

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

*EXCLUSIÓN DE LOCI CANDIDATOS COMO RESPONSABLES
DEL FENOTIPO DE POLIDACTILIA POSTAXIAL TIPO B
EN UNA FAMILIA COSTARRICENSE*

**Tesis sometida a la consideración de la Comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Biología para
optar al grado de Magister Scientiae**

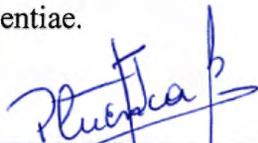
JUAN MANUEL PERALTA FERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Costa Rica

2005

Esta Tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Magister Scientiae.



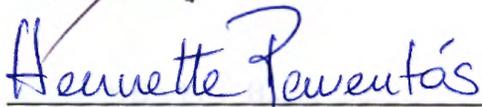
Dra. Patricia Cuenca Berger
Representante del Decano del SEP



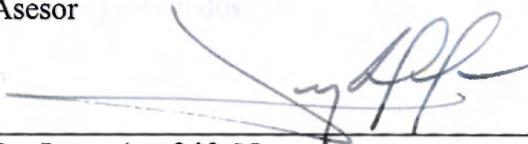
Dr. Pedro León Azofeifa
Director de Tesis



Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta
Asesor



Dra. Henriette Raventós Vorst
Asesor



Dr. Jorge Azofeifa Navas
Director del Programa de Posgrado en Biología



Juan Manuel Peralta Fernández
Candidato

Índice

Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
Tipos de polidactilia.....	3
Polidactilia postaxial.....	4
Fenotipo.....	4
Epidemiología.....	5
Genética.....	7
Loci de polidactilia.....	8
HOXD13.....	10
EVC.....	11
GLI3.....	12
PAPA2.....	15
PAPA3.....	16
PAP-A/B y PAP-B.....	16
Materiales y métodos.....	18
Material de estudio.....	18
Modelo de herencia.....	18
Fenotipo.....	20
Loci candidatos.....	20
Loci marcadores.....	20
Análisis de ligamiento.....	24
Simulaciones.....	25

Metodologías de laboratorio.....	26
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	26
Geles de secuenciación manuales.....	29
Geles de secuenciación automática.....	29
Tinción con nitrato de plata de geles de poliacrilamida.....	29
Resultados.....	31
Discusión.....	41
Conclusiones.....	49
Bibliografía.....	50

Peralta Fernández, Juan Manuel

Exclusión de loci candidatos como responsables del fenotipo de polidactilia postaxial tipo b en una familia costarricense.

Tesis Maestría en Ciencias. - San José, C.R.:

J.M. Peralta F., 2005.

65h.: 5 il. - 66 refs.

Se propone determinar si existe ligamiento genético entre los loci de polidactilia postaxial descritos en la literatura y el fenotipo de polidactilia postaxial tipo B observado en una familia costarricense.

La investigación contó con muestras previamente recolectadas del ADN de miembros de una familia costarricense que presenta el fenotipo de polidactilia postaxial tipo B. Mediante el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa se amplificaron loci marcadores cercanos a los genes *HOXD13*, *GLI3/PAP1*, *EVC*, en las áreas críticas de ligamiento donde se localizan los genes *PAPA2*, *PAPA3*, *PAP-A/B* y en el área de la translocación t(4;7)p15.2;q35. Se usó un modelo de herencia autosómico dominante para el análisis paramétrico de ligamiento. Se calcularon puntajes LOD de dos puntos y multipunto.

El análisis de ligamiento reveló que el fenotipo de polidactilia postaxial tipo B observado en la familia no es causado por los loci candidatos. Por el contrario, los resultados muestran una clara exclusión de los genes *HOXD13*, *GLI3/PAP1* y de el área crítica de ligamiento de los genes *PAPA3* y *PAP-A/B*. También se obtuvo evidencia negativa de ligamiento para el gen *SHH* y exclusión del gen *dHAND* y los grupos de genes homeóticos *HOXA* y *HOXB*. Los resultados obtenidos permiten sugerir la existencia de un nuevo locus responsable del fenotipo de polidactilia postaxial tipo B.

POLIDACTILIA; PAP-B; LOCI CANDIDATOS; EXCLUSIÓN

Dr. Pedro León Azofeifa

Escuela de Biología

Lista de Cuadros

Cuadro 1: Loci candidatos.....	21
Cuadro 2: Loci marcadores seleccionados para cada uno de los loci candidatos.....	22
Cuadro 3: Mapa genético de los loci marcadores usados en el estudio.....	23
Cuadro 4: Reacciones para la amplificación de microsatélites.....	28
Cuadro 5: Número de genotipos obtenidos para cada locus marcador usado en el estudio.	31
Cuadro 6: Número de alelos, frecuencia e “informatividad” de los loci marcadores.....	33
Cuadro 7: Puntaje LOD obtenido para cada locus marcador mediante el análisis de ligamiento de dos puntos.....	34

Lista de Figuras

Figura 1: Genealogía de F01.....	19
Figura 2: Máximo puntaje LOD de acuerdo a las simulaciones S1 y S2.....	37
Figura 3: Puntaje LOD obtenido para las simulaciones S3 y S4.....	38
Figura 4: Máximo puntaje LOD posible a una fracción de recombinación de 0.1.....	39
Figura 4: LODs multipunto.....	40

Introducción

La malformación de dígitos es la anomalía somática de repetición o deficiencia de apéndices más común en humanos [Zguricas *et al.* 1999, Castilla *et al.* 1998]. En función del fenotipo las malformaciones de los dígitos son clasificadas en cuatro categorías que permiten sistematizar su estudio:

- Polidactilia: aumento en el número de dígitos en manos y/o pies
- Sindactilia: ausencia y/o fusión de dígitos en manos y/o pies
- Braquidactilia: reducción del tamaño de los dígitos
- Aracnodactilia: aumento del tamaño de los dígitos

Se ha demostrado que en ciertos casos esas malformaciones deben su ocurrencia a la herencia monogénica mendeliana de un alelo anormal [Sarfarazi *et al.* 1995, Radhakrishna *et al.* 1999]. Empero, la causa de muchos otros casos parece ser de naturaleza más compleja. Una característica destacable de las malformaciones en humanos, y del grupo de los vertebrados en general, es que suelen presentarse como signos de síndromes complejos.

La polidactilia no es la excepción y, aunque la mayor proporción de los casos de polidactilia son no sindrómicos, se observa frecuentemente asociada a otras malformaciones. Forma parte del fenotipo de síndromes tales como el síndrome de Down [Vogel y Motulsky 1997], Ellis-Van Creveld [Polymeropoulos *et al.* 1996, Radhakrishna *et al.* 1997] y cefalopolisindactilia de Creig [Brueton *et al.* 1988, Radhakrishna *et al.* 1997] entre otros.

Aún se desconoce, para la gran mayoría de los casos, cuál o cuáles factores genéticos ocasionan polidactilia y cuáles mecanismos bioquímicos o fisiológicos se ven involucrados en el proceso. Sin embargo, es claro que el fenotipo de polidactilia es causado por algún factor que ocasiona una perturbación de naturaleza local de los procesos de crecimiento en el

embrión en desarrollo. Dados los inconvenientes asociados al estudio de síndromes, muchas investigaciones se han enfocado en los tipos no sindrómicos cuyo estudio puede conducir al descubrimiento de nuevos genes del desarrollo, ofrecer nuevas perspectivas sobre mecanismos de diferenciación celular, sugerir vías de transducción de señales involucradas en el desarrollo de tejidos y/o revelar que papel juegan ciertos genes en el desarrollo de extremidades en humanos.

Antecedentes

El primer estudio documentado sobre polidactilia y factores hereditarios fue realizado por Pierre-Louis Moreau de Maupertuis [Vogel y Motulsky 1997]. Él estudió una familia de Berlín, con miembros de varias generaciones, en la cual logró demostrar que la polidactilia podía ser transmitida por el padre o por la madre. Estableció que la característica fenotípica era el resultado de una mutación en "las partículas de la herencia" que los padres transmitían a sus hijos. Maupertuis calculó la probabilidad matemática de ocurrencia del fenotipo en nuevos miembros de la familia, y demostró que el azar por sí solo era insuficiente para explicar la agregación de polidactilia en esa familia [Vogel y Motulsky 1997]. El trabajo de Maupertuis es considerado el primer registro científicamente preciso de la transmisión de una característica hereditaria dominante en humanos [Vogel y Motulsky 1997].

Wright estudió la polidactilia en cobayos en los 1930s. Mediante el diseño cuidadoso de cruces de líneas endogámicas de cobayos --con tres y cuatro dedos en patas traseras-- estableció que la polidactilia no tiene causas genéticas simples [Wright 1934a, Wright 1934b]. Los datos que Wright obtuvo eran más consistentes con un modelo en el cual la aparición de un cuarto dedo depende del nivel de un rasgo subyacente cuya distribución es de naturaleza cuantitativa [Lynch y Walsh 1997]. Wright llegó a demostrar que la polidactilia en cobayos es

un carácter de tipo umbral, que responde a la variación aditiva de alelos diferentes presentes en al menos cuatro loci del genoma.

El trabajo de Wright es relevante ya que una variante frecuente de polidactilia en humanos, la polidactilia postaxial, ha sido considerada un rasgo poligénico con al menos cuatro loci involucrados [Orioli 1995]. El cobayo podría representar, entonces, un modelo animal apropiado para el estudio de los factores genéticos que determinan el desarrollo de extremidades. Sin embargo, no todas las investigaciones concuerdan con la hipótesis del rasgo poligénico, alegando que este defecto de nacimiento no encaja dentro de un modelo multifactorial de herencia [Orioli 1995].

Tipos de polidactilia

La clasificación de las malformaciones congénitas de la mano es principalmente descriptiva y basada en aspectos anatómicos. Esto tiene sentido pues no se cuenta aún con suficiente información sobre estas patologías, como para establecer una clasificación más acorde con la biología subyacente.

En 1978 Temtamy y McKusick establecieron una clasificación clínica para los casos de polidactilia y sindactilia [Temtamy y McKusick 1978]. Su clasificación es la que más frecuentemente usan los estudios genéticos de tales malformaciones, quizás por la influencia de McKusick en el ámbito de la genética humana. Ésta subdivide a la polidactilia y a la sindactilia en:

- Polidactilia
- Postaxial
- Preaxial
- Tipo I: Polidactilia del pulgar
- Tipo II: Polidactilia del pulgar trifalángico
- Tipo III: Polidactilia del dedo índice
- Tipo IV: Polidactilia cruzada
- Sindactilia
- Tipo I: Zigodactilia
- Tipo II: Sinpolidactilia
- Tipo III: Sindactilia en anillo y del meñique
- Tipo IV: Tipo Haas
- Tipo V: Sindactilia con fusión metacarpal/ metatarsal

Recientemente, una clasificación más moderna, basada en aspectos embriológicos, ha sido propuesta por Winter and Tickle [Winter y Tickle 1993]. Sin embargo su uso no es muy difundido.

A pesar de las diferencias que puedan existir entre los diversos esquemas de clasificación, todos ellos comparten una característica: ninguno es capaz de explicar el considerable traslape que existe entre los fenotipos de las diversas categorías que cada uno describe [Zguricas *et al.* 1999].

Polidactilia postaxial

Fenotipo

La polidactilia postaxial (PAP) se caracteriza por la presencia de un dedo extra en posición ulnar o fibular en manos y/o pies. Existen dos fenotipos morfológicamente diferentes: tipo A (PAP-A) y tipo B (PAP-B). En PAP-A el fenotipo consiste en un dígito extra bien desarrollado, que articula con el quinto metacarpal/metatarsal. Usualmente el apéndice extra es funcional. El fenotipo de PAP-B, también denominado postminus pedunculado, consiste en un dígito que no se ha desarrollado adecuadamente, y por lo común se presenta como un apéndice de piel, con uña y carente de tejido óseo.

Epidemiología

La incidencia de polidactilia postaxial varía entre grupos étnicos [Castilla *et al.* 1973, Scott-Emuakpor y Madueke 1976]. En una muestra de 120127 nacimientos en la población estadounidense de Baltimore, Frazier observó que la incidencia de PAP en la etnia negra (incidencia de 3.6/1000 nacimientos) es doce veces mayor que en la etnia blanca (0.3/1000) [Frazier 1960]. Woolf y Myrianthopoulos observaron la misma relación entre las incidencias en una muestra de 49279 nacimientos procedentes de varias poblaciones estadounidenses, aunque la incidencia de polidactilia fue mayor (13.5/1000 para la etnia negra y 1.2/1000 la etnia blanca) [Woolf y Myrianthopoulos 1973]. Sin embargo su trabajo fue más detallado que el de Frazier, y les permitió observar que es PAP-B el tipo de polidactilia que tiene mayor incidencia en la etnia negra [Woolf y Myrianthopoulos 1973].

Castilla *et al.* encontraron que la incidencia de PAP en una muestra de 185704 nacimientos en las poblaciones de Argentina, Uruguay y Chile fue 1.01/1000 [Castilla *et al.* 1973]. La incidencia de polidactilia en Uruguay fue de 1.72/1000 mientras que para Argentina y Chile fue de 0.91/1000. Los autores atribuyen la diferencia en incidencia de PAP entre esas poblaciones a la diferente proporción del componente étnico negro en ellas, que en el caso de la población Uruguaya es de 12.85% mientras que para Argentina y Chile es de 0.49% [Castilla *et al.* 1973]. Ellos, al igual que Woolf y Myrianthopoulos, encuentran que PAP-B es responsable de la diferencia en incidencia.

Castilla y colaboradores también contrastan la prevalencia de PAP que obtuvieron en una investigación que incluyó muestras derivadas de dos estudios distintos: el Estudio Colaborativo Latinoamericano de Malformaciones Congénitas (ECLAMC) con 3 128 957 nacimientos ocurridos en el período comprendido entre 1967 y 1993; y el Estudio

Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (ECEMC) con 1 093 856 nacimientos entre 1976 y 1993 [Castilla *et al.* 1996]. En el ECLAMC la prevalencia de PAP fue de casi el doble de la del ECEMC (1.50/1000 y .67/1000 respectivamente). Al igual que en su estudio de 1973, los autores sugieren que la diferencia podía explicarse por la existencia de un mayor componente étnico negro Africano en la población sudamericana que en las poblaciones de España [Castilla *et al.* 1996].

Para otros tipos de polidactilia las tasas reportadas por ambos estudios fueron muy similares (5.4 y 5.7 en 100 000; ECLAMC y ECEMC respectivamente), lo cual sugiere que no existe un componente étnico considerable asociado a ellos. Esto significaría que los valores de prevalencia de polidactilias no postaxiales que se encuentran en la literatura son posiblemente válidos para la muchas poblaciones [Castilla *et al.* 1996]. La prevalencia de polidactilia postaxial es mucho mayor que la prevalencia de cualquiera de los otros tipos de polidactilia [Castilla *et al.* 1996]. En una muestra de 8558 individuos de Nigeria la prevalencia de PAP fue de 22.78/1000 [Scott-Emuakpor y Madueke 1976].

La polidactilia postaxial también se ha visto asociada a anomalías múltiples y síndromes reconocidos [Woolf y Myriantopoulos 1973, Castilla *et al.* 1973]. Castilla y colaboradores realizaron un análisis epidemiológico de la asociación de polidactilia con otras anomalías congénitas [Castilla *et al.* 1998]. La muestra consistió en 5 927 casos consecutivos de polidactilia. En el 15% de los casos, la polidactilia no fue la única anomalía congénita. Se observó que la asociación con otras malformaciones fue mayor para la sindactilia y menor para la polidactilia postaxial. Sin embargo, si se trata de síndromes reconocidos, la asociación con polidactilia es mayor. De hecho, al excluir los síndromes del análisis vieron desaparecer la asociación entre polidactilia y malformaciones.

Entre aquellos que involucran aberraciones cromosómicas, la polidactilia postaxial está asociada con alrededor de un 75% de casos de trisomía 13 [Castilla *et al.* 1998]. También existe evidencia de fuerte asociación con el síndrome de Meckel y de moderada asociación con el síndrome de Ellis-van Creveld [Castilla *et al.* 1998]. Una observación interesante es que el síndrome de Down presentó una asociación negativa con polidactilia postaxial.

Existen dos subtipos específicamente sindrómicos de polidactilia postaxial: polidactilia postaxial orofaciodigital (PAP-O) y el síndrome de Czeizel y Brooser (polidactilia-miopía) (PAP-CB). Lo único que se sabe con certeza de ambos es que el modo de herencia de PAP-CB corresponde a un patrón autosómico dominante.

Genética

La polidactilia postaxial parece presentarse mayoritariamente como un rasgo con herencia de tipo autosómico dominante con penetrancia incompleta [Castilla *et al.* 1973]. Sin embargo existen informes sobre familias en las cuales se presenta como un rasgo recesivo [Mohan 1969, Mollica *et al.* 1978].

El trabajo de Scott-Emuakpor y Madueke en la población de Nigeria estableció la penetrancia de PAP-B en aproximadamente 65%; la penetrancia de PAP-A es marcadamente mayor (90-100%) [Scott-Emuakpor y Madueke 1976]. Ellos no detectaron diferencias fenotípicas entre homocigotas y heterocigotas. Concluyen que la polidactilia postaxial es una condición autosómica dominante, con penetrancia variable.

Es interesante notar que la prevalencia de PAP en hombres descrita por ellos (27.1/1000) es casi el doble que en mujeres (17.9/1000) en esa población [Scott-Emuakpor y Madueke 1976]. Esto no ha pasado desapercibido para los investigadores. En un estudio publicado en 1995, Orioli analiza el patrón de herencia de polidactilia postaxial en una muestra tomada del

ECLAMC [Orioli 1995]. Orioli parte de la premisa de que el “imprinting” puede explicar diferencias en la incidencia de un fenotipo, dependiendo de si la herencia es vía paterna o materna. De hecho, muchas condiciones monogénicas, multigénicas y síndromes de malformación que varían en cuanto a fenotipo, edad de aparición parecen estar relacionadas con el sexo del progenitor que transmite el rasgo [Hall 1990].

Orioli compara las frecuencias de polidactilia postaxial entre hijos de madres y padres con y sin ancestros africanos. Como resultado obtuvo que la prevalencia es mayor en la progenie de padres negros que entre los hijos de madres negras. Sin embargo, entre padres y madres caucásicos afectados no se observaron diferencias en prevalencia de polidactilia postaxial entre los hijos [Orioli 1995]. Orioli concluye que la segregación distorsionada en favor de afectados entre la progenie de padres negros afectados puede ser interpretada como el efecto de un gen modificador ligado al sexo que actúa durante la gametogénesis sobre un gen autosómico dominante de polidactilia [Orioli 1995].

Loci de polidactilia

Un pequeño número de loci de polidactilia ha sido localizado en el genoma: cefalopolisindactilia de Greig en 7p13 [Brueton *et al.* 1988], polidactilia del pulgar trifalángo (y de polisindactilia compleja bilateral) en 7q36 [Heutink *et al.* 1994], polidactilia asociada al síndrome de Ellis-van Creveld en 4p16 [Polymeropoulos *et al.* 1996] y sinpolidactilia tipo II en 2q31 [Sarfarazi *et al.* 1995]. El clonaje posicional y el análisis de genes candidatos reveló a su vez que el gen responsable de la cefalopolisindactilia de Greig es *GLI3* [Vortkamp *et al.* 1991] y que el responsable de la sinpolidactilia de tipo II es *HOXD13* [Muragaki *et al.* 1996].

Radhakrishna y colaboradores localizaron a PAP-A, y al tipo mixto PAP-A/B en el cromosoma 7p15-q11.23 en una familia india [Radhakrishna *et al.* 1997]. Al poco tiempo el

mismo grupo demostró la presencia de una mutación de desplazamiento del marco de lectura en el gen *GLI3*, en individuos afectados de la misma familia en la cual realizó el estudio de ligamiento [Radhakrishna *et al.* 1999]. En ese mismo año, el grupo de Akarsu descubrió ligamiento entre PAP-A y el cromosoma 13q en una numerosa familia turca [Akarsu *et al.* 1997]. *GLI3* recibe también la denominación *PAP1*, pues fue el primer gen de PAP-A descubierto; el locus en 13q es denominado *PAPA2*. No existe evidencia en la literatura de que existan diferencias discernibles entre los fenotipos ocasionados por *PAP1* y *PAPA2*.

Recientemente dos nuevos loci de PAP-A han sido identificados. El primero fue identificado por Zhao y colaboradores quienes encontraron ligamiento con un locus en el cromosoma 19p13.1-13.2 en una familia china [Zhao *et al.* 2002]. El segundo, descubierto por Galjaard y colaboradores [Galjaard *et al.* 2003], se localiza en 7q21-q34 y fue detectado en una familia alemana.

La existencia de al menos cuatro loci, descubiertos en muestras de cuatro poblaciones diferentes, vinculados con el fenotipo de PAP señala claramente la presencia de varios loci. De hecho, Castilla *et al.* había sugerido ya en 1973 la existencia de heterogeneidad genética tras el desarrollo de PAP, específicamente para el caso de PAP-B [Castilla *et al.* 1973].

Existe además un factor adicional que produce confusión al realizar el análisis genético de las polidactilias: heterogeneidad alélica (también llamada variabilidad alélica). Alelos diferentes del gen *GLI3* causan fenotipos diferentes: cefalopolisindactilia de Greig [Vortkamp *et al.* 1991], polidactilia preaxial (PRAP) tipo IV, PAP-A y PAP-A/B [Radhakrishna *et al.* 1999], y el síndrome de Pallister-Hall [Kang *et al.* 1997]. Este hecho no ha pasado desapercibido y Radhakrishna *et al.* proponen la denominación genérica de “morfopatías *GLI3*” para todos aquellos fenotipos ocasionados por *GLI3*, en particular porque no existe una aparente correlación genotipo-fenotipo [Radhakrishna *et al.* 1999].

HOXD13

El proceso de desarrollo de las extremidades en los tetrápodos involucra a una amplia gama de genes, entre ellos a los genes con dominio homeotico (HOX) [Gilbert 1997]. Los tetrápodos cuentan con 4 grupos diferentes de genes HOX (sólo hay uno en invertebrados). En humanos, el grupo HOXD se encuentra localizado en el cromosoma 2q, HOXA se ubica en 7p, HOXC en 12q y HOXB en 17q.

Los genes HOX cumplen una diversidad de funciones durante el desarrollo de los organismos multicelulares y desempeñan un papel importante en la determinación del patrón metamérico corporal [Gilbert 1997, Lewis 1978] y de las extremidades de los tetrápodos [Zákány *et al.* 1997, Veraksa *et al.* 2000] y su evolución [Spring 2002, McLysaght *et al.* 2002, Zákány *et al.* 1999].

El análisis de mutaciones naturales e inducidas en diversos organismos experimentales ha permitido establecer la hipótesis de que los genes Hox 5’ “abdominal-B-like” especifican porciones individuales del eje proximo–distal de las extremidades en desarrollo [Rijli y Chambon 1997]. La hipótesis establece que los genes más hacia el extremo 5’ del cluster de

genes de las series *HOXA* y *HOXD* de genes parálogos (genes 13 al 9) se expresan más distalmente en la extremidad en desarrollo y su expresión contribuye a establecer la identidad de diferentes regiones de la extremidad [Zákány *et al.* 1997, Zákány *et al.* 2004]. *HOXA-13* y *HOXD-13* están involucrados en el desarrollo de los dedos de las extremidades. Se ha sugerido un mecanismo dependiente de dosis que regula no sólo en número sino el tamaño de los dígitos [Zákány *et al.* 1997].

Una mutación de tipo “pérdida de función” ocasionada por la expansión de un tracto de polialanina en *HOXD-13*, es responsable directa del fenotipo sindactilia tipo II (sinpolidactilia, SP), que segrega en forma autosómica dominante y se caracteriza por la presencia de anomalías en manos y pies donde los huesos metacarpales y metatarsales se han transformado en huesos cortos carpales y tarsales lo cual resulta en la unión de los dígitos [Sarfarazi *et al.* 1995, Muragaki *et al.* 1996].

EVC

El gen responsable del síndrome de Ellis-van Creveld, denominado *EVC*, fue localizado en el cromosoma 4p, ligado a *HOX7* (un gen con dominio homeobox, también conocido como *MSX1*), cerca de *FGFR3* (el gen responsable del fenotipo de acondroplasia [Shiang *et al.* 1994, Rousseau *et al.* 1994]) en 1996 [Polymeropoulos *et al.* 1996]. Análisis posteriores mostraron que *HOX7* no es el locus *EVC* [Ide *et al.* 1996], aunque éste último se localiza muy cerca de él.

Parte de las múltiples características de éste síndrome son la presencia de anomalías en la estructura del esqueleto, que incluyen PAP-A, braquidactilia y un encogimiento de las extremidades distales. En 1997, Howard y colaboradores publicaron los resultados de un estudio que encontró ligamiento entre un fenotipo reminiscente a la disostosis¹ acrofacial de

¹ Osificación defectuosa; defecto en la osificación normal de los cartílagos fetales.

Weyers y *EVC*, en una familia de 4 generaciones [Howard *et al.* 1997]. Una característica particular del fenotipo que Howard *et al.* estudiaron fue la presencia de PAP-A segregando en forma autosómica dominante. Curiosamente dos fenotipos similares, la displasia torácica asfixiante de Jeune [Curry y Hall 1979] y la disostosis acrofacial de Weyers [Langer 1969], ambos con PAP-A como una de sus características, habían sido localizados en la misma región citogenética, 4p16.

GLI3

El gen *GLI3* ("GLIoblastoma homology 3") fue originalmente aislado en virtud de su hibridación cruzada con sondas para el gene con dominio de dedos de zinc *GLI*, el cual se presenta amplificado en ciertos glioblastomas. En 1988 fue localizado en el cromosoma 7 por análisis de ADN de paneles de híbridos ratón–humano y dos años más tarde se delimitó su ubicación en 7p13, cerca de los loci de genes *HOXA*, mediante hibridación *in situ* [Ruppert *et al.* 1988, Ruppert *et al.* 1990].

Los productos génicos de *HOXA* están implicados en la determinación del patrón corporal y en el desarrollo de extremidades. Sin embargo, *GLI3* no pertenece a la familia de genes *HOX*, sino que es un miembro de la familia de genes Krüppel, integrada por genes que codifican proteínas que poseen dominios con dedos de zinc [Ruppert *et al.* 1988]. Tanto *GLI* como su homólogo *GLI3* codifican factores de transcripción, con especificidad de secuencia de unión al ADN. A pesar de su homología con *GLI*, *GLI3* no ha sido asociado con gliomas, glioblastomas, o algún otro tipo de neoplasia. Se ha observado su expresión en tejidos tales como los testículos, el miometrio, la placenta y los pulmones.

Vortkamp y colaboradores aislaron a partir de un YAC ("Yeast Artificial Chromosome") un "contig" de más de 1000kb, que incluye a *GLI3* [Vortkamp *et al.* 1994, Vortkamp *et al.*

1995]. Estructuralmente el gene *GLI3* cuenta con 14 exones, distribuidos a lo largo de 280kb de ADN genómico. Uno de los exones es de 2500pb, existen dos repeticiones en tándem de número variable (VNTR) en dos regiones intragénicas distintas y se conocen al menos cuatro polimorfismos de una base (SNPs) en la región codificante. Hacia el extremo 5' de la región estructural, corriente arriba del gene, existe una isla CpG, que forma parte de un posible elemento regulatorio. *GLI3* es transcrito a un ARNm de 8.5kb, que es traducido en una proteína de 1596 aminoácidos y 190 kilodaltons.

GLI3 es homólogo al producto del gene *ci* (cubitus interruptus) de *Drosophila*. *ci* es una proteína citoplasmática sujeta a procesamiento postraduccional. Regula a los genes *ptc* (patched), *gsb* (gooseberry) y *dpp* (decapentaplegic) [Shin *et al.* 1999]. Es un regulador de la transcripción y un componente importante de la vía de señalamiento de Hedgehog (HH), involucrada en el establecimiento del patrón de formación de extremidades y alas. El procesamiento de *ci* origina un activador de la transcripción, de 155 aminoácidos (*ci*-155) que puede ser hidrolizado, cerca de su extremo N-terminal, a un represor de 75 aminoácidos (*ci*-75) que contiene el dominio de dedos de zinc. *ci*-155 está localizada en el citoplasma, anclada al sistema de microtúbulos. En ausencia de HH, *ci*-155 es digerida por una proteasa (regulada negativamente por HH) que genera a *ci*-75 que es translocada al núcleo celular. En presencia de HH, *ci*-155 es translocada al núcleo. Los estudios de mutaciones y de fenotipos humanos en *GLI3* han establecido los paralelismos entre *ci* y *GLI3*. *GLI3* silvestre es similar a *ci*-155.

Recientemente un trabajo de investigación parece demostrar que existe un mecanismo de transducción de señales, mediado por fosfoquinasa-A (PKA) involucrado en el procesamiento de *GLI3* [Wang *et al.* 2000]. Durante el desarrollo de extremidades *GLI3* genera un potente represor, antagonizado por señalamiento de larga distancia de la proteína Sonic Hedgehog

(SHH) localizada en sitios posteriores al punto de crecimiento [Ming *et al.* 1998, Zákány *et al.* 2004, Wang *et al.* 2000]. Dicho de otra forma, *GLI3* exhibe un gradiente anteroposterior represor de la vía SHH que puede ser perturbado por mutaciones o fallos en la regulación de *GLI3* [Wang *et al.* 2000, Welsher *et al.* 2002]. Tales perturbaciones pueden producir un ámbito de malformaciones en el patrón de formación de las extremidades [Villavicencio *et al.* 2000].

Ya se mencionó con anterioridad que el gene *GLI3* ha sido identificado como el responsable de varios síndromes y malformaciones. Así, mutaciones en *GLI3* se han observado en la cefalopolisindactilia de Greig (GCPS), el síndrome de Pallister-Hall y la polidactilia postaxial tipo A [Radhakrishna *et al.* 1999, Vortkamp *et al.* 1991, Kang *et al.* 1997, Villavicencio *et al.* 2000]. El análisis mutacional de 24 casos de GCPS permitió identificar 15 nuevas mutaciones, presentes en estado heterocigota en los alelos de *GLI3* de los pacientes. Éstas se localizaron a lo largo de la región codificante. La mayor parte de ellas truncan a la proteína principalmente del lado N-terminal o en la región central que codifica el dominio de unión al ADN. Se cree que las mutaciones que se localizan hacia el extremo C-terminal de los dedos de zinc afectan funciones adicionales de la proteína. Esto debido a que en estudios de transfección con construcciones que involucraron a dos dominios ubicados hacia el extremo C-terminal se observó capacidad de transactivación. Además, la actividad de *GLI3*^{GCPS} es diferente a la de ci-155. Por tanto, se postula que el mecanismo tras GCPS puede ser la haploinsuficiencia, debido a la pérdida completa de una copia génica o de la función transactivadora del factor de transcripción codificado por uno de los alelos [OMIM 165240].

Una mutación de desplazamiento del marco de lectura, debida a la delección de un nucleótido, es la responsable de PAP-A/B en dos familias [Radhakrishna *et al.* 1999]. El cambio del marco de lectura ocasiona que se produzca una proteína anormal de 1245

aminoácidos. Mientras que una mutación de pérdida de sentido es responsable del fenotipo de PRAP- IV observado en otra familia [Radhakrishna *et al.* 1999]. En cuanto al síndrome de Pallister-Hall, se ha encontrado una mutación del tipo sin-sentido [Radhakrishna *et al.* 1999]. Se sabe que la proteína mutante resultante posee una función y distribución citoplasmática similar a la de ci-75.

Existe la hipótesis de que ciertos tipos de mutaciones podían estar asociados a uno u otro de los síndromes antes mencionados. Pero se ha visto que tal inferencia no siempre es correcta.

GLI3 parece ser un gene con una función compleja. Es posible que la diversidad fenotípica (alelismo) asociada a él guarde relación con la acción epistática que sobre él tienen otros genes y con los posibles efectos pleiotrópicos de *GLI3* sobre otra amplia gama de genes involucrados en el desarrollo de extremidades.

PAPA2

Demostración directa de que existe heterogeneidad genética tras el fenotipo PAP-A se dió al encontrarse ligamiento entre éste y loci en 13q21-32 [Akarsu *et al.* 1997]. Akarsu *et al.* usaron un enfoque de genes candidatos, y descartaron a *GLI3*, así como 1q, 2q y 4p, como posibles responsables de PAP-A en una familia turca. Posteriormente detectaron ligamiento con una serie de loci en 13q, entre D13S800 y D13S154, región en la que no observaron ningún recombinante [Akarsu *et al.* 1997]. El máximo puntaje LOD fue 3.61 para D13S1230 luego de que el estado de afección de un individuo fue cambiado de “normal” a “desconocido” [Akarsu *et al.* 1997]. Desafortunadamente no existe información adicional referente a este hallazgo.

PAPA3

Un tercer locus de PAP-A fue descrito por Zhao *et al.* En 2002 [Zhao *et al.* 2002]. El nuevo locus, denominado *PAPA3*, se localiza en 19p13.1-13.2 y fue descubierto segregando en una familia china que presentaba en su fenotipo PAP-A/B. El máximo puntaje LOD fue detectado para D19S221 ($\theta=0$, $Z=5.85$), y la región crítica de ligamiento fue situada entre D19S1165 y D19S929, contigua a D19S221 en dirección 19q-ter [Zhao *et al.* 2002].

PAP-A/B y PAP-B

En 2003 Galjaard *et al.* publicó la ubicación de un nuevo locus para PAP-A/B en cromosoma 7 [Galjaard *et al.* 2003]. Usando ADN de 31 individuos, 11 de ellos afectados, pertenecientes a una familia alemana de 6 generaciones Galjaard *et al.* logró detectar ligamiento con los loci D7S1799 y D7S500 luego de realizar un tamizaje genómico.

Ese mismo año, Galjaard *et al.* describe el caso de un hombre que presenta PAP-B en sus manos, de forma aislada, mientras que su hija presenta un fenotipo extendido, que incluye PAP-B, retardo mental, y una serie adicional de anomalías [Galjaard *et al.* 2003b]. El análisis citogenético determinó que ambos presentan una translocación balanceada $t(4;7)(p15.2;q35)$, siendo el hombre un mosaico de dicha translocación.

Mediante el uso de FISH (“Fluorescent *In Situ* Hibridization”) con BACs (“Bacterial Artificial Chromosomes”) y PACs (“P-1 derived Artificial Chromosomes”) derivados del genoma humano para cromosomas 4 y 7 lograron determinar que la translocación afecta a la región que contiene a *CASPR2* y *LOC206654* en 7q36.1 y a *SLIT2* en 4p15.31 [Galjaard *et al.* 2003b]. *CASPR2* no parece ser un buen candidato, pues únicamente se expresa en el sistema nervioso central y periférico. *LOC206654* es un posible gen, predicho por análisis

bioinformáticos de la secuencia del genoma humano, del cual no existe información adicional. *SLIT2* por otro lado, es un gen involucrado en la migración de precursores neuronales y se sabe que se expresa en las zonas de crecimiento de las extremidades en desarrollo [Galjaard *et al.* 2003b].

El descubrimiento de t(4;7)(p15.2;q35) vinculado con PAP-B de forma aislada (en una persona) es la única evidencia existente hasta el momento que asocia únicamente a PAP-B con dos regiones concretas del genoma humano.

Materiales y métodos

Material de estudio

Esta investigación contó con 51 muestras de ADN genómico procedentes de los miembros de una familia costarricense (F01) de cinco generaciones que posee individuos con el fenotipo PAP-B en cuatro generaciones (Figura 1). Las muestras fueron colectadas en el año 1994⁽²⁾.

En total 20 miembros de la familia presentan el fenotipo PAP-B en manos y/o pies. Seis miembros adicionales no presentan dicho fenotipo pero éste está presente en su progenie. El ADN corresponde a 17 individuos con PAP-B y a 3 de los individuos (II-5, III-2, III-6) que no presentaron el fenotipo pero que se presume portan la condición. En otras palabras, se asume que no hay heterogeneidad genética tras la determinación del fenotipo PAP-B en F01.

Modelo de herencia

Tal y como se ha descrito en la literatura [Castilla *et al.* 1973, Woolf y Myriantopoulos 1973, Zhao *et al.* 2002, Galjaard *et al.* 2003, Galjaard *et al.* 2003b] se asumió un modelo de herencia de tipo autosómico dominante con penetrancia incompleta. Además, se presume que la mutación responsable fue introducida una única vez en F01, por el individuo I-1 o I-2.

² El origen de este estudio fue inusual. Una alumna del curso "Genética Molecular" impartido por el Dr. Pedro León Azofeifa, y con el fenotipo PAP-B se interesó por localizar el gen involucrado en la determinación de su propio fenotipo –convirtiéndose entonces en probando e investigador del estudio–. En conjunto con el Dr. León, dicha alumna obtuvo una muestra de sangre, voluntariamente, de todos sus familiares vivos. Dado que en la fecha en que se colectaron las muestras de sangre en Costa Rica eran incipientes los comités de ética para este tipo de estudio no se obtuvo formalmente el consentimiento informado de los sujetos que donaron las muestras. Se cuenta, sin embargo, con un consentimiento firmado por la estudiante en nombre de la familia.

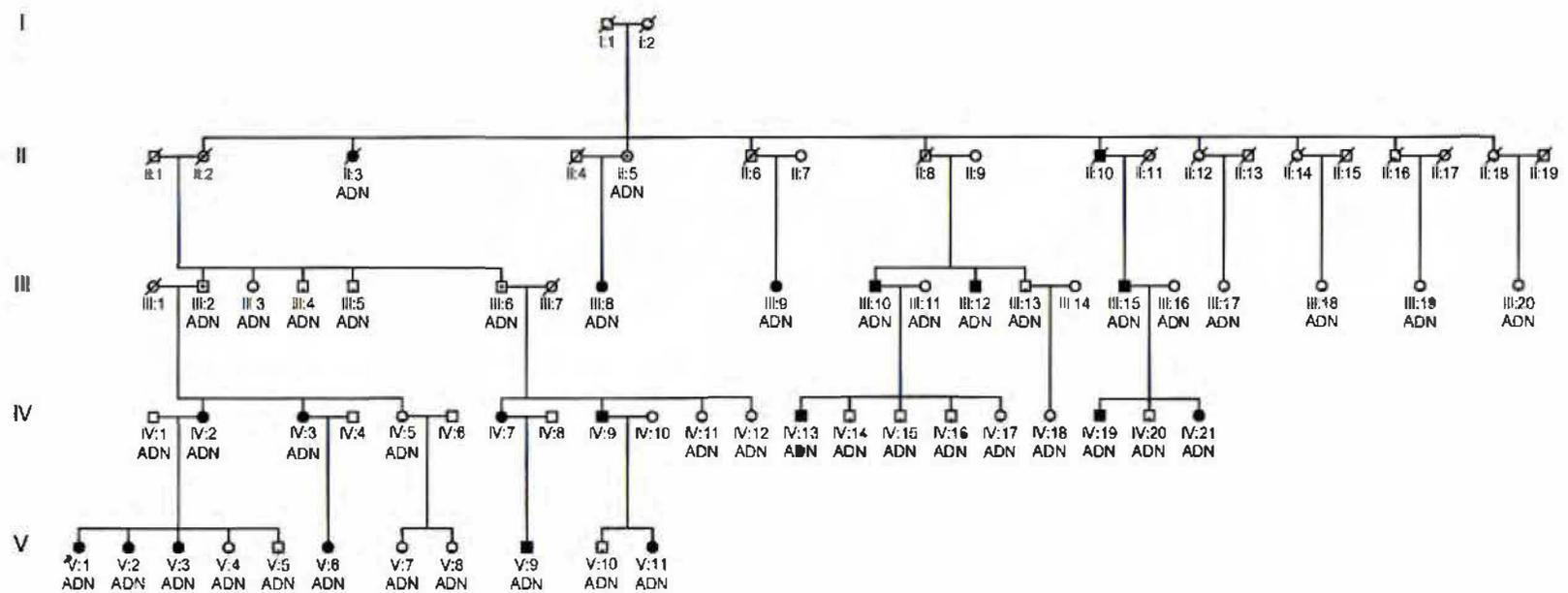


Figura 1: Genealogía de F01. Los individuos afectados aparecen en negro, los individuos que se asume portan la condición están representados por un punto negro. El signo de interrogación indica que el fenotipo observado es normal, pero que pueden ser portadores de la condición.

Fenotipo

Para efectos de este estudio a los 17 individuos con el fenotipo PAP-B y a los seis individuos que se supone portadores no penetrantes de la condición se les asignó el fenotipo “afectado”. Todos los cónyuges de descendientes de I-1 y I-2 fueron considerados “no-afectados”, debido a que no existe evidencia de matrimonios consanguíneos y que se presume que la mutación fue introducida por los individuos I-1 o I-2. Todos los restantes individuos recibieron la asignación de fenotipo “desconocido”.

Loci candidatos

Como resultado de la revisión de la literatura científica pertinente fueron seleccionados posibles loci candidatos. El Cuadro 1 presenta la lista de los candidatos, los fenotipos a los cuales se han vinculado, y los puntajes LOD de los loci marcadores que los ubicaron en un sitio concreto del genoma humano.

Loci marcadores

Se seleccionaron loci de microsatélites polimórficos localizados a distancias de 0-7 cM de los principales loci candidatos, con el fin de obtener genotipos para realizar análisis de ligamiento. El Cuadro 2 muestra los loci marcadores seleccionados para cada uno de los loci candidatos.

Loci en cromosomas 3 y 8 fueron también usados debido a que se contó con iniciadores fluorescentes para ellos, por ser parte de los paneles comerciales de iniciadores que se adquirieron para loci en cromosomas 4 y 7. El mapa genético de todos los loci marcadores usados se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 1: Loci candidatos.

Locus candidato	Fenotipo	Cromosoma	cM*	Evidencia de ligamiento entre el fenotipo y loci marcadores			Fuente
				Locus [†]	cM [†]	MLOD [†]	
HOXD13	Polisindactilia	2	182	D2S111	169	4,71	Sarfrazi <i>et al.</i> 1995 Muragaki <i>et al.</i> 1996
				D2S326	178	3,75	
				D2S1238	178	5,91	
				HOXD8	182	8,73	
				D2S1244	182	4,59	
				D2S300	183	3,88	
				D2S138	183	5,12	
				D2S148	183	6,3	
				D2S324	184	4,37	
				D2S1391	186	7,33	
EVC	Síndrome de Ellis-Van Creveld	4	12	HOX7/MSX1	8	6,91	Ide <i>et al.</i> 1996, Howard <i>et al.</i> 1997, Polymeropoulos <i>et al.</i> 1996
				D4S827	12	3,77	
				D4S431	12	4,57	
				D4S3007	13	3,37	
				D4S394	16	2,49	
GLI3/PAP-A1	PAP, Cefalopolisindactilia de Greig	7	64	D7S521	62	3,17	Radhakrishna <i>et al.</i> 1997
				D7S691	64	2,89	
				D7S667	67	3,01	
				D7S1830	73	3,01	
				D7S801	76	4,21	
PAP-A/B	PAP	7	110- 150	D7S1799	113	3,18	Galjaard <i>et al.</i> 2003
				D7S525	121	2,44	
				D7S500	141	2,64	
				GATA63F08	150	2,00	
PAP-A2	PAP	13	55- 75	D13S800	55	?	Akarsu <i>et al.</i> 1997
				D13S1230	68	3,61	
				D13S154	75	?	
PAP-A3	PAP	19	32- 42	D19S583	32	3,73	Zhao <i>et al.</i> 2002
				D19S584	34	4,9	
				D19S558	34	3,24	
				D19S221	36	5,85	
				D19S840	36	5,02	
				D19S1165	37	2,32	
				D19S252	42	2,92	
				D19S929	42	2,95	
				D19S226	42	5,42	
PAP-B (4;7) p15.2;q35	PAP, Retardo mental	4p15.2	25	SLIT2	25	-	Galjaard <i>et al.</i> 2003b
		7q35	149	CASPR2	149	-	

*Ubicación aproximada del locus en cM a partir de p-ter

†Loci que permitieron detectar ligamiento entre el locus candidato y el fenotipo al que fue vinculado, en la fuente que se cita. Los loci usados en esta investigación se encuentran en negrita

†Puntaje LOD máximo.

Cuadro 2: Loci marcadores seleccionados para cada uno de los loci candidatos

Locus candidato	Locus marcador	Distancia (cM)
HOXD13	D2S103	6
EVC	HOX7	4
	D4S2935	2
GLI3/PAP-A1	D7S691	0
PAP-A/B	D7S515	ACL*
	D7S486	
	D7S530	
	D7S640	
	D7S684	
PAP-A2	D7S1824	ACL
	D13S1320	
PAP-A3	D13S1296	ACL
	D19S865	
PAP-B t(4;7)p15.2;q35	D19S566	ACL
	D4S2935	
	D4S419	
	D4S391	AT*
	D7S684	
	D7S1824	
	D7S661	
D7S636	AT	
D7S798		

*Área crítica de ligamiento.
*Área de la translocación.

Cuadro 3: Mapa genético de los loci marcadores usados en el estudio

Locus*	Cromosoma	cM	Locus*	Cromosoma	cM
<u>D2S103</u>	2	188	D7S486	7	124
<u>D2S72</u>	2	199	D7S530	7	135
<u>PAX3</u>	2	218	D7S640	7	138
D3S1297	3	8	D7S684	7	147
D3S1304	3	22	<u>D7S1824</u>	7	150
D3S1300	3	80	D7S661	7	155
D3S1292	3	147	D7S636	7	162
D3S1569	3	158	D7S798	7	169
D3S1262	3	201	D8S277	8	8
D3S1601	3	214	D8S550	8	21
<u>HOX7</u>	4	8	D8S505	8	61
D4S2935	4	14	D8S285	8	71
D4S419	4	33	D8S270	8	104
D4S391	4	44	D8S284	8	144
D4S1592	4	70	<u>D12S835</u>	12	6
D4S1572	4	108	<u>D12S96</u>	12	68
D4S413	4	158	D13S1320	13	49
D4S415	4	181	D13S1296	13	53
D4S426	4	207	D17S805	17	47
D7S531	7	5	D17S927	17	58
D7S507	7	29	D17S1795	17	68
D7S493	7	35	D17S957	17	80
<u>D7S691</u>	7	64	D19S865	19	32
D7S519	7	69	D19S566	19	47
<u>D7S527</u>	7	109			
D7S515	7	112			

+Los nombres de los loci cuyos iniciadores fueron convencionales (marcadores convencionales) se encuentran subrayados.

*Ubicación del locus en cM a partir de p-ter

Análisis de ligamiento

Los genotipos obtenidos fueron analizados en busca de inconsistencias de segregación en la transmisión mendeliana de los alelos (por ejemplo, no paternidades o errores de asignación de genotipos) mediante el uso del software PEDCHECK 1.1 [O'Connell y Weeks 1997]. Únicamente se observaron problemas en la segregación mendeliana de alelos. Aquellos genotipos que dieron problemas fueron descartados.

El análisis de ligamiento se realizó con el software LINKAGE 5.2 [Lathrop *et al.* 1984] y SIMWALK2.83 [Sobel y Lange 1996]. Con ellos se realizó el cálculo del estadístico puntaje LOD (“LOD score”), a partir de la información de los genotipos obtenidos para cada marcador. Los genotipos de cada polimorfismo fueron sometidos a un análisis de ligamiento paramétrico de dos puntos, usando el programa MLINK del paquete LINKAGE, y paramétrico multi-punto usando SIMWALK. En los análisis se usó el fenotipo de individuos afectados, no afectados y desconocido. Sin embargo, debido a que únicamente los cónyuges de descendientes de los individuos I-1 y I-2 recibieron el fenotipo “no afectados” el análisis de ligamiento se comporta como un análisis de “sólo afectados”. Para el análisis de dos puntos se obtuvo el valor del puntaje LOD para las seis fracciones de recombinación comprendidas entre 0 y 0.5 inclusive.

El modelo de herencia que usado para el análisis de ligamiento paramétrico fue autosómico dominante, con penetrancia de 78%. La frecuencia del alelo normal del locus PAP-B se estableció arbitrariamente en 0.999 y, consecuentemente, la frecuencia del alelo causal del fenotipo (alelo anormal) fue 0.001. De esa forma se ajustó el modelo de herencia a la suposición implícita de que todas las copias del alelo anormal que segregan en la familia F01 son idénticos por descendencia (IBD). Para todos los análisis se consideró que no existen

fenocopias en la muestra, y se asumió una tasa de recombinación igual para hombres y mujeres.

Las frecuencias alélicas correspondientes a cada uno de los loci marcadores polimórficos fueron estimadas usando el programa DOWNFREQ 1.1 [Goring y Terwilliger 2000].

Simulaciones

Simulaciones para establecer el poder de cada marcador para detectar ligamiento, así como el efecto que habría tenido en el puntaje LOD la inclusión y/o recolección de información genética adicional (por ejemplo, genotipos de miembros adicionales de la familia para los loci marcadores), fueron realizadas con el software SLINK 2.61 [Ott 1989, Weeks *et al.* 1990]. Éstas consistieron en la simulación de genotipos independientemente para cada locus marcador, bajo la suposición de ligamiento con el fenotipo PAP-B. El estado de afección de los individuos no fue modificado y los parámetros usados para el cálculo del puntaje LOD fueron los mismos que se usaron para el análisis de ligamiento. En cada simulación se generaron 50 réplicas de F01 para cada locus marcador.

Las simulaciones realizadas fueron denominadas S1 a S4. S1 consistió en la simulación de genotipos para todos aquellos individuos cuyos genotipos fueron obtenidos de forma empírica en el laboratorio. S2 simuló genotipos para todos los individuos de F01 cuyo ADN fue o podría haber sido colectado para esta investigación (es decir, si se hubieran reclutado más miembros de F01). S3 simuló únicamente los genotipos de los individuos para los cuales se contó con ADN pero cuyos genotipos no fueron obtenidos de forma empírica. S4 fue similar a S2, sólo que se simularon genotipos para individuos cuyo ADN no fue recolectado.

S1 y S2 evalúan el poder de F01, dados los individuos usados para la obtención de genotipos y las frecuencias alélicas observadas de los loci marcadores. S3 y S4 valoran el

efecto que podrían haber tenido sobre el puntaje LOD la recolección de genotipos faltantes en la muestra de individuos cuyo ADN estuvo disponible y la recolección de información genética de individuos clave adicionales.

Metodologías de laboratorio

Se utilizaron dos protocolos diferentes de amplificación de ADN, dependiendo el tipo de iniciador usado: marcado con un cromóforo fluorescente (iniciadores fluorescentes) o no (iniciadores convencionales). Todos los iniciadores fluorescentes fueron derivados de los paneles 6, 11 y 12 del “ABI PRISM Linkage Mapping Set Versión 2” de PE Applied Biosystems.

En el caso de los iniciadores no fluorescentes, cuyos productos de amplificación fueron revelados con plata, el protocolo aquí descrito fue ajustado para optimizar el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada iniciador. Esto fue requerido porque, contrario a los iniciadores fluorescentes, los iniciadores no fluorescentes no han sido optimizados para exactamente las mismas condiciones de reacción. El Cuadro 4 resume la descripción de ambos protocolos de amplificación.

Los individuos CEPH 1331-1 y 1331-2 fueron incluidos en cada corrida de amplificación como controles.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación y detección de los productos de PCR (alelos) fue realizada de forma convencional, para productos no marcados con fluorescencia, y de forma automática utilizando el Software GeneScan® v3.7 y GenoTyper® v3.7 de Applied Biosystems en el

secuenciador automático ABI-377 del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM).

Todas las detecciones manuales fueron digitalizadas mediante el uso de un scanner. Dicho documento digital se conservó como registro. Todas las detecciones manuales de alelos fueron realizadas a partir de una copia impresa de dicho documento, leído independientemente por tres colaboradores. Los alelos fueron asignados por consenso respecto a su identidad entre los tres lectores. La identidad de los alelos fue establecida como su tamaño en pares de bases siempre que fue posible. Para ello se usaron como referencia los alelos de los individuos CEPH, la información disponible en bases de datos en Internet (www.gdb.org, www.ncbi.nlm.nih.gov) referente a los tamaños de los alelos descritos en la literatura y el marcador “10 bp DNA Ladder” de GibcoBRL/Life Technologies.

Las detecciones automáticas generaron documentos digitales *per se*, que fueron conservados como registro. Los electroferogramas fueron evaluados manualmente para verificar la confiabilidad en la identificación de alelos y las asignaciones de genotipos. La identidad de los alelos fue establecida como su tamaño en pares de bases, determinado por el secuenciador automático en relación al estándar de tamaño de fragmentos GS-500 HD ROX de Applied Biosystems.

Cuadro 4: Reacciones para la amplificación de microsatélites

Reacción de PCR				
Iniciadores regulares*		Iniciadores marcados con cromóforo fluorescente*		
Reactivo	Cantidad	Reactivo	Cantidad	
Tampón PCR 10x	1.2µl	Mezcla pre-PCR de Applied Biosystems	9µl	
dNTPs 2mM	1.2µl			
MgCl ₂ 25mM	0.48µl			
Taq polimerasa	XU			
Iniciador directo (F)	0.1-0.2µM final	Mezcla de iniciadores 10µM (2 iniciadores, 5µM de cada uno)	1µl	
Iniciador reverso (R)	0.1-0.2µM final			
ADN 10ng/µl	3µl	ADN 30ng/µl	2µl	
dd H ₂ O	ajustar a 12µl	dd H ₂ O	3µl	
Condiciones de reacción (Termociclador PJ-100)				
Paso	Tiempo	Temperatura	Tiempo	Temperatura
1	3min	95°C	12min	95°C
2	45s	95°C	15s	94°C
3	1min 20s	57°C	15s	55°C
4	45s	72°C	30s	72°C
5	pasos 2, 3 y 4	9 ciclos	pasos 2, 3 y 4	10 ciclos
6	45s	90°C	15s	89°C
7	1min 20s	56°C	15s	55°C
8	45s	72°C	30s	72°C
9	pasos 6,7 y 8	27 ciclos	pasos 6,7 y 8	20 ciclos
10	5min	72°C	10min	72°C

+Según protocolo estándar para amplificación de microsatélites en el CIBCM

* Según protocolo "True-Aliel" de Applied Biosystems

Geles de secuenciación manuales

Se utilizaron cámaras para electroforesis Life Technologies S2 con geles de poliacrilamida al 6%, o al 4%, de 0.4mm de espesor. Los geles se prepararon de la siguiente manera:

1. Mezclar 20ml de acrilamida–bisacrilamida al 20% con 40ml de urea 7.0M y agitar manualmente.
2. Filtrar la mezcla a través de un filtro Millipore® 1.2µm
3. Agregar 30 ul de TEMED® y 120ul de persulfato de amonio al 25%
4. Chorrear el gel, usando jeringas plásticas de 20ml, en el molde de la cámara para electroforesis previamente preparado
5. Dejar polimerizar a temperatura ambiente

Geles de secuenciación automática

La preparación de los geles que fueron sometidos a electroforesis en el equipo ABI-377 según el protocolo suministrado por el fabricante del equipo (Applied Biosystems).

Tinción con nitrato de plata de geles de poliacrilamida

El siguiente es el protocolo que fue usado para la tinción con plata de geles de poliacrilamida manuales:

1. Sacar gel de la cámara de electroforesis instantes después de que ésta concluye.
2. Desarmar el molde y retirar el vidrio que sostiene el gel. Ubicarlo en una bandeja de 600ml de capacidad.
3. Cubrir el gel con ácido acético 7.5% y colocarlo en agitación por 10 minutos.
4. Lavar con agua destilada durante dos minutos en agitación. Repetir tres veces.
5. Cubrir con una mezcla fresca de 600ml de nitrato de plata y 900µl de formaldehído al 37%.
6. Lavar rápidamente (no más de 10 segundos) con agua destilada.

7. Cubrir con una disolución de 18g de carbonato de sodio en 600ml de agua destilada. Colocar en agitación entre 5-10 minutos hasta apreciar las bandas del marcador de peso molecular y de los productos de PCR.
8. Descartar el carbonato de sodio y colocar ácido acético al 7.5% hasta cubrir el gel. Agitar durante 10 minutos.
9. Lavar con agua destilada, en agitación, durante 10 minutos. Descartar el agua y dejar secar el gel.

Resultados

De la muestra original de 51 ADN, 6 no pudieron ser inequívocamente identificados en la genealogía de la familia F01 debido a la falta de registros, por lo que fueron usados para optimizar las reacciones de PCR y posteriormente como controles positivos de amplificación. De las restantes 45 muestras sólo 44, incluyendo las 17 muestras de individuos afectados con PAP-B y las 3 muestras de presuntos portadores, estuvieron disponibles para su análisis.

A partir del ADN genómico de 44 individuos (20 afectados) de F01 se obtuvieron 310 genotipos de 9 loci mediante la amplificación con iniciadores convencionales, y 1094 genotipos de 41 loci usando iniciadores fluorescentes. En total fueron obtenidos 1404 genotipos para 50 loci, distribuidos en 9 cromosomas (Cuadro 5).

Cuadro 5: Número de genotipos obtenidos para cada locus marcador usado en el estudio.

Locus	Genotipos	Locus	Genotipos	Locus	Genotipos	Locus	Genotipos
D2S103	37	D4S391	15	D7S486	29	D8S284	30
D2S72	40	D4S1592	32	D7S530	35	D12S835	33
PAX3	39	D4S1572	32	D7S640	35	D12S96	12
D3S1297	15	D4S413	31	D7S684	30	D13S1320	11
D3S1304	25	D4S415	32	D7S1824	36	D13S1296	12
D3S1300	33	D4S426	33	D7S661	30	D17S805	29
D3S1292	31	D7S531	26	D7S636	30	D17S927	10
D3S1569	32	D7S507	29	D7S798	30	D17S1795	10
D3S1262	31	D7S493	30	D8S277	30	D17S957	10
D3S1601	32	D7S691	37	D8S550	30	D19S865	16
HOX7	37	D7S519	29	D8S505	30	D19S566	15
D4S2935	33	D7S527	39	D8S285	30		
D4S419	32	D7S515	29	D8S270	30		

En general, los loci fueron polimórficos e informativos para el análisis de ligamiento (Cuadro 6, Figura 2). Si se observa el número de genotipos obtenidos para cada locus, se

observará que es inferior al número de muestras de ADN disponibles para análisis. Debido a que el análisis de ligamiento usado por esta investigación es primordialmente de tipo “sólo-afectados”, individuos cuyo fenotipo es “desconocido” aportan poca información para este tipo de análisis. Así, individuos como III-3, III-4, III-5, III-17, III-18, III-19 y III-20 pueden ser obviados hasta que una señal de ligamiento positiva haya sido detectada.

El número de genotipos obtenidos para loci en cromosomas 12, 13, 17 y 19 fue aún menor. Para loci en estos cromosomas, se usaron únicamente individuos de la cuarta y quinta generación de F01, con el fin de conservar ADN de individuos de la segunda y tercera generación. Las muestras de ADN de individuos como II-3 y II-5 son muy valiosas en términos de estudios de ligamiento futuros y no pueden ser obtenidas con facilidad otra vez. Además, simulaciones realizadas (luego de que marcadores en cromosomas 2, 3, 4, 7 y 8 fueron analizados) mostraron que el uso de unos pocos individuos clave debería ser suficiente, bajo el modelo de herencia establecido, para detectar una señal positiva de ligamiento. Por tales motivos, sólo se usaron unos cuantos individuos clave: F01-1, sus hermanos afectados (F01-2, F01-12) y sus padres (F01-8, F01-42); F01-24 y sus padres (F01-20, F01-23); y F01-34, su hermana F01-37 y sus padres (F01-35, F01-33).

Los resultados del análisis de ligamiento de dos puntos entre cada uno de los loci marcadores y el fenotipo PAP-B se resumen en el Cuadro 7. Tal como los resultados indican, no se detectó ligamiento. Ninguno de los loci marcados dió puntajes $LOD \geq 2$ y, por el contrario el puntaje LOD fue ≤ -2 para muchos de ellos. El máximo puntaje LOD obtenido fue 1.94 para el locus D3S1601.

Cuadro 6: Número de alelos, frecuencia e "informatividad" de los loci marcadores

Locus	Alelos	Frecuencia*	PIC*	Locus	Alelos	Frecuencia*	PIC*
D2S103	6	0,29 (7)	0,75	D7S486	8	0,44 (6)	0,69
D2S72	7	0,40 (4)	0,70	D7S530	6	0,40 (4)	0,68
PAX3	9	0,25 (9)	0,91	D7S640	11	0,35 (3)	0,81
D3S1297	6	0,25 (5)	0,77	D7S684	8	0,39 (2)	0,74
D3S1304	5	0,31 (2)	0,75	D7S1824	8	0,24 (2)	0,84
D3S1300	6	0,32 (1)	0,75	D7S661	6	0,38 (4)	0,71
D3S1292	7	0,22 (1)	0,80	D7S636	13	0,13 (7)	0,94
D3S1569	8	0,27 (1)	0,82	D7S798	8	0,21 (6)	0,83
D3S1262	11	0,35 (6)	0,82	D8S277	9	0,36 (2)	0,80
D3S1601	8	0,30 (1)	0,80	D8S550	8	0,32 (6)	0,80
HOX7	4	0,67 (1)	0,47	D8S505	6	0,45 (3)	0,70
D4S2935	4	0,39 (1)	0,62	D8S285	4	0,37 (1)	0,63
D4S419	6	0,33 (1)	0,69	D8S270	5	0,59 (7)	0,57
D4S391	6	0,29 (4)	0,75	D8S284	8	0,42 (4)	0,72
D4S1592	7	0,37 (1)	0,73	D12S835	4	0,45 (1)	0,62
D4S1572	7	0,33 (4)	0,72	D12S96	3	0,54 (3)	0,47
D4S413	9	0,37 (2)	0,80	D13S1320	5	0,39 (1)	0,70
D4S415	4	0,56 (1)	0,51	D13S1296	3	0,50 (3)	0,54
D4S426	6	0,27 (3)	0,77	D17S805	8	0,14 (1)	0,81
D7S531	4	0,55 (1)	0,55	D17S927	4	0,50 (1)	0,61
D7S507	12	0,12 (8)	0,90	D17S1795	5	0,35 (5)	0,68
D7S493	11	0,17 (6)	0,90	D17S957	3	0,70 (3)	0,41
D7S691	7	0,31 (4)	0,76	D19S865	9	0,21 (5)	0,84
D7S519	5	0,28 (1)	0,72	D19S566	8	0,18 (3)	0,86
D7S527	8	0,38 (2)	0,73				
D7S515	8	0,26 (5)	0,83				

*Estimación de máxima verosimilitud (MLE) de la frecuencia del alelo más común. El código correspondiente al alelo se encuentra entre paréntesis.

**"Polymorphism Information Content"

Cuadro 7: Puntaje LOD obtenido para cada locus marcador mediante el análisis de ligamiento de dos puntos.

Locus macador	Puntaje LOD para la fracción de recombinación $\theta =$												Máximo LOD	Mínimo θ	
	0	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,10	0,20	0,30	0,40	0,49	LOD			θ
D2S103	-3,17	-2,89	-2,66	-2,45	-2,26	-2,09	-1,39	-0,55	-0,14	0,02	0,01	0,02	0,40	-3,17	0
D2S72	-2,62	-2,03	-1,71	-1,48	-1,30	-1,16	-0,68	-0,24	-0,06	0,00	0,00	0,00	0,49	-2,62	0
PAX3	-6,03	-4,96	-4,39	-3,98	-3,65	-3,37	-2,38	-1,25	-0,61	-0,21	-0,01	-0,01	0,49	-6,03	0
D3S1297	-1,19	-0,99	-0,85	-0,74	-0,66	-0,59	-0,35	-0,13	-0,05	-0,01	0,00	0,00	0,49	-1,19	0
D3S1304	-1,19	-0,99	-0,85	-0,74	-0,66	-0,59	-0,35	-0,13	-0,05	-0,01	0,00	0,00	0,49	-1,19	0
D3S1300	-5,78	-4,42	-3,74	-3,27	-2,92	-2,64	-1,74	-0,86	-0,40	-0,14	-0,01	-0,01	0,49	-5,78	0
D3S1292	-4,30	-3,77	-3,48	-3,25	-3,04	-2,84	-2,05	-1,06	-0,52	-0,20	-0,02	-0,02	0,49	-4,30	0
D3S1569	-4,08	-3,19	-2,78	-2,50	-2,29	-2,11	-1,46	-0,68	-0,26	-0,07	0,00	0,00	0,49	-4,08	0
D3S1262	-1,83	-1,03	-0,63	-0,37	-0,18	-0,03	0,41	0,67	0,61	0,37	0,04	0,67	0,20	-1,83	0
D3S1601	1,59	1,77	1,86	1,90	1,93	1,94	1,86	1,48	1,01	0,51	0,05	1,94	0,05	0,05	0,49
HOX7	-1,10	-0,94	-0,84	-0,76	-0,71	-0,66	-0,52	-0,36	-0,21	-0,08	-0,01	-0,01	0,49	-1,10	0
D4S2935	-0,54	-0,50	-0,45	-0,40	-0,35	-0,31	-0,15	0,01	0,06	0,05	0,01	0,06	0,30	-0,54	0
D4S419	-3,76	-3,22	-2,84	-2,56	-2,34	-2,16	-1,59	-1,04	-0,69	-0,35	-0,03	-0,03	0,49	-3,76	0
D4S391	-2,36	-1,89	-1,60	-1,39	-1,22	-1,09	-0,64	-0,22	-0,04	0,02	0	0,02	0,40	-2,36	0
D4S1592	-1,05	-0,77	-0,59	-0,46	-0,35	-0,25	0,07	0,32	0,28	0,15	0,02	0,32	0,20	-1,05	0
D4S1572	-3,25	-2,88	-2,66	-2,48	-2,33	-2,19	-1,63	-0,86	-0,40	-0,14	-0,01	-0,01	0,49	-3,25	0
D4S413	-5,50	-4,32	-3,75	-3,38	-3,11	-2,90	-2,27	-1,67	-1,12	-0,50	-0,04	-0,04	0,49	-5,50	0
D4S415	0,01	-0,01	-0,02	-0,03	-0,04	-0,05	-0,07	-0,05	-0,01	0	0	0,01	0	-0,07	0,10
D4S426	-3,25	-2,15	-1,60	-1,24	-0,97	-0,77	-0,20	0,18	0,22	0,14	0,02	0,22	0,30	-3,25	0
D7S531	-1,16	-1,01	-0,88	-0,78	-0,69	-0,61	-0,35	-0,13	-0,05	-0,01	0	0	0,49	-1,16	0
D7S507	-4,01	-3,25	-2,88	-2,63	-2,45	-2,31	-1,81	-1,09	-0,56	-0,23	-0,02	-0,02	0,49	-4,01	0
D7S493	-0,24	-0,26	-0,24	-0,21	-0,17	-0,12	0,07	0,22	0,16	0,05	0,00	0,22	0,20	-0,26	0,01
D7S691	-4,79	-4,01	-3,61	-3,33	-3,11	-2,94	-2,36	-1,60	-0,94	-0,40	-0,03	-0,03	0,49	-4,79	0
D7S519	-3,69	-3,20	-2,82	-2,51	-2,26	-2,06	-1,35	-0,63	-0,27	-0,09	-0,01	-0,01	0,49	-3,69	0
D7S527	-3,69	-2,76	-2,25	-1,91	-1,65	-1,44	-0,82	-0,31	-0,14	-0,06	-0,01	-0,01	0,49	-3,69	0
D7S515	-2,43	-2,38	-2,28	-2,17	-2,05	-1,93	-1,42	-0,74	-0,35	-0,13	-0,01	-0,01	0,49	-2,43	0
D7S486	-1,62	-1,16	-0,95	-0,81	-0,71	-0,63	-0,38	-0,17	-0,09	-0,04	0	0	0,49	-1,62	0
D7S530	-2,54	-2,15	-1,94	-1,78	-1,66	-1,56	-1,14	-0,55	-0,24	-0,08	0	0	0,49	-2,54	0
D7S640	-2,46	-1,67	-1,31	-1,08	-0,91	-0,79	-0,42	-0,09	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01	0,49	-2,46	0
D7S684	0,60	0,72	0,80	0,86	0,91	0,95	1,05	1,01	0,76	0,39	0,04	1,05	0,10	0,04	0,49
D7S1824	-0,61	-0,26	-0,10	-0,01	0,05	0,09	0,20	0,15	-0,01	-0,07	-0,01	0,20	0,10	-0,61	0
D7S661	-1,49	-1,02	-0,81	-0,67	-0,57	-0,49	-0,24	-0,03	0,04	0,04	0,01	0,04	0,40	-1,49	0
D7S636	-3,09	-1,87	-1,30	-0,94	-0,67	-0,47	0,10	0,46	0,44	0,26	0,03	0,46	0,20	-3,09	0
D7S798	-3,23	-1,92	-1,30	-0,89	-0,59	-0,36	0,29	0,62	0,51	0,25	0,02	0,62	0,20	-3,23	0
D8S277	-2,02	-1,27	-0,92	-0,69	-0,54	-0,42	-0,09	0,15	0,20	0,15	0,02	0,20	0,30	-2,02	0
D8S550	-0,55	-0,10	0,09	0,22	0,30	0,37	0,55	0,65	0,55	0,33	0,04	0,65	0,20	-0,55	0
D8S505	-2,43	-1,96	-1,74	-1,59	-1,47	-1,37	-0,95	-0,38	-0,08	0,03	0,01	0,03	0,40	-2,43	0
D8S285	-1,41	-1,39	-1,34	-1,28	-1,21	-1,13	-0,76	-0,30	-0,08	0,00	0	0	0,49	-1,41	0
D8S270	-2,96	-2,91	-2,85	-2,78	-2,69	-2,60	-2,10	-1,22	-0,60	-0,21	-0,01	-0,01	0,49	-2,96	0
D8S284	-4,69	-4,36	-4,15	-3,98	-3,82	-3,66	-2,95	-1,79	-0,94	-0,37	-0,03	-0,03	0,49	-4,69	0
D12S835	-2,66	-2,25	-1,98	-1,79	-1,64	-1,51	-1,10	-0,65	-0,37	-0,17	-0,02	-0,02	0,49	-2,66	0
D12S96	0,11	0,18	0,24	0,28	0,31	0,33	0,37	0,30	0,18	0,07	0	0,37	0,10	0	0,49
D13S1320	-1,70	-1,20	-0,96	-0,80	-0,68	-0,59	-0,30	-0,09	-0,03	-0,02	0	0	0,49	-1,70	0
D13S1296	-0,53	-0,46	-0,40	-0,36	-0,32	-0,28	-0,17	-0,08	-0,04	-0,02	0	0	0,49	-0,53	0
D17S805	-1,80	-1,32	-0,98	-0,73	-0,54	-0,39	0,06	0,34	0,32	0,18	0,02	0,34	0,20	-1,80	0
D17S927	-1,49	-1,42	-1,34	-1,26	-1,17	-1,09	-0,76	-0,35	-0,13	-0,02	0	0	0,49	-1,49	0
D17S1795	-2,31	-1,92	-1,69	-1,53	-1,39	-1,28	-0,86	-0,40	-0,16	-0,04	0	0	0,49	-2,31	0
D17S957	-0,49	-0,41	-0,34	-0,29	-0,25	-0,22	-0,11	-0,02	0,01	0,02	0	0,02	0,40	-0,49	0
D19S865	-2,72	-2,55	-2,35	-2,16	-2,00	-1,85	-1,30	-0,67	-0,33	-0,13	-0,01	-0,01	0,49	-2,72	0
D19S566	-3,82	-3,17	-2,82	-2,57	-2,39	-2,23	-1,71	-1,06	-0,61	-0,27	-0,02	-0,02	0,49	-3,82	0

Debido a que el análisis de ligamiento de dos puntos sugirió la exclusión de los principales loci candidatos como responsables del fenotipo PAP-B, se realizaron simulaciones para evaluar si habría sido posible la detección de ligamiento dada la información genética recolectada, en particular para los cromosomas 12, 13, 17 y 19.

Así, para la simulación S1 se simularon genotipos de 44 individuos de F01 para 51 loci marcadores, para S2 se simularon genotipos de 52 individuos, para S3 se simularon los genotipos de 12 individuos y para S4 se simularon genotipos de 8 individuos.

La simulación S1 (Figura 2) ilustra que, para la muestra de 44 ADNs genómicos de individuos de F01, la mayoría de los loci marcadores tienen el poder suficiente para detectar ligamiento. A su vez, S2 (Figura 2) sugiere que la inclusión de individuos adicionales de F01 en el estudio no conlleva un aumento significativo en el poder de detección de ligamiento de la mayoría de los loci marcadores. En otras palabras, contar con las muestras de ADN de F01-122, F01-124, el principal efecto medido por S2, habría permitido incrementar el valor de puntaje LOD pero no es necesario para detectar ligamiento con PAP-B en F01.

S3 muestra que de haberse contado con un conjunto completo de genotipos de los 44 individuos, para todos los loci marcadores, habría podido ocasionar, en promedio, un modesto incremento en el puntaje LOD (Figura 3). S4 al igual que S2 muestra que no habría habido una ganancia importante en el puntaje LOD de haber incluido individuos adicionales disponibles en F01. Marcadores en cromosomas 12, 13, 17 y 19 en particular habrían extraído más información para el análisis al incluirse más individuos. Sin embargo las simulaciones sugieren que la inclusión de la totalidad de los individuos de la muestra en el análisis no habría repercutido en la detección de ligamiento, puesto que el puntaje LOD promedio estimado para S3 y S4 no supera el umbral de $Z=3$ (Figura 3).

Adicionalmente, con el fin de establecer si la información contenida en los loci analizados habría permitido detectar ligamiento con un locus ubicado a una distancia mayor de $\theta=0$ se simuló ligamiento entre cada uno de ellos y un locus a $\theta=0.1$. En la Figura 4 se observa el resultado de la simulación, el cual sugiere que casi todos los marcadores son lo suficientemente informativos en F01 como para permitir detectar una señal de ligamiento en el rango $0 \leq \theta \leq 0.1$.

La Figura 5 muestra los resultados del LOD multipunto. Los resultados indican que la totalidad del cromosoma 4 y grandes segmentos de cromosomas 3, 7 y 8 superan por amplio margen el criterio de exclusión, $Z \leq -2$. En cromosomas 13, 17 y 19, ciertas regiones entre los loci analizados también rebasan el umbral de exclusión, aunque no en forma tan pronunciada como para cromosomas 3, 4, 7 y 8, mientras que en cromosoma 12 la región de exclusión está confinada a los loci directamente analizados debido a la distancia que los separa.

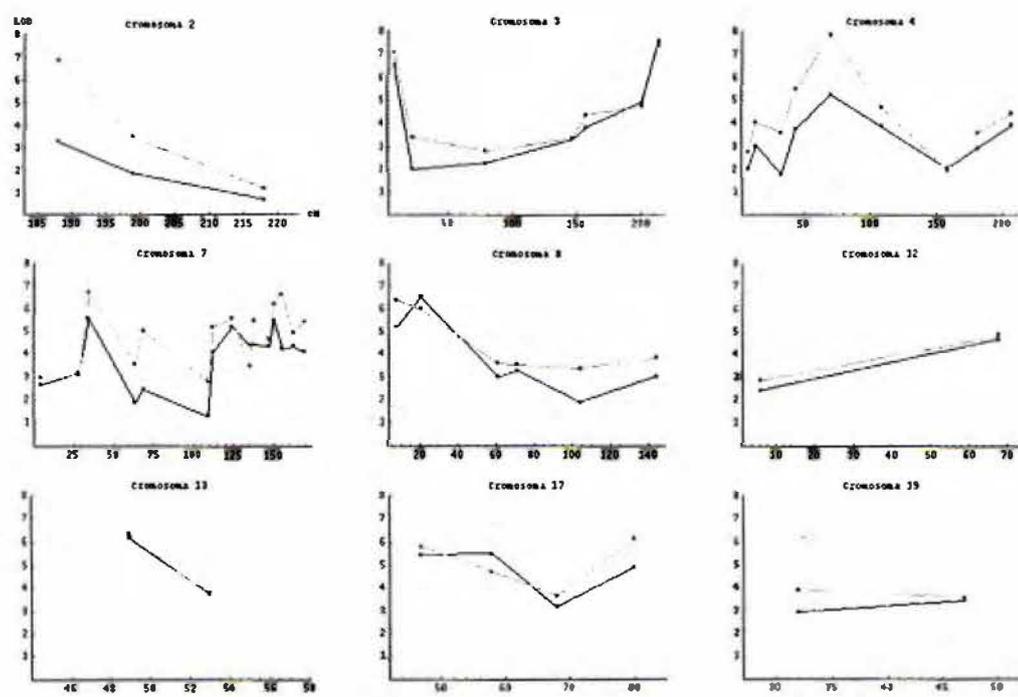


Figura 2: Máximo puntaje LOD ($\theta=0..0.49, 0.01$) de acuerdo a las simulaciones S1 (negro) y S2 (gris). La escala horizontal difiere entre cromosomas.

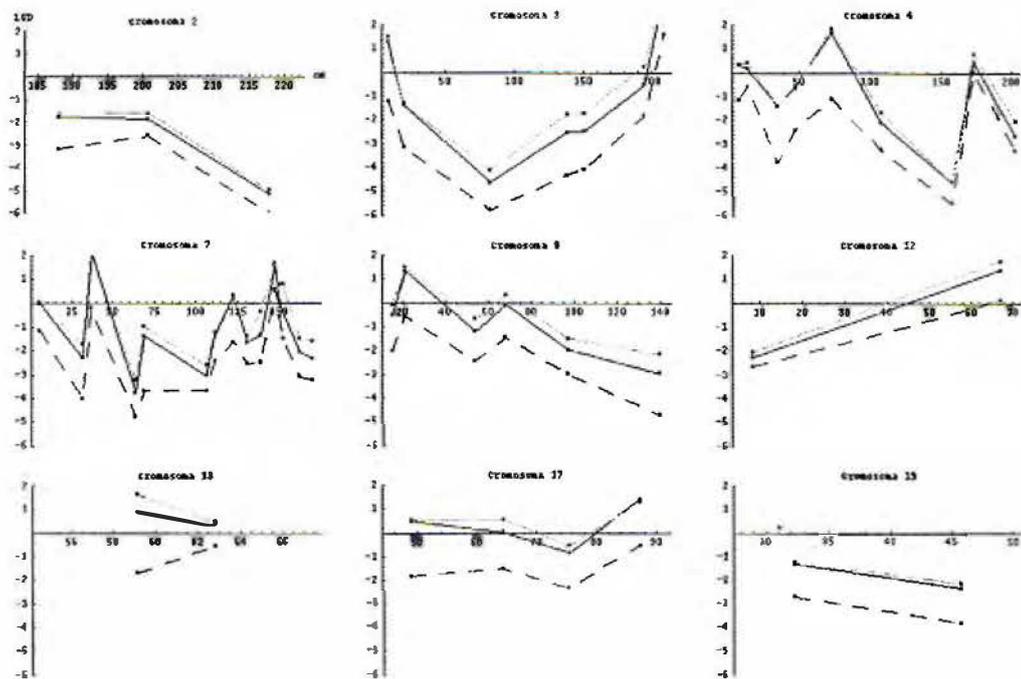


Figura 3: Puntaje LOD ($\theta=0$) obtenido para las simulaciones S3 (negro) y S4 (gris). La línea punteada corresponde al puntaje LOD real. La escala horizontal difiere entre cromosomas.

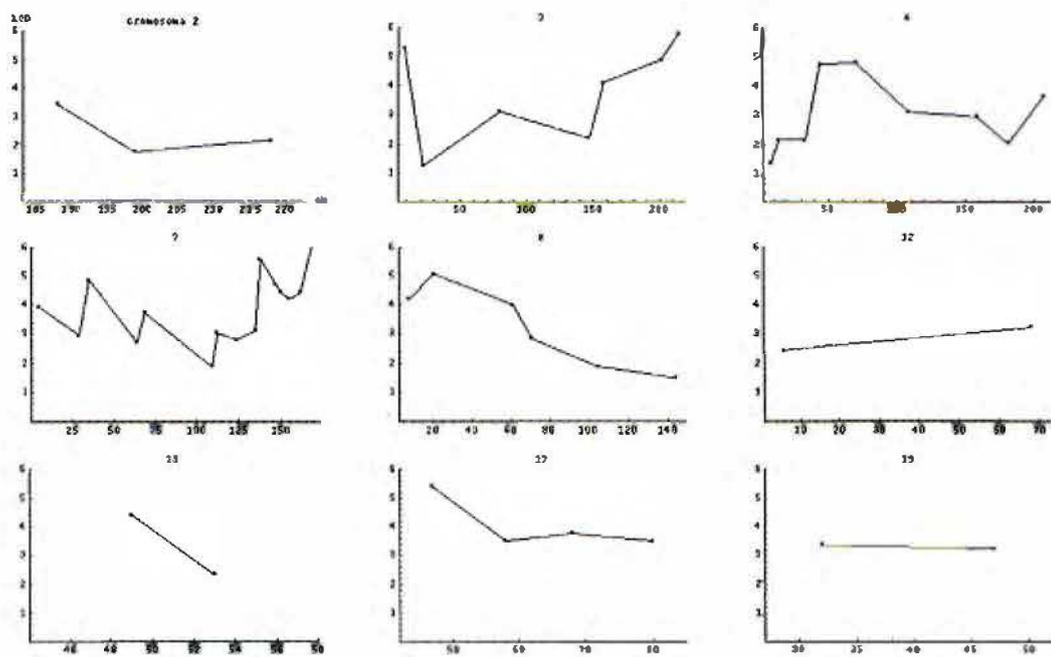


Figura 4: Máximo puntaje LOD posible entre un locus marcador y un locus a $\theta=0.1$

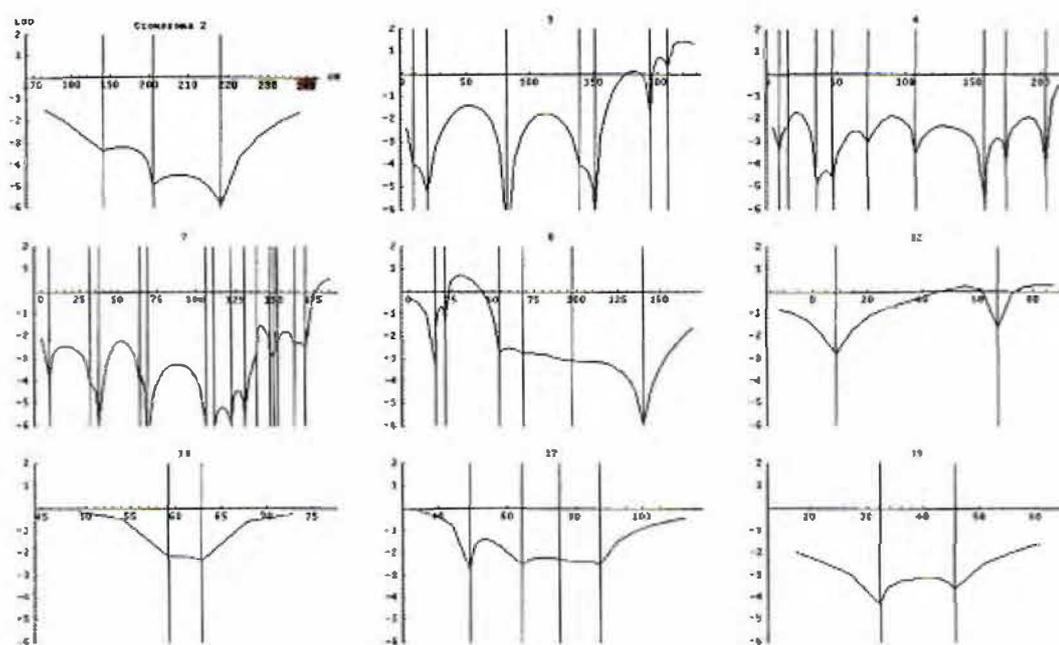


Figura 5: LODs multipunto. Las líneas verticales representan la ubicación de los loci marcadores usados.

Discusión

Cuando las muestras de ADN fueron recolectadas, en 1994, *HOXD13* fue el candidato obvio de PAP-B. Los análisis de ligamiento indicaban que un locus cercano a *HOXD13* era el locus responsable de la sindactilia tipo II (sinpolidactilia, SP), una anomalía en el desarrollo de extremidades que se presenta de forma aislada (no sindrómica) y que está genéticamente determinada [Sarfrazi *et al.* 1995, Muragaki *et al.* 1996]. El patrón de herencia observado en familias afectadas con SP, autosómico dominante con penetrancia incompleta y expresividad variable, es muy similar al patrón observado en familias que segregan polidactilia postaxial [Akarsu *et al.* 1997, Muragaki *et al.* 1996]. La SP suele presentarse acompañada de polidactilia pre- (PRAP) o postaxial (PAP) [Manouvrier-Hanu *et al.* 1999]. No fue sino hasta 1996 que la mutación responsable de la polisindactilia fue identificada como la expansión de un tracto de polialanina en el extremo amino-terminal de *HOXD13* [Muragaki *et al.* 1996].

D2S103 fue seleccionado como un locus marcador apropiado debido a su cercanía a la región SP. El puntaje LOD obtenido para D2S103 excluye a *HOXD13* como el locus PAP-B, al menos para la familia F01. El área de exclusión se extiende a $\theta \cong 0.05$ de D2S103 ($\theta = 0 \dots 0.05$, $Z = -2.06$, Cuadro 7) e incluye a *HOXD13*, que está localizado a $\theta \cong 0.05$ 2p-ter de D2S103. Cabe resaltar que cuando se detectó ligamiento entre SP y loci marcadores la señal de ligamiento abarcó ~16 cM y fue detectable a ~8 cM de distancia de *HOXD13* [Muragaki *et al.* 1996].

HOXD13 es el miembro ubicado más al extremo p-ter-5' del grupo de genes *HOXD*, el cual abarca unos 100Kb. D2S103 permite también excluir a los otros ocho miembros de *HOXD* (*HOXD1,3,4,8-12*) como posibles loci de PAP-B, puesto que estos también están

ubicados dentro del área de exclusión. Por tanto es improbable que *HOXD13*, o alguno de los genes *HOXD* sea el locus PAP-B. Las simulaciones realizadas sugieren que D2S103 es lo suficientemente informativo como para permitir detectar una señal de ligamiento a $\theta=0.1$ (Figura 4).

El locus marcador PAX3 se localiza a $\theta \approx 0.03$ en dirección 2q-ter de Indian Hedgehog (*IHH*). *IHH* es un homólogo de Sonic Hedgehog (*SHH*) que ha sido implicado en la condensación, crecimiento y diferenciación de cartílago [Vortkamp *et al.* 1996]. La proteína *IHH*, al igual que *SHH*, se une covalentemente a una molécula de colesterol durante su maduración [Vortkamp *et al.* 1996]. Se ha especulado que problemas en la maduración de *IHH* podrían alterar la condrogénesis y conllevar al desarrollo de PAP en particular porque PAP se presenta en los casos más severos del síndrome Smith-Lemi-Optiz, el cual es ocasionado por un defecto en la esterol D⁷-reductasa que se transmite de modo autosómico recesivo [Manouvrier-Hanu *et al.* 1999].

PAX3 excluye un segmento de 2q que se extiende $\theta \approx 0.12$ a su alrededor ($\theta=0 \dots 0.1$, $Z=-2.38$, Cuadro 7), que incluye a *IHH* ($\theta_{PAX3-IHH} \approx 0.03$, $Z_{PAX3} = -3.98$, Cuadro 7). En conjunto, D2S103, D2S72 y PAX3 excluyen una región de ~ 50 cM en el cromosoma 2 (Figura 5) como posible ubicación de un gen causal de PAP-B.

PAP suele presentarse como parte de síndromes complejos tales como SLO, Ellis-van Creveld, Bardet-Bledt, Simpson-Golabi-Behmel, Kaufman-McKusick, y Meckel [Woolf y Myriantopoulos 1973, Castilla *et al.* 1998, Manouvrier-Hanu *et al.* 1999]. Los estudios epidemiológicos han mostrado, al menos para poblaciones latinas-hispanas, que la asociación más fuerte suele presentarse con los síndromes de Meckel y Ellis-van Creveld [Castilla *et al.* 1998].

EVC fue seleccionado como candidato principalmente por el hecho de que al menos 4 fenotipos similares, involucrando diversas representaciones de PAP-A, se localizan en un mismo locus del genoma. Además, la vinculación entre estos fenotipos y alteraciones en la estructura ósea resultaba particularmente interesante en relación con PAP y PAP-B en particular.

Los resultados del análisis de ligamiento de dos puntos de esta investigación permiten descartar, pero no excluir, a *EVC* ($\theta=0$, $Z=-1.10$, Cuadro 7). Sin embargo, en análisis multipunto la información conjunta de *HOX7* y los demás loci en cromosoma 4 excluye claramente no solamente al locus *EVC* sino a la totalidad del cromosoma (Figura 5).

La exclusión del cromosoma 4 como posible portador del gen responsable del fenotipo PAP-B es interesante porque excluye a *SLIT2* y a *dHAND*. Galjaard *et al.* describe una translocación, t(4;7)(p15.2;q35), que parece involucrar a *SLIT2*, o al menos a la región ~25cM de 4p-ter en donde éste se localiza, con PAP-B [Galjaard *et al.* 2003b]. Sin embargo, los loci D4S2935 y D4S419 usados en el presente estudio y que rodean la región de *SLIT2* no aportaron evidencia positiva de ligamiento en esa región (Cuadro 7, Figura 5).

dHAND está involucrado en el desarrollo de la identidad de los dígitos [Charité *et al.* 2000, McFadden *et al.* 2002] y es un componente importante del mecanismo que regula la

expresión y desarrollo de las extremidades en tetrápodos [Charité *et al.* 2000, McFadden *et al.* 2002, Welsher *et al.* 2002, Zákány *et al.* 2004]. Está localizado a ~191cM de 4p-ter y se encuentra flanqueado por los loci D4S415 y D4S426.

Zákány *et al.* describieron a mediados del 2004 la dinámica molecular detrás del establecimiento del gradiente de SHH durante el desarrollo de extremidades en tetrápodos que, finalmente, determina el patrón antero-posterior de las extremidades y la identidad de los dígitos [Zákány *et al.* 2004]. Su modelo involucra a genes del grupo HOXD, *SHH*, *GLI3* y a *dHAND* en el establecimiento del gradiente postero-anterior de SSH y un gradiente inverso de *GLI3*.

Si bien tanto *GLI3* como *SHH* desempeñan un papel de similar preponderancia en el desarrollo [Zákány *et al.* 2004], mutaciones en *SHH* nunca han sido ligadas o asociadas con malformaciones de extremidades pues alteraciones en su expresión suelen degenerar en severos defectos como la holoprosencefalia, o en letalidad del feto [Ming *et al.* 1998, Villavicencio *et al.* 2000]. Los resultados de esta investigación aportan evidencia en el mismo sentido, no parece existir un vínculo directo entre *SHH* y PAP-B. El gen *SHH* se ubica en cromosoma 7 a ~153cM de 7p-ter, en una región de ~5cM enmarcada por los loci D7S1824 y D7S661. Ambos loci dieron evidencia negativa de ligamiento en el análisis de dos puntos ($\theta=0.0..0.5$, $-1<Z<0$, Cuadro 7), y en el análisis multipunto ($-2<Z<-1$, Figura 5).

En los últimos años *GLI3* se ha perfilado como uno de los genes centrales en el desarrollo de extremidades [Villavicencio *et al.* 2000, Wang *et al.* 2000, McFadden *et al.* 2002, Zákány *et al.* 2004]. Aunque mutaciones en *GLI3* han sido descritas como las responsables de síndromes complejos, lo cierto es que otras causan perturbaciones mucho menos drásticas en el desarrollo, ocasionando PRAP, PAP-A y PAP-A/B, que segregan de forma aislada en

familias [Radhakrishna *et al.* 1999]. El hecho de que se presenten, en un gen involucrado en la arquitectura de las extremidades desde etapas muy tempranas del desarrollo, mutaciones no letales y ocasionen únicamente polidactilia es asombroso. *GLI3* fue, indudablemente, el principal candidato de esta investigación.

D7S691 se ubica en el noveno intron de *GLI3*. Los resultados del análisis de ligamiento indican que D7S691 excluye $\theta \approx 0.2$ a su alrededor ($\theta = 0 \dots 0.2$, $Z = -2.36$, Cuadro 7) y por tanto, *GLI3* no puede ser vinculado al fenotipo de la familia F01. La exclusión de *GLI3* es muy sólida, en particular por que D7S691 es intragénico y a $\theta = 0$ el puntaje LOD es < -4 (Cuadro 7).

Al igual que *GLI3* y *SHH*, el grupo de genes *HOXA* se ubica en el cromosoma 7 a ~ 28 cM de 7p-ter. El locus D7S507 se ubica a $\theta \approx 0.01$ en dirección 7q. El análisis de ligamiento de dos puntos indica que es improbable un locus a $\theta \approx 0.05$ de distancia de este marcador, como alguno de los miembros de *HOXA*, pueda ser ligado a PAP-B ($\theta = 0 \dots 0.2$, $Z = -2.36$, Cuadro 7).

Los genes de los grupos *HOXD*, *HOXA* así como *GLI3*, *dHAND* y *SHH* son el centro de la vía de transducción de señales y cascada de activación de genes que culmina en el establecimiento de un eje antero-posterior y define la identidad de las extremidades y dígitos en tetrápodos. Este estudio sugiere que ninguno de ellos puede ser catalogado como posible responsable del fenotipo PAP-B, al menos en la familia F01.

Galjaard *et al.* publicó la ubicación de un nuevo locus para PAP-A/B en cromosoma 7, localizado entre D7S1799 y D7S500 [Galjaard *et al.* 2003]. D7S1799 se localiza a ~ 113 cM de 7p-ter mientras que D7S500 se haya localizado un poco más distante, a ~ 141 cM de 7p-ter, por

lo que ambos están separados por $\theta \approx 0.3$. Sin embargo, el fenotipo PAP-B de F01 no parece localizarse en esta región. D7S515 se ubica a $\theta \approx 0.3$ de D7S1799, y D7S500 se encuentra en medio de D7S640 y D7S684 a $\theta \approx 0.03$ y $\theta \approx 0.6$ respectivamente. El análisis de ligamiento realizado excluye a D7S515 ($\theta=0$.. 0.04, $Z=-2.05$, Cuadro 7) y D7S640 ($\theta=0$, $Z=-2.46$, Cuadro 7). D7S486 y D7S530, ubicados entre D7S515 y D7S640 también presentaron puntajes LOD < -1 , lo cual sugiere que PAP-B no puede estar ubicado entre la región de PAP-A/B descrita por Galjaard *et al.*. D7S684, por otra parte, da una señal positiva en el análisis de dos puntos ($\theta=0.1$, $Z=1.05$, Cuadro 7). Lo que hace a D7S684 interesante es que *CASPR2* y *LOC206654* se ubican en la región que lo circunda. *LOC206654*, en particular, es mencionado como un posible candidato del locus PAP-B por Galjaard *et al.* pues podría ser parte de t(4;7) (p15.2;q35) [Galjaard *et al.* 2003b]. El hecho de que D7S684 esté dando una señal positiva en dicha región es sugestivo. Sin embargo, la señal desaparece en el análisis multipunto. Además, las simulaciones S1 y S2 en esta región indican que tanto los loci marcadores como la estructura familiar tienen el potencial para detectar ligamiento con valores de LOD > 3 (Figura 2) incluso si el locus PAP-B se ubica a distancias de $\theta=0.1$ (Figura 4). S3 y S4 sugieren, por otra parte, que la expansión de la muestra de individuos de F01 para incluir a la totalidad de afectados y “portadores” (6 individuos en total) no habría tenido un efecto significativo en el puntaje LOD de marcadores en esta región (Figura 3). Puesto que cabe la posibilidad de que el modelo especificado no esté ajustándose correctamente a los datos, diversos modelos de herencia fueron examinados para este locus (no presentado en los resultados). Cambios en el modelo de penetrancia, en las frecuencias alélicas y en la frecuencia de la “mutación” no alteraron significativamente los resultados. El cambio a un modelo de herencia autosómico recesivo, por el contrario, hizo decaer el puntaje LOD a valores < 0 . En conjunto, esta

evidencia parece sugerir que el locus PAP-B no está ligado a D7S684, al menos para F01.

Se exploró la posibilidad de que el locus *PAPA2* pudiera ser también el locus PAP-B. Con tal fin se usaron los loci D13S1320 y D13S1296. Los resultados del análisis de ligamiento de dos puntos fueron negativos, sin alcanzar el umbral de exclusión.

De forma similar, el locus *PAPA3* fue explorado con el uso de D19S865 y D19S566 que enmarcan estrechamente la región crítica, entre D19S1165 y D19S929, descrita por Zhao *et al.* [Zhao *et al.* 2002]. Los resultados muestran que PAP-A3 puede ser claramente excluido ($\theta_{D19S865}=0 \dots 0.04$, $Z_{D19S865} \leq -2$; $\theta_{D19S566}=0 \dots 0.05$, $Z_{D19S566} \leq -2$ Cuadro 7).

Finalmente, loci en 12q (D12S835 y D12S96) y 17q (D17S805, D17S927, D17S1795 y D17S957), alrededor de donde se localizan los grupos de genes HOXC y HOXB respectivamente, fueron también investigados sin que se detectara ligamiento. D12S96 se ubica a unos pocos centimorgans del grupo de genes HOXC. El gen *MKS1* causante del Síndrome de Meckel, mencionado con anterioridad, está ubicado en el cromosoma 17 cerca de D17S927 ($\theta=0.01$).

Los cromosomas 3 y 8 fueron también examinados y pueden ser excluidos en su mayor parte. Llama la atención que el máximo puntaje LOD obtenido en esta investigación, $Z=1.94$ (Cuadro 7) fue para el locus D3S1601. La única publicación en la literatura que hace referencia a PAP en el cromosoma 3 es de Brewer *et al.* [Brewer *et al.* 1998]. Tras analizar un catálogo comercial de aberraciones cromosómicas post-natales (denominado "Human Cytogenetics Database") ellos encuentran asociación significativa entre PAP y 3p25-26. D3S1601, sin embargo, está ubicado en 3q. Si bien es necesario dar seguimiento a este resultado, debe ser el objetivo de otra investigación.

Conclusiones

Los análisis de ligamiento realizados no detectaron ligamiento entre fenotipo y loci marcadores, lo cual sugiere que ninguno de los candidatos de esta investigación puede ser responsable de PAP-B en F01. Por el contrario, los resultados obtenidos excluyen regiones del genoma como su posible ubicación y sugieren la existencia de un nuevo gen de polidactilia.

Ante los resultados obtenidos por esta investigación y la posibilidad de que un gen de polidactilia aún no descrito se encuentre segregando en F01, es claro que el siguiente paso debería consistir en la realización de un tamizaje genómico completo. Un comentario final en ese sentido es que, debido a la amplia gama de fenotipos y la heterogeneidad genética que rodean a la polidactilia postaxial la estrategia usual, que involucra el reclutamiento de más de una familia para incrementar el poder del estudio, puede resultar contraproducente. La probabilidad de que familias diferentes puedan estar segregando genes diferentes en relación con un mismo fenotipo de polidactilia es alta. Por tal motivo, quizás la estrategia más apropiada involucre a una o más familias extendidas, cada una de ellas analizada de forma independiente.

Bibliografía

- Akarsu, A. N., F. Ozbas & N. Kostakoglu. 1997. Mapping of the second locus of postaxial polydactyly type A (PAP-A2) to chromosome 13q21-q32. *Am. J. Hum. Genet.* 61 (suppl.): 265.
- Brewer, C., S. Holloway, P. Zawalnyski, A. Schinzel, & D. FitzPatrick. 1998. A chromosomal deletion map of human malformations. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1153-9.
- Brueton, L., S. M. Huson, R. M. Winter & R. Williamson. 1988. Chromosomal localisation of a developmental gene in man: direct DNA analysis demonstrates that Greig cephalopolysyndactyly maps to 7p13. *Am. J. Med. Genet.* 31:799-804.
- Castilla, E., J. Paz, O. Mutchinick, E. Muñoz, E. Giorgiutti & Z. Gelman. 1973. Polydactyly: a genetic study in South America. *Am. J. Hum. Genet.* 25:405-12.
- Castilla, E., R. Lugarinho, M. da Graca Dutra, E. Bermejo, L. Cuevas & M. L. Martinez-Frias. 1996. Epidemiological analysis of rare polydactylies. *Am. J. Med. Genet.* 65:295-303.
- Castilla, E., R. Lugarinho, M. da Graca Dutra & L. J. Salgado. 1998. Associated anomalies in individuals with polydactyly. *Am. J. Med. Genet.* 80:459-465.
- Castilla, E., R. Lugarinho, M. da Graca Dutra, E. Bermejo, L. Cuevas & M. L. Martinez-Frias. 1996. Epidemiological analysis of rare polydactylies. *Am. J. Med. Genet.* 65:295-303.
- Charité, J., D.G. McFadden & E.N. Olson. 2000. The bHLH transcription factor dHAND controls Sonic hedgehog expression and establishment of the zone of polarizing activity during limb development. *Development* 127:2461-70.
- Curry, C.J. & B.D. Hall. 1979. Polydactyly, conical teeth, nail dysplasia, and short limbs: a new autosomal dominant malformation syndrome. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 15:253-63.
- Frazier, T. M. 1960. A note on race-specific congenital malformation rates. *Obstet. Gynecol.* 80:184-185.
- Galjaard, R. H., A. P. T. Smits, J. H. A. M. Tuerlings, A. G. Bais, Aagje, A. M. B. Avella, G. Breedveld, E. Graaff, B. A. Oostra & P. Heutink. 2003. A new locus for postaxial polydactyly type A/B on chromosome 7q21-q34. *Eur. J. Hum. Genet.* 11:409-15.
- Galjaard, R. H., H. C. Linde, B. H. J. Eussen, B. B. A. Vries, C. H. Wouters, B. A. Oostra, E. Graaff & P. Heutink. 2003. Isolated postaxial polydactyly type B with mosaicism of a submicroscopic unbalanced translocation leading to an extended phenotype in offspring. *Am. J. Med. Genet.* 121:168-73.
- Gilbert. 1997. *Developmental Biology*. Sinauer Associates, Massachusetts. 918p.
- Göring, H. H. & J. D. Terwilliger. 2000. Linkage analysis in the presence of errors III: marker loci and their map as nuisance parameters. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1298-309.

- Hall, J. G. 1990. Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 46:857-873 .
- Heutink, P., J. Zguricas, L. Oosterhout, G. J. Breedveld, L. Testers, L. A. Sandkuijl, P. J. Snijders, J. Weissenbach, D. Lindhout, S. E. Hovius, *et al.* 1994. The gene for triphalangeal thumb maps to the subtelomeric region of chromosome 7q. *Nat. Genet.* 6:287-292.
- Howard, T. D., A. E. Guttmacher, W. McKinnon, M. Sharma, V. A. McKusick & E. W. Jabs. 1997. Autosomal dominant postaxial polydactyly, nail dystrophy, and dental abnormalities map to chromosome 4p16, in the region containing the Ellis-van Creveld syndrome locus. *Am. J. Hum. Genet.* 61:1405-1412.
- Ide, S. E., R. I. Ortiz de Luna, C. A. Francomano & M. H. Polymeropoulos. 1996. Exclusion of the *MSX1* homeobox gene as the gene for the Ellis van Creveld syndrome in the Amish. *Hum. Genet.* 98:572-575.
- Kang, S., M. Rosenberg, V. D. Ko & L. G. Biesecker. 1997. Gene structure and allelic expression assay of the human *GLI3* gene. *Hum. Genet.* 101:154-157 .
- Langer, L.O. 1969. The thoracic-pelvic-phalangeal dystrophy.. *Birth Defects* 5:55-64.
- Lathrop, G. M., J. M. Lalouel, C. Julier & J. Ott. 1984. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3443-3446.
- Lewis, E. B. 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*.. *Nature* 276:565-70.
- Lynch, M. & B. Walsh. 1997. *Genetics and analysis of quantitative traits*. Sinauer Assoc., Massachusetts. 980p.
- Manouvrier-Hanu, S., M. Holder-Espinasse & S. Lyonnet. 1999. Genetics of limb anomalies in humans.. *Trends Genet* 15:409-17.
- McFadden, D. G., J. McAnally, J. A. Richardson, J. Charité & E. N. Olson. 2002. Misexpression of *dHAND* induces ectopic digits in the developing limb bud in the absence of direct DNA binding. *Development* 129:3077-88.
- McLysaght, A., K. Hokamp & K. H. Wolfe. 2002. Extensive genomic duplication during early chordate evolution.. *Nat Genet* 31:200-4.
- Ming, J.E., E. Roessler & M. Muenke. 1998. Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today* 4:343-9.
- Mohan, J. 1969. Postaxial polydactyly in three Indian families. *J. Med. Genet.* 6:196-200.
- Mollica, F., S. L. Volti & G. Sorge. 1978. Autosomal recessive postaxial polydactyly type A in a Sicilian family. *J. Med. Genet.* 15:212-216.
- Muragaki, Y., S. Mundlos, J. Upton & B. R. Olsen. 1996. Altered growth and branching

- patterns in synpolydactyly caused by mutations in HOXD13. *Science* 272:548-550.
- O'Connell, J. R. & D. E. Weeks. 1997. PedCheck: A Program for Identification of Genotype Incompatibilities in Linkage Analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 63:259-266.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM), 165240 3/14/2005.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Orioli, I. M. 1995. Segregation distortion in the offspring of Afro-American fathers with postaxial polydactyly. *Am. J. Hum. Genet.* 56:1207-1211.
- Ott, J. 1989. Computer-simulation methods in human linkage analysis. *Proc Natl Acad Sci* 86:4175-4178.
- Polymeropoulos, M. H., S. E. Ide, M. Wright, J. Goodship, J. Weissenbach, R. E. Pyeritz, E. O. Da Silva, R. I. Ortiz De Luna & C. A. Francomano. 1996. The gene for the Ellis-van Creveld syndrome is located on chromosome 4p16. *Genomics* 35:1-5.
- Radhakrishna, U., J. L. Blouin, H. Mehenni, U. C. Patel, M. N. Patel, J. V. Solanki & S. E. Antonarakis. 1997. Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 60:597-604.
- Radhakrishna, U., D. Bornholdt, H. S. Scott, U. C. Patel, C. Rossier, H. Engel, A. Bottani, D. Chandal, J. L. Blouin, J. V. Solanki, K. H. Grzeschik & S. E. Antonarakis. 1999. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type- A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 65:645-655.
- Rijli, F.M. & P. Chambon. 1997. Genetic interactions of Hox genes in limb development: learning from compound mutants. *Curr Opin Genet Dev* 7:481-7.
- Rousseau, F., J. Bonaventure, L. Legeai-Mallet, A. Pelet, J. M. Rozet, P. Maroteaux, M. L. Merrer & A. Munnich. 1994. Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 371:252-4.
- Ruppert, J. M., K. W. Kinzler, A. J. Wong, S. H. Bigner, F. T. Kao, M. L. Law, H. N. Seunaz, S. J. O'Brien & B. Vogelstein. 1988. The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol. Cell. Biol.* 8:3104-3113.
- Ruppert, J. M., B. Vogelstein, K. Arheden & K. W. Kinzler. 1990. GLI3 encodes a 190-kilodalton protein with multiple regions of GLI similarity. *Mol. Cell. Biol.* 10:5408-5415.
- Sarfrazi, M., A. N. Akarsu & B. S. Sayli. 1995. Localization of the syndactyly type II (synpolydactyly) locus to 2q31 region and identification of tight linkage to HOXD8 intragenic marker. *Hum. Mol. Genet.* 4:1453-1458.
- Scott-Emuakpor, A.B. & E. D. Maduekc. 1976. The study of genetic variation in Nigeria. II. The genetics of polydactyly. *Hum. Hered.* 26:198-202.

- Shiang, R., L. M. Thompson, Y. Z. Zhu, D. M. Church, T. J. Fielder, M. Bocian, S. T. Winokur & J. J. Wasmuth. 1994. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 78:335-42.
- Shin, S. H., P. Kogerman, E. Lindström, R. Toftgård & L.G. Biesecker. 1999. GLI3 mutations in human disorders mimic *Drosophila cubitus interruptus* protein functions and localization.. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:2880-4.
- Sobel, E. & K. Lange.. 1996. Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am. J. Hum. Genet.* 58:1323-37.
- Spring, J. 2002. Genome duplication strikes back.. *Nat. Genet.* 31:128-9.
- Temtamy, S.A. & V. A. McKusick. 1978. The genetics of hand malformations. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.* 14:i-xviii.
- Veraksa, A., M. Campo & W. McGinnis. 2000. Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol. Genet. Metab.* 69:85-100.
- Villavicencio, E. H., D. O. Walterhouse & P. M. Iannaccone. 2000. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1047-54.
- Villavicencio, E. H., D. O. Walterhouse & P. M. Iannaccone. 2000. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1047-54.
- Vogel, F. & A. G. Motulsky. 1997. *Human Genetics: Problems and Approaches*. Springer-Verlag, Berlin. 851p.
- Vortkamp, A., M. Gessler & K. H. Grzeschik. 1991. GLI3 Zinc-finger gene interrupted by translocation in Greig syndrome families. *Nature* 352:539-540.
- Vortkamp, A., M. Gessler, D. Le Paslier, R. Elasarapu, S. Smith & K.H. Grzeschik. 1994. Isolation of a yeast artificial chromosome contig spanning the Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) gene region. *Genomics* 22:563-568.
- Vortkamp, A., C. Heid, M. Gessler & K. H. Grzeschik. 1995. Isolation and characterization of a cosmid contig for the GCPS gene region. *Hum. Genet.* 95:82-88.
- Vortkamp, A., K. Lee, B. Lanske, G. V. Segre, H. M. Kronenberg & C. J. Tabin. 1996. Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* 273:613-22.
- Wang, B., J. F. Fallon & P. A. Beachy. 2000. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell* 100:423-434.
- Weeks, D. E., J. Ott & G. M. Lathrop. 1990. SLINK: a general simulation program for linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 47:A204.

- Welscher, P., A. Zuniga, S. Kuijper, T. Drenth, H. J. Goedemans, F. Meijlink & R. Zeller. 2002. Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* 298:827-30.
- Winter, R.M. & C. Tickle. 1993. Syndactylies and polydactylies: embryological overview and suggested classification. *Eur. J. Hum. Genet.* 1:96-104.
- Woolf, C.M. & N. C. Myrianthopoulos. 1973. Polydactyly in American Negroes and Whites. *Am. J. Hum. Genet.* 25:397-404.
- Wright, S. 1934. An analysis of variability in number of digits in an inbred strain of guinea pigs. *Genetics* 19:506-536.
- Wright, S. 1934. The results of crosses between inbred strains of guinea pigs, differing in number of digits. *Genetics* 19:537-551.
- Zákány, J., C. Fromental-Ramain, X. Warot & D. Duboule. 1997. Regulation of number and size of digits by posterior Hox genes: a dose-dependent mechanism with potential evolutionary implications.. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13695-700.
- Zákány, J. & D. Duboule. 1999. Hox genes in digit development and evolution.. *Cell Tissue Res* 296:19-25.
- Zákány, J., M. Kmita & D. Duboule. 2004. A dual role for Hox genes in limb anterior-posterior asymmetry. *Science* 304:1669-72.
- Zguricas, J., H. Heus, E. Morales-Peralta, G. Breedveld, B. Kuyt, E. F. Mumcu, W. Bakker, N. Akarsu, S. P. Kay, S. E. Hovius, L. Heredero-Baute, B. A. Oostra & P. Heutink. 1999. Clinical and genetic studies on 12 preaxial polydactyly families and refinement of the localisation of the gene responsible to a 1.9 cM region on chromosome 7q36. *J. Med. Genet.* 36:32-40.
- Zhao, H., Y. Tian, G. Breedveld, S. Huang, Z. Ying, Y. Jue, J. Chai, L. Hui, M. Li, B. A. Oostra, W. H. Y. Lo & P. Heutink. 2002. Postaxial polydactyly type A/B (PAP-A/B) is linked to chromosome 19p13.1-13.2 in a chinese kindred. *Eur. J. Hum. Genet.* 10:162-6.