue posible realizar el muestreo (por fallecimiento, migración, etc.) se procedió a levantar la información en la siguiente casa al norte de la casa considerada inicialmente, hasta un máximo de tres viviendas. Cuando ninguna de éstas cumplió con los criterios, se tomó como pérdida (Alba J, 1993).

Análisis

El análisis se realizó con medidas de tendencia central y de dispersión de los datos de población; se estimaron los intervalos de confianza de esta

prevalencia. Se determinaron las frecuencias alélicas en la población, los años promedio entre el nacimiento del primer hijo y la edad del padre para la determinación de los años de la “Generación”, así como los datos de Migración (Tremblay et al, 2000).

4ª FASE.

Diseño de estudio

Análisis de desequilibrio del ligamiento

Determinación del tiempo de origen de la mutación (Fechaje)

Para estimar el tiempo de origen de la mutación (Fechaje probable de la mutación), se analizaron marcadores polimórficos que flanquean al gen mutante. Se incluyeron marcadores localizados 3 megabases antes y 3 megabases después del locus responsable (Bliznetz, 2009; Mapview,2010) (anexo E) y se compararon los genotipos en los sujetos con la mutación mediante el programa DMLE+2.0 (www.dmle.org) que estima el desequilibrio de ligamiento entre marcadores polimórficos y una mutación determinada (Mor-Cohen, 2007). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por medio del método de frecuencias alélicas (Slatkin, 1997; Reeve, 2002; Pollak, 1986).

Los marcadores consistieron en 16 polimorfismos de base única (SNPs) y un microsatelite (Tabla 4) y fueron seleccionados de la base de datos de la Universidad de California en Santa Cruz (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg19&position=Chr1:45480329-45481329>).

La evaluación de la migración y la endogamia en la presentación de los casos de esclerocórnea se realizó con las estimación de las tasa de migración e inmigración de portadores y enfermos. La determinación del efecto de la endogamia y consanguinidad se realizó con las tasas de reproducción de casos de esclerocórnea (CONAPO, 2010).

Marcador	Posición (mb)
rs1778904	44,705
rs13948	45,480
rs7524495	46,266
rs439283	46,809
rs2404610	47,001
rs119759	47,481
rs9333051	47,394
rs2405588	47,491
rs9436873	47,778
FOXE3	47,881
rs3046918 (microsatélite)	47,907
rs11211573	48,082
rs11211587	48,133
rs1155279	48,378
rs492379	48,673
rs1343426	49,465
rs12735833	50,008
rs1502857	50,740

Tabla 4. Marcadores genéticos utilizados para la identificación de los haplotipos originados por recombinación meiótica y determinación de la antigüedad de la mutación en la población (fechaje).

7.3 Variables

Variables de tiempo

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición Operativa	Clasificación
Fecha	Fecha probable de la aparición de una mutación	Numero de generaciones ocurridas desde la aparición de la mutación	Cuantitativa Continua
Generación	Periodo comprendido entre el nacimiento y el periodo promedio del inicio de reproducción del individuo	Periodo transcurrido en años promedio, entre el nacimiento del individuo y la edad a la que tienen su primer hijo	Cuantitativa Continua

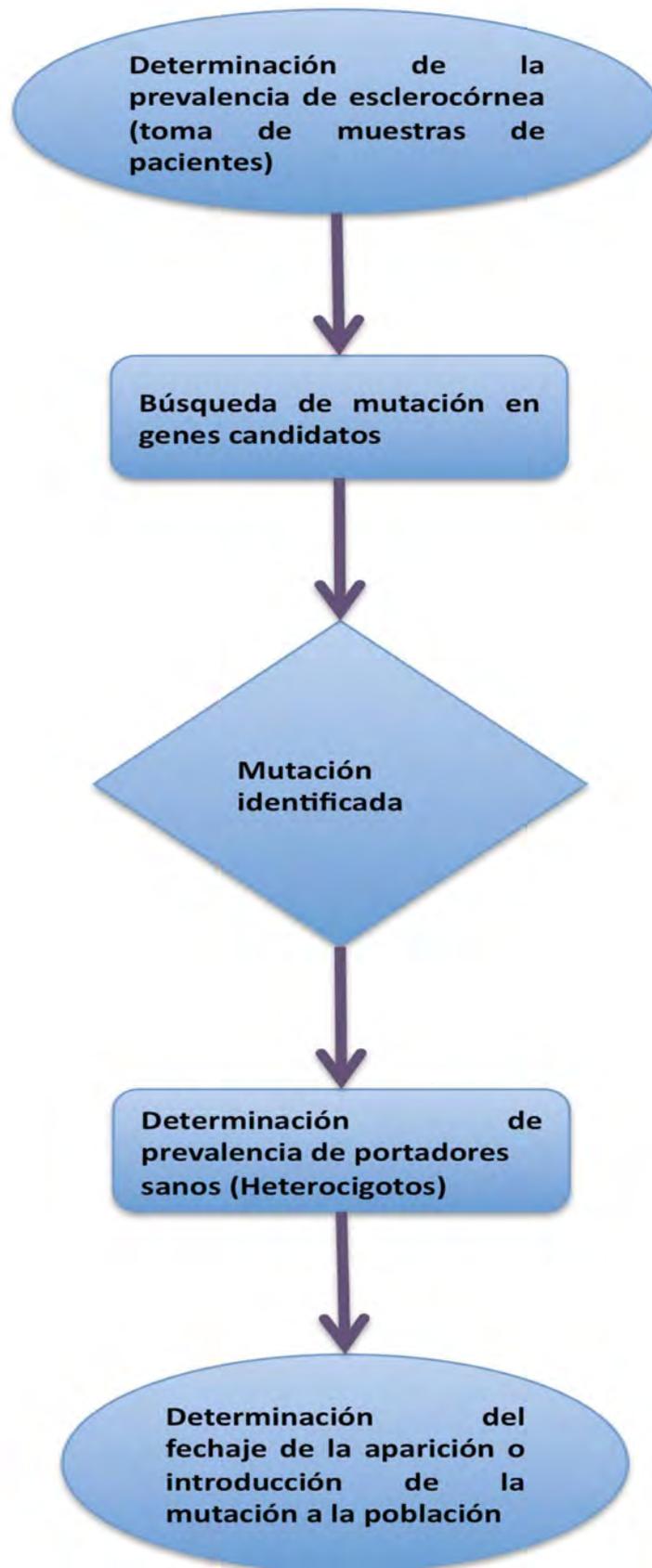
Variables de lugar

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición Operativa	Clasificación
Migración	Desplazamiento de población que tiene lugar desde un lugar de origen hacia otro destino, y que implica un cambio de la residencia habitual	Salida de la localidad para residir de forma permanente en otro municipio, estado o país	Cuantitativa continua
Inmigración	Entrada a un lugar de personas que nacieron o proceden de otra población.	Proporción de llegada de otros municipio, estado o país a la localidad con intención de residir de forma permanente	Cuantitativa continua
Lugar de nacimiento	Es la entidad federal, país o territorio extranjero donde nació la persona	Lugar en donde nació el individuo	Cualitativa Politómica
Tiempo de migración	Tiempo trascurrido entre la salida del individuo al momento de la medición	Periodo de tiempo trascurrido entre la salida de la persona y la fecha del levantamiento del instrumento de recolección	Cuantitativa discreta
Tiempo de inmigración	Tiempo trascurrido entre la llegada del individuo al momento de la medición	Periodo de tiempo trascurrido entre la llegada de la persona y la fecha del levantamiento del instrumento de recolección	Cuantitativa discreta
Tasa de Migración	Proporción de personas que salen de la localidad permanentemente respecto de la población	Proporción de personas que salen de la localidad permanentemente respecto de la población	Cuantitativa continua
Tasa de inmigración	Proporción de personas que llegan a la localidad permanentemente respecto de la población	Proporción de personas que llegan a la localidad permanentemente respecto de la población	Cuantitativa Continua

Variables de persona

Nombre de la variable	Definición conceptual	Definición Operativa	Clasificación
Prevalencia de esclerocórnea	Proporción de casos existentes esclerocórnea por una constante poblacional	Proporción de casos existentes de esclerocórnea	Cuantitativa continua
Prevalencia de portadores	Proporción portadores existentes de la mutación genética de esclerocórnea por una constante poblacional	Proporción de casos existentes de algún padecimiento	Cuantitativa continua
Caso de Esclerocórnea	Paciente sin limitación de la cornea y la esclera de forma total	Paciente con ceguera debida a ocupación de la esclera en la zona de la cornea	Cualitativa dicotómica
Mutación	Alteración o cambio en la información genética de un ser vivo	Ausencia del cambio en DNAs de referencia. Transmisión mendeliana de la mutación. Efecto deletéreo de la mutación.	Cualitativa dicotómica
Portador de la mutación	Individuo con un alelo mutante y un alelo normal (heterocigoto)	Pacientes sin esclerocórnea que presentan en uno de los alelos la mutación genética causante de la esclerocórnea	Cualitativa dicotómica

7.4 Esquema general



8. Ética

De acuerdo con los artículos 14, 20, 21, 22, 25 y 36 (SSA, 2006) de la Ley General de Salud con los que se rige las instituciones de salud de México, se solicitó a todos los participantes su autorización por medio de una carta de consentimiento informado (ANEXO A). En el caso de los menores de edad, esta carta fue firmada por los padres o tutores. Para el caso de los pacientes que no hablasen español se contó con apoyo para la traducción por parte de personal de la comunidad. Los datos obtenidos fueron utilizados de forma agrupada garantizando el cualquier momento la confidencialidad de los participantes. El protocolo fue evaluado y aprobado por los comités de Investigación y Bioética del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana".

Recursos Financieros

El proyecto fue financiado por el fondo de investigación del Patronato del Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana".

9. RESULTADOS

9.1 Fenotipo

Todos los pacientes identificados en el municipio (n=22) presentaron un cuadro uniforme de malformación congénita ocular bilateral caracterizada por ausencia de estructuras corneales identificables, sin delimitación anatómica limbal entre la córnea y la esclera (Fig. 3A - F). Ninguno de los pacientes presentó malformaciones extra-oculares ni discapacidad intelectual, por lo que se estableció un diagnóstico de esclerocórnea total, bilateral, no sindrómica. Otros hallazgos identificados durante la exploración oftalmológica especializada en este grupo de sujetos incluyeron córnea plana, ausencia de cámara anterior del ojo, queratomalacia, ectropión (Fig. 3G) y aumento de la presión intraocular (en pacientes no adultos) medida por digitopresión. La escleralización corneal no permitió efectuar una inspección de fondo de ojo. En todos los casos en los que fue posible evaluar la agudeza visual, ésta varió de percepción de luz a movimiento de manos, indicando discapacidad visual severa. El estudio de ultrasonografía ocular en 5 afectados reveló malformaciones oculares asociadas, específicamente disminución del eje antero-posterior del ojo (microftalmia bilateral), ausencia bilateral de cristalino (afaquia congénita) y coloboma bilateral del disco óptico (Fig. 4). El análisis de los árboles genealógicos apoyó una transmisión hereditaria autosómica recesiva (Fig. 5), se observaron algunos casos de padres afectados en los que toda su descendencia heredó la enfermedad (Fig. 5).

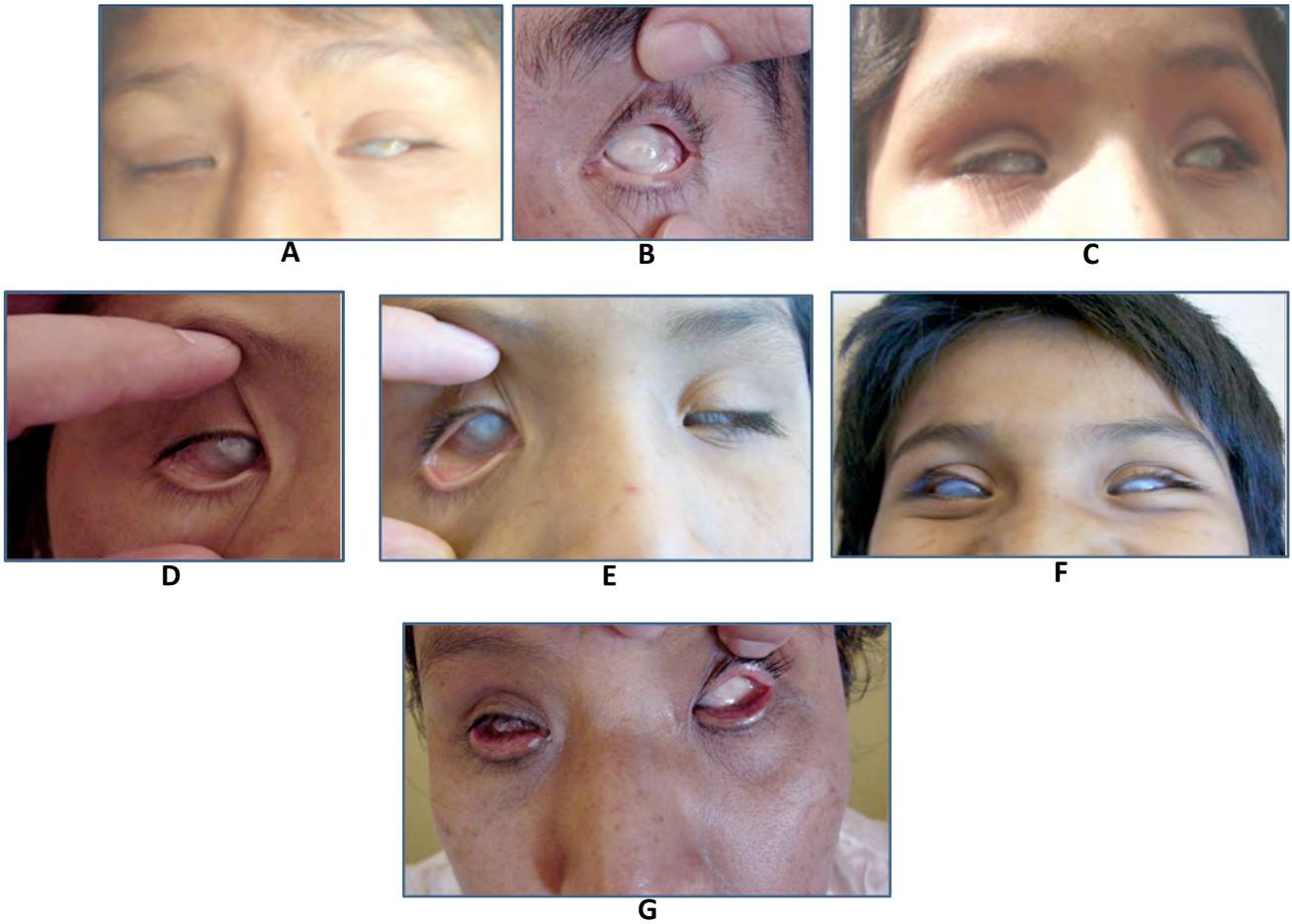


Figura 3. A – F Esclerocórnea total bilateral en habitantes de san Francisco Tetlahnocan, Tlaxcala. Se observan opacidad corneal severa con pérdida de la delimitación limbo-corneal . G. Queratomalacia y ectropión en uno de los casos.



Figura 4. Ecografía ocular (ojo derecho) en un paciente con esclerocórnea total. Se demuestra afaquia congénita y coloboma del disco óptico.

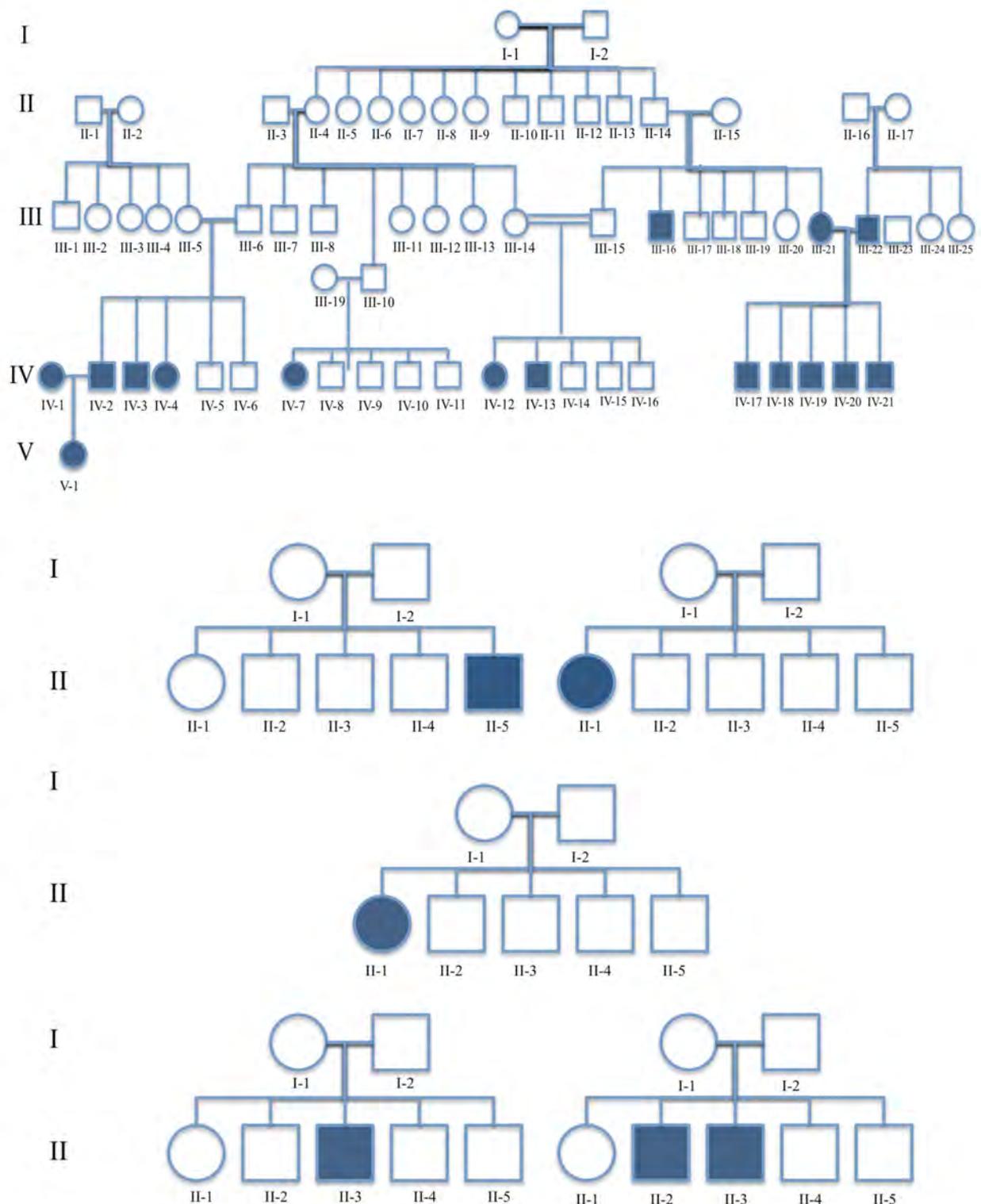


Figura 5. Árboles genealógicos de los casos de esclerocórnea de san Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala. Se observa una transmisión autosómica recesiva y dos casos de padres con la enfermedad con la totalidad de su descendencia afectada, en el árbol superior. (III-21/III-22 y IV-1/IV-2).

9.2 Actividades de Campo

Fue censada una población total de 7,438 personas habitantes del municipio de aquellos domicilios donde se nos proporcionó información. Se visitaron un total de 1,907 casas con los resultados siguientes:

- Casas censadas: 1,327
- Casas Ausentes: 231
- Casas deshabitadas: 165
- Casas renuentes: 25
- Casas en construcción: 159

Sobre esta base poblacional se localizaron un total de 22 pacientes con el fenotipo de esclerocórnea bilateral.

De acuerdo al número de casos identificados con esclerocórnea y sobre la base poblacional observada, se obtuvo una prevalencia de 2.96 casos por cada 1,000 habitantes.

Para determinar el número de casos de esclerocórnea por nacimiento se realizó también una búsqueda en el registro civil del número de nacimientos anuales en la población. Del año 2004 al año 2008 se estableció una media de nacimientos vivos anuales de 242.2 al año (esto debido a que el registro civil del San Francisco Tetlanohcan inició actividades en 2004, puesto que antes se llevaba el registro en la localidad vecina de Santa Ana Chiautempan) y de acuerdo a la edad del caso de esclerocórnea mas antiguo se estimó una tasa de "1" caso por cada 12,626 nacidos vivos el cual es mayor que el referente a la tasa publicada referida ($p=0.0001$) de tres casos por 100,000 nacidos (de todas las opacidades corneales entre la cuales se consideró a la esclerocórnea (Luresia, 2009)).

Datos demográficos

De acuerdo al sexo de los pacientes, los casos de esclerocórnea fueron predominantemente varones con un 64% (Fig. 7).

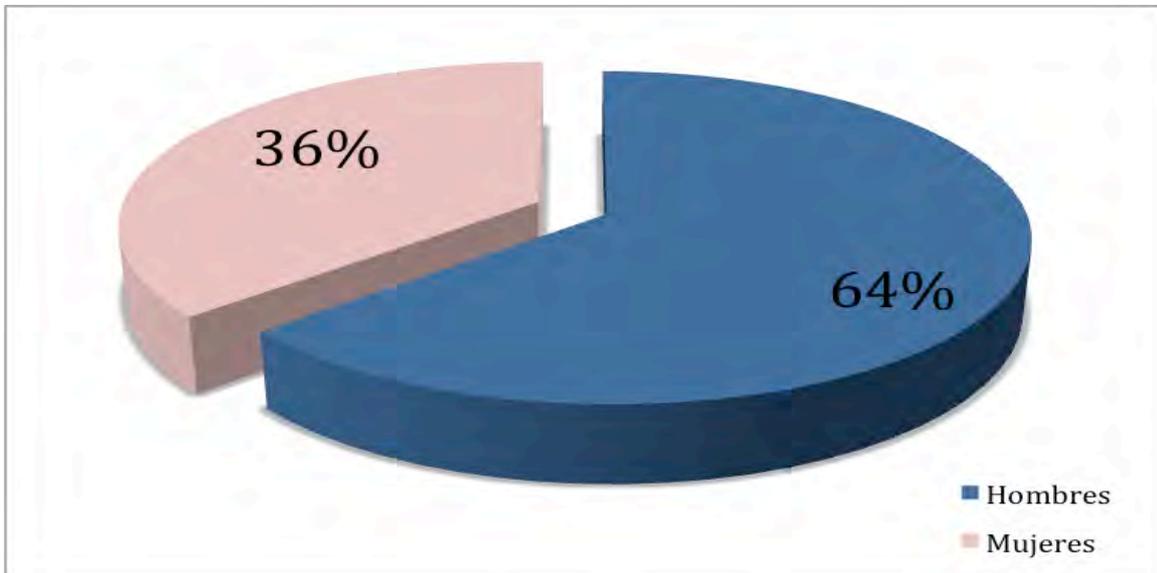


Figura 7. Distribución de casos de esclerocórnea

Respecto al grupo etáreo de los pacientes, los individuos de 25 a 44 años constituyeron el grupo más numeroso, seguido del grupo de 14 a 24 años y del de 45 a 64 años de edad (Fig. 8).

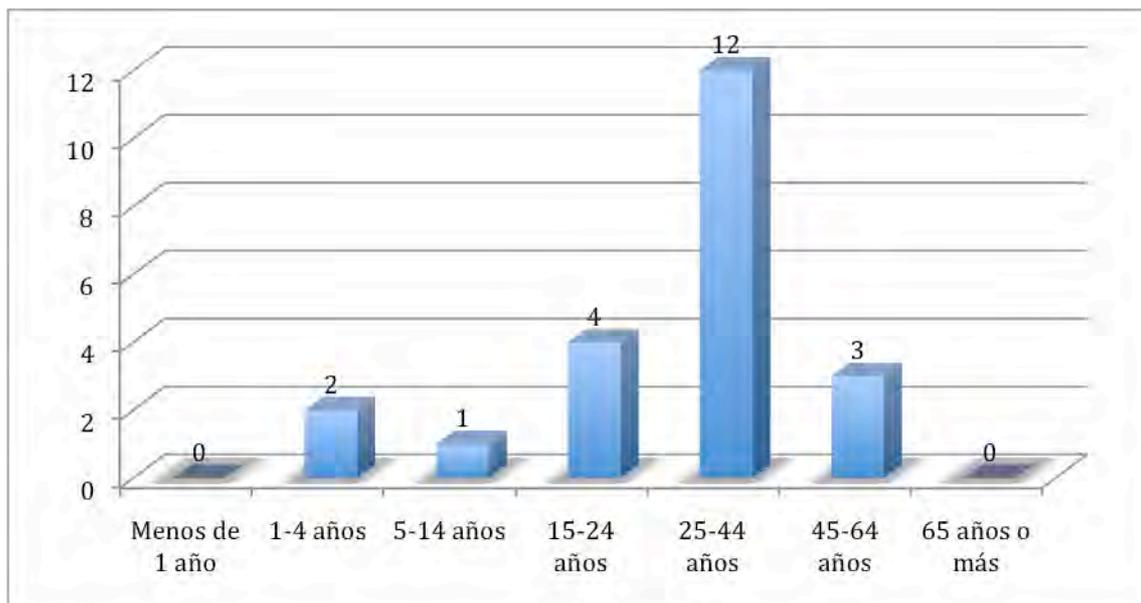


Figura 8. Distribución de casos de esclerocórnea de acuerdo a su grupo etáreo

9.4 SEGUNDA FASE

9.4.1 Análisis molecular

El análisis por secuenciación nucleotídica del gen *FOXC1* en el DNA de uno de los afectados no demostró mutaciones deletéreas. En cambio, la secuenciación nucleotídica del gen *FOXE3* permitió identificar una mutación homocigota de Timina a Citosina en la base 292 que predice un cambio de Tirosina (TAC) a Histidina (CAC) en el aminoácido 98, Tir98His (Fig. 9). Esta mutación fue confirmada en la cadena complementaria de DNA.

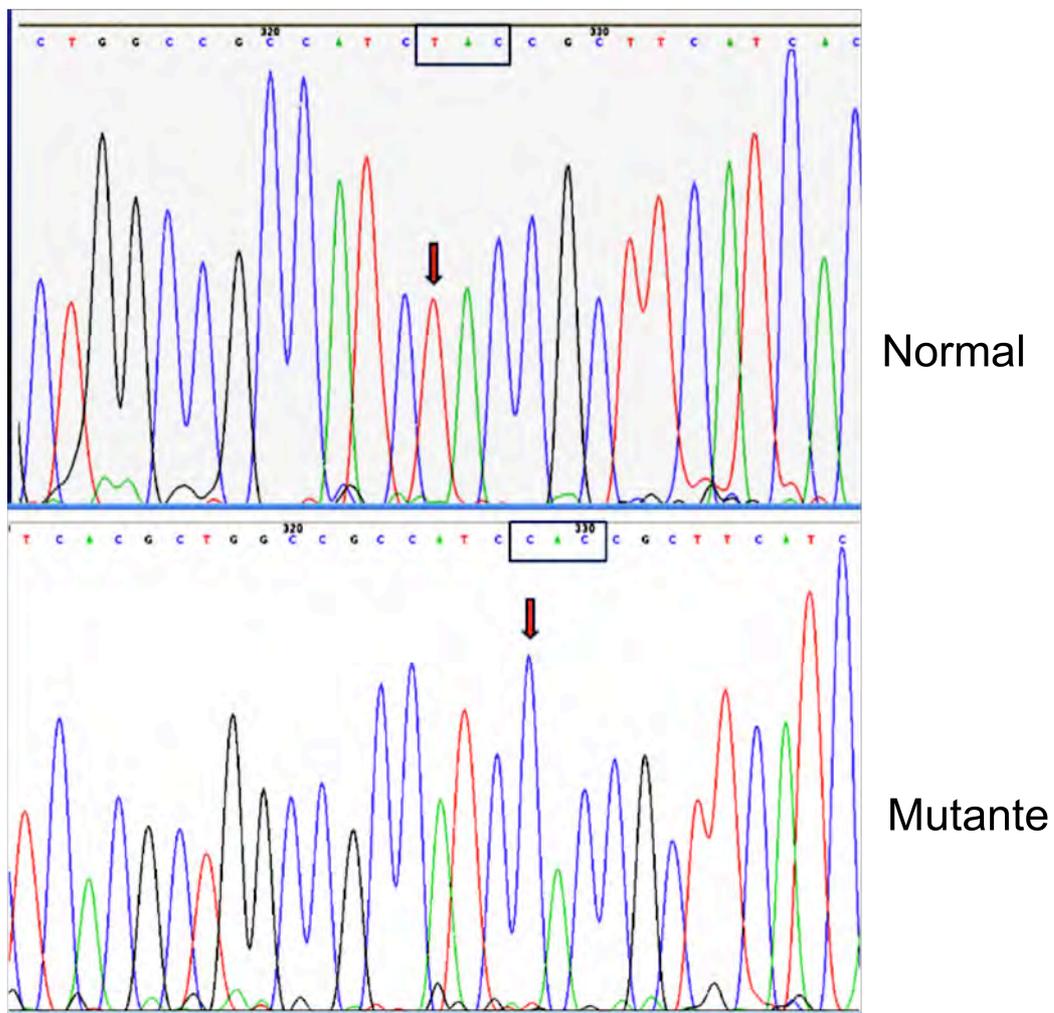


Figura 9. Secuenciación nucleotídica parcial del gen en FOXE3 en DNA de un sujeto con esclerocórnea. La flecha señala la mutación c.292 T>C en estado homocigoto (panel inferior). Se muestra la secuencia nucleotídica normal en un DNA control (panel superior).

La mutación c.292 T>C fue identificada en estado homocigoto en el DNA de todos los casos de esclerocórnea disponibles para estudio molecular (n=17). El análisis en el DNA de los padres sanos de algunos de éstos pacientes demostró la mutación, invariablemente en estado heterocigoto.

9.5 Análisis de Predicción funcional de la mutación Tir98His (p.Y98H) en FOXE3

La predicción *in silico* del efecto de la mutación Tir98His (p.Y98H) en FOXE3 fue realizada con el programa informático *Polyphen*. Como se observa en la Fig. No. 10, esta sustitución fue considerada como posiblemente dañina por el programa. La diferencia de puntuación PSIC (*position-specific independent counts*) fue de 1.997. Mientras mayor sea la diferencia de puntuación PSIC, mayor es el impacto funcional que posiblemente tenga una sustitución de un aminoácido particular. Una sustitución con una diferencia de puntuación PSIC mayor de 1.5 es considerada dañina (De Alencar y Lopes, 2010).

Query					
Acc number	Position	AA1	AA2	Description	
Q13461	98	Y	H	RecName: Full=Forkhead box protein E3; AltName: Full=Forkhead-related protein FKHL12; AltName: Full=Forkhead-related transcription factor 8; Short=FREAC-8; LENGTH: 319 AA	
Prediction					
This variant is predicted to be possibly damaging					
Prediction	Available data	Prediction basis	Substitution effect	Prediction data	
possibly damaging	alignment	alignment	N/A	PSIC score difference: 1.997	
Details					
SEQUENCE FEATURES OF THE SUBSTITUTION SITE					
Region	Site	Feature table	Critical sites		
N/A	N/A	show FT fields for Q13461	N/A		
PSIC PROFILE SCORES FOR TWO AMINO ACID VARIANTS					
Score1	Score2	Score1-Score2	Observations	Diagnostics	Multiple alignment around substitution position
+1.748	-0.249	1.997	383	precomputed	Sequences: <input type="text" value="all"/> Flanks: <input type="text" value="25"/> <input type="button" value="Show alignment"/>
MAPPING OF THE SUBSTITUTION SITE TO KNOWN PROTEIN 3D STRUCTURES					
Database	Initial number of structures	Number of structures			
PQS	24	0			

Figura 10. Predicción con el programa informático Polyphen de posible efecto de la sustitución p.Y98H en la proteína FOXE3. Se obtuvo una puntuación PSIC de 1.997 que corresponde a una variante muy probablemente deletérea.

Se realizó el análisis de 300 alelos control y en ninguno de ellos se identificó la mutación c.292 T>C de *FOXE3*. La genotipificación de estos alelos fue realizada por PCR-RFLP (260 alelos) con la enzima *FOKI* y por secuencia directa (40 alelos).

Se realizó el alineamiento de la secuencia parcial de residuos de la proteína *FOXE3* de diversos vertebrados mediante el programa Vertebrate Multi Alignment de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC, 2011) identificando la alta conservación filogenética de la tirosina 98 (Fig. 11).

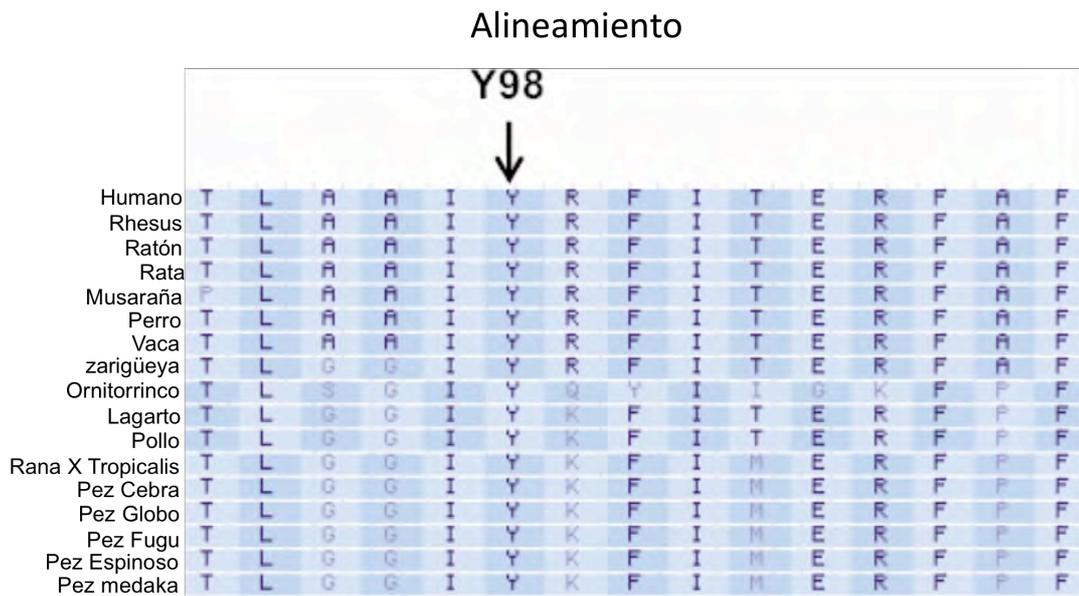


Figura 11. Alineamiento de residuos de la proteína *FOXE3* de diferentes especies de vertebrados. La flecha señala el residuo tirosina (Y), que está invariablemente conservado en la posición correspondiente de todas las proteínas *FOXE3* analizadas.

Los datos anteriores demuestran que la mutación Tir98His en *FOXE3* es la causa de la esclerocórnea autosómica recesiva en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

9.6 TERCERA FASE

Para la identificación de la frecuencia de portadores y de acuerdo al muestreo establecido, se realizaron 405 entrevistas y tomas de muestras de células de mucosa oral para extracción de DNA. Después del análisis por secuencia

directa de estas 405 muestras, se identificaron un total de 10 sujetos heterocigotos para la mutación c.292 T>C de *FOXE3*. Estos resultados arrojan una prevalencia de 2.46 (1.26 - 4.35) portadores por cada 100 habitantes en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

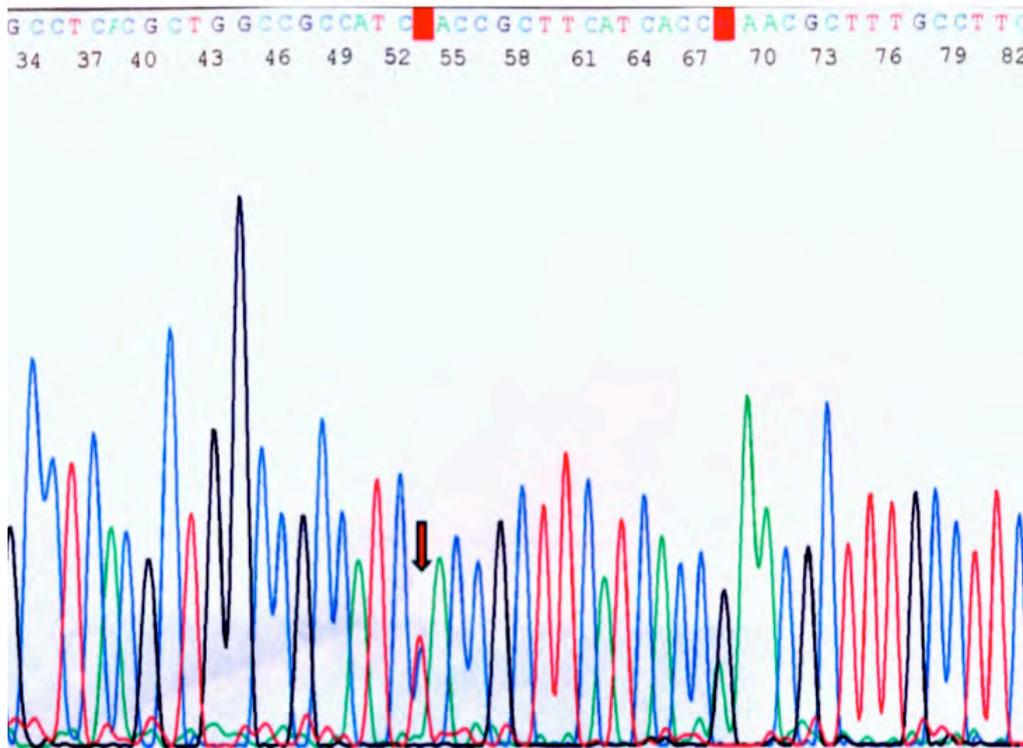


Figura 12. Secuencia nucleotídica parcial del gen *FOXE3* en DNA de un sujeto portador. La flecha señala la mutación c.292 T>C en estado heterocigoto

De acuerdo a estos datos la frecuencia genotípica fue la siguiente:

TT = 97.24 % (homocigotos normales)

T/C= 2.46% (heterocigotos)

De acuerdo a estas frecuencias genotípicas, se calcula una probabilidad de encontrar un heterocigoto cada 40 personas y la probabilidad teórica de un empate aleatorio entre dos heterocigotos fue calculada en 1 de cada 1,600 empates.

9.7 Migración

9.7.1 Inmigración

El porcentaje de personas que son originarias del municipio fue de 82.7% (78.8-86.7). Un 17.3% de los entrevistados son originarios de otros municipios de Tlaxcala (9.14%), principalmente de los Municipios de La Magdalena Tlaltelulco y Chiautempan (Fig. No. 13). Los estados del País del que provienen los entrevistados fueron principalmente del Distrito Federal (3.3%), seguido del estado de Puebla (2.2%), Estado de México (1.0%), San Luís Potosí (1.0%) y Veracruz (0.5%).

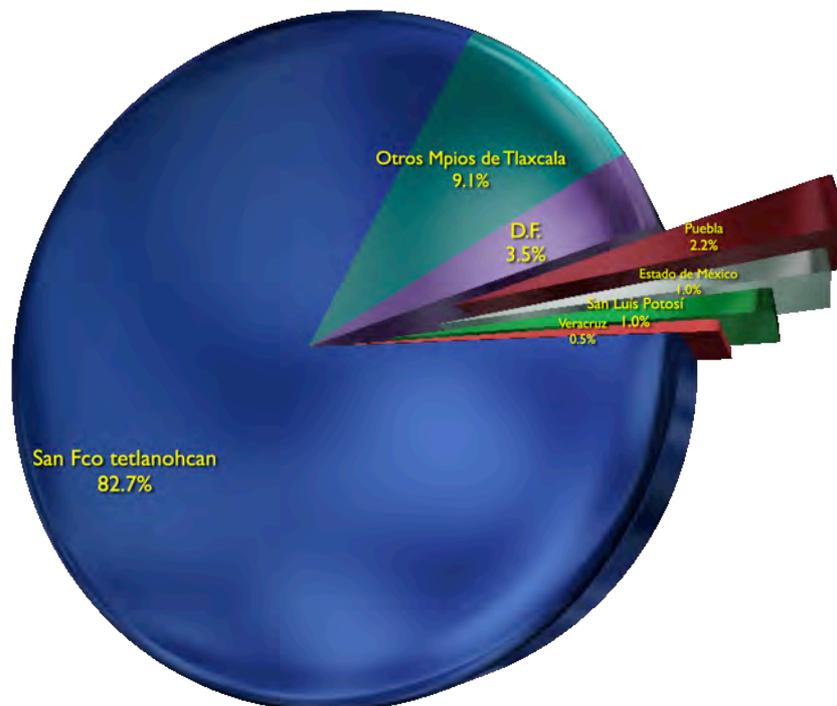


Figura 13. Distribución de los lugares de donde son originarios los habitantes de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

9.7.2 Emigración

De acuerdo a la encuesta aplicada, 19.24% de la población emigra del Municipio. La mayoría de los emigrantes (42.67%) tiene como destino los Estados Unidos de America (principalmente la ciudad de Nueva York), mientras que el restante 57.33% emigra a otros municipios de Tlaxcala y de otros estados del País, principalmente Puebla y el Estado de México.

La tasa de migración neta calculada para la población fue negativa, con un valor de -19.4, es decir esta población perdió 19.4 personas por cada 1,000 residentes en los últimos 5 años.

Inmigración	Emigración	Tasa neta*
17.3	19.24	-19.4

* X 1000

9.8 Origen de los heterocigotos

El 100% de los individuos heterocigotos, así como sus padres, fueron originarios del municipio. El 55.3% de estos sujetos informó que sus abuelos eran originarios del municipio (n=21), mientras que en el resto eran originarios de otros municipios principalmente de Santa Ana Chiautempan 26.3% (n=10), Magdalena Tlaltelulco 13.2% (n=5), San Lorenzo, 2.6% (n=1) y Apizaco 2.6% (n=1). En dos casos, el heterocigoto no pudo recordar el origen de uno de los abuelos.

9.9 Patrón de segregación

9.9.1 Determinación de la ley de Hardy-Weinberg

La estimación del patrón de la segregación alélica, se realizó de acuerdo a la prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (Pierce, 2009), en la que se encontró

que las diferencias entre los valores observados y los esperados según la hipótesis de equilibrio fueron significativas ya que el valor de p encontrado fue calculado menor de 0.05, es decir la población estudiada no se encuentra en equilibrio ya que el patrón de segregación alélica no fue aleatorio.

Prueba	Valor	p
Chi cuadrada	235.3	0.001

9.9.2 Definición de Generación

Con la información obtenida con el instrumento de recolección se determinó el número de años que conformaban una generación en esta población.

Se considero la edad del padre al momento de tener el primer hijo, la cual fue en promedio de 20.7 años y de acuerdo a este resultado, la generación se calculó en 21 años.

9.9.3 Endogamia

Para la determinación de endogamia, fue calculado el coeficiente de consanguinidad (F), éste coeficiente de fue calculado a partir de las frecuencias genotípicas (Pierce, 2009), el valor encontrado fue de:

$$F = 0.825.$$



Figura 14. Determinación de endogamia en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

9.10 CUARTA FASE

Para la determinación de tiempo en que fue introducida o se generó la mutación en la población, se realizó la genotipificación de 17 marcadores genéticos polimórficos que flanquean al locus de la mutación en 1p32 (gen FOXE3). Estos marcadores están distribuidos en un segmento de 6 Mb, aproximadamente 3 Mb a cada lado de FOXE3. Se genotipificaron 17 polimorfismos (Tabla No.4) en el DNA de 17 individuos (34 alelos) con esclerocórnea. Se identificaron 3 haplotipos distintos: un haplotipo específico fue observado en 30 alelos, un segundo haplotipo se observó en 3 alelos y un tercer haplotipo fue identificado en un solo alelo (Fig No. 15).

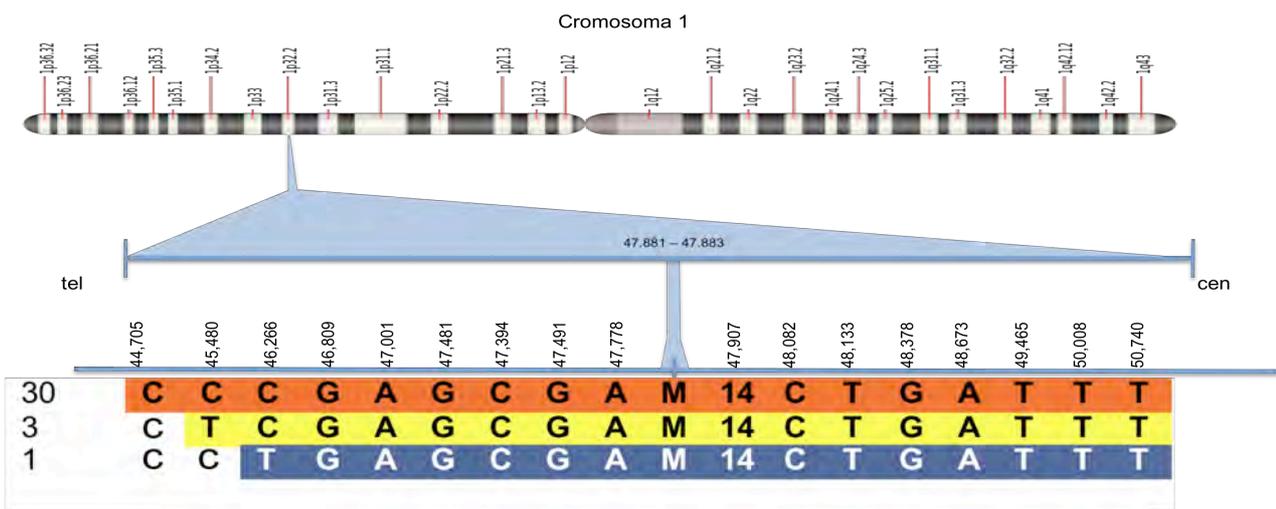


Figura 15. Haplotipos en 1p32 en los pacientes con esclerocórnea de San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala. El haplotipo mostrado en rojo fue el más frecuente ya que se identificó en 30 alelos. Se observaron 2 haplotipos adicionales, uno de ellos identificado en 3 alelos (amarillo) y otro observado en un solo alelo (azul). (M) señala la ubicación del gen FOXE3 cuya mutación es responsable de la malformación ocular en estos pacientes.

La tasa de recombinación, necesaria para la estimación del fechaje, fue determinada a partir del número de casos observados y a la población de referencia. La tasa obtenida fue de 0.0029.

Ya que esta tasa se encuentra asociada a la aparición del fenotipo causado por la mutación, esta tasa nos permite conocer el número de mutaciones por unidad biológica (es decir por persona), en este caso conocida como ronda de replicación (Pierce, 2009).

El cálculo por frecuencias alélicas corregido de acuerdo a Luria y Delbrück (Luria, 1943), fue de 6.21 generaciones lo que corresponde a un total de 130 años.

Con lo anterior, se calculó la fecha de ingreso o generación de la mutación en el programa DMLE (version 2.14) arrojando un total de 5.4 generaciones lo que corresponde a un total de 113 años.

10. DISCUSIÓN

La epidemiología molecular es una rama de la medicina que se enfoca al estudio de la contribución de factores de riesgo genéticos y ambientales, identificados a nivel molecular, en la etiología, distribución y prevención de las enfermedades, dentro de familias o en poblaciones completas. Este campo ha emergido de la integración de la biología molecular a la investigación epidemiológica tradicional. La epidemiología molecular ha mejorado el entendimiento de la patogénesis de las enfermedades al identificar genes, moléculas o vías específicas que influyen el riesgo de desarrollar una enfermedad. La expresión epidemiología molecular fue popularizada por Perea y Weinstein, en los años ochenta y es una disciplina que se ocupa de estudiar marcadores moleculares en las poblaciones expuestas a factores de riesgo, para determinar la susceptibilidad de las personas a padecer un efecto adverso a la salud. Aplicado esto a la genética, determina la susceptibilidad individual a las diversas enfermedades y aplica los conocimientos adquiridos a la prevención y control de las mismas, mediante pruebas de tamizaje o diagnóstico temprano de las personas genéticamente vulnerables.

En este trabajo se realizó la caracterización clínica, epidemiológica y molecular de una malformación ocular hereditaria (esclerocórnea) en una población endogámica del estado de Tlaxcala. La investigación fue realizada en diversas fases, incluyendo la determinación de la prevalencia de la enfermedad, la identificación del defecto molecular que la origina, la determinación de la frecuencia de portadores del gen mutante en la localidad y la estimación de las generaciones transcurridas desde que la mutación se originó en esta población.

Desde hace muchos años los aislados de población han sido sujeto de interés tanto de la genética médica como poblacional (Jorde et al, 2000). Los aislados genéticos de población se definen como un grupo de individuos que descienden de una población fundadora (grupo fundador) y que han mantenido un grado relativo de homogeneidad genética debido a su aislamiento geográfico y/o cultural a través de numerosas generaciones. Una población

fundadora incluye aquellos habitantes que tienen sus orígenes en un “cuello de botella” de individuos, comúnmente dentro de las últimas 100 generaciones (Peltonen et al, 1995; Arcos-Burgos y Muenke, 2002). Estos grupos se hallan en aislamiento geográfico a lo largo de muchas generaciones y sin intercambio genético con otras poblaciones (Bowcock et al, 1991; Barbujabi et al, 2001). El estudio de estas comunidades ha permitido en años recientes resultados notables en el mapeo de genes causantes de enfermedades genéticas, especialmente aquellas que exhiben una forma de herencia autosómica recesiva. Los logros iniciales, que se originaron principalmente por el análisis de aislados de poblaciones como los finlandeses y Amish, aumentaron el interés en este tipo de poblaciones. Estas comunidades particulares, que fueron el foco de estudios históricos, antropológicos y de genética de población, son ahora de interés de grandes consorcios de mapeo genético y aún de compañías de biotecnología (Kruglyak, 1999a; Peltonen et al, 2000). Las poblaciones aisladas genéticamente ofrecen muchas ventajas para estudios de mapeo amplio del genoma ya que la mayoría de ellas se origina de un efecto fundador y el alto grado de endogamia ha derivado en un aumento de la incidencia de enfermedades autosómicas recesivas (Peltonen, 2000). En estos aislados especiales pueden encontrarse casos familiares confinados, bien documentados y multigeneracionales de enfermedades con un fenotipo homogéneo (Kruglyak, 1999b). El “efecto fundador” impacta enormemente en el grado subsecuente de variación genética en la población y puede ocasionar pérdida o ganancia de alelos asociados a una o más enfermedades y, en consecuencia, aumento o disminución de la prevalencia de enfermedades con base genética, comparado con otras poblaciones (Zlotogora, 1994; Feingold, 1998).

Los pacientes con esclerocornea detectados en la localidad presentaron un cuadro clínico homogéneo, no sindrómico, caracterizado por esclerocórnea total bilateral y discapacidad visual severa. En algunos pacientes se realizó ecografía ocular que demostró además microftalmia, afaquia congénita y coloboma de disco óptico bilaterales, lo que indica un cuadro malformativo ocular complejo con afectación principal del segmento anterior. En ninguno de los afectados estudiados, se identificaron malformaciones congénitas

extraoculares ni discapacidad intelectual. El análisis genealógico confirmó la transmisión autosómica recesiva de la enfermedad e incluso se observaron algunas familias en las que ambos padres estaban afectados (homocigotos) y, como era de esperarse, heredaron la enfermedad a la totalidad de su descendencia. El análisis de los familiogramas indicó que 16 de los casos estaban relacionados con un ancestro común, lo que apoyó la teoría de un efecto “fundador” en esta población.

La primera fase del estudio fue realizada para conocer el número total de casos de esclerocórnea en la localidad. Para este fin se utilizó una metodología de censado o barrido casa por casa, técnica de vigilancia epidemiológica activa que ofrece como ventaja la alta cobertura y confiabilidad que se alcanza (OPS, 1994). La realización de este censo de toda la comunidad permitió detectar un total de 22 casos, lo que corresponde a una prevalencia del padecimiento de 3 casos por cada 1,000 habitantes. Se identificaron tres casos no conocidos por el personal de salud del municipio, muy probablemente debido al ocultamiento por la estigmatización que existe sobre estos pacientes. No puede descartarse que puedan existir otros pacientes en esta situación en la comunidad.

Un dato a destacarse es que el número de habitantes contabilizado en este censo es menor a la referida en el INEGI, lo que posiblemente sea explicado por el alto número de migrantes que salen de la localidad hacia los Estados Unidos de América. Estos datos indican que esta localidad se ha convertido en una localidad expulsora de población.

No existen datos en la literatura mundial acerca de la frecuencia de esclerocórnea, por lo que no fue posible realizar una comparación con la frecuencia observada en la localidad que fue de 3 casos por cada 1000 habitantes. La prevalencia referida en la literatura mundial para la totalidad de opacidades corneales es de 3 por cada 100,000 (Lurescia, 2009). La forma en la que se distribuyeron los casos espacialmente en la localidad, presenta una aparente concentración de éstos en la zona centro del municipio sin embargo, la presentación geográfica de los casos fue similar en cada una de las AGEBS estudiadas. Los casos fueron mayormente de varones y respecto al grupo

etéreo, la mayoría de los pacientes eran personas jóvenes y en edad económicamente activa.

Por otra parte, la realización del censo permitió identificar una alta frecuencia de otros padecimientos hereditarios de transmisión autosómica recesiva, particularmente distrofia muscular e insuficiencia renal de causa no determinada, pero muy probablemente también de etiología autosómica recesiva.

Una vez establecida la prevalencia de la enfermedad se procedió a obtener muestras de DNA de 17 casos para realizar el análisis genético que permitiera identificar la causa de la enfermedad. Debido al desconocimiento de algún gen responsable de esclerocórnea autosómica recesiva no sindrómica, se propuso un abordaje de gen candidato y se seleccionaron dos genes para el análisis genético inicial. El primer gen analizado fue FOXC1, uno de los genes más frecuentemente asociados a malformaciones del segmento anterior en el humano (Nishimura et al, 2001; Sowden et al, 2007). El análisis de secuenciación de FOXC1 en DNA de un afectado no demostró ninguna mutación que pudiera explicar la malformación ocular. El segundo gen analizado fue FOXE3, localizado en la región cromosómica 1p32. El análisis de secuencia inicial demostró una mutación puntual en estado homocigoto en DNA de un afectado. Este cambio, localizado en la base 292 (c.292T>C), predijo una sustitución de tirosina a histidina en el residuo 98 de la proteína FOXE3. Este cambio fue identificado en estado homocigoto en otros 16 DNAs de sujetos con esclerocórnea y en estado heterocigoto en sujetos que eran portadores obligados. La patogenicidad de la mutación fue confirmada mediante los siguientes resultados:

- 1.- Segregación del fenotipo con la mutación en homocigosidad
- 2.- Ausencia de la mutación c.292T>C en 300 alelos control .
- 3.- Evidencia *in silico* de patogenicidad de la mutación (programa Polyphen).
- 4.- Conservación estricta del residuo tirosina 98 residuo en la proteína FOXE3 de numerosas especies de vertebrados e invertebrados.

El gen *Foxe3* fue inicialmente demostrado como asociado al fenotipo de cristalino disgenético (*dyl*) en el ratón, que está limitado al ojo y consiste en grados variables de microftalmia, opacidad corneal, cristalino pequeño e irregular, y adherencias entre el cristalino y la córnea. (Sanyal and Hawkins, 1979). Se demostró que el fenotipo de este modelo animal era causado por dos mutaciones de sentido equivocado en el dominio “forkhead” (“cabeza de horquilla”) de *Foxe3* (Blixt et al, 2000; Brownell et al, 2000). Por su parte, Ormestad et al. (2002) demostraron que la proteína *Foxe3* mutante en el ratón *dyl* tiene una unión defectuosa al DNA y por lo tanto es un alelo nulo. Si bien, los ratones heterocigotos *dyl +/-* fueron reportados inicialmente como normales, una exanimación minuciosa reveló que aproximadamente 40% de los ratones mutantes heterocigotos mostraban un fenotipo ocular semejante a la anomalía de Peters, que consiste en sinequias entre la córnea y el cristalino, leucoma central, catarata y otras anomalías corneales (Ormestad et al, 2002).

La expresión y función de *Foxe3* está conservada en vertebrados y se corresponde con los fenotipos oculares reportados en los mutantes. Durante el desarrollo, los transcritos de *Foxe3* están presentes en el cristalino en formación y en el cerebro medio de embriones de ratón. En el ratón adulto, la expresión está limitada al epitelio del cristalino anterior (Blixt et al, 2000; Brownell et al, 2000). Similarmente, la expresión de *foxe3* fue observada en ojo y cerebro de embriones de pez cebra con los niveles más elevados en las células epiteliales del cristalino (Shi et al, 2006). Los estudios de expresión en cortes de embriones humanos demostraron que *FOXE3* solo se expresa en el cristalino en desarrollo, particularmente en el epitelio anterior (Iseri et al, 2009). No se pudo descartar que la expresión de *FOXE3* en cerebro humano en etapas más tempranas a la estudiada (37-44 días pos ovulación).

Las mutaciones de *FOXE3* en humanos fueron identificadas por primera vez por Semina y cols. (2001) en un paciente con embriotoxon posterior, cataratas y miopía. El paciente y su madre, quien también presentaba embriotoxon y cataratas, portaban una mutación dominante c.943InsG que predijo un cambio p.L315RfsX117. En una segunda familia, una mutación distinta de *FOXE3* fue detectada en un sujeto con anomalía de Peters, opacidades corneales y

glaucoma pero sin cataratas (Ormestad et al, 2002). Esta mutación, c. 524G>T (p.R90L) resultó en una sustitución de aminoácido en el dominio de unión al DNA. Más recientemente, Iseri y cols. (2009) reportaron dos mutaciones dominantes más en familias con fenotipos variables. La primera mutación, c.958T>C (p.X320RextX72), fue observada en un sujeto con microftalmia bilateral, afaquia derecha, esclerocornea, coloboma y anomalía de Peters con catarata congénita. El segundo cambio, C. 146G>C (p.G49A) fue demostrado en un paciente con microftalmia unilateral, coloboma bilateral, y otros miembros de la familia con catarata cerúlea o cataratas de inicio tardío (Iseri et al, 2009). A medida que se han identificado mutaciones adicionales de FOXE3 en humanos, se ha reconocido que también mutaciones en estado homocigoto son responsables de fenotipos oculares particulares. El primer caso de enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en FOXE3 fue descrito por Valleix et al. (2006) en un par de hermanos, hijos de una unión consanguínea y afectados por afaquia primaria congénita y microftalmia. Ambos hermanos fueron homocigotos para una mutación c.720C>A (p.C240X) y los padres, sin anomalías oculares, fueron heterocigotos para la misma mutación. (Valleix et al, 2006). Más tarde, Iseri y cols. (2009) describieron dos familias consanguíneas adicionales con mutaciones recesivas en FOXE3. La primera mutación, c.244A>G (p.M82V), fue identificada en una familia con microftalmia bilateral, afaquia y esclerocornea en algunos miembros y disgenesia del segmento anterior, glaucoma y ojos de tamaño normal en otros. La segunda mutación homocigota, c.21_24del (p.M7lfsX216), fue identificada en una familia afectada con microftalmia bilateral, esclerocornea y afaquia. Todos los portadores obligados en ambas familias eran sanos (Iseri et al, 2009). Más recientemente, Reis y cols. identificaron una frecuencia de mutaciones homocigotas de FOXE3 de 15% (4/26) en pacientes con microftalmia bilateral y concluyeron que FOXE3 es un gen mayor en la etiología de microftalmia de tipo autosómico recesivo (Reis et al, 2010).

FOXE3 funciona como un factor de transcripción, por lo que las mutaciones en éste pueden presentar diferentes fenotipos y comportamientos hereditarios distintos (dominante vs recesivo) (Iseri, 2009).

La tercera fase de esta investigación tuvo como finalidad la estimación de la frecuencia de portadores (heterocigotos sanos) de la mutación causante de microftalmia en la localidad de estudio. Esta información es de gran trascendencia para estimar los riesgos de aparición de nuevos casos, especialmente debido a los altos índices de endogamia en el municipio. Una vez determinada de manera irrefutable la patogenicidad de la mutación p.Y98H en FOXE3, se realizó un muestreo aleatorizado de 405 sujetos sanos habitantes del municipio, se realizó análisis molecular de FOXE3 en DNA de estos sujetos y se identificó una prevalencia de 2.46 heterocigotos por cada 100 habitantes. De acuerdo a esta cifra y a los intervalos de confianza obtenidos se puede estimar que existen 246 (126-435) personas con la mutación de forma heterocigota en la totalidad de la población. De acuerdo a esta prevalencia, la posibilidad teórica de que dos sujetos heterocigotos de esta población se unan de forma aleatoria es de 1 en 1,600. Sin embargo, dada la frecuencia de casos (n=22), es evidente que las uniones no se están produciendo al azar y que existe un efecto importante de las prácticas endogámicas.

La ocurrencia de homocigotos para la mutación también está influenciada por la posibilidad de unión con individuos con menor riesgo de portar la mutación, por ejemplo sujetos provenientes de otras localidades. Es bien conocido que la migración que es otra de las fuerzas que modifica las frecuencias genéticas (Pierce, 2009). Los datos obtenidos en este estudio indican que ésta es una población expulsora de habitantes (tasa neta negativa), en parte explicado por la migración hacia zonas con mayores oportunidades de trabajo. Este fenómeno sin embargo, tiene el efecto de disminuir la probabilidad de ingreso de sujetos con menor probabilidad de presentar la mutación y favorece en cambio que las uniones en la localidad se produzcan entre los mismos habitantes que tienen mayor riesgo de ser heterocigotos.

De forma importante los datos de migración permitieron identificar que aunque tanto los heterocigotos como sus padres son originarios de San Francisco Tetlanohcan, un 46% de los abuelos eran originarios principalmente de Santa Ana Chiautempan, un municipio urbano con mayor cantidad de habitantes y situado a 9.8 kilómetros de Tetlanohcan (Google maps, 2011), dato que

también apoya la hipótesis de un efecto fundador de la mutación en este municipio.

El campo de la genética de población estudia la variación de diversos polimorfismos (SNPs) en tiempo y espacio en muy diversas poblaciones biológicas. El abordaje clásico para caracterizar patrones y diferencias en la prevalencia de SNPs es la caracterización de la estructura genética de una población. Esta estructura genética es definida por la estructura alélica, es decir la prevalencia de determinados alelos y la proporción de estos para un locus o loci y la estructura genotípica por la prevalencia de los genotipos y la proporción de estas para uno locus o más loci. El teorema de Hardy-Weinberg establece que las frecuencias genotípicas permanecerán constantes y siguen una distribución binomial para un modelo de un sistema bialélico. En otras palabras las estructuras alélicas y genotípicas permanecen sin cambios importantes a través del tiempo (Arcos-Burgos, 2002). Teóricamente, una población está en equilibrio genético sólo si se cumplen ciertos requisitos como uniones al azar (panmixia), índices bajos de mutación y ausencia de migración.

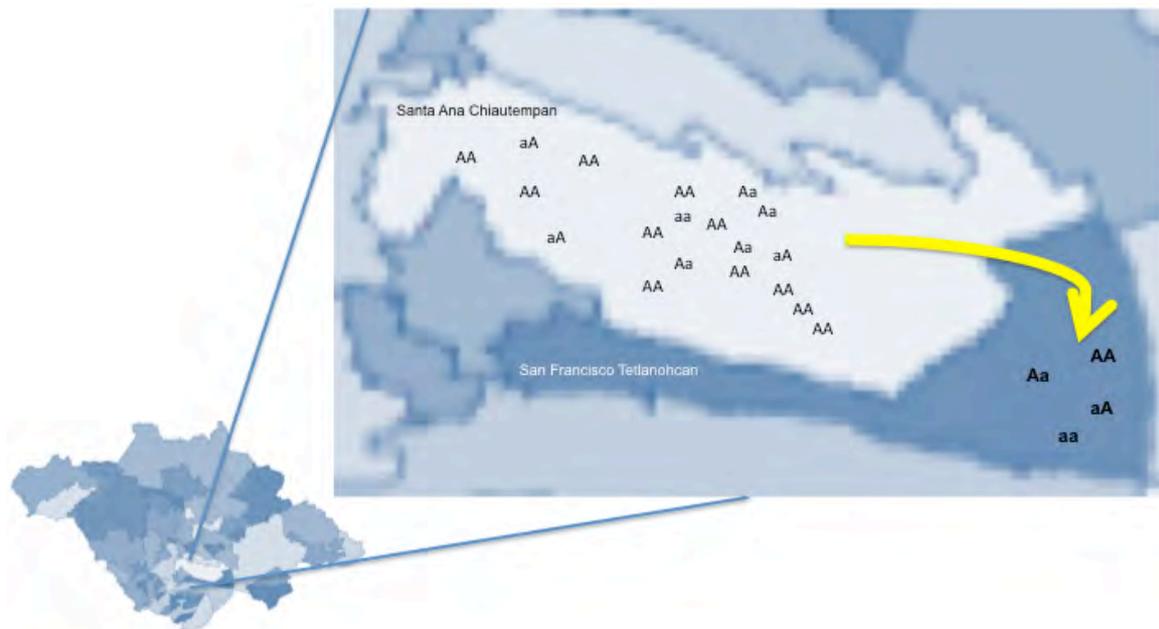


Figura 16 Posible efecto fundador de pobladores originarios de Santa Ana Chiautempan, Tlaxcala.

De acuerdo a las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro estudio, la estimación del equilibrio de segregación de la ley de Hardy-Weinberg, presentó valores por arriba de los valores críticos, puede concluirse que el patrón de segregación no es aleatorio, lo que conjuntamente con los valores del coeficiente de consanguinidad permite concluir que la endogamia ha desempeñado un papel fundamental en la generación de enfermos en esta comunidad.

Finalmente la última fase fue orientada a determinar el tiempo transcurrido desde que esta mutación ingresó a la población en estudio. Este aspecto se estudió analizando el desequilibrio de ligamiento entre la mutación y marcadores flanqueantes.

La edad de un alelo es el tiempo desde que este surgió por mutación. En este contexto, un alelo es definido por la posesión de una alteración particular en la secuencia de DNA. En los 1990s, los especialistas en Genética Humana se interesaron en la estimación la edad de alelos asociados a enfermedades genéticas humanas (Slatkin M, 2000). El entendimiento de la historia evolutiva de alelos individuales es de importancia creciente debido a la relevancia para el mapeo de genes asociados con enfermedades genéticas y a la comprensión del efecto de la selección natural sobre cada alelo.

Virtualmente todas las enfermedades genéticas para las que han sido descubiertos los genes responsables tienen algún grado de heterogeneidad alélica. Esto es, los cromosomas asociados a la enfermedad pueden portar diferentes mutaciones del mismo gen. En algunos casos, una mutación única puede dominar en frecuencia, por ejemplo la delección F508 que se encuentra en aproximadamente 70% de los casos de fibrosis quística en Europa (EWGCFG, 1990). En otros casos la mutación responsable de la enfermedad en una población es bastante rara, sin ninguna mutación dominante, como sucede en la enfermedad de Wilson en la que se han descrito más de 80 mutaciones distintas, todas en una frecuencia relativamente baja (Roberts y Cox, 1998). La explicación de tales patrones tiene que ver con las historias demográficas de poblaciones humanas y las influencias históricas de la deriva genética, la migración y la selección natural (Cavalli-Sforza et al, 1994). Un

primer paso para entender la influencia de los eventos históricos en las variaciones genéticas humanas es considerar las edades de mutaciones particulares. En términos generales, la edad de una mutación puede estimarse por dos métodos: por la frecuencia del alelo mutante en una población y por el grado de variación de marcadores ligados a la mutación (genealogía cromosómica) (Morral et al, 1994). Los métodos nuevos y más eficientes para evaluar la extensión de variabilidad intra-alélica han proporcionado información adicional que permite estimados de mayor refinamiento de la edad de un alelo. La información potencial acerca de la edad de una mutación está disponible a partir de la variación observada en marcadores genéticos estrechamente ligados (Rannala y Bertorelle, 2001). La utilización de los patrones de variación genética en marcadores ligados a mutaciones es una herramienta que genera mayor conocimiento acerca de la historia demográfica humana, de los patrones históricos de selección natural y de la edad de una enfermedad genética particular.

El desequilibrio de ligamiento es una herramienta poderosa para el mapeo de genes siempre y cuando la población en estudio cumpla con dos requisitos mayores: la población actual debe derivarse de un relativo número pequeño de fundadores (población fundadora) y la expansión de la población debe haber ocurrido por crecimiento y no por inmigración (de la Chapelle y Wright, 1997; Arcos-Burgos y Muenke, 2002). Estos criterios se cumplen en diversas poblaciones humanas, sin embargo, para ser de mayor utilidad en la investigación de enfermedades, deben presentar ciertas características adicionales. Por ejemplo, la población debe ser lo suficientemente numerosa para proporcionar el número de sujetos afectados necesarios para el estudio; debe haber pasado suficiente tiempo desde el evento fundador para que se hayan producido los entrecruzamientos críticos necesarios para el mapeo de alta resolución; debe contar con registros genealógicos detallados para identificar orígenes comunes de los individuos bajo estudio, incluyendo lugares de nacimiento de los ancestros; finalmente, los profesionales de la salud locales y los pobladores deben tener una actitud favorable hacia la investigación (Sherwin et al, 2008; Abecasis et al, 2005). La geografía restringida permite un registro exhaustivo y una recolección completa de

muestras biológicas. Además la estabilidad familiar y comunitaria permite la corroboración de los hallazgos en el futuro y la realización de estudios prospectivos.

En nuestro estudio se determinó el tiempo que constituía una generación para esta población particular y mediante la genotipificación de marcadores polimórficos que flanquean al gen FOXE3 fue posible estimar la tasa de recombinación de los haplotipos en los 17 sujetos con esclerocornea analizados molecularmente. Utilizando 2 modelos independientes, se determinó que la mutación ingresó a esta localidad hace aproximadamente 5-6 generaciones, que corresponden a entre 113 y 130 años. Un dato interesante, es que este número de años coincide con un arribo importante de colonos desde Santa Ana Chiautempan. Tomando en consideración estos datos, se propone que el primer sujeto con la mutación en FOXE3 arribó a San Francisco Tetlahnocan hace 130 años y se convirtió en el “fundador” a partir del cual la mutación fue transmitiéndose a generaciones subsecuentes.

La determinación del tiempo desde que se introdujo la mutación también nos permite conocer los mecanismos de distribución de la mutación así como los factores que afectan a esta distribución, como lo son los mecanismos de expansión y migración además de permitir la identificación de un “efecto fundador” (Labuda et al, 1997) el cual es de forma general el responsable de los cambios de los perfiles de las frecuencias de las variantes genéticas (Yotoba V, 2005) como posiblemente sucedió en San Francisco Tetlanohcan y con esta información determinar la posible introducción de la mutación a la población afectada o si la mutación apareció de “novo”. Lo anterior nos permite conocer anticipadamente las frecuencias posibles de acuerdo a las diferentes variables que actúan en la expansión de la mutación como lo es la deriva génica, la migración, la endogamia etc. (Rannala, 2001) además de que es posible combinar los resultados específicos de ésta población con otras poblaciones estudiadas lo que nos permitiría identificar patrones de segregación más amplios en diferentes áreas geográficas (Slatkin M, 2000). En conclusión, en este trabajo se describen los aspectos epidemiológicos y moleculares de una enfermedad hereditaria en una población endogámica. Este modelo puede aplicarse a otras poblaciones de nuestro país con

dinámicas sociales semejantes en las que se han documentado prevalencias elevadas de padecimientos hereditarios.

11. ANEXOS

Anexo A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

México San Francisco Tetlanohcan a ____/____/ 2010

Título de la investigación: Epidemiología molecular de la esclerocórnea autosómica recesiva en San Francisco Tetlanohcan, Tlaxcala.

Investigador principal: Juan Carlos Zenteno Ruiz / Carlos Alberto Pantoja Meléndez (Teléfono: 5442 17 00 extensión 3210)

Nombre del paciente: _____

(primero preséntese con el participante)

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Usted debe saber que cuenta con libertad absoluta de hacer cualquier pregunta. En caso de que Usted desee participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada. En caso que se requiera la participación de alguno de sus hijos (as) solicitamos a usted el permiso para la obtención de muestras en él)

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. Estamos realizando un estudio para conocer las causas de un tipo de ceguera en esta comunidad, esto nos permitirá determinar el por que se presenta y a la vez poder informar a los pacientes que presenten este padecimiento como aquellos que pueden estar en riesgo de que sus hijos lo presenten, información que les permita conjuntamente con el médico tomar el consejo que sea necesario.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

El objetivo de este estudio es determinar cual es la causa de la enfermedad así como saber como afecta a esta población.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

El principal beneficio será poder informar a la población sobre la causa de esta enfermedad y si es posible dar el consejo requerido en quienes quieren tener familia (hijos), de esta manera la información que usted nos proporcione podrá ayudar a otras personas y posiblemente evitar que se presente esta enfermedad.

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted y sus familiares directos, posteriormente le pediremos nos permita frotar con un "cepillo" los carrillos de su boca, lo cual no le causará ninguna molestia o afectación.

ACLARACIONES

Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.

1. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
2. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, aun cuando yo no se lo solicite, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad sin cuestionamiento alguno.
3. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
4. Se le dará de forma personal el resultado de los análisis.
5. En caso de que la prueba de laboratorio presente alguna alteración, se le canalizará a los servicios médicos de DIF municipal donde le atenderán sin costo alguno.
6. No recibirá pago por su participación.
7. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
8. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad.
9. Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y Ética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana por medio del Dr. Jonathan Garfias Becerra al Teléfono: 5442 17 00 extensión 3210.

Si usted está de acuerdo y no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar el presente documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Testigo

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador

Firma del participante o del padre o tutor

DATOS DEL ABUELA P 45.- Apellido Paterno _____

46.- Apellido Materno _____

47.- Nombre (s) _____

Lugar de nacimiento: 48.- País _____ 49.- Estado _____ 50.- Municipio _____

51.- Localidad _____ 52.- Edad: _____ 53.-Ocupación: _____

DATOS DEL ABUELO M 54.- Apellido Paterno _____

55.- Apellido Materno _____

56.- Nombre (s) _____

Lugar de nacimiento: 57.- País _____ 58.- Estado _____ 59.- Municipio _____

60.- Localidad _____ 61.- Edad: _____ 62.-Ocupación: _____

DATOS DEL ABUELA M 63.- Apellido Paterno _____

64.- Apellido Materno _____

65.- Nombre (s) _____

Lugar de nacimiento: 66.- País _____ 67.- Estado _____ 68.- Municipio _____

69.- Localidad _____ 70.- Edad: _____ 71.-Ocupación: _____

APARATOS Y SISTEMAS:

72.- Auditivo: _____

73.- Olfativo: _____

74.- Neurológico: _____

75.- Cardiovascular: _____

76.- Digestivo: _____

77.- Respiratorio: _____

78.- Genitourinario: _____

79.- Músculo-esquelético: _____

80.- Endocrino: _____

81.- Piel y anexos: _____

MIGRACIÓN

82.- ¿Ha vivido más de seis meses fuera de este estado. No 0 Si 1 (pase a la siguiente si la respuesta es Si)

83.- Cuanto tiempo tiene de vivir en esta localidad desde la última vez que llegó: _____

84.- ¿En donde vivía usted en el año 2005? Aquí en este estado: _____

En Otro estado: _____ 85.- Especifique: _____

En Otro País: _____ 86.- Especifique: _____

¿Sus hijos viven en esta localidad ?

87.- No 0 Si 1 (pase a la siguiente si la respuesta es No)

En donde viven actualmente?

88.- Hijo 1 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____

89.- Hijo 2 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
90.- Hijo 3 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
91.- Hijo 4 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
92.- Hijo 5 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
93.- Hijo 6 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____
94.- Hijo 7 País _____ Estado _____ Municipio _____ Localidad _____

En caso de que alguno de los reglones sea desconocido por el encuestado ponga un guión

Árbol Genealógico

Anexo C

Muestreo

Se realizó un muestreo simple utilizando como marco muestral el desarrollado por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), basado en las Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEBs).

El municipio tiene registrado de acuerdo al último Censo de Población y Vivienda (marco geoestadístico estatal 2000), 1,992 domicilios distribuidos en cuatro AGEBS.

Fueron ordenadas las AGEBS de la siguiente manera:

1. AGEB 29050000100**15**
2. AGEB 29050000100**2A**
3. AGEB 29050000100**34**
4. AGEB 29050000100**49**

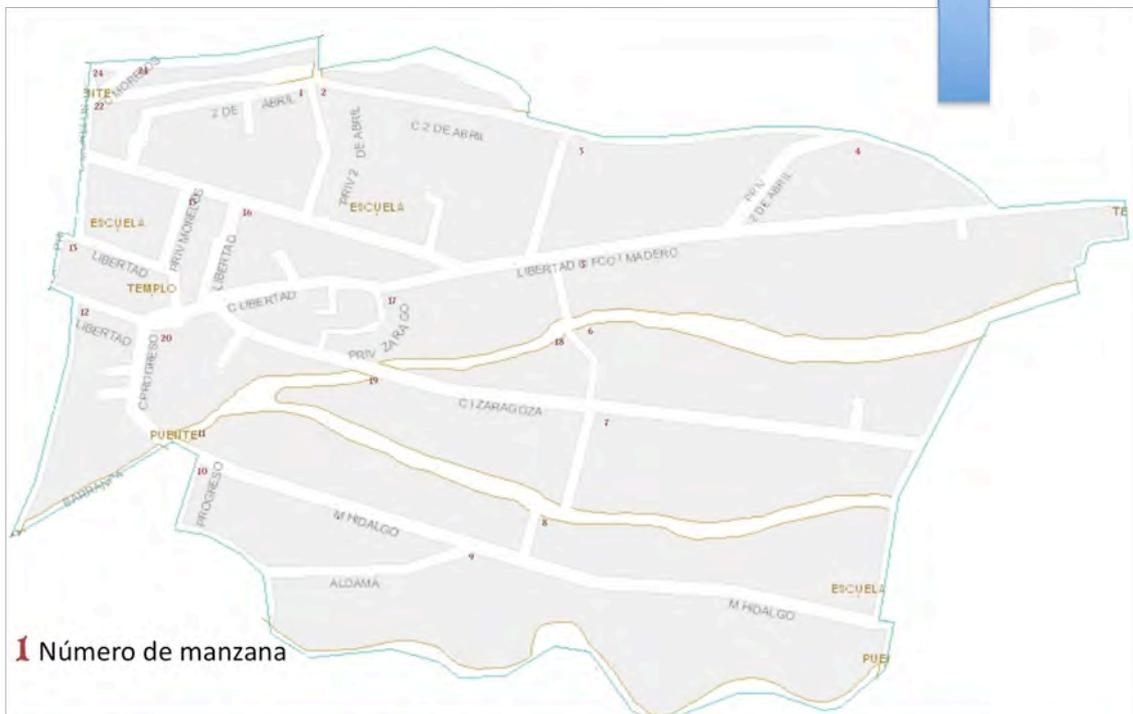
La asignación del número de casa **uno**, se dio de acuerdo a la manzana **uno** de la AGEB, en cuestión y siguiendo el orden previamente explicado. La ubicación de la casa número **uno** será la primera casa a la derecha de la esquina noroeste de la manzana, cada manzana contiene un número de viviendas reportadas por el INEGI aquí se les enumero de acuerdo a el número consecutivo de cada vivienda y en secuencia del número de viviendas por manzana

De acuerdo a la AGEB, se segmentó el número de viviendas que contiene cada una, así para la AGEB 29050000100**15** Correspondieron los domicilios del, 1 al 475, para la AGEB 29050000100**2A** correspondieron los domicilios 476 al 851. En la AGEB 29050000100**34** se ubicaron los domicilios 852 al 4,414 finalmente en la AGEB 29050000100**49** se ubicó del domicilio 1,415 al 1992. Las localidades del municipio (3) , fueron incluidas dándole números consecutivos a cada de domicilio por lo que en el sorteo se consideraron 1,998 viviendas.

Una vez ubicada la numeración de domicilios en el municipio, se procedió a seleccionar el número de viviendas considerados en el tamaño de muestra (204) de forma aleatoria obteniendo los siguientes resultados.

La ubicación física de las viviendas se muestra a continuación en los siguientes croquis de campo.

Muestra
AGEB 2905000010015



NOM_ENT	MUN	NOM_MUN	LOC	AGEB	MZA	T_VIVHAB	De la casa	A la casa	Seleccionadas
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	001	20	1	20	18
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	002	14	21	34	25
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	003	22	35	56	53 / 54
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	004	18	57	74	63 / 74
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	005	27	75	101	84
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	006	33	102	134	107 / 108 / 118 / 125
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	007	35	135	169	150 / 158 / 161 / 163 / 167
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	008	12	170	181	S/N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	009	28	182	209	195 / 197 / 202
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	010	16	210	225	213
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	011	15	226	240	231 / 233 / 234
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	012	14	241	254	S/N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	013	29	255	283	266
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	015	24	284	307	285
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	016	1	308	308	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	017	15	309	323	310
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	018	22	324	345	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	019	9	346	354	351
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	020	40	355	394	360 / 363 / 367 / 371 / 377 382 / 385 / 387 / 390 / 393
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	022	41	395	435	396
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	024	15	436	450	441 / 443 / 447 / 449
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	025	10	451	460	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	026	5	461	465	465
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	027	8	466	473	470
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0015	028	2	474	475	S / N

Muestra
AGEB 2905000010034



1 Número de manzana

NOM_ENT	MUN	NOM_MUN	LOC	AGEB	MZA	T_VIVHAB	De la casa	A la casa	Seleccionadas
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	001	43	852	894	868 / 875 / 886
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	002	22	895	916	899 / 901 / 905 / 908 / 915
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	003	14	917	930	930
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	004	22	931	952	932 / 933
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	005	36	953	988	956 / 957 / 961 / 963 / 967 / 978
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	006	82	989	1070	992 / 1015 / 1017 / 1027 / 1050
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	007	37	1071	1107	1095 / 1106
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	008	39	1108	1146	1115 / 1128 / 1129 / 1134 / 1137 / 1146
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	010	19	1147	1165	1153 / 1158
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	011	24	1166	1189	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	012	29	1190	1218	1195 / 1203
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	013	14	1219	1232	1232
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	014	10	1233	1242	1239
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	015	23	1243	1265	1243 / 1244
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	016	25	1266	1290	1274 / 1284 / 1290
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	017	19	1291	1309	1297 / 1305 / 1308
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	020	3	1310	1312	1312
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	021	1	1313	1313	1313
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	022	15	1314	1328	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	023	13	1329	1341	1348
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	024	20	1342	1361	1351 / 1357 / 1358
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	025	24	1362	1385	1362 / 1364 / 1370 / 1374
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	026	1	1386	1386	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	028	1	1387	1387	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	029	25	1388	1412	1389 / 1409
Tlaxcala	050	San Francisco Tetlanohcan	0001	0034	032	2	1413	1414	S / N

Muestra
AGEB 2905000010049



1 Número de manzana

NOM_ENT	MUN	NOM_MUN	LOC	AGEB	MZA	T_VIVHAB	De la casa	A la casa	Seleccionadas
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	001	50	1415	1464	1444 / 1451 / 1452
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	002	18	1465	1482	1472 / 1474 / 1478
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	003	6	1483	1488	1487
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	004	16	1489	1504	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	005	26	1505	1530	1505 / 1524
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	006	45	1531	1575	1566
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	007	5	1576	1580	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	008	9	1581	1589	1585 / 1587
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	009	15	1590	1604	1592 / 1594 / 1599 / 1604
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	010	12	1605	1616	1606
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	011	41	1617	1657	1635 / 1647 / 1648
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	012	33	1658	1690	1661 / 1662 / 1688
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	013	14	1691	1704	1692 / 1694 / 1699
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	014	31	1705	1735	1710 / 1721 / 1722 / 1725
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	015	25	1736	1760	1739 / 1742 / 1743 / 1745 / 1755
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	016	15	1761	1775	1772
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	017	1	1776	1776	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	018	5	1777	1781	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	019	19	1782	1800	1784 / 1785 / 1786 / 1791
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	020	23	1801	1823	1814 / 1815
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	021	1	1824	1824	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	025	5	1825	1829	S / N
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	026	28	1830	1857	1832 / 1836 / 1838 / 1844
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	028	41	1858	1898	1877 / 1884 / 1895
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	029	28	1899	1926	1902
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	030	21	1927	1947	1935
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	031	42	1948	1989	1950 / 1954 / 1956 / 1960 / 1967 / 1969 / 1970 / 1976 / 1976 / 1979 / 1980
Tlaxcala	050	San Francisco	0001	0049	032	3	1990	1992	S / N

12. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Abecasis G, Ghosh D, Nichols TE. Linkage disequilibrium: ancient history drives the new genetics. *Hum Hered.* 2005;59:118-24.
- 2.- Alba J. Cartografía aplicada a la salud. Secretaria de salud 1993:14.
- 3.- Arcos-Burgos M, Muenke M. Genetics of population isolates. *Clin Genet.* 2002;61:233-47.
- 4.- Arsson, C, Hellqvist, M, Pierrou S, White I, Enerback S, Carlsson P. Chromosomal localization of six human forkhead genes, freac-1 (FKHL5), -3 (FKHL7), -4 (FKHL8), -5 (FKHL9), -6 (FKHL10), and -8 (FKHL12). *Genomics.* 1995;30: 464-469.
- 5.- Barbujani G, Bertorelle G. Genetics and the population history of Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:22-5.
- 6.- Beebe D. Fisiología del ojo. ELSEVIER. 2003:117-158
- 7.- Bessant D, Anwar K, Khaliq S, Hameed A, Ismail M, Payne A, Mehdi S, Bhattacharya S. Phenotype of autosomal recessive congenital microphthalmia mapping to chromosome 14q32. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:919-22.
- 8.- Bhat Y, Sanoj K. Sclerocornea. *Indian Pediatr.* 2005;42:277
- 9.- Binenbaum G, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Walker BM, Coleman K, Mach AM, Adam M, Manning M, Alcorn DM, Zabel C, Anderson DR, Forbes BJ. Sclerocornea associated with the chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet A.* 2008;146:904-9.
- 10.- Blixt A, Mahlapuu M, Aitola M, Pelto-Huikko M, Enerbäck S, Carlsson P. A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle. *Genes Dev.* 2000;14(2):245-54.
- 11.- Bliznetz E, Tverskaya S, Zinchenko R, Abrukova A, Savaskina E, Nikulin M, Kirillov A, Ginter G, Evgeny, Polyakov A. Genetic análisis of autosomal recessive osteopetrosis in Chuvashiya: the unique splice site mutation in TCIRG1 gene Spreads by the founder effect. *European Journal of Human Genetics.* 2009;17:664-672
- 12.- Blohmé J, Torqvist K. Visual impairment in Swedish children. II Etiological factors. *Acta Ophthalmol Scand.* 1997;75:199-205
- 13.- Boletín de ECEMC: Revista de Dismorfología y Epidemiología. 2004; 3
- 14.- Bowcock A, Kidd J, Mountain J, Hebert J, Carotenuto L, Kidd K, Cavalli-Sforza L. Drift, admixture, and selection in human evolution: a study with DNA polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88:839-43.
- 15.-Brownell I, Dirksen M, Jamrich M. Forkhead Foxe3 maps to the dysgenetic lens locus and is critical in lens development and differentiation. *Genesis.* 2000;27:81-93.

- 16.-Cavalli-Sforza L, Menozzi P, Piazza A. History and geography of human genes. Princeton University Press 1994; 2: 455-456
- 17.- Cape C, Zaidman G, Beck A, Kaufman A. Phenotypic variation in ophthalmic manifestations of MIDAS syndrome (microphthalmia, termal aplasia and esclerocornea). Arch Ophthalmol. 2003;122: 1070-4
- 18.- Cvekl A, Tamm E. Anterior eye development and ocular mesenchyme New insights from mouse models and human diseases. Bio Essays. 2004;4:374-386.
- 19.- Danton H, O'Day. Human Development. Toronto at Mississauga, University. 2010:79
- 20.- De Alencar C, Lopes J. A Comprehensive In Silico Analysis of the Functional and Structural Impact of SNPs in the IGF1R Gene. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010; 39:10-11
- 21.- De la Chapelle A, Wright F. Linkage disequilibrium mapping in isolated populations: the example of Finland revisited. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 ;95:12416-23.
- 22.- European Working Group on CF Genetics. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. Hum Genet. 1990;85:436-441.
- 23.- Faber S, Dimanlig P, Makarenkova H, Shirke S, Ko K, Lang R. Fgf receptor signaling plays a role in lens induction. Development. 200;128:4425-38.
- 24.- Feingold J. Multiple mutations in a specific gene in a small population. C Acad Sci III. 1998;21:553-5.
- 25.- Foster A, Gilbert C. Epidemiology of visual impairment in children. Paediatric Ophthalmology. 1997: 3-12
- 26.- Francois J, Haustrate-Gosset F. Causes of blindness in the Belgian adult population. London Academic Press. 1990:445-452
- 27.- Gehring W. The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. Int J Dev Biol. 2002; 46:65-73
- 28.- Gilbert C, Rahi J, Eckstein M. Hereditary disease as a cause of childhood blindness: regional variation. Results of blind school Studies undertaken in countries of Latin America, Asia and Africa. Ophthalmic Genet. 1995; 16: 1-10
29. Gould D, Smith R. Anterior segment development relevant to glaucoma. Int J Dev Biol. 2004;48:1015-29.
- 30.- Graw J, The genetic and molecular basis of congenital eye defects . Nature Rev. 2003;4:876-888
- 31.- Griffiths A. *Génética Moderna*. Ed. Mc Graw Hill-Interamericana. Madrid, 2002. 85-118
- 32.- Hae P, Hyun R, Magna L. Genetics and prevention of blindness. Arq Bras Oftalmol. 2006;69:481-5

- 33.- Harissi-Dagher M, Colby K. Anterior segment dysgenesis: peters anomaly and sclerocornea. *Int Ophtahalmol Clin.* 2008;48:35-42
- 34.- Horsford J. Hanson I. Transcription Factors in Eye Disease and Ocular Development. *Scriver's OMMBID. The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.*2011:37
- 35.- INEGI, Censo Nacional de Población y Vivienda Marco Geoestadístico Tlaxcala.2005.
- 36.- Iseri S, Osborne R. Seeing clearly: the dominant and recessive nature of FOXE3 in eye developmental anomalies. *Hum Mutat.* 2009;30:1378-86.
- 37.- Jaakko K. Science, medicine, and the future Genetic epidemiology. *BMJ* 2000;320:1257
- 38.- Johnson J. *The Epidemiology of Eye Disease. Second Edition.* 2003:65-69
- 39.- Jorde. *Carey. Medical Genetic Fourth Edition.* Elsevier. 2010.
- 40.- Jorde L, Watkins W, Kere J, Nyman D, Eriksson A. Gene mapping in isolated populations: new roles for old friends?. *Hum Hered.* 2000;50:57-65.
- 41.- Labuda D. Zivtkiewicz E, Labuda M. The Genetic Clock and the Age of the Founder Effect in Growing Populations: A Lesson from French Canadians and Ashkenazim. *Am J Hum Genet.* 1997;61:768-771.
- 42.- Larsen W, *Essentials of Human Embriology.* Churchill Livingstone. 2001: 349
- 43.- Kapur R, Tu E, Corneal pathology in microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Cornea.* 2008;6:734-8.
- 44.- Khan A. Sclerocornea and cornea plana are distinct entities. *Surv Ophthalmol.* 2007;52:325-6
- 45.- Kivlin J, Fineman R, Williams M. Phenotypic variation in the del(12p) syndrome. *Am J Med Genet.* 1985;22:769-79.
- 46.- Kruglyak L. Genetic isolates: separate but equal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:1170-2.
- 47.- Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nat Genet.* 1999;22:139-44.
- 48.- Lines M. Kozlowsk K. Molecular genetics of Axenfeld-Rieger malformations. *Human Molecular Genetics.* 2002;11:177-1184
- 49.- Lise-Schneider B, Calvas P, Roche O, Lambert J, Dufier J, Costet-Fighiera C. Glaucoma with aniridia and isolated congenital glaucoma in siblings: contribution and limits of genetics. *Fr Ophtalmol.* 2007;30:44-8.
- 50.- Lurescia C. Opacidades Corneales Congenitas. *Oftal B. Aires.* 2009; 80.104-108.
- 51.- Luria S, Delbrock M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics.* 1943; 28:491-511

- 52.- Mathers P, Grinberg A, Mahon A, Jamrich, M. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature*. 1997;387:603–607.
- 53.- Mengual E , Hueso A. Actualización en oftalmología Pediátrica. 2011;1:39
- 54.- Michaeli A, Markovich A, Rootman D. Corneal transplants for the treatment of congenital corneal opacities. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2005;42:34-44.
- 55.- Mor-Cohen R, Zivelin A, Fromovich-Amit Y, Kovalski V, Rosenberg N, Seligsohn U. Age estimates of ancestral mutations causing factor VII deficiency and Dubin-Johnson syndrome in Iranian and Moroccan Jews are consistent with ancient Jewish migrations. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2007;18:139-44.
- 56.- Morral N, Bertranpetit J, Estivill X, Nunes V, Casals T, Giménez J, Reis A, Varon-Mateeva R, Macek M Jr, Kalaydjieva L. The origin of the major cystic fibrosis mutation (DF508) in European populations. *Nat Genet*. 1994;7:169–175.
- 57.- Nishimura D, Searby C, Alward W, Walton D, Craig J, Mackey D, Kawase K, Kanis A, Patil S, Stone E, Sheffield V. Spectrum of FOXC1 mutations suggests gene dosage as a mechanism for developmental defects of the anterior chamber of the eye. *Am J Hum Genet*. 2001;2:364-72
- 58.- Ogata T, Wakui, K, Muroya, K, Ohashi, H, Matsuo N, Brown D, Ishii T, Fukushima Y. Microphthalmia with linear skin defects syndrome in a mosaic female infant with monosomy for the Xp22 region: molecular analysis of the Xp22 breakpoint and the X-inactivation pattern. *Hum. Genet*. 1998;103:51-56,
- 59.- Oliva R, Ballesta F. *Génética Médica*. Diaz de Santos. 2004: 190- 245
- 60.- Organización Panamericana de la Salud. Cuaderno técnico No.40. 1994
- 61.- Ormestad M, Blixt A, Churchill A, Martinsson T, Enerbäck S, Carlsson P. Foxe3 haploinsufficiency in mice: a model for Peters' anomaly. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43:1350-7.
- 62.- Peltonen L, Pekkarinen P, Aaltonen J. Messages from an isolate: lessons from the Finnish gene pool. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995;376:697-704.
- 63.- Peltonen L. Positional cloning of disease genes: advantages of genetic isolates. *Hum Hered*. 2000;50:66-75.
- 64.- Pierce B. *Genética un enfoque conceptual*, Tercera edición. 2009: 685-686
- 65.- Pollak E. On Three Methods for Estimating Mutation Rates Indirectly. *Am J Hum Genet*. 1986;38:209-227
- 66.- Prakash S, Cormier A, McCall E, Garcia J, Sierra R, Haupt B, Zoghbi H, Van den Veyver I. Loss of holocytochrome c-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum. Molec. Genet*. 2002;11:3237-3248,
- 67.- Rannala B, Bertorelle G. Using linked markers to infer the age of a mutation. *Hum Mutat*. 2001;18:87-100
- 68.- Reeve J, Rannala B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics*. 2002;18:894-5.

- 69.- Reddy M , Purbrick R , Petrou P. The prevalence of patients with ocular genetic disorders attending a general paediatric ophthalmology clinic in the East End of London. *Eye*. 2009;23:111-114
70. Reis LM, Tyler RC, Schneider A. FOXE3 plays a significant role in autosomal recessive microphthalmia. *Am J Med Genet A*. 2010;152:582-90.
- 71.- Reis L, Semina E. Genetics of anterior segment dysgenesis disorders. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2011; 22:314-324
- 72.- Rezende R, Uchoa U, Uchoa R, Rapuano C, Laibson P. Congenital corneal opacities in cornea referral practice. *Cornea*. 2004;23:565-70.
- 73.- Riaño I, Rodríguez C. Frecuencia y presentación clínica de los defectos oculares congénitos en Asturias (1990-2004). *An Pediatr Bar*. 2010;72:250-256.
- 74.- Robert L. Nussbaum, M,. *Génética En Medicina 7ª edición*. 2005:115-149.
- 75.- Rosenberg T, Flage T, Hansen E, Rudanko S, Viggoson G. Visual impairment in Nordic children. II Aetiological factors. *Acta Ophthalmol*. 1992;70:155-164
- 76.- Sanyal S, Hawkins R. Dysgenetic lens (dyl) a new gene in the mouse. *Invest Ophthalmol*. 1979;18:642-5.
- 77.- Secretaria de Salud. *Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud*. 1997
- 78.- Semina E, Brownell I, Mintz-Hittner H, Murray J, Jamrich M. Mutations in the human forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. *Hum Mol Genet*. 2001;10:231-6.
- 79.- Schaeffer R, Mendenhall W, Ott L. *Elementary Survey Sampling, Fourth Edition*. 1990: 137-154
- 80.- Schanzlin D, Goldberg D, Brown S. Hallermann-Streiff syndrome associated with sclerocornea, aniridia, and a chromosomal abnormality. *Am J Ophthalmol*. 1980;90:411-5.
- 81.- Sherwin J, Hewitt A, Ruddle J, Mackey D. Genetic isolates in ophthalmic diseases. *Ophthalmic Genet*. 2008;29:149-61.
- 82.- Shi X, Luo Y, Howley S, Dzialo A, Foley S, Hyde D, Vihtelic TS. Zebrafish foxe3: roles in ocular lens morphogenesis through interaction with pitx3. *Mech Dev*. 2006;10:761-82
- 83.- Slatkin M, Rannala B. Estimating the Age of Alleles by Use of Intraallelic Variability. *Am J Hum Genet*. 1997;60:447-458
- 84.- Slatkin M, Rannala B. Estimating Allele Age. *Genomics Hum Genet*. 2000; 01:225–36
- 85.- Slatkin M. Allele age and a test for selection on rare alleles. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2000;355:1663-8.
- 86.- Stoll C, Alembik Y, Dott B, Roth M. Epidemiology of congenital eye malformations in 131,760 consecutive births. *Ophthalmic Paediatr Genet*. 1992; 13:179-86.

- 87.- Sowden J. Molecular and developmental mechanisms of anterior segment dysgenesis. *Eye*. 2007; 21:1310–1318
- 88.- Tamayo M, Bernal J. Alteraciones visuales y auditivas de origen genético. Centro Editorial.1998:169
- 89.- Temple I, Hurst J, Hing S, Butler L, Baraitser M. De novo deletion of Xp22.2-pter in a female with linear skin lesions of the face and neck, microphthalmia, and anterior chamber eye anomalies. *J. Med. Genet.* 1990;27: 56-58
- 90.- Tremblay M, Vezina H. New estimates of intergenerational time intervals for the calculation of age and origins of mutations. *Am J Hum Genet.* 2000;66:651–658
- 91.- Valleix S, Niel F, Nedelec B, Algros MP, Schwartz C, Delbosc B, Delpech M, Kantelip B. Homozygous nonsense mutation in the FOXE3 gene as a cause of congenital primary aphakia in humans. *Am J Hum Genet.* 2006;79:358-64
- 92.- Vázquez Ana, Padecen ceguera pueblos tlaxcaltecas, *Diario REFORMA*, 03 de marzo de 2009, Nacional p. 15
- 93.- Voronina V, Kozhemyakina A, O'Kernick C, Kahn N, Wenger S, Linberg J, Schneider A, Mathers P. Mutations in the human RAX homeobox gene in a patient with anophthalmia and sclerocornea. *Hum Mol Genet.* 2004;13:315-22
- 94.- Wimplinger I, Shaw G, Kutsche K. HCCS loss-of-function missense mutation in a female with bilateral microphthalmia and sclerocornea: a novel gene for severe ocular malformations?. *Mol Vis.* 2007;13:1475-82
- 95.- Wimplinger I, Morleo M, Rosenberger G, Iaconis D, Orth U, Meinecke P, Lerer I, Ballabio A, Gal A, Franco B, Kutsche K. Mutations of the mitochondrial holocytochrome c-type synthase in X-linked dominant microphthalmia with linear skin defects syndrome. *Am J Hum Genet.* 2006;79:878-889
- 96.- Wissinger B, Kohl S, Langenbeck U. *Genetics in Ophthalmology*. *Dev Ophthalmol.* 2003; 37:16-43
- 97.- Ying K, Curry C, Rajani K, Kassel S, Sparkes R. De novo interstitial deletion in the long arm of chromosome 9: a new chromosome syndrome. *J Med Genet.* 1982;1:68-70
- 98.- Yoshimoto A, Saigou Y, Higashi Y, Kondoh H. Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development.* 2005;132: 4437-48.
- 99.- Yotova V, Labuda D, Zietkiewicz E, Gehl D, Lovell A, Lefebvre J, Bourgeois S, Lemieux-Blanchard E, Labuda M, Vézina H, Houde L, Tremblay M, Toupance B, Heyer E, Hudson TJ, Laberge C. Anatomy of a founder effect: myotonic dystrophy in Northeastern Quebec. *Hum Genet.* 2005;117:177–187.
- 100.- Zlotogora J. High frequencies of human genetic diseases: founder effect with genetic drift or selection. *Am J Med Genet.* 1994;49:10-3

Paginas consultadas

101.-

<http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/prodyserv/iris/scince/html/proyirisscince.cfm>

102.- <http://unstats.un.org/unsd/censuskb20/KnowledgebaseCategory65.aspx>

103.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

104.- <http://www.conapo.gob.mx>

105.-

<http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/Tlax/Poblacion/default.aspx?tema=ME&e=29>

106.-

http://maps.google.com.mx/maps?pq=distancia+santa+ana+chiautempan+san+francisco+tetlanohcan&hl=es&cp=0&gs_id=t&xhr=t&client=firefox-a&hs=Jdy&rls=org.mozilla:es-ES:official&channel=s&gs_upl=&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.,cf.osb&biw=1526&bih=945&q=santa+ana+chiautempan+san+francisco&um=1&ie=UTF-8&hq=&hnear=0x85cfdef5a6addef7:0x8f8286c753d081ef, San+Francisco,+Santa+Cruz+Guadalupe,+Chiautempan,+TLAX&gl=mx&ei=vZsCT5z2Ho662gWT7tC0Ag&sa=X&oi=geocode_result&ct=title&resnum=1&sqi=2&ved=0CBsQ8gEwAA

107.-

<http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/prodyserv/cartocen/cartocen.cfm?c=334>

108.- <http://www.inegi.gob.mx/est/contenidos/espanol/.../metodeneu.html>

http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/ccpv/cpv2000/default.aspx?&_s=est&_c=14058

109.- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>

110.- <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/168ssa18.html>

111.- <https://lists.soe.ucsc.edu/pipermail/genome/2009-February/018151.html>