

Universidad del Valle de Guatemala  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Utilización de la técnica Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual como herramienta para la detección de mutaciones puntuales en los genes *EVC* y *EVC2* implicados en el síndrome de Ellis van Creveld

Wendy Karen Jó Lei

Guatemala  
2010



Utilización de la técnica Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual como herramienta para la detección de mutaciones puntuales en los genes *EVC* y *EVC2* implicados en el síndrome de Ellis van Creveld

Universidad del Valle de Guatemala  
Facultad de Ciencias y Humanidades



Utilización de la técnica Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual como herramienta para la detección de mutaciones puntuales en los genes *EVC* y *EVC2* implicados en el síndrome de Ellis van Creveld

Trabajo de investigación presentado  
por Wendy Karen Jó Lei  
para optar el grado de Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala  
2010



## PREFACIO

El síndrome de Ellis-van Creveld es una enfermedad genética con una incidencia de 1 de cada 60,000 nacidos vivos, sus características fenotípicas son muy características, dando lugar a una tétrada de anomalías que incluyen: condrodisplasia, displasia ectodermal, polidactilia y desarrollo de malformaciones congénitas.

En Guatemala, esta investigación constituye la primera vez que se reporta la presencia de dicha enfermedad, detectada por el Dr. Paez, doctor médico entrenado en cardiogenética, y el encargado de esta investigación. El estudio pretende dar tanto un enfoque clínico como molecular al diagnóstico de la enfermedad de Ellis-van Creveld, así como ser un estudio pionero en la detección de enfermedades genéticas en Guatemala.

Este proyecto fue financiado principalmente por la Fundación Aldo Castañeda, cofinanciado por distintas instituciones como el Instituto de Enfermedades Genéticas y Enfermedades Metabólicas (INVEGEM) – Fundación Rozas Botrán, el Laboratorio de Protección Vegetal, y el departamento de Bioquímica y Microbiología de la Universidad del Valle de Guatemala.

Agradezco principalmente al equipo de trabajo de INVEGEM por darme la oportunidad de participar en este proyecto, al Dr. Silva por creer en mí, a la Lda. Elena Dardón por su apoyo, a la Lda. Sofía Hernández por su invaluable ayuda en la fase experimental del proyecto, y en especial al Lic. Andrés Ávalos por su paciencia, su apoyo y por ser mi mentor y guía.

Agradezco, al igual, a la Universidad del Valle de Guatemala, en especial a dos personas por su colaboración en el proyecto, la Dra. Pennington, quien me guió en el alcance del proyecto, y la Lda. Palmieri, quien amablemente prestó sus instalaciones, ambas financiando parte de la investigación.

Agradezco al equipo de analistas forenses de la Fundación de Antropología Forense de Guatemala (FAFG) por su colaboración, en especial a la Lda. Mishel Stephenson, por su interés en el proyecto y ser una guía.

Agradezco a mis amigas Mónica y Ana Lucía por brindarme su amistad, apoyo y ánimos en todo el proceso.

Agradezco también a mi familia por brindarme constante apoyo y ánimos, sobre todo a mi papá.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
PREFACIO	vi
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
RESUMEN	xiii
Capítulos	
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Antecedentes	2
1. La herencia en genética	2
2. Nomenclatura de las mutaciones	4
3. Ellis-van Creveld	5
4. Cuadro Clínico	5
5. <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	12
6. Diagnóstico Molecular	13
7. Mutaciones más frecuentes	19
8. Asociación de EvC a otras enfermedades	25
9. Tratamiento	26
B. Justificación	28
C. Objetivos	29
1. Generales	29
2. Específicos	29
II. METODOLOGÍA	30
A. Procedimientos	30
1. Diseño de cebadores	31
2. Diseño de consentimientos informados	31
3. Recolección de muestras	31
4. Extracción ADN	32

5.	Reacción en Cadena de la Polimerasa	32
6.	Visualización de bandas	34
7.	Secuenciación	34
8.	SSCP	34
III.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
A.	Diseño de Cebadores	36
B.	Optimización de PCR	39
1.	Concentración de ADN	39
2.	Concentración de MgCl <sub>2</sub>	40
3.	Temperatura de Anillamiento (Ta)	41
4.	Adición de DMSO y BSA	41
5.	Reamplificación	42
6.	Combinación de factores	43
C.	Secuenciación	44
D.	SSCP	46
E.	Comparación entre la técnica SSCP y secuenciación directa	52
IV.	CONCLUSIONES	55
V.	RECOMENDACIONES	57
VI.	LITERATURA CITADA	58
VII.	APÉNDICE	65
A.	Certificado de terminación de curso de entrenamiento en “Protegiendo los Participantes de Investigación Humana”	65
B.	Consentimientos informados	66
C.	Protocolo de extracción de ADN con kit comercial Wizard Genomic DNA Purification kit	71
D.	Protocolo de PCR	72
E.	Protocolo de reamplificación de PCR	74
F.	Protocolo para elaboración de la técnica de Polimorfismo de la comprobación de una sola banda (SSCP)	75
G.	Alineamiento de secuencias de paciente y referencia GRCh37	77

H.	Perfil de SNP de los genes <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	82
I.	Frecuencia de la distribución en distintas poblaciones de polimorfismos encontrados para los genes <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	84
J.	Frecuencia de los patrones y el Rf de las bandas obtenidas por SSCP	88
K.	Comparación de costos Secuenciación vrs. SSCP	89
VIII.	GLOSARIO	90

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Página</b>
1. Mutaciones encontradas en el gen <i>EVC</i> para el síndrome Ellis-van Creveld	20
2. Mutaciones encontradas en el gen <i>EVC2</i> para el síndrome Ellis-van Creveld y la disostosis acrofacial de Weyers	21
3. Frecuencia de las mutaciones encontradas en el gen <i>EVC</i> en personas con <i>EvC</i> evaluados con métodos de biología molecular reportados en la literatura	23
4. Frecuencia de las mutaciones encontradas en el gen <i>EVC2</i> en personas con <i>EvC</i> evaluados con métodos de biología molecular reportados en la literatura	24
5. Programa de PCR	32
6. Cebadores diseñados para los exones analizados del gen <i>EVC</i>	36
7. Cebadores diseñados para los exones analizados del gen <i>EVC2</i>	36
8. Análisis de mutaciones en exones del gen <i>EVC</i> comparados con una secuencia consenso evaluados mediante secuenciación directa	45
9. Análisis de mutaciones en exones del gen <i>EVC2</i> comparados con una secuencia consenso evaluados mediante secuenciación directa	45
10. Cambios a nivel de ARNm y proteína debido a los SNP encontrados en la paciente con el síndrome de Ellis-van Creveld	46
11. Exones con migraciones distintas entre paciente y control negativo	47
12. Frecuencia de los patrones obtenidos en la población estudiada de los exones 7, 10, 13 y 15 del gen <i>EVC</i>	49
13. Exones con polimorfismos encontrados según la técnica utilizada	53

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
1. Paciente EvC con polidactilia postaxial, sidactilia y uñas Hipoplásicas	6
2. Paciente EvC con genu valgo	6
3. Paciente con EvC con ausencia de incisores superiores e incisores inferiores cónicos	7
4. Válvulas del corazón	8
5. Caso C	9
6. Caso D: Polidactilia de los cuatro extremos del cuerpo, pies y manos	10
7. Paciente caso E con diagnóstico clínico del síndrome de EvC	10
8. Pedigree la paciente caso E diagnóstico clínico del síndrome de EvC	11
9. Organización genómica de los genes <i>EVC</i> y <i>EVC2</i>	12
10. Técnica de Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual (SSCP)	15
11. Secuenciación automática capilar	16
12. Paciente 1 del Caso F	18
13. Paciente 2 del Caso F	18
14. Caso G: Síndrome EvC asociado a coeficiente intelectual (IQ) bajo en una familia egipcia	19
15. Paciente de 8 años de edad con disostosis acrodental de Weyer	26
16. Diagrama de Flujo de Metodología	30
17. Esquema general para la optimización de una PCR	33
18. División de la región de amplificación del exón 1 de la isoforma 2 del gen <i>EVC2</i>	38
19. Amplificación de regiones de ADN de distintos tamaños a diferentes Concentraciones	39
20. Optimización de la amplificación de 584pb del exón 12 del gen <i>EVC2</i> variando concentración de $MgCl_2$	40
21. Comparación entre variaciones de $\sim 5^\circ C$ de Ta en 3 regiones.	41

22. Optimización del exón 12 de 423pb del gen <i>EVC</i> con la adición de 5% DMSO y 0.08% BSA y variando temperatura de anillamiento	42
23. Reamplificación de exón 7 de 430 pb del gen <i>EVC</i>	43
24. Optimización en la PCR del exón 15 de 531pb del gen <i>EVC</i>	43
25. Electroferograma del exón 6	46
26. Comparación de patrones de migración variados entre paciente y control negativo C-001	47
27. Migración de amplificaciones de exones 7, 9, 16 y 18 pertenecientes al gen <i>EVC2</i> en dos condiciones	48
28. Migración del producto PCR de los exones 7, 15, 10 y 13 del gen <i>EVC</i> por la técnica SSCP	51
29. Electroferograma del exón 13	52

## RESUMEN

El síndrome de Ellis-van Creveld (EvC) es una enfermedad autosómica recesiva que involucra a dos genes, *EVC* y *EVC2* con 21 y 22 exones respectivamente. Se caracteriza por la presencia de polidactilia postaxial en manos, acortamiento de las extremidades, tórax angosto, dientes y uñas displásicas, enanismo y desarrollo de malformaciones cardíacas en un 50 a 60% de los casos. Su incidencia es de aproximadamente 1 de cada 60,000 nacidos vivos.

Se reporta en este trabajo un caso de un paciente con Ellis-van Creveld, y se describe la metodología de diagnóstico con enfoque molecular utilizada, desde el diseño de cebadores de 27 exones, la optimización de la PCR para 29 regiones, los análisis de electroferogramas y de alineamientos de secuencia luego de obtener la secuencia de la paciente, hasta la optimización y realización de la técnica de Polimorfismos Conformacionales de Cadena Individual (SSCP, por sus siglas en inglés Single Stranded Conformational Polimorfisms), y su posterior análisis en la comparación de los patrones obtenidos.

Con ambas técnicas se detectaron polimorfismos de un nucleótido (SNP por sus siglas en inglés Single Stranded Polimorfism). Con la secuenciación se encontraron mutaciones en los exones 6 y 8 del gen *EVC*, exón 14 y exones 1 de ambas isoformas del gen *EVC2*. Con los SSCP se detectaron polimorfismos en los exones 7 y 15 del gen *EVC*. Las únicas regiones donde fue posible la detección de polimorfismos por ambas técnicas fueron el exón 10 y exón 13 del gen *EVC*.

En este trabajo se logró detectar mediante el análisis de electroferograma del exón 6 la mutación heterocigota 954 T>A, que combinada con el polimorfismo homocigoto 953 C>T, forma el codón de alto UAA, dando lugar a la mutación L256X en la proteína, reportada en el estudio de Sund y colegas (2009), constituyendo ésta la posible mutación implicada en el desarrollo de la EvC en la paciente estudiada.

## I. Introducción

La enfermedad de Ellis-van Creveld (EvC) es una displasia condroectodermal autosómica recesiva rara causada por mutaciones en cualquiera de los dos genes, *EVC* y *EVC2*. El cuadro clínico que caracteriza a la EvC por la presentación de polidactilia postaxial en las manos, acortamiento de las extremidades, dientes y uñas displásicas, enanismo (Ellis *et al.* 1940), y en un 50 a 60% de los casos defectos congénitos del corazón (Rihani 2007). Pacientes infantiles con esta última anomalía tienen una tasa de mortalidad de un 50% (Shilpy *et al.* 2007).

La tasa mundial de incidencia es aproximadamente 1 de cada 60,000 nacidos vivos, siendo la población Amish la que presenta la mayoría de casos, con una prevalencia encontrada de 2 de cada 1,000 personas, y 5 de cada 1,000 nacidos vivos de la comunidad Amish del condado de Lancaster, Pensylvania. Se ha encontrado que en la mayoría de casos, los padres del paciente son consanguíneos (Abeles *et al.* 2008; Polymeropoulos *et al.* 1996).

En esta investigación, se presentará el caso de una paciente con síntomas clínicos sugerentes de la EvC asociado a canal atrioventricular común, constituyendo el primer reporte a nivel nacional de dicho caso. A causa de la rareza de la enfermedad, se reportará un protocolo de diagnóstico molecular utilizando las técnicas PCR-SSCP y secuenciación para determinar la mutación causante del desarrollo de la enfermedad en caso que se vuelva a presentar un caso similar.

Debido a su importancia en casos de presentación de malformaciones congénitas cardíacas, es muy importante la detección temprana de dicha enfermedad, para un adecuado corregimiento quirúrgico del corazón en el niño, y que éste pueda llevar una vida normal.

## A. Antecedentes

1. La herencia en genética: se habla de herencia cuando un individuo tiene rasgos similares a sus progenitores, características físicas las cuales se le llaman fenotipo. Este concepto se ha ido moldeando a través de los años, cada vez con mayor información de la manera en cómo se heredan dichas características, ampliándolo y profundizándolo a nivel del genoma, por lo cual le llamaremos genotipo porque involucra todo el genoma, y es el responsable de codificar el fenotipo (Griffiths *et al.* 2002).

Cada individuo tiene 23 pares de cromosomas, un juego heredado por cada progenitor, 22 de estos pares son iguales, y se les llama cromosomas autosómicos. En el caso del par faltante se hereda por parte de la madre un cromosoma X, y por parte del padre un cromosoma ya sea X o Y. Un varón tiene la configuración XY, mientras que una mujer tiene configuración XX, estos son los cromosomas determinantes del sexo, por lo que se les llama también cromosomas sexuales (Griffiths *et al.* 2002).

A las diferentes formas de un gen se les conoce como alelo, por lo tanto un individuo puede contener dos alelos para un solo gen, uno heredado por cada padre. Se dice que es homocigoto, cuando ambos alelos son iguales, y heterocigoto cuando ambos alelos son diferentes (Griffiths *et al.* 2002). De hecho, pueden existir varias formas de alelos en una sola población, a esto se le denomina polimorfismo, definido por Griffiths y colegas (2002) como:

<< ...la coexistencia en una población de dos o varios fenotipos comunes de un carácter. Los fenotipos alternativos de un polimorfismo se heredan a menudo como alelos de un solo gen.>>

También Oliva (2004) lo describe como:

<<Un locus se considera polimórfico si el alelo raro tiene una frecuencia de 0.01% de manera que la frecuencia del heterocigoto es al menos de 0.02. Las variaciones con una frecuencia inferior al 1% se denominan variantes raras.>>

A los polimorfismos que ocurren entre dos individuos de la misma especie variando en un solo nucleótido se le denomina SNP (por sus siglas en inglés “Single Nucleotide Polymorphism”), estas pequeñas mutaciones no afectan el fenotipo desarrollado, se dan en 1 cambio por cada 1000 bases entre dos individuos. A las mutaciones que afectan únicamente la secuencia codificante, pero no resultan en un cambio de aminoácido se les denomina mutaciones sinónimas, y se les puede considerar un SNP (Griffiths *et al.* 2002; Oliva *et al.* 2004).

Las mutaciones que si afectan el fenotipo o que están asociados al desarrollo de una enfermedad son:

- Mutaciones de sentido equivocado “missense”: sustituyen una base por otra, generando así el cambio en el triplete, por consecuente codifica un aminoácido diferente (Oliva *et al.* 2004).

- Mutaciones sin sentido “nonsense”: codifican un codón de terminación prematura, impidiendo la producción de la proteína completa (Oliva *et al.* 2004).
- Deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura “frameshift”: desfasa todo el marco de lectura generando en la mayoría de casos un fenotipo afectado grave (Oliva *et al.* 2004).
- Deleciones o inserciones que no alteran el marco de lectura: estos se dan en cambios de 3, resultando en la introducción o eliminación de uno o más aminoácidos (Oliva *et al.* 2004).
- Mutaciones que crean o destruyen sitios de corte y empalme: resultan en la adición o eliminación de algún exón (Oliva *et al.* 2004).
- Mutaciones a nivel de regiones reguladoras: se da un cambio en la expresión del gen (Oliva *et al.* 2004).

Existen diferentes patrones de herencia determinados por las diferentes combinaciones entre genes dominantes y genes recesivos. Los genes dominantes son aquellos que cuando se heredan, basta con tener un solo alelo para prevalecer sobre el otro, estos se representan utilizando una mayúscula, mientras que los genes recesivos son aquellos que únicamente determinará el fenotipo al encontrarse en ambos alelos, estos se representan con una minúscula (Griffiths *et al.* 2002), *e.g.* el cruce entre dos formas de hoja, redondo y afilado, los cuales denominaremos *R* y *r* respectivamente, si tiene genotipo *R/R* o *R/r* desarrollará fenotipo redondo, mientras que con genotipo *r/r* desarrollará fenotipo afilado.

Con base a lo explicado anteriormente existen diferentes formas de enfermedades:

- Enfermedades autosómicas recesivas: El fenotipo afectado es determinado por un alelo recesivo, y el fenotipo no afectado está determinado por el correspondiente alelo dominante, ej. la enfermedad fenilcetonuria (PKU) es heredada como fenotipo recesivo con el genotipo *p/p*, un individuo es considerado sano cuando tiene el genotipo *P/P* y portador al ser *P/p* (Griffiths *et al.* 2002).
- Enfermedades autosómicas dominantes: Estas en cambio, su fenotipo son determinadas por un solo alelo dominante, ej. la enfermedad de Huntington que consiste en la degeneración neuronal provocando convulsiones y la muerte prematura, es de genotipo *H/h* o *H/H*. La herencia de este último genotipo en cualquier enfermedad autosómica dominante es muy escasa, pues es considerado que puede producir un efecto tan grave que este genotipo es letal (Griffiths *et al.* 2002).
- Enfermedades recesivas ligadas al cromosoma X: Sujetos con este tipo de enfermedad muestran generalmente los siguientes patrones (Griffiths *et al.* 2002):
  - Una mayor cantidad de hombres muestran el fenotipo afectado, pues las mujeres resultan ser afectadas únicamente cuando ambos padres tienen dicho alelo.
  - Ningún descendiente de un varón afectado estará desarrollará la enfermedad, sin embargo todas sus hijas serán portadoras, y a su vez, la mitad de los descendientes varones de estas hijas portadoras tendrán la probabilidad de un 50% de resultar afectados.

- Ningún varón descendiente de un individuo afectado desarrollará la enfermedad ni será transmitida, puesto que el cromosoma afectado es el X, y los varones heredan de su padre únicamente el cromosoma Y.

Ej. La distrofia muscular duchenne, la cual es una enfermedad mortal ligada al X y recesiva. Las mujeres son portadoras y sus descendientes hombres resultan afectados en un 50% de los casos.

- Enfermedades dominantes ligadas al cromosoma X (Griffiths *et al.* 2002):
  - Los varones afectados transmiten su condición a todas sus hijas, pero no a sus hijos.
  - Las mujeres heterocigotas desarrollan la enfermedad, y al casarse con un individuo sano, transmiten en un 50% de los casos el defecto a todos sus hijos varones y hembras.

Existen muy pocos casos, pero un *ej.* es la hipofosfatemia, raquitismo con resistencia a la vitamina D.

2. Nomenclatura de las mutaciones: debido al constante descubrimiento de nuevas mutaciones, surgió la necesidad de nombrarlas con un sistema de nomenclatura que funcionara a nivel internacional, con las condiciones de ser preciso, sin ambigüedades, pero flexible, y el cambio nucleotídico tiene que estar incluido en el reporte original. Entre las recomendaciones realizadas por Antonarakis y colegas en 1998 son las siguientes:

- Dependiendo de la secuencia de referencia, se coloca una “g.” cuando es genómica, y una “c.” cuando es ADNc.
- La A del codón iniciador metionina se coloca como el nucleótido +1, y el nucleótido en el 5' al +1 se denomina -1.
- Dos mutaciones en un mismo alelo se colocan en un mismo corchete, pero se separan por “;”.

En el año 2000, J. den Dunnen y S. Antonarakis actualizaron y agregaron más recomendaciones tanto a nivel de ADN como a nivel de proteína. A nivel de ADN:

- Los cambios de nucleótido empiezan con el número del nucleótido y el cambio sigue este número; {intervalo de nucleótido} {secuencia cambiada de nucleótido} {tipo de cambio} {nueva secuencia de nucleótido}
- Las sustituciones son reportadas como “>”; *e.g.* la mutación 4003C>A se interpreta como un cambio del nucleótido C de la secuencia referencia por una A.
- Las deleciones son nombradas como “del” luego del intervalo delecionado, *e.g.* 1997-1999del o 1997-1999delACC.
- Inserciones son nombradas como “ins”, seguida por los nucleótidos insertados, así 2002-2003ins A nos dice que una T fue insertada entre los nucleótidos 2002-2003.
- Mutaciones en el intrón se nombran con el número del intrón precedido por “IVS” o la posición del ADNc, además los números se colocan como positivos si empiezan del G del sitio de corte y empalme GT, mientras que se denominan negativos si empiezan de la G en el sitio de corte y

empalme AT, *e.g.* la mutación IVS4-2A>C o 1998-2A>C denomina en el primer caso la mutación del cambio de A reemplazándola por una C en el intrón 4 en la posición -2, y a nivel, y en el segundo caso a nivel de ADNc se da el cambio entre los nucleótidos 1997 y 1998.

Y a nivel de proteína, los cuales deducen la consecuencia no la naturaleza de la mutación (den Dunnen *et al.* 2000):

- El codón iniciador de la metionina es codón 1.
- Codones de terminación se designan por una X, así R97X describe un cambio en arginina 96 a un codón de terminación.
- Cambio de aminoácidos se tiene de primero el aminoácido original, la posición donde se encuentra y de último el aminoácido que lo reemplazo, *e.g.* Y97S nos dice que tirosina 97 es sustituida por una serina.
- Deleciones también son determinadas como “del” luego del intervalo del aminoácido, *e.g.* T97-C102del.
- Las inserciones son nombradas como “ins” luego del intervalo de aminoácido seguido por los aminoácidos insertados, *e.g.* T97-W98insLQS.

3. Ellis-van Creveld: esta enfermedad (EvC, MIM 225500) es una displasia condroectodermal (condro=esqueleto; ectodermal=piel) autosómica recesiva rara causada por mutaciones en los genes *EVC* y *EVC2*, esto sugiere que dichas mutaciones son heredadas por ambos padres, quienes son heterocigotos para dichas mutaciones en dichos genes.

Fue reportada por primera vez en 1940 por Richard Ellis y Simon van Creveld, quienes lo definieron como un síndrome consistente en una tétrada de anormalidades: a) condrodisplasia, b) displasia ectodérmica, c) polidactilia y d) defectos congénitos del corazón. Desde entonces se ha reportado en la literatura aproximadamente unos 150 casos más. Este síndrome se da con una mayor frecuencia en poblaciones Amish, con una prevalencia encontrada de 2 de cada 1,000 personas, y 5 de cada 1,000 nacidos vivos de la comunidad Amish del condado de Lancaster, Pensylvania (Polymeropoulos *et al.* 1996). En la población general su incidencia es aproximadamente 1 de cada 60,000 nacidos vivos (Abeles *et al.* 2008).

4. Cuadro clínico: el EvC se caracteriza a grandes rasgos por polidactilia postaxial en las manos, acortamiento de las extremidades y costillas, dientes y uñas displásicas, y enanismo, donde la estatura promedio del adulto suele estar entre un rango de 109-155cm (Geneviève *et al.* 2007; Ruiz-Perez *et al.* 2000). En adición, defectos congénitos del corazón ocurren en un 50 a 60% de los casos (Rihani 2007), canal atrioventricular común y atrio común son los defectos cardíacos más frecuentes (Thapa *et al.* 2008). Las anomalías cardíacas de este síndrome, tiene una tasa de mortalidad de un 50% en pacientes infantiles (Shilpy *et al.* 2007).

La polidactilia en las manos es uno de los rasgos más comunes en estos pacientes (véase Figura 1), polidactilia en los pies se ha encontrado únicamente en un 10% de los casos, donde se presenta usualmente un espacio abierto entre el primer dedo y el resto de dedos (Kurian *et al.* 2007). La polidactilia postaxial puede ser de tipo A, donde los dedos extras están totalmente desarrollados, o de tipo B, donde los dedos extras presentados no lo están, son rudimentarios (Nuñez-Samper *et al.* 2007). Sincarpalismo, sinmetacarpalismo y polimetacarpalismo son frecuentemente presentados. Generalmente el acortamiento de las extremidades son acromélico y mesomélico, y el paciente no puede oprimir el puño (Kurian *et al.* 2007; Rihani 2007). Un defecto del extremo proximal de la tibia, da lugar a la deformidad genu valgo (véase Figura 2), la cual se caracteriza por una desviación del muslo y la pierna en el plano frontal, formando así un ángulo abierto hacia afuera (Ruiz-Perez *et al.* 2007).

*Figura 1.* Paciente EvC con polidactilia postaxial, sindactilia y uñas hipoplásicas



(Kurian *et al.* 2007)

*Figura 2.* Paciente EvC con genu valgo



(Kurian *et al.* 2007)

Las manifestaciones orales (véase Figura 3) incluyen en muchos casos fusión de la porción media del labio superior al margen gingival maxilar, presencia de dientes natales y neonatales, ausencia congénita de dientes, dentición retrasada, y nacimiento de dientes deformes o afectados por caries (Shilpy *et al.* 2007).

Figura 3. Paciente con EvC con ausencia de incisores superiores e incisores inferiores cónicos



(Geneviève *et al.* 2007)

Las deformaciones congénitas del corazón presentadas son diversas, entre ellas: Comunicación interauricular (CIA), CIA's ostium primum, CIA's ostium secundum, coartación con el aorta, estenosis de la válvula aórtica, vena cava superior retornando al atrio izquierdo, comunicación interventricular (CIV), defectos de las válvulas mitral y tricúspide, defecto septal ventricular, síndrome hipoplástico del lado izquierdo del corazón, atrio común, comunicación atrioventricular parcial (CAVP), y canal atrioventricular común o canal atrioventricular completo (CAVC), entre otros (Digilo *et al.* 1997; Katsouras *et al.* 2003; Ökten *et al.* 2004; Sharma *et al.* 2006; Chakraborty *et al.* 2007; Geneviève *et al.* 2007; Piacentini *et al.* 2007; Tompson *et al.* 2007; Sajeev *et al.* 2008).

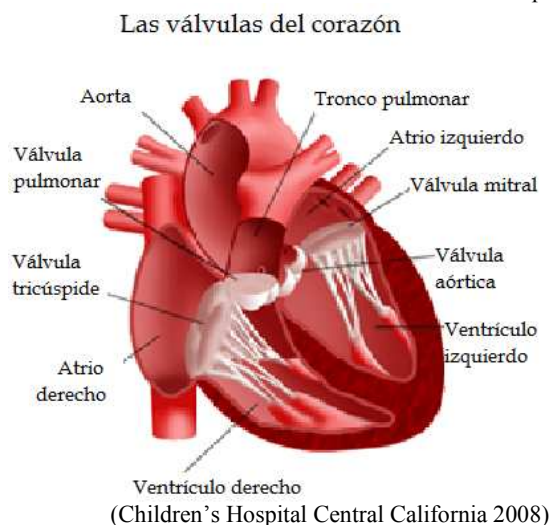
El corazón comprende de varias válvulas, entre ellas la aorta, válvula pulmonar, válvula tricúspide, atrio derecho, ventrículo derecho tronco pulmonar, atrio izquierdo, válvula mitral, válvula aórtica, y ventrículo izquierdo (véase Figura 4), todas ellas importantes en el desarrollo de las diferentes patologías que comprende el cuadro complejo del EvC. El CAVC es una malformación comprendida por una deficiencia variable del área atrioventricular (crux cordis) en el desarrollo del corazón. Se caracteriza por la presencia de una cámara cardíaca común que carece de la porción inferior del septo atrial y porción superior del septo ventricular, que tiene un anillo común para las válvulas atrioventriculares. La malformación incluye los septos atrioventricular, ventricular y atrial, y ambas válvulas atrioventriculares.

Los folletos de las válvulas atrioventriculares no se encuentran unidas de forma segura al margen superior del septo ventricular, y los folletos tienen hendiduras completas que las hacen incompetentes (Macris *et al.* 1992; Calabrò *et al.* 2006).

La mitad de niños con CAVC sin tratamiento mueren en su primer año de vida, ya sea por fallo cardíaco o neumonía. Los sobrevivientes son generalmente afectados por enfermedades vasculares pulmonares luego de los dos años de edad (Calabrò *et al.* 2006).

Además del cuadro clínico presentado, se pueden realizar diversos diagnósticos clínicos a los pacientes como exámenes cardiovasculares y radiográficos, estos incluyen: electrocardiogramas (ECG), rayos-X del tórax, pantorrilla demostrando genu valgo, de las manos demostrando polidactilia, y ecocardiograma transtorácico (Ye *et al.* 2006). Debido a su similitud con algunos otros síndromes como Kaufman-McKusick y la disostosis acrodental de Weyer, el diagnóstico de base molecular ofrece una mejor orientación (Digito *et al.* 1997; Ye *et al.* 2006).

*Figura 4.* Válvulas del corazón. El corazón consta de cuatro cavidades, dos aurículas (también llamadas atrios), que son las cavidades superiores y dos ventrículos, las cavidades inferiores. La sangre pasa a través de una válvula antes de salir de cada cavidad del corazón. Las cuatro válvulas del corazón son la tricúspide, pulmonar, mitral y aórtica



A continuación se presentarán algunos casos reportados en la literatura de personas afectadas con el síndrome de EvC:

#### Caso A

Se reportó en el año 2006, el caso de un niño de 13 años de edad en la India, que presentaba anomalías típicas óseas, como polidactilia bilateral, duplicación incompleta del primer metacarpo y su extremo proximal, fusión del capitatum y unciforme en el lado derecho, epífisis osificada en el extremo inferior de la ulna y radio, deformidad valgo en el tobillo izquierdo, epífisis tibial con forma cónica, y

epífisis fabular no osificada. Mostraba además dientes caninos e incisores hipolásticos, uñas displásicas, unión entre la parte interna y la encía del labio superior, y una malformación congénita del corazón presentando una desviación de izquierda a derecha a nivel del atrio (Sharma *et al.* 2006).

### Caso B

Niña de 4 años de edad, con características típicas del síndrome de EvC, que presentaba una hendidura mediana en el labio superior, frenillo lingual, agenesia de dos molares inferiores, tórax angosto, acortamiento de las extremidades, manos anchas con braquidactilia y uñas pequeñas, polidactilia postaxial tipo A en las manos y pies bilaterales. Ecocardiograma mostró un defecto parcial atrio-ventricular y un atrio común (Digilo *et al.* 1997).

### Caso C

Figura 5. Caso C



Se reportó en el año 2004, el caso de un niño de 15 años (véase Figura 5), hijo de padres consanguíneos, el abuelo de parte de la madre y tíos presentaban estatura corta y polidactilia postaxial en las manos. Tuvo una operación de criptorquidismo a los 2 años de edad. Medía 142 cm de alto, con un peso de 35 kg. Hombros bajos, tórax angosto, con pectus carinatum. Presentaba polidactilia postaxial en las manos y pies, con amputación de los dedos extras. Sus manos y pies eran anchos y gruesos, los dedos tenían forma de salchicha, y las uñas eran displásicas. Los dientes tenían una forma cónica con espacios de intermedio. Exámenes del esqueleto mostraron acortamiento de huesos tubulares, húmero, radio, ulna, tibia, fibula, metacarpos, metatarso, falanges, depresión lateral del la meseta tibial, lordosis lumbar, genu valgo y clinodactilia en los dedos del pie (Ökten *et al.* 2004).

(Ökten *et al.* 2004)

### Caso D

En el 2007, Chakraborty y sus colegas, reportaron un caso de una variante de la EvC, desarrollado en un niño de 9 años de edad. El niño había estado sufriendo constantemente de infecciones respiratorias y había desarrollado progresivamente disnea excepcional por los últimos tres meses. Sus padres no eran consanguíneos. El niño presentaba hipertrofia gingival media y polidactilia como se muestra en la Figura 6. Una radiografía de tórax documento un pequeño incremento de la razón cardioráica con campos pulmonares normales. Electrocardiografía mostró una desviación del axis izquierdo, alargamiento bi-atrial e hipertrofia del ventrículo derecho. Ecocardiografía transtorácica identificó una membrana delgada intra-atrial ondulatoria en el lado izquierdo con un defecto ostium primum. Se encontró también cor triatatum (CT), que es una malformación congénita cardíaca, que consiste en una membrana fibromuscular que

divide el atrio izquierdo en una cámara postero-superior y una cámara antero-inferior. Se diagnosticó al niño con polidactilia de los cuatro ligamientos con CT y defecto septal ostium primum, sugiriendo posible diagnóstico de una variante del síndrome EvC.

*Figura 6.* Caso D: Polidactilia de los cuatro extremos del cuerpo, pies y manos



(Chakraborty *et al.* 2007).

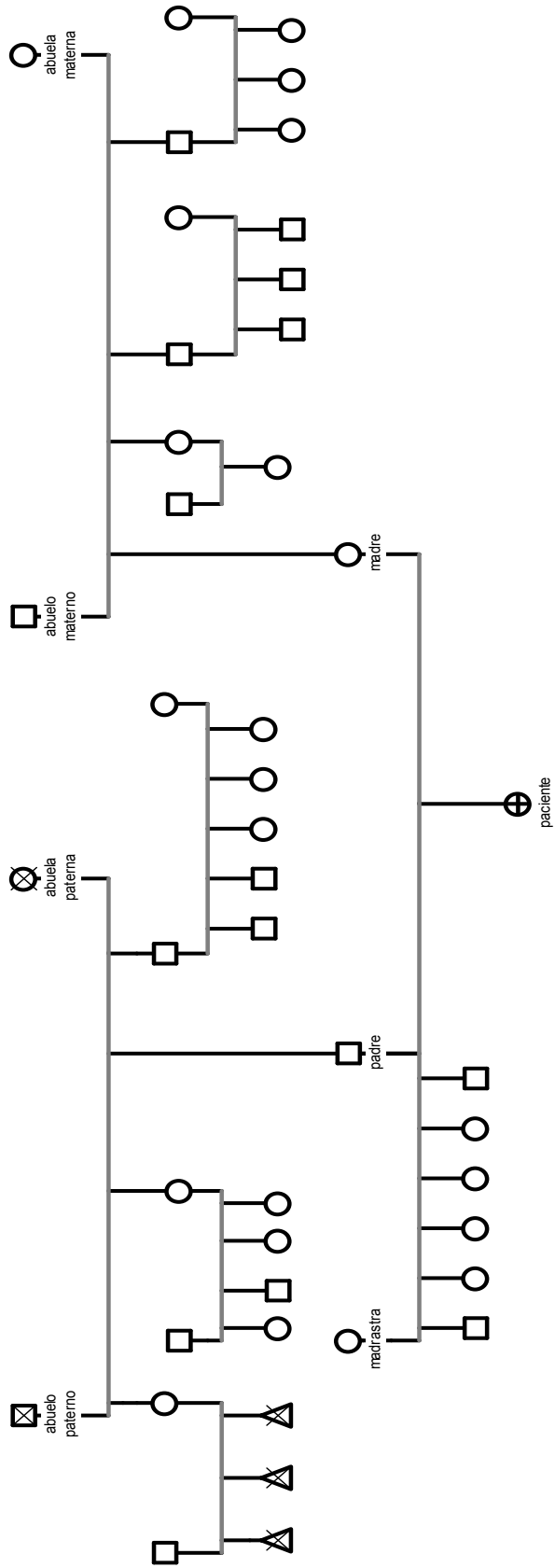
### Caso E

Este estudio reporta el caso de una niña de 5 años de edad que vive en Guatemala, con ambos padres del mismo apellido paternal, y sin previa evaluación de consanguinidad aparente. Como se puede observar en la Figura 7, la niña presenta paladar hendido, encías en sierra, dientes displásicos, erupción dental tardía, oligodontia, polidactilia postaxial en manos operada, uñas hipoplásicas tanto en manos como en pies, genu valgo, estatura baja, miembros cortos, torax angosto, hipertelorismo mamario, y canal atrioventricular común (Paez 2009).

*Figura 7.* Paciente caso E con diagnóstico clínico del síndrome de EvC. **A:** Tórax angosto, genu valgo y manos con polidactilia post-operadas. **B:** Mano con uñas displásicas. **C:** Pie con uñas displásicas. **D:** Oligodontia, dientes displásicos, encías en sierra y paladar hendido.



**Figura 8.** Pedigrigree de la paciente caso E con diagnóstico clínico del síndrome de EVC: No hay consanguinidad aparente ni otros familiares afectados.



5. *EVC* y *EVC2*: por años se había considerado al gen *EVC*, localizado en el cromosoma 4 región 4p16, como único causante del síndrome de EvC, sin embargo, en varios casos de EvC no se lograba encontrar una mutación en algún alelo del gen, por lo que se amplió la región de búsqueda, y se encontró el gen *EVC2*, separado a una distancia de 2.6kb del gen *EVC*, teniendo ambos una configuración cabeza-cabeza como muestra la Figura 9. (Galdzicka *et al.* 2002; Ruiz-Perez *et al.* 2003; Tompson *et al.* 2007; Ye *et al.* 2006).

Figura 9. Organización genómica de los genes *EVC* y *EVC2*: Estos se encuentran separados por una distancia de 2.6kb, los cuadros en la figura representan los exones de cada gen, con 21 exones el *EVC* y 22 exones el *EVC2*



(modificado de Tompson *et al.* 2007).

El gen *EVC* tiene 21 exones codificantes de 120kb de ADN genómico y codifica a 992 aminoácidos (Ruiz-Perez *et al.* 2000). Fue asignado al cromosoma 4p16 en un estudio de ligamiento con doce pedigreos: nueve Amish y uno de México, de Ecuador y de Brazil conducido por Polymeropoulos y colegas en el año 1996. Recientemente, en un estudio conducido por Victor Ruiz-Perez y colegas en el año 2007, se encontró que la proteína Evc está localizada en el extremo distal del cuerpo basal y la base del axonema, además es primordial para la señalización del Indian hedgehog (Ihh), en huesos en desarrollo. Ihh es el regulador más importante en el crecimiento de los huesos, coordina la proliferación y la diferenciación de los condrocitos, los cuales son responsables del tamaño y la forma de los huesos largos y las articulaciones.

En el desarrollo de huesos largos, Ihh es secretado por condrocitos prehipertróficos, generando una señal de gradiente que coordina diferenciación y proliferación de condrocitos, y desarrollo del pericondrio. Existen tres moléculas de señalización Hedgehog en el humano, Ihh, Sonic hedgehog (Shh) y Desert hedgehog (Dhh), los cuales están mediados por el factor de transcripción Gli3. De manera general, la señalización de los hedgehogs (Hh) funciona mediante la unión a su receptor, lo cual libera la inhibición de Smoothened (Smo), el activador de la ruta Hh. Smo promueve la activación de Gli. Por lo que se puede decir que EvC es un componente de señalización de Hh indispensable para el crecimiento endocondral normal, actuando corriente abajo de Smo en la cascada de regulación, para facilitar la transcripción de genes reguladores de Ihh (Ruiz-Perez *et al.* 2007).

El gen *EVC2* tiene 22 exones con una longitud de 150kb de ADN genómico y codifica a 1,308 aminoácidos (Ruiz-Perez *et al.* 2003). Comparte una región promotora común al *EVC*. Análisis de secuenciación de esta región promotora identifican varios posibles sitios de unión a factores de transcripción incluyendo Sp1, AP-2, miogenina, y C/EBP. Esta organización sugiere que ambos genes son transcritos de una manera coordinada, llevando a suponer que están funcionalmente relacionados

(Galdzicka *et al.* 2002). Se han encontrado dos isoformas, diferenciándose en el exón 1, donde la variante de transcripción 1 representa la versión más corta transcrita, pero codifica la isoforma más larga, mientras que la variante de transcripción 2 es la isoforma más larga con el transcrito más corto, debido a que difiere en la región 5'UTR, el cual carece de una porción en la región codificante 5', y utiliza en su lugar un codón iniciador corriente abajo, resultando su acortamiento en la región N-terminal (Pruitt *et al.* 2007).

El gen *EVC2* codifica la proteína limbina, cuyo rol es crítico en la formación de los huesos y el desarrollo del esqueleto, pero hacen falta estudios posteriores para determinar con mayor profundidad su función específica en el cuerpo. Este gen es expresado en el corazón, pulmón, placenta, músculo esquelético, riñón y páncreas (Galdzicka *et al.* 2002).

En un estudio reciente (Sund *et al.* 2009) se encontró que existe una co-expresión de los productos de ambos genes durante la morfogénesis del corazón en estructuras valvuloseptales clave que son malformados en el síndrome EvC. Este hallazgo concuerda con la orientación cabeza-cabeza de ambos genes, sugiriendo que ambas proteínas funcionan coordinadamente durante el desarrollo del corazón y su pérdida da lugar al EvC.

En la mayoría de estudios reportados, se ha encontrado que el EvC es desarrollado en personas con mutaciones en un solo gen, ya sea en *EVC* o *EVC2* (Galdzicka *et al.* 2002; Ruiz-Perez *et al.* 2000; Ruiz-Perez *et al.* 2003; Tompson *et al.* 2007; Ulucan *et al.* 2008; Ye *et al.* 2006). Sin embargo no se le ha podido atribuir a mutaciones en estos dos genes al 100% de los casos de EvC, en el 2007, Tompson y colegas lograron detectar las mutaciones causantes en dos tercios de los 65 pacientes estudiados, por lo que ellos sugieren la posibilidad de la participación de otros genes. Un caso particular lo constituye el estudio conducido por Temtamy y colegas en el 2008, donde se encontró la delección homocigota simultánea de exones del *EVC* y todo el *EVC2*, abarcando además parte de otros genes, los cuales se detallaran en el siguiente segmento.

6. Diagnóstico molecular: luego de pasar por el diagnóstico clínico, es necesario realizar un diagnóstico a nivel molecular, es decir a nivel de los genes para la determinación de la enfermedad de EvC. La determinación de la EvC únicamente puede ser certera con un análisis molecular debido a la naturaleza de su desarrollo, la cual es de tipo recesiva, indicando que necesita que ambos padres sean portadores heterocigotos de dicha enfermedad. Además, el EvC genera una amplia variabilidad fenotípica, pero su rango de variabilidad aún no se ha definido, por lo que se podría confundir con algún otro síndrome, como es el caso de la disostosis acrodental de Weyer, su forma heterocigota.

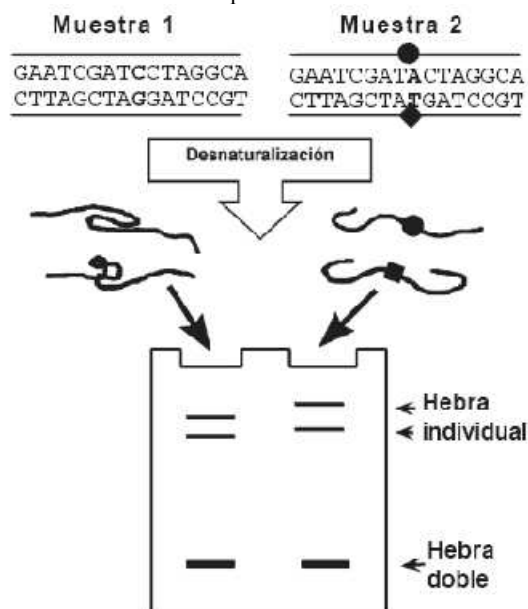
Entonces mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es una técnica utilizada para amplificar una secuencia específica en el genoma, de cada exón involucrado de los genes *EVC* y *EVC2*, y su consecuente secuenciación, se puede encontrar las diferentes mutaciones ocurridas en dichos genes, que dan lugar a la EvC.

Una PCR consiste en tres pasos principales que comprenden: 1) La desnaturalización de la hebra (~96°C), 2) Hibridación de los cebadores (~56°C), y 3) Amplificación de la secuencia de ADN (~72°C). Esto se logra a partir de un termociclador, con el cual se programan las temperaturas a las cuales se llevan a cabo cada paso, y el número de ciclos necesarios, que generalmente son de 30. Los reactivos necesarios incluyen, el ADN muestra, dNTP's, polimerasa, cebadores "primers" sentido y antisentido, cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), buffer con pH adecuado y los deoxinucleotidotrifosfato (dNTP's): adenina, citosina, guanina y timina (Silva *et al.* 2008).

Debido a que el EvC es generado en su gran mayoría por mutaciones puntuales, antes de realizar la secuenciación de los productos, se puede recurrir a utilizar métodos discriminatorios como la técnica de Polimorfismos de conformación de cadena individual (SSCP por sus siglas en inglés), utilizada en el año 2000 por Ruiz-Perez y colegas para un tamizaje inicial de secuencias intrónicas, de las cuales las muestras con patrones alterados de migración se mandaron a secuenciar.

El SSCP puede identificar polimorfismos de un solo nucleótido en segmentos de ADN, aproximadamente entre 150-300 nucleótidos. Esto lo logra desnaturalizando la doble hebra de ADN en simples hebras, las cuales adoptan distintas conformaciones espaciales específicas de su composición nucleotídica (véase Figura 10), debido a que existe una hibridización entre distintas regiones de la secuencia de un mismo segmento de ADN (Sheffield *et al.* 1993). Las diferentes conformaciones se deben al cambio de una sola base, lo cual se detecta bajo algunas condiciones de migración electroforética en una matriz de poliacrilamida (Orita *et al.* 1989, Humphries *et al.* 1997). Ésta constituye una técnica simple, fácil de implementar y económica, comprendiendo una sensibilidad de 80-90% para detectar mutaciones en fragmentos <300pb (Sheffield *et al.* 1993). Se ha encontrado en otros estudios que es posible aumentar la sensibilidad de esta técnica a 97.5-99.9% al combinarla con otros métodos como el análisis heterodúplex (HD), que requiere el uso de electroforesis capilar (Liechti-Gallati *et al.* 1999; Kozłowski *et al.* 2001).

Figura 10. Técnica de Polimorfismos de Conformación de Cadena Individual (SSCP). Muestras 1 y 2 se diferencian en un solo nucleótido, los cuales al desnaturalizarse toman distintas conformaciones espaciales, lo cual migrará de distinta manera en comparación con el control



(Estrada-Cuzcano *et al.* 2005).

Las condiciones como temperatura, composición del gel, fuerza iónica y aditivos modifican las conformaciones de la molécula, haciéndose imposible predecir la estructura tri-dimensional y/o la movilidad del fragmento de ADN de simple hebra (Liechti-Gallati *et al.* 1999).

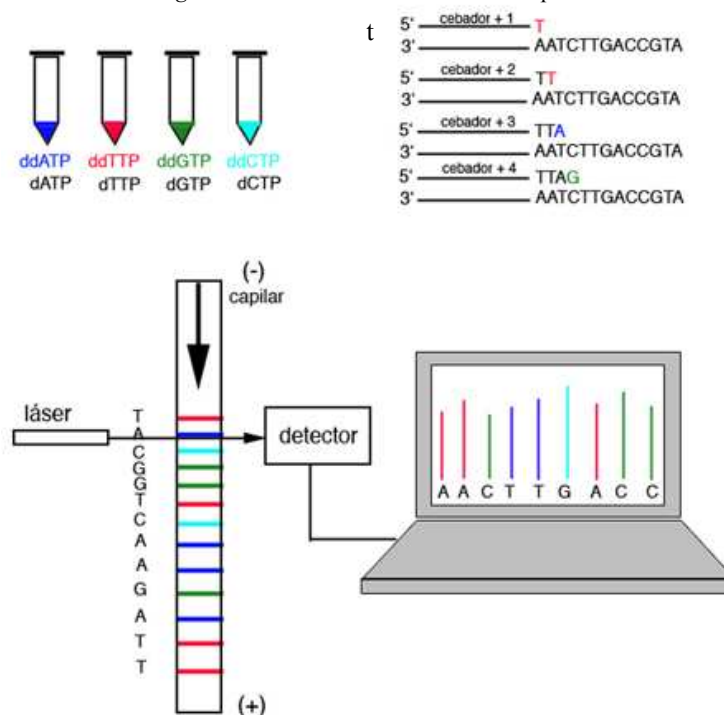
En un estudio realizado por Estrada-Cuzcano y colegas en el 2005, se demostró que la técnica de SSCP sirve como un buen diagnóstico rutinario, siendo más rápido y económico que una secuenciación directa, esto es ahorrando tiempo y dinero, y pudiendo encontrar resultados con alto grado de confiabilidad. Los inconvenientes presentados fueron que no se logró precisar el efecto de ciertos parámetros como la composición del gel, tamaño del fragmento de ADN, composición del tampón, la concentración de ADN y el contenido de guanina/citosina del ADN (Estrada-Cuzcano *et al.* 2005).

La secuenciación por su parte (véase Figura 11), una técnica más sensible, pero más laboriosa y costosa (Estrada-Cuzcano *et al.* 2005), comprende en la determinación del orden de los nucleótidos: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) en la plantilla de ADN a analizar. Los métodos clásicos comprenden el método químico de Maxam y Gilbert, y el método enzimático de Sanger. El primero, consiste en el rompimiento de cadenas sencillas de ADN marcadas radiactivamente mediante reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases de nucleótidos. Con el método de Sanger se utiliza la técnica de PCR para amplificar una región de ADN específico, a diferencia que también se agregan pequeñas cantidades de los dideoxinucleótidos (ddGTP, ddATP, ddCTP, ddTTP) los cuales carecen de su extremo 3'OH libre, por lo que al incorporarse en la cadena de ADN, termina con su elongación. Esta incorporación al azar, genera cadenas de distintas longitudes, todas empezando en un extremo de 5' y

acabando en diferentes posiciones, dependiendo donde se haya incorporado el ddNTP. La reacción con cada dideoxinucleótido de base diferente se realiza en un tubo distinto. Ambos métodos requieren la utilización de una electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida-urea (Rodríguez *et al.* 2006).

En épocas modernas, una alternativa al método de Sanger, lo constituye la secuenciación automática empleando el método enzimático. Esta consiste en marcar con fluorescencia ya sea el cebador o los terminadores y activar la reacción de secuencia. Los productos pasan por un láser que va a excitar los fluoróforos, permitiendo detectar fluorescencia emitida. Esta secuenciación se realiza por medio de un secuenciador automático capilar, en los cuales se inyectan las muestras en un capilar previamente cargado con un polímero, el cual permite resolver fragmentos de ADN de cadena sencilla que se diferencian en una única base. A una altura determinada, el laser detecta la fluorescencia emitida por cada cadena sencilla de ADN fluorescente y traduce esta emisión de fluorescencia en la secuencia correspondiente (Rodríguez *et al.* 2006).

Figura 11. Secuenciación automática capilar



(modificado de Herveg *et al.* 2006)

Otro método automático lo constituye la secuenciación en geles desnaturizantes de acrilamida/bisacrilamida, que consiste en la polimerización de un gel de acrilamida/bisacrilamida entre dos cristales montados sobre un cassette que sirve de soporte para los mismos y que posteriormente se acopla a un secuenciador automático para proceder a la carga de las muestras. Las limitantes de este método lo constituyen la calidad de ADN, correcta cuantificación del mismo, y la polimerización correcta del gel de

acrilamida/bisacrilamida. Este procedimiento se desarrolla aproximadamente durante 7 horas, realizando una lectura de unos 700pb (Rodríguez *et al.* 2006).

El método de secuenciación automática más moderna la constituye la secuenciación empleando microarrays, la cual es explicada por Rodríguez (2006) como:

<<constituyen la última línea de técnicas basadas en la interacción de cadenas complementarias de ADN. Este tipo de técnicas introducen básicamente dos nuevas innovaciones: el empleo de soportes sólidos no porosos tales como cristal que facilitan la miniaturización y la detección basada en fluorescencia y el desarrollo de métodos de síntesis in situ de oligonucleótidos de altas densidades sobre el soporte sólido.>>

Otros métodos utilizados reportados en la literatura en el estudio de EvC son Hibridización *In Situ* de Fluorescencia (FISH), Hibridización *In Situ* en el tejido, análisis de corte y empalme *In Vitro*, análisis con microsatélites, PCR de rango largo, PCR de Transcripción Reversa (RT-PCR), Northern blot, Amplificación rápida del extremo de ADNc (RACE), análisis de Ligamiento, análisis de Matriz-Masa (MassARRAY) y análisis de restricción enzimática (Galdzicka *et al.* 2002; Ruiz-Perez *et al.* 2000; Ruiz-Perez *et al.* 2003; Tompson *et al.* 2007; Ulucan *et al.* 2008; Ye *et al.* 2006; Temtamy *et al.* 2008; Kalsoom *et al.* 2009).

## Caso F

En el 2008 se reportó el caso de una familia de Turquía por Ulucan y colegas, cuyos progenitores tienen un ancestro común, que presentaban algunas características del cuadro propio del síndrome EvC. Estas características incluían estatura corta, hipodonia, defectos congénitos del corazón, polidactilia postaxial de manos y pies, y epífisis en forma de cono de los falangios (*véase* Figuras 12 y 13). Es importante mencionar que estos pacientes no presentaban características distintivas propias del EvC, sino un cuadro menos severo. No se presentaron defectos del labio superior, tórax angosto, uñas hipoplásicas, entre otros.

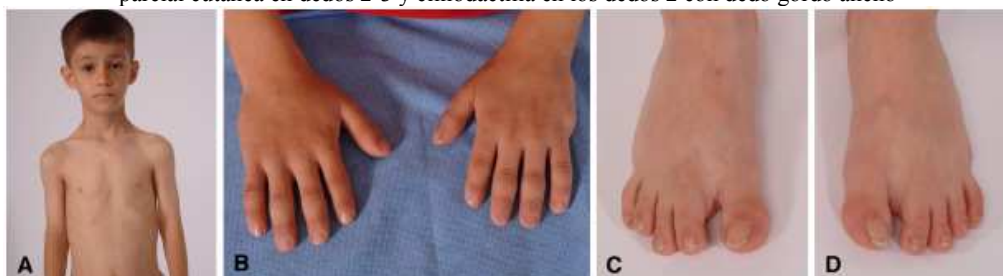
Se realizó un diagnóstico molecular mediante marcadores de microsatélite, además se realizó una secuenciación de sus exones. Se encontró en el padre e hijo una mutación homocigota en el exón 13 del gen *EVC* c. 1868T>C, que predice p.L623P. Se concluyó que esta mutación es hipomórfica, y que puede causar defectos cardiacos y de las extremidades que son menos severas que un síndrome de EvC típico, por lo que se debe considerar un análisis molecular de mutaciones en los genes *EVC* y *EVC2* cuando se presenten en pacientes con malformaciones cardiacas y de las extremidades, incluso si no es un cuadro clínico típico del EvC.

**Figura 12.** Paciente 1 del caso F. **A:** No hay características dismórficas faciales ni torácicas. **B:** Polidactilia postaxial en manos. **C:** Polidactilia postaxial con sindactilia parcial cutánea en dedos 4-5 del pie derecho



(Ulucan *et al.* 2008).

**Figura 13.** Paciente 2 del caso F. **A:** Vista frontal mostrando ausencia de características dismórficas. **B:** Sus dedos extra bilaterales fueron eliminados previamente, además se pueden notar que los dedos son cortos. **C y D:** Sindactilia parcial cutánea en dedos 2-3 y clinodactilia en los dedos 2 con dedo gordo ancho



(Ulucan *et al.* 2008).

## Caso G

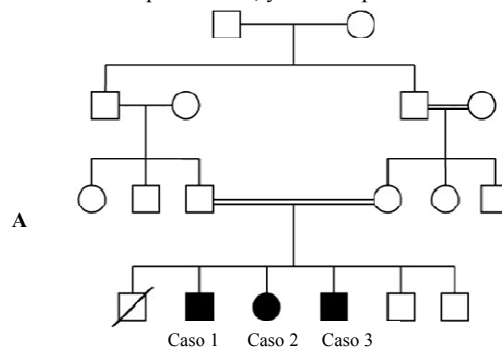
Se reportó en el 2008, por Temtamy y colegas, el caso de tres hermanos pertenecientes a una familia egipcia consanguínea, con el síndrome EvC y un coeficiente de inteligencia (IQ) bajo. Entre los síntomas clínicos más característicos desarrollados en los tres hermanos, se encuentran acortamiento acromélico y mesomélico, tórax angosto, polidactilia postaxial en manos y pies (véase Figura 14), camptodactilia en el quinto dedo, primer dedo amplio, sindactilia entre segundo y tercer dedo del pie, espacio ancho entre primero y segundo dedo del pie, clinodactilia del quinto dedo del pie, uñas hipoplásicas, cara larga, nariz prominente, filtrum corto, labios gruesos y con hendidura en el labio superior, frenillos linguales múltiples, anodoncia parcial, espacio entre dientes anormal, IQ bajo y una ecocardiografía normal.

Mediante su diagnóstico molecular, se obtuvo que los exones 1-11 del gen *EVC*, todos los exones del *EVC2*, y regiones adyacentes pertenecientes al gen *C4orf6*, y *STK32B* se encontraban ausentes en estas personas, por lo que se sugirió que tenían una delección homocigota de estos genes. El *C4orf6* y *STK32B* son genes recientemente estudiados que aún no se ha encontrado su función, pero su ausencia sugiere una leve deficiencia intelectual.

En conclusión se encontró que no existen características fenotípicas en la ausencia de uno de estos genes que sea rescatado por el otro, las características fenotípicas orofacial y óseas son igual si existe mutación en ambos genes que si solo se presentará en uno, y es muy probable que uno o más de los genes ausentes juegan un papel muy importante en el desarrollo del cerebro.

*Figura 14. Caso F: Síndrome EvC asociado a coeficiente intelectual (IQ) bajo en una familia egipcia. A:*

*Pedigree de la familia egipcia demostrando consanguinidad, y los tres hermanos afectados. B: Manos del caso 2 demostrando polidactilia postaxial, camptodactilia, clinodactilia del quinto dedo, y uñas displásicas. C: Pies del caso 2 demostrando polidactilia postaxial, braquidactilia, sindactilia parcial entre el segundo y tercer dedo, y entre el cuarto y quinto dedo, y uñas displásicas*



(modificado de Temtamy *et al.* 2008)

7. Mutaciones más frecuentes: Las mutaciones presentadas en ambos genes incluyen sustituciones de un solo par de base, microinserciones, microdeleciones, y pocas deleciones que abarcan más de un exón en un mismo gen (Tompson *et al.* 2007). La mayoría de ellas introducen codones de terminación ya sea directamente o mediante un corrimiento del marco de lectura, lo cual generará pérdida de función de las proteínas.

Diversos estudios, en diferentes poblaciones, se han realizado para identificar las distintas mutaciones generadas que causan el síndrome EvC, es así como se encontró inicialmente en el estudio hecho por M. Galdzicka y colegas en el año 2002, el involucramiento del gen *EVC2* en un niño de la familia judía Ashkenazi con el síndrome EvC. No se logró encontrar alguna mutación en las regiones codificadoras, ni en las regiones no transcritas del 5' y 3' (UTR) del gen *EVC*. Sin embargo, sí se logró encontrar dos mutaciones homocigotas, una mutación sin sentido (3337CT; Arg870Trp) en el exón 17 y un codón de alto "stop" (3754CT; Q1009X) en el exón 18. Los padres del niño tuvieron las mismas mutaciones, pero fueron heterocigotos. El resultado de la interrupción prematura de la mutación 3754CT es una proteína truncada, conteniendo únicamente 1,009 de los 1,229 aminoácidos.

A continuación se muestran las mutaciones encontradas en los distintos pacientes de diferentes estudios secuenciales de los genes *EVC* y *EVC2* reportadas en la literatura:

**Cuadro 1.** Mutaciones encontradas en el gen *EVC* para el síndrome Ellis-van Creveld

Enfermedad	Tipo de Mutación	Exón	Mutación	Efecto de proteína	Referencia
EvC	Heterocigoto compuesto	6, 8	c.734delT, c.1018C>T	Corrimiento del marco de lectura, R340X	Ruiz-Perez <i>et al.</i> 2000
	Heterocigoto compuesto	7, 17	c.919T>C, c.2456delG	S307P, Corrimiento del marco de lectura	
	Homocigoto	7	c.904_906delAAGG	p.K302del	
	Homocigoto	7	c.910_911insA	Corrimiento del marco de lectura	
	Homocigoto	12-21	Deleción	Corrimiento del marco de lectura	
	Homocigoto	Intrón 13	IVS13+5G>T	Alteración del corte y empalme	
	Homocigoto	18	c.2635C>T	Q879X	
	Heterocigoto	10	c.1328G>A	R443Q	
	Homocigoto	Intrón 1	IVS1+1G>A	Alteración del corte y empalme	Tompson <i>et al.</i> 2007
	Homocigoto	Intrón 3	IVS3+5_6GA>AC	Alteración del corte y empalme	
	Homocigoto	Intrón 5	IVS5-1G>C	Alteración del corte y empalme	
	Homocigoto	7	c.873_874insT	p.E292X	
	Heterocigoto compuesto	7, 12	c.873_874insT, 1694delC	p.E292X, S307P	
	Homocigoto	12	1694delC	S307P	
	Heterocigoto compuesto	12, 14	c.1694delC, c.2089insCA	S307P, Q896H	
	Heterocigoto compuesto	10-21, 15	delE10_21, c.2200C>T	Corrimiento del marco de lectura, Q734X	
	Homocigoto	13	c.1813C>T	Q605X	
	Homocigoto	15	c.2277insCCGG	p.R760PfsX7	
	Homocigoto	Intrón 15	IVS15+2T>G	Alteración del corte y empalme	
	Homocigoto	18	c.2635C>T	Q879X	
	Homocigoto	18	c.2688G>C	Q896H	
Homocigoto	13	c.1868T>C	p.L623P	Ulucan <i>et al.</i> 2008	
Homocigoto	1-11	Deleción	Inactivación	Temtamay <i>et al.</i> 2008	
Homocigoto	4	c.617G>A	p.S206N	Kalsoom <i>et al.</i> 2009	
Homocigoto	Intrón 14	Del_IVS13 (-9 a +14)	Alteración del corte y empalme	Sund <i>et al.</i> 2009	
Homocigoto	6	c.770T>A	p.L256X		

Continuación **Cuadro 1.** Mutaciones encontradas en el gen *EVC* para el síndrome Ellis-van Creveld

Enfermedad	Tipo de mutación	Exón	Mutación	Efecto de proteína	Referencia
EvC	Homocigoto	1*	c.2T>A	p.M1?	Valencia <i>et al.</i> 2009
	Homocigoto	Intron 1	c.175 -2A>G		
	Heterocigoto Compuesto	2*, 9*	c.203delA, c.1114_1122del	p.N681fsX48, p.T372_G374del	
	Heterocigoto Compuesto	3*, 12	c.363C>A, c.1678G>T	p.Y121X, p.E560X	
	Homocigoto	6	c.708dupT	p.1237YfsX5	
	Heterocigoto Compuesto	7, 8	c.873dupT, c.1060G>T	p.E292X, p.E354X	
	Heterocigoto Compuesto	Intrón 7, intrón 8	c.940 -150T>G, c.1098+1G>A		
	Homocigoto	9*	c.1217delT	p.L406RfsX94	
	Homocigoto	9*	c.1255G>T	p.E419X	
	Homocigoto	9*	c.1269_1278del	p.Q424RfsX73	
	Homocigoto	Intrón 11	c.1563+1G>C		
	Homocigoto	13	1858_1878del	p.L620_L626del	
	Homocigoto	16*	[c.2344_2345del; c.2357_2370del]	p.T782QfsX26	

(Ruiz-Perez *et al.* 2000; Tompson *et al.* 2007; Uluçan *et al.* 2008; Temtamy *et al.* 2008, Kalsoom *et al.* 2009; Sund *et al.* 2009; Valencia *et al.* 2009)

\* Estos exones no se incluyeron en el estudio debido a que su publicación se realizó luego de empezar la parte experimental del proyecto

**Cuadro 2.** Mutaciones encontradas en el gen *EVC2* para el síndrome EvC y la disostosis acrofacial de Weyers

Enfermedad	Tipo de mutación	Exón	Mutación	Efecto de proteína	Referencia
Weyers	Heterocigota	7	c.919T>C	S307P	Ruiz-Perez <i>et al.</i> 2003
EvC	Homocigota	1	c.198insGGCGG	Corrimiento del marco de lectura	
	Homocigota	7	c.848T>G	1283R	
	Homocigota	10	c.1195C>T	R399X	
	Homocigota	12	c.1855C>T	Q619X	
	Homocigota	14	c.2056insC	Corrimiento del marco de lectura	
EvC	Heterocigoto compuesto	17, 18	c.3337C>T, c.3754C>T	R870W, Q1009X	Galdzicka <i>et al.</i> 2002
Weyers	Heterocigota	22	c.3793delC	Corrimiento del marco de lectura	Ye <i>et al.</i> 2006
EvC	Homocigota	2	c.273insT	Corrimiento del marco de lectura	Tompson <i>et al.</i> 2007
	Homocigota	Intrón 4	IVS4+2T>C	Alteración del corte y empalme	
	Heterocigota	6	c.745C>T	Q249X	
	Homocigota	8	c.893delA	Corrimiento del marco de lectura	
	Homocigota	8	c.981delG	Corrimiento del marco de lectura	
Homocigota	9	c.1028_1034delTGGAACC	Corrimiento del marco de lectura		

Continuación **Cuadro 2.** Mutaciones encontradas en el gen *EVC2* para el síndrome EvC y la disostosis acrofacial de Weyers

Enfermedad	Tipo de mutación	Exón	Mutación	Efecto de proteína	Referencia		
EvC	Heterocigoto compuesto	10, 16	c.1386_1387delAA, c.2743delA	Corrimiento del marco de lectura	Tompson <i>et al.</i> 2007		
	Homocigota	10	c.1468insGA	Corrimiento del marco de lectura			
	Heterocigoto compuesto	11	c.1541_1542delTC, c.1655_1658delGGGA	Corrimiento del marco de lectura			
	Homocigota	11	c.1708C>T	Q570X			
	Heterocigoto compuesto	11, 14	c.1708C>T, c.2263C>T	Q570X, Q755X			
	Homocigota	12	c.1855C>T	Q619X			
	Heterocigota	13	c.2006A	Corrimiento del marco de lectura			
	Heterocigoto compuesto	13, 18	c.2006delA, c.3134C > T	Corrimiento del marco de lectura, A1045V			
	Heterocigota	13	c.2019insT	Corrimiento del marco de lectura			
	Homocigota	14	c.2056insC	Corrimiento del marco de lectura			
EvC	Heterocigoto compuesto	17, Intrón 21	c.2854insA, IVS21+2T>C	Corrimiento del marco de lectura, alteración del corte y empalme	Valencia <i>et al.</i> 2009		
	Homocigota	22	c.3660delC	Corrimiento del marco de lectura			
	EvC	Homocigota	Todos	Deleción completa del gen		No hay proteína	Temtam <i>et al.</i> 2008
	EvC	Homocigoto	9	c.1024A>T		p.K342X	Sund <i>et al.</i> 2009
		Heterocigoto compuesto	15*, intrón 21	c.2698G>T, IVS21+2T>C		p.Q900X, Alteración del corte y empalme	
		Heterocigoto compuesto	5*, 15*	c.619G>T, c.2620C>T		p.D207Y, p.R874X	
	EvC	Homocigoto	3-6	Ex3 6del			Valencia <i>et al.</i> 2009
		Homocigoto	12	c.1828C>T		p.Q610X	
		Homocigoto	13-16	Ex13 16del			
		Heterocigoto compuesto	13, 22	c.1918delA, c.3660delC		p.M640CfsX21, p.S1220RfsX3	
Homocigoto		13	c.2029C>T	p.R677X			
Homocigoto		14	c.2365G>T	p.E789X			
Homocigoto		14	c.2476C>T	p.R826X			
Heterocigoto compuesto		15, 22	c.2652G>A, c.3660delC	p.W884X, p.S1220RfsX3			
Homocigoto		16	c.2710C>T	p.Q904X			
Heterocigoto compuesto		17, 22	c.2885delG, c.3660delC	p.G962AfsX17, p.S1220RfsX3			
Weyers	Heterocigoto compuesto	19*, 20*	c.3283G>T, c.3405_3411del	p.E1095X, p.G1136RfsX6			
	Homocigoto	Intrón 19	c.3360+1G>A				
	Homocigoto	22	c.3731dupT	p.S1245VfsX20			
Weyers	Heterocigoto	22	c.3797T>A	p.L1266X			

(Ruiz-Perez *et al.* 2000; Galdzicka *et al.* 2002; Ye *et al.* 2006; Tompson *et al.* 2007; Temtam *et al.* 2008, Kalsoom *et al.* 2009; Sund *et al.* 2009; Valencia *et al.* 2009)

\* Estos exones no se incluyeron en el estudio debido a que su publicación se realizó luego de empezar la parte experimental del proyecto

**Cuadro 3.** Frecuencia de las mutaciones encontradas en el gen *EVC* en personas con EvC evaluados con métodos de biología molecular reportados en la literatura

Exón	Mutación	No. veces reportado	Porcentaje % (n=52)	Porcentaje % Total
1	c.2T>A	1	1.9	1.9
2	c.203delA	1	1.9	1.9
3	c.363C>A	1	1.9	1.9
4	c.617G>A	4	7.7	7.7
6	c.734delT	1	1.9	5.7
	c.708dupT	1	1.9	
	c.770T>A	1	1.9	
7	c.919T>C	3	5.7	22.8
	c.904_906delAAGG	3	5.7	
	c.910_911insA	2	3.8	
	c.873_874insT	3	5.7	
	c.873dupT	1	1.9	
8	c.1018C>T	4	7.7	9.6
	c.1060G>T	1	1.9	
9	c.1217delT	1	1.9	7.7
	c.1255G>T	1	1.9	
	c.1269_1278del	1	1.9	
	c.1114_1122del	1	1.9	
10	c.1328G>A	1	1.9	1.9
12	1694delC	3	5.7	7.7
	c.1678G>T	1	1.9	
13	c.1868T>C	4	7.7	13.4
	c.1813C>T	1	1.9	
	1858_1878del	2	3.8	
14	c.2089insCA	1	1.9	1.9
15	c.2277insCCGG	1	1.9	1.9
16	[c.2344_2345del; c.2357_2370del]	1	1.9	1.9
17	c.2456delG	1	1.9	1.9
18	c.2635C>T	3	5.7	7.7
	c.2688G>C	1	1.9	

(Ruiz-Perez *et al.* 2000; Tompson *et al.* 2007; Ulucan *et al.* 2008; Kalsoom *et al.* 2009; Sund *et al.* 2009; Valencia *et al.* 2009)

**Cuadro 4.** Frecuencia de las mutaciones encontradas en el gen *EVC2* en personas con EvC evaluados con métodos de biología molecular reportados en la literatura

Exón	Mutación	Veces reportado	Porcentaje % (n=63)	Porcentaje % Total
1	c.198insGGCGG	2	3.2	3.2
2	c.273insT	1	1.6	1.6
5	c.619G>T	1	1.6	1.6
6	c.745C>T	2	3.2	3.2
7	c.848T>G	3	4.8	4.8
8	c.893delA	1	1.6	3.2
	c.981delG	1	1.6	
9	c.1028_1034delTGGAACC	1	1.6	3.2
	c.1024A>T	1	1.6	
	c.1195C>T	2	3.2	
10	c.1386_1387delAA	1	1.6	6.4
	c.1468insGA	1	1.6	
11	c.1541_1542delTC	1	1.6	4.8
	c.1708C>T	2	3.2	
12	c.1855C>T	2	3.2	4.8
	c.1828C>T	1	1.6	
13	c.2006delA	2	3.2	8
	c.2019insT	1	1.6	
	c.1918delA	1	1.6	
	c.2029C>T	1	1.6	
14	c.2056insC	2	3.2	9.6
	c.2263C>T	1	1.6	
	c.2447_2452dupAGGCC	1	1.6	
	c.2365G>T	1	1.6	
	c.2476C>T	1	1.6	
15	c.2620C>T	1	1.6	4.8
	c.2652G>A	1	1.6	
	c.2698G>T	1	1.6	
16	c.2743delA	1	1.6	3.2
	c.2710C>T	1	1.6	
17	c.3337C>T	1	1.6	4.8
	c.2854insA	1	1.6	
	c.2885delG	1	1.6	
18	c.3754C>T	1	1.6	3.2
	c.3134C>T	1	1.6	
19	c.3283G>T	1	1.6	1.6
20	c.3405_3411del	1	1.6	1.6
22	c.3660delC	9	14.3	27.1
	c.3793delC	5	8	
	c.3731dupT	1	1.6	
	c.3797T>A	2	3.2	

(Ruiz-Perez *et al.* 2003; Galdzicka *et al.* 2002; Ye *et al.* 2006; Tompson *et al.* 2007; Sund *et al.* 2009; Valencia *et al.* 2009)

- \* Se tomaron en cuenta únicamente los casos de pacientes con desarrollo de EvC o disostosis acrodental de Weyer, no se tomaron en cuenta los casos de pacientes portadores.
- \* No se tomaron en cuenta mutaciones intrónicas ni deleciones a nivel exonal.
- \* En el caso de una mutación heterocigota compuesta de dos exones, se tomo en cuenta como dos apariciones, por lo que la suma de las frecuencias no suma el 100%.

8. Asociación de EvC a otras enfermedades: generalmente las proteínas producidas que son codificadas por un alelo normal de los genes *EVC* y *EVC2* son suficientes para el desarrollo correcto de las extremidades, el esqueleto y los dientes. Pero se ha encontrado en algunos casos que su forma heterocigota causa síntomas incluso en la presencia de un alelo normal (Ye *et al.* 2006).

A esta forma de la enfermedad se le conoce como la disostosis acrodental de Weyer, también llamada síndrome de Curry-Hall (MIM 193530), mientras que la forma homocigota desarrolla la condrodisplasia EvC (Rihani. 2007). Evidencias de la delección heterocigota en el exón final (exón 22) del gen *EVC2*, el cual crea un codón de terminación prematuro, da lugar al fenotipo de Weyer. Estos ARNm mutantes que contienen la terminación prematura del codón en el último exón, dan lugar a un péptido truncado que causa el fenotipo por interferencia con la función normal de la proteína por efecto dominante negativo. Por lo que se consideran al EvC y la disostosis acrodental de Weyer condiciones alélicas (Tompson *et al.* 2007).

La disostosis acrodental de Weyer es un desorden dominante autosómico, clínicamente caracterizado por hipotelorismo, sínfisis mandibular (en infantes), polidactilia postaxial tipo A o tipo B, oncodistrofia, y estatura corta menos acentuada que en el EvC. La manifestación oral consiste en dientes pequeños irregulares, un incisivo central único o hipodoncia (Ye *et al.* 2006).

Ambos síndromes son similares, pero la disostosis acrodental de Weyer no genera malformaciones cardíacas, su mayor diferencia consiste en el modo de transmisión y el grado de severidad fenotípica, siendo más severo el EvC (Ye *et al.* 2006).

A continuación un caso de disostosis acrodental de Weyer:

#### Caso H

Se estudió el caso de una familia no consanguínea proveniente de China, pertenecientes a la nacionalidad Han, en el año 2006 por Ye y colegas. Se encontró que un niño de 8 años de edad con dos de sus parientes fueron los individuos más afectados. El niño presentó una altura de 110 cm, tenía nacimiento de dientes retardado e hipodoncia, cicatrices en sus cuatro extremidades debido a la eliminación de dedos extra por cirugía, sindactilia parcial de su segundo con tercer dedo del pie, uñas displásicas, frenillos linguales múltiples, incisivos pequeños y cónicos, y la ausencia de incisivos bilaterales con espacios amplios (véase Figura 15). Su madre con una altura de 155cm, tenía polidactilia postaxial tipo B en sus manos, polidactilia postaxial tipo A en sus pies, sindactilia en dedos de pies, distrofia en las uñas, un solo incisivo central y agenesia en algunos molares. La abuela del niño con 62 años de edad tenía una estatura

de 160 cm, polidactilia postaxial en los pies, sindactilia en los dedos de los pies, tamaño y forma irregulares de los dientes, y uñas displásicas.

Se encontró que estos pacientes no presentaban defectos del canal atrioventricular ni anomalías torácicas, mediante las siguientes pruebas: electrocardiograma (ECG), rayos-X del tórax y ecocardiograma transtorácico. Tampoco se presentaron retrasos mentales.

Se realizó un diagnóstico molecular de ambos genes *EVC* y *EVC2*, mediante la amplificación de los genes con una PCR convencional, su posterior clonación y secuenciación directa para determinación de las mutaciones en juego. Además se realizó un análisis de restricción enzimática para confirmar que la delección encontrada era la mutación implicada en el desarrollo del síndrome y no un polimorfismo raro. Con ello se encontró una delección *de novo* heterocitoga L1265fsX1266 en el exón 22 del gen *EVC2*: c.3793delC. Esta mutación resulta en un codon de alto prematuro. Mediante un análisis de restricción enzimática, se confirmó que el cambio en la secuencia no se encontraba presente en al menos 300 cromosomas normales. Con estas pruebas se logró determinar definitivamente la presencia de una disostosis acrodental de Weyers que afectaba la familia en vez del síndrome de EvC, tanto por el cuadro clínico menos severo como por la heterocigocidad de la enfermedad.

*Figura 15.* Paciente de 8 años de edad con disostosis acrodental de Weyer. **A:** Frenillos linguales múltiples, diastemas, dientes anormales, erupciones de dientes retardados. **B:** Uñas displásicas en manos. **C:** Sindactilia parcial entre el segundo y tercer dedo en los pies



(modificado de Ye *et al.*, 2006).

9. Tratamiento: debido a las características únicas del EvC, los pocos estudios que se tienen a nivel genético, los tratamientos que se realizan por lo general son correcciones quirúrgicas de las deformaciones desarrolladas, como amputación de los dedos extra, correcciones de genu valgo, reparaciones quirúrgicas de malformaciones cardíacas, e intervención oral, entre otros (Shilpy *et al.* 2007).

Para la corrección de la deformidad genu valgo, se puede emplear la aplicación de fijadores Ilizarov externos, el cual permite la corrección de la deformidad femoral y corrección gradual de la deformidad de la tibia con menos invasión y una incidencia menor de complicaciones. El realineamiento del axis mecánico es extremadamente importante para prevenir refracturas y recurrencias de la deformidad (Morsy *et al.* 2007).

Una característica del síndrome de EvC, es la irregularidad del crecimiento, pero no es una enfermedad conocida por causar deficiencia en la hormona del crecimiento, con excepción de un caso de un paciente EvC con dicho síntoma, y fue tratado con la hormona del crecimiento, que dio los resultados esperados. Este estudio elaborado por Versteegh y colegas en el 2007, trataron a los pacientes con síndrome EvC con dosis de la hormona del crecimiento. De los pacientes tratados, la mitad no tenían deficiencia en la hormona del crecimiento, pero todos por igual obtuvieron resultados positivos, aunque no se puede generalizar debido a las diferentes edades de los pacientes, donde no se puede descartar la influencia de la etapa de la pubertad de algunos pacientes, y además que el estudio abarcó pocos pacientes con EvC. Al presente, el tratamiento con la hormona de crecimiento a pacientes con EvC no es una indicación aprobada, pero se sugiere que a todos los pacientes con EvC se les haga un diagnóstico de determinación de deficiencia de la hormona del crecimiento.

En casos de CAVC, el tratamiento predilecto es el quirúrgico ante la administración medicinal. Este último es considerado únicamente como un puente hacia la realización de cirugía, y generalmente consiste en la administración de digitálicos, diuréticos y vasodilatadores. La corrección quirúrgica se realiza preferentemente antes de los 6 – 12 meses de vida, generalmente entre los 3 – 6 meses de nacido. Con frecuencia se realizan reparaciones intracardiacas completas, que consisten en cerrar las comunicaciones intracardiacas con un parche atrial y ventricular simple o separado. Los riesgos presentados incluyen la edad del paciente, la severidad de la incompetencia de la válvula común pre-operativa, la presencia de malformaciones cardiacas asociadas, y el nivel de clase funcional. Se ha reportado una mortalidad menor del 5-10% en la reparación de CAVC, y no hay necesidad de una reoperación en un 80-95% de los casos (Calabrò *et al.* 2006).

Existen nuevas tendencias para el tratamiento de enfermedades genéticas como el EvC, que engloba aspectos clínicos con moleculares, identificando la mutación causante del desarrollo de EvC en el paciente, por ejemplo se puede recurrir a la reparación o alteración del gen blanco (TGA por sus siglas en inglés: Targeted Gene Alteration), el cual utiliza una estrategia de base molecular que tiene por objetivo corregir mutaciones de una sola base responsable del desarrollo de la enfermedad genética. Utiliza un oligonucleótido de ADN de simple hebra que se hibridiza con la región donde se encuentra la mutación y mediante mecanismos de reparación de ADN del organismo, se corrige la mutación (Parekh-Olmed *et al.* 2007).

En un futuro se espera el diseño y fabricación de biomateriales para las displasias ectodermales, a partir de los estudios de genotipificación, mapeo genético, SNPs, tratamientos ARNi, bioimaginación, ingeniería de tejidos y otros acercamientos biomiméticos (Slavkin 2009).

## B. Justificación

Por primera vez en Guatemala, se reporta un caso de Ellis-van Creveld (EvC), la cual es una enfermedad poco frecuente, y en la mayoría de casos, su desarrollo indica consanguinidad entre los padres. La importancia de esta enfermedad se debe a su mortalidad, de un 50% de pacientes infantiles que desarrollan malformaciones congénitas del corazón, quienes a su vez conforman un 50 a 60% de los casos de EvC (Rihani. 2007; Shilpy *et al.* 2007).

Por lo general, en el campo de las enfermedades con predisposición genética en Guatemala, se realizan diagnósticos clínicos como única manera de determinar una enfermedad, los cuales a su vez pueden resultar más costosos, laboriosos, abarcan un rango mayor de tiempo, y en muchos de los casos no son 100% certeros, esto dependerá mucho de la experiencia del médico profesional encargado.

En cambio a nivel genético, en la mayoría de casos se logra determinar la enfermedad, mediante la detección de la presencia o ausencia de mutaciones en genes específicos, que dan lugar al desarrollo de dicha enfermedad.

En este estudio se evaluó la técnica de PCR-SSCP comparándola con la técnica PCR-secuenciación para la enfermedad de EvC. Se propuso esta técnica como un tamizaje inicial por su sencillez y costos más baratos a comparación de la secuenciación, además que con ello se obtiene un diagnóstico más certero, evitando su confusión con otros síndromes que presentan características clínicas similares, *e.g.* la disostosis acrodental de Weyer.

Mediante el registro de estudios de casos como el presente, se pretende dar una mejor orientación al personal de salud al momento en que se presenten casos similares. Con ello se realizará un diagnóstico más confiable, con el cual se logrará dar un mejor consejo genético a los padres y familiares de dichos pacientes, y promover en la población en general la prevención de matrimonios consanguíneos, dando a conocer algunas de sus consecuencias.

Este es el primer caso en Centroamérica de un estudio de caracterización genético molecular de EvC, y se pretende con ello realzar la importancia de un diagnóstico a nivel molecular, siendo a la vez el motor de empuje a otras investigaciones de esta índole. A partir de ello, se obtendría un historial más enriquecedor y una mayor certeza de la enfermedad investigada, para con ello dar el tratamiento más adecuado a los pacientes.

## C. Objetivos

### 1. General

Evaluar la aplicación de la técnica SSCP como tamizaje inicial para la detección de polimorfismos en exones seleccionados de los genes *EVC* y *EVC2*, en comparación con la secuenciación directa.

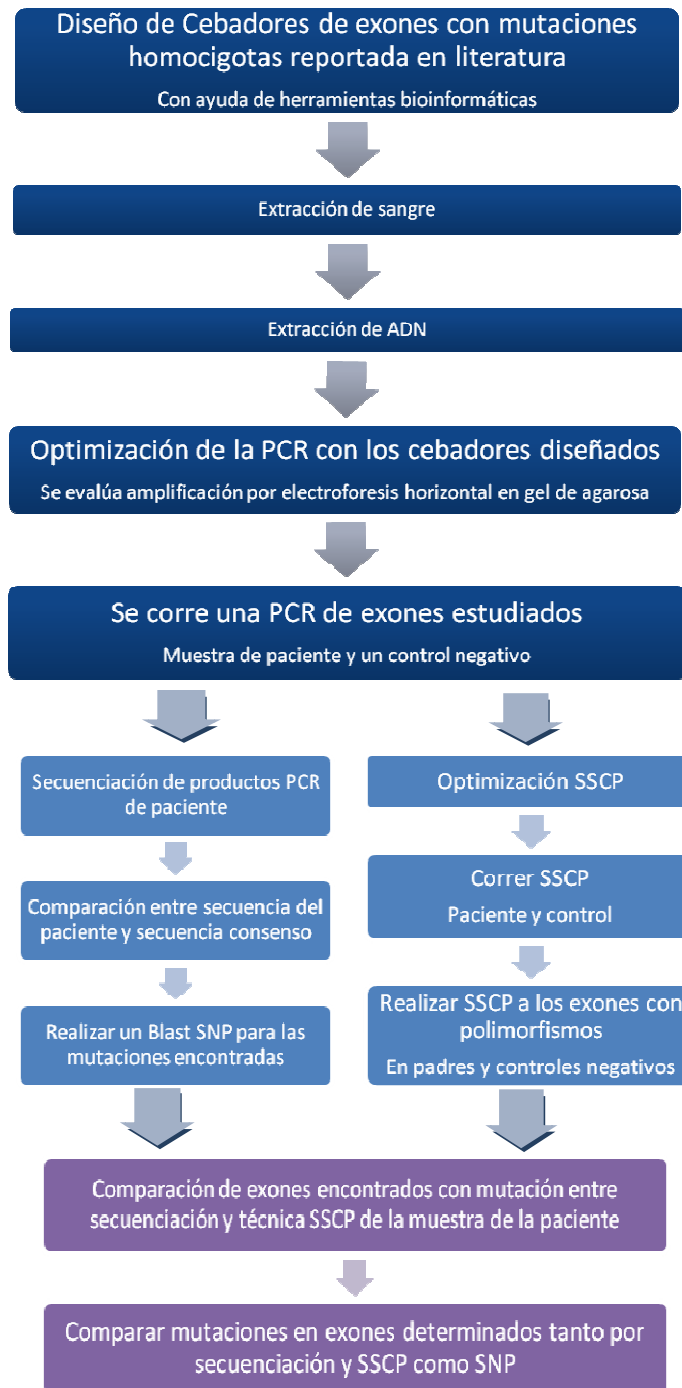
### 2. Específicos

- Optimización de la técnica de PCR de los exones reportados previamente con mutaciones en los genes *EVC* y *EVC2*.
- Preparación de productos de PCR para secuenciación.
- Análisis de los electroferogramas y comparación de las mutaciones encontradas con las reportadas en la literatura.
- Optimización de la técnica SSCP como herramienta de diagnóstico de EvC en el laboratorio de INVEGEM.
- Realización de un protocolo de metodología desde la toma de muestra hasta el análisis genético a seguir en caso de presentarse de nuevo otro caso similar.

# METODOLOGÍA

## A. Procedimientos

Figura 16. Diagrama de flujo de la metodología a realizar empezando desde el diseño de los cebadores hasta la comparación de resultados.



1. Diseño de cebadores. Se trabajaron 27 exones (véase Cuadros 3 y 4) en conjunto para ambos genes, los cuales estaban reportados previamente en la literatura. Tanto el cebador sentido como antisentido se diseñaron conforme a su secuencia de ADN localizada en la región intrónica cerca del inicio y final del exón. Este diseño se realizó tomando en cuenta las siguientes consideraciones (Grande 2004):

- Longitud del cebador: 18-24 pares de bases
- Temperatura de fusión (T<sub>m</sub>): una T<sub>m</sub> similar en ambos cebadores sentido y antisentido. Por lo general es mejor que tenga un rango de 55-72°C. La T<sub>m</sub> se calculó utilizando la siguiente fórmula:  
$$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$$
- Especificidad: secuencia única y poca repetitividad de secuencia en el cebador.
- Secuencia complementaria del cebador: homología dentro del cebador no debe ser mayor de 3 pares de bases. Homología entre cebadores también debe tomarse en cuenta, pues puede interferir en hibridación, o puede prevenir formación de producto deseado por competencia.
- Contenido G/C: un cebador debe tener un contenido G/C entre 45-55%.
- Secuencia 3' terminal: inclusión de un residuo G, C, GC o CG en la secuencia 3' terminal del cebador.
- Secuencia de producto no mayor de 600 pb.

En el caso de secuencias mayores de 600pb, se dividieron en dos regiones, por lo que se analizaron 29 regiones por la PCR.

Para cada par de cebadores, se procedió a correr una prueba de PCR *in silico* en el USCS Genome Browser (Kent 2003) y programa de Primer Blast de National Institute of Health (NIH) (Rozen *et al.* 2000) con las secuencias genómicas de ambos genes estudiados.

2. Diseño de consentimientos informados. Se diseñaron los consentimientos informados tanto para el paciente y padre, como para los controles negativos (véase Apéndice 2) adaptado del modelo de consentimiento informado utilizado en la Universidad de Minnesota, aprobado por el comité de ética de la misma universidad, IRB por sus siglas en inglés Institutional Review Board (University of Minnesota, 2005). Estos consentimientos informados fueron aprobados por el comité de ética del Hospital UNICAR.

3. Recolección de las muestras. La población en estudio consistió en un paciente (caso E), descrito en el marco teórico, ambos padres y 10 controles negativos (personas aleatorias de la población guatemalteca). Antes de la toma de muestra de sangre, se les explicó acerca de la naturaleza de la enfermedad y del estudio, donde además se les pidió autorización para participar en el estudio mediante el consentimiento informado.

La toma de muestra se realizó por una persona cualificada, se tomaron ~4mL de sangre periférica total, por venopunción (Silva *et al.* 2004), recolectadas con el sistema de mariposa Vacutainer® con aguja No. 23 <sup>3</sup>/<sub>4</sub>, en tubos de ensayo al vacío con EDTA.

4. Extracción de ADN. Se llevó a cabo con la ayuda del kit comercial *Wizard® genomic DNA purification kit* (Promega) de acuerdo a las especificaciones del manual (*véase* Apéndice 3).

5. Reacción en cadena de la polimerasa. Para la optimización de la PCR de los exones, se procedió iniciando con un protocolo inicial igual para todos, exceptuando su temperatura de anillamiento. Se creó un esquema general (Figura 17) a seguir para la optimización de la PCR dependiendo de cada resultado.

Las condiciones en la reacción que no se variaron fueron la concentración del buffer 1X, de dNTP's 0.2mM y de cebadores 0.2μM, para la PCR se siguió el programa siguiente:

**Cuadro 5.** Programa de PCR

	Paso	Temperatura	Tiempo
	1era. Desnaturalización	94°C	6 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 s
	Anillamiento	*	30 s
	Extensión	72°C	3 min
	Extensión Final	72°C	5 min

\* Temperatura de anillamiento varió según la Ta del grupo

A partir de ello se estandarizó un protocolo para el análisis de 27 exones de los genes implicados en la EvC (*véase* Apéndice 4).



6. Visualización de bandas. Se evaluó la amplificación mediante la visualización de los productos por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% a 90V/cm. Las bandas generadas se compararon con un control negativo y su tamaño se determinó mediante la comparación con una escalera molecular de 100pb Novagen.

7. Secuenciación. Luego de comprobar la amplificación de las bandas por medio de la electroforesis en gel de agarosa de cada exón evaluado de la paciente, se procedió a mandar dichos productos, asegurándose que estuvieran bien sellados. Se envió cada muestra y su cebador por separado para su análisis con un secuenciador automatizado ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) a la compañía Eton Bioscience en San Diego, CA, EEUU. Con ello se obtuvieron las respectivas secuencias y electroferogramas de ADN analizado para cada exón.

La secuencia de los exones analizados pertenecientes a las regiones de ADN se compararon con la secuencia de referencia GRCh37 (actualizada hasta febrero del 2009) en las regiones del gen *EVC* (acceso NM\_153717.2) y *EVC2* (acceso NM\_147127 para isoforma 1 y NM\_001166136 para isoforma 2) en la base de datos de “The National Center for Biotechnology Information”, abreviado como NCBI (2006). Se realizaron alineamientos de secuencia mediante el software CLC Sequence Viewer 6 y se analizó la homocigocidad y heterocigocidad de las secuencias mediante el software Sequencher 4.9.

En las regiones donde se encontró mutación, se buscaron en la base de datos de HapMap (The International HapMap Consortium 2007), se realizó un blast para SNP con el programa BLAST2 (BIRD 2009) y programa de Blast SNP desarrollado por NCBI (1997), además de compararlas con el perfil de SNP’s encontrados en línea (véase Apéndice 8).

8. SSCP. Luego de la amplificación, en paralelo a la secuenciación, se utilizó la técnica SSCP para evaluar mutaciones puntuales en la paciente comparándolo con un solo control negativo. A partir de un protocolo establecido (Font 2008; Hernández 2009) se realizaron algunas modificaciones para adecuarlo al presente estudio y obtener mejores migraciones. Las condiciones tomadas en cuenta para la optimización fueron: porcentaje de glicerol, tamaños de pares de bases de los exones, tiempo de corrida, amperaje y temperatura.

Como tamizaje inicial, se corrieron entonces los 29 productos de PCR, paciente y un control negativo en dos condiciones como lo sugerido por otros autores (Michaud *et al.* 1992; Fujita *et al.* 1994), siguiendo el protocolo estandarizado para el presente trabajo (véase Apéndice 6). Se compararon los patrones de migración de manera cualitativa entre ambos sujetos, y donde hubo diferencia de migración entre las muestras, se procedió a correr un SSCP del paciente, ambos padres, y otros 9 controles negativos. Debido a que se trabajaron con regiones de variados tamaños (215-663pb), se elaboró una escalera a partir de la amplificación de regiones de ADN de 209, 331, 413, 531 y 605 pb, las cuales se mezclaron en un tubo y se agregó el doble de buffer de montaje desnaturalizante,

conformando de esta manera la propia escalera molecular entre ~200-600pb del estudio. Siempre se mantuvo en frío antes de cargarse en el gel, para evitar la desnaturalización de la doble hebra de ADN.

Para la comparación entre los patrones de banda entre paciente, ambos padres y los 10 controles, el análisis consistió en determinar el factor de migración relativa (Rf) con ayuda del programa “Phoretix 1D v10.2” de la compañía TotalLab Ltd. luego de digitalizar el gel. Con estos valores, se establecieron los distintos patrones de migración de banda encontrados. También se determinó el porcentaje de frecuencia del apareamiento de cada patrón y su intervalo de confianza (IC) al 90% con ayuda de la calculadora de proporciones “Confidence Interval” de la compañía Dimension Research, Inc.

Se evaluó la sensibilidad de la técnica mediante la comparación entre los patrones de la paciente y sus padres, en donde necesariamente el patrón de migración de bandas de la paciente tendría que ser igual a por lo menos uno de los padres, o en el caso de heterocigocidad, tener ambos patrones de migración de bandas de los padres integrado.

Se descartaron como SNP los exones que presentaron variados patrones de corrida entre los diferentes controles, mientras que se tomaron como mutaciones posibles causantes del desarrollo del síndrome los exones que presentaron un patrón de corrida similar entre los controles negativos y cualquiera de los padres, los cuales a su vez fueron diferentes al patrón de corrida de la paciente. Para obtener una mayor validez en este último criterio, sería necesario correr por lo menos 100 muestras de control negativo (Ruiz-Perez *et al.* 2000; Tompson *et al.* 2007). Por ello los SSCP conforman únicamente el tamizaje inicial en el protocolo que se propone, puesto que los exones donde se presenten posibles mutaciones se mandarían a secuenciar, reduciendo los costos de un estudio en el futuro.

## II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Diseño de cebadores

Los cebadores diseñados cumplen en su mayoría con las consideraciones de Grande (2004):

**Cuadro 6.** Cebadores diseñados para los exones analizados del gen *EVC*

Exón	Sentido (5'-3')	% GC	Antisentido (5'-3')	% GC	Tm °C	Tamaño (pb)
4	AATCCCAGAGGCATCACATG	50.0	AAGCCTCATCCTCCATTGC	52.6	59	315
6	GCATTATGGGCCATTGTCATG	47.6	CCTTGAAACATAGGTTGAAGAC	40.9	62	322
7	TGGGTCAAACCTCATGTACAAC	45.5	CTGCCTCTAGGGCAGAATGC	60.0	64	430
8	ACCTCACTTCTTGCTGCTTG	50.0	CCTCAGGATTCCATATCTCTA	42.9	60	257
10	TGGCTCACAGAGTCACCTCC	60.0	CAGAGCTACAACCTGGCTCAC	55.0	63	247
12	TTGTGGAGGAGAGGCAGAG	57.9	AACAGTCATCTCCGTAGAGC	50.0	60	423
13	AGCAAGCAGGATTGTTGAAGTG	45.5	GGAGCATCATGCAGGACACAA	52.4	64	224
14	TGTCACTGGCTTCGTGAAGC	55.0	CACCAAGGGTGATAGGATTCG	52.4	63	377
15	GCACGCAGTTGATGCTCAA	52.6	ATGAACGGTGTGGCAAGGAG	55.0	60	531
17	ACACTCTGGAGAGCTGGTG	55.0	GGTAGAGAACAGCCCTACGT	55.0	62	269
18	CTGCTGTGAATGGTGCC	58.8	ATGGCTGACGTGTGGTCAC	57.9	57	362

**Cuadro 7.** Cebadores diseñados para los exones analizados del gen *EVC2*

Exón	Sentido (5'-3')	% GC	Antisentido (5'-3')	% GC	Tm °C	Tamaño (pb)
1 <sub>1</sub> *	AGATGCGGGTGTGTTTGTTC	52.6	TCAAACCACTACAGTCAGACC	47.6	60	413
1 <sub>2a</sub> +	AACAACCTCCAACGGTCCAGC	55.0	AAGCTCTCCCTGAACCTCTCC	55.0	62	439
1 <sub>2b</sub> +	TAGGCAGGGATGAGGAAGC	57.9	CGAATCAGAGCGGGTCACT	57.9	60	578
2	ATGTCCTCTCCATGTGAGTC	50.0	AGGGCTTCAGGCTTCTGG	61.1	59	215
6	TGAGAAAGGGCTAGGAGAGC	55.0	AAGGAACTAACAGGTCTTCTG	42.9	61	511
7	AAGCTCTGACCTGTGCAGC	58.0	CGAGAGACTGCACAGAGTCC	60.0	62	332
8	GACAGGCTTGTCATGCACTG	55.0	TTCAACCTCACATTCACCAC	45.0	60	394
9	TGATTGGGTGCTCAGACTG	52.6	TTGGCCTTATGTCACTGTCTG	50.0	59	319
10	TGGATGAAGCAGAAGTGAGC	50.0	AATGGACAGATGAGTGGGTAG	47.6	61	562
11	ATGTAGGTGCATGTTTCAGTG	45.0	AGGCAGGACTGAACTCTGAG	55.0	63	383
12	TAGGGCAGTGAAGTTGTTCTG	47.6	CCCTCACTCGATCTTGAACCT	47.6	62	584
13	TCTGCCCTTACTCTGCTAG	52.6	GGCAATGTCTGGCACAGTA	52.6	58	428
14	ACATTCTGTGCTTCCTGCAAC	47.6	AATCTCCCTGGCATCAACG	52.6	60	605
16	AGAAACTTCTCTTGACCTG	45.0	TTAGCACCTGAGTGAGTGAG	50.0	59	357
17	TCCCAGTGCGTCTCCATTG	57.9	TTGCAGCCTGTTTCATAGAGG	47.6	61	454
18	AGACTTGTAGCAAGACACC	47.4	TTCTCCAGGACTGCTGG	58.8	55	365
22a	TCTTGGAGAACTCAGAACAC	45.0	TGTCACCACACAGACCATAG	50.0	59	663
22b	TCCAAAGGAGCCAGAGATC	52.6	TTGGCAACTGGAGCGATAG	52.6	58	630

\* Variante de transcripción 1

+Variante de transcripción 2

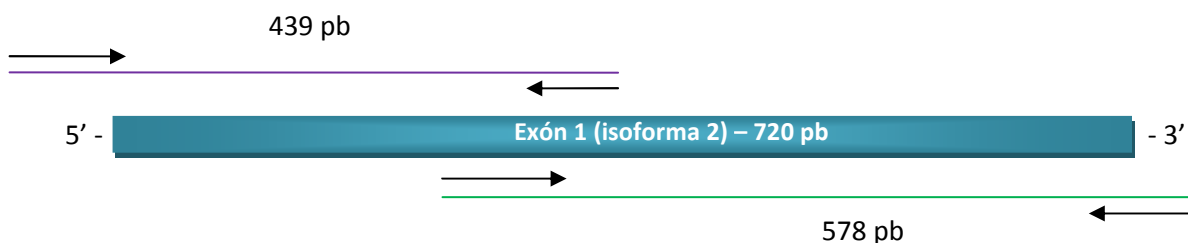
Como primer punto se buscaron secuencias variadas y con poca repetitividad en la región intrónica cerca del exón, en donde no se repitieran pequeñas secuencias en una misma región, con el fin de obtener especificidad y evitando de esta manera homología entre el mismo cebado. Así mismo se tomó en cuenta la secuencia del cebador complementario a modo que no tuvieran unión fuerte entre sí, puesto que esto causaría que no existiera suficiente cebador libre en el medio para unirse al templado de ADN, y de esta manera disminuiría la eficiencia de amplificación. Esto se realizó con ayuda del programa en línea IDT SciTools Oligo Analyzer 3.1 de la compañía Integrated DNA Technologies (IDT 2002).

La especificidad se comprobó corriendo un PCR *in silico* con ayuda del programa USCS Genome Browser (Kent 2003) y el programa de Primer Blast de National Institute of Health (NIH) (Rozen *et al.* 2000), asegurándose que el par de cebadores fueran específicos para la región que se deseaba amplificar en el genoma humano.

Se tomó en cuenta en cada caso que la longitud de los exones no excediera 24pb. Los cebadores más cortos son de 17pb y los más largos son de 22pb. Esto es muy importante, puesto que la longitud de los cebadores influye en la tasa de anillamiento al templado de ADN (Brown 2001), así en el caso de un cebador de 17 pb, existe una posibilidad de ocurrencia cada  $4^{17} = 17179869184$ pb a lo largo del genoma humano de ~3000000kb, lo cual en teoría aumenta la probabilidad de amplificar un sitio específico. En el caso de cebadores muy largos, esto puede disminuir la eficiencia de anillamiento al no obtener tiempo suficiente para completar el anillamiento durante el ciclo de reacción (Brown 2001). Por ello los cebadores diseñados en este trabajo tienen una longitud lo suficientemente grande para disminuir la probabilidad de amplificación de sitios inespecíficos, y lo suficientemente corto para no causar deficiencias en el paso de anillamiento.

Además de la longitud del cebador, se tomó en cuenta que la longitud de la región para amplificar no fuera mayor a 600pb, esto para asegurarse una óptima amplificación. Por medio de la PCR convencional no es recomendable amplificar productos de hasta 3kb, e idealmente debe de tener una longitud menor de 1kb (Brown 2001), además que para la secuenciación tampoco es recomendable tener productos mayores de 700pb (Rodríguez *et al.* 2006), de lo contrario puede ocurrir un fallo en la lectura de la secuencia a analizar, por lo que se tomó 600pb como número de referencia. Para los exones 1 de la isoforma 2 y 22 del gen *EVC2* se procedió a dividir la región en dos, incluyendo el inicio de la secuencia de la segunda región al final de la primera región (Figura 18).

Figura 18. División de la región de amplificación del exón 1 de la isoforma 2 del gen *EVC2*: La primera región abarcó parte de la región intrónica 5' con 439pb de largo, la segunda región abarcó parte del final de la primera región y una porción de la región intrónica 3' adyacente al exón con 578pb de largo.



El anillamiento entre ADN-ADN es un fenómeno dependiente de la temperatura (Brown 2001), por lo que este juega un papel muy importante. Para ello se tomó en cuenta que la temperatura de fusión ( $T_m$ ) estuviera en un rango entre 55-72°C (Grande 2004), ya que a partir de esta es que se obtiene la temperatura de anillamiento (5°C menor que la  $T_m$ ). El par de cebadores diseñados con menor  $T_m$  pertenecen al exón 18 del gen *EVC* con 55°C, y el par de cebadores con mayor  $T_m$  pertenecen a los exones 7 y 13 del gen *EVC* con 64°C. Otra consideración fue que las  $T_m$  entre el par de cebadores variaron entre 2-3°C de diferencia. La importancia de este factor radica en que a temperaturas muy altas no ocurre anillamiento, y a temperaturas muy bajas ocurren anillamientos estables que no coinciden en toda la secuencia, ocurriendo entonces también amplificación de otras regiones (Brown 2001).

Se obtuvo un rango de contenido GC entre 40.9 – 61.1%. El valor ideal varía según cada autor, así para Henegariu y colegas (1997) el contenido ideal se encuentra entre un rango de 35-60%, mientras que para Grande (2004) este rango es menor entre 45-55% y para Markoulatos y colegas (2002) este rango se encuentra entre 45-60%. Esta condición es relevante para la determinación de la  $T_m$  de los cebadores.

Para obtener una unión más específica en el extremo 3', la mayoría de cebadores diseñados tienen en su secuencia una terminación de 1-2 C/G o ambas, puesto que las citosinas y guaninas tienen una unión de puente de hidrógeno más que las adeninas y timinas, fortaleciendo su enlace.

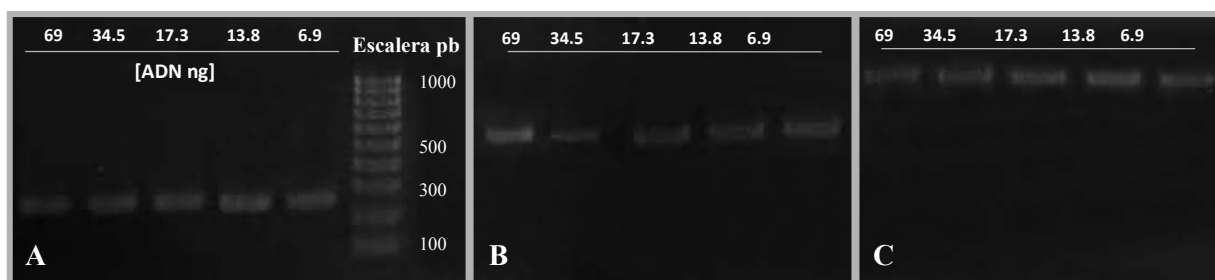
Existen también páginas en la red que pueden diseñar cebadores introduciendo únicamente la región y especificando las regiones aproximadas donde se necesita que se anillen los cebadores, pero para fines prácticos de este trabajo, cada cebador se buscó manualmente.

## B. Optimización de PCR

Se optimizaron 29 reacciones de PCR, para cada caso se encontraron diferentes condiciones óptimas para su amplificación. Se encontraron que varios factores influyen a la vez el rendimiento óptimo de una PCR, no existe una sola vía para el rendimiento óptimo de amplificación. Cabe mencionar que los dos parámetros más importantes que se encontraron fueron la concentración de  $MgCl_2$  y la temperatura de anillamiento.

1. Concentración de ADN. Para obtener la concentración ideal de ADN templado para realizar una PCR, se realizaron distintas diluciones de una muestra de ADN y se realizó la PCR amplificando distintas regiones con distintos tamaños de pares de base como se muestra en la Figura 19. Se determinó que en todos los casos no existe una diferencia al utilizar entre 69ng o 6.9 ng de ADN para amplificar regiones de hasta 988pb para 12.5 $\mu$ L de volumen final. Esto concuerda con los estudios de otros autores donde se encontró que no existe una diferencia en la amplificación de templados de ADN con concentraciones que varían hasta una magnitud de 40 veces (William *et al.* 1990), y se puede dar una amplificación relativamente constante utilizando tanto 1ng como 500ng de ADN (Wolff *et al.* 1993). Con base a estos resultados se puede decir que la PCR es una técnica altamente sensible y robusta, y que no es estrictamente necesaria la cuantificación de ADN para llevar a cabo una buena amplificación. Sin embargo, la cuantificación nos puede dar una idea acerca de la integridad de la muestra, así como de la eficiencia de la extracción.

Figura 19. Amplificación de regiones de ADN de distintos tamaños a diferentes concentraciones: Se amplificó una región de 257pb en muestra A, 542pb en muestra B y 988pb en muestra C a las concentraciones 6.9, 13.8, 17.3, 34.5 y 69ng/ $\mu$ L.



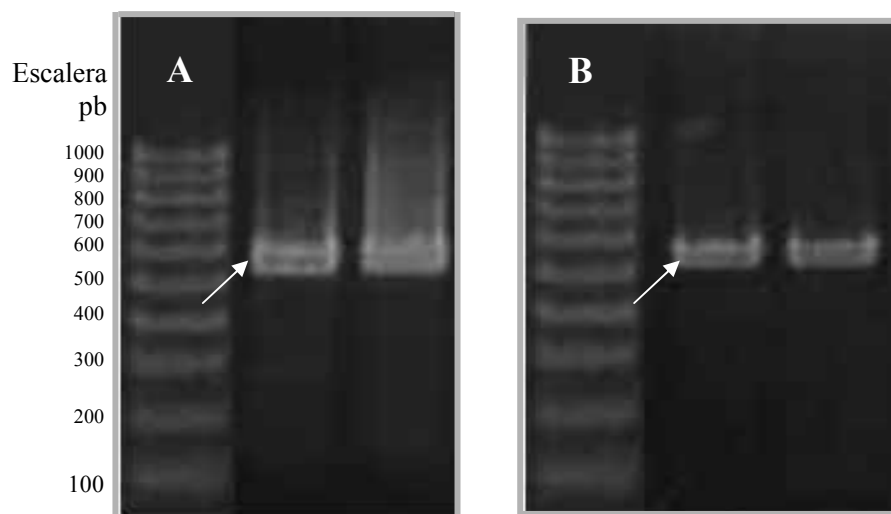
2. Concentración de  $MgCl_2$ . En la amplificación de varios exones, se encontró que cantidades excesivas de  $MgCl_2$  causaban un aumento de barrido. La Taq polimerasa de ADN es una enzima dependiente de magnesio, además que el templado de cebador y dNTP's también se unen al  $Mg^{2+}$ , por lo que dependiendo de la secuencia del templado a donde se unen los cebadores, se varió la cantidad de  $MgCl_2$  (Markoulatos et al. 2002).

Se obtuvo que a menor concentración, hay mayor especificidad y una obtención de mayor cantidad de producto. Esto se debe a que un exceso de  $Mg^{2+}$  puede estabilizar el anillamiento a otros lugares del templado de ADN, bajando la especificidad.

Las amplificaciones empezaron con una condición inicial de 3 mM de  $MgCl_2$  para todos los exones. Los únicos exones donde no se tuvieron ningún problema con esta concentración fueron los exones 6, 7, 13 y 14 del gen *EVC*, y los exones 17 y 22a del gen *EVC2*. Con una concentración de 2.5mM de  $MgCl_2$  fue posible la amplificación específica del exón 17 del gen *EVC* y los exones 1a<sub>2</sub>, 2, 8, 9, 10, 12, 18 del gen *EVC2*. Por último, la concentración más baja utilizada fue de 2mM para los exones 4, 8, 10, 12, 15 y 18 del gen *EVC* y los exones 1<sub>1</sub>, 1b<sub>2</sub>, 6, 7, 11, 13, 14, 16 y 22b del gen *EVC2*.

El aumento en especificidad al bajar la concentración de  $MgCl_2$  se puede observar en la Figura 20 al bajar 0.5mM a la concentración inicial utilizada para la amplificación del exón 12 del gen *EVC2*.

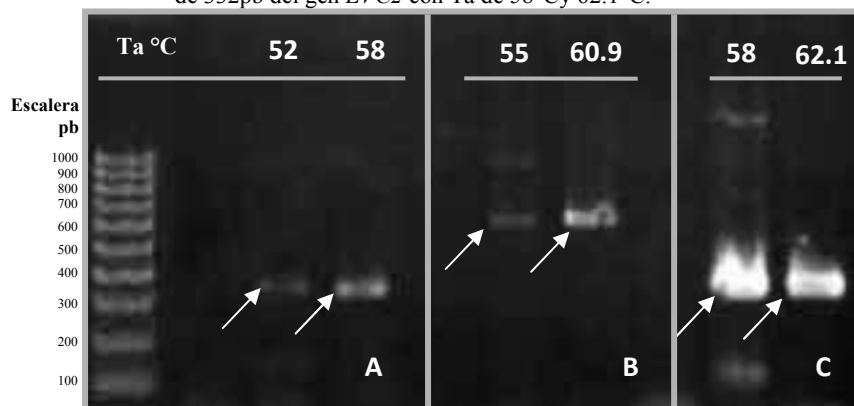
*Figura 20.* Optimización de la amplificación de 584pb del exón 12 del gen *EVC2* variando concentración de  $MgCl_2$ . **A:** Amplificación con las condiciones iniciales con 3mM de  $MgCl_2$ . **B:** Amplificación variando únicamente la concentración de  $MgCl_2$  a 2.5mM.



3. **Temperatura de Anillamiento (Ta).** La Ta de los exones estudiados se encuentra en un rango de 54-68°C. Se encontró que en temperaturas bajas hay amplificación de bandas inespecíficas y ocurrencia de barrido, mientras que a mayor Ta hay mayor especificidad. Como se observa en la Figura 21, con un aumento de ~5°C de Ta aumentó la especificidad de la amplificación de los productos pertenecientes a la región del exón 18 (Figura 21-A) del gen *EVC* y los exones 1b (Figura 21-B) y 7 (Figura 21-C) del gen *EVC2*.

Esta temperatura depende directamente de la longitud así como de la composición del cebador utilizado, pues en un inicio se determinó utilizando 5°C por debajo de la Tm siguiendo el criterio de Innis y Gelfand (1990). Debido a que para la determinación de la Tm solamente se tomó en cuenta la composición de las bases que componían al cebador, factores como concentración de buffer, Mg<sup>2+</sup> y dNTPs pudo haber influido en el cambio de Ta final utilizada.

Figura 21. Comparación entre variaciones de ~5°C de Ta en 3 regiones. **A:** Amplificación del exón 18 de 362pb el gen *EVC* con Ta de 52°C y 58°C. **B:** Amplificación del exón 1b de 578pb del gen *EVC2* con Ta de 55°C y 60.9°C. **C:** Amplificación del exón 7 de 332pb del gen *EVC2* con Ta de 58°C y 62.1°C.



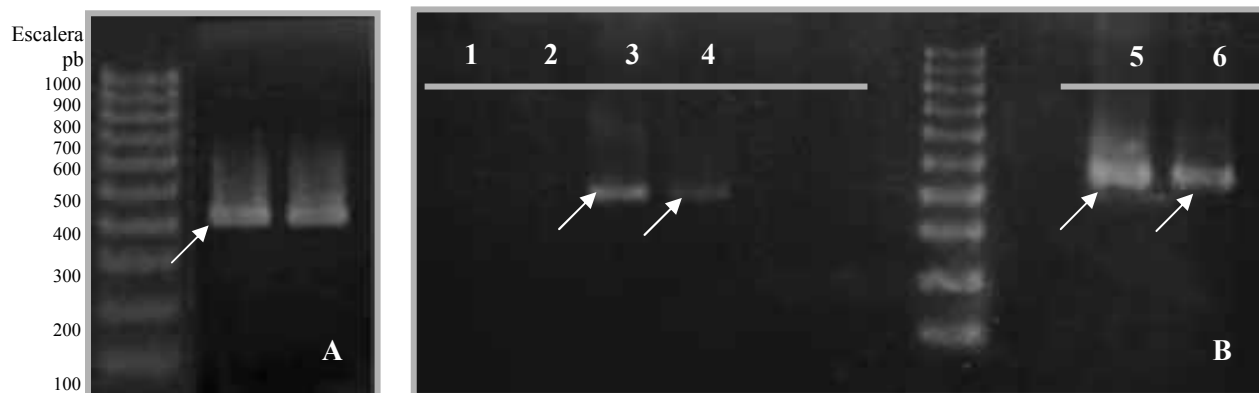
Este parámetro fue determinante en la optimización de las amplificaciones llevadas a cabo, puesto que con un Ta muy bajo, le permite a uno o ambos cebadores anillarse con otras secuencias al tolerarse el anillamiento parcial o la falta de complementaridad de un nucleótido en secuencias diferentes a la del objetivo. Pero también a Ta muy alto, disminuye el rendimiento de la PCR porque poco producto es amplificado a consecuencia de que la posibilidad de anillamiento del cebador es reducida, o hay una inhibición total, por lo que no se produce la amplificación (Rybicki 2001).

4. **Adición de DMSO y BSA.** En la utilización de 0.08% de albúmina sérica de bovino (BSA) y 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) se encontró que podía bajar el barrido en las muestras y aumentar la especificidad, es decir bajando el número de bandas inespecíficas. Esto es debido a que el DMSO y BSA son aditivos que relajan el ADN, facilitando la desnaturalización del templado (Markoulatos *et al.* 2002). El DMSO es un compuesto que irrumpe el apareamiento de bases, previniendo la formación de horquillas en regiones ricas en GC (Musso *et al.* 2006). Otros autores sugieren la utilización de glicerol, betaina y/o 7-deaza-dGTP,

que tienen efectos similares (Wolfgang *et al.* 1997). A su vez el BSA ayuda en la PCR al reducir los efectos de inhibidores que puedan encontrarse presentes, de esta manera aumentando la fidelidad de la Taq polimerasa (Waleed *et al.* 2000).

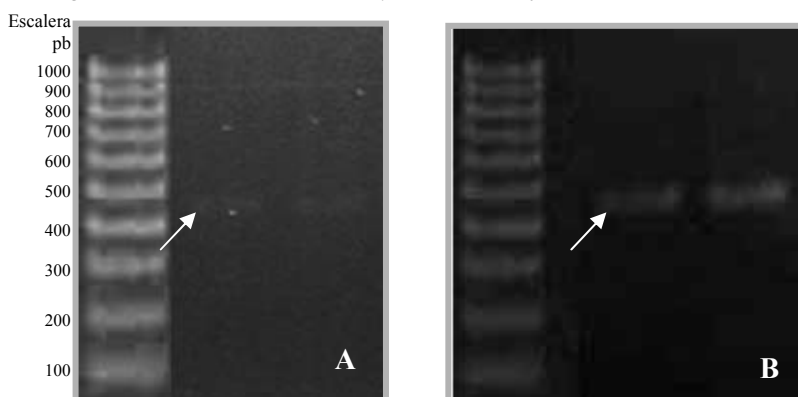
Un ejemplo muy interesante de la función del DMSO y el BSA fue una prueba realizada con el exón 12 del gen *EVC*, donde luego de la primera amplificación, en la cual se observó barrido (Figura 22-A), se procedió a realizar una prueba añadiéndole BSA 0.08% y DMSO 5%, y un aumento de Ta de  $\sim 10^{\circ}\text{C}$ . Como se observa en la Figura 22-B, en la columna 1 y 2 no hay amplificación a una temperatura de 65.5 con BSA y DMSO presente, mientras que sin la adición de BSA y DMSO, se observa una amplificación fuerte con un poco de barrido en la columna 5 y 6 a esa misma temperatura. También se observa que a temperaturas menores como 55.1 y 56.8 $^{\circ}\text{C}$  hay una amplificación más específica de la región, pero un aumento de  $\sim 2^{\circ}\text{C}$  es significativo, como se observa en entre las columnas 3 y 4, donde hay una clara disminución en el rendimiento de la amplificación del producto en la columna 4 (56.8 $^{\circ}\text{C}$ ) en relación a la columna 3 (55.1 $^{\circ}\text{C}$ ). Mediante este ejemplo se demuestra que la adición de estos dos aditivos aumenta la especificidad de la amplificación (columnas 3 y 4), sin necesidad de tener que aumentar la Ta, mientras que si no se encuentran presentes, un efecto similar lo puede ejercer el aumento de la Ta.

**Figura 22.** Optimización del exón 12 de 423pb del gen *EVC* con la adición de 5% DMSO y 0.08% BSA y variando la temperatura de anillamiento. **A:** Amplificación con las condiciones iniciales de Buffer 1X, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTP's, 0.2 $\mu\text{M}$  cebadores. **B:** Adición de 5% DMSO y 0.08% BSA a columnas 1-4, variando Ta (1 y 2 con 65.5 $^{\circ}\text{C}$ , 3 con 55.1 $^{\circ}\text{C}$  y 4 con 56.8 $^{\circ}\text{C}$ ), columnas 5 y 6 sin adición de DMSO y BSA, con aumento en Ta a 65.5 $^{\circ}\text{C}$ .



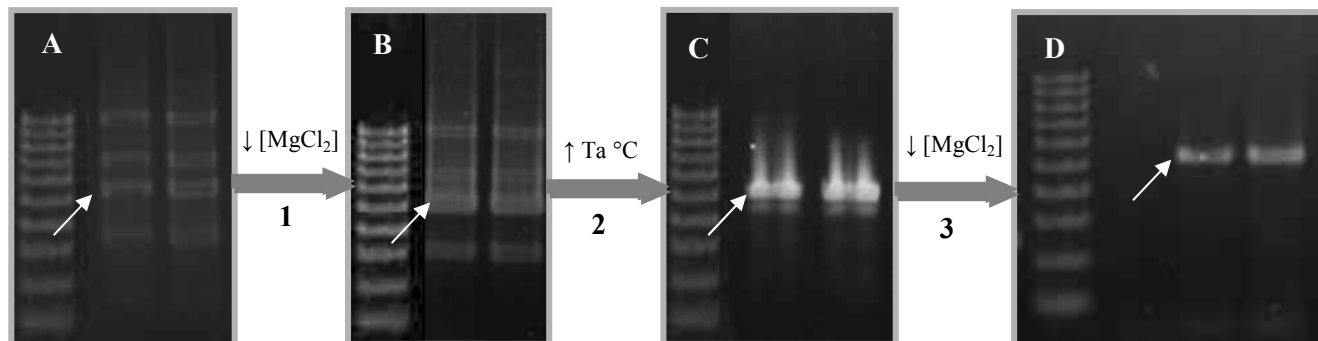
5. Reamplificación. En algunos casos donde la banda era apenas perceptible o no se observaba ninguna amplificación aparente, se procedió a realizar una reamplificación (véase Apéndice 5). Como se puede observar en la Figura 23, en algunos casos existe una amplificación muy débil del producto, por lo que se procede a realizar una reamplificación, esta es diferente de un aumento en número de ciclos, puesto que en el aumento de número de ciclos se esperaría aumentar la concentración de dNTP's, lo cual puede resultar en una inhibición. Una reamplificación puede aumentar el rendimiento del producto deseado (Hengen 1995).

**Figura 23.** Reamplificación de exón 7 de 430 pb del gen *EVC*. **A:** Amplificación con las condiciones iniciales: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 3mM, 0.2mM dNTP's, 0.2μM cebadores, y 35 ciclos a un Ta 58.9°C. **B:** Reamplificación con las condiciones: Buffer 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, 0.2mM dNTP's, 0.1 μM cebadores, y 2° ciclos a un Ta 61°C.



6. **Combinación de factores.** En algunos casos para lograr una amplificación con banda nítida del producto, no existe una sola vía para su optimización, es necesario variar diversas condiciones, *e.g.* optimización del exón 15 del gen *EVC* (Figura 24). En un inicio se procedió a bajar la concentración de MgCl<sub>2</sub>, se observó que aunque existieran bandas inespecíficas y barrido, aumento la amplificación del producto blanco (Figura 24-B). Luego aumentando la Ta ~10°C, se eliminaron totalmente todas las bandas inespecíficas, quedando un poco de barrido (Figura 24-C). Al final se volvió a bajar 0.5mM de MgCl<sub>2</sub>, dando como resultado una amplificación específica, con banda nítida (Figura 24-D).

**Figura 24** Optimización en la PCR del exón 15 de 531pb del gen *EVC*. **A:** Amplificación con las condiciones iniciales: 1X Buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM dNTPs, 0.2μM cebadores con Ta 55°C. **B:** Amplificación bajando la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 2.5mM. **C:** Amplificación aumentando la Ta a 65.5°C. **D:** Amplificación bajando la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 2mM con una Ta de 65.5°C.



### C. Secuenciación.

Se obtuvo un rango de porcentaje de calidad de ADN en la secuenciación entre 86.2-100, obteniendo en la mayoría de casos un 100% (Cuadros 8 y 9). Esto indica junto a la visualización de la banda por electroforesis en agarosa, que el producto de PCR es específico para la región que se quería analizar. Por lo tanto las condiciones optimizadas sí fueron lo suficientemente adecuadas para la amplificación de dicha región y la secuencia obtenida a través de la secuenciación efectuada por la compañía EtonBioscience es suficientemente confiable para el análisis de búsqueda de mutaciones realizado.

A partir de la alineación de secuencias entre la paciente y secuencias consenso (véase Apéndice 7), y el análisis de electroferogramas se encontró la mutación sin sentido L257X (Cuadro 10), reportada previamente en el estudio de Sund y colegas (2009), por la combinación entre dos mutaciones [953 C>T; 954 T>A] localizados en el exón 6 del gen *EVC*, en la cual el cambio en la posición 953 es homocigota, mientras que en 954 es heterocigota (Figura 28), sugiriendo que únicamente uno de los dos alelos codifica una proteína truncada, logrando la traducción hasta la posición 256 de los 992 aminoácidos. Este hallazgo sugiere que la combinación de ambas mutaciones, la mutación 953 C>T reportada previamente como polimorfismo (Ulucan *et al.* 2008) y la mutación 954 T>A sin reportarse, es la posible causa del desarrollo de la enfermedad de EvC en la paciente estudiada. Para poder afirmarlo, son necesarios estudios posteriores. Además debido a la forma heterocigota de la mutación, es posible la presencia de otra mutación en forma heterocigota en el otro alelo de la paciente, haciendo que la proteína fuera disfuncional.

Adicionalmente se lograron encontrar varios SNP, algunos en forma heterocigota y algunos en forma homocigota. Las mutaciones de los exones 8 y 10 del gen *EVC*, y del exón 1 de ambas isoformas del gen *EVC2*, fueron encontradas en forma heterocigota, mientras que la mutación 956 T>C del exón 6 del gen *EVC* y exón 14 del gen *EVC2* en forma homocigota. Todas las mutaciones encontradas están reportadas en la base de datos de HapMap (The International HapMap Consortium 2007) entre ellos, la mutación 956 T>C pertenecientes al exón 6 y la mutación 1530 C>A perteneciente al exón 10 son SNP previamente reportadas en el estudio de Ulucan y colegas (2008).

Cabe mencionar que en el análisis de todos los exones de ambos genes (resultados no mostrados en este trabajo), se agregan únicamente dos polimorfismos a los ya mencionados, por lo que sí es probable que en los exones analizados existe mayor probabilidad de mutación, como se encontró este trabajo y como lo indicado por la literatura (Ruiz-Perez *et al.* 2000; Galdzicka *et al.* 2002; Ye *et al.* 2006; Tompson *et al.* 2007; Ulucan *et al.* 2008; Kalsoom *et al.* 2009; Sund *et al.* 2009; Valencia *et al.* 2009).

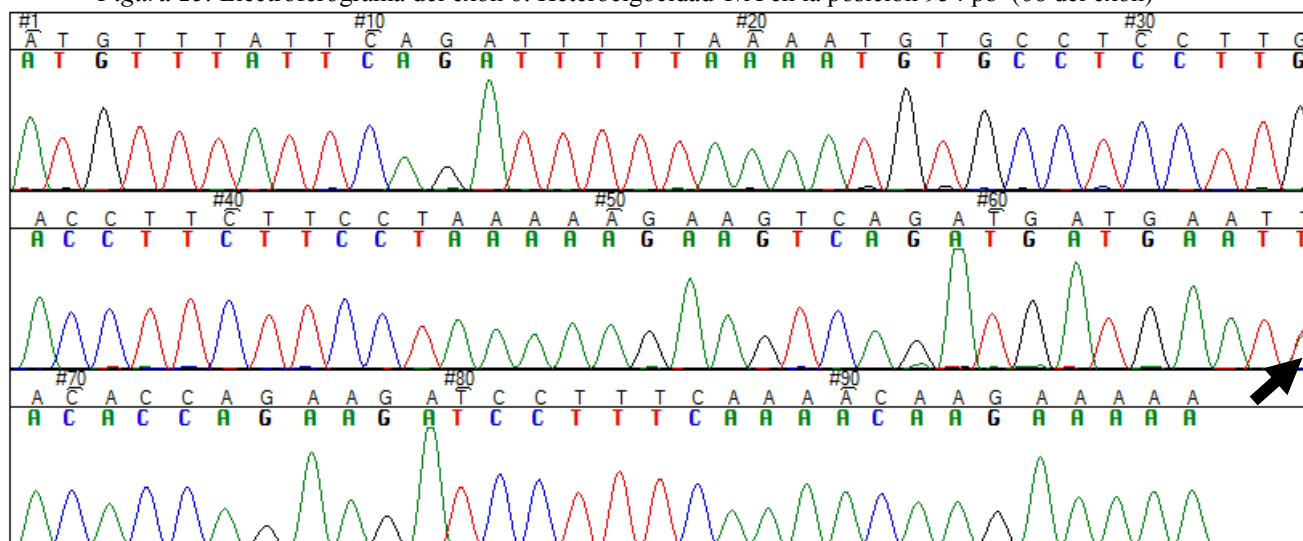
**Cuadro 8.** Análisis de mutaciones en exones del gen *EVC* en la paciente comparados con una secuencia consenso evaluados mediante secuenciación directa

Exon	Tamaño (pb)	Mutación en el exon	Calidad de ADN (%)
4	233	---	99.1
6	99	[953 C>T; 954 T>A; 956 T>C]	99
7	138	---	86.2
8	159	1252 A>G	99.4
10	149	1530 C>A	95.3
12	213	---	100
13	110	2038 C>T	96.4
14	211	---	100
15	207	---	100
17	112	---	95.5
18	127	---	100

**Cuadro 9.** Análisis de mutaciones en exones del gen *EVC2* en la paciente comparado con una secuencia consenso evaluados mediante secuenciación directa

Exon	Tamaño (pb)	Mutación en el exon	Calidad de ADN (%)
1 <sub>1</sub>	282	[40 G>A; 106 C>T]	95.4
1 <sub>2</sub>	720	[181 C>T; 466 C>A; 629 T>C]	98.7
2	55	---	100
6	110	---	100
7	54	---	100
8	135	---	100
9	140	---	100
10	325	---	100
11	240	---	100
12	176	---	92.6
13	160	---	99.3
14	455	2149 A>G	100
16	123	---	100
17	228	---	100
18	215	---	99.5
22	691	---	93.9

Figura 25. Electroferograma del exón 6: Heterocigocidad T/A en la posición 954 pb (68 del exón)



Cuadro 10. Cambios a nivel de ARNm y proteína debido a los SNP encontrados en la paciente con el síndrome de Ellis-van Creveld

Gen	Exon	ARNm				Proteína		
		Mutación	Tipo de mutación	Cambio en Alelo	Función	Posición	Cambio	Efecto
EVC	6	953 C>T	Homocigoto	<u>CTA</u> → <u>TTA</u>	Sinónimo	256	L [Leu] → L [Leu]	---
		953 C>T; 954 T>A	Homocigoto; Heterocigoto	<u>CTA</u> → <u>TAA</u>	Sin Sentido	256	L [Leu] → X	L256X
	8	956 T>C	Homocigoto	<u>TAC</u> → <u>CAC</u>	Sentido equivocado	257	Y [Tyr] → H [His]	Y258H
	10	1252 A/G	Heterocigoto	<u>CTA</u> → <u>CTG</u>	Sinónimo	355	L [Leu] → L [Leu]	---
	13	1530 C/A	Heterocigoto	<u>ACG</u> → <u>AAG</u>	Sentido equivocado	448	T [Thr] → K [Lys]	T449K
EVC2	1 <sub>1</sub>	2038 C/T	Heterocigoto	<u>CTC</u> → <u>CTT</u>	Sinónimo	617	G [Gly] → G [Gly]	---
		40 G/A	Heterocigoto	NA	UTR 5'		NA	---
	1 <sub>2</sub>	106 C/T	Heterocigoto	<u>CTC</u> → <u>TTC</u>	Sentido equivocado	17	L [Leu] → F [Phe]	L18F
		181 A/G	Heterocigoto	NA	UTR 5'	NA	NA	---
		466 G/T	Heterocigoto	NA	UTR 5'	NA	NA	---
		629 C/T	Heterocigoto	NA	UTR 5'	NA	NA	---
14	2149 A>G	Homocigoto	<u>ACG</u> → <u>GCG</u>	Sentido equivocado	698	T [Thr] → A [Ala]	T699A	

Mediante el blast SNP (BIRD 2009) se obtuvieron porcentajes de las frecuencias de dichos polimorfismos en las poblaciones europea, asiática, africana sub-sahara, entre otros. Realizando la comparación entre los polimorfismos (homocigoto o heterocigoto) de la paciente, se obtuvo que existe una mayor similitud con la población asiática (véase Apéndice 9).

En la mayoría de casos los SNPs encontrados son mutaciones sinónimo y sentido equivocado, cambiando en el caso de mutación de sentido equivocado un solo aminoácido en la proteína. Se encontraron además 1 mutación en la isoforma 1 y 3 mutaciones en la isoforma 2 del gen *EVC2* en la región no codificante. Esto explica su condición de polimorfismo en la población, puesto que dichas mutaciones no son críticas para afectar la función de la proteína.

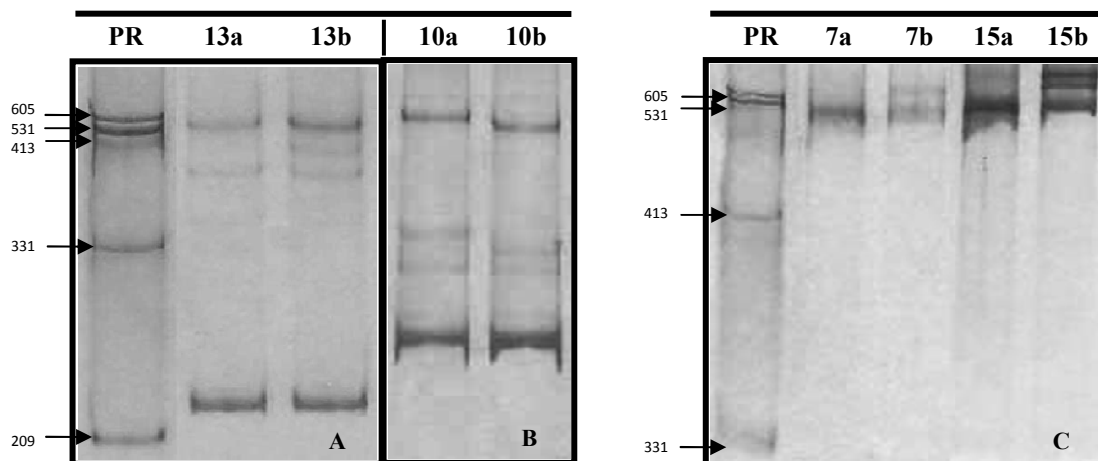
#### D. SSCP

Se encontraron cuatro regiones con variación de migración de bandas entre paciente y un control negativo (Cuadro 11). Entre ellas, tres se lograron detectar en los geles poliácridamida al 11% y con glicerol 10%, mientras que una se detectó en los geles poliácridamida al 11% sin glicerol como se observa en la Figura 26, esto demuestra que sí es importante el análisis por SSCP con por lo menos dos condiciones como sugieren otros autores (Michaud *et al.* 1992; Fujita *et al.* 1994).

**Cuadro 11.** Exones con migraciones distintas entre paciente y control negativo

Gen	Glicerol 10%	Sin glicerol
<i>EVC</i>	7, 13 y 15	10

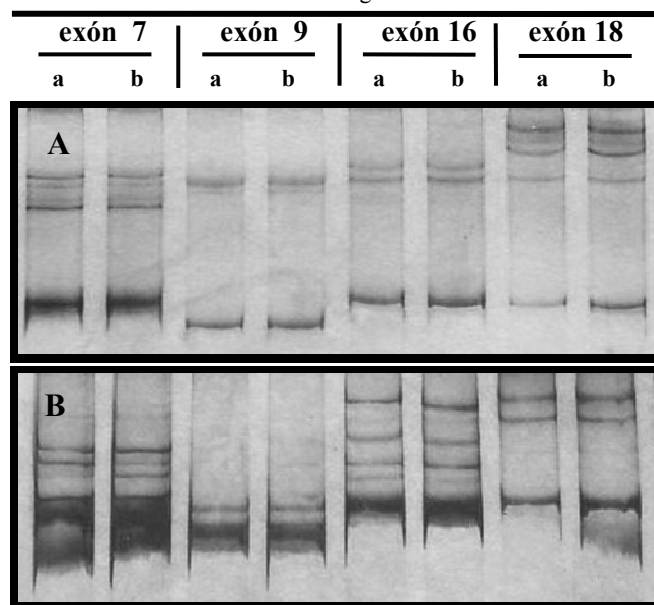
*Figura 26.* Comparación de patrones de migración variados entre paciente y control negativo C-001. **A:** Migración del producto de PCR del exón 13 del gen *EVC* en gel poliácridamida al 11% con glicerol al 10%, corrido por 5 horas a 30mAmp. **B:** Migración del producto de PCR del exón 10 del gen *EVC* en gel poliácridamida al 11% sin glicerol, corrido por 5 horas a 35mAmp. **C:** Migración del producto de PCR de exones 7 y 15 del gen *EVC* en gel poliácridamida al 11% con glicerol al 10%, corrido por 7 horas a 30mAmp. Bandas de "a" pertenecen a paciente y "b" a un mismo control negativo, "PR" es el patrón de referencia.



Como indican Michaud y colegas (1992), diferentes condiciones electroforéticas, como presencia o ausencia de glicerol y la temperatura, afectan la migración de las bandas. En este estudio se obtuvo mejor resolución de la migración de las bandas con 10% de glicerol que con 5% de glicerol, ya que hay mayor migración y separación de bandas. Se optó por utilizar geles poliacrilamida al 11% sin glicerol como segunda condición, debido a que existe una diferencia en los patrones de migración de banda (Figura 26). No se logró una migración óptima en los geles sin glicerol, observándose algunos patrones de banda irregulares, como se observa en la Figura 26–B. La condición que se mantuvo constante fue la temperatura, colocándose siempre en hielo el sistema.

También el amperaje varió según la condición utilizada; puesto que se observó que con glicerol existe una migración mayor que los geles sin glicerol, se optó por utilizar a 30 mA los geles con glicerol al 10% y a 35mA los geles sin glicerol.

Figura 27. Migración de amplificaciones de exones 7, 9, 16 y 18 pertenecientes al gen *EVC2* en dos condiciones. **A:** Migración de bandas con 10% de glicerol. **B:** Migración de bandas sin glicerol. Bandas de “a” pertenecen a paciente y “b” a un mismo control negativo.



A partir de las migraciones obtenidas de los exones 7, 10, 13 y 15 del gen *EVC* en la población estudiada (n=13, incluyendo paciente), se obtuvieron distintos patrones para cada exón, su frecuencia (Cuadro 12) y los Rf de las bandas generadas (véase Apéndice 10). Estos datos indican que las mutaciones encontradas son SNP, debido a que el patrón de bandas generado por la paciente aparece por lo menos una vez en la población.

**Cuadro 12.** Frecuencia de los patrones obtenidos en la población estudiada de los exones 7, 10, 13 y 15 del gen *EVC*

Exón	Patrón	Frecuencia (n=13)	IC 90%
7	A	9 (69%)	48 – 90
	B	4 (31%) *	10 – 52
10	A	5 (38%) *	16 – 61
	B	2 (15%)	-1 – 32
	C	4 (31%)	10 – 52
	D	2 (15%)	-1 – 32
13	A	1 (8%)	-5 – 20
	B	6 (46%)	23 – 69
	C	6 (46%) *	23 – 69
15	A	6 (46%) *	23 – 69
	B	7 (54%)	31 – 77

(DRI 2005)

\* patrón presentado por la paciente

La letra de patrón hacen referencia a los distintos patrones de migración obtenidos para cada exón, estos fueron designados con el único propósito de diferenciarlos. Cabe mencionar que los patrones son distintos entre los exones aunque se les haya designado un mismo nombre, *e.g.* el patrón A del exón 7 no es el mismo que el patrón A del exón 13.

Es importante denotar que a pesar que en la literatura se ha reportado que regiones de ADN >300pb no son recomendables (Hayashi 1991; Sheffield *et al.* 1993), pues la técnica de SSCP no es lo suficientemente sensible en dichos casos, en el presente trabajo, de los cuatro exones en donde se presentaron SNPs, dos tenían regiones mayores a las 300pb: exón 7 y 15 con 430 y 531pb respectivamente. Mientras que los exones 10 y 13 tenían regiones amplificadas menores a 300pb, con 247pb el exón 10 y 224pb el exón 13. Sin embargo se puede observar que en los fragmentos cortos se detectaron un rango mayor de patrones de migración de banda, mientras que en los fragmentos más grandes se detectaron únicamente dos patrones distintos de migración de banda, por lo que esto sugiere que hay una mayor sensibilidad de la técnica para fragmentos de ADN cortos como lo indicado en la literatura.

Se encontraron variados patrones en el estudio de estos cuatro exones. En el exón 7 (Figura 28-A), fue posible distinguir dos patrones de migración de bandas, donde la paciente tiene una migración igual al padre. De acuerdo al electroferograma de la secuencia de dicho exón presentado, la paciente es homocigota en dicha región, por lo que se puede inferir que el padre es homocigoto, presentando el mismo patrón de migración de banda que la paciente, y la madre necesariamente heterocigoto para que la paciente heredara el alelo con el mismo polimorfismo que el padre. En la población se presenta una mayoría de frecuencia del patrón A.

Se presenta en el exón 15 (Figura 28-B) un patrón de bandas distinto entre la paciente y su padre, a partir del electroferograma de la secuencia de la paciente. Se sabe que la paciente es homocigota, por lo que se infiere que la madre es homocigota al igual que la paciente, presentando patrones de migración igual, mientras que el padre necesariamente es heterocigoto, para que la paciente haya heredado el alelo con el mismo polimorfismo que la

madre. En este exón, se presentaron únicamente dos patrones de banda al igual en la población, obteniéndose frecuencias parecidas entre sí.

En la región del exón 10 (Figura 28-C) se presentaron variados patrones de migración de banda. En la familia se obtuvieron dos, entre los cuales la paciente varía de su padre. Esta variación de patrones puede deberse a distintas mutaciones en distintas regiones, contrario a lo que se observa en los demás polimorfismos obtenidos, donde se encontraron únicamente dos patrones, o en el caso del exón 13, tres patrones, pero dos homocigotos de secuencia distinta y un heterocigoto, producto de la combinación entre ambas secuencias, como se puede observar en la Figura 28-D. A partir de los patrones de banda en la Figura 28-D, se puede observar que la madre tiene patrón A, el padre patrón B, y la paciente patrón C, la cual es la combinación entre ambos patrones, denotando su estado heterocigoto, con apoyo del análisis de secuencia realizado (Figura 29), donde se puede observar por electroferograma claramente el estado heterocigoto de la paciente. Se encontró que la población control utilizada es 50% heterocigota, y 50% homocigota presentando el patrón B, el patrón A está en menor proporción en la población estudiada y tanto el patrón B como el C aparecen distribuidos en igual proporción.

Cabe mencionar que estos polimorfismos fueron encontrados en una población de 13 personas, un número muy limitado, por lo cual las frecuencias encontradas de los distintos patrones no son válidos para toda la población.

*Figura 28.* Migración del producto PCR de los exones 7, 15, 10 y 13 del gen *EVC* por la técnica SSCP. **A:** Migración electroforética de región amplificada del exón 7, observándose 2 patrones de banda distintos. **B:** Migración electroforética de la región amplificada del exón 15, observándose 2 patrones de banda distintos. **C:** Migración electroforética de la región amplificada del exón 10, observándose 4 patrones distintos. **D:** Migración electroforética de la región amplificada del exón 13, observándose 3 patrones distintos. PR se refiere a patrón de referencia, muestra "a" es la madre, muestra "b" es el padre y muestra "c" es la paciente, siendo los controles negativos muestras 1-10.

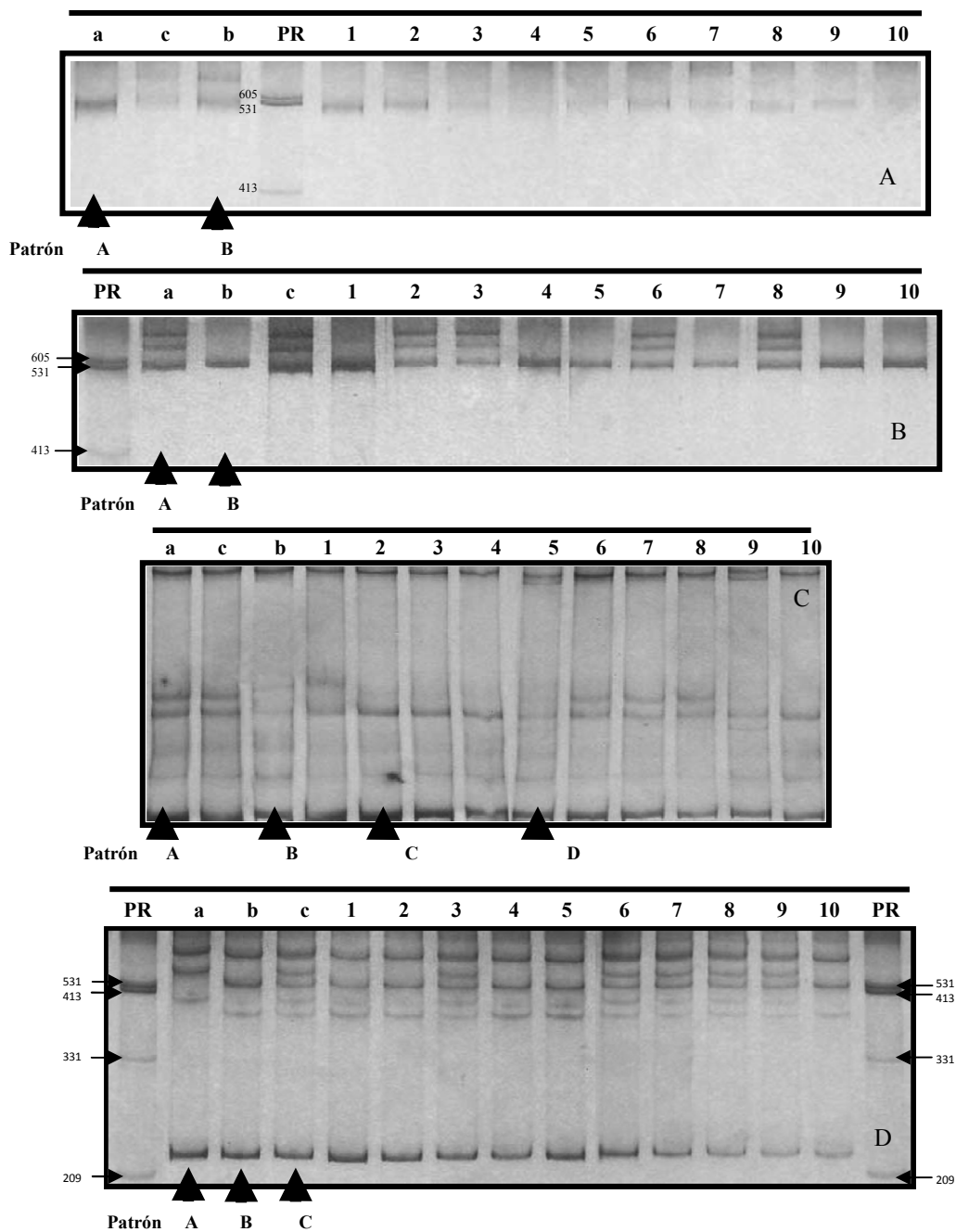
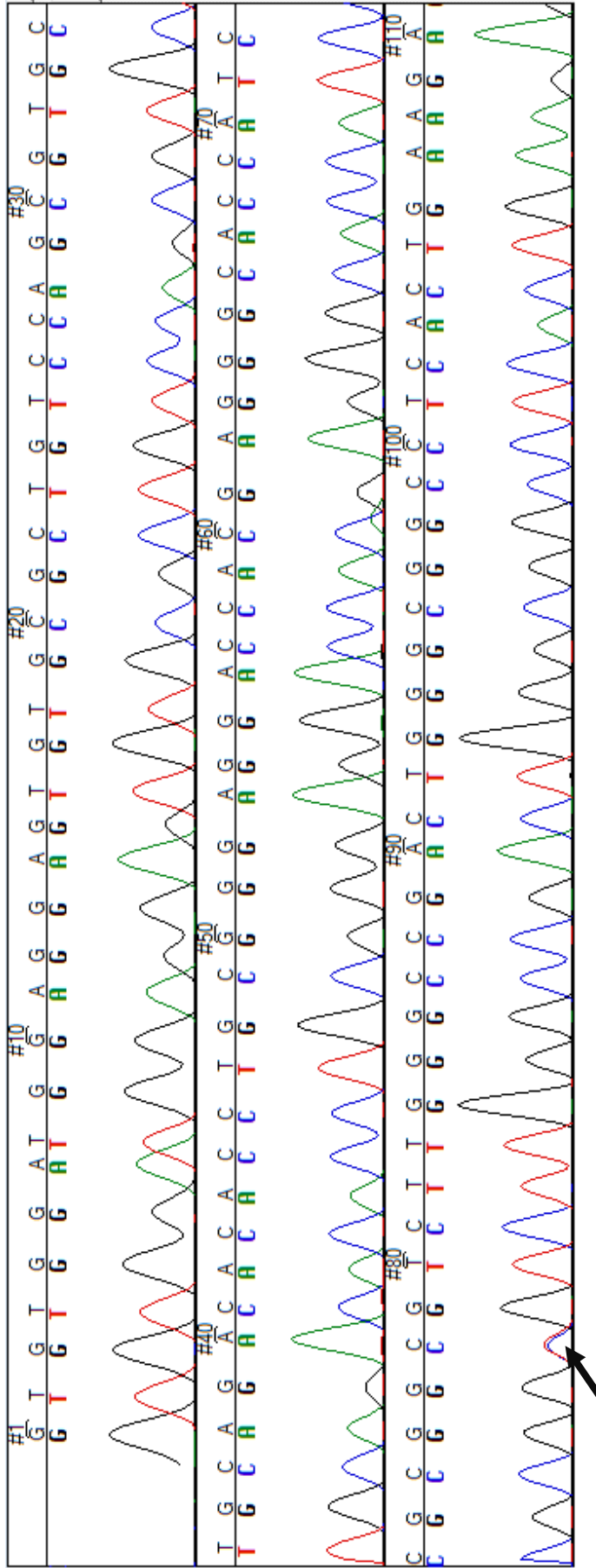


Figura 29. Electroferograma del exón 13: Heterociguidad C/T en la posición 2038 pb (78 del exón)



En los exones donde se encontró diferencia en la migración de las bandas entre los distintos controles negativos y paciente, pero no se encontró mutación en la alineación de secuencias con la secuencia de referencia GRCh37, puede deberse a que alguna mutación en la región intrónica entre la región de apareamiento de los cebadores y los exones puede causar diferencia entre la migración de las bandas, generando distintos patrones. Otra posibilidad es que la paciente tenga igual secuencia que la de referencia GRCh37, pero que existan polimorfismos distribuidos en la población, por ello los SSCP dependen invariablemente del fondo genético de la población en estudio.

#### E. Comparación entre la técnica SSCP y secuenciación directa

Con base a los resultados obtenidos, se detectó por secuenciación siete exones con mutación, ya sea homocigota o heterocigota, y por los SSCP cuatro mutaciones, de las cuales se comparten entre ambas técnicas dos exones (Cuadro 13).

**Cuadro 13.** Exones con polimorfismos encontrados según la técnica utilizada

<b>Gen</b>	<b>Secuenciación</b>	<b>Secuenciación y SSCP</b>	<b>SSCP</b>
<i>EVC</i>	6 y 8	10 y 13	7 y 15
<i>EVC2</i>	1 <sub>1</sub> , 1 <sub>2</sub> y 14	---	---

No fue posible evaluar los SSCP en comparación con la secuenciación directa debido a que ambas secuencias de comparación eran diferentes, en la secuenciación directa se alinearon la secuencia de la paciente con la de referencia, mientras que con la técnica SSCP se comparó siempre la migración de patrón de banda de la paciente con un control negativo. Sin embargo, aunque no se comparó con la misma secuencia, era de esperarse encontrar polimorfismo en el exón 6 del gen *EVC* en donde se encontró la mutación heterocigota 954 T>A, que en combinación con el SNP 953 C>T, da lugar a un codón de alto.

Aunque se haya logrado encontrar polimorfismos en los exones 7, 10, 13 y 15 del gen *EVC* de variados tamaños, no se logró encontrar la mutación más importante hallada en este estudio por la secuenciación. Todo esto sugiere que la técnica SSCP no es sensible para todos los casos, y por lo tanto no es una técnica lo suficientemente adecuada para utilizarse como tamizaje inicial del presente estudio.

Además, en términos de costos, comparando los precios entre ambas técnicas, efectivamente los SSCP constituyen una técnica más barata (véase Apéndice 11) como lo indicado por Estrada-Cuscano y colegas (2005), pero debido a la naturaleza del estudio, no es del todo conveniente establecer la presente metodología como rutinaria; en primer punto por que se está analizando una enfermedad encontrada en 1 de cada 60,000 nacidos vivos, y segundo, aunque sean dos genes los estudiados, implica el estudio de 43 exones y para este trabajo 29 regiones distintas de variados tamaños (215-663pb), para lo cual son necesarias distintas

condiciones de corrida. También un factor crítico es el tiempo, pues los SSCP resultaron ser una técnica tanto laboriosa como extensa en tiempo, necesitándose como mínimo para este trabajo 8 corridas electroforéticas de 32 geles en total, por 5 ó 7 horas cada migración, sin tomar en cuenta el tiempo que fue necesario para la optimización.

La enfermedad de EvC es un síndrome muy complejo, involucrando anormalidades tanto en dientes y uñas, como en la estructura ósea y sistema cardiovascular. Su incidencia es muy baja, por lo que son pocos los casos dados alrededor del mundo, sin contar la población Amish. Existen variados trabajos (Ruiz-Perez *et al* 2007; Sund *et al.* 2009; Ruiz-Perez *et al.* 2009) tratando de elucidar el mecanismo molecular de la enfermedad, vinculándolo a los señalamientos Hedgehog implicados en el desarrollo de huesos, pero no hay una claridad en su mecanismo, ni se ha encontrado el mecanismo molecular implicado en las malformaciones cardiacas, teniendo como único dato que las proteínas codificadas funcionan coordinadamente durante el desarrollo del corazón. Además aún no existe un diagnóstico molecular exitoso para todos los casos presentados, teniéndose un éxito del 66% en la determinación de la mutación implicada (Tompson *et al* 2007). Se necesitan de varios estudios aún para lograr entender la naturaleza de la enfermedad y así mejorar el diagnóstico, prognosis, tratamiento y terapéutica. Por ello fue importante determinar la secuencia y es pertinente reportarla en la base de datos mundial.

### III. CONCLUSIONES

- El análisis de electroferogramas detectó la mutación heterocigota 954 T>A, que combinada con el polimorfismo homocigoto 953 C>T localizados en el exón 6 del gen *EVC*, forma el codón de alto UAA, dando lugar a la mutación L256X en la proteína, constituyendo esta la posible mutación implicada en el desarrollo de la EvC en la paciente estudiada.
- La técnica SSCP no logró detectar polimorfismo en la región amplificada del exón 6 del gen *EVC*, por lo cual se desvalida la utilización de los SSCP como tamizaje inicial en la metodología propuesta.
- La técnica de SSCP, con las condiciones utilizadas, detecta polimorfismos en fragmentos de ADN de 224-531pb.
- No se logró evaluar la comparación directa entre la técnica de SSCP con la secuenciación para la detección de mutaciones puntuales en los genes *EVC* y *EVC2*, debido a que ambas referencias de comparación no fueron iguales.
- Se logró la optimización de la técnica PCR de los exones reportados previamente con mutaciones en los genes *EVC* y *EVC2* a partir de cebadores sentido y antisense diseñados en el presente estudio y modificación de varias condiciones, e.g. concentración de MgCl<sub>2</sub> y Ta.
- Se detectaron polimorfismos en la población estudiada (n=13) en los exones 7, 10, 13 y 15 del gen *EVC* mediante la técnica SSCP, obteniéndose 2, 4, 3 y 2 patrones de migración de bandas distintos, respectivamente.
- Ambas técnicas lograron la detección de polimorfismo en los exones 10 y 13 del gen *EVC*.

- El alineamiento de secuencias y electroferogramas obtenidos demuestran SNPs en el gen *EVC* en las regiones del exón 6 con las mutaciones homocigotas 953 C>T y 956T>C, exón 8 con mutación heterocigota 1252 A>G, exón 10 con mutación heterocigota 1530 C>A y exón 13 con mutación heterocigota 2038 C>T, y en el gen *EVC2* en ambas isoformas, en el exón 1 de la isoforma 1 se encontraron las mutaciones heterocigotas 40 G>A y 106 C>T, en el exón 1 de la isoforma 2 se encontraron las mutaciones 181 A>T, 466G>T y 629 C>T, y en el exón 14 la mutacion homocigota 2149 A>G.

#### IV. RECOMENDACIONES

- Secuenciar el exón 6 del gen *EVC* de ambos padres.
- Para encontrar la posible presencia de otra mutación heterocigota, analizar regiones intrónicas, puesto que se han encontrado mutaciones en el intrón que afecta en el corte y empalme de la proteína producida.
- Como alternativa a la metodología seguida, se pueden genotipificar utilizando marcadores microsatélite para cromosoma 4 región 4p16 (D4S2936, D4S412, D4S2285, D4S3007, D4S394, D4S2983), realizar transcripción reversa y posterior amplificación del ADNc, o realización de un Western Blot a controles negativos y paciente.
- Si se desea continuar el estudio con la técnica SSCP:
  - Diseñar nuevos cebadores sentido y antisentido para la amplificación de la región del exón 6 con un tamaño <250pb.
  - Comparar ambas técnicas secuenciando el control negativo con el cual se comparó el ADN amplificado de la paciente en la técnica SSCP, y alinear ambas secuencias.
  - Se necesitan analizar por lo menos otros 90 controles negativos para tener suficiente validez en la evaluación de polimorfismos.
  - Diseñar cebadores sentido y antisentido que amplifiquen regiones con un tamaño <300pb, para obtener mayor sensibilidad en la técnica SSCP.
  - Combinarla con la técnica de análisis heterodúplex (HD) para aumentar sensibilidad hasta un 97.5-99.9%.
- Realizar estudio de continuación sobre la prevalencia del síndrome EvC en la población guatemalteca.
- Realizar diagnóstico clínico de la enfermedad a la población guatemalteca, y tratarla por medios quirúrgicos, antes de evaluarlos por medio del diagnóstico molecular propuesto.

## V. LITERATURA CITADA

- Abeles, A. y J. Tobias. 2008. *Anesthetic implications of Ellis-van Creveld syndrome*. Journal of Clinical Anesthesia, 20: 618–621
- Amalgíá, A.; Arce, P. y C. Villca. Fecha desconocida. *Descripción Huesos de Antebrazo y Mano*. [web en línea] en: <<http://www.anatomiahumana.ucv.cl/>> [con acceso el 25-07-2009]
- Antonarakis, S. 1998. *Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations*. Human Mutations, 11: 1-3
- Brown, T. 2001. *Gene cloning and DNA Analysis*. 4ta. Ed. Reino Unido. Blackwell Science Ltd. 363 Pp.
- Calabrò, R. y G. Limongelli. 2006. *Complete atrioventricular canal*. Orphanet Journal of Rare Diseases. 1 (8): 1-5
- Cifuentes, L.; Nazer, J.; Caviedes, A. y A. Luarte. 2007. *Polidactilia: Características clínicas y genético epidemiológicas en una muestra de población chilena*. Rev Chil Pediatr 78 (1): 46-53
- Chakraborty P.; Bandyopadhyay D.; Mandal S.; y R. Subhasis. 2007. *A rare variant of Ellis van Creveld syndrome*. Singapore Med J, 48(7): 684
- Children's Hospital Central California. 2008. *Anatomía y la Función de las Válvulas Cardíacas*. [web en línea] en: <<http://www.childrenscentralcal.org/ESPANOL/HEALTHS/P06159/P06157/Pages/P06152.aspx>> [con acceso el 13-09-2009]
- Clark, M. 2004. *Los valores P y los intervalos de confianza: ¿en qué confiar?*. Rev Panam Salud Pública, 15 (5): 293-296
- Coelho, M. Fecha desconocida. *Deformidades congénitas de la pared torácica anterior*. [web en línea] en: <[http://www.marloscoelho.com.br/conteudo.php?acao=deformidade&area=deformidade\\_pectuscarinatum&idoma=2](http://www.marloscoelho.com.br/conteudo.php?acao=deformidade&area=deformidade_pectuscarinatum&idoma=2)> [con acceso el 20-07-2009]
- Correa, B. y M. García-Robles. 1996. *Agnesia dentaria: Estudio familiar*. Rev Cubana Ortod 11(1). [publicación en línea] en: <[http://bvs.sld.cu/revistas/ord/vol11\\_1\\_96/ord05196.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/ord/vol11_1_96/ord05196.htm)> [con acceso el 14-07-2009]
- Corretger, J.; Seres, A.; Casaldáliga, J. y K. Trias. 2005. *Síndrome de Down*. Editorial Masson. España. 385 Pp. [libro en línea] en: <[http://books.google.es/books?id=19loysBjm1UC&pg=PA44&lpg=PA44&dq=Canal+Atrioventricular+Com%C3%BAn&source=bl&ots=SwsY7Ygzm-&sig=FVe9xCmb8IB4lIPWbEoSR08aG-Q&hl=es&ei=hWNISvG\\_LN6Ltget0NT0Dw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=8](http://books.google.es/books?id=19loysBjm1UC&pg=PA44&lpg=PA44&dq=Canal+Atrioventricular+Com%C3%BAn&source=bl&ots=SwsY7Ygzm-&sig=FVe9xCmb8IB4lIPWbEoSR08aG-Q&hl=es&ei=hWNISvG_LN6Ltget0NT0Dw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=8)> [con acceso el 20-07-2009]
- Cove Point Foundation. 2009. *Canal Atrio-Ventricular, Parcial*. [web en línea] en: <<http://www.pted.org/?id=sp/atRIOventricularpartial1>> [con acceso el 20-07-2009]
- Digilo, M.; Marino, B.; Giannotti, A.; y B. Dallapiccola. 1997. *Atrioventricular Canal Defect and Postaxial Polydactyly Indicating Phenotypic Overlap of Ellis-van Creveld and Kaufman-McKusick Syndromes*. Pediatr Cardiol, 18: 74–75
- Dimension Research, Inc (DRI). 2005. Confidence interval for proportion calculator. [Programa informático en línea] Disponible desde Internet en: <[http://www.dimensionresearch.com/resources/calculators/conf\\_prop.html](http://www.dimensionresearch.com/resources/calculators/conf_prop.html)> [Con acceso el 23-08-2010]
- den Dunnen, J. y S. Antonarakis. 2000. *Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion*. Human Mutation, 15: 7-12
- Ellis, R., y S. van Creveld. 1940. *A syndrome characterized by ectodermal dysplasia, polydactyly, chondrodysplasia and congenital morbus cordis*. Arch. Dis. Child, 15: 65.

- Estrada-Cuzcano, A.; Sandoval, J.; Guevara-Fujita, M.; y R. Fujita. 2005. *Uso de la técnica SSCP para detectar mutaciones puntuales del ADN mitocondrial humano*. Rev. peru. biol. 12(3): 349- 358
- Faella, H. 2005. *Comunicación interauricular: Porque, cuándo y cómo tratarla*. [web en línea] en: <<http://www.fac.org.ar/ccvc/lave/c114/faella.php>> [Con acceso el 09-10-2009]
- Fox, S. 2003. *Fisiología Humana*. 7ma Ed. España. McGrawHill. 750 Pp.
- Font, A. 2008. *Análisis filogeográfico de los biotipos de Bemisia tabaci en diferentes regiones de Guatemala utilizando el gen citocromo oxidasa I (COI) como marcador mitocondrial*. Tesis, Universidad del Valle de Guatemala. 83 Pp.
- Fujita, K. y J. Silver. 1994. *Single Strand Conformational Polymorphism*. Genome Research, 4 (11): S137-S140
- Galdzicka, M.; Patnala, S.; Hirshman, M.; Cai, J.; Nitowsky, H.; Egeland, J.; y E. Ginns. 2002. *A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome*. Molecular Genetics and Metabolism 77: 291–295
- García, M. 2008a. *Camptodactilia*. [web en línea] en: <[http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Camptodactilia](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Camptodactilia)> [con acceso el 20-07-2009]
- , 2008b. *Clinodactilia*. [web en línea] en: <[http://www.portalesmedicos.com/diccionario\\_medico/index.php/Camptodactilia](http://www.portalesmedicos.com/diccionario_medico/index.php/Camptodactilia)> [con acceso el 20-07-2009]
- Gardner, W. y W. Osbourn. 1971. *Anatomía Humana*. 1era ed. México. Editorial Interamericana, S.A. 403 Pp.
- Griffiths, A.; Miller, J.; Suzuki, D.; Lewontin, R. y W. Gelbart. 2002. *Genética*. 7ma. Ed. España. McGraw-Hill. 860 Pp.
- Geneviève, B. y Le Merrer, M. 2007. *Ellis-Van Creveld syndrome*. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2:27
- Grande, A. 2004. *Diseño de Oligonucleótidos para PCR*. <[http://campusvirtual.uma.es/campus/v/eviguera/ing\\_genet/\\_contenidos/clase14-04-2005/ejercicio%20oligos.doc](http://campusvirtual.uma.es/campus/v/eviguera/ing_genet/_contenidos/clase14-04-2005/ejercicio%20oligos.doc)> [Con acceso el 02-03-2009]
- Guerrero, D. 2002. *Sindactilia*. [web en línea] en: <<http://www.aeped.es/infofamilia/temas/sindactilia.htm>> [con acceso el 26-07-2009]
- Gyls, B. y M. Wedding. 2005. *Medical Terminology Systems*, F.A. Davis Company
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: *A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA*. PCR Methods App, 1: 34-38
- Henegariu, O.; Heerema, N.; Dlouhy, S.; Vance, G. y P. Vogt. 1997. *Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol*. BioTechniques, 23: 504-511
- Hengen, P. 1995. *Methods and reagents – Reamplification of PCR fragments*. Trends in Biochemical Sciences, 20 (3): 124-125.
- Hernández, M. Fecha desconocida. *Salud Bucodental*. [web en línea] en: <[http://www2.gobiernodecanarias.org/sanidad/scs/3/3\\_5/3\\_5\\_1/\\_fter\\_3/temas/epilepsia.jsp](http://www2.gobiernodecanarias.org/sanidad/scs/3/3_5/3_5_1/_fter_3/temas/epilepsia.jsp)> [con acceso el 25-07-2009]
- Hernández, S. 2009. *Detección de la presencia de mutaciones en el exón 2 del gen GJB2 que codifica la conexina 26 por medio de la técnica “PCR-SSCP”*. Tesis, Universidad del Valle de Guatemala. 75 Pp.
- Herveg, J. y M. Barcia-Macay. 2006. *Secuenciación automática del ADN*. <<http://home.scarlet.be/~tsk05520/biomolespa/secuencia/secuencia.html>> [Con acceso el 02-05-2009]
- Humphries, S.; Gudnadson, V.; Whitall, R.; e I. Day. 1997. *Single strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia*. Clinical Chemistry, 43: 427-435.
- Innis, M. y D. Gelfand. 1990. *Optimization of PCRs*. En PCR protocols: A guide to methods and applications. EEUU. Academic Press, Inc. Págs 3-12. [Libro en línea] en: <<http://a32.lehman.cuny.edu/webwurtzel/course/PCR%20PROTOCOLS%20.pdf>> [con acceso el 14-04-2010]

- Integrated DNA Technologies (IDT). 2002. *IDT SciTools Oligo Analyzer*. Versión 3.1. [Programa informático en línea] Disponible desde Internet en: <<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>> [Con acceso el 02-03-2009]
- Institute for Bioinformatics Research and Development (BIRD). 2009. *BLAST2*. Versión 2.21. [programa informático en línea] Disponible desde Internet vía URL: <<http://www-btlls.jst.go.jp/cgi-bin/Tools/BLAST/index.cgi>> en <<http://www-btlls.jst.go.jp/cgi-bin/Tools/BLAST-SNP/index.cgi?lang=en>> [con acceso el 15-01-2010]
- Kalsoom, U.; Wasif, N.; Tariq, M. y W. Ahmad. 2009. *A novel missense mutation in the EVC gene underlies Ellis-van Creveld syndrome in a Pakistan family*. *Pediatrics International*. (en prensa)
- Karolchik, D.; Kuhn, R.; Baertsch, R.; Barber, G.; Clawson, H.; Diekhans, M.; Giardine, B.; Harte, R.; Hinrichs, A.; Hsu, F.; Miller, W.; Pedersen, J.; Pohl, A.; Raney, B.; Rhead, B.; Rosenbloom, K.; Smith, K.; Stanke, M.; Thakkapallayil, A.; Trumbower, H.; Wang, T.; Zweig, A.; Haussler, D. y J. 2008. *The UCSC Genome Browser Database: 2008 update*. *Nucleic Acids Res.*, 36:D773-D779. [publicación en línea] <<http://genome.ucsc.edu>>
- Katsouras, C.; Thomadakis, C.; y L. Michalis. 2002. *Cardiac Ellis-van Creveld syndrome*. *International Journal of Cardiology*, 87: 315–316
- Kent, J. 2003. *UCSC In-Silico PCR*. [programa informático en línea] Disponible desde Internet vía FTP anónimo en: <[genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=hg18](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?db=hg18)> en: <<http://genome.ucsc.edu/>> [con acceso el 18-05-2009]. Actualizado Febrero 2009
- Kozlowski, P. y W. Krzyzosiak. 2001. *Combined SSCP/duplex analysis by capillary electrophoresis for more efficient mutation detection*. Oxford University Press, *Nucleic Acids Research* 29 (14): 1-13.
- Kurian, K.; Shanmugam, S.; Vardah, H.; y S. Gupta. 2007. *Chondroectodermal dysplasia (Ellis-van Creveld syndrome): A review of three cases with report of literature*. *Indian J Dent Res*, 18(1): 31-34
- Laboratorio de Protección Vegetal (LPV). 2009. *Técnica de polimorfismo de la comprobación de una sola banda (SSCP)*. Universidad del Valle de Guatemala.
- Langsrud, Ø. 2004. *Fisher's Exact Test*. Versión 1. [programa informático en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.langsrud.com/fisher.htm>> [con acceso el 17-02-2010]
- Liechti-Gallati, S.; Schneider, V.; Neeser, D. y R. Kraemer. 1999. *Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease*. *European Journal of Human Genetics* 7: 590–598.
- Macris, M.; Ott, D. y D. Cooley. 1992. *Complete Atrioventricular Canal Defect*. *Texas Heart Institute Journal*, 19 (3): 239 – 243
- Markoulatos, P.; Siafakas, N. y M. Moncany. 2002. *Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16: 47-51.
- McDonald, J. 2009. *Handbook of Biological Statistics*. 2da Ed. Baltimore, Maryland. Sparky House Publishing. 319 Pp.
- Michaud, J.; Brody, L.; Steel, G.; Fontaine, G.; Martini, L.; Valle, D. y G. Mitchell. 1992. *Strand-Separating Conformational Polymorphism Analysis: Efficacy of Detection of Point Mutations in the Human Ornithine  $\delta$ -Aminotransferase Gene*. *Genomics*, 13: 389-394
- Mondofacto. 2008. *Hypoplasia*. [web en línea] en: <<http://www.mondofacto.com/facts/dictionary?hypoplasia>> [con acceso el 25-07-2009]
- Morsy, A.; Tsuchiya, H.; Matsubara, H.; Kabata, T.; y K. Tomita. 2007. *Ilizarov deformity correction of the lower limbs in Ellis-van Creveld syndrome*. *Journal of Orthopaedic Science*, 12:505–509

- Musso, M.; Bocciardi, R.; Parodi, S.; Ravazzolo, R.; e I. Ceccherini. 2006. *Betaine, Dimethyl Sulfoxide, and 7-Deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences*. Journal of Molecular Diagnostics, 8 (5): 544-550
- Myers, D. 2006. *Dysplasia*. [web en línea] en: <<http://coloncancer.about.com/od/glossaries/g/Dysplasia.htm>> [con acceso el 25-07-2009]
- Nuñez-Samper, M. y LF Llanos. 2007. Biomecánica, medicina y cirugía del pie. 2da. Ed. Masson. Pág. 161. <[http://books.google.com.gt/books?id=DQ22QAtba3YC&pg=PA161&lpg=PA161&dq=polidactilia+postaxial+tipo+A&source=bl&ots=VvR61gptmM&sig=hR3mw3y0S4rARP53ebh3wRJoK9I&hl=es&ei=Uj5Sc6PO8yrtgfqu8ywAw&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=5](http://books.google.com.gt/books?id=DQ22QAtba3YC&pg=PA161&lpg=PA161&dq=polidactilia+postaxial+tipo+A&source=bl&ots=VvR61gptmM&sig=hR3mw3y0S4rARP53ebh3wRJoK9I&hl=es&ei=Uj5Sc6PO8yrtgfqu8ywAw&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5)> [Con acceso el 28-04-2009]
- Ökten, A.; Çakir, M.; Orhan, F.; y I. Mungan. 2004. *Atypical crossed polydactyly in two siblings with Ellis-van Creveld Syndrome and mild clinical manifestations in close relatives*. Pediatrics International, 46: 184–187
- Oliva, R.; Ballesta, F.; Oriola, J. y J. Clària. 2004. *Genética Médica*. 3era. Ed. España. 71 UB. 345 Pp.
- Oppel, T. y H. C. Korting. 2003. *Onychodystrophy and its management*. German Medical Science 1: 1-7. [publicación en línea] en: <<http://www.egms.de/en/gms/2003-1/000002.shtml>> [con acceso el 25-07-2009]
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazana, H.; Havashi, K.; y T. Sekiya. 1989. *Detection of polymorphisms of human DNA by electrophoresis as singlestrand conformation polymorphisms*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2766-2770.
- Paez, M. Julio 2009. *Laboratorio de Genética de Hospital Roosevelt*. UNICAR. Hospital Roosevelt, Guatemala, C.A. Correo electrónico: drmaco@gmail.com. Tel.: (502) 57029247
- Parekh-Olmed, H. y E. Kmiec. 2007. *Progress and Prospects: targeted gene alteration (TGA)*. Gene Therapy, 14: 1675-1680.
- Pesqueira, T. Fecha desconocida. *Malformaciones craneofaciales congénitas y del desarrollo*. [web en línea] en: <<http://escuela.med.puc.cl/publ/manualcabezacuello/malformaciones.html>> [con acceso el 25-07-2009]
- Piacentini, G.; Digilio, M.C.; Sarkozy, A.; Placidi, S.; Dallapiccola, B.; y B. Marino. 2007. *Genetics of congenital heart diseases in syndromic and non-syndromic patients: new advances and clinical implications*. Journal of Cardiovascular Medicine, 8 (1): 7-11
- Polymeropoulos, M.; Ide, S.; Wright, M.; Goodship, J.; Weissenbach, J.; Pyeritz, R.; Da Silva, E.; Ortiz, R.; y C. Francomano. 1996. *The Gene for the Ellis-van Creveld Syndrome Is Located on Chromosome 4p16*. Genomics, 35 (0315): 1–5
- Pombo, M. 1997. *Tratado de Endocrinología Pediátrica*. 2da. Ed. 1440 pp. [libro en línea] en: <[http://books.google.es/books?id=kIru7hXwZxIC&pg=PA336&lpg=PA336&dq=hueso+tubular&source=bl&ots=HwTCq3orSY&sig=ETi28svdQFaWgnT2j4gFT3DIN6w&hl=es&ei=LYhrSp-TF8-GmQfHx\\_HkBQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=5](http://books.google.es/books?id=kIru7hXwZxIC&pg=PA336&lpg=PA336&dq=hueso+tubular&source=bl&ots=HwTCq3orSY&sig=ETi28svdQFaWgnT2j4gFT3DIN6w&hl=es&ei=LYhrSp-TF8-GmQfHx_HkBQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=5)> [con acceso el 25-07-2009]
- Poirier, J.; Ribadeau, J.; Catala, M.; André, J.; Gherardi, R. y J. Bernaudin. 2002. *Histología*. 1era. Ed. Masson. España. 199 Pp.
- Pruitt, K.; Tatusova, T.; y D. Maglott. 2007. *NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins*. Nucleic Acids Research, 35 (Database issue): D61-D65. [publicación en línea] <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxyhost.library.tmc.edu/pmc/articles/PMC1716718/?tool=pubmed>>
- Quiroz, F. 1972. *Anatomía Humana*. Tomo II. 10ma ed. México. Editorial Porrúa México. 525 Pp.
- Ramírez, S.; García, E. y J. Marco. Fecha Desconocida. *Frenillo Lingual*. Protocolos Clínicos de la Sociedad Española de Cirugía Oral y Maxilofacial. Pp. 39-47 [web en línea] en: <<http://archivos.secom.org/archivo/pdf/capitulo2.pdf>> [con acceso el 25-07-2009]

- Richardson, V y O. Mutchinick. 1982. *Características clínicas, radiológicas y genéticas de ciertos tipos de enanismo de miembros cortos en el recién nacido*. Bol. méd. Hosp. Infant. Méx 39(2): 105-II.
- Rihani, F. 2007. *Ellis-van Creveld and Weyers acrofacial dysostosis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 104(6): 731
- Rodríguez, G. y M. Santiago. 2006. *Secuenciación automática de ADN*. <<http://www.iib.uam.es/servicios/seq/otros/SecuenciaADN/SecuencaciaADN.html>> [Con acceso el 02-05-2009]
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. [programa informático en línea] Disponible desde Internet vía FTP anónimo en: <[ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)> en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>> [con acceso el 18-05-2009] Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa: 365-386
- Ruiz-Perez, V.; Blair, H.; Rodriguez, E.; Blanco, M.; Wilson, A.; Liu, Y.; Miles, C.; Peters, H.; y J. Goodship. 2007. *Evc is a positive mediator of Ihh-regulated bone growth that localises at the base of chondrocyte cilia*. Development, 134(16): 2903-2912
- ; Ide, S.; Strom, T.; Lorenz, B.; Wilson, D.; Woods, K.; King, L.; Francomano, C.; Freisinger, P.; Spranger, S.; Marino, B.; Dallapiccola, B.; Wright, M.; Meitinger, T.; Polymeropoulos, M.; y J. Goodship. 2000. *Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodental dysostosis*. Nature Genetics, 24: 283-286
- ; Tompson, S.; Blair, H.; Espinoza-Valdez, C.; Lapunzina, P.; Silva, E.; Hamel, B.; Gibbs, J.; Young, I.; Wright, M.; y J. Goodship. 2003. *Mutations in Two Nonhomologous Genes in a Head-to-Head Configuration Cause Ellis-van Creveld Syndrome*. Am. J. Hum. Genetics. 72: 728-732
- y J. Goodship. 2009. *Ellis-van Creveld Syndrome and Weyers Acrodental Dysostosis are caused by cilia-mediated diminished response to Hedgehog ligands*. Am J Med Genet Part C Semin Med Genet, 151C: 341-351.
- Rybicki, E. 2001. *PCR primer design and reaction optimization*. 3era. Ed. Molecular Biology Techniques Manual. 10 Pp.
- Sajeev, C.; Roy, T. y K. Venugopal. 2002. *Common atrium in a child with Ellis-Van Creveld syndrome*. Heart 88:142.
- Sharma, O.; Saraf, R.; y B. Gupta. 2006. *Ellis-van Creveld's syndrome (a Case Report)*. Ind J Radiol Imag, 16(3): 325-327
- Sheffield, V.; Beck, J.; Kwitek, A.; Sandstrom, D.; y E. Stone. 1993. *The sensitivity of single strand conformation polymorphism analysis for detection of single base base substitutions*. Genomics, 16: 325-332.
- Shilpy, S.; Nikhil, M.; y D. Samir. 2007. *Ellis Van Creveld syndrome*. Journal Indian Soc Pedod Prevent Dent, 25 Suppl: S5-7.
- Silva G.; Dardón, E. y M. García. 2008. *Proyecto FODECYT 109-2006: Detección de deleciones exonales asociadas a las distrofias musculares de Duchenne y de Becker en Guatemala, mediante la reacción en cadena de la polimerasa en múltiplex*. En preparación.
- Silva, C.; D. Fonseca; C. Restrepo; N. Contreras; H. Mateus. 2004. *Deleciones en el gen de la distrofina en 62 familias colombianas: correlación genotipo-fenotipo para la distrofia muscular de Duchenne y Becker*. Colombia Médica (35): 191-198.
- Sistema de Información sobre Enfermedades Raras en Español (SIERE). Fecha Desconocida. *Mesomélico*. [web en línea] en: <[http://iier.isciii.es/er/prg/er\\_dic2.asp?cod\\_dic=535](http://iier.isciii.es/er/prg/er_dic2.asp?cod_dic=535)> [con acceso el 25-07-2009]
- Slavkin HC. 2009. *What the future holds for ectodermal dysplasias: Future research and treatment directions*. Am J Med Genet Part A, 149A: 2071–2074.

- Sund, K.; Roelker, S.; Ramachandran, V.; Durbin, L. y D. Benson. 2009. *Analysis of Ellis van Creveld syndrome gene products: implications for cardiovascular development and disease*. Human Molecular Genetics, 18 (10): 1813-1824.
- Robbins, F.; Cotran, R. y V. Kumar. 1996. *Patología Estructural y Funcional*. Tomo II. El Corazón. 5ta. ed. España. McGraw-Hill.991pp.
- Temtam, S.; Aglan, M.; Valencia, M.; Cocchi, G.M Pacheco, M.; Ashour, A.; Amr, K.; Helmy, S.; El-Gammal, M.; Wright, M.; Lapunzina P.; Goodship, J.; y V. Ruiz-Perez. 2008. *Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE1)-Mediated Deletion of EVC, EVC2, C4orf6, and STK32B in Ellis-van Creveld Syndrome With Borderline Intelligence*. Human Mutation, 29(7): 931-938
- Thapa, R.; Mukhopadhyay, M.; y A. Bhattacharya. 2008. *Discordance for Ellis-van Creveld syndrome in twins*. Singapore Med J. 49 (12): e369-e371
- The International HapMap Consortium. 2007. *A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs*. Nature, 449: 851-861
- The National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2006. *SNP linked to gene EVC(GeneID:2121) Via Contig Annotation*. [web en línea] en: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=2121&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=2121&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN)> [con acceso el 15-01-2010]
- 2006. *SNP linked to Gene EVC2(geneID:132884) Via Contig Annotation*. [web en línea] en: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=132884&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene\\_ResultsPanel.Gene\\_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=132884&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Gene.Gene_ResultsPanel.Gene_RVFullReport.GeneRightColMenuLinksP&ordinalpos=NaN)> [con acceso el 15-01-2010]
- 1997. *Blast SNP Sequence*. [programa informático en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snpblastByChr.html>> en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>> [con acceso el 25-01-2010]
- McGinnis, S. y T. Madden. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. Nucleic Acids Res, 32: W20–W25. [publicación en línea] en: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC441573/?tool=pubmed>>
- Tompson, S.; Ruiz-Perez, V.; Blair, H.; Barton, S.; Navarro, V.; Robson, J.; Wright, M.; y J. Goodship. 2007. *Sequencing EVC and EVC2 identifies mutations in two-thirds of Ellis-van Creveld syndrome patients*. Human Genetics, 120: 663-670.
- TotalLab. 2009. *Phoretix ID*. Versión 10.2. [programa informático en línea]. Disponible desde Internet en: <<http://www.totallab.com/download/software/>> [con acceso el 30-04-2010]
- Ulucan, H.; Gül, D.; Sapp, J.; Cockerham, J.; Johnston, J.; y L. Biesecker. 2008. *Extending the spectrum of Ellis van Creveld syndrome: a large family with a mild mutation in the EVC gene*. BMC Medical Genetics, 9:92
- UCDavis. Fecha Desconocida. *PCR Reamplification for Inadequate or Failed Amplifications*. [web en línea] en: <[http://genome-lab.ucdavis.edu/Protocols/pcr\\_tips/pcr\\_reamplification.htm](http://genome-lab.ucdavis.edu/Protocols/pcr_tips/pcr_reamplification.htm)> [con acceso el 16-01-2010]
- University of Minnesota. 2005. *Consent process & forms*. [web en línea] en: <<http://cflegacy.research.umn.edu/irb/consent/>> [con acceso el 01-09-2009]
- Versteegh, F.; Buma, S.; Costin, G.; de Jong, W.; Hennekam, R.; y EvC Working Party. 2007. *Growth Hormone Analysis and Treatment in Ellis-van Creveld Syndrome*. American Journal of Medical Genetics, Part A 143A: 2113–2121
- Villalobos, G. 2000. *Orquiectomía de perros criptorquídeos por cirugía laparoscópica, usando dos puertos de acceso*. Rev AMMVEPE 11(4): 117-120.

- Waleed, A. y P. Radstrom. 2000. *Effects of amplification facilitators on diagnostic PCR in the presence of blood, feces and meat*. Journal of clinical microbiology, 38 (12): 4463-4470
- Williams, J.; Kubelik, A.; Livak, K.; Rafalski, J. y S. Tingey. 1990. *DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucl. Acids Res., 18: 6531-6535
- Wolff, K.; Schoen, E. y P. Rijn. 1993. *Optimizing the generation of random amplified polymorphic DNAs in chrysanthemum*. Theor. Appl. Genet., 86: 1033-1037
- Wolfgang, H.; Herdel, K.; Jung, K.; Schnorr, D. y S. Loening. 1997. *Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences*. Nucleic Acids Research, 25 (19): 3957-3958.
- Ye, X.; Song, G.; Fan, M.; Shi, L.; Wang, E.; Huang, S.; Guo, R.; y Z. Bian. 2006. *A novel heterozygous deletion in the EVC2 gene causes Weyers acrofacial Dysostosis*. Human Genetics, 119: 199–205

## VI. Apéndices

### A. APÉNDICE 1: Certificado de terminación del curso de entrenamiento en “Protegiendo los Participantes de Investigación Humana”



## B. APÉNDICE 2: Consentimientos informados

### i ) Consentimiento informado para pacientes de estudio

#### CONSENTIMIENTO

#### Caracterización genético molecular del Síndrome de Ellis van Creveld asociado a canal atrioventricular

El síndrome de Ellis-van Creveld (EvC) es una enfermedad causada por mutaciones en el ADN. Afecta desde el nacimiento el crecimiento de los huesos y piel que muchas veces se manifiesta en las personas más de 5 dedos en las manos, brazos y piernas más cortas, dientes y uñas con crecimiento anormal, baja estatura, y en un 50 a 60% de los casos con problemas del corazón. Pacientes de pequeña edad que presentan problemas de corazón, mueren en un 50% de los casos. Es una enfermedad rara que se presenta en un aproximado de 1 de cada 60,000 nacidos vivos. Si la enfermedad es detectada y tratada con tiempo, se pueden realizar correcciones quirúrgicas que disminuyen la mortalidad de la enfermedad.

Este es un estudio de detección de mutaciones implicados en el síndrome de Ellis-van Creveld. Usted fue invitado porque:

- Presenta síntomas de la enfermedad Sí \_\_\_ No \_\_\_
- Usted es familiar (padre/madre/tío/hermano/hermana/otro) de una persona que presenta síntomas de la enfermedad y es representante legal de la persona. Sí \_\_\_ No \_\_\_

En caso de ser familiar, indicar si

- Se le sacará una muestra para el estudio Sí \_\_\_ No \_\_\_
- Actúa como representante legal del paciente Sí \_\_\_ No \_\_\_

Es importante que usted lea con cuidado la siguiente información, tome su tiempo y le pedimos que por favor discuta cualquier duda al respecto antes de estar de acuerdo en la participación suya o su familiar en el estudio.

Este estudio es conducido por Dr. Marco Paez, médico cardiólogo-genetista, de la Unidad de Cirugía y Cardiología de Guatemala (UNICAR). Este estudio está financiado por la misma entidad.

#### Propósito del estudio

El propósito del estudio es la detección de mutaciones en el ADN causantes del desarrollo del síndrome de EvC. Queremos encontrar la razón de porqué se da la enfermedad.

#### Procedimientos del estudio

Si está de acuerdo en la participación suya o su familiar en el estudio, se le llamará para que se reúna con el Dr. Paez y le saque más o menos 1 cucharadita de sangre de su brazo con una aguja pequeña y se guarde la sangre en un tubo.

#### Potenciales riesgos e incomodidades

Es posible que usted o su familiar sentirá un pequeño dolor al momento de pinchar la aguja y después de ella. También es posible que se forme un morete causado por el pinchazo de la aguja. Este dolor es pequeño (es posible que hasta se le olvide) y se quitará después de unos días.

Después del estudio, puede que sienta frustración, enojo o decepción tanto usted si es familiar o si es paciente, si no se encuentra que enfermedad tiene el paciente.

### Potenciales beneficios en la participación del estudio

- El participante podrá saber con seguridad si tiene o no EvC.
- Se podrá darle una mejor orientación en su tratamiento o el de su familiar
- Ofrecerle consejo genético a usted y a su familia

### Costos del estudio/compensación

Participar en este estudio es **gratis**, no se le pagará y tampoco se le pedirá dinero a usted.

### Confidencialidad

Su nombre y datos personales serán archivados en un folder que tendrán acceso únicamente el Dr. Paez, el director del instituto y el investigador en el área de laboratorio. La muestra se trabajará por medio de códigos que únicamente indicará el número de paciente, y no se podrá hacer ninguna asociación directa con su persona. Solamente el Dr. Paez, el director del instituto y el investigador en el área de laboratorio podrán asociar el código con su persona.

Los resultados serán manejados de forma confidencial y con total anonimato, y le serán entregados a usted, si fuera el paciente o el representante legal. Estos serán guardados en un folder diferente con únicamente el código.

Le pedimos autorización para:

- En caso de sobrar sangre, le pedimos de autorización para guardarla en el congelador a -20°C para futuras comparaciones con otras personas que participen en el estudio, esta será guardada únicamente con el código indicando si es familiar o paciente.

Sí\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

\* Si la respuesta fue NO, la sangre que sobre se tirará y no se guardará.

- En caso de cualquier publicación o presentación, se pueda incluir el diagnóstico clínico y algunas fotos que muestren el desarrollo de la enfermedad de su familiar o el suyo (dientes, dedos de mano y/o pie, torax, brazos y piernas), sin incluir ninguna información que haga posible su identificación como sujeto de estudio.

Sí\_\_\_\_\_ No\_\_\_\_\_

\* Si la respuesta fue NO, no publicaremos ningún diagnóstico clínico ni fotos.

### Naturaleza voluntaria del estudio

La participación suya o de su familiar en el estudio es voluntaria, esta decisión de participación no influirá en sus relaciones actuales o futuras con la Unidad de Cirugía y Cardiología de Guatemala (UNICAR). Si decide participar usted o su familiar, es libre de retirarse en cualquier momento sin afectar dichas relaciones.

### Dudas y contactos

El investigador principal del estudio es el Dr. Marco Paez, el supervisor es el Lic. Andrés Ávalos, y la investigadora en la parte de laboratorio es Wendy Jó. Cualquier duda presentada, siéntase libre de acercarse a nosotros contactándonos al 2472-4053 ext. 279

Se le dará una copia de este formulario para su información.

## Declaración de consentimiento

He leído toda la información anterior, ya me han resuelto todas las dudas presentadas.

Yo (subrayar):

- Paciente: Estoy de acuerdo en mi participación en este estudio
- Representante legal: Consiento la participación de mi familiar en este estudio y el/ella también está de acuerdo.

### *Participante*

Nombre completo \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

### *Representante*

Nombre completo \_\_\_\_\_

Relación con paciente \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

### *Investigador*

Nombre completo \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

**Este estudio no tiene ningún costo para usted**

## ii ) Consentimiento informado para controles negativos

### CONSENTIMIENTO

#### Estudios de carácter genético de enfermedades genéticas, hereditarias y/o congénitas en la Unidad de Cirugía y Cardiología de Guatemala (UNICAR) y el Instituto de Enfermedades Genéticas y Enfermedades Metabólicas (INVEGEM)

El laboratorio de genética en Guatemala de INVEGEM estudia la caracterización de:

- Enfermedades genéticas: caracterizada por un daño en la información heredada de los padres.
- Enfermedades hereditarias: Transmitida de padre a hijo desde la concepción, y pueden no observarse en el momento de nacimiento.
- Enfermedades congénitas: Una enfermedad con la cual se lleva desde el nacimiento, y generalmente provocan incapacidad física (corporal) y/o mental.

UNICAR es la unidad nacional que brinda servicios de cardiología no invasiva e intervencionista, así como quirúrgicos, apoyada por la Fundación Aldo Castañeda.

Usted fue invitado porque para realizar los estudios de enfermedades genéticas, congénitas y/o hereditarias, es necesario compararlas con una persona que sea considerado(a) saludable en relación a la enfermedad estudiada.

Es importante que usted lea con cuidado la siguiente información, tome su tiempo y le pedimos que por favor discuta cualquier duda al respecto antes de estar de acuerdo en participar como control negativo.

#### Propósito de los estudios

Caracterización de las enfermedades genéticas, hereditarias y/o congénitas presentes en Guatemala.

#### Procedimientos del estudio

Si está de acuerdo en participar como control negativo de las diferentes caracterizaciones de enfermedades genéticas, hereditarias y/o congénitas realizadas en INVEGEM y/o UNICAR, se le llamará para que se reúna con una persona calificada y le saque más o menos 1 cucharadita de sangre de su brazo con una aguja pequeña y se guarde la sangre en un tubo.

#### Potenciales riesgos e incomodidades

Es posible que usted sienta un pequeño dolor al momento de pinchar la aguja y después de ella. También es posible que se forme un morete causado por el pinchazo de la aguja. Este dolor es pequeño (es posible que hasta se le olvide) y se quitará después de unos días.

#### Potenciales beneficios en la participación del estudio

No habrá ningún beneficio personal de su participación en el estudio. Pero su participación contribuirá al avance de la ciencia en el área de genética médica en Guatemala.

Note que en caso de que usted presente alguna enfermedad genética, se le contactará por parte del director médico del laboratorio.

#### Costos del estudio/compensación

Participar en este estudio es **gratis**, no se le pagará y tampoco se le pedirá dinero a usted.

**Confidencialidad**

La muestra donada por usted se guardará en un congelador a -20°C hasta su posterior uso únicamente identificado con un código, el cual únicamente el director médico del laboratorio tendrá acceso a su identificación.

Se asegura que las muestras únicamente sean utilizadas para estudios de carácter genético, hereditarios y/o congénitos. No se involucrarán en estudios de enfermedades de transmisión sexual.

**Naturaleza voluntaria del estudio**

Su participación como control negativo es voluntaria, esta decisión de participación no influirá en sus relaciones actuales o futuras con UNICAR y/o INVEGEM. Si decide participar, es libre de retirarse antes del momento de la toma de la muestra únicamente, después de sacada y guardada su muestra, no se podrá retirar la muestra debido a que no existe ningún tipo de ligamiento de su persona con el código de la muestra.

**Dudas y contactos**

El director de INVEGEM es el Dr. Silva y el director del laboratorio es el Lic. Andrés Ávalos. Cualquier duda presentada, siéntase libre de acercarse a nosotros contactándonos al 2472-4053 ext. 279

**Declaración de consentimiento**

He leído toda la información anterior, ya me han resuelto todas las dudas presentadas. Yo estoy de acuerdo en mi participación como control negativo en los estudios realizados en UNICAR y/o INVEGEM.

***Participante***

Nombre completo \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

Teléfono \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

**Este estudio no tiene ningún costo para usted**

-----  
Llenado únicamente por el personal de INVEGEM y/o UNICAR

Código \_\_\_\_\_

***Director Médico del Laboratorio***

Nombre completo \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

### C. APÉNDICE 3: Protocolo de extracción de ADN con kit comercial Wizard Genomic DNA purification kit.

1. Adicionar a un tubo 900µL de solución Lisis de Célula a un tubo estéril de microcentrifuga de 1.5 mL.
2. Mezclar suavemente por inversión tubo con la muestra de sangre y adicionar 300 µL al tubo conteniendo la solución de lisis de célula. Mezclar por inversión de nuevo 5-6 veces.
3. Incubar mezcla en temperatura ambiente durante 10 minutos para lisar eritrocitos.
4. Centrifugar a 13,000rpm durante 20 segundos a temperatura ambiente.
5. Descartar sobrenadante, teniendo cuidado de no tocar el pellet. Aproximadamente 10-20 µL de líquido residual se mantendrá en el tubo. (Si la muestra de sangre ha sido congelada, repetir pasos 1-4 hasta que el pellet sea de color blanco)
6. Vortexear vigorosamente el tubo para resuspender las células.
7. Adicionar 300 µL de solución Lisis del Núcleo al tubo conteniendo células resuspendidas. Pipetear solución 5-6 veces para lisar linfocitos. La solución debería tornarse viscosa. (Si se observan grumos en la solución, incubarlo a 37°C hasta disolverse, si luego de 1 hora aún no se ha disuelto, adicionar 100 µL de solución Lisis del Núcleo, y repetir incubación)
8. Adicionar 100 µL de solución Precipitación de Proteína al lisado nuclear y vortexearlo vigorosamente por 10-20 segundos. (Si en paso 7 se adicionó más solución de lisis de núcleo, agregar 130 µL en vez de los 100 µL)
9. Centrifugar a 13,000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se tiene que observar un pellet café oscuro. Transferir sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga de 1.5 mL conteniendo 300 µL de isopropanol a temperatura ambiente.
10. Mezclar suavemente por inversión la solución hasta que las hebras como de hilo blancas de ADN formen una masa visible.
11. Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
12. Decantar el sobrenadante y adicionar un volumen de muestra de etanol al 70% a temperatura ambiente. Mezclar suavemente por inversión varias veces para lavar el pellet de ADN, y repetir paso 11.
13. Aspirar con cuidado el etanol teniendo cuidado de no tocar el pellet, e invertir el tubo y colocarlo en un papel adsorbente para dejar secar el tubo al aire durante 10-15 minutos.
14. Adicionar 100 µL solución de Rehidratación de ADN al tubo, e incubarlo a 65°C por una hora para la rehidratación. Como alternativa se puede incubar solución durante toda la noche a temperatura ambiente o a 4°C.
15. Almacenar ADN a 4°C.

## D. APÉNDICE 4: Protocolo de PCR

1. Preparar área de trabajo limpiando con cloro al 5%, y luego con etanol al 70%.
2. Se realizarán 4 PCR, divididos en 4 grupos (I-IV).

**Cuadro 1.** Grupos de PCR

Grupos	Subgrupo	Exones
I	A	6 <sub>1</sub> 7 <sub>1</sub> , 13 <sub>1</sub> 14 <sub>1</sub> 17 <sub>2</sub> 22a <sub>2</sub>
	B	8 <sub>1</sub> 12 <sub>1</sub> 1 <sub>2</sub> 6 <sub>2</sub>
II	A	4 <sub>1</sub>
	B	1a <sub>2</sub> 8 <sub>2</sub> 9 <sub>2</sub> 10 <sub>2</sub> 12 <sub>2</sub> 18 <sub>2</sub>
III	A	18 <sub>1</sub> 11 <sub>2</sub> 13 <sub>2</sub> 14 <sub>2</sub> 16 <sub>2</sub> 22b <sub>2</sub>
IV	A	10 <sub>1</sub> 15 <sub>1</sub> 1b <sub>2</sub> 2 <sub>2</sub> 7 <sub>2</sub>
	B	17 <sub>1</sub>

<sub>1</sub> exones pertenecientes al gen *EVC*  
<sub>2</sub> exones pertenecientes al gen *EVC2*

3. Se preparan las recetas para cada grupo y se utiliza para cada uno de ellos su respectivo programa de PCR a su respectiva Temperatura de anillamiento (Ta) (Cuadros 4 y 5).

**Recetas de PCR****Cuadro 2.** Concentración final de cada reactivo en la mezcla de PCR para cada receta

Reactivos	Grupo I		Grupo II		Grupo III	Grupo IV	
	A	B	A	B	A	A	B
H <sub>2</sub> O	---	---	---	---	---	---	---
Buffer	1X	1X	1X	1X	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	3mM	2mM	2mM	2.5mM	2mM	2mM	2.5mM
dNTPs	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM	0.2mM
BSA 1%	---	0.08%	---	---	---	---	---
DMSO	---	5%	---	---	---	---	---
Primer F y R	0.2μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM	0.2μM
Taq	1 U	1 U	1 U	1 U	1 U	1 U	1 U
ADN	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng

**Programa de PCR:** La PCR se realizó en un termociclador de gradiente:

**Cuadro 3.** Programa de PCR

	Paso	Temperatura	Tiempo
	1era. Desnaturalización	94°C	6 min
35 ciclos	Desnaturalización	94°C	30 s
	Anillamiento	*	30 s
	Extensión	72°C	3 min
	Extensión Final	72°C	5 min

\* Temperatura de anillamiento varía según el grupo

- a. Grupo A: EVCA, Ta 57.5 ± 5°C
- b. Grupo B: EVCB, Ta 56 ± 3°C
- c. Grupo C: EVCC, Ta 58.5 ± 1.5°C
- d. Grupo D: EVCD, Ta 65 ± 3.5°C

## La Ta de los distintos exones

*Cuadro 4.* Gen EVC

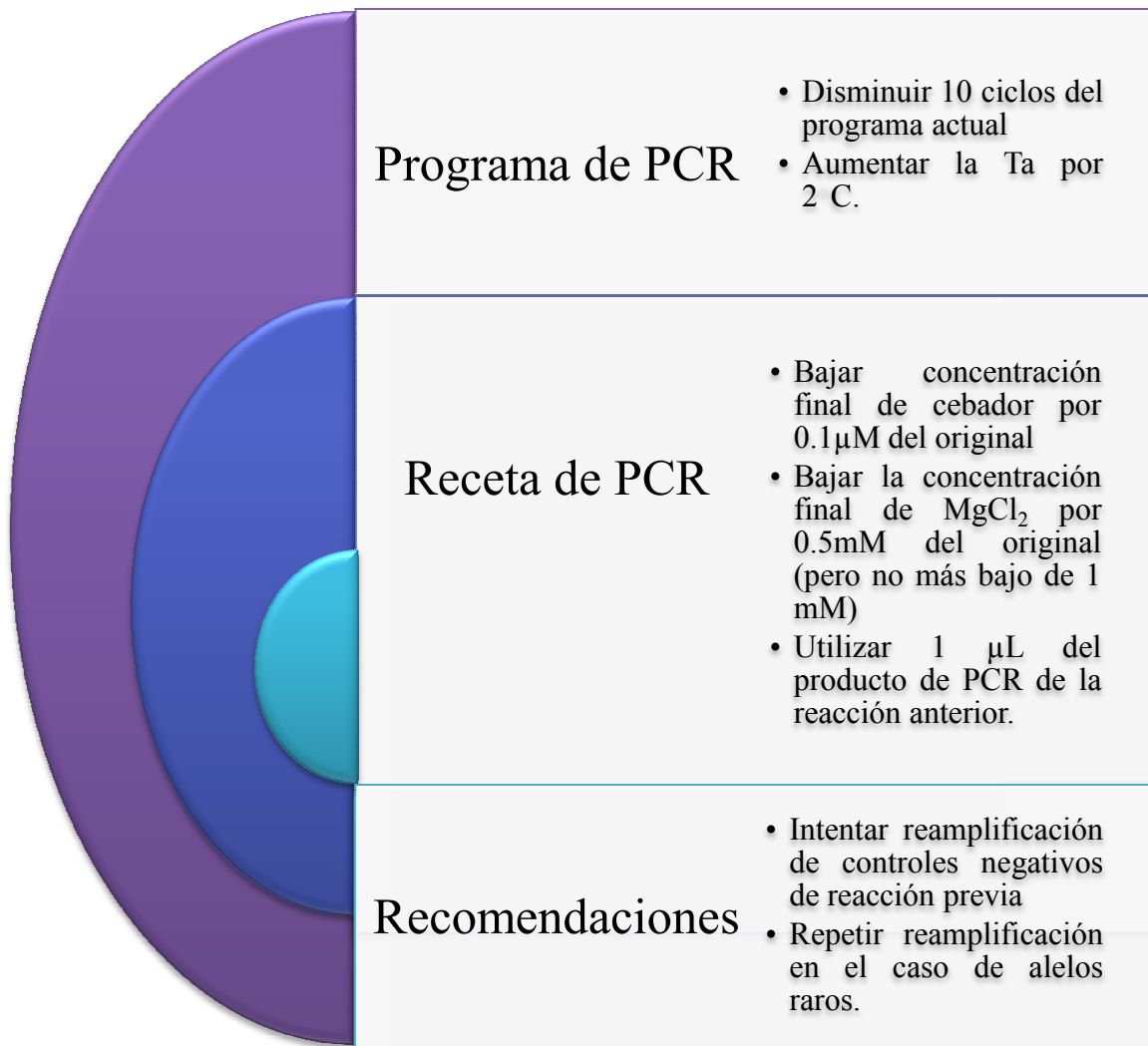
<b>Exón</b>	<b>Ta °C</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
4	54	315
6	57	322
7	59.1	430
8	55	257
10	68	247
12	57	423
13	59.1	224
14	60.3	377
15	65.4	531
17	65.4	269
18	57.8	362

*Cuadro 5.* Gen EVC2

<b>Exón</b>	<b>Ta °C</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
1 <sub>1</sub> *	57.8	413
1 <sub>2</sub> a+	57.6	439
1 <sub>2</sub> b+	62	578
2	63.5	215
6	57	511
7	62	332
8	55.4	394
9	54	319
10	59	562
11	58.2	383
12	57.1	584
13	58.2	428
14	60.3	605
16	57	357
17	60	454
18	55.4	365
22a	60	663
22b	57	630

## E. APÉNDICE 5: Protocolo de reamplificación de PCR (UCDavis)

Cambiar el protocolo de PCR seguido hasta el momento de la siguiente manera:



## F. APÉNDICE 6: Protocolo para elaboración de la técnica de Polimorfismo de la comprobación de una sola banda (SSCP)

### Reactivos

- TBE 5X (1.1M Tris, 0.9M Ácido Bórico, 25mM EDTA, pH8.3)
- TEMED 100%
- APS 25%
- Poliacrilamida 38%
- Glicerol
- Buffer de montaje Desnaturalizante (formamida 4.5%, 0.025% azul de bromofenol, 0.025% xilen cianol, 10mM NaOH)
- Escalera
- Ácido Acético 10% v/v
- Nitrato de Plata
- Formaldehído
- Carbonato de Sodio
- Tiosulfato de Sodio 500mg/mL

### i) Técnica de polimorfismo de la comprobación de una sola banda (SSCP)

1. Se lavan las placas de vidrio y espaciadores con agua y jabón. Pasar agua destilada.
2. Limpiar con isopropanol al 100% y dejar secar por 10 minutos.
3. Armar el sistema de polimerización juntando las respectivas placas de vidrio con sus espaciadores. Sellar bien las esquinas para no permitir escapar líquidos.
4. Preparar la mezcla de reactivos según Cuadro 1 para realizar la solución de poliacrilamida al 11 % en dos condiciones, con 10% de glicerol y sin glicerol.

**Cuadro 1.** Preparación de solución de poliacrilamida al 11 % con glicerol 10%

Reactivo	Volumen	Volumen
Agua destilada	7.03 ml	5.91 mL
TBE 5X	1.20 ml	1.20 ml
Poliacrilamida 38%	3.15 ml	3.15 ml
Glicerol	---	1.14 mL
TEMED	16.0 $\mu$ l	16.0 $\mu$ l
APS 25%	16.0 $\mu$ l	16.0 $\mu$ l
<b>Volumen total</b>	<b>11.412 ml</b>	<b>11.412 ml</b>

\* Primero mezclar bien, tratando de no agregar burbujas, la solución de agua destilada, TBE 5X, Glicerol y Poliacrilamida al 38%. Degasificar por 20 minutos. Agregue de último el TEMED y APS 25% ya que estos son los agentes que polimerizan la solución. El volumen total puede utilizarse para preparar un total de dos geles aproximadamente.

5. Verter solución de poliacrilamida al 11% dentro de placas de vidrio inmediatamente después de agregar TEMED y APS 25%.
6. Colocar respectivos peines y esperar 20 minutos a que polimerice el gel.
7. Preparar muestra en tubos de 0.2mL: 2.5  $\mu$ L de producto de PCR más 5  $\mu$ L de buffer de montaje desnaturalizante.
8. Calentar muestras a 95°C por 5 minutos.
9. Armar sistema de electroforesis con las placas y geles sumergidos en buffer TBE 1X frío.
10. Cargar 5 $\mu$ L de marcador de peso y 5  $\mu$ L de muestra en respectivos pozos dentro del gel de poliacrilamida.
11. Cerrar sistema de electroforesis y colocarlo en baño de hielo.
12. Conectar sistema de electroforesis a fuente de poder.
13. Condiciones de corrida varían según grupo analizado (Cuadro 2)
  - Grupos 1 y 2, se corren a 30mAmp constantes los geles con glicerol al 10%, y 35mAmp constantes los geles sin glicerol. Siempre con máxima potencia de 500V por 5 horas.
  - Grupos 3, 4 y 5 se corren a 30mAmp constantes los geles con glicerol al 10%, y 35mAmp constantes los geles sin glicerol. Siempre con máxima potencia de 500V por 7 horas.

NOTA: es importante verificar que el sistema se mantenga en frío durante toda la corrida.

**Cuadro 2.** Exones pertenecientes a los grupos 1-5, con sus respectivos tamaños en pb

<b>Grupo</b>	<b>Gen</b>	<b>Exón</b>	<b>Tamaño pb</b>
1	<i>EVC</i>	8	257
		10	247
		13	224
		17	269
	<i>EVC2</i>	2	215
2	<i>EVC</i>	4	315
		6	322
		14	377
		18	362
	<i>EVC2</i>	7	332
		9	319
		16	357
		18	365
3	<i>EVC</i>	7	430
		12	423
	<i>EVC2</i>	1 <sub>1</sub>	413
		1 <sub>2a</sub>	439
		8	394
		11	383
		13	428
17	454		
4	<i>EVC</i>	15	531
		1 <sub>2b</sub>	578
	<i>EVC2</i>	6	511
		10	562
5	<i>EVC2</i>	12	584
		14	605
		22a	663
		22b	630

### ii ) Protocolo para revelación de polimorfismo por tinción de plata

1. Incubar los geles de poliacrilamida en 100 ml de ácido acético al 10% por 30 minutos en constante agitación. Guarde la solución.
2. Lavar cuatro veces los geles con 150 ml de agua destilada desmineralizada, agitando y cambiando el agua cada 2 minutos de lavado.
3. Incubar agitando por 30 minutos en 150 ml de solución de nitrato de plata 0.1% p/v, formaldehído 0.15%p/v (esta solución se puede reutilizar como máximo 2 veces).
4. Lavar agitando por 15 segundos en 150 ml de agua destilada desmineralizada.
5. Incubar inmediatamente en 150 mL de solución de carbonato de sodio al 3% p/v, tiosulfato 0.00052% p/v y formaldehído 0.55% v/v. Agite constantemente hasta que se hagan visibles todas las bandas. Pare la reacción agregando los 100 ml de ácido acético 10%. Agite la solución hasta que deje de hacer burbujas.
6. Guardar los geles en la solución anterior a 4 °C por tiempo indefinido.
7. Para el desecado del gel, cada gel se coloca de manera céntrica en un papel filtro y se coloca encima papel acetato. Se deja deshidratándose por 3 días con presión.
8. Al estar secos, se digitalizan con un scanner.

## G. APÉNDICE 7: Alineamiento de secuencias de paciente y referencia GRCh37

i) Gen *EVC*

			20			40	
EVC - 6 consenso	<b>ATGTTTATTC</b>	<b>AGATTTTTAA</b>		<b>AATGTGCCTC</b>	<b>CTTGACCTTC</b>		40
EVC - 6 muestra	<b>ATGTTTATTC</b>	<b>AGATTTTTAA</b>		<b>AATGTGCCTC</b>	<b>CTTGACCTTC</b>		40
			60			80	
EVC - 6 consenso	<b>TTCCTAAAAA</b>	<b>GAAGTCAGAT</b>		<b>GATGAACTAT</b>	<b>ACCAGAAGAT</b>		80
EVC - 6 muestra	<b>TTCCTAAAAA</b>	<b>GAAGTCAGAT</b>		<b>GATGAACTAC</b>	<b>ACCAGAAGAT</b>		80
EVC - 6 consenso	<b>CCTTTCAAAA</b>	<b>CAAGAAAAA</b>					99
EVC - 6 muestra	<b>CCTTTCAAAA</b>	<b>CAAGAAAAA</b>					99

Análisis de alineamiento de la secuencia del exón 6 del gen *EVC* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exón 6 comprende de 887-985pb, y se encontraron dos mutaciones puntuales homocigotas 953 C>T y 956 T>C, y una mutación puntual heterocigota 954 T>A del ADNc.

			20			40	
EVC-8 consenso	<b>ATGGAAGCTT</b>	<b>TCTGGAAACA</b>		<b>GATGGCAAAT</b>	<b>ATCCAGCACT</b>		40
EVC - 8 muestra	<b>ATGGAAGCTT</b>	<b>TCTGGAAACA</b>		<b>GATGGCAAAT</b>	<b>ATCCAGCACT</b>		40
			60			80	
EVC-8 consenso	<b>TTCTTGTTGA</b>	<b>CCAGTTTAAG</b>		<b>TGTTCCAGCT</b>	<b>CCAAAGCCCG</b>		80
EVC - 8 muestra	<b>TTCTTGTTGA</b>	<b>CCAGTTTAAG</b>		<b>TGTTCCAGCT</b>	<b>CCAAAGCCCG</b>		80
			100			120	
EVC-8 consenso	<b>ACAGCTGATG</b>	<b>ATGACTCTGA</b>		<b>CGGAAAGAAT</b>	<b>GATTGCAGCC</b>		120
EVC - 8 muestra	<b>ACAGCTGATG</b>	<b>ATGACTCTGA</b>		<b>CGGAAAGAAT</b>	<b>GATTGCAGCC</b>		120
			140				
EVC-8 consenso	<b>GAAGGGCTAT</b>	<b>TGTGCGATTG</b>		<b>TCAGGAGCTG</b>	<b>CAGGCTCTG</b>		159
EVC - 8 muestra	<b>GAAGGGCTGT</b>	<b>TGTGCGATTG</b>		<b>TCAGGAGCTG</b>	<b>CAGGCTCTG</b>		159

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 8 del gen *EVC* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 8 comprende de 1124-1282 pb, y se encontró heterocigocidad A/G en la posición 1252 del ADNc.

			20		40	
EVC-10 consenso	<b>AGTTTGTCCA</b>	<b>GCGAGGCAAA</b>		<b>GACCTGGTCA</b>	<b>CGGCGTCTCT</b>	40
EVC - 10 muestra	<b>AGTTTGTCCA</b>	<b>GCGAGGCAAA</b>		<b>GACCTGGTCA</b>	<b>AGGCGTCTCT</b>	40
			60		80	
EVC-10 consenso	<b>GGCTCACCAG</b>	<b>GTGGAGGGAA</b>		<b>CGGCAAACT</b>	<b>CACGCTGGCC</b>	80
EVC - 10 muestra	<b>GGCTCACCAG</b>	<b>GTGGAGGGAA</b>		<b>CGGCAAACT</b>	<b>CACGCTGGCC</b>	80
			100		120	
EVC-10 consenso	<b>CAAGAGGAGG</b>	<b>AACAGAGAAG</b>		<b>CTTCCTGGCT</b>	<b>GAGGCCAGC</b>	120
EVC - 10 muestra	<b>CAAGAGGAGG</b>	<b>AACAGAGAAG</b>		<b>CTTCCTGGCT</b>	<b>GAGGCCAGC</b>	120
			140			
EVC-10 consenso	<b>CGACTGCTGA</b>	<b>CCCGGAAAAG</b>		<b>TTTCTCGAG</b>		149
EVC - 10 muestra	<b>CGACTGCTGA</b>	<b>CCCGGAAAAG</b>		<b>TTTCTCGAG</b>		149

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 10 del gen *EVC* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 10 comprende de 1500-1648 pb, y se encontró heterocigocidad C/A en la posición 1530 del ADNc.

			20		40	
EVC-13 consenso	<b>GTGTGGATGG</b>	<b>AGGAGTGTGC</b>		<b>GCTGTCCAGC</b>	<b>GTGCTGCAGA</b>	<b>CACACCTGCG</b> 50
EVC-13 muestra	<b>GTGTGGATGG</b>	<b>AGGAGTGTGC</b>		<b>GCTGTCCAGC</b>	<b>GTGCTGCAGA</b>	<b>CACACCTGCG</b> 50
			60		80	
EVC-13 consenso	<b>GGAGGACCAC</b>	<b>GAGGGCACCA</b>		<b>TCGCGGGCGT</b>	<b>CTTGGGCCGA</b>	<b>CTGGGCGGCC</b> 100
EVC-13 muestra	<b>GGAGGACCAC</b>	<b>GAGGGCACCA</b>		<b>TCTGCGGGCGT</b>	<b>CTTGGGCCGA</b>	<b>CTGGGCGGCC</b> 100
EVC-13 consenso	<b>TCACTGAAGA</b>					110
EVC-13 muestra	<b>TCACTGAAGA</b>					110

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 13 del gen *EVC* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 13 comprende de 1961-2070pb, y se encontró heterocigocidad C/T en la posición 2038 del ADNc.

ii) Gen *EVC2*

			20			40	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>GCTCCAGCGA</b>	<b>CTCGGCGGCA</b>		<b>CCCGCCGCTT</b>	<b>TGAGGTAGCG</b>	40	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>GCTCCAGCGA</b>	<b>CTCGGCGGCA</b>		<b>CCCGCCGCTT</b>	<b>TGAGGTAGCA</b>	40	
			60			80	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>GGTCCCGACA</b>	<b>GGCGATGGAC</b>		<b>CCCTCGGGCT</b>	<b>CCCGGGGGCG</b>	80	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>GGTCCCGACA</b>	<b>GGCGATGGAC</b>		<b>CCCTCGGGCT</b>	<b>CCCGGGGGCG</b>	80	
			100			120	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>CCCCACGTGG</b>	<b>GTGCTGGCCG</b>		<b>GGGGTCTCCT</b>	<b>GGCAGTGGCC</b>	120	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>CCCCACGTGG</b>	<b>GTGCTGGCCG</b>		<b>GGGGTTTCCT</b>	<b>GGCAGTGGCC</b>	120	
			140			160	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>CTGGCGCTGG</b>	<b>GGGGCCGAGG</b>		<b>CTGTCTCGGC</b>	<b>GCCAGCTCAC</b>	160	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>CTGGCGCTGG</b>	<b>GGGGCCGAGG</b>		<b>CTGTCTCGGC</b>	<b>GCCAGCTCAC</b>	160	
			180			200	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>GTCCCCGCTG</b>	<b>GCGCCCCCTC</b>		<b>GGCGCGCAGC</b>	<b>CACCCCGGGA</b>	200	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>GTCCCCGCTG</b>	<b>GCGCCCCCTC</b>		<b>GGCGCGCAGC</b>	<b>CACCCCGGGA</b>	200	
			220			240	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>TCCCCAGGTG</b>	<b>GCTCCTAGGT</b>		<b>CTGGGCCCGG</b>	<b>CCTGAGGATC</b>	240	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>TCCCCAGGTG</b>	<b>GCTCCTAGGT</b>		<b>CTGGGCCCGG</b>	<b>CCTGAGGATC</b>	240	
			260			280	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>CCTCCGGGGC</b>	<b>GGAGCGGGGC</b>		<b>GGGGCCCGAG</b>	<b>AGCAGCACGC</b>	280	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>CCTCCGGGGC</b>	<b>GGAGCGGGGC</b>		<b>GGGGCCCGAG</b>	<b>AGCAGCACGC</b>	280	
EVC2-1 var 1 consenso	<b>AG</b>					282	
EVC2 - 1 var 1 muestra	<b>AG</b>					282	

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 1 de la isoforma 1 del gen *EVC2* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 1 de la isoforma 1 comprende de 1-282 pb, y se encontraron encontraron dos mutaciones heterocigotas en la posición 40 G/A y en la posición 106 C/T del ADNc.

EVC2 - 1 var 2 consenso	TTATAAATTC	TCAGCTTCTC	GAACCCCATG	GCCTTGTCCA	TGTTAGGTCA	GGAAAGGCTT	GTCCTTGGAT	70
EVC2 - 1 var 2 muestra	TTATAAATTC	TCAGCTTCTC	GAACCCCATG	GCCTTGTCCA	TGTTAGGTCA	GGAAAGGCTT	GTCCTTGGAT	70
EVC2 - 1 var 2 consenso	GGTCTGGGTT	ATGGGGAGAG	AGGCTGCCAG	GGGCCAGGCT	CGCTGGCCTG	AGACTTTATA	GACAGCCTAA	140
EVC2 - 1 var 2 muestra	GGTCTGGGTT	ATGGGGAGAG	AGGCTGCCAG	GGGCCAGGCT	CGCTGGCCTG	AGACTTTATA	GACAGCCTAA	140
EVC2 - 1 var 2 consenso	CAGCCTGCCC	CGCAGGAAGG	CTGGCGGGAG	TGGAGCCCTC	CCCCGTCAAC	AGGTGTCAGC	TGTCACCCAG	210
EVC2 - 1 var 2 muestra	CAGCCTGCCC	CGCAGGAAGG	CTGGCGGGAG	TGGAGCCCTC	CCCCGTCAAC	AGGTGTCAGC	TGTCACCCAG	210
EVC2 - 1 var 2 consenso	GACCTAGGCA	GGGATGAGGA	AGCACACAAA	AGGCTCCACC	AGTCCCCCTT	TTTGTGTCTT	TCTCCTCCTC	280
EVC2 - 1 var 2 muestra	GACCTAGGCA	GGGATGAGGA	AGCACACAAA	AGGCTCCACC	AGTCCCCCTT	TTTGTGTCTT	TCTCCTCCTC	280
EVC2 - 1 var 2 consenso	CTCCTCCTGC	GTCCCTTGGC	AAAGCAAATC	CCTGTCCCTT	CGGAGAGTTC	AGGGAGAGCT	TGCTTAGGGC	350
EVC2 - 1 var 2 muestra	CTCCTCCTGC	GTCCCTTGGC	AAAGCAAATC	CCTGTCCCTT	CGGAGAGTTC	AGGGAGAGCT	TGCTTAGGGC	350
EVC2 - 1 var 2 consenso	TGCGACTTCA	GACACCAGCT	CCCCTCTTTC	TAGGTCCCCA	GAGAGGTGGC	CCAGCGGCTG	GCCTGTTTCC	420
EVC2 - 1 var 2 muestra	TGCGACTTCA	GACACCAGCT	CCCCTCTTTC	TAGGTCCCCA	GAGAGGTGGC	CCAGCGGCTG	GCCTGTTTCC	420
EVC2 - 1 var 2 consenso	CACTGGGAAT	GCGAGGGGCA	CCCGGGCCGG	CCCAGGGCTG	ACCCAAGCA	GGCTCGGGCA	GTGGGTGCTC	490
EVC2 - 1 var 2 muestra	CACTGGGAAT	GCGAGGGGCA	CCCGGGCCGG	CCCAGGGCTG	ACCCAAGCA	GGCTCGGGCA	GTGGGTGCTC	490
EVC2 - 1 var 2 consenso	AGCTGGTCTG	CACTGAACGC	AACCGGAAGT	GAGGGTCCTT	TTCTTTCTCT	GCGGCCACCC	CCTCCTCCCC	560
EVC2 - 1 var 2 muestra	AGCTGGTCTG	CACTGAACGC	AACCGGAAGT	GAGGGTCCTT	TTCTTTCTCT	GCGGCCACCC	CCTCCTCCCC	560
EVC2 - 1 var 2 consenso	GAGCTTTTCT	GAACCTTCTG	GGTGCTCCAG	GACTCCCGGC	CCCGCGCTCC	AAATGCTTCT	CCGTTTTTCA	630
EVC2 - 1 var 2 muestra	GAGCTTTTCT	GAACCTTCTG	GGTGCTCCAG	GACTCCCGGC	CCCGCGCTCC	AAATGCTTCT	CCGTTTTTCA	630
EVC2 - 1 var 2 consenso	AGCGGGGATG	GGGAAACTCT	GGATTACAT	CCGTGTGTCA	GGAAACCGTT	CCCAGGGGAA	GTGCGTCTGA	700
EVC2 - 1 var 2 muestra	AGCGGGGATG	GGGAAACTCT	GGATTACAT	CCGTGTGTCA	GGAAACCGTT	CCCAGGGGAA	GTGCGTCTGA	700
EVC2 - 1 var 2 consenso	GCTGAGGCTT	ACAGACCCAG	720					
EVC2 - 1 var 2 muestra	GCTGAGGCTT	ACAGACCCAG	720					

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 1 de la isoforma 2 del gen *EVC2* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 1 de la isoforma 2 comprende de 1-720 pb, y se encontraron encontraron tres mutaciones heterocigotas, en la posición 181 C/T, 466 C/A, y 629 T/C del ADNc.

		20		40		60			
EVC - 14 consenso	<b>CACAGGGAGC</b>	<b>AGCGTAGGGA</b>	<b>GCAGGCGTCC</b>	<b>GTCGGCGAGG</b>	<b>CCTTCCGAC</b>	<b>GGTTGAGGAT</b>	<b>GCCGGCCAGT</b>	70	
EVC2 - 14 muestra	<b>CACAGGGAGC</b>	<b>AGCGTAGGGA</b>	<b>GCAGGCGTCC</b>	<b>GTCGGCGAGG</b>	<b>CCTTCCGAGC</b>	<b>GGTTGAGGAT</b>	<b>GCCGGCCAGT</b>	70	
	80		100		120		140		
EVC - 14 consenso	<b>ACCTGCACCA</b>	<b>GAAGAGGAGC</b>	<b>CTGATGGAGG</b>	<b>AGCACGGTGC</b>	<b>CACCCTGGAG</b>	<b>GAGCTGCAGG</b>	<b>AGCGTCTGGA</b>	140	
EVC2 - 14 muestra	<b>ACCTGCACCA</b>	<b>GAAGAGGAGC</b>	<b>CTGATGGAGG</b>	<b>AGCACGGTGC</b>	<b>CACCCTGGAG</b>	<b>GAGCTGCAGG</b>	<b>AGCGTCTGGA</b>	140	
	160		180		200				
EVC - 14 consenso	<b>CCAGGCCGCC</b>	<b>CTGGACGATC</b>	<b>TCAGGACCCT</b>	<b>GACCCTTTCG</b>	<b>CTGTTTGAAA</b>	<b>AGGCCACCGA</b>	<b>CGAGCTGCGG</b>	210	
EVC2 - 14 muestra	<b>CCAGGCCGCC</b>	<b>CTGGACGATC</b>	<b>TCAGGACCCT</b>	<b>GACCCTTTCG</b>	<b>CTGTTTGAAA</b>	<b>AGGCCACCGA</b>	<b>CGAGCTGCGG</b>	210	
	220		240		260		280		
EVC - 14 consenso	<b>CGCCTGCAGA</b>	<b>ACTCAGCCAT</b>	<b>GACCCAGGAG</b>	<b>CTGCTCAAGC</b>	<b>GTGGGGTGCC</b>	<b>CTGGCTCTTC</b>	<b>CTGCAGCAGA</b>	280	
EVC2 - 14 muestra	<b>CGCCTGCAGA</b>	<b>ACTCAGCCAT</b>	<b>GACCCAGGAG</b>	<b>CTGCTCAAGC</b>	<b>GTGGGGTGCC</b>	<b>CTGGCTCTTC</b>	<b>CTGCAGCAGA</b>	280	
	300		320		340				
EVC - 14 consenso	<b>TCCTGGAGGA</b>	<b>GCACGGCAAG</b>	<b>GAGATGGCTG</b>	<b>CACGGGCCGA</b>	<b>GCAGCTGGAG</b>	<b>GGGGAGGAGA</b>	<b>GGGACAGGGA</b>	350	
EVC2 - 14 muestra	<b>TCCTGGAGGA</b>	<b>GCACGGCAAG</b>	<b>GAGATGGCTG</b>	<b>CACGGGCCGA</b>	<b>GCAGCTGGAG</b>	<b>GGGGAGGAGA</b>	<b>GGGACAGGGA</b>	350	
	360		380		400		420		
EVC - 14 consenso	<b>CCAGGAGGGT</b>	<b>GTCCAGAGCG</b>	<b>TGAGGCAGAG</b>	<b>ACTGAAGGAT</b>	<b>GACGCTCCTG</b>	<b>AGGCCGTGAC</b>	<b>AGAGGAGCAG</b>	420	
EVC2 - 14 muestra	<b>CCAGGAGGGT</b>	<b>GTCCAGAGCG</b>	<b>TGAGGCAGAG</b>	<b>ACTGAAGGAT</b>	<b>GACGCTCCTG</b>	<b>AGGCCGTGAC</b>	<b>AGAGGAGCAG</b>	420	
	440								
EVC - 14 consenso	<b>GCAGAGCTGC</b>	<b>GACGCTGGGA</b>	<b>GCACCTGATC</b>	<b>TTCAT</b>				455	
EVC2 - 14 muestra	<b>GCAGAGCTGC</b>	<b>GACGCTGGGA</b>	<b>GCACCTGATC</b>	<b>TTCAT</b>				455	

Análisis de alineamiento de la secuencia del exon 14 del gen *EVC2* de la paciente en estudio con la referencia GRCh37 (actualizado hasta el 2009) reportada en NCBI. El exon 14 comprende de 2101-2555pb, y se encontró una mutación puntual homocigota 2149 A>G del ADNc.

## H. Apéndice 8: Perfil de SNP de los genes *EVC* y *EVC2*

Con el avance de la nueva era bioinformática, está disponible a través de internet los polimorfismos encontrados en ambos genes, mediante el análisis de genomas humanos secuenciados y reportados en las bases de datos del NCBI (2006): (acceso NM\_153717.2) y *EVC2* (acceso NM\_147127 para isoforma 1 y NM\_001166136 para isoforma 2

**Cuadro 5.** SNP encontrados en el gen *EVC* con acceso NM\_153717.2

Exón	Posición en ARNm	Función	Nucleótido		Residuo de proteína		Posición de codón	Posición de aminoácido
			Mutación	Consenso	Mutación	Consenso		
1	185	Codón de iniciación						1
2	405	Sentido equivocado	C	A	Pro [P]	Gln [Q]	2	74
	433	Sinónimo	G	A	Ser[S]	Ser[S]	3	83
	468	Sentido equivocado	G	A	Gly [G]	Asp [D]	2	95
3	525	Sentido equivocado	T	C	Val [V]	Ala [A]	2	114
4	734	Sentido equivocado	A	G	Asn [N]	Asp [D]	1	184
	770	Sentido equivocado	G	A	Asp [D]	Asn [N]	1	196
6	953	Sentido equivocado	T	C	Leu [L]	Leu [L]	1	257
	956	Sentido equivocado	C	T	His [H]	Tyr [Y]	1	258
	964	Sinónimo	A	G	Lys [K]	Lys [K]	3	260
8	1153	Sinónimo	C	T	Asn [N]	Asn [N]	3	323
	1210	Sinónimo	C	G	Leu [L]	Leu [L]	3	342
	1224	Sentido equivocado	T	C	Met [M]	Thr [T]	2	347
	1252	Sinónimo	G	A	Leu [L]	Leu [L]	3	356
	1280	Sinónimo	T	C	Leu [L]	Leu [L]	1	366
9	1299	Sentido equivocado	T	C	Met [M]	Thr [T]	2	372
10	1504	Sentido equivocado	A	T	Leu [L]	Phe [F]	3	440
	1512	Sentido equivocado	A	G	Gln [Q]	Arg [R]	2	443
	1530	Sentido equivocado	A	C	Lys [K]	Thr [T]	2	449
12	1894	Cambio en marco de lectura	G	-/G	Gly [G]	Gly [G]	3	570
	1911	Sentido equivocado	A	G	Gln [Q]	Arg [R]	2	576
	1915	Cambio en el marco de lectura	-/G	G	Arg [R]		3	577
13	2010	Sentido equivocado	A	G	Gln [Q]	Arg [R]	2	609
	2038	Sinónimo	T	C	Gly [G]	Gly [G]	3	618

Continuación **Cuadro 5.** SNP encontrados en el gen *EVC* con acceso NM\_153717.2

Exón	Posición en ARNm	Función	Nucleótido		Residuo de proteína		Posición de codón	Posición de aminoácido
			Mutación	Consenso	Mutación	Consenso		
14	2124	Sentido equivocado	A	G	Gln [Q]	Arg [R]	2	647
15	2354	Sentido equivocado	T	C	Trp [W]	Arg [R]	1	724
	2463	Sentido equivocado	A	G	Gln [Q]	Arg [R]	2	760
16	2547	Sentido equivocado	A	G	His [H]	Arg [R]	2	788
	2557	Sinónimo	A	G	Gln [Q]	Gln [Q]	3	791
20	3053	Sentido equivocado	A	G	Arg [R]	Gly [G]	1	957
	3056	Sentido equivocado	A	G	Asn [N]	Asp [D]	1	958

(NCBI 2006)

**Cuadro 6.** SNP encontrados en el gen *EVC2* con acceso NM\_147127 para isoforma 1 y NM\_001166136 para isoforma 2

Exón	Posición en ARNm	Función	Nucleótido		Residuo de proteína		Posición de codón	Posición de aminoácido
			Mutación	Consenso	Mutación	Consenso		
	55	Codón de iniciación						1
1	106	Sentido equivocado	T	C	Phe [F]	Leu [L]	1	18
	118	Sentido equivocado	C	G	Pro [P]	Ala [A]	1	22
	119	Cambio de marco de lectura	-/G	C		Ala [A]	2	22
	135	Cambio de marco de lectura	-/G	C		Gly [G]	3	27
	4	517	Cambio de marco de lectura	C	-/G	Leu [L]	Ser [S]	1
5	742	Sentido equivocado	G	A	Gly [G]	Ser [S]	1	230
6	783	Sinónimo	T	C	Ser [S]	Ser [S]	3	243
10	1438	Sentido equivocado	G	A	Ala [A]	Thr [T]	1	462
	1491	Sinónimo	G	A	Glu [E]	Glu [E]	3	479
13	2083	Sinónimo	A	C	Arg [R]	Arg [R]	1	677
	2115	Sinónimo	C	T	Arg [R]	Arg [R]	3	687
14	2149	Sentido equivocado	G	A	Ala [A]	Thr [T]	1	699
	2289	Sinónimo	G	A	Glu [E]	Glu [E]	3	745
	2383	Sinónimo	T	C	Leu [L]	Leu [L]	1	777
	2541	Sinónimo	A	G	Glu [E]	Glu [E]	3	829
17	3077	Sentido equivocado	T	C	Leu [L]	Ser [S]	2	1008
18	3192	Sentido equivocado	G	C	Arg [R]	Ser [S]	3	1046
20	3561	Sinónimo	T	C	His [H]	His [H]	3	1169

(NCBI 2006)

I. APÉNDICE 9: Frecuencia de la distribución en distintas poblaciones de polimorfismos encontrados para los genes *EVC* y *EVC2*

i) Gen *EVC*

Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 953 C>T (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	G/G	G/T	T/T
ss42373632	HapMap-CEU	Europea	118		0.169	0.831
	HapMap-HCB	Asiática	90			1.000
	HapMap-JPT	Asiática	88			1.000
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120			1.000
ss68889099	HapMap-CEU	Europea	120	0.167	0.017	0.817
	HapMap-HCB	Asiática	90			1.000
	HapMap-JPT	Asiática	90			1.000
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120			1.000

Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 956 T>C (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	C/C	C/T	T/T
ss44545837	HapMap-CEU	Europea	120	0.583	0.383	0.033
	HapMap-HCB	Asiática	90	0.822	0.178	
	HapMap-JPT	Asiática	88	0.886	0.114	
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120	0.283	0.517	0.200
ss68889100	HapMap-CEU	Europea	120	0.817	0.183	
	HapMap-HCB	Asiática	90	1.000		
	HapMap-JPT	Asiática	90	1.000		
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120	1.000		

Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 1252 A>G (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	A/A	A/G	G/G
ss48044358	AGI_ASP	Múltiple	88	0.553	0.368	0.079

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 1530 C&gt;A (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	A/A	A/G	G/G
ss23958733	AFD EUR PANEL	Europea	48		0.167	0.833
	AFD AFR PANEL	Afroamericana	44		0.136	0.864
	AFD CHN PANEL	Asiáticos	48	0.083	0.333	0.583
ss44581228	HapMap-CEU	Europea	120	0.067	0.267	0.667
	HapMap-HCB	Asiáticos	90	0.044	0.311	0.644
	HapMap-JPT	Asiáticos	90	0.022	0.378	0.600
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120			1.000
ss48404360	AGI_ASP	Múltiple	74	0.081	0.108	0.811
ss68889124	HapMap-CEU	Europea	120	0.067	0.267	0.667
	HapMap-HCB	Asiáticos	90	0.044	0.311	0.644
	HapMap-JPT	Asiáticos	90	0.022	0.378	0.600
	HapMap-YRI	Africana Sub-Sahara	120			1.000

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 2038 C&gt;T (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	C/C	C/T	T/T
ss134690811	ENSEMBL_Venter	Europeo	2			1.000
	ENSEMBL_celera	Europa Norte y Oeste	4	0.500	0.500	
ss98929159	J. Craig Venter	Europa Norte y Oeste	2			1.000

ii) Gen *EVC2*

NOTA Mutaciones en el exón 1 de la isoforma 1 [40 G>A; 106 C>T] no tiene datos de diversidad en la población.

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 181 C&gt;T (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	A/A	A/G	G/G
ss161559532	ENSEMBL_celera	Europa Norte y Oeste	4	0.500	0.500	

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 466 C&gt;A (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	C/C	C/T	T/T
ss133383186	ENSEMBL_Venter	Europeo	2		1.000	
	ENSEMBL_celera	Europa Norte y Oeste	4	0.500		0.500

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 629 T&gt;C (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas	C	T
ss134690865	ENSEMBL_venter	Europeo	2	1.000	
ss139416783	ENSEMBL_watson	Europeo	2	1.000	
ss2919286	CEPH	Múltiple	184	0.370	0.630
	AoD_African American	Afroamericanos	90	0.140	0.860
	AoD_Caucasian	Caucásicos	92	0.490	0.510
	AoD_Chinese	Chinos	90	0.600	0.400
	AoD_Japanese	Japoneses	90	0.450	0.550

## Frecuencia en las distintas poblaciones del polimorfismo 2149 A&gt;G (modificado de BIRD 2009)

ss#	Población	Grupo individuos	No. de cromosomas					
				C	C/C	C/T	T	T/T
ss23957969	AFD EUR PANEL	Europea	46		0.087	0.391		0.522
	AFD AFR PANEL	Afroamericana	42		0.667	0.286		0.048
	AFD CHN PANEL	Asiática	46		0.435	0.522		0.043
ss688889040	HapMap-CEU	Europea	120		0.100	0.500		0.400
	HapMap-HCB	Asiática	90		0.556	0.356		0.089
	HapMap-JPT	Asiática	90		0.422	0.444		0.133
	HapMap-YRI	African Sub-sahara	120		0.750	0.250		
ss75502	SC 12 A	Asiática	22		0.273	0.455		0.273
	SC 12 AA	Afroamericana	20		0.800	0.200		
	SC 12 C	Europea	14		0.143	0.714		0.143
	HapMap-CEU	Europea	120		0.080	0.389		0.531
	HapMap-HCB	Asiática	90		0.488	0.395		0.116
	HapMap-JPT	Asiática	90		0.314	0.453		0.233
	HapMap-YRI	Africana Sub-sahara	120		0.821	0.171		0.007
	CHMJ	Asiática	74		0.541		0.459	

## Lista de las poblaciones y su descripción (modificado de BIRD 2009)

Población	Descripción
CEU	Residentes de Utah con ancestros de Europa del norte y oeste
HCB	Chinos Han de Beijing, China
JPT	Japoneses de Tokyo, Japón
YRI	Yoruba en Ibadan, Nigeria
AGI ASP	Mujeres de afroamericanas y caucásicas
AFD EUR PANEL	Descendientes europeos americanos
AFD AFR PANEL	Descendientes afroamericanos
AFD CHN PANEL	Descendientes Han de Los Angeles, EEUU
CEPH	94% Utah, 4% franceses, 3% venezolanos
SC 12 A	6 mujeres asiáticas y 6 hombres asiáticos
SC 12 AA	6 mujeres afroamericanas y 6 hombres afroamericanos
SC 12 C	6 hombres caucásicos y 6 mujeres caucásicas
CHMJ	ADN extraído de mol hidatiforme (CHM), un tumor benigno formado por la fertilización de un óvulo vacío por una esperm haploide donado por mujeres japonesas.

## J. APÉNDICE 10: Frecuencia de los patrones y el Rf de las bandas obtenidas por SSCP

Frecuencia de los patrones obtenidos en la población estudiada y el Rf de las bandas en cada patrón de los exones 7, 10, 13 y 15 del gen *EVC*

Exón	Muestras	Patrón	Frecuencia (n=13)	Bandas	Rf	IC 95%
7	Madre, 8 CN	A	69	1	0.338	[0.330; 0.346]
	Padre, paciente, 2 CN	B	31	1	0.139	[0.122; 0.156]
2				0.307	[0.291; 0.323]	
10	Madre, paciente, 3 CN	A	38	1	0.031	[0.028; 0.035]
				2	0.531	[0.525; 0.537]
				3	0.593	[0.591; 0.596]
				4	0.745	[0.738; 0.752]
				5	0.853	[0.849; 0.857]
	Padre, 1 CN	B	15	1	0.010	[0.008; 0.012]
				2	0.462	[0.454; 0.470]
				3	0.583	[0.580; 0.586]
				4	0.738	[0.735; 0.741]
				5	0.857	[0.854; 0.860]
10	4 CN	C	31	1	0.023	[0.021; 0.025]
				2	0.595	[0.590; 0.600]
				3	0.739	[0.733; 0.745]
	2 CN	D	15	4	0.851	[0.854; 0.860]
				1	0.016	[0.013; 0.019]
				2	0.060	[0.048; 0.071]
13	Madre	A	8	3	0.597	[0.592; 0.602]
				4	0.653	[0.651; 0.655]
				5	0.762	[0.756; 0.768]
	Padre, 5 CN	B	46	6	0.861	[0.855; 0.867]
				1	0.085	NA
				2	0.164	NA
13	Paciente, 5 CN	C	46	3	0.287	NA
				1	0.093	[0.078; 0.108]
				2	0.228	[0.225; 0.231]
				3	0.311	[0.308; 0.314]
				4	0.367	[0.363; 0.371]
15	Madre, paciente, 4 CN	A	46	1	0.101	[0.096; 0.106]
				2	0.182	[0.178; 0.185]
				3	0.237	[0.234; 0.240]
				4	0.302	[0.296; 0.307]
				5	0.368	[0.364; 0.372]
15	Padre, 6 CN	B	54	1	0.101	[0.098; 0.104]
				2	0.210	[0.200; 0.220]
15	Padre, 6 CN	B	54	3	0.323	[0.303; 0.344]
				1	0.338	[0.329; 0.347]

CN, Controles Negativos

Rf, factor de migración relativa

IC, Intervalo de confianza al 95%

NA, No aplica

## K. APÉNDICE 11: Comparación de costos Secuenciación vrs. SSCP

## Comparación de los costos totales estimados para la secuenciación y los SSCP

<b>Reacciones</b>	<b>Descripción</b>	<b>Precio Total</b>
Secuenciación	Se estimaron 29 reacciones sentido y 14 reacciones antisentido. Cada reacción costó \$5.00 <sup>1</sup>	Q 1,783.50
SSCP	Se estimaron 8 corridas electroforéticas de muestras y 4 corridas por la fase de optimización o repeticiones. Cada corrida costó \$8.41 <sup>2</sup>	Q 1,105.00

Conversión de dólar Q8.20 por \$ 1.00

<sup>1</sup>El precio de la secuenciación fueron dados por la compañía EtonBioscience

<sup>2</sup>El precio de los SSCP fueron obtenidos del catálogo Sigma Aldrich 2007-2008

## VII. Glosario

1. Acromélico: segmento distal de los miembros (Richardson *et al.* 1982).
2. Agenesia (dentaria): es una anomalía de número caracterizada por la ausencia congénita de dientes temporales y/o permanentes (Correa *et al.* 1996).
3. Anodoncia: *ver* agenesia
4. Atrio Común: rara variedad de una comunicación interatrial caracterizada por la ausencia o ausencia virtual del septo atrial (Sajeev *et al.* 2002).
5. Autosómico: con referencia a los cromosomas no sexuales (Griffiths 2002).
6. Braquidactilia: fenotipo dominante de dedos cortos (Griffiths 2002).
7. Camptodactilia: malformación de los dedos, caracterizada por la flexión permanente de uno (meñique) o de varios dedos de la mano, flexión que afecta particularmente a la articulación de la segunda sobre la primera falange (García 2008a).
8. Canal Atrioventricular Común (CAVC): malformación que consiste en existencia de un cortocircuito desde las cavidades cardíacas izquierdas hacia las derechas a través de los defectos de reptación (Corretger *et al.* 2005).
9. Capitatium: también llamado hueso grande del carpo, es el tercero de la hilera del carpo, y tiene una prominente cabeza redonda que se extiende proximalmente para llenar el punto más alto del arco cóncavo de la primera hilera (Gardner *et al.* 1971).
10. Cardiopatías Congénitas: anomalías del corazón o de los grandes vasos que están presentes desde el nacimiento (Robbins *et al.* 1996).
11. Carpo: o también llamada muñeca, está formada por ocho huesos carpianos pequeños, dispuestos en dos hileras de cuatro huesos cada una (Gardner *et al.* 1971).
12. Cianosis: coloración azulada de la piel y las mucosas debida al exceso de desoxihemoglobina; indica la presencia de cantidades insuficientes de oxígeno en la sangre (Fox 2003).
13. Clinodactilia: desviación de los dedos de manos o pies hacia la cara dorsal, la cara palmar o en sentido plantar o lateral. Obedece generalmente a retracciones cicatrizales o ligamentosas (García 2008b).
14. Coartación de la aorta: estrechamiento o constricción de la aorta, esta se sitúa con una elevada frecuencia entre las anomalías estructurales comunes (Robbins *et al.* 1996).
15. Comunicación Atrioventricular Parcial (CAVP): también es conocido como defecto del tabique aurículo-ventricular parcial, y consiste en una combinación de dos defectos: malformación de la válvula mitral y CIA (Cove Point Foundation 2009).
16. Comunicación interauricular (CIA): malformación cardíaca congénita que presenta una apertura anómala en el tabique interauricular, permitiendo el paso de la sangre entre aurículas. Existen varios tipos de CIA, dependiendo del lugar en el cual se encuentra el defecto: seno venoso, ostium secundum, ostium primum y vena cava inferior (Robbins *et al.* 1996; Faella, 2005).
17. Comunicación interauricular ostium primum: se encuentra en la parte baja del tabique interauricular, anteroinferiores a la fosa oval y adyacentes a las válvulas AV, y por lo general se asocian a una válvula mitral anterior hendida (Robbins *et al.* 1996; Faella, 2005).
18. Comunicación interauricular ostium secundum: está ubicado en la parte media del tabique interauricular, en la zona de la fosa oval, su defecto se debe a una deficiencia del septum primum embrionario, deficiencia del septum secundum, o ambos, y afecta a la válvula o al limbo de la fosa oval (Robbins *et al.* 1996; Faella, 2005).
19. Comunicación Interventricular (CIV): cardiopatía congénita que se asocia a un aumento del flujo y de la presión pulmonar. Esto se debe a una apertura en el tabique interventricular que permite la libre comunicación entre ventrículos derecho e izquierdo (Robbins *et al.* 1996).
20. Condrocito: célula formadora de cartílago (Fox 2003).

21. Criptorquidismo: es una alteración hereditaria que se conoce por la falla del descenso de uno o de ambos testículos al escroto en un tiempo límite usual (Villalobos 2000).
22. Diáfisis: tallo del hueso entre dos epífisis (Gardner *et al.* 1971).
23. Disnea: dificultad subjetiva para respirar (Fox 2003).
24. Displasia: crecimiento y desarrollo anormal de células u órganos (Myers 2006).
25. Epífisis: porción expandida en el eje longitudinal que se junta con parte análoga de otro hueso en una articulación (Gardner *et al.* 1971).
26. Estenosis Aórtica: cardiopatía congénita que involucra la obstrucción al flujo de salida del ventrículo izquierdo que da lugar a escaso desarrollo de éste y de la aorta ascendente (Robbins *et al.* 1996).
27. Falanges: huesos de los dedos, más pequeños que los metacarpianos. Cada dedo tiene un falange proximal, media y distal (Gardner *et al.* 1971).
28. Fíbula: hueso largo y su ubicación es posterolateral en la pierna. Articula con la tibia y posee dos epífisis y una diáfisis (Amalgá *et al.* s.f.).
29. Fosa oval: agujero en la pared interna de la aurícula derecha, que durante el desarrollo embrionario dejaba pasar sangre de la aurícula derecha a la izquierda (Gardner *et al.* 1971)
30. Frenillo Lingual: pliegue vertical de mucosa que surge en la línea media, situado en la superficie ventral de la lengua, que une la parte libre de ésta al suelo de la boca (Ramírez *et al.* s.f.).
31. Hiperplasia: aumento en el número de células de un órgano o tejido (Robbins *et al.* 1996)
32. Hipoplásicas: desarrollo incompleto o subdesarrollo de un órgano o tejido (Mondofacto 2008).
33. Hipertrofia Gingival: incremento de las papilas interdentes haciéndose la encía más prominente, tendiendo a invadir la corona clínica de los dientes. Provoca alteraciones estéticas, interferencias en la oclusión, trastornos fonatorios y deglutorios, gingivorragias, malposición dentaria (Hernández s.f.).
34. Hipodoncia: *ver* agenesia
35. Hipotelorismo: aumento de la distancia de las paredes internas de la órbita (Pesqueira s.f.).
36. Hueso Tubular: huesos largos de las extremidades, incrementan progresivamente su longitud, adelgazando, se divide en epífisis, disco de crecimiento, metáfisis y diáfisis (Pombo 1997).
37. Húmero: es el hueso largo del brazo anatómico, al cual se refiere como extremidad superior (Gardner *et al.* 1971).
38. Lordosis lumbar: se refiere a la curvatura fisiológica de la columna en la región cervical o lumbar (Gylys *et al.* 2005).
39. Mesomélico: relativo a la porción media de los miembros (SIERE s.f. ).
40. Metacarpo: los cinco huesos de la mano (Gardner *et al.* 1971).
41. Metatarso: Huesos que forman el pilar anterior del arco longitudinal del pie (Gardner *et al.* 1971).
42. Mutación: cambio en la secuencia nucleotídica de los genes que puede afectar produciendo variantes fenotípicas discontinuas raras y/o excepcionales (Griffiths 2002).
43. Onicodistrofia: se refiere a los cambios en las uñas, como la disrupción de las capas de queratina en las uñas. Este término representa varios procesos patológicos en las uñas por desordenes tanto infecciosos como no infecciosos incluyendo onicomiosis, dermatitis irritante (Oppel 2003).
44. Pectus carinatum: prominencia del esternón, principalmente en su porción media e inferior y acompañada, casi siempre, de depresión costal bilateral inferior (Coelho s.f.).
45. Pericondrio: Tejido conjuntivo formado por fibroblastos y una densa red de fibras de colágeno (Portier *et al.* 2002).

46. Polidactilia: anomalía congénita caracterizada por la existencia de dedos supernumerarios o bífidos (Cifuentes *et al.* 2007).
47. Polidactilia Postaxial: polidactilia en el borde cubital de la mano o peroneo del pie (Cifuentes *et al.* 2007).
48. Polimorfismo: La existencia de dos o más variantes discontinuas comunes de genes en una población natural (Griffiths 2002).
49. Radio: es el hueso externo del antebrazo (Gardner *et al.* 1971).
50. Sindactilia: fusión de los dedos (dos o más). Puede ser completa si la fusión entre los dedos implicados es total, o incompleta si una porción de los dedos implicados queda libre (Guerrero 2002).
51. Tabique: separación entre las cavidades izquierda y derecha entre las aurículas y ventrículos, formando un tabique interventricular, y tabique interauricular (Quiroz 1972).
52. Tibia: hueso de de la pierna que se encuentra más cerca de la parte anterior de la pierna, soporta el peso del cuerpo (Gardner *et al.* 1971).
53. Ulna: hueso largo ubicado medial en el antebrazo. Posee dos epífisis y una diáfisis (Amalgá *et al.* s.f.).
54. Unciforme: o gancho, es el cuarto hueso de la hilera del carpo, del cual sólo una pequeña parte llega al lado interno de la muñeca, se llama así por el gancho prominente que proyecta hacia adelante, en el lado interno de la muñeca (Gardner *et al.* 1971).
55. Válvula Mitral: válvula auriculoventricular, fijo a la pared ventricular, su función depende de las acciones coordinadas de valvas, cuerdas tendinosas, músculos papilares y pared ventricular izquierda asociada (Robbins *et al.* 1996).
56. Vena Cava: Troncos en donde llega la sangre de regreso desde la aurícula derecha, luego de pasar por todo el organismo. Se divide en superior e inferior (Quiroz 1972).