



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN *HGSNAT* EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ.

LEANDRA JOHANA TORRES RAMIREZ

Estudiante de postgrado

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología
Maestría Genética Humana
Bogotá D.C., Colombia

2017

ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN *HGSNAT* EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ

Leandra Johana Torres Ramírez

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Genética Humana

Director:

MD, ESP, MSc. HARVY MAURICIO VELASCO PARRA

Coinvestigador:

MSc, PhD. SIDNEY EMANUEL BATISTA DOS SANTOS

MSc, PhD. ÂNDREA RIVEIRO-DOS-SANTOS

MD, ESP. YAZMIN SANCHEZ GOMEZ

MSc. TATIANA VINASCO-SANDOVAL

Línea de Investigación:

Genética Clínica

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Morfología

Maestría Genética Humana

Bogotá D.C., Colombia

2017

Dedicatoria

*A Dios,
A mis padres,
A mi hermana,
Y a mis sobrinos.*

Agradecimientos

A los pacientes con MPS IIIC, en especial a los fallecidos y su familia.

A todas las personas de la vereda de Runta.

A los patrocinadores de la investigación: farmacéutica SHIRE.

Al Dr. Harvy por su orientación, compromiso y comprensión durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Sidney y Dra. Andrea por sus orientaciones metodológicas y acompañamiento.

A la Dra. Yazmín por su colaboración durante el desarrollo del trabajo de campo.

Al profesor Usaquén por sus enseñanzas y observaciones.

A Tatiana Vinasco y Diana Mayorga por su asesoramiento en el laboratorio de genética y su ayuda.

A mis compañeros de la maestría en genética humana, por su acompañamiento en el desarrollo de la maestría, en especial a Laudy, Julie y Mary.

Resumen

Introducción: El síndrome de Sanfilippo, es una enfermedad genética de herencia recesiva. El defecto primario es la ausencia de la enzima heparan acetylCoA: α -glucosaminide-N-acetyltransferase (HGSNAT, MPS IIIC, MIM #252930), responsable de la degradación de heparán sulfato, cuya consecuencia patológica es la acumulación de este compuesto en los tejidos del cuerpo. La mucopolisacaridosis tipo III tiene una frecuencia en la región Cundiboyacense de 0,17 casos por 100.000 nacidos vivos. **Métodos:** Se incluyeron 6 pacientes, 69 portadores de mutación nonsense c.1360C>T pertenecientes a 4 familias y 78 controles a los que se le determinó el haplotipo alrededor de la mutación, a través de la tipificación de 6 STRs. Se llevó a cabo el cálculo de la posible edad de la mutación a través del software ESTIAGE y DMLE v3.1, teniendo en cuenta diferentes tasas de mutación y 25 años por generación. **Resultados:** Se identificó un haplotipo fundador alrededor de la mutación en pacientes y portadores en el 88.9% de los haplotipos analizados, con pocas modificaciones correspondiente al 11.1% restante. El haplotipo ancestral ni sus modificaciones fue encontrado en la población control. La edad de la mutación determinada por ESTIAGE fue de 41 (CI 95% 35-48) y 48 (CI 95% 40-57) generaciones antes del presente (dependiendo de la tasa de mutación utilizada, 0.001 o 0.0001 respectivamente) y de 39 (CI 95% 35-46) generaciones antes del presente en DMLE v 3.1. **Conclusiones:** Se logró determinar un haplotipo ancestral compartido por los pacientes y portadores, no encontrado en la población control, que apoya la existencia de un efecto fundador para la mutación c.1360C>T en la vereda de Runta. La edad de la mutación calculada a través de ESTIAGE y DMLE v 3.1. ubica su origen hace aproximadamente 1000 años, se tratar de una mutación de origen prehispánico posiblemente muisca, que se ha escapado a la selección por su estado heterocigoto, logrando evidenciarla por la endogamia de la región que favorece la aparición de homocigotos recesivos.

Palabras clave: Mucopolisacaridosis, Heparan alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa, Síndrome de sanfilippo, HGSNAT, efecto fundador, DMLE, ESTIAGE.

Abstract

Introduction: Sanfilippo syndrome is a recessive inheritance genetic disease. It is caused by the deficiency of the enzyme heparan acetylCoA: α -glucosaminide-N-acetyltransferase (HGSNAT, MPS IIIC, MIM#252930), needed for breaking down heparan sulfate, which, in consequence, builds up in various tissues of the body. The frequency of mucopolysaccharidosis III in the Cundinamarca and Boyacá region is 0.17 cases per 100 000 live births. **Methods:** Six patients, 69 carriers of the c.1360C>T nonsense pathogenic variant belonging to 4 families and 78 controls were included in the study. The haplotype around the mutation was determined through the typification of six STRs. The possible age of the mutation was calculated using the ESTIAGE and DMLE v3.1 software, taking into account different mutation rates and 25 years per generation. **Results:** A founder haplotype was identified around the pathogenic variant in patients and carriers in 88.9% of the analyzed haplotypes; few mutations were found in the remaining 11.1%. The ancestral haplotype or its mutations were not found in the control population. The age of the mutation determined by ESTIAGE was 41 (95% CI, 35-48) and 48 (95% CI, 40-57) generations (0.001 or 0.0001, respectively, depending on the mutation rate used), and 39 (95% CI, 35-46) generations in DMLE v 3.1. **Conclusions:** An ancestral haplotype shared by patients and carriers was determined, although it was not found in the control population. This supports the existence of a founder effect for mutation c.1360C> T in the village of Runta. The age of the mutation calculated through ESTIAGE and DMLE v 3.1. indicates that the most recent common ancestor lived 1 000 years ago; this a prehispanic mutation, possibly Muisca, which escaped selection because of its heterozygote status. It could be evidenced due to endogamy in the region, which favors recessive homozygotes.

Key words: Mucopolysaccharidosis, Heparan alpha-glucosaminide N-acetyltransferase, Sanfilippo syndrome, HGSNAT, founding effect, DMLE, ESTIAGE.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Abstract.....	VIII
Lista de figuras	XI
Lista de gráficas.....	XII
Lista de tablas	XIII
Lista de Símbolos y abreviaturas	XIV
Introducción	1
1. Capítulo 1 – Marco Teorico	3
1.1 Mucopolisacaridosis	3
1.1.1 MPS III	6
1.1.2 MPS IIIC.....	7
1.1.3 MPS IIIC en Runta.....	12
1.2 Genetica de Poblaciones	13
1.2.1 Deriva genética.....	13
1.2.2 Endogamia.....	15
1.2.3 Selección de aelos recesivos	16
1.2.4 Microsatélites	17
1.2.5 Datación de la mutación	19
1.2.6 Años por generación	21
1.3 Vida prehispánica / conquista	23
2. Capítulo 2 - Metodología.....	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29
2.3 Tamaño de muestra	29
2.4 Criterios de inclusión	30
2.5 Criterios de exclusión	30
2.6 Extracción de DNA	30
2.7 Selección de STRs	30
2.8 Amplificación de los fragmentos genéticos	32
2.9 Análisis estadístico	32
2.10 Consideraciones éticas	34

3. Capítulo 3 - Resultados	36
3.1 Sometimiento de la mutación c.1360C>T al ClinVar	36
3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg	37
3.3 Estadísticos F	37
3.4 Frecuencias alelicas y haplotípicas	38
3.5 Haplotipo alrededor de la mutación c. 1360C>T	41
3.6 Efecto fundador	42
3.7 Cálculo de edad de la mutación - ESTIAGE.....	44
3.8 Cálculo de edad de la mutación – DMLE v3.1.	44
4. Capítulo 4 – Discusión	47
5. Conclusiones y recomendaciones	58
5.1 Conclusiones	58
5.2 Recomendaciones.....	59
A. Anexo: Formatos de consentimientos informados, asentimiento del menor y encuesta de recolección de datos	60
B. Anexo: Imágenes de secuenciación de fragmentos (haplotipos)	71
C. Anexo: Resultado desequilibrio de ligamiento y gráficas DMLE v3.1	85
Bibliografía	91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Ubicación de mutaciones MPS IIIC en el gen HGSNAT.....	8
Figura 1-2: Mecanismo propuesto para la acetil-CoA: α -glucosaminida-N-acetiltransferasa.....	11
Figura 1-3: Clasificación de microsatélites.....	18
Figura 1-4: Desplazamiento de replicación en microsatélites (Replication slippage).....	19
Figura 1-5: Patrones de desequilibrio de ligamiento basado en el tiempo de origen de una mutación de enfermedad.....	21
Figura 1-6: Localización de pueblos Chibchas y vecinos durante siglo XVI.	25
Figura 2-1: Distribución de STRs alrededor de la mutación	31
Figura 3-1: Mutación c.1360C>T en ClinVar	36
Figura 3-2: Arbol genealógico familias de Runta.	39
Figura 3-3: Estimación edad de la mutación c.1360C>T, software DMLE v3.1.....	45

Lista de gráficas

	Pág.
Gráfica 3-1: Porcentaje de haplotipos encontrados en homocigotos mutantes, heterocigotos y homocigotos WT (controles).	42
Gráfica 3-2: Solapamiento de CI, software DMLE y ESTIAGE.....	46

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Clasificación de los trastornos MPS.....	5
Tabla 1-2: Enzimas relacionadas con MPSIII.....	7
Tabla 1-3: Cambios socioculturales, climáticos y biológicos en los Andes Orientales de Colombia.....	24
Tabla 2-1: Primers para amplificación de fragmentos STRs.....	33
Tabla 3-1: Equilibrio de Hardy-Weinberg por locus de la población de Runta y Tunja	37
Tabla 3-2: Frecuencias alélicas de la población de Runta	38
Tabla 3-3: Frecuencias haplotípicas de la población de Runta	40
Tabla 3-4: Frecuencias alélicas de la población control	41
Tabla 3-5: Haplotipos alrededor de la mutación c.1360C>T en pacientes y portadores	42
Tabla 3-6: Número de alelos por población y locus analizado.....	43
Tabla 3-7: Tabla de significancia - Desequilibrio de ligamiento población de Tunja y Runta.....	43
Tabla 3-8: Frecuencias de recombinación RUTGERS mapa v.2.....	44
Tabla 3-9: Cálculo de tasa de crecimiento de la población	44
Tabla 3-10: Proporción esperada de cromosomas con la mutación	45
Tabla 3-11: Resultados DMLE v.3.1	46
Tabla 4-1 Heterocigosidad observada y esperada por locus (Software Bottleneck) ..	53

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura Término

BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
ClinVar	<i>Archives and aggregates information about relationships among variation and human health</i>
CI	Intervalo de Confianza
EDL	Enfermedades de depósito lisosomal
EIM	Errores innatos del metabolismo
EL	Enfermedades lisosomales
<i>EXTL2</i>	<i>Exostosin like glycosyltransferase 2</i>
<i>EXTL3</i>	<i>Exostosin like glycosyltransferase 3</i>
GAL	<i>Galanin and GMAP prepropeptide</i>
GCK	Glucoquinasa
HGMD	<i>The Human Gene Mutation Database</i>
<i>HGSNAT</i>	Heparan alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa
IGUN	Instituto de Genética de la Universidad Nacional
IMAT	Intermediario mal alineado transitorio
MPS	Mucopolisacaridosis
MPS IIIC	Mucopolisacaridosis tipo IIIC
MRCA	Ancestro común más reciente
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
siRNAs	RNA pequeño de interferencia
SMM	Modelo de mutación paso a paso
STR	Repeticiones cortas en tándem
TP53	Tumor proteína p53
UPTC	Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
VWF	Factor von Willebrand

Introducción

La mucopolisacaridosis IIIC o síndrome de sanfilippo, es una enfermedad genética de herencia recesiva, causada por alteraciones en el gen *HGSNAT* (Heparan alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa), el cual codifica una proteína de 635 aminoácidos, encargada de la acetilación de residuos de glicosaminas terminales de Heparan sulfato intra-lisosomal (1). La proteína consta de 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal dentro del lisosoma y el C-terminal en el citosol (2), su mal funcionamiento conlleva a la acumulación de Heparan sulfato en el lisosoma y por tanto, a la presentación de síntomas y signos con múltiple compromiso y neurodegeneración (3, 4).

Los datos más recientes de la frecuencia de la Mucopolisacaridosis en Colombia, son los reportados por Gómez et al., 2012, donde se estimó para todos los casos de mucopolisacaridosis una frecuencia de 1,98 casos por 100.000 nacidos vivos, siendo la de tipo III la de menor frecuencia con 0,17 casos por 100.000 nacidos vivos en la región cundiboyacense (5), la incidencia de la MPS IIIC hasta la fecha no ha sido determinada.

Estudios realizados por el grupo investigación de Genética Clínica de la Universidad Nacional, logró evidenciar una mutación nonsense c.1360C>T en el gen *HGSNAT* como causante de la enfermedad de Mucopolisacaridosis IIIC en la población de Runta (Boyacá) con una alta incidencia (6) (ClinVar ID: 374408), hallazgo que ésta acorde con la predicción de una relativa alta frecuencia de Enfermedades de Depósito lisosomal (EDL) como la Mucopolisacaridosis, en la región de Cundinamarca y Boyacá (5).

La gran mayoría de poblaciones con enfermedades recesivas en alta frecuencia, como la encontrado en la vereda de Runta, pueden ser el resultado de efectos fundadores y cuellos de botella, que con un tamaño reducido de la población y eventos desencadenantes como geográficos y culturales pueden llegar a depresión endogámica (7, 8) comportándose como clúster genéticos.

Dentro de las poblaciones con alta frecuencia en enfermedades que son poco prevalentes en otras regiones se pueden encontrar los Finlandeses con la fibrosis quística, la distrofia muscular espinal en Hutteritas, el síndrome de Ellis–van Creveld en Amish, la enfermedad de Gaucher y Nieman Pick en Judíos o algunas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas del adulto en Paisas (9); sin embargo, pese a los estudios que muestran una relativa alta frecuencia de Enfermedades de Depósito lisosomal (EDL) en la región de Cundinamarca y Boyacá (5), no ha sido definido ningún clúster genético de EDL.

A la luz de la alta frecuencia de MPS IIIC en la vereda de Runta, hemos decidido desarrollar un trabajo que permita establecer la presencia de un efecto fundador y el cálculo de la edad de la mutación c.1360C>T. Con este fin, se ha seleccionado una metodología basada en la tipificación de STRs alrededor de la mutación, que nos permita conocer el tamaño y los cambios del bloque haplotípico que se forma con la aparición de una nueva mutación (10, 11).

La importancia de este tipo de poblaciones originadas de efectos fundadores, radica en la posibilidad de realizar estudios de ligamiento, búsqueda de genes candidatos, estudios de asociación, GWAS y definir clusters genotípicos específicos, sobre todo en enfermedades raras (9) adicional al hecho de poder definir zonas de riesgo de enfermedad genética, susceptibles de intervención médica y educación.

1. Capítulo 1 – Marco Teórico

1.1 Mucopolisacaridosis

Los errores innatos del metabolismo (EIM) son un grupo heterogéneo de enfermedades genéticas que ocurren principalmente en la infancia. Son individualmente raros pero colectivamente numerosos, causando morbilidad y mortalidad sustanciales. Son responsable de anomalías en la síntesis o catabolismo de proteínas, carbohidratos o grasas por medio de enzimas defectuosas o proteínas de transporte, lo que resulta en un bloqueo de vía metabólica (12, 13).

Dentro de los EIM, se encuentran las enfermedades lisosomales (EL), que se producen por el déficit de enzimas específicas intralisosomales o del sistema de proteínas transportadoras, del núcleo al citoplasma, encargadas de la hidrólisis ácida de macromoléculas situadas en el interior de los lisosomas. Este defecto enzimático produce un acúmulo progresivo del sustrato correspondiente en diferentes tejidos, lo que conduce a una enfermedad crónica y multiorgánica (14).

Las enfermedades lisosomales son sistémicas progresivas, pero con evolución variable. Debido a que los lisosomas se encuentran en todas las células excepto en los eritrocitos maduros, es posible que cualquier órgano se pueda afectar por la disfunción de las hidrolasas lisosomales. La mayoría de las enfermedades de depósito lisosomal tienen afectación neurológica (14).

Más del 30% de todas las enfermedades lisosómicas son mucopolisacaridosis (MPS), trastornos que afectan a las enzimas necesarias para la degradación gradual de Glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos), hidratos de carbono repetidos generalmente encontrados unidos a proteoglicanos (15). Son causadas por mutaciones en los genes que codifican para las enzimas requeridas en el catabolismo de dichos compuestos, los cuales

hacen parte de la matriz del tejido conjuntivo. Este depósito lisosómico produce disfunción celular, tisular y orgánica, afectando diversos tejidos como hueso, cerebro, hígado, vasos sanguíneos, piel, cartílago, vías respiratorias, válvulas del corazón y la córnea (16) (17).

Clasificación

Las características clínicas y bioquímicas de las MPS definen 7 grupos principales, designados de MPS-I a MPS-IX (la denominación MPS V y MPS-VIII no se utiliza en la actualidad). Los niños afectados suelen ser normales al nacer y la enfermedad se diagnostica conforme el fenotipo progresa con el tiempo (17).

En general, MPS se manifiesta en tres maneras: 1. Fenotipo con dismorfia facial, característica con apariencia tosca, prominencia frontal, cejas gruesas, labios gruesos, displasia esquelética con contracturas articulares, hepatoesplenomegalia, hernias abdominales, infecciones respiratorias, opacidad de la córnea, hipoacusia y cardiopatía como en MPS-I (síndrome de Hurler), MPS-II (síndrome de Hunter) y MPS-VI (síndrome de Maroteaux-Lamy), 2. Problemas de aprendizaje, trastornos de conducta y demencia como en MPS-III (síndrome de Sanfilippo), 3. Displasia ósea severa MPS-IV (síndrome de Morquio), retraso mental profundo que se observa en forma severas de MPS-I y MPS-II, y en todos los tipos de MPS-III, por lo general con muerte en la infancia (17). MPS-VII (síndrome de Sly) es mucho más rara y ocurre como una dismorfia de tipo Hurler. La MPS-IX (Síndrome de Natowicz) se ha encontrado en pocos casos de modo que no es posible conocer su fenotipo con certeza (18).

En general cada una de las MPS tienen características clínicas, bioquímicas y moleculares diferentes, aunque compartiendo parcialmente endofenotipos como la excreción de heparan, dermatan, condrotin o keratan sulfato, o el compromiso mayoritario de sistemas Nervioso, Esquelético o Cardiovascular (19) (Tabla 1-1).

Epidemiología

La incidencia de las MPS, presentan variaciones, desde 1,75 casos por 100.000 en Suecia (20) hasta 4,5 casos por 100.000 para Latinoamérica (21). Un análisis de los diagnósticos bioquímicos desde 1987 hasta el 2008 en población colombiana describió cerca de 113 pacientes con MPS sin clasificar, 7 con MPS I, 4 con MPS II, 3 con MPS VI y 37 pacientes

MPS IV (22), la MPS III a pesar de ser una de las más comunes a nivel mundial, pareciera no ser tan frecuente en Colombia.

Recientemente Gómez et al., 2012, demostró un agrupamiento espacial en la zona cundiboyacence para distintos tipos de MPS, encontrando que la incidencia para MPS IV era de 0,68 por 100.000 nacidos vivos y de 0.17 para MPS III en dicha región (5). Datos de incidencias muy altas de enfermedades ultra-raras se han descrito en población brasilera, un proyecto realizado en la municipalidad de Monte Santo por Costa_Motta, et al., 2011 detectó un conglomerado genético de MPS IV (13 pacientes) presentando una prevalencia local de 1/5.000 (23). Estos datos demuestran la presencia real de clusters genéticos en Latinoamérica.

Tabla 1-1 Clasificación de los trastornos MPS

Trastorno	Enzima deficiente	Locus	Almacenamiento de GAG	Herencia genética
MPS I (Hurler, Hurler Scheie, síndrome de Scheie)	α -L-Iduronidasa	4p16.3	Dermatán sulfato, heparán sulfato	Autosómica recesiva
MPS II (Síndrome de Hunter)	Iduronato-2-sulfatasa	Xq28	Dermatán sulfato, heparán sulfato	Recesiva ligada a X
MPS III A–D (Síndrome de Sanfilippo)	A: Heparan N-sulfatasa	A: 17q25.3	Heparán sulfato	Autosómica recesiva
	B: α -N-Acetilglucosaminidasa	B: 17q21		
	C: Acetil-CoA: α -glucosaminida acetiltransferasa	C: 8p11.1		
	D: N-Acetilglucosamina 6-sulfatasa	D: 12q14		
MPS IVA, B (Síndrome de Morquio)	A: Galactosa 6-sulfatasa	A: 16q24.3	A: Queratán sulfato, condroitín sulfato	Autosómica recesiva
	B: β -Galactosidase	B: 3p21.33	B: Queratán sulfato	
MPS VI (Síndrome de Maroteaux Lamy)	Arylsulfatase B	5q11–q13	Dermatán sulfato, heparán sulfato	Autosómica recesiva
MPS VII (Síndrome de Sly)	β -Glucuronidasa	7q21.11	Dermatán sulfato, heparán sulfato, condroitín sulfato	Autosómica recesiva
MPS IX	Hialuronidasa	3p21.3–p21.2	Ácido hialurónico	Autosómica recesiva

Tomado y modificado de Cimaz et al., 2014 (24).

1.1.1 MPS III

La mucopolisacaridosis tipo III (MPS III), o síndrome de Sanfilippo, es un trastorno autosómico recesivo causado por deficiencia en una de las cuatro enzimas implicadas en la degradación lisosomal del sulfato de heparán: Heparán sulfato sulfamidasa (SGSH, MPS IIIA, MIM #252900), α - N-acetilglucosaminidasa (NAGLU, MPS IIIB, MIM#252920), heparan acetil-CoA: α -glucosaminida-N-acetiltransferasa (HGSNAT, MPS IIIC, MIM #252930), o N-a cetilglucosamina-6-sulfatasa (GNS, MPS IIID, MIM #252940) (Tabla 1-2). Este trastorno afecta principalmente al sistema nervioso central. Todos los tipos de MPS III se caracterizan por deterioro mental progresivo y problemas de comportamiento con características faciales dismórficas más o menos prominentes y signos somáticos leves (25).

El heparan Sulfato, se encuentra en los proteoglicanos asociados con la membrana de casi todas las células, pero es más abundante en los tejidos conectivos (26). Consiste en un disacárido repetitivo compuesto de unidades de Ácido L-idurónico sulfatado o glucurónico unido a N-glucosamina. La degradación escalonada del heparán sulfato se produce dentro de los lisosomas por la acción concertada de las enzimas encargadas de su degradación (15). El defecto funcional de una de estas enzimas lleva a la acumulación lisosomal del heparán sulfato, su excreción urinaria y la aparición clínica del síndrome de Sanfilippo.

Cada subtipo MPS III se hereda como un trastorno autosómico recesivo. La enfermedad se caracteriza por una afectación de múltiples órganos y severa degeneración del sistema nervioso central. El curso clínico se manifiesta en tres etapas, con un período de desarrollo normal seguido de alteraciones del comportamiento y una neurodegeneración en fase terminal con una esperanza de vida corta. Los síntomas clínicos generalmente se presentan entre 2 y 6 años de edad e incluyen déficit de atención, hiperactividad, comportamiento agresivo, retraso en el desarrollo, pelo grueso, hirsutismo, trastornos del sueño (27) y alteraciones somáticas y esqueléticas generalmente leves (25).

Las complicaciones se producen en 3 fases. La primera comienza antes de los 3 años, se caracteriza por hipoacusia, retraso en el lenguaje, falta de control de esfínteres, otitis, faringitis y diarrea. La segunda inicia entre los 3-4 años, se hacen evidentes trastornos del sueño, hiperactividad y agresividad; en pocos casos signos como escoliosis, cifosis, lordosis lumbar y síndrome del túnel carpiano. La tercera aparece alrededor de los 10 años,

la hiperactividad cesa, aumenta la espasticidad, pérdida de equilibrio, convulsiones, hasta la pérdida importante de movilidad que genera incapacidad permanente; surgen problemas para deglutir y alimenticios, por lo que su ingesta es líquida y en algunos casos con sonda nasogástrica (28). Los pacientes fallecen entre la segunda y la tercera década de vida, usualmente por infecciones respiratorias severas (29, 30).

Tabla 1-2: Enzimas relacionadas con MPSIII

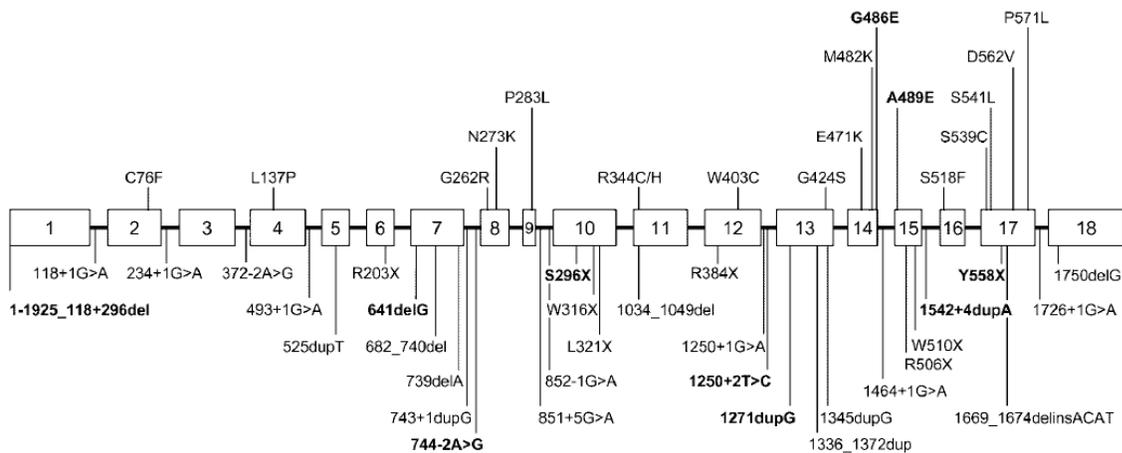
MPS III	Gen / enzima	Locus	Exones	Masa (Da)	Aminoácidos
A	SGSH: Heparan N-sulfatasa	17q25.3	8	56,695	502
B	NAGLU: Alfa-N-acetilglucosaminidasa	17q21.2	6	82,266	743
C	HGSNAT: AcetilCoA: alfa-glucosaminide acetiltransferasa	8p11.21	18	70,496	635
D	GNS: N-acetilglucosamina 6-sulfatasa	12q14.3	14	62,082	552

1.1.2 MPS IIIC

La mucopolisacaridosis IIIC, causada por alteraciones en el gen HGSNAT (Heparan alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa), el cual se encuentra localizado en el cromosoma 8p11.21 con 62,4 kb de longitud y 18 exones, codifica una proteína de 635 aminoácidos (1), involucrada en la acetilación de residuos de glicosaminas terminales de Heparan sulfato intra-lisosomal, tiene efecto de disminución de la actividad enzimática de Heparan alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa, una proteína de membrana de 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal dentro del lisosoma y el C-terminal en el citosol (2), conlleva a la acumulación de Heparan sulfato en el lisosoma y por tanto, a la presentación de síntomas y signos con múltiple compromiso y neurodegeneración (3, 4).

La MPS IIIC es causada por aproximadamente 70 mutaciones (37 missense/nonsense, 14 de splicing, 5 pequeñas deleciones, 5 pequeñas inserciones, 1 indel, 2 grandes deleciones, 1 grande inserción y 1 reordenamiento complejo) en el gen HGSNAT, siendo el tipo más frecuente las mutaciones missense e inserciones y duplicaciones pequeñas, algunas de las cuales se muestra en la figura 1-1 (www.hgmd.org, consultado el 17 de abril de 2017) (15).

Fig. 1-1: Ubicación de mutaciones MPS IIIC en el gen *HGSNAT*. Los exones se representan por cajas. Las posiciones de las mutaciones missense se muestran arriba del gen. Otras mutaciones (nonsense, inserciones, deleciones y mutaciones de empalme de sitio) se muestran abajo del gen. Mutaciones nonsense y missense se presentan con base a los cambios de aminoácidos, mientras que las mutaciones en sitios de empalme, inserciones y deleciones se presenta con base en los cambios de nucleótidos. Las nuevas mutaciones se muestran en negrita (15).



Tomado de Feldhammer et al., 2009

Las mutaciones identificadas, pueden tener diferente acción sobre la proteína. Una caracterización de la región promotora del gen *HGSNAT* y evaluación del impacto funcional del promotor fue realizado a variantes en 23 pacientes con MPS IIIC, encontrando que la transcripción de gen es impulsado por un promotor TATA-less, con una región -101/-20 importante para la actividad del promotor y otra -1073/-716 donde los mutantes mostraban disminución del 60% de la actividad de la enzima, demostrando ser un sitio importante para la relación con elementos CIS en la actividad del promotor (31).

Fedele et al., 2010, demostró a través de un estudio de inmunofluorescencia que algunas mutaciones (p.P237Q, p.A615T y dobles heterocigotos p.L137P / p.A489E y p.W403C / p.A615T) pueden influir en la localización de la enzima, impidiendo que ésta llegue a la membrana del lisosoma, lo cual es crucial para llevar a cabo su función (32).

Clínica general

La edad diagnóstica de la MPS IIIC en comparación con las otras MPS III es la más tardía, presentando un desarrollo de síntomas menos grave, con pérdida de interacción alrededor de los 17 años, pérdida de independencia a los 19 años, y edad media de muerte alrededor de los 20 a 35 años, en comparación con los 15, 17 y 19 años para la MPS IIIA, MPS IIB y MPS IIID respectivamente (33).

Los síntomas de la enfermedad pueden variar en severidad, incluyendo afectación severa del SNC pero leve enfermedad somática (25); se presentan problemas neuropsiquiátricos progresivos, retraso mental, pérdida de la audición, y manifestaciones viscerales relativamente menores, leve hepatomegalia, rigidez articular y cuerpos vertebrales dorsolumbar biconvexos, leves facies tosca e hipertrichosis (34).

Epidemiología

La MPSIIIC es la tercera más alta en frecuencia, representando el 5.56% de un estudio de 90 casos confirmados de MPS en pacientes de Lahore, Pakistán (35), una frecuencia estimada de 0,21 a 0,7 por 100.000 recién nacidos vivos para Francia y los Países Bajos respectivamente (33, 36), incidencia de 0,12 por 100.000 nacidos vivos en Portugal (37), 0,07 por 100.000 nacidos vivos en Australia (38), y 0,34 por 100.000 nacidos vivos en Suecia (39). La incidencia de MPS IIIC para la población colombiana no ha sido reportada, Gómez et al., 2012 reporta una incidencia para MPSIII total de 0.17 por cada 100.000 nacidos vivos en la región Cundiboyacense (5) y se cree que para la región descrita por Velasco et al., 2017 es cercana a 1 por 200 nacidos vivos.

Proteína

Como se ha mencionado, la enzima acetil-CoA: α -glucosaminida-N-acetiltransferasa, es una proteína de 11 dominios transmembrana con el extremo N-terminal dentro del lisosoma y el C-terminal en el citosol (2) que cataliza la transferencia de un grupo acetilo de acetil-coenzima A (acetil-CoA) citoplasmática a la glucosamina de sulfato de heparán dentro del lisosoma. Esta acetilación transmembrana es realizada a través de un mecanismo de ping-pong; en dos reacciones acetilación de la enzima, y transferencia del grupo acetilo a glucosamina (40).

El mecanismo de acción descrito empieza con la unión de acetil-coA a la N-acetiltransferasa en el lado citoplásmico del lisosoma; la enzima es acetilada y se libera CoA. El intermedio acetil-enzima sufre un cambio conformacional que mueve la enzima acetilada hacia el lumen del lisosoma. La glucosamina se une a la enzima acetilada (enzima isomerizada), con posterior transferencia del grupo acetilo para formar N-acetilglucosamina. Posteriormente se produce la isomerización, devolviendo la enzima a su conformación en el lado citoplasmático del lisosoma (41) figura 1-2.

El sitio reactivo de los residuos involucrados en la reacción de acetilación, fue estudiado a través de mediciones de actividad enzimática frente a tratamientos de aminoácidos con diversas modificaciones de reactivos, logrando evidenciar en el sitio activo la ubicación de histidina, esencial para la existencia de un intermediario acetil-enzima que requiere el pH bajo del citoplasma, en contraste con las condiciones dentro del lisosoma, que favorecen la desacetilación del Acetilhistidina (41).

La deficiencia de la enzima, conlleva a la acumulación de heparan sulfato en lisosoma y la posterior manifestación de síntomas y signos caracterizados principalmente por el deterioro severo del SNC (25), presentando problemas neuropsiquiátricos progresivos, retraso mental, pérdida de la audición y manifestaciones viscerales menores (34).

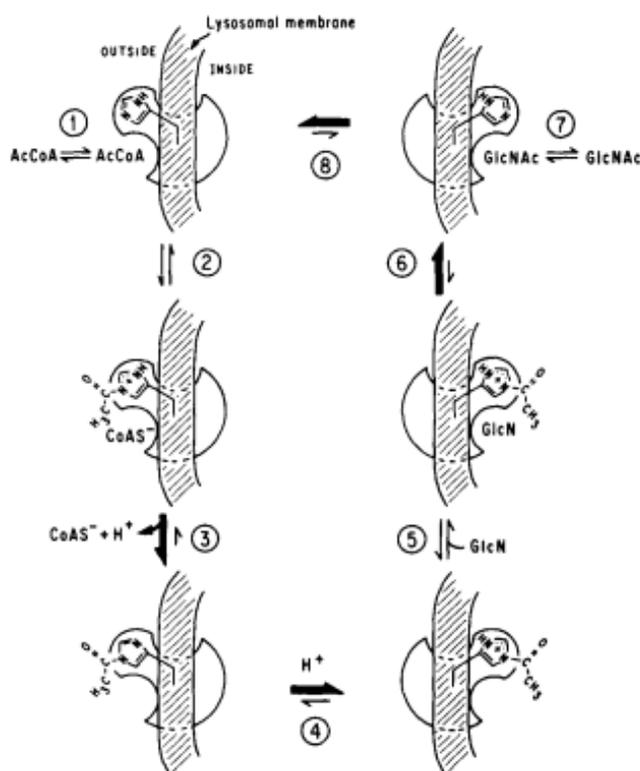
La fisiopatología que acompaña el deterioro nervioso, fue abordado en un estudio realizado por Cannals et al., 2015 en el que se utilizaron células pluripotenciales inducidas y diferenciadas a neuronas a partir de fibroblastos de pacientes con MPS IIIC, que mostró alteraciones lisosomales en concordancia con la naturaleza progresiva de la enfermedad, así como desconexión de neuronas, subconjuntos de células altamente conectadas y una evolución de red hacia estructura *disassortive*, que es altamente susceptible a daños (42).

Manejo

En la actualidad se han propuesto tratamientos experimentales para la enfermedad como la terapia de reducción del sustrato a través del uso de siRNAs en la inhibición de los genes EXTL2 y EXTL3 que son importantes en la síntesis del heparán sulfato (43) o la utilización de aminoglicosidos y no aminoglicosidos en fibroblastos de pacientes con MPSIIIC (44) entre otras, sin embargo, hasta el momento no se cuenta con un método efectivo, se

necesita más investigación hacia la consecución exitosa del tratamiento adecuado para el síndrome.

Figura 1-2 Mecanismo propuesto para la acetil-CoA: α -glucosaminida-N-acetiltransferasa. En la primera etapa, acetil-coA se une a la N-acetiltransferasa en el lado citoplasmático de la membrana. Una vez que se forma el acetilhistidina intermedio (etapa 2), tiende a perder un protón (etapa 3) y, por tanto, no puede transferir el grupo acetilo. El paso 4 es el primer cambio conformacional, que lleva la acetilhistidina al interior del lisosoma. Dentro del medio ácido, la acetilhistidina tendrá una tendencia mayor a protonarse, aumentando su susceptibilidad al ataque nucleofílico por la glucosamina y la formación subsiguiente de N-acetilglucosamina (etapas 5-7) Una vez desacetilada la enzima, Asume su conformación en el lado citoplasmático de la membrana (segundo cambio conformacional, etapa 8).



Tomado de Bame y Rome, 1986.

Efectos fundadores en enfermedades de depósito lisosomal

Diferentes efectos fundadores de enfermedades de depósito lisosomal han sido encontrados. Oliveira de Alencar et al., 2014 reportó un efecto fundador en población brasilera para la mutación 30delG del gen GAL, causante de la enfermedad de Fabry, un trastorno ligado al cromosoma X del metabolismo de glicoesfingolípido que resulta de una actividad deficiente de la enzima lisosómica α -galactosidasa (α -Gal A) y la consiguiente incapacidad para metabolizar Globotriaosilceramida (Gb3), que conduce a la acumulación de este lípido en muchos órganos y tejidos (45).

Díaz et al., 2000 encontró un efecto fundador en europeos no judíos y judíos asquenazí de las mutaciones N370S y 84GG respectivamente, causantes de la enfermedad de Gaucher de tipo 1, un trastorno de almacenamiento lisosomal, que resulta de la actividad deficiente de la beta-glucosidasa ácida (GBA) y posterior acumulo de glucocerebrósido (46).

Otro efecto fundador fue encontrado en Monte Santo (Brasil), analizando la mutación missense p.H178L, causante de la enfermedad MPS VI o síndrome de Maroteaux-Lamy, que lleva a deficiencia de la enzima arilsulfatasa B y posterior acumulación de dermatán-sulfato (23).

Para Sanfilippo C, aunque el espectro de mutaciones en pacientes muestra alta heterogeneidad, algunas mutaciones identificadas tienen alta frecuencia dentro de una población o incluso a través de las poblaciones, lo que sugiere efectos fundadores (15); un estudio en pacientes con MPS IIIC sugirió efectos fundadores en la población holandesa, donde las dos mutaciones, la p.R344C y p.S518F representaron el 22,0% y el 29,3%, respectivamente de los alelos entre los probandos (47). Otro estudio demostró que los probandos de 3 de las 10 familias estudiadas eran homocigotos para la mutación c.852-1G4A y que todos estos pacientes tenían orígenes en el sur de Italia (48). La mutación c.525dupT se encontró en 5 de 6 alelos de MPS IIIC pacientes de Portugal y también se sugirió un posible efecto fundador (49). Para Colombia sólo ha sido reportado un *cluster* para la mutación c.1360C>T en la vereda de Runta, Boyacá (6).

1.1.3 MPS IIIC en Runta

El estudio realizado por Velasco et al., 2017 en la población de Runta (objeto de esta investigación), analizó la historia natural de 5 pacientes con MPSIIIC con la mutación c.1360C>T, encontrando diferencias significativas al comparar la edad de inicio ($p =$

0,00324), la edad de trastorno neurocognitivo mayor ($p = 0,00186$) y la pérdida de habilidades de deambulaci3n ($p = 0,00186$) con datos reportado en otros pacientes europeos, sugiriendo que en la poblaci3n de Runta, la MPSIIIC presenta una forma m1s grave de la condici3n en cada estadio cl3nico (6).

1.2 Gen3tica de poblaciones

1.2.1 Deriva gen3tica

La deriva gen3tica es una fuerza evolutiva que modifica las frecuencias al3licas y produce cambios evolutivos por acontecimientos al azar lo que da como resultado cambios en el acervo g3nico entre generaciones sucesivas de una poblaci3n. Debido a que es un efecto acumulativo de eventos aleatorios, la deriva gen3tica no puede producir adaptaci3n, pero puede hacer que las frecuencias de los alelos cambien, lo que es por s3 mismo, un mecanismo de evoluci3n (8).

Diferentes simulaciones realizadas por Herron et al., 2014, demuestran que el efecto de la deriva disminuye a medida que aumenta el tama1o de la muestra, por lo cual, la deriva gen3tica es un poderoso mecanismo evolutivo en poblaciones peque1as, pero su poder disminuye en poblaciones m1s grandes (8, 50).

El desplazamiento de las frecuencias de los alelos produce dos efectos importantes y relacionados: 1. Los alelos se pueden desplazar a la fijaci3n o p3rdida, con una probabilidad de fijaci3n igual a la frecuencia del alelo (51) y 2. La frecuencia de los heterocigotos declina, llevando a una p3rdida de heterozigosidad y por ende un aumento de homocigosidad que expone alelos delet3reos a la selecci3n.

De esta forma, la deriva gen3tica es un mecanismo no adaptativo de la evoluci3n, donde las frecuencias de los alelos pueden cambiar de una generaci3n a la siguiente, llevar a la fijaci3n de algunos alelos, la p3rdida de otros, y a una disminuci3n general en la diversidad gen3tica. La deriva es m1s influyente en poblaciones peque1as, cuando la selecci3n es d3bil, y sus efectos se agravan a trav3s de generaciones (8).

Efecto fundador

Los fundadores originales de cada población son pequeñas muestras de la población donante y por lo tanto difieren entre sí en las frecuencias de los alelos debido a un efecto de muestreo aleatorio. Esta variación inicial se llama efecto fundador (52). Un efecto fundador puede resultar del establecimiento de una nueva población de individuos derivados de una población mucho mayor o de una reducción extrema en el tamaño de la población (cuello de botella). En cualquiera de los casos los alelos presentes inmediatamente después del evento se pueden encontrar en una frecuencia mucho más alta de lo que eran anteriormente y alcanzar frecuencias mayores por deriva genética que tenga lugar mientras la población siga siendo pequeña (53).

Las poblaciones aisladas se pueden definir como subpoblaciones derivadas de un pequeño número de individuos que se separaron a causa de un evento fundador y mantiene este estado por muchas generaciones. El aislamiento geográfico y/o cultural que resulta de estas poblaciones tiene consecuencias genéticas, como, por ejemplo, la endogamia, junto con el flujo de genes muy restringido de poblaciones vecinas que a menudo puede ser observado. Por lo tanto, los genomas tienden a mostrar mayor homogeneidad en los aislamientos en comparación con las poblaciones cosmopolitas, que se refleja por un reducido tamaño efectivo de la población (N_e , el número efectivo de personas requeridas para explicar la variabilidad genética observada) (9, 54).

En general, las características de una población que ha sido producto de un efecto fundador, corresponde a cambios en relación a la población original, tales como:

- Disminución en el número de alelos (55) que conlleva a la pérdida de diversidad alélica, la pérdida de heterocigosidad y el aumento de homocigosidad (8).
- Fijación de alelos. Un efecto fundador puede ocasionar la presencia de un alelo en una frecuencia inusualmente alta en una población si el alelo es selectivamente neutro y todas las copias son idénticas por descendencia, lo que explica además la presencia de enfermedades de alta frecuencia en muchas poblaciones aisladas (53, 56).
- Incremento en el nivel de desequilibrio de ligamiento (55), causada por la pérdida de haplotipos en la población, que lleva a la presencia de sólo algunas combinaciones.

1.2.2 Endogamia

El tipo más común de apareamiento no aleatorio es la endogamia (apareamiento entre parientes genéticos). El efecto de la endogamia en la genética de una población es aumentar la frecuencia de los homocigotos en comparación con lo que se espera en los supuestos de Hardy-Weinberg (50).

Sin embargo, aunque la endogamia hace que las frecuencias genotípicas cambien de generación en generación, no hace que las frecuencias de los alelos cambien. Por lo tanto, la endogamia por sí misma no es un mecanismo de evolución. Sin embargo, puede tener importantes consecuencias evolutivas (8).

Estas consecuencias evolutivas se relacionan con la llamada depresión endogámica, que generalmente resulta en la exposición de alelos recesivos deletéreos susceptibles a la selección. Al aumentar por endogamia la proporción de individuos en una población que son homocigóticos, aumenta la frecuencia con la cual los alelos recesivos deletéreos afectan a los fenotipos, afectando la aptitud de la descendencia en la población. Así por ejemplo, los hijos de primos tienen tasas de mortalidad más altas que los hijos de padres no relacionados (8, 57).

Estadísticos F

Los cálculos de los índices de fijación de Wright (F_{it} , F_{st} y F_{is}) son fundamentales para estudiar la diferenciación genética de las poblaciones. Estos índices pueden definirse en términos de correlaciones entre los gametos unificadores (58); como funciones de las heterocigosidades y sus expectativas de Hardy-Weinberg (59, 60), o como funciones de los componentes de la varianza de un análisis anidado de la varianza (61).

Weir y Cockerham describieron tres parámetros básicos cuando los individuos diploides son muestreados de una serie de poblaciones de la siguiente manera: el coeficiente de endogamia F , F_{it} de Wright, es la correlación de genes dentro de un solo individuo sin considerar la existencia de subpoblaciones; la co-ascendencia, θ , F_{st} de Wright, es la correlación de genes de individuos procedentes de diferentes subpoblaciones; y f , F_{is} de Wright, es la correlación de los genes dentro de los individuos dentro de las subpoblaciones (61). Cuando una población establece un patrón de subdivisión de otros debido a algún

tipo de aislamiento genético, el proceso se denomina microdiferenciación o microespecificación. Este proceso puede ser evaluado paramétricamente usando F_{st} de Wright o θ de Cockerham y Weir.

Algo importante para el uso de estos estadísticos es que no se ven afectados por aspectos de los esquemas de muestreo de los alelos observados por locus, el número de individuos muestreados por población o el número de poblaciones muestreadas (61).

La fórmula que describe los estadísticos F , está dada por:

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e}$$

Donde H_e es la heterocigosidad esperada bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg en una población total creada combinando todas las poblaciones, y H_o es el promedio de las poblaciones separadas (subpoblaciones) en sus heterocigosidades esperadas (8).

A la luz de los estadísticos F tenemos, que las poblaciones que exhiben altos niveles de endogamia presentan un aumento en la homocigosidad y tendrán valores F positivos, mientras que aquellas poblaciones que exhiben un apareamiento al azar entre individuos procedentes de diferentes subpoblaciones tendrán valores F negativos (8, 60).

1.2.3 Selección de alelos recesivos

La selección ocurre cuando individuos con fenotipos particulares sobreviven a la madurez sexual a tasas más altas que aquellos con otros fenotipos, o cuando individuos con fenotipos particulares producen más descendientes durante la reproducción que aquellos con otros fenotipos (50). Teniendo en cuenta que la MPS IIIC confiere un fenotipo incapacitante y letal, podemos inferir selección en contra del genotipo homocigoto recesivo y por ende del alelo recesivo.

Sea p la frecuencia del alelo dominante A , y q la frecuencia del alelo recesivo a . La selección en el alelo recesivo muestra el fitness (w) de los genotipos dados por:

w_{AA}	w_{Aa}	w_{aa}
1	1	$1 - s$

Donde s , denominado coeficiente de selección, representa la fuerza de selección frente a los homocigóticos recesivos en relación con los otros genotipos. En el caso puntual de letalidad $s=1$, tendremos un fitness de 0 para los homocigotos recesivos, que se traduce en evolución por un cambio de frecuencias alélicas en la siguiente generación, aumentando p y disminuyendo q , así como la pérdida de equilibrio de las frecuencias genotípicas (8).

A pesar de la disminución del alelo q , cuando el alelo recesivo es raro (como en caso de la MPS IIIC), la mayoría de las copias de la población se encuentran en individuos heterocigóticos, donde están efectivamente ocultos de la selección y de esta manera logran pasar de una generación a otra (8).

1.2.4 Microsatélites

Los microsatélites también conocidos como repeticiones cortas en tándem (STRs, Short tandem repeats) (62, 63), son secuencias de ADN que contienen bloques de repeticiones de 6 nucleótidos o menos, dispuestas sin interrupción un número limitado de veces. Se localizan a lo largo de todo el genoma, siendo abundantes en regiones centroméricas o en porciones heterocromáticas de los cromosomas y su densidad promedio por genoma es de un locus STR cada 104 o 105 bases; así, las secuencias microsatélites constituyen aproximadamente el 3% del genoma humano (64).

Los microsatélites se clasifican según el tipo de arreglo de sus secuencias repetidas, los de estructura simple se componen de una misma secuencia de repetición, independientemente del número de bases que la conformen. Los compuestos están conformados por más de un tipo de repetición en tándem, generalmente con repeticiones muy similares en tamaño y secuencia y varían solo en un nucleótido. Los complejos presenta más de un tipo de repetición pero pueden ser de diferente tamaño y secuencia (65).

Otra clasificación considera secuencias perfectas, imperfectas, interrumpidas o compuestas: En un microsatélite perfecto la secuencia de repetición no está interrumpida por ninguna base que no pertenezca al motivo; en un microsatélite imperfecto, hay un par de bases entre los motivos repetidos que no concuerdan con la

secuencia motivo. En un microsatélite interrumpido hay una pequeña secuencia dentro de la secuencia repetitiva que no coincide con la secuencia motivo y en uno compuesto, la secuencia contiene dos secuencias de repeticiones distintas y adyacentes (66), figura 1-3.

Figura 1-3 Clasificación de microsatélites

Mononucleótido (A) ₁₃	AAAAAAAAAAAAA
Dinucleótido (GT) ₈	GTGTGTGTGTGTGTGT
Trinucleótido (GAT) ₇	GATGATGATGATGATGAT
Tetranucleótido (CTAG) ₆	CTAGCTAGCTAGCTAGCTAG
Pentanucleótido (CATTG) ₅	CATTGCATTGCATTGCATTG
Hexanucleótido (GGATCC) ₄	GGATCCGGATCCGGATCCGGATCC
Microsatélite imperfecto	GTGTGTGTGT A TGTGTGTGTG
Microsatélite interrumpido	GTGTGTGTG CCC GTGTGTGTGT
Microsatelite compuesto	GTGTGTGTG CTCTCTCTCTC

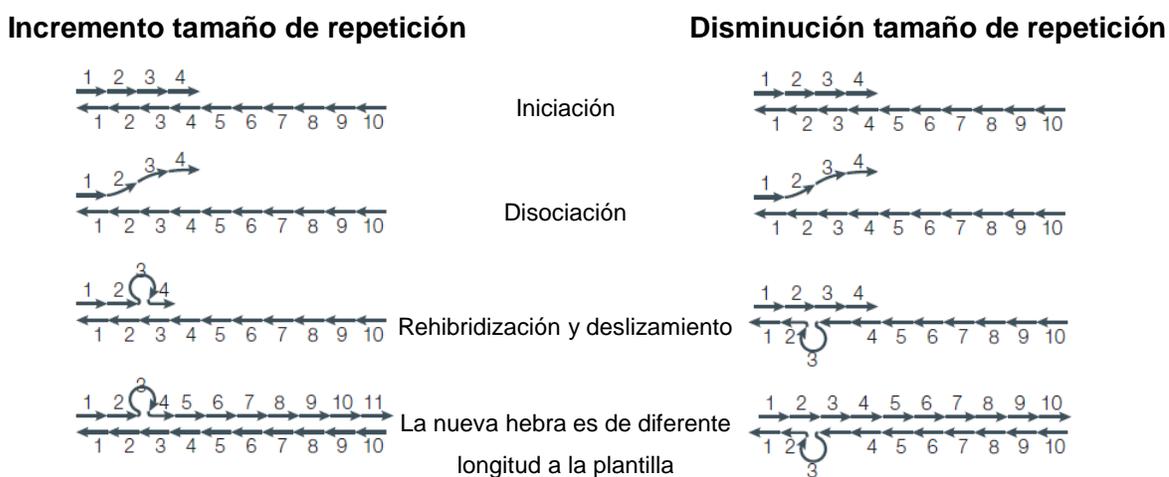
Tomado y modificado de Schlötterer y Harr, 2004.

Los microsatélites son altamente mutables ya sea hacia la ganancia o la pérdida de repeticiones, su tasa de mutación se ha estimado en, 10^{-3} a 10^{-4} eventos por locus por generación, mucho mayor que las tasa de sustitución de nucleótidos simples, y varía entre loci, entre alelos y aun entre especies y depende parcialmente de su estructura intrínseca, como del número de unidades repetidas, la longitud en pares de bases y el motivo de repetición (67).

La base para explicar la dinámica mutacional de los microsatélites puede ser a través del mecanismo de la replicación en *slippage*, o *slippage* de la polimerasa, basado en el modelo de *Streisinger*, que describe un mal apareamiento por deslizamiento de hebras o *slipped-strand mispairing*, que afecta a la ADN polimerasa, provocando una detención del copiado, al parecer es ocasionada por factores como la misma secuencia repetitiva (puede generar una estructura no usual de la molécula de ADN), que produce la detención de la actividad enzima y el complejo de replicación, durante el copiado y la procesividad de la polimerasa sobre la hebra molde (68).

Se genera una disociación del complejo de replicación, que desplaza la enzima y aleja el extremo primado terminal de la hebra naciente, del sitio activo de la polimerasa. Posteriormente, la enzima puede volver a su sitio original, continuando la copia desde la misma unidad de repetición que había dejado en el momento de la interrupción, o en una repetición previa o posterior a ella. Estas situaciones dependen de un evento accesorio que es la formación de un intermediario mal alineado transitorio (IMAT) o un *loop* que generalmente contiene una unidad de repetición, la cual puede generarse sobre alguna de las cadenas sencillas naciente o molde (69), figura 1-4.

Figura 1-4 Desplazamiento de replicación en microsatélites (*Replication slippage*)



Tomado y modificado de Ellegren, 2004.

Uno de los modelos de mutación en microsatélites mayormente aceptado es el modelo por pasos, *Step wise mutation model* (SMM), tiene en cuenta que cuando un microsatélite muta, gana o pierde una repetición; esto implica que dos alelos que difieren solo en una repetición, es decir, comparten un ancestro común más reciente, están más relacionados, que aquellos que difieren en varias unidades (70).

1.2.5 Datación de la mutación

Es posible realizar aproximaciones a la edad de una mutación a partir de la variación genética entre diferentes copias (variación intraalélica) como de su frecuencia. Las estimaciones basadas en la variación intraalélica se derivan de la desintegración

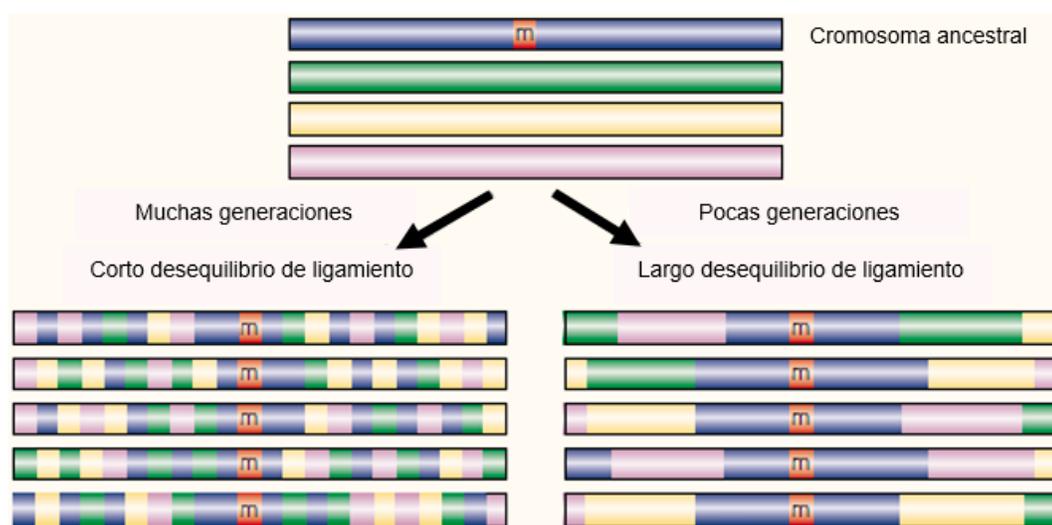
exponencial del desequilibrio de ligamiento (LD) debido a la recombinación y la mutación (11). El LD que se crea cuando una nueva mutación se produce en un cromosoma que lleva un alelo particular en un lugar cercano, se erosiona gradualmente por recombinación, por lo cual se espera que la extensión de LD en las poblaciones disminuya con el tiempo y la distancia de recombinación (r , o la fracción de recombinación) entre los marcadores (10) (71) figura 1-5.

Algunos factores que influyen en el desequilibrio de ligamiento pueden ser: (10):

- Deriva genética, como un fenómeno que aumenta el LD por pérdida de haplotipos de la población.
- Crecimiento de la población, disminuye el LD al reducir la deriva genética.
- Migración, puede crear LD por ADMIXTURE entre poblaciones, inicialmente proporcional a las diferencias de frecuencia de alelos entre las poblaciones y luego el LD entre los marcadores no enlazados se pierde rápidamente, mientras que con los marcadores cercanos se descompone lentamente por recombinación.
- Selección natural, cuando un haplotipo completo flanquea una variante favorecida que puede aumentar la frecuencia o incluso a fijarse, o por selección epistática por combinaciones favorables de alelos en dos o más loci en el mismo o en diferentes cromosomas.
- Tasas variables de mutación, como por ejemplo, en islas CpG que podrían tener alta tasa de mutación y por lo tanto poca o ningún LD con marcadores cercanos.
- Conversión de genes, en el que un corto tramo de una copia de un cromosoma se transfiere a la otra durante la meiosis, lo que puede romper LD de una manera similar a la recombinación o mutación recurrente.

Los programas de cálculo de edad de la mutación, se basan en algunos de estos factores para determinar a través de los cambios presentes en el haplotipo el tiempo del posible origen de la mutación. Para el desarrollo de esta metodología, son mayormente utilizados marcadores STRs alrededor de la mutación, ya que en comparación con los SNP, tienen una mayor tasa de mutación que permite la acumulación de cambios a través del tiempo.

Figura 1-5 Patrones de desequilibrio de ligamiento basado en el tiempo de origen de una mutación de enfermedad. La mutación (m) se muestra en rojo y los marcadores cromosómicos adyacentes se muestran en otros colores, de acuerdo con su cromosoma de origen. Estos son mezclados por recombinación durante la meiosis en células de óvulos o espermatozoides. Las mutaciones que ocurrieron recientemente han tenido menos eventos de recombinación y por lo tanto están asociadas con largos intervalos de desequilibrio de ligamiento (LD) (derecha). Mutaciones que ocurrieron hace mucho tiempo han tenido muchos eventos de recombinación y por lo tanto están asociados con intervalos cortos de LD (izquierda).



Tomado y modificado de Ostrer H., 2001.

1.2.6 Años por generación

Como vimos en la datación de la mutación, el factor tiempo es necesario para romper el LD, razón por la cual, algunos software como el DMLE utilizan la tasa de crecimiento de la población teniendo en cuenta los años por generación.

En la práctica, la longitud de generación puede variar ampliamente: La paternidad puede extenderse desde la pubertad hasta la muerte o en las mujeres desde la menarquia hasta la menopausia (72).

Un estudio realizado por Ossa et al., 2012, con población indígena mapuche chilena, evidenció que la edad de menarquia en las adolescentes no indígenas es más temprana (147 meses) que en las niñas de apellidos indígenas (155 meses), aunque estas

diferencias no necesariamente deben ser atribuidas a etnicidad, sino más bien a un grupo de factores que incluyen como el nivel socioeconómico, estado nutricional y la enfermedad durante la vida preadulta (73-75). Otro estudio realizado con indígenas embera chamibida en Colombia revela un promedio de edad de la menarquia de 13,5 años, con edades mínima y máxima de 9 y 19 años y con un promedio de edad de la primera gestación de 18 con máxima de 38 años. El comportamiento reproductivo de esa población se caracteriza por una entrada a la unión (matrimonio) a los 17,8 años en promedio, con intervalos intergenésicos cortos, con una tasa de fecundidad ajustada de 5,12 hijos, que acepta la planificación familiar occidental y con mayor acceso a la escolaridad formal (72).

Papadimitriou A., 2016, describió la evolución de la edad en la menarquia desde tiempos prehistóricos a los actuales, encontrando en la época paleolítica y neolítica una edad entre 7 y 13 años, en la época medieval de 14 años (Siglo V a XV a.C), con un rango de 12-15 años y un retraso significativo en la edad de la menarquia (15 a 16 años) a principios de los tiempos modernos, poco después de la revolución industrial (1760 a 1840), debido a la deterioro de las condiciones de vida y luego en el siglo XX disminuyó (12-13 años) gracias a la mejora de las condiciones socioeconómicas. Su conclusión se centró a partir de los datos paleoantropológicos, donde las niñas en épocas prehistóricas maduraron en edad similar a la de los tiempos modernos (76).

La variación en la edad de la menarquía (y de edades generacionales) ha sido explicada teniendo en cuenta las diferencias de las condiciones socioeconómicas, sin embargo, algunos autores también argumentan que a menudo hay compensaciones entre fecundidad y longevidad, presentándose un aumento de la fecundidad asociado con longevidad reducida (77, 78). Por otra parte, investigaciones endocrinológicas directas han confirmado alta frecuencia de ciclos anovulatorios y lutealmente insuficientes en los periodos perimenarquéal y peri menopáusico (79-81), con niveles de función ovárica más bien constante entre estos extremos de la amplitud reproductiva (82-84), que apoya la idea de una edad de fecundidad más corta de lo pensado con un inicio más tardío poco después de la menarquia (después de los 15 años) hasta antes de la menopausia.

Como podemos ver, la longitud de una generación se utiliza principalmente como un cálculo sobre la credibilidad de la evidencia; un lapso demasiado largo o corto entre padre

e hijo puede llevar a apreciaciones erróneas y es con ese propósito que los promedios de 20 y 25 años continúan siendo utilizados.

1.3 Vida prehispánica / Conquista

La ocupación del territorio Americano hace quizá 20 mil años antes de la llegada de los europeos dio origen a un conjunto de comunidades indígenas que conocieron y modificaron su entorno, adaptándolo según sus características, necesidades y nivel tecnológico alcanzado (85).

Hacia el siglo VIII d.C se produce una oleada de migraciones de etnias pertenecientes a la familia lingüística Chibcha (hace parte Muisca, Lanches, Guanes) desde la Guajira y la cuenca del lago de Maracaibo, hacia los andes orientales de Colombia y Venezuela, dando origen a la ocupación tardía de pueblos de habla chibcha de estas regiones (86).

De acuerdo con los cambios ambientales, culturales y biológicos percibidos en la sabana de Bogotá, se divide la secuencia de las ocupaciones humanas prehispánicas en varios períodos (87) (Tabla 1-3):

- Precerámico Temprano (hasta mediados del III milenio a.C.), en que prevalece la recolección y la caza. La gente es robusta, dolicocefala, de dientes grandes y rostro mesomorfo.
- Precerámico Tardío (finales del III milenio a inicios del I milenio a.C.), cuando surge la horticultura y la pesca como actividades de subsistencia importantes. La población se ve afectada por un proceso de gracilización y de reducción del aparato masticatorio, y por enfermedades infecciosas propiciadas por el crecimiento demográfico y la sedentarización.
- Formativo o Herrera (I milenio a. C. a siglo VIII d. C.), cuando surge la agricultura del maíz y otros productos como el frijol y la achira. La población se torna más grácil y braquicefala tipo mongoloide y se congrega en torno a pequeñas aldeas.
- Tardío o Chibcha (siglos IX-XVI d. C.), cuyas características fueron similares a las descritas por los conquistadores europeos.

Tabla 1-3 Cambios socioculturales, climáticos y biológicos en los Andes Orientales de Colombia.

PERÍODO	CRONOLOGÍA	CLIMA	ECONOMÍA Y CULTURA	BIOTIPO	SITIOS
República	ss XIX-XXI d. C.	Calentamiento global.	Industria	Mestizo hipsi-braquicéfalo	Múltiples
Conquista y Colonia	ss XVI-XIX d. C.	Pequeña Edad de Hielo.	Extractiva	Mestizo braquicéfalo, español dolicocefalo	Edificaciones coloniales
Chibcha Tardío	ss XIII-XV d. C.	Más cálido, menos húmedo.	Agricultura intensa, mayor densidad demográfica. Muiscas, guanes, laches, chitareros.	Braquicéfalo	Bogotá, Tunja, Duitama, Sogamoso, Los Santos, S. N. Cocuy, Silos
Chibcha Temprano	ss IX-XII d. C.	Menos cálido y más húmedo.	Período de transición, cerámica pintada	Braquicéfalo	Portalegre, Candelaria, Funza
Herrera Tardío	ss I-VIII d. C.		Agricultura más intensa, generalización del maíz. Desarrollo de templos y observatorios astronómicos líticos. Cerámica incisa.	Braquicéfalo Deformación craneal	Madrid 1, laguna de La Herrera, Templo del Sol (Sogamoso), Templo de Goranchacha (Tunja), El Infiernito (Villa de Leiva), San Lorenzo (Duitama)
Herrera Temprano	I milenio a. C.	Calentamiento, desecación de lagos, entre ellos, La Herrera.	Inicios de la agricultura (maíz), construcción de camellones, canales, y estructuras líticas. Cerámica incisa.	Dolico-mesocéfalo	Madrid 0, Zipacón
Precerámico Tardío	III-II milenio a. C.	Más seco y cálido	Caza, recolección, pesca, horticultura (raíces del altiplano).	Dolicocefalo	Aguazuque, Vistahermosa
Precerámico Temprano	VI-III milenio a. C.	Hipsitermal, muy cálido	Caza (venado, extinción de megafauna), recolección. Inicios de domesticación del curí.	Dolicocefalo	Chía, Galindo, Neusa
	VIII-VII milenios a. C.	Inicios del Holoceno y del deshielo			Checua, Tequendama, Sueva, Nemocón, Floresta
	IX milenio a. C.	Estadial El Abra	Caza (venado, caballo, mastodonte, curí, otros), recolección.		Tibitó, El Abra.
	X milenio a. C.	Interstadial Guantiva			Pubenza, Tocogua, Río Sogamoso
	XVIII-XI milenios a. C.	Estadial Fúquene			

Tomada de Rodríguez, 2011.

De los Muiscas, Guanes y Lanches arqueológicamente se registra presencia después de los agroalfareros tempranos o Herreras (pueblos contemporáneos vecinos), con los que se establecieron importantes redes de intercambio, por su capacidad para explotar los pisos térmicos y compleja organización social y religiosa (88), figura 1-6.

El altiplano Cundiboyacense estaba conformado por numerosos valles apartados unos de otros y en cada valle había un señor que lo gobernaba y que le daba su nombre; varios valles estaban supeditados a un cacique y todo el conjunto lo estaba a un gran señor, como Tunja o Bogotá. Este último muy poderoso y el mayor y universal señor de todos los otros caciques de la tierra y valle de Bogotá (87).

mantenían una distribución de asentamientos dispersos y de baja densidad demográfica (88). Las condiciones de vida que se han logrado recrear muestran, que se trató de indígenas más comerciantes que guerreros y que los de Tunja eran menos belicosos y más religiosos (88).

La alimentación general de las poblaciones indígenas prehispánicas se apoyaba en productos que proporcionaban una dieta suficiente y equilibrada en proteínas de tipo vegetal, animal, energía, vitaminas y minerales con infinidad de frutas y verduras (85), gracias al aprovechamiento de diferentes pisos térmicos, la habilidad de intercambio de productos con otros pueblos de tierras bajas y el papel del cacique en la distribución de alimentos en épocas de escases (88).

El pueblo muisca era religioso y muy ritual con normas morales claramente determinadas y un severo código penal, aplicado a los que contravenían las normas al matar o robar, aplicaban penas desde ahorcar, cortar manos, orejas, cegar con fuego, muerte y expulsión; no toleraban violaciones (88) o el incesto (89).

Los matrimonios se realizaban, por lo general, entre miembros de diferentes bandos, aunque “no existía ninguna desaprobación en contra de matrimonios entre personas de la misma parte”. Eran polígamos, pudiendo el novio tener tantas mujeres cuanta disponibilidad económica y social poseía, teniendo en cuenta que la alianza se realizaba entre grupos sociales y no entre individuos. La unidad de la organización social muisca estaba constituida por las capitanías o parcialidades, grupos exógamos matrilineales a nivel intralocal, endógamos en sentido interlocal, cuyo poder lo heredaba el sobrino, hijo de la hermana del cacique, pues se tenía la certeza de que el hijo de la hermana era del mismo linaje (87).

Hasta mediados del siglo XX con el descubrimiento, excavación y análisis de extensos cementerios en el altiplano Cundiboyacense por parte del profesor Eliecer Silva Celis, se inició el estudio de las enfermedades antiguas mediante sus restos óseos momificados (90, 91).

El estudio de la paleopatología en restos óseos no llega al 1% de las enfermedades que afectaron en la época, sin embargo se pueden evidenciar patologías dentales (caries, enfermedad periodontal, abscesos) y desgaste posiblemente debido a la ingesta de alimentos duros y hábitos como tensionar la cuerda de los arcos (87). La más frecuente patología encontrada en los restos óseos de los muiscas, es la enfermedad articular degenerativa, relacionada con el trabajo mecánico sobre las articulaciones. Se reporta también tuberculosis principalmente en poblaciones agrícolas sedentarias y treponematosis que en el caso de los muiscas de Tunja no fue descrito (88).

A la llegada de los españoles se encontraron con una sociedad organizada, con una compleja organización política y religiosa y con una muy variada producción agrícola, autosuficiencia alimentaria y un sistema de intercambio mediante ferias y mercados (92). La irrupción de Europa en el continente americano a partir del siglo XVI modificó de manera abrupta la vida de los pueblos indígenas, destruyendo los poblados, las sementeras y los núcleos familiares. Fueron esclavizados en represalia de la muerte de algunos españoles a manos de los nativos, desde 1504 hasta que en 1542 por orden del Rey Carlos de España se prohibió esa condición y restituyeron la libertad de los indios (85).

La conquista española trajo consigo la disminución de la población nativa por causa de las enfermedades. La población infantil indígena era a su vez la más susceptible a las epidemias de enfermedades infecciosas traídas por los españoles, como la ocurrida en el año de 1559 cuando surgió una pestilencia de viruela y sarampión tan impactante que murieron muchos indígenas, especialmente de la provincia de Vélez, la que se repitió en 1570. El bienestar nativo se eclipsó por 500 años, llevándose consigo a millares de indefensos aborígenes y acabando con tradiciones agrícolas milenarias, sustentadas en la laboriosidad e ingenio aborígen, que fueron suplantadas por cultígenos poco adaptados a nuestro suelo, convirtiendo la “comida de indios” en alimentos poco deseables (87).

Dentro de las catástrofes demográficas, se encuentra la ocurrida en el altiplano Cundiboyacense a finales del año 1558 causada por la enfermedad de la viruela que llevó a la muerte de más de 15.000 personas naturales (93) y en 1816 se dio otra epidemia de Viruela y Lepra. Desde 1835 hasta 1842 se presentaron los picos más altos de muertes de defunciones en las 3 parroquias de Tunja. En 1836 se presentó una epidemia de sarampión y en 1837 se registró un periodo de hambre en toda la provincia, incluyendo la ciudad de

Tunja donde guerra, hambre, enfermedad y muerte se juntaron (94). En Tunja la población descendió de 53.465 a 8.610 durante esa catástrofe demográfica que caracterizó los siglos XVI y XVII por el desarraigo, las epidemias, los trabajos excesivos y la desarticulación de las sociedades indígenas (95).

2. Capítulo 2 – Metodología

2.1 Objetivo general

Establecer la presencia de efecto fundador de la mutación nonsense c.1360C>T del gen HGSNAT en la población de Runta, Boyacá.

2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar los STR alrededor de la mutación nonsense c.1360C>T, a través de análisis bioinformático.
- Determinar el haplotipo presente alrededor de la mutación nonsense *HGSNAT* a través de marcadores STRs en pacientes portadores y afectados.
- Estimar la edad de la mutación a través del análisis de los haplotipos.

2.3 Tamaño de muestra

La muestra fue tomada en la vereda Runta, ubicada en la parte centro oriental del municipio de Tunja, limita por el norte con la vereda de Porvenir, por el este con el Perímetro Urbano, por el Sur con la vereda de Chorroblando, por el oeste con la vereda de Barón Germania, ubicada a una distancia de 4.6 km de Tunja (9 minutos por la Avenida Oriental); es una de las veredas más pobladas del municipio de Tunja con alrededor de 2570 habitantes.

La muestra fue tomada a conveniencia; de un total de 198 individuos genotipados a través del proyecto desarrollado por el grupo de investigación de Genética Clínica de la Universidad Nacional “IDENTIFICACION DE PACIENTES CON MUCOPOLISACARIDOSIS EN REGIONES “CLUSTERS” CON RIESGO PARA EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES DE DEPOSITO LISOSOMAL EN

COLOMBIA” pertenecientes a la vereda, de los cuales se tomaron 6 muestras de pacientes homocigotos positivos para la mutación, 69 de individuos heterocigotos pertenecientes a 4 familias y del personal médico del Hospital San Rafael de Tunja (que fueran nacidos en la región) 78 muestras control para un total de 153 muestras.

2.4 Criterios de inclusión

- Individuos afectados con la mutación nonsense c.1360C>T con diagnóstico molecular de MPS IIIC.
- Familiares desde primer hasta sexto grado de consanguinidad que sean heterocigotos para la mutación c.1360C>T.
- Habitantes de la vereda que sean heterocigotos para la mutación c.1360C>T.
- Individuos control con padres y abuelos nacidos en la región.
- Firma del consentimiento informado y asentimiento del menor.

2.5 Criterios de exclusión

- Individuos que no pertenezcan a la Vereda de Runta.
- En el caso de los individuos control, aquellos que no tengan padres o abuelos nacidos en la región.

2.6 Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico se realizó usando el kit de extracción *UltraClean Blood DNA Isolation Kit*® (MO BIO Laboratories, USA) a partir de una muestra de 300 µl de sangre periférica, según las instrucciones del fabricante. Se obtuvo dos muestras por cada paciente incluido en el estudio. El DNA obtenido fue cuantificado por espectrofotometría en un equipo *Nanodrop2000*® UV-Vis Spectrophotometer ThermoScientific® (A260/230 >1.0, A260/280 >1.5).

2.7 Selección de STRs

Se procedió a realizar la búsqueda de los STRs alrededor de la mutación abarcando 4 Mb a cada lado de la mutación, utilizando la referencia: *Homo sapiens chromosome*

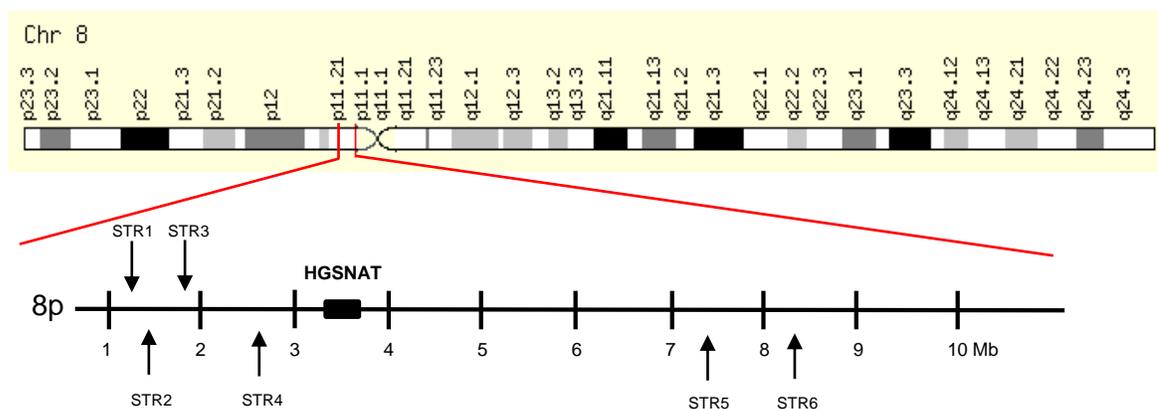
8, GRCh38 *reference primary assembly*, GenBank: CM000670.2 desde la posición 39192412 hasta la 47192412.

Para la definición de los STRs alrededor de la mutación se tuvo en cuenta varios aspectos:

- La distancia final entre los STRs a la mutación, fue determinada teniendo en cuenta trabajos en los cuales se ha desarrollado la misma metodología, encontrando distancia entre 2.7 Mb (45) y 8 Mb (96), por lo cual, hemos seleccionado 6.5 Mb.
- Selección de STRs perfectos y puros de ser posible, teniendo en cuenta que los STRs interrumpidos (con unidades irregulares intercaladas) mutan con menos frecuencia que los alelos ininterrumpidos o perfectos (97).
- STRs con 10 o más repeticiones en el genoma de referencia, teniendo en cuenta que las regiones repetidas homogéneas con números repetidos <10 parecen mutar muy raramente (97). Además, entre más repeticiones tiene el STRs mayor es la probabilidad de ocurrencia de un *slippage* durante la replicación (69).
- STRs en los cuales se lograra diseñar primers cuyo análisis de harpin, homodímero o heterodímero permitieran su utilización.

Fueron seleccionados 6 STRs distribuidos en 6.5 Mb alrededor de la mutación como se ilustra en la figura 2-1.

Figura 2-1: Distribución de STRs alrededor de la mutación.



2.8 Amplificación de los fragmentos genéticos

Esta fase del desarrollo del trabajo de investigación fue realizada con la colaboración del grupo del Laboratorio de Genética Humana y Médica de la Universidad Federal de Pará (Brasil) bajo la coordinación y orientación del Dr. Sidney Santos.

Se realizó amplificación de los 6 STRs alrededor del gen *HGSNAT*, ubicados en regiones intrónicas. Se emplearon los primers diseñados en el programa bioinformático *primer3* (<http://primer3.ut.ee>), sintetizados por Invitrogen (Tabla 2-1).

La amplificación se llevó a cabo a través de 2 PCR multiplex usando Kit Qiagen (Qiagen, Hilden Alemania) en un volumen final de 10 μ L: 5 μ L de Quiagen, 1 μ L Q-sol, 2 μ L H₂O, 1 μ L de Mix de primers y 1 μ L DNA (10ng/ μ L) por reacción.

Concentración mix de primers 1: STR1 0.5 μ M, STR2 1 μ M, STR6 0.5 μ M

Concentración mix de primers 2: STR3 0.5 μ M, STR4 1 μ M, STR5 1.2 μ M

Las condiciones de termociclado fueron las siguientes:

Incubación inicial a 95°C durante 15 min; 35 ciclos a desnaturalización 94°C durante 30s, hibridación 60°C durante 40s, extensión 72°C durante 50s, finalización 5°C durante 4min.

Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis capilar en un ABI PRISM 3130 con el estándar de tamaño LIZ GS-500, el conjunto de filtros D y polímero POP7 (Life Technologies, California, EE.UU.). Se identificaron alelos y asignaron mediante el software GeneMapper IDv3.2 (Life Technologies California, USA).

2.9 Análisis estadístico

La estimación de Equilibrio de Hardy-Weinberg fue realizada con el software Genepop V4, el cálculo de frecuencias alélicas y haplotípicas, desequilibrio de ligamiento, Fis, Fst y Fit fue realizado a través del software Arlequin v3.1.

Para estimar la edad de la mutación, se utilizaron los software ESTIAGE y DMLE v2.3. La metodología de ESTIAGE implementa un método probabilístico para estimar la edad del ancestro común más reciente (MRCA) de un grupo de individuos portadores de la misma

mutación utilizando datos de marcadores multilocus de estos individuos. Utiliza dos características principales (98):

- La frecuencia de recombinación entre cada marcador y la mutación, que fue calculada utilizando el mapa de vinculación física generada por RUTGERS mapa v.2 (99), teniendo en cuenta que las tasas de recombinación son heterogéneas a través del genoma con mayores tasas en ciertos cromosomas (100).
- La tasa de mutación para STRs. Fue utilizada 10^{-3} y 10^{-4} para realizar comparaciones.

Tabla 2-1: Primers para amplificación de fragmentos STRs.

STRs	Bloque de repetición	Secuencia 5'-3'	Tm (°C)	Tamaño producto (bp)
STR1_F	(TAT) _n	[6FAM] AAGACTGCACACCTACAACCA	59.51	149
STR1_R		GGCAACAGTGAGATCCTGACT	59.72	
STR2_F	(TAT) _n	[6FAM] ATCATTGCCATTACTGCCTCCA	60.09	222
STR2_R		ATGAGCTGAGACTGCACCATT	59.72	
STR3_F	(GATA) _n	[6FAM] CGGACTGGGACTCACATCATC	60.20	290
STR3_R		ACCTAAACTTAACCATCACAGGCT	59.96	
STR4_F	(CTTT) _n (CT) _n	[NED] GCATTTGTAAGCTGTCATGGCA	60.09	212
STR4_R		AGGCTGAGATGAGAGGATCGT	60.13	
STR5_F	(TAT) _n	[HEX] CTGGGACTATAGGTGTGTGCC	59.86	166
STR5_R		TGGATGACAGAGTGAGACCTTG	59.44	
STR6_F	(CTTT) _n (CT) _n	[HEX] AAACCCAGGCAAAGAAAAGG	59.23	234
STR6_R		GCCTGGGTGATAGAGCAAGAC	60.47	

La metodología DMLE v2.3. se basa en la relación observada entre el desequilibrio de la mutación y los marcadores ligados en muestras de ADN de individuos normales no relacionados y los pacientes afectados. El programa utiliza la cadena de Markov y algoritmo de Monte Carlo para permitir la estimación bayesiana de la edad de mutación, con base en los siguientes parámetros (101, 102):

- Haplotipos identificados entre los cromosomas de los portadores de mutaciones y los controles de la misma región geográfica.
- Un mapa de la distancia entre la mutación y los marcadores STRs.
- La proporción esperada de los cromosomas que llevan la mutación.

- Tasa media de crecimiento de la población estudiada.

Para estimar la tasa de crecimiento de la población se emplearon datos sobre el tamaño de la población colombiana desde 1778 hasta 2016. La tasa de crecimiento de la población (r) se estimó a través de la ecuación:

$$T1 = T0 \cdot e^{(gr)}$$

Donde $T1$ es el tamaño estimado de la población hoy, $T0$ es el tamaño estimado de la población ancestral, y g es el número de generaciones entre estos dos puntos de tiempo (25 años/generación) (103).

Posteriormente, en la estimación final de la edad de la mutación, fue utilizado el enfoque presentado por Winbo et al., 2011, en el cual se estima la edad de la mutación como la corresponde a la gama de superposición de los intervalos de confianza entre las estimaciones obtenidas utilizando los software ESTIAGE y DMLE (45, 104).

En el desarrollo del trabajo hemos decidido realizar los cálculos generacionales, basados en el promedio actualmente aceptado y utilizado por otros investigadores en la determinación de la edad de la mutación. Podemos ver que en estudios donde han encontrado mutaciones tan antiguas como de más de 10.000 años de edad para la *VWF* c.2561G>A (105), 134 generaciones para la mutación *BRCA1* c.190T> C (106) o 110 generaciones para la mutación *GCK* p.Gly318Arg (107) son utilizados 25 años por generación. Además, es importante recordar que partimos de una mutación de la cual no conocemos su procedencia y fue encontrada en una población mestiza.

2.10 Consideraciones éticas

El presente estudio cuenta con comité de ética de la Universidad Nacional de Colombia, según acta de evaluación No 019-203-15 del 12 de noviembre de 2015 y del hospital San Rafael de Tunja. Se clasifica como “Investigación con riesgo mínimo”, por cuanto es un estudio descriptivo, que emplea el registro de datos por medio de una entrevista, un examen físico diagnóstico y la extracción de sangre por punción venosa con un volumen no mayor a 12 ml (Artículo 11 de la Resolución 008430 de 1993).

Dado que en las instalaciones del Instituto de Genética de la Universidad Nacional (IGUN), ya se cuenta con algunas de las muestras de DNA de las personas de la vereda, recolectados bajo el proyecto: “**ANALISIS GENETICO POBLACIONAL DEL CLUSTER DE MPS III EN EL ALTIPLANO CONDUBOYACENCE COLOMBIANO.**”, ejecutado por Velasco H. et al., 2017 y que tuvo aprobación del comité de ética en el año 2013, sólo se tomaron algunas muestras faltantes.

Por corresponder a un estudio que involucra la extracción de DNA, todo Comité de Ética en Investigaciones considera necesario un consentimiento informado por escrito y asentamiento del menor, con la respectiva autorización para la disposición futura de la muestra (Ver anexo A).

3. Capítulo 3 – Resultados

3.1 Sometimiento de la mutación c.1360C>T al ClinVar

Una vez realizada la búsqueda de la mutación c.1360C>T a través de bases de datos como el ClinVar, 1000 genomas, HGMD y revisando bibliografía de la enfermedad, logramos determinar que hasta el momento la mutación no había sido reportada, por lo cual, procedimos a someterla al ClinVar. El sometimiento fue aprobado el 10 de enero 2017 bajo el ID 374408 figura 3-1.

Figura 3-1 Mutación c.1360C>T en ClinVar

The screenshot displays the ClinVar interface for the variation NM_152419.2(HGSNAT):c.1360C>T (p.Gln454Ter). The variation ID is 374408, and its review status is (0/4) no assertion criteria provided. The clinical significance is listed as Pathogenic, last evaluated on Mar 1, 2016, with one submission. The condition is Mucopolysaccharidosis, MPS-III-C. The affected gene is heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (HGSNAT). The variant frequency in dbGaP is noted as 'No dbGaP data has been submitted for this variant.' Browser views include RefSeqGene, Variation Viewer [GRCh38 - GRCh37], and UCSC [GRCh38/hg38 - GRCh37/hg19]. Related information includes dbSNP, Gene, and MedGen. The allele details show an Allele ID of 361294, a single nucleotide variant type, and a cytotenetic location of 8p11.21.

NM_152419.2(HGSNAT):c.1360C>T (p.Gln454Ter)	
Variation ID:	374408
Review status:	★ ★ ★ ★ (0/4) no assertion criteria provided
Interpretation	
Clinical significance:	Pathogenic
Last evaluated:	Mar 1, 2016
Number of submission(s):	1
Condition(s):	Mucopolysaccharidosis, MPS-III-C [MedGen - Orphanet - OMIM]
Allele(s)	
NM_152419.2(HGSNAT):c.1360C>T (p.Gln454Ter)	
Allele ID:	361294
Variante type:	single nucleotide variant
Cytogenetic location:	8p11.21

3.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg

Los seis loci estudiados para la población de Tunja se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y 4 de la población de Runta no lo están. De forma general (Método de Fisher) la población de Runta no se encuentra en equilibrio ($p < 0.01$), mientras que la población de Tunja sí lo está ($p = 0.1339$) (Tabla 3-1).

Tabla 3-1 Equilibrio de Hardy-Weinberg por locus de la población de Runta y Tunja.

Población de Runta					Población de Tunja				
Locus	P-val	S.E.	W&C	R&H	Locus	P-val	S.E.	W&C	R&H
STR1	0.0004	0.0000	-0.3342	-0.1509	STR1	0.5423	0.0051	0.0056	0.0063
STR2	0.0003	0.0000	-0.3669	-0.1266	STR2	0.7764	0.0041	0.0065	0.0043
STR3	0.0003	0.0000	-0.2047	0.0487	STR3	0.2592	0.0058	0.0929	0.0255
STR4	0.9975	0.0005	-0.2823	-0.0380	STR4	0.0893	0.0096	0.0344	0.0205
STR5	0.0000	0.0000	-0.4625	-0.1706	STR5	0.0580	0.0027	0.0662	0.0907
STR6	0.7266	0.0023	-0.1481	-0.0516	STR6	0.2390	0.0070	0.1361	0.0761

P-val: Valor de significancia p. S.E: Error Estándar. W&C: Fis de Weir & Cockerham.
R&H: Fis de Robertson & Hill.

3.3 Estadísticos F

Los estadísticos F fueron calculados utilizando los 6 STRs, obteniendo los siguientes resultados: $F_{is} = -0.0936$ ($p = 1$), $F_{it} = 0.0791$ ($p = 0.52$) y $F_{st} = 0.1579$ ($p < 0.001$), lo que indica alta diferenciación entre las poblaciones de Runta y Tunja.

Teniendo en cuenta que solo dos STRs (STR4 y STR6) se encuentran en equilibrio, decidimos recalculer los estadísticos F con éstos dos marcadores, obteniendo $F_{is} = -0.0356$ ($p = 0.93$), $F_{it} = 0.1383$ ($p = 0.01$) y $F_{st} = 0.1680$ ($p < 0.001$); los resultados nuevamente indicaron alta diferenciación entre las poblaciones.

El estadístico F_{is} para la población de Runta presentó un resultado cercano a cero y no significativo, por lo cual, con esta prueba no se logró establecer endogamia. Sin embargo, sabemos por la historia de la vereda que la población es endogámica, como se puede ver en el árbol genealógico figura 3-2.

3.4 Frecuencias alélicas y haplotípicas

A continuación se presentan las frecuencias alélicas y haplotípicas obtenidas de la tipificación de la población de la vereda (Tabla 3-2 y Tabla 3-3) y las frecuencias alélicas de la población control (Tabla 3-4).

Tabla 3-2: Frecuencias alélicas de la población de Runta

Item	Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4		Locus 5		Locus 6	
	Alelos	Frecuencia										
1	143	0.607	212	0.0200	280	0.0067	198	0.0133	221	0.0067	162	0.0133
2	146	0.007	215	0.5667	288	0.1467	206	0.0067	224	0.2867	164	0.0133
3	149	0.127	218	0.2400	292	0.1667	216	0.0067	227	0.1000	166	0.0200
4	152	0.180	221	0.1333	296	0.6400	218	0.0200	230	0.5867	170	0.0800
5	155	0.080	224	0.0133	300	0.0400	220	0.0267	233	0.0200	172	0.1267
6			227	0.0267			224	0.0733			174	0.6733
7							226	0.0333			178	0.0600
8							228	0.6000			180	0.0133
9							230	0.0067				
10							232	0.0133				
11							234	0.0667				
12							236	0.0067				
13							238	0.0200				
14							248	0.0667				
15							252	0.0333				
16							256	0.0067				

Figura 3-2 Árbol genealógico familias de Runta

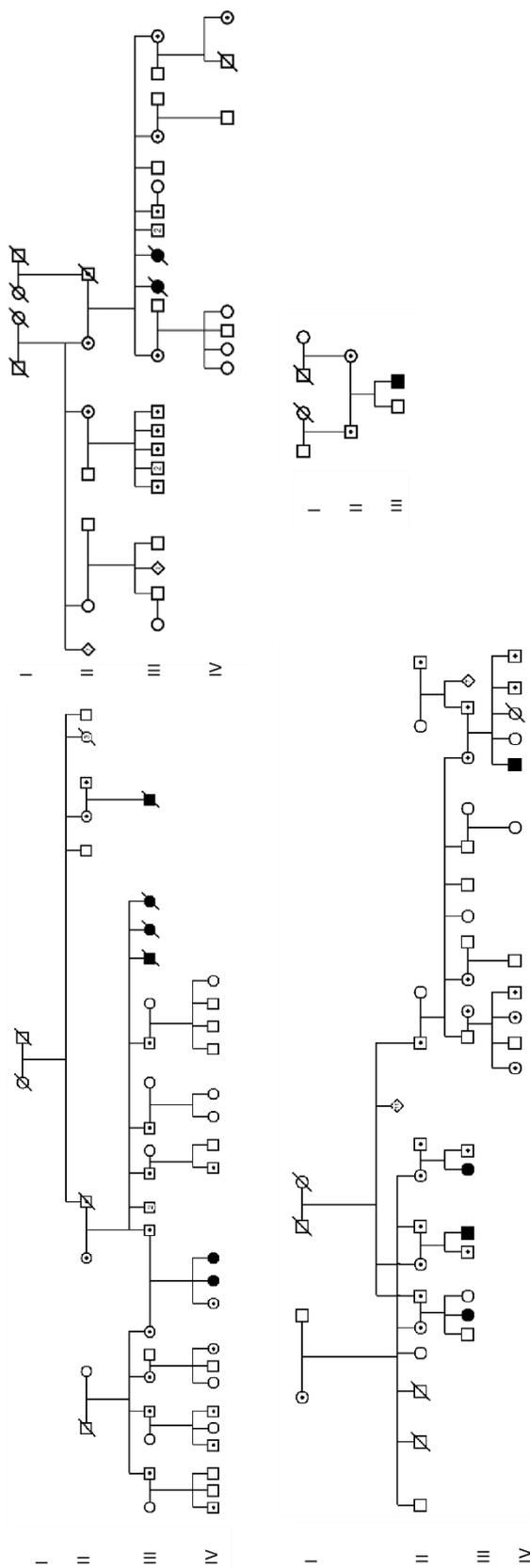


Tabla 3-3: Frecuencias haplotípicas de la población de Runta

Item	Haplotipo						Frecuencia
1	143	215	296	228	230	178	0.0333
2	149	218	292	234	227	172	0.0400
3	143	215	296	228	230	174	0.4800
4	149	218	292	248	224	174	0.0400
5	152	221	288	224	224	174	0.0533
6	152	221	288	228	224	174	0.0267
7	152	221	288	220	224	174	0.0200
8	152	221	292	216	230	166	0.0067
9	143	218	288	232	227	174	0.0067
10	143	215	292	228	230	166	0.0067
11	152	221	288	224	224	162	0.0067
12	152	218	296	226	230	170	0.0267
13	149	218	280	230	227	170	0.0067
14	143	218	292	228	230	174	0.0067
15	152	221	288	226	224	170	0.0067
16	152	227	296	234	230	170	0.0067
17	152	221	296	218	233	170	0.0228
18	149	215	292	232	233	180	0.0067
19	155	227	292	238	227	166	0.0067
20	155	218	296	234	224	172	0.0067
21	143	218	296	248	224	172	0.0200
22	149	218	300	234	227	172	0.0228
23	143	218	288	228	224	178	0.0267
24	155	224	296	252	224	172	0.0067
25	155	212	292	252	224	172	0.0228
26	155	224	296	206	221	180	0.0067
27	155	227	296	198	224	174	0.0228
28	155	215	292	224	227	164	0.0228
29	143	218	296	252	224	174	0.0067
30	143	215	300	228	230	174	0.0228
31	149	215	300	238	224	170	0.0067
32	152	218	296	228	230	174	0.0067
33	155	218	292	218	227	172	0.0067
34	146	215	292	252	224	170	0.0067
35	149	218	292	248	224	172	0.0067
36	155	212	296	256	224	172	0.0067
37	143	218	296	220	224	162	0.0067
38	149	218	300	238	224	172	0.0067
39	152	218	292	236	227	170	0.0067

Tabla 3-4: Frecuencias alélicas de la población control

Item	Locus 1		Locus 2		Locus 3		Locus 4		Locus 5		Locus 6	
	Alelos	Frecuencia										
1	143	0.2692	212	0.0449	276	0.0256	190	0.0064	215	0.0256	162	0.0128
2	146	0.0705	215	0.0641	280	0.0385	194	0.0897	218	0.0128	164	0.0064
3	149	0.1090	218	0.5897	284	0.0962	198	0.0192	221	0.0385	166	0.0128
4	152	0.2564	221	0.0705	288	0.0962	202	0.0897	224	0.4872	168	0.1987
5	155	0.2756	224	0.0962	292	0.3654	206	0.0513	227	0.1859	170	0.0064
6	158	0.0192	227	0.1282	296	0.2885	208	0.0513	230	0.1795	172	0.2692
7			230	0.0064	300	0.0641	214	0.1090	233	0.0641	174	0.1859
8					304	0.0256	216	0.0769	236	0.0064	176	0.2308
9							28	0.0897			178	0.0128
10							220	0.0577			180	0.0641
11							224	0.0256				
12							226	0.0385				
13							228	0.0064				
14							230	0.0577				
15							232	0.0256				
16							234	0.0256				
17							236	0.0128				
18							238	0.0385				
19							240	0.0064				
20							242	0.0385				
21							248	0.0192				
22							252	0.0064				
23							256	0.0449				
24							260	0.0128				

3.5 Haplotipo alrededor de la mutación c.1360C>T

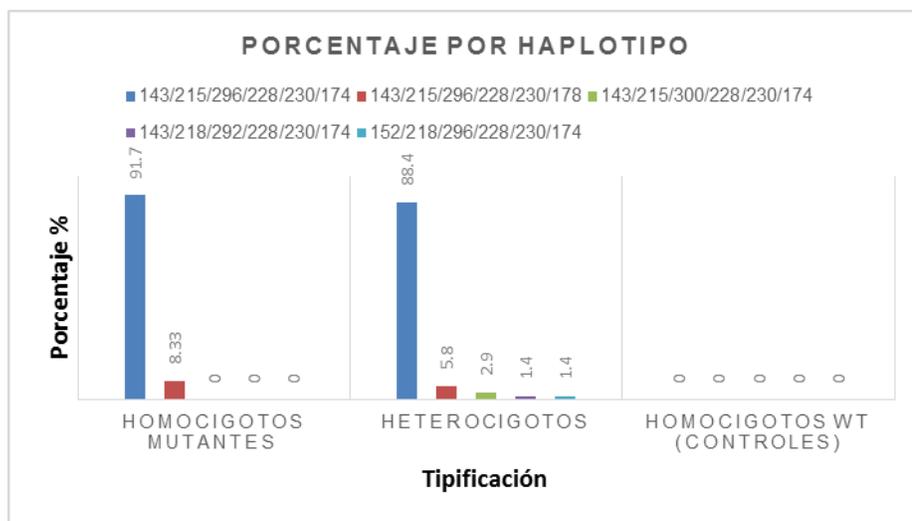
En total se encontraron 5 haplotipos diferentes alrededor de la mutación, uno de los cuales consideramos el **Haplotipo Ancestral** encontrado en 72 (88.9%) del total de haplotipos analizados entre pacientes y portadores (Tabla 3-5) (Ver anexo B).

En la gráfica 3-1 se representa el porcentaje de haplotipos encontrados en los homocigotos mutantes (pacientes), heterocigotos (portadores) y homocigotos wt (controles). Se puede observar que ninguno de los haplotipos alrededor de la mutación fue encontrado en los individuos de la población control genotipados (individuos de Tunja).

Tabla 3-5: Haplotipos alrededor de la mutación c.1360C>T en pacientes y portadores.

Haplotipo	STR1	STR2	STR3	STR4	c.1360C>T	STR5	STR6	n
1	143	215	296	228	T	230	174	72
2	143	215	296	228	T	230	178	5
3	143	215	300	228	T	230	174	2
4	143	218	292	228	T	230	174	1
5	152	218	296	228	T	230	174	1

n= Cantidad de haplotipos encontrados entre pacientes y portadores. Sombreado rosa=Cambios en relación al haplotipo ancestral.

Gráfica 3-1: Porcentaje de haplotipos encontrados en homocigotos mutantes, heterocigotos y homocigotos WT (controles).

3.6 Efecto fundador

Los resultados obtenidos en relación a los haplotipos nos permite corroborar que la presencia de la mutación c.1360C>T en el gen *HGSNAT*, obedece a un efecto fundador por los siguientes elementos:

- La gran mayoría de los pacientes o portadores de la mutación tienen un haplotipo común alrededor de la mutación (91,7% y 88.9% respectivamente) de los haplotipos tipificados.
- El haplotipo ancestral común alrededor de la mutación no fue encontrado en los controles sanos.
- La variante patogénica hasta la fecha no había sido encontrada en otra parte del mundo. Fue reportada al ClinVar por el grupo de Genética Clínica de la Universidad Nacional de Colombia con el ID de variación: 374408.
- Al comparar la cantidad de alelos de las dos poblaciones, podemos ver que se ha presentado disminución en el número de alelos en la población de Runta en relación con la de Tunja (Tabla 3-6).
- La frecuencia de la mutación en la población, que para tratarse de una enfermedad de herencia autosómica recesiva es alta, lo que puede indicar un posible proceso de fijación.
- El desequilibrio de ligamiento es significativo en todos los loci analizados en la población de Runta, mientras que para la población de Tunja la mayoría de los loci no se encuentran ligados (como se puede ver en la parte de abajo) (Tabla 3-7) (Anexo C).

Tabla 3-6 Numero de alelos por población y locus analizado.

Población	Cantidad de alelos					
	STR1	STR2	STR3	STR4	STR5	STR6
Tunja	6	7	8	24	8	9
Runta	5	6	5	16	5	7

Tabla 3-7 Tabla de significancia - Desequilibrio de ligamiento población de Tunja y Runta

Población de Tunja						Población de Runta							
Locus #	0	1	2	3	4	5	Locus #	0	1	2	3	4	5
0	*	-	-	+	-	-	0	*	+	+	+	+	+
1	-	*	+	+	-	-	1	+	*	+	+	+	+
2	-	+	*	+	-	-	2	+	+	*	+	+	+
3	+	+	+	*	+	+	3	+	+	+	*	+	+
4	-	-	-	+	*	-	4	+	+	+	+	*	+
5	-	-	-	+	-	*	5	+	+	+	+	+	*

- No significativo + Significativo

3.7 Calculo edad de la mutación – ESTIAGE

A continuación se muestra el resultado del cálculo de frecuencia de recombinación utilizando RUTGERS mapa v.2 (Tabla 3-8).

Tabla 3-8: Frecuencia de recombinación RUTGERS mapa v.2

Locus	Chr	Ubicación (bp)	Promedio sexos (cM)	Mujer (cM)	Hombre (cM)	Total cM	cM a la mutación	θ
STR1	8	40992202	62.0736	71.67355223	53.40896749	-	1.3613	0.013613
STR2	8	41044794	62.1233	71.76817791	53.41027175	0.0497	1.3116	0.013116
STR3	8	41290828	62.3522	72.2198547	53.4155899	0.2289	1.0827	0.010827
STR4	8	42440901	63.3263	74.1348464	53.43252064	0.9741	0.1086	0.001086
MUTACIÓN	8	43047556	63.4349	74.3408685	53.43947067	0.1086	-	-
STR5	8	46945700	63.7427	74.93768812	53.47971734	0.3078	0.3078	0.003078
STR6	8	47506176	63.8404	75.13372288	53.48639013	0.0977	0.4055	0.004055
						1.7668		

Chr= Cromosoma, cM= centimorgan - unidad de los mapas genéticos, θ = Tasa de recombinación.

La edad de la mutación estimada por ESTIAGE fue de 41 (CI 95% 35-48) y 48 (CI 95% 40-57) generaciones antes del presente (dependiendo de la tasa de mutación utilizada, 0.001 o 0.0001, respectivamente).

3.8 Calculo edad de la mutación – DMLE v3.1

El cálculo de la tasa de crecimiento de la población fue realizado teniendo en cuenta los censos y cálculos de la población colombiana en el intervalo de 1778 a 2016 (108) (<http://www.dane.gov.co/reloj/>) (Tabla 3-9).

Tabla 3-9: Calculo de tasa de crecimiento de la población

Periodo	T1	T0	(T1/T0)	Log10 (T1/T0)	g	g*Log10 e	r (Log10 (T1/T0)/g*Log10 e)
1778 2016	~48500000	891077	54.4285174	1.735826505	9.52	4.134483468	0.419841201

T1=Tamaño estimado de la población hoy, T0= Tamaño estimado de población ancestral, g=Número de generaciones entre puntos de tiempo T1 y T0 (25 años/generación), r= Tasa de crecimiento de la población.

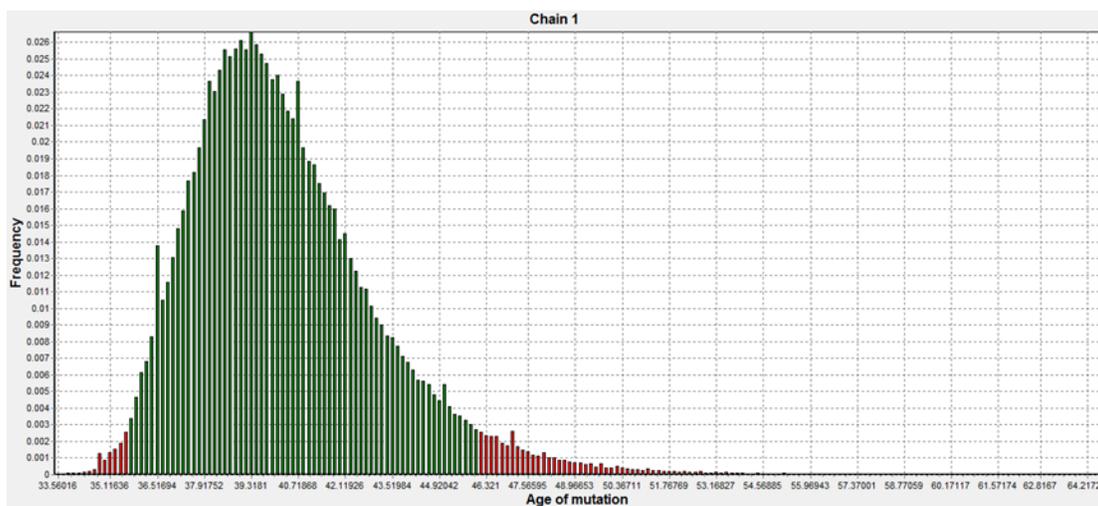
La proporción esperada de cromosomas que llevan la mutación, fue calculado a partir de la tipificación de las muestra de 198 individuos de la vereda obtenidas del desarrollo del proyecto “**ANALISIS GENETICO POBLACIONAL DEL CLUSTER DE MPS III EN EL ALTIPLANOCONDUBOYACENCE COLOMBIANO.**” (Tabla 3-10).

Tabla 3-10: Proporción esperada de cromosomas con la mutación

	Cantidad Individuos	q2	q	p	2pq	q colombia	2pq colombia	q esperado muestra	2pq esperado muestra	Total Crom. Esperado
Positivos	6	0.030303	0.17	0.83	0.29	8442766.31	13946138.69	0.0000014	0.0000049	0.0000063
Heterocigotos	69									
Negativos	123									
Total	198									

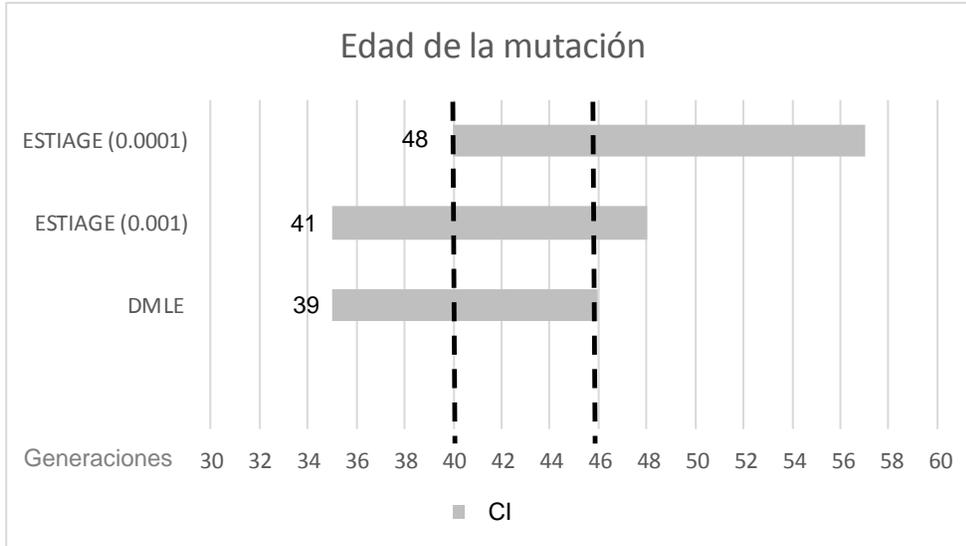
La edad de la mutación estimada por DMLE v3.1 (25 años por generación), fue de 39 generaciones (CI 95% 35-46) generaciones antes del presente (mayor frecuencia) como se puede ver en la figura 3-3.

Figura 3-3: Estimación edad de la mutación c.1360C>T, software DMLE v3.1.



A continuación se presentan los resultados de edad de la mutación estimada por el software DMLE y ESTIAGE, donde se puede observar el solapamiento de los diferentes intervalos de confianza entre 40 y 46 generaciones, gráfica 3-2.

Gráfica 3-2 Solapamiento de CI, software DMLE y ESTIAGE



Teniendo en cuenta que la población Colombiana es producto de mezcla y que la población amerindia ubicada en Boyacá antes de la llegada de los españoles presentaba una esperanza de vida de 25 a 30 años, hemos calculado la posible edad de la mutación a partir de la población de Colombia y la Boyacense con diferentes años por generación (15, 20 y 25 años) usando DMLE v3.1. (Tabla 3-11) (Ver anexo C).

Tabla 3-11 Resultados DMLE v3.1. Población Colombiana y Boyacense, 15, 20 y 25 años por generación.

Años / Generación	Población Colombia			Población Boyacá		
	15	20	25	15	20	25
DMLE	62 (CI 56-70)	47.4 (CI 44-55)	39.3 (CI 35-46)	59.1 (CI 53-72)	48.7 (CI 42-58)	39.4 (CI 35-46)
Tiempo	930	948	982.5	886.5	974	985
Año	1086	1068	1033.5	1129.5	1042	1031

Se puede apreciar en cada una de las opciones que la posible edad de la mutación es en una época anterior a la conquista.

4. Capítulo – Discusión

En este estudio se analizaron seis pacientes con MPS IIIC, 69 portadores de la mutación nonsense c.1360C>T del gen *HGSNAT*, que hasta la fecha no había sido reportada por ningún grupo de investigación y 78 controles sanos de Tunja. Nuestro objetivo fue verificar si la mutación deriva de un evento fundador o de repetidos eventos mutacionales independientes, así como estimar la posible edad de la mutación.

Fueron analizados 6 STRs en el brazo corto del cromosoma 8p alrededor del gen *HGSNAT* en una distancia de 6.5 Mb. Fue elegido este enfoque, porque los STR utilizados se ubican en regiones no codificantes del genoma que son biológicamente silenciosas, lo que permite la acumulación de mutaciones sin impedimentos durante la generación y facilita la identificación de la variabilidad molecular.

Los resultados de este análisis indicaron que los portadores de la mutación c.1360C>T comparten el mismo haplotipo de seis STRs localizadas dentro de una región de 6.5 Mb alrededor del gen *HGSNAT*, además, la determinación del genotipo en 78 controles no identificó ningún haplotipo similar al compartido por los pacientes. Por lo tanto, todos los resultados apuntan a que la mutación c.1360C>T ocurrió como un evento único en el pasado.

Diferentes estudios que han trabajado la misma metodología desarrollada aquí, han logrado determinar un haplotipo ancestral que no es compartido con la población control: el estudio de Oliveira de Alencar et al., 2014 donde fue encontrado un haplotipo ancestral de 4 STR en población brasilera alrededor de la mutación 30delG del gen *GAL* causante de la enfermedad de Fabry; el De Davila Paskulin et al., 2015 con 8 STR alrededor de la

mutación c.1010C>A en el gen *TP53* que conlleva a síndrome de Li-Fraumeni o Casonato et al., 2013 con 5 STR alrededor de la mutación c.2561G>A del gen *VWF* causante de la enfermedad de Von Willebrand tipo 2N, en los cuales se estimó la mutación como derivada de un efecto fundador.

Se estimó la fecha más probable de aparición de la mutación a través del empleo de dos estrategias diferentes para evitar posibles distorsiones, encontrando estimaciones que no eran particularmente distantes. Con el uso de software ESTIAGE, la aparición de la mutación se estimó en 41 (CI 95% 35-48) y 48 (CI 95% 40-57) generaciones antes del presente (dependiendo de la tasa de mutación utilizada, 0.001 o 0.0001, respectivamente).

El análisis del desequilibrio de ligamiento en portadores y no portadores a través del software DMLE v.2.3, estimó que la mutación estaba presente en un haplotipo que podría haber sido introducido hace 39 (CI 95% 35-46) generaciones antes del presente. Las pequeñas variaciones entre las dos estimaciones se deben a factores que no se pueden medir con precisión, como la identificación de la verdadera tasa de mutación de cada marcador STR del cromosoma 8. Es importante tener en cuenta que los software permiten hacer estimaciones de un periodo de tiempo en el cual pudo haber ocurrido el evento mutacional, sin embargo los acontecimientos reales, específicos de lo que pudo haber sucedido serán imposibles de recrear con toda certeza.

Siguiendo el enfoque presentado por Winbo et al., 2011, se ha estimado la edad de la mutación como la que corresponde a la gama de superposición de los intervalos de confianza entre las estimaciones obtenidas utilizando los software ESTIAGE y DMLE. Se estimó que la mutación c.1360C>T ocurrió hace aproximadamente 41 generaciones antes del presente, con un intervalo de confianza entre 40 y 46 generaciones. Considerando un promedio de 25 años por generación, es probable que la mutación se produjo alrededor del año 991 (entre 866 y 1016, con un CI de 95%), si tenemos en cuenta un promedio de 20 años por generación, es probable que la mutación haya producido alrededor del año 1196 (entre 1096 y 1216, considerando un IC del 95%), dataciones que corresponden al periodo prehispánico de chibcha temprano (siglo IX-XVI d.C) (87).

Nuestra estimación de la edad de la mutación debe considerarse con precaución debido a que no se pueden establecer tasas de crecimiento de población absolutamente precisas, por lo cual se ha utilizado una estimación de este crecimiento. Una distancia de generación de 40-46 generaciones, que asciende a unos 1000 años aproximadamente, implica que la mutación ha surgido en un antepasado que vivió unos 500 años antes de la llegada de los conquistadores, que en el caso particular de Tunja, se dio en el año 1539.

Surge la duda para estudios de este tipo, si se debe manejar 25 años por generación tratándose de poblaciones prehispánicas. Hemos analizado diferentes estudios en este sentido, como el de Jack Fenner, quien realizó un análisis detallado de muchos estudios genéticos y genealógicos anteriores a 2005 en 157 sociedades cazadoras – recolectoras, y en 40 países alrededor del mundo (a través de encuestas) utilizando la edad de matrimonio de los hombres y de las mujeres y la edad media de la madre al primer y último parto. Encontró intervalos medios de generación entre las sociedades cazadoras-recolectoras de 31,5 años para los hombres y 25,6 años para las mujeres (aunque con una gran varianza), para los países menos desarrollados de 31,8 y 28,3 años y entre los países desarrollados de 30,8 y 27,3 años, respectivamente, recomendando el uso de 31 años para varones y 25 años para hembras (109).

Un estudio conducido por los genetistas de poblaciones Marc Tremblay y Helene Vezina, se basó en 100 genealogías ascendentes de Quebec, usando la base de datos genealógica BALSAC-RETRO, desarrollada a través de varios proyectos de investigación que involucran análisis genealógicos, la cual contiene información vinculada sobre más de 120.000 matrimonios que se remontan hasta finales del siglo XVI, permitiendo la realización de estudios longitudinales que abarcan varias generaciones. Se investigaron los intervalos intergeneracionales entre padres e hijos considerando varios eventos del ciclo de vida de la familia, se midieron las edades en el matrimonio, las edades de los nacimientos de los primeros y últimos hijos y las edades medias en los nacimientos de todos los niños y se analizó la relación entre algunos parámetros de reproducción y la edad media en la edad fértil. Los investigadores encontraron un intervalo generacional basado en los años entre los padres y los matrimonios de los niños de 31,7 años y determinaron que las generaciones masculinas promediaron 35 años, mientras que las generaciones femeninas promediaron 28,7 años (110).

El antropólogo biológico Agnar Helgason y sus colegas utilizando la base de datos genética DeCODE de Islandia, que contiene linajes de la mayoría de los islandeses de dos siglos atrás y mucho más para muchas familias, calcularon por separado intervalos de generación patrilineal y matrilineal en diferentes longitudes de tiempo. Los primeros valores incluyeron solamente las líneas a los antepasados que vivieron en el marco de tiempo 1848-1892, incluyendo tres a cinco generaciones. Luego calcularon intervalos de longitud a los antepasados nacidos entre 1692 y 1742, extendiéndolos a una longitud de siete a nueve generaciones. Los resultados mostraron que las generaciones más recientes eran un poco más cortas (3.8 y 4.3 patrilineal y matrilineal respectivamente) de longitud que las más distantes (7.9 y 8.8 patrilineal y matrilineal respectivamente), lo opuesto a lo que la visión convencional sostiene, además, contrariamente a algunas implicaciones, las expectativas de vida, por sí mismas, eran esencialmente irrelevantes para la duración de la generación (111), hasta la muerte se encontraban en edad de fecundidad con posibilidad de tener descendencia, que se tendrían en cuenta para establecer la edad generacional.

Como podemos ver, son diferentes las conclusiones al respecto, incluso llegando a recomendarse un uso de edad generacional más alto que 25 años. Con el fin de abordar esta situación, hemos mostrado cálculos de edad de la mutación, utilizando diferentes años por generación y tasa de crecimiento de la población teniendo en cuenta la población de Colombia y Boyacá, todos los resultados ubican la posible edad de la mutación en época prehispánica.

Aunque el cálculo de la edad de la mutación indica un origen casi milenario, sería coherente pensar que la variante podría haber salido de Europa (teniendo en cuenta que la población de Boyacá fue constituida por amerindios mermados en número y españoles (112, 113)), sin embargo, hasta la fecha la mutación solo ha sido reportada en Colombia, en la vereda objeto de este estudio, de modo que este origen pasa a ser más pausiblemente amerindio.

Teniendo en cuenta la historia del territorio, nos centramos en conocer las costumbres y cultura de la población indígena Muisca que se encontraba asentada en la región objeto de estudio. La población de Tunja en los años que se calcula como posible origen de la mutación, obedece a un pueblo indígena muisca catalogado como muisca temprano (siglos IX-XVI d.C.) (87), en el que las condiciones de vida que se han logrado recrear

muestran que se trató de indígenas más comerciantes que guerreros, con una alimentación abundante, variada y equilibrada gracias al aprovechamiento de diferentes pisos térmicos, la habilidad de intercambio de productos con otros pueblos de tierras bajas y el papel del cacique en la distribución de alimentos en épocas de escases, además, tenían una distribución de asentamientos dispersos y de baja densidad demográfica (88).

Historiadores como el profesor José Vicente Rodríguez Cuenca, concluye que las condiciones de vida prehispánicas en Colombia, teniendo en cuenta la buena alimentación, la baja densidad demográfica y los asentamientos dispersos, equilibraban su relación con el medio ambiente e impedían que se desataran agudas epidemias, constituyendo la base del bienestar de la mayoría de las sociedades precolombinas que se vio afectada seriamente con la llegada de los europeos (85).

Con la llegada de los conquistadores se inició el ciclo de “extinción” de comunidades indígenas por parte de españoles equipados con espadas metálicas, ballestas, mosquetones y caballos ante indígenas armados con flechas, macanas y hondas (85). Además de los enfrentamientos, se presentó otro tipo de catástrofes demográficas como la ocurrida en el altiplano Cundiboyacense a finales del año 1558 causada por la enfermedad de la viruela que llevó a la muerte de más de 15.000 personas naturales (93). En Tunja la población descendió de 53.465 a 8.610 durante la catástrofe demográfica que caracterizó los siglos XVI y XVII por el desarraigo, las epidemias, los trabajos excesivos y la desarticulación de las sociedades indígenas (95).

Todos estos acontecimientos que disminuyeron en gran cantidad la población, pudieron ser eventos propicios que llevaran a que las comunidades se alejaran escapando de las epidemias y permitiendo la fundación de poblaciones a partir de un reducido número de individuos sobrevivientes, dentro de los cuales pudieron participar portadores del alelo mutado. Además, como sabemos la cultura muisca practicaba la poligamia y cada hombre podía tener tantas mujeres como pudiera mantener, un cacique en el que podría presentarse el evento mutacional podía llegar a tener hasta 20, 30 o 50 mujeres (88) con posibilidades de pasar el alelo mutado que se ha mantenido hasta el presente.

Aunque hay escasas evidencias de la ocurrencia de enfermedades genéticas y malformaciones congénitas en América, existe evidencia arqueológica de la presencia de

las mismas, como algunas mucopolisacaridosis mediante piezas de arte cerámico de la cultura Tumaco-La Tolita, que habitaron las fronteras de la actual Colombia y Ecuador (114, 115), abriendo la posibilidad a que enfermedades como la estudiada en la población de Runta pudiera estar presente antes de la llegada de los españoles.

Al tratarse de una mutación que ha estado en la población de Boyacá desde hace tanto tiempo, la muerte de niños que padecían la enfermedad era frecuente y lo hemos constatado analizando el entorno cultura de la vereda de Runta. Se observó a través de las entrevistas y narración de las experiencias frente a la MPSIIIC en el territorio, que la enfermedad para ellos es un acontecimiento normal, que se ha presentado en la vereda desde hace mucho tiempo como un designio de Dios, obedeciendo a algo más espiritual que genético. Ésta familiaridad con la enfermedad y la muerte temprana de sus habitantes en edad pediátrica es coherente con las tasas de mortalidad infantil en Boyacá, un ejemplo de ello es el estudio realizado por Manrique et al., 2011 que muestra para el siglo XX tasas de mortalidad infantil considerablemente más altas (231/1.000NV) en relación al siglo XXI (17/1.000NV) (116).

Dado que los efectos fundadores presentan características genéticas particulares, se intentó determinar la endogamia de la población (F) y describir cuantitativamente el efecto fundador por cuello de botella, utilizando el software Bottleneck y M-Ratio. "Bottleneck", asumen que las poblaciones que han experimentado una reducción reciente de su tamaño efectivo de la población, exhiben una reducción correlativa del número de alelos y de las heterocigosidades en loci polimórficos. Como la diversidad alélica se reduce más rápidamente que la heterocigosidad, se espera encontrar que la heterocigosidad observada sea mayor que la heterocigosidad esperada (117). "M-Ratio", demuestra como la proporción del número de alelos, teniendo en cuenta el rango en el tamaño del alelo para muestra de loci microsatélites, se puede utilizar para detectar reducciones en el tamaño efectivo de la población (118).

A través de los estadísticos F no logramos determinar la existencia de endogamia en la población de Runta, sin embargo, esta característica es un hecho que pudimos comprobar indirectamente a través de: a) resultados previos publicados por nuestro grupo donde la región presenta altos índices de consanguinidad del 15% (119); b) elementos culturales de la región que a través de las entrevista nos señalaron los habitantes de la vereda,

relacionadas con la herencia de tierras de padres a hijos y el apego de los hijos en especial de los hombres a su mamá, que los lleva a buscar mantenerse en las tierras y conformar allí su familia, muchas veces sin limitaciones de parentesco; c) análisis de isonimias de 35 matrimonios que muestra una isonimia observada (OI) de 0.7142 y esperada (EI) de 0.5265, así como los coeficientes de endogamia $F_n=0.0247$, $F_r=0.0329$ y $F_t=-0.0568$ con valores positivos que indican uniones consanguíneas al azar y endogamia por uniones entre parientes en la población de Runta (120).

A través de la metodología de Crow y Mange 1965, modificada por Rodríguez-Larralde y Casique 1993 calculamos el coeficiente de endogamia por apareamientos al azar (ϕ_{ii}) en 0.0557 (121, 122), resultado que sugiere alto grado de aislamiento poblacional comparado con poblaciones aisladas como las del oriente de Antioquia (entre 0.002 y 0.01) (123, 124). Además, el estimador B (siete apellidos más frecuentes) fue de 75.71% y estimador C (15 apellidos más frecuentes) de 89.28% que representa un porcentaje alto de la población incluida en los apellidos más frecuentes, indicativo de aislamiento relativo. El índice de diversidad de apellidos (α) fue de 4.17 y el estimador A (apellidos únicos) de 11.42% que indica homogeneidad y bajo flujo génico (120, 122, 125).

Para el software Bottleneck v1.2.02, se obtuvo la relación de la heterocigosidad esperada y observada por locus (Tabla 4-1), la prueba de signo, prueba de diferencias normalizadas, prueba de Wilcoxon, y el resultado de la distribución, mostrada a continuación:

Tabla 4-1: Heterocigosidad observada y esperada por locus (software Bottleneck)

Locus	Observado			I.A.M.				S.M.M.			
	n	ko	He	Heq	S.D.	DH/sd	Prob	Heq	S.D.	DH/sd	Prob
Loc1	150	5	0.58	0.47	0.17	0.64	0.32	0.657	0.09	-0.876	0.18
Loc2	150	6	0.61	0.535	0.17	0.424	0.42	0.722	0.07	-1.702	0.07
Loc3	150	5	0.54	0.485	0.17	0.336	0.45	0.662	0.09	-1.353	0.1
Loc4	150	16	0.63	0.823	0.06	-3.364	0.01	0.904	0.02	-16.72	0
Loc5	150	5	0.57	0.476	0.17	0.531	0.35	0.657	0.09	-1.021	0.14
Loc6	150	8	0.52	0.634	0.13	-0.832	0.19	0.791	0.05	-5.542	0

Prueba de signo:

Suposiciones: todos los loci encajan I.A.M., equilibrio mutación-deriva.

Número esperado de loci con exceso de heterocigosidad: 3.48

2 loci con deficiencia de heterocigosidad y 4 loci con exceso de heterocigosidad.

Probabilidad: 0.50186

Suposiciones: todos los loci se ajustan a S.M.M., equilibrio mutación-deriva.

Número esperado de loci con exceso de heterocigosidad: 3,55

6 loci con deficiencia de heterocigosidad y 0 loci con exceso de heterocigosidad.

Probabilidad: 0.00467

Prueba de diferencias normalizadas: No fueron tenidas en cuenta en el análisis por corresponder a prueba paramétrica en la cual se deben manejar como mínimo 20 loci polimórficos.

Prueba de wilcoxon:

Suposiciones: todos los loci encajan I.A.M., equilibrio mutación-deriva.

Probabilidad (una cola para la deficiencia de H): 0.50000

Probabilidad (una cola para el exceso de H): 0.57813

Probabilidad (dos colas para el exceso y la deficiencia de H): 1.00000

Suposiciones: todos los loci se ajustan a S.M.M., equilibrio mutación-deriva.

Probabilidad (una cola para la deficiencia de H): 0.00781

Probabilidad (una cola para el exceso de H): 1.00000

Probabilidad (dos colas para el exceso o deficiencia de H): 0.01563

Modo de cambio – Distribución: Distribución normal en forma de L.

Para el software M-Ratio, se obtuvo un M superior a 0.68:

RUNTASRATIO.txt

$4*Ne*(\text{mutation rate})=3$ % larger mutations = 0 mean step size = 3

Locus 0: # alleles = 5 range = 5 ratio = 1 sample size = 150

0	1	2	3	4
91	1	19	27	12

Locus 1: # alleles = 6 range = 6 ratio = 1 sample size = 150

0	1	2	3	4	5
3	85	36	20	2	4

Locus 2: # alleles = 5 range = 6 ratio = 0.833333 sample size = 150

0	2	3	4	5
1	22	25	96	6

Locus 3: # alleles = 16 range = 30 ratio = 0.533333 sample size = 150

0	4	9	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20
	25	27	29									
2	1	1	3	4	11	5	90	1	2	10	1	3
	11	4	1									

Locus 4: # alleles = 5 range = 5 ratio = 1 sample size = 150

0	1	2	3	4
1	43	15	88	3

Locus 5: # alleles = 8 range = 10 ratio = 0.8 sample size = 150

0	1	2	4	5	6	8	9
2	2	3	12	19	101	9	2

M = 0.861111

Paradójicamente estos resultados muestran que no existe cuello de botella en la población de estudio. Inferimos que estos resultados, así como los de los estadísticos F, se deben a que la mayoría de los loci utilizados no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, presentan desequilibrio de ligamiento en su totalidad y la cantidad de marcadores es reducida. Lo anterior es de esperarse dado que los STRs seleccionados para el estudio eran específicos para la identificación del haplotipo común y datación de la mutación ya que nuestra metodología no pretendía ir más allá. Sin embargo, se continuará con otras fases del estudio que nos permitan complementar estos análisis, con el uso de SNPs o STRs (mínimo 20) que cumplan completamente con las características necesarias para F, Bottleneck y M-Ratio.

A partir de este estudio se demuestra la existencia de un efecto fundador en la población de Runta, basado en la determinación de un haplotipo alrededor de la mutación c.1360C>T en el gen *HGSNAT* común en pacientes y portadores y ausente en controles sanos,

además del cumplimiento de características de efecto fundador como la disminución en el número de alelos, la tendencia a fijación de alelos y el alto nivel de desequilibrio de ligamiento. Consideramos que el efecto fundador presentado en la vereda, es producto de un cuello de botella y no de un evento migratorio europeo, teniendo en cuenta que hasta la fecha se han descrito alrededor de 70 mutaciones en el gen *HGSNAT* en todo el mundo y la encontrada en la vereda de Runta no ha sido descrita en Europa, hasta ahora reportada sólo por nuestro grupo de investigación, además, la edad calculada teniendo en cuenta la historia de la población Colombiana no es coherente con un evento migracional de origen Europeo.

Además de las consideraciones anteriores, quisimos consultar los estudios de datación de enfermedades diferentes o relacionada con patologías de depósito lisosomal en Latinoamérica, que presentara una edad de mutación tan antigua como la determinada por nosotros en la vereda de Runta (y con similar metodología), con el fin de estimar que tan antigua es en relación a lo encontrado en la literatura hasta el momento, encontrando los siguiente estudios:

- El realizado al sur de Brasil, donde la mutación p.Arg337His, c1010G>A en el gen *TP53*, causante del Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), que obedece a un efecto fundador de aproximadamente 2.000 años, posiblemente procedente de Europa (96).
- El estudio realizado por Paradisi et al., 2015, en población venezolana con Ataxias espinocerebelosas, causadas por repeticiones del pentanucleótido (ATTCT) en el gen *ATXN10*, en el que encontraron un haplotipo común a la mutación, presente también en pacientes de México, Brasil y Sioux, que sugiere un origen amerindio, posiblemente en población norteamericana desde donde se extendió al centro y sur del continente, sin embargo no fue datado (126).
- El estudio realizado en una pequeña aldea mexicana, donde la enfermedad de un grupo de pacientes con esclerocornea, afaquia y microftalmia es debido a la mutación fundadora p.Y98H del gen *FOXE3*, que surgió hace poco más de un siglo (106-138 años) (127).
- El realizado en 133 pacientes en una población de Guatemala con una mutación común c.131G>A (p.Trp44*) en el gen *GJB2* que causa pérdida auditiva no sindrómica

(ARNHL) y cuyo análisis ADMIXTURE indica una ascendencia de las muestras Mexicana y Maya, aunque no fue realizada la datación (128).

A nivel de depósito lisosomal, son pocos los estudios encontrados en Latinoamérica con datación de la mutación, sólo el realizado por De Alencar et al., 2014, que reveló una edad mutacional de 11 a 12 generaciones para la mutación GLA30delG del gen GLA causante de la enfermedad de Fabry (45). Dado lo anterior, podemos ver que la mutación c.1360C>T del gen *HGSNAT*, encontrada en la población de Runta, podría ser una de las más antiguas y en relación a enfermedad de depósito lisosomal podría tratarse de la mutación prehispánica más antigua datada hasta la fecha en Latinoamérica.

Finalmente, retomando la definición de población aislada según la cual son poblaciones que pueden ser derivadas de pequeños grupos de fundadores, que presentan reducción de la diversidad genética y presencia de altos niveles de desequilibrio de ligamiento (129, 130), postulamos a los integrantes de esta vereda como un aislado genético, lo que representaría un escenario importante de investigación de gran alcance en la cartografía genética de trastornos hereditarios raros y multifactoriales (131, 132), por lo tanto esperamos en subsiguientes investigaciones lograr decantar esta hipótesis. Nuestra inferencia se basa además, en estudios como el realizado en la población polinesia de la isla de Niue y en áreas rurales de población estadounidense, donde a través de la determinación de baja diversidad genética, disminución de alelos, alto desequilibrio de ligamiento y alta frecuencia de enfermedades recesivas, se definen poblaciones que pueden ser resultado de efectos fundadores como poblaciones aisladas (133, 134).

Concluyendo podemos decir que a pesar de las condiciones de vida recreadas para la población muisca temprana, las condiciones de salud de la época o los acontecimientos relacionados con la conquista, lo que realmente ha sucedido en el pasado alrededor de la variante patogénica c.1360C>T no podrá ser determinado con certeza, sólo podemos realizar inferencias de lo sucedido basados en las herramientas que ofrece la historia y la ciencia en la actualidad. De esta forma, inferimos que la mutación tiene un origen amerindio que se ha mantenido en la población pese a la selección en contra de los homocigotos recesivos (letales), posiblemente por el genotipo heterocigoto que escapa a la selección (8), y que se ha logrado visualizar en la población gracias a un efecto fundador que dio origen a la población, acompañado del apareamiento no al azar que presentan.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Hemos determinado un haplotipo ancestral de 6 STRs alrededor de la mutación c.1360C>T, localizado dentro de una región de 6.5 Mb alrededor del gen *HGSNAT*, resultados coherentes con la conclusión de que la mutación ocurrió como un evento único en el pasado producto de un efecto fundador.

Se determinó una edad de la mutación de aproximadamente 1.000 años antes del presente, época en la que la población colombiana se encontraba constituida por amerindios, y en el caso de la región Cundiboyacense por indígenas muiscas en los que se pudo haber presentado el evento mutacional que por deriva y fenómenos de fundación se ha mantenido hasta nuestros días.

Basados en la definición de población aislada así como estudios con metodología que la define, inferimos que la población de Runta puede tratarse de un aislado genético, de importancia para la realización de estudios de ligamiento, búsqueda de genes candidatos, estudios de asociación y definición de clusters genotípicos específicos, sobre todo en enfermedades raras y multifactoriales (9), lo que la hace susceptible de intervención médica y educación.

Según lo encontrado en la literatura referente a datación de enfermedades de depósito lisosomal en Latinoamérica, la mutación c.1360C>T del gen *HGSNAT* encontrada en la población de Runta, puede ser la mutación prehispánica más antigua datada hasta la fecha.

Este estudio permite brindar información a la comunidad de la vereda Runta, sobre el tiempo transcurrido y el posible origen de la mutación que presentan, así como reportar el primer cluster de MPSIIC identificado en Colombia.

5.2 Recomendaciones

Con el fin de comprobar el origen amerindio que se piensa tiene la mutación, sería importante comparar los haplotipos que comparte la mutación c.1360C>T con los haplotipos de los individuos de la población parental que contribuyó a la actual población del territorio Cundiboyacense (indígenas muiscas y españoles) y verificar la relación filogenética existente.

Sería importante ampliar el estudio en la población de Runta, con el uso de SNPs o STRs que cumplan con las características necesarias para determinar el cuello de botella con el software Bottleneck y M-Ratio, así como los estadísticos F.

A. Anexo: Acta de comité de ética, formatos de consentimientos informados, asentimiento del menor y encuesta de recolección de datos



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 019-203 -15
Fecha: 12 de noviembre 2015

Nombre completo del proyecto: "ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA BOYACÁ".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Leandra Johana Torres Ramírez

Dirigido por: el profesor Harvy Mauricio Velasco Parra

Presentado por: el profesor Harvy Mauricio Velasco Parra, Coordinador Académico

Departamento o Sección: Maestría en Genética Humana de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 12 de noviembre de 2015

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Patología
2	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Departamento de Morfología
3	Duarte Gutiérrez Liz Marcela	Asesora Jurídica Facultad de Medicina
4	Guerrero Fonseca Carlos Arturo	Presidente Comité de Ética / Departamento de Ciencias Fisiológicas
5	Parra Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

Elb/, Jeannette P. AL-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
Correo electrónico: eticasalud_fm bog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- a. Es válido desde el punto vista ético. La investigación involucra un riesgo igual al promedio para los sujetos que participan en ella. La investigación se ajusta a los estándares de la buena práctica clínica.
- b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger a los sujetos humanos son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los Investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA ha generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el Investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

Elb./ Jeannette P. Al.-

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ADULTO****“ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ”.**

Usted está invitado a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Es muy importante que usted lea y entienda los siguientes puntos importantes en la realización del estudio molecular:

(a) La naturaleza de este estudio es la investigación, con el propósito de identificar los cambios de la información genética que originaron la enfermedad de Mucopolisacaridosis tipo IIIC o síndrome de Sanfilippo en la población.

(b) Según la resolución 8430 de 1993 el estudio es catalogado como riesgo mínimo debido a la extracción de sangre por punción venosa que puede ser necesaria para el desarrollo del estudio, dicha punción será realizada por profesionales expertos bajo las condiciones de asepsia adecuadas y necesaria.

(c) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria

(d) Puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocatoria de este consentimiento no tendrá consecuencia alguna en la atención médica que se le suministre.

(e) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

(f) Este estudio no generará beneficios inmediatos sobre el paciente o sujeto de investigación, ni sobre su familia. Sin embargo a mediano plazo, esta investigación nos permitirá clarificar muchos conceptos sobre el desarrollo y comportamiento del Síndrome de Sanfilippo o MPS IIIC.

(g) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

(h) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted.

(i) CONFIDENCIALIDAD: Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética de la Universidad nacional. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

(j) ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados del estudio le serán socializados (sin costo adicional) por un MEDICO GENETISTA.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dr. Harvy Velasco
Especialista en genética médica
Instituto de Genética Universidad Nacional
Tel .Conmutador: (57) (1) 316-5000 Extensión: 11610



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ADULTO

“ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ”.

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO: Establecer la presencia de efecto fundador de la mutación nonsense g.1360C>T del gen HGSNAT en la población de Runta, Boyacá.

PROCEDIMIENTO: Si decide participar, se realizará una entrevista inicial, en la cual estará acompañado por sus padres o representante legal, donde se explicaran las características y alcances del estudio, se procederá a tomar una muestra de no más de 5 ml de sangre periférica (1 tubo tapa jila de 5cc), por medio de punción de una de las venas del antebrazo (de ser necesario). En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado y contactado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por personas expertas involucradas en el equipo de atención médica.

Su sangre será utilizada por los investigadores para identificar los cambios de la información genética que originaron la enfermedad llamada Mucopolisacaridosis tipo IIIC o síndrome de Sanfilippo. Esto permitirá a los investigadores conocer mejor la enfermedad en los niños y pacientes colombianos y sus familias.

BENEFICIOS ADICIONALES:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en que usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores, por favor marque su decisión:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de diagnóstico molecular.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio molecular, para lo cual, me deberán contactar nuevamente con el fin de firmar el respectivo consentimiento informado previamente aprobado por Comité de Ética.

Yo, _____ identificado con documento de identificación # _____ de _____, acepto voluntariamente que se me tome muestra de _____, con el fin de almacenarla para el estudio molecular de MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IIIC. Así mismo, declaró que se me ha explicado la no presencia de riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

FECHA: _____

Sujeto de Investigación: _____ Investigador: _____

Testigo: _____



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENOR DE EDAD
“ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ”.

Usted y su hijo están invitados a participar en un estudio de investigación propuesto por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional. Es muy importante que usted(es) lea(n) y entienda(n) los siguientes puntos importantes en la realización del estudio molecular:

(a) La naturaleza de este estudio es la investigación, con el propósito de identificar los cambios de la información genética que originaron la enfermedad de Mucopolisacaridosis tipo IIIC o síndrome de Sanfilippo en la población.

(b) Según la resolución 8430 de 1993 el estudio es catalogado como riesgo mínimo debido a la extracción de sangre por punción venosa que puede ser necesaria para el desarrollo del estudio, dicha punción será realizada por profesionales expertos bajo las condiciones de asepsia adecuadas y necesaria.

(c) Su participación en este estudio es totalmente voluntaria

(d) Puede retirarse del estudio cuando lo desee. La revocatoria de este consentimiento no tendrá consecuencia alguna en la atención médica que se le suministre.

(e) Si tiene algún interrogante sobre el estudio por favor no dude en manifestarlo a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le contestará sus preguntas.

(f) Este estudio no generará beneficios inmediatos sobre el paciente o sujeto de investigación, ni sobre su familia. Sin embargo a mediano plazo, esta investigación nos permitirá clarificar muchos conceptos sobre el desarrollo y comportamiento del Síndrome de Sanfilippo o MPS IIIC.

(g) Ninguna persona involucrada en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte nuestra o de las instituciones colaboradoras.

(h) Participar en este estudio no tiene ningún costo para usted.

(i) CONFIDENCIALIDAD: Los registros médicos de cada individuo permanecerán archivados en el Instituto de Genética de la Universidad nacional. Las historias médicas, los resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado son de carácter absolutamente confidencial, de manera que, solamente usted y el equipo de investigación tendrá acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento. Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas científicas o congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos.

(j) ENTREGA DE RESULTADOS: Los resultados del estudio le serán socializados (sin costo adicional) por un MEDICO GENETISTA.

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dr. Harvy Velasco
Especialista en genética médica
Instituto de Genética Universidad Nacional
Tel .Commutador: (57) (1) 316-5000 Extensión: 11610



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENOR DE EDAD
“ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE
DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ”.

EXPLICACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

OBJETIVO: Establecer la presencia de efecto fundador de la mutación nonsense g.1360C>T del gen HGSNAT en la población de Runta, Boyacá.

PROCEDIMIENTO: Si decide participar, se realizará una entrevista inicial, en la cual estará acompañado por sus padres o representante legal, donde se explica las características y alcances del estudio, se procederá a tomar una muestra de no más de 5 ml de sangre periférica (1 tubo tapa lila de 5cc), por medio de punción de una de las venas del antebrazo (de ser necesario). En caso de que sea necesario repetir los exámenes, usted será notificado y contactado para tomar las muestras nuevamente. Estas muestras serán manejadas únicamente por personas expertas involucradas en el equipo de atención médica.

Su sangre será utilizada por los investigadores para identificar los cambios de la información genética que originaron la enfermedad llamada Mucopolisacaridosis tipo IIIC o síndrome de Sanfilippo. Esto permitirá a los investigadores conocer mejor la enfermedad en los niños y pacientes colombianos y sus familias.

BENEFICIOS ADICIONALES:

La utilización de la muestra en estudios posteriores nos podría ayudar en el futuro a entender las causas y/o el comportamiento de la(s) entidad(es) anteriormente mencionada(s). Se puede dar el caso en que usted y su familia no se beneficien directamente de estos estudios, pero tanto su familia como otros individuos afectados podrían beneficiarse. Por lo tanto, con respecto al almacenamiento de la muestra y su utilización en estudios de investigación posteriores, por favor marque su decisión:

Deseo que la muestra que me fue extraída sea DESECHADA una vez completado el estudio de diagnóstico molecular.

Autorizo conservar la muestra que me fue extraída con la posibilidad de emplearla junto con el resultado del estudio molecular, para lo cual, me deberán contactar nuevamente con el fin de firmar el respectivo consentimiento informado previamente aprobado por Comité de Ética.

Yo, _____ identificado con documento de identificación # _____ de _____, acepto voluntariamente que se tome muestra de _____, a mi hijo (a) o menor a mi cargo _____ con documento de identidad _____ con el fin de almacenarla para el estudio molecular de MUCOPOLISACARIDOSIS TIPO IIIC. Así mismo, declaró que se me ha explicado la no presencia de riesgos y el manejo que se le dará al material de muestra.

FECHA: _____

PADRE _____ MADRE _____

Firma Representante Legal _____ Sujeto de Investigación: _____

Testigo _____ Investigador _____



ASENTIMIENTO INFORMADO PARA MENOR DE EDAD
**“ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE
DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ”.**

INFORMACION GENERAL

A continuación se procede a explicar al menor que el propósito del estudio es identificar los cambios de la información genética que originaron la enfermedad de Mucopolisacaridosis tipo IIIC o síndrome de Sanfilippo en la población, que los padres tienen conocimiento del estudio que se va a realizar y que previamente han dado su aprobación para la participación de él en el estudio.

Se explica que para realizar el estudio puede ser necesario tomar una muestra de sangre, que será extraída por punción de una vena del antebrazo por una persona experta y bajo las condiciones de asepsia adecuadas y necesarias.

Adicionalmente, se aclara que puede decidir no participar en el estudio y que no pasa nada, que si cuando empiece el estudio tiene alguna pregunta, puede preguntarle al grupo de investigadores cuantas veces sea necesario, hasta aclarar sus dudas, que en cualquier momento puede decidir que ya no quiere seguir participando y nadie lo obligará a continuar en el estudio y que no obtendrá ninguna recompensa ni remuneración al participar en el estudio.

Posteriormente se pregunta al menor si después de haber sido explicado lo que se va a realizar, desea participar en el estudio y suministrar la muestra de sangre de ser necesaria.



**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA TOMA DE FOTOGRAFÍAS Y/O
GRABACIONES AUDIOVISUALES**

**ESTUDIO: "ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN
HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ".**

INSTITUTO DE GENÉTICA UNIVERSIDAD NACIONAL

Nombre del Paciente: _____ **Fecha:** _____

Como representante legal de _____, identificado con documento de identidad # _____, doy mi consentimiento para la toma de fotografías, videos, grabaciones de voz a mi o a mi hijo (a) (o persona de la cual soy el acudiente o representante legal). Entiendo que la información puede ser utilizada como parte de mi historial médico, como parte de docencia médica o para publicación en libros o artículos. Entiendo igualmente que no voy a recibir ningún incentivo económico. Si me niego, esto no afectará la atención médica adecuada.

Autorización para la utilización del material

___Autorizo que las fotografías, los videos y las grabaciones de voz se usen en publicaciones médicas, incluyendo artículos, libros y publicaciones electrónicas. Entiendo que la imagen puede ser vista por miembros del público en general, además de los científicos y los investigadores médicos, que regularmente usan estas publicaciones en su educación profesional. Aunque dichas fotografías, videos o grabaciones de voz serán utilizados sin identificar información personal (mi nombre), entiendo que es posible que alguien me reconozca. Estoy de acuerdo con que mi imagen se muestre para efectos académicos y para mi historia clínica.

___Autorizo que las fotografías sean utilizadas para lo mencionado en el ítem anterior, siempre y cuando se utilice enmascaramiento, con el fin de que no me reconozcan.

___Autorizo que mi imagen sea utilizada para la enseñanza y que se use para mi historia clínica, **PERO NO**, para publicaciones médicas.

___Autorizo que mi imagen se utilice **SOLAMENTE** como parte de la historia clínica.

Confirmando que el consentimiento se me ha explicado en términos que entiendo, y firmo a continuación,

Firma Paciente o Representante Legal

Testigo

Cualquier información adicional usted puede obtenerla directamente con:

Dr. Harvy Velasco
Especialista en genética médica
Instituto de Genética Universidad Nacional
Tel .Conmutador: (57) (1) 316-5000 Extensión: 11610

	ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ.
	FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Proyecto aprobado por Comité de ética, acta No 019-203-15 del 12 de noviembre de 2015.

CODIGO: BOY

FECHA: DD MM AAAA

INFORMACIÓN GENERAL		
NOMBRES Y APELLIDOS: _____		
DOCUMENTO: _____	LUGAR DE NACIMIENTO: _____	
FECHA DE NACIMIENTO DD/MM/AAAA: _____	EDAD (AÑOS): _____	
TELÉFONOS: _____	DIRECCIÓN: _____	
CIUDAD: _____	CORREO ELECTRÓNICO: _____	
TIEMPO VIVIENDO EN LA REGION (AÑOS): _____		
INFORMACIÓN DE LA FAMILIA		
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DE LA MADRE: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DE LA ABUELA MATERNA: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL ABUELO MATERNO: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL PADRE: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DE LA ABUELA PATERNA: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL ABUELO PATERNO: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 1: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 2: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 3: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 4: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 5: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 6: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 7: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 8: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 9: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HERMANO 10: _____		
LUGAR NACIMIENTO: _____	DTO: _____	EDAD (AÑOS): _____

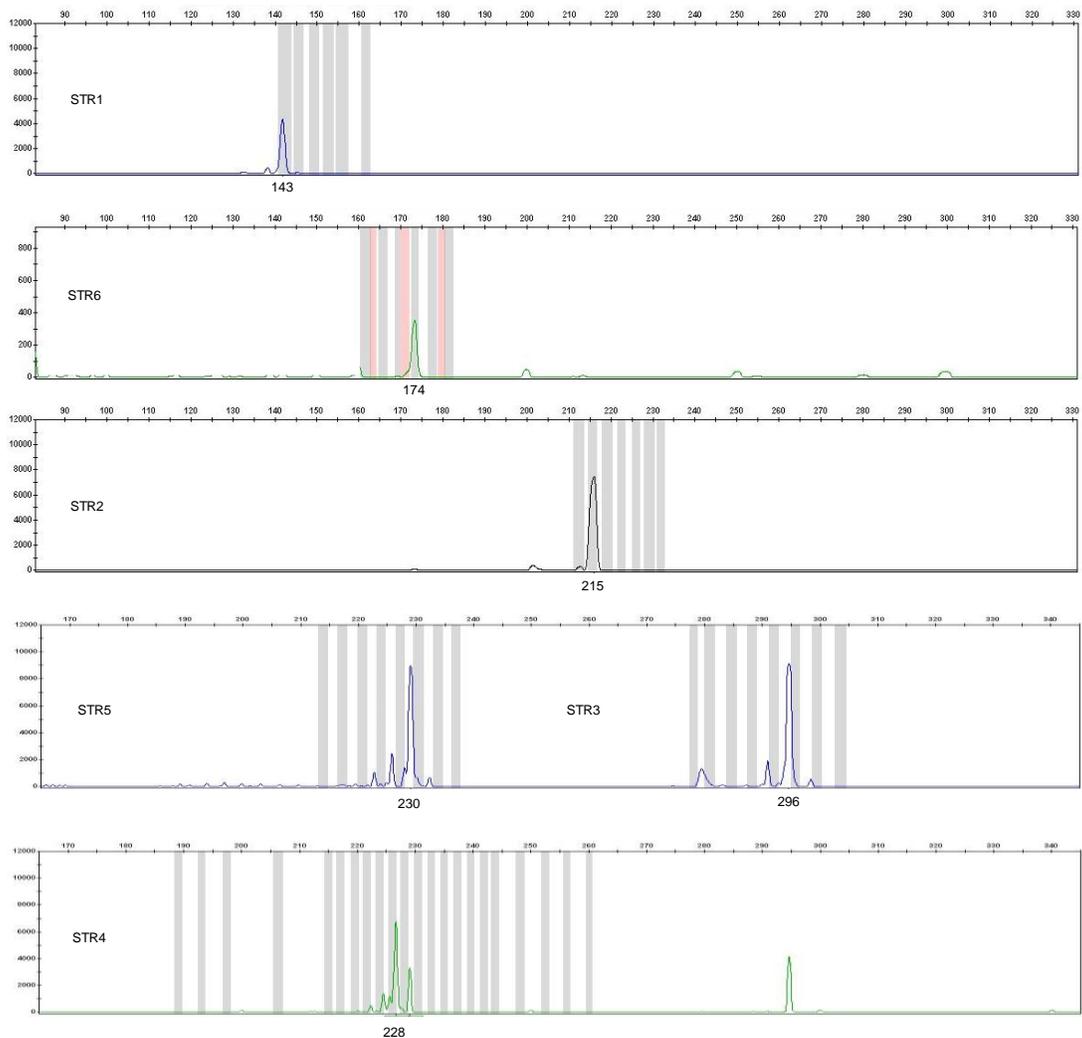
 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	ANÁLISIS DEL EFECTO FUNDADOR DE UNA MUTACIÓN NONSENSE DEL GEN HGSNAT EN LA POBLACIÓN DE RUNTA, BOYACÁ. FORMATO DE RECOLECCIÓN DE DATOS
---	--

NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL CONYUGE 1: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL CONYUGE 2: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 1: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 1: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 2: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 2: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 3: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 3: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 4: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 4: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL CONYUGE 3: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL CONYUGE 4: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 1: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 1: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 2: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 2: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 3: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 3: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____
NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 4: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____	NOMBRES Y 2 APELLIDOS DEL HIJO 4: _____ LUGAR NACIMIENTO: _____ DTO: _____ EDAD (AÑOS): _____

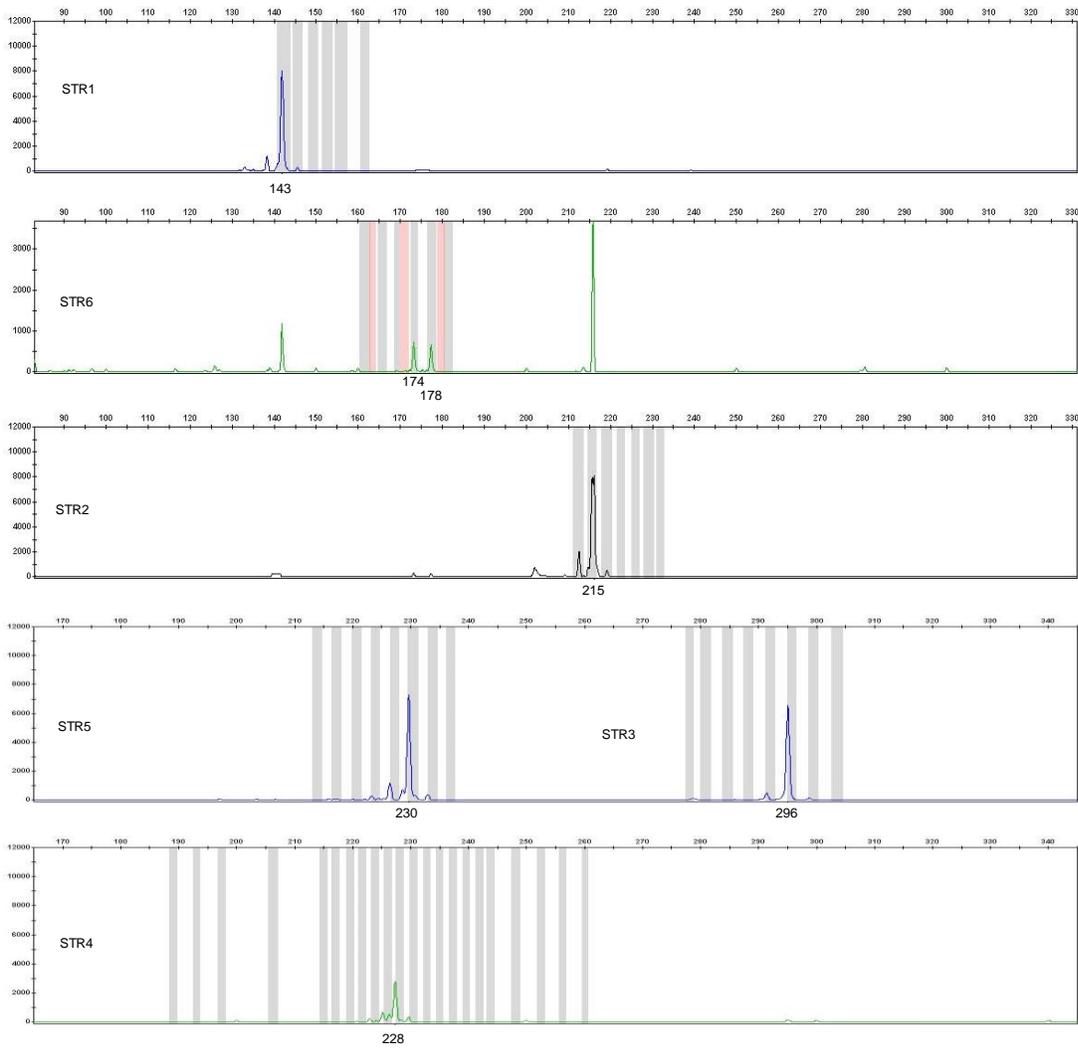
Responsable

B. Anexo: Imágenes de secuenciación de fragmentos (haplotipos)

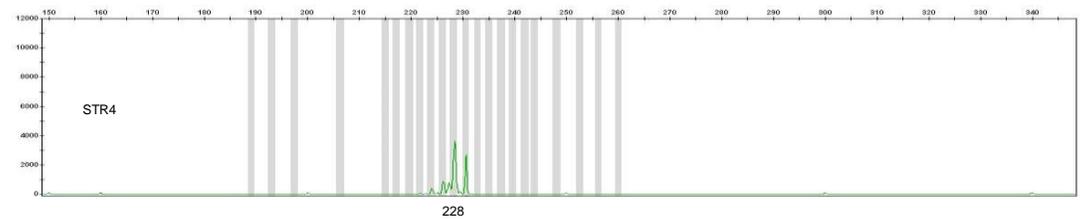
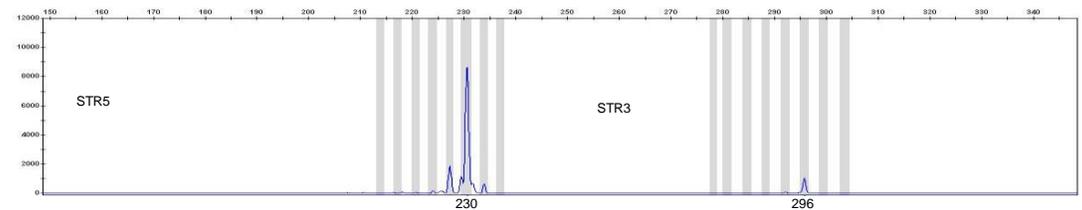
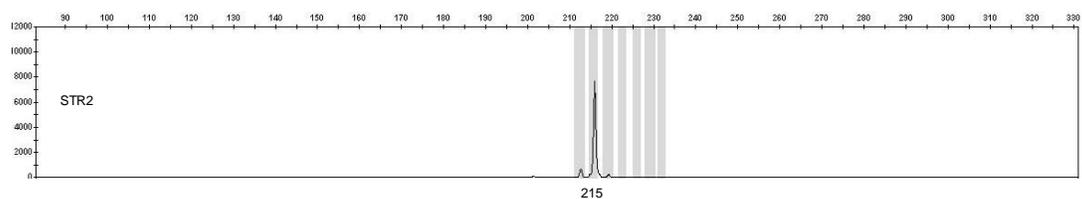
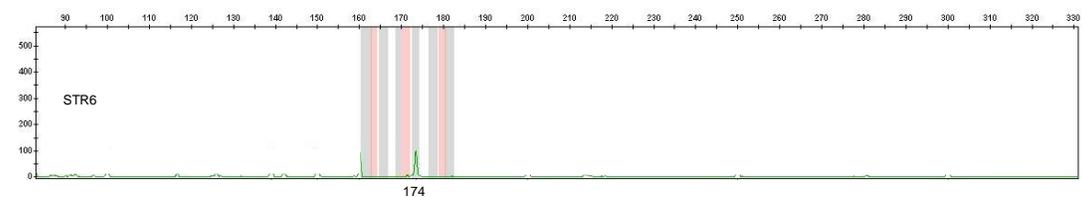
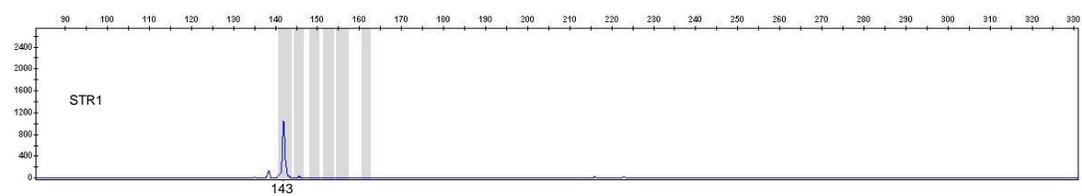
BOY008 (positivo)



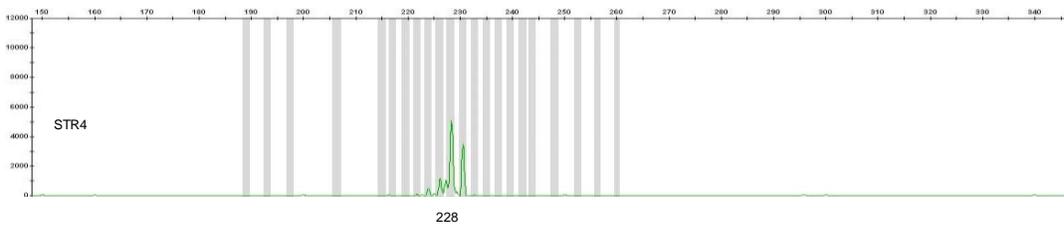
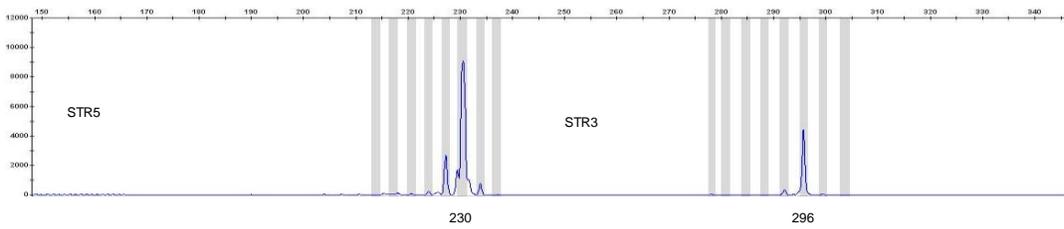
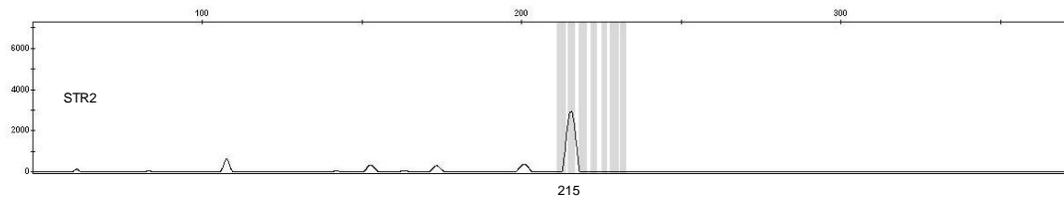
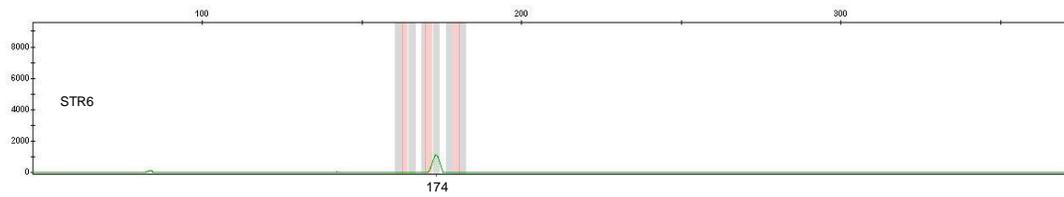
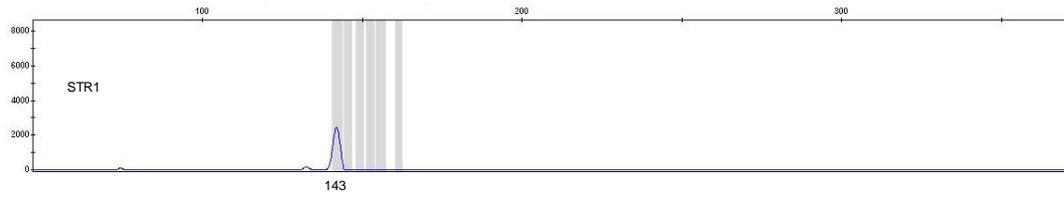
BOY010 (positivo)



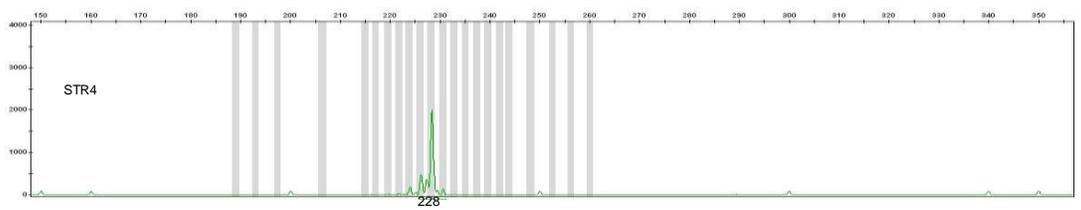
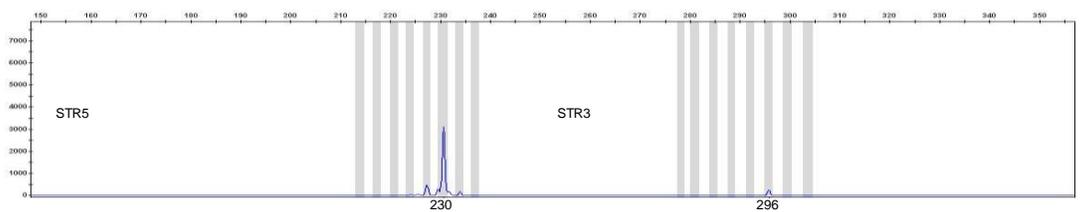
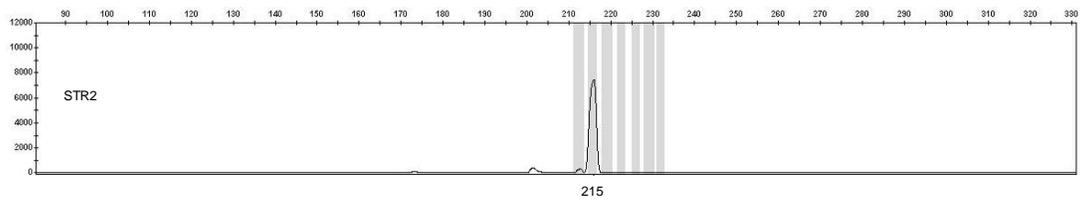
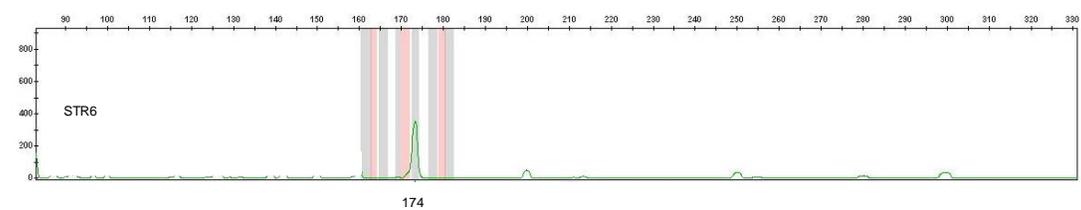
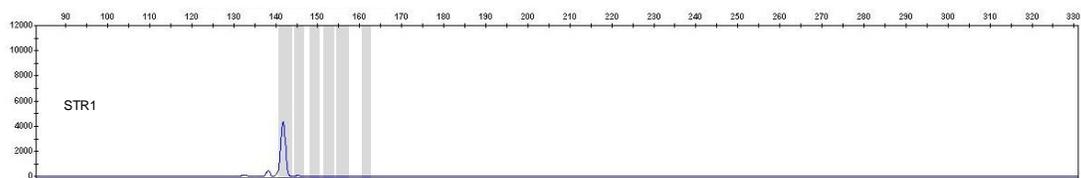
BOY023 (positivo)



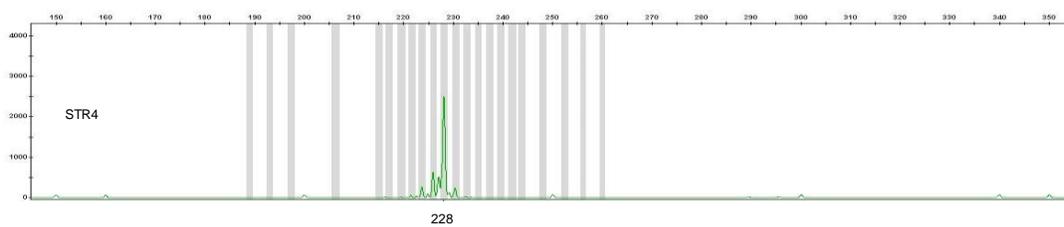
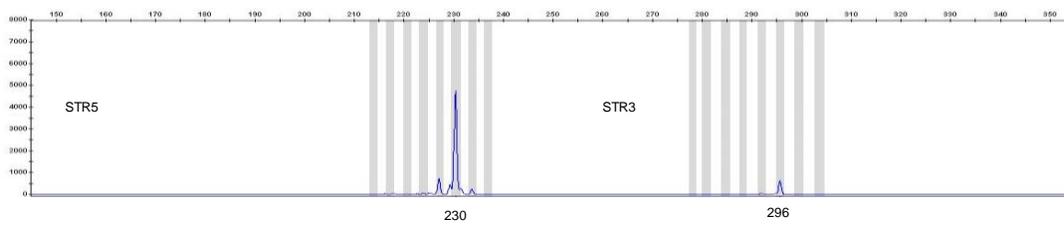
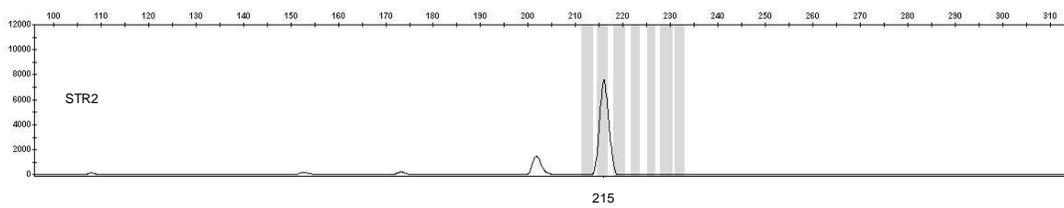
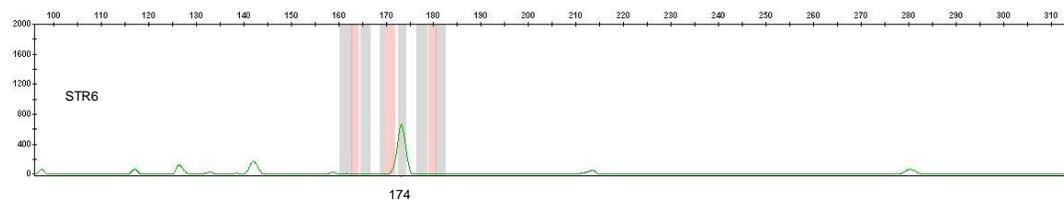
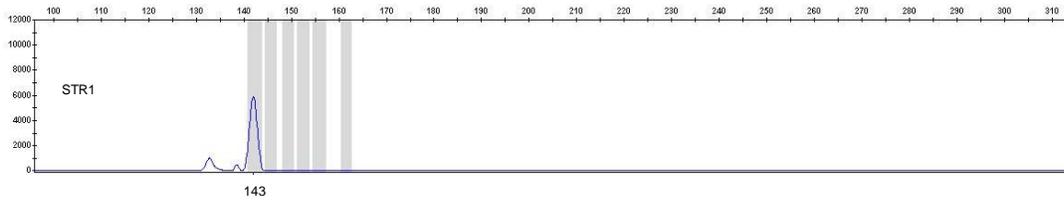
BOY024 (positivo)



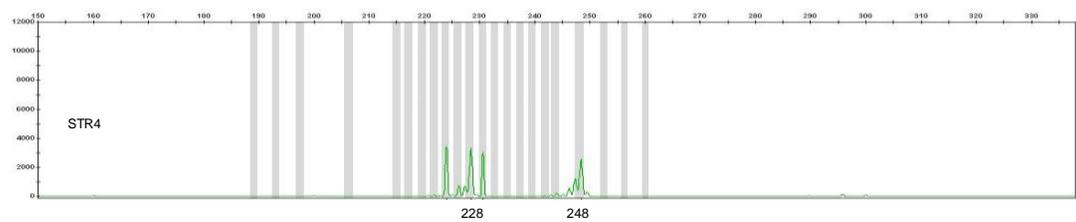
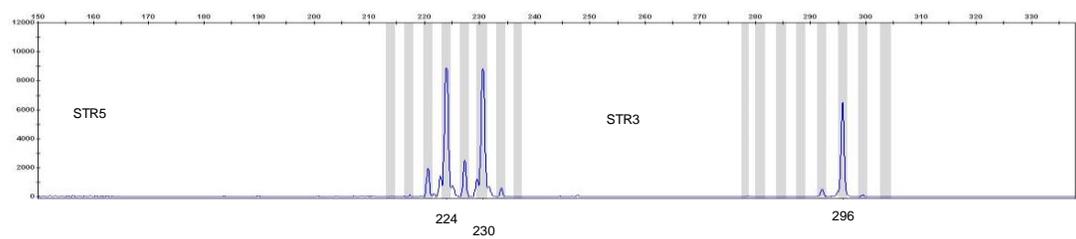
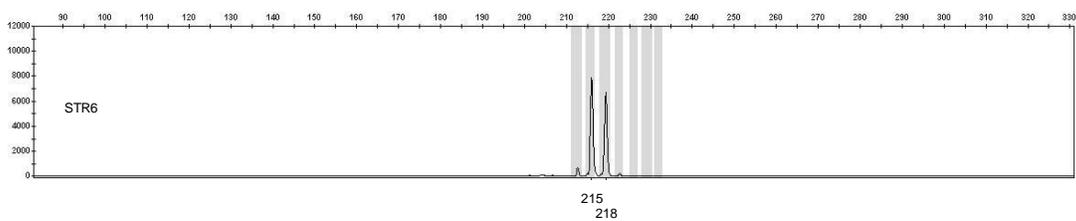
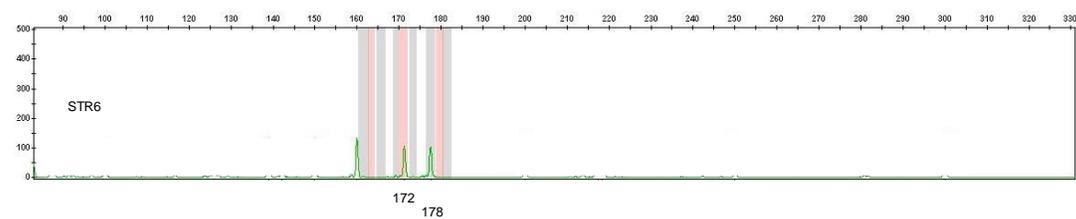
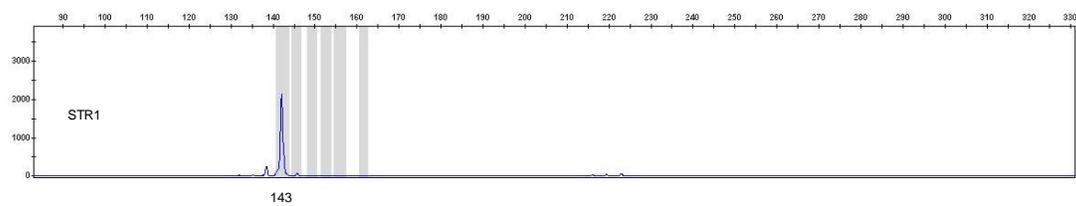
BOY026 (positivo)



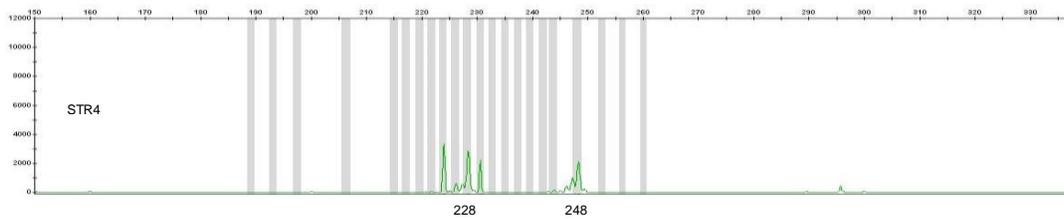
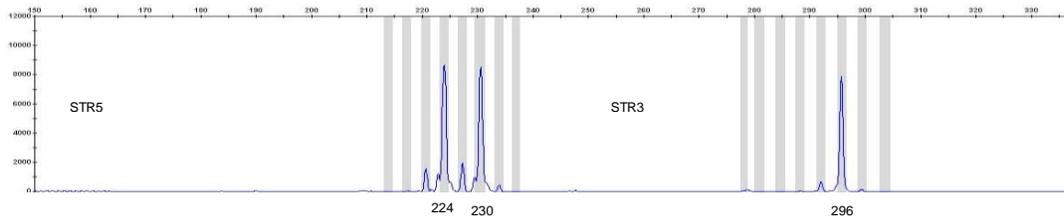
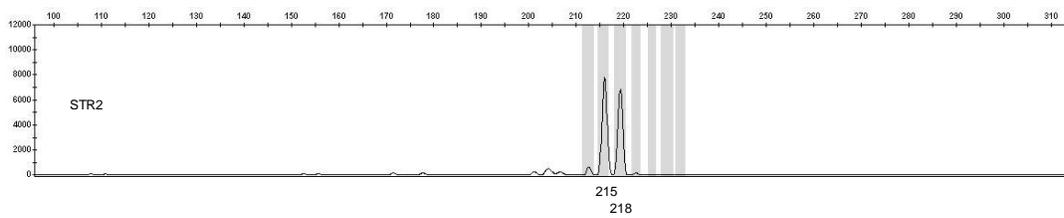
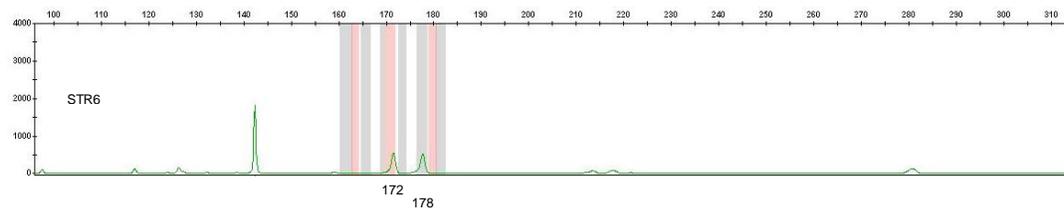
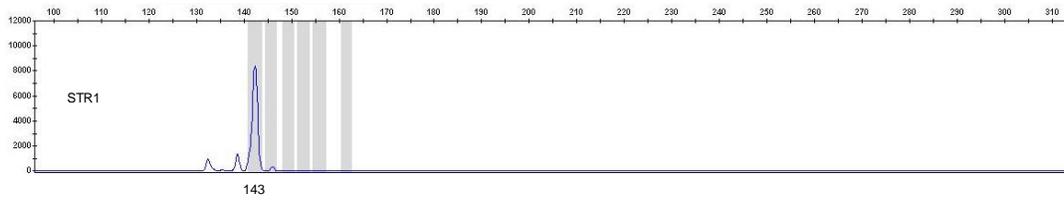
BOY059 (positivo)



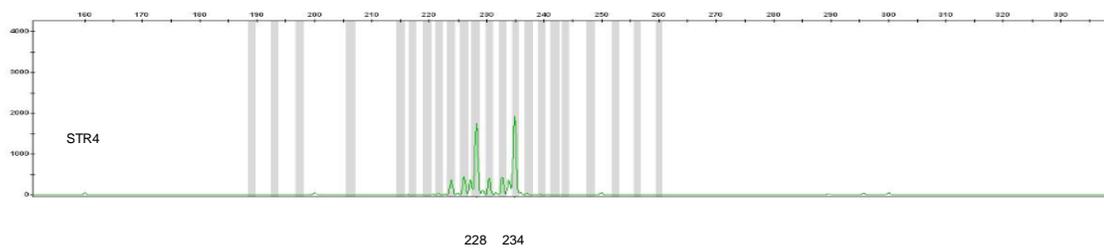
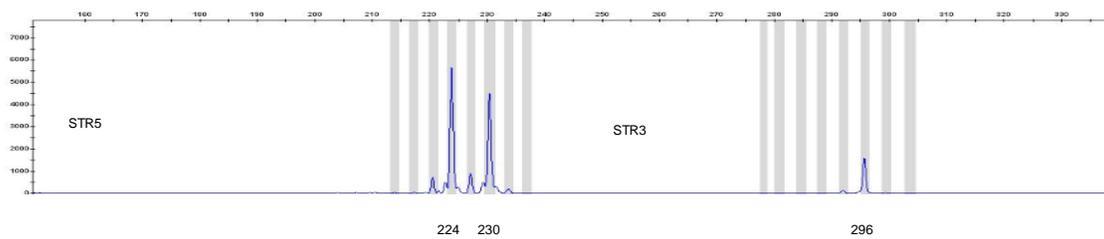
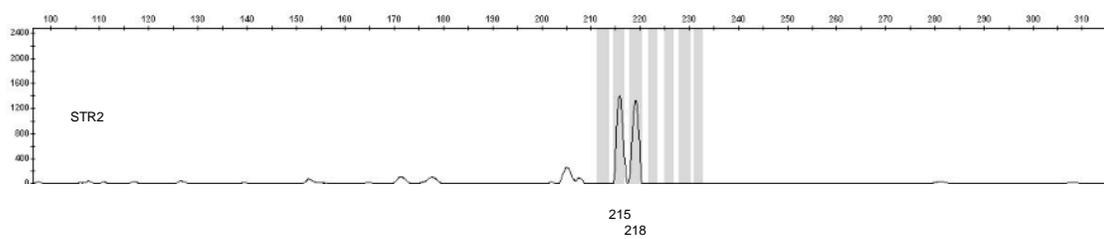
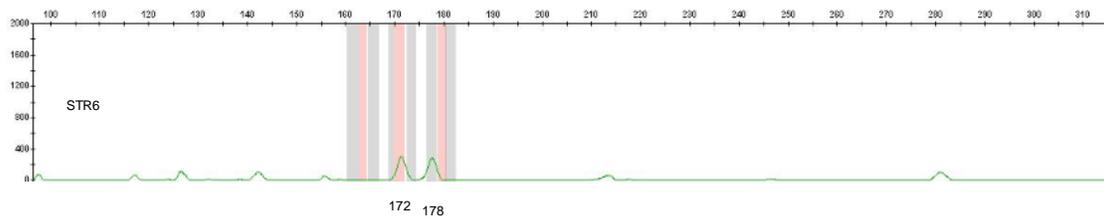
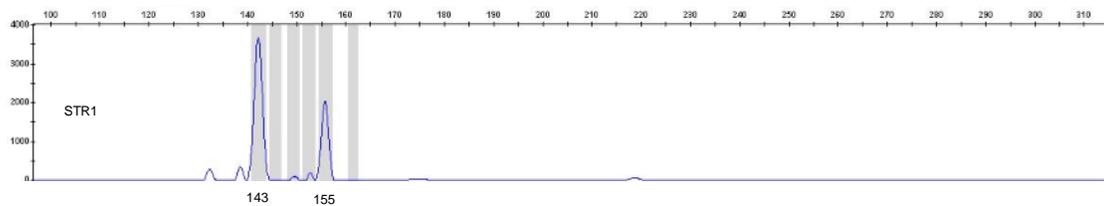
BOY203 (heterocigoto)



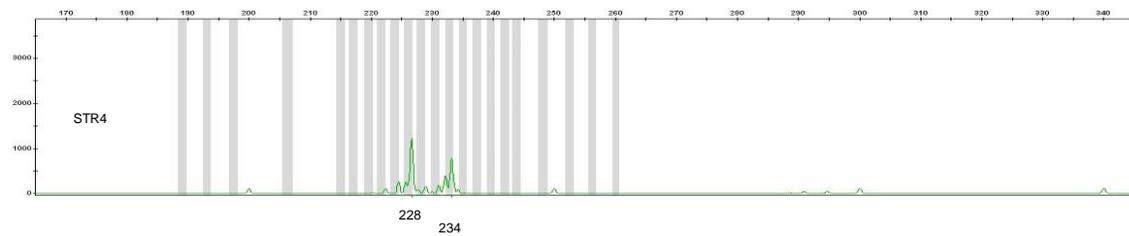
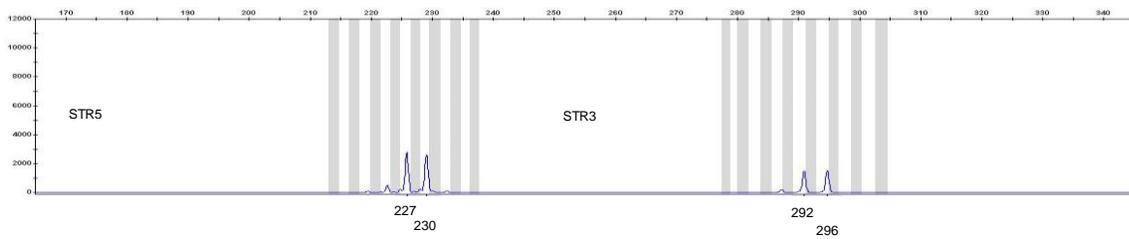
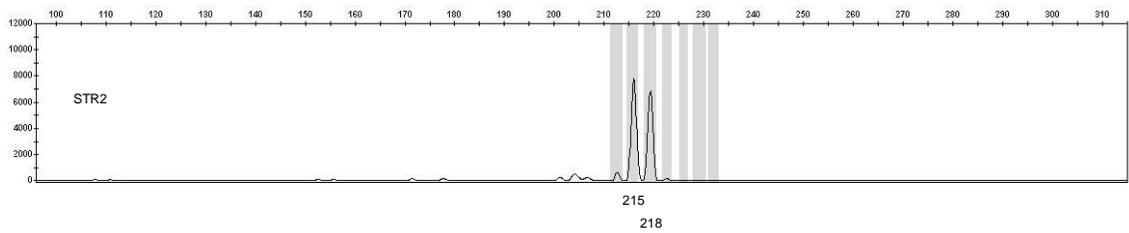
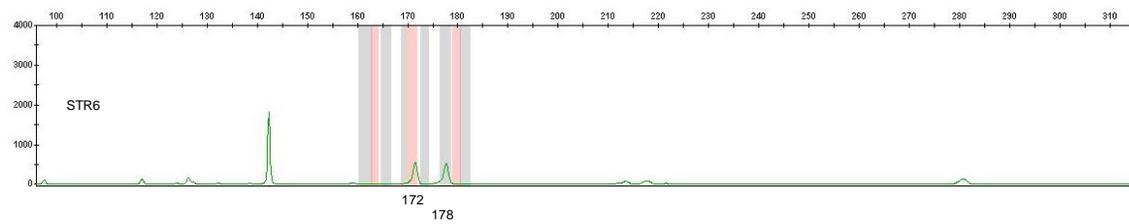
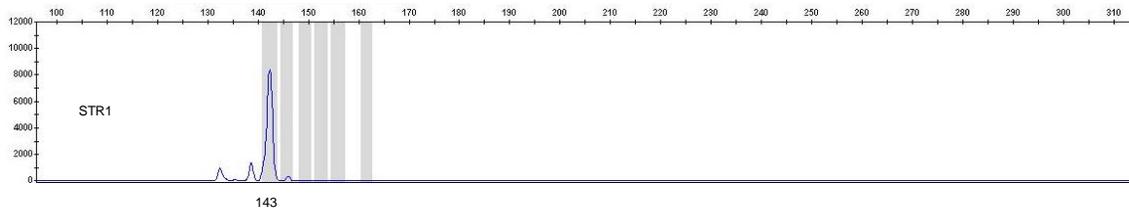
BOY204 (heterocigoto)



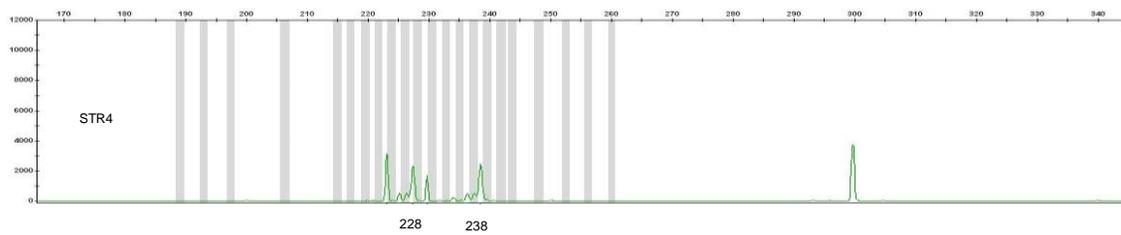
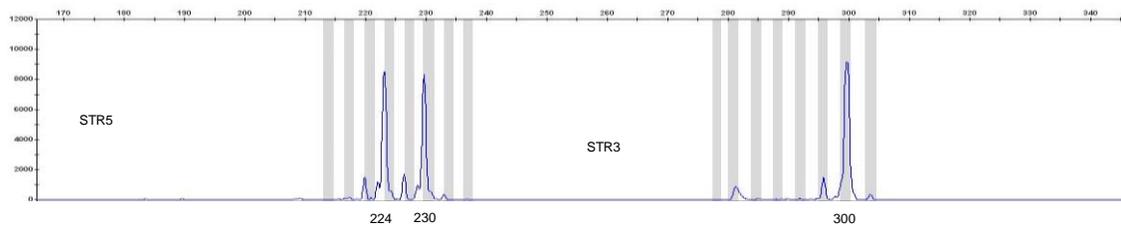
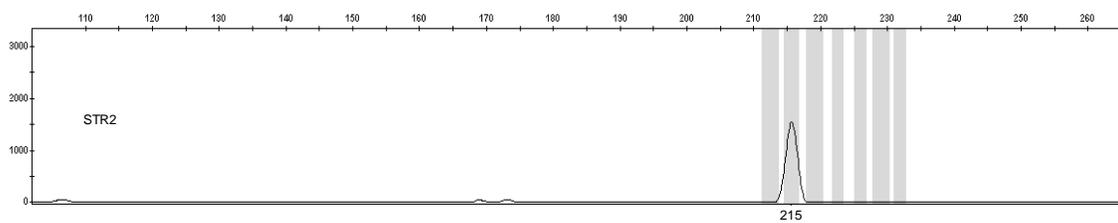
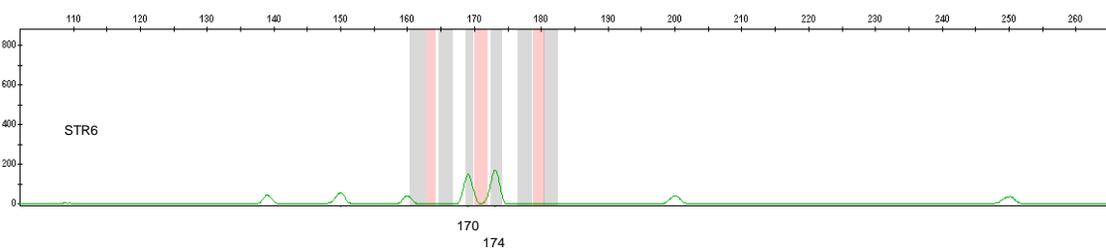
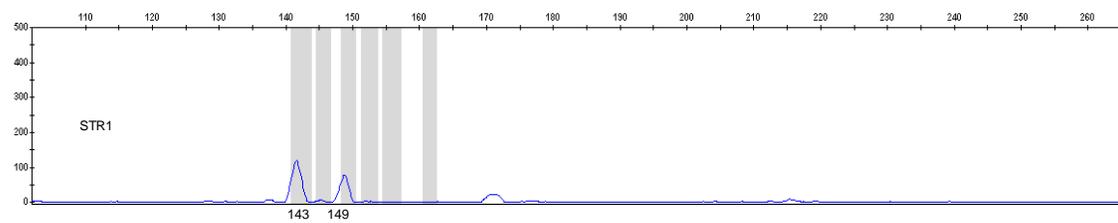
BOY205 (heterocigoto)



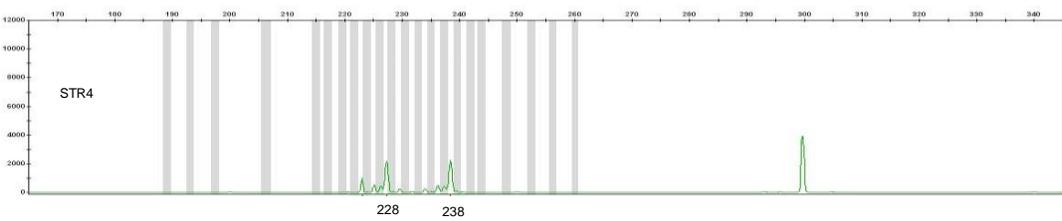
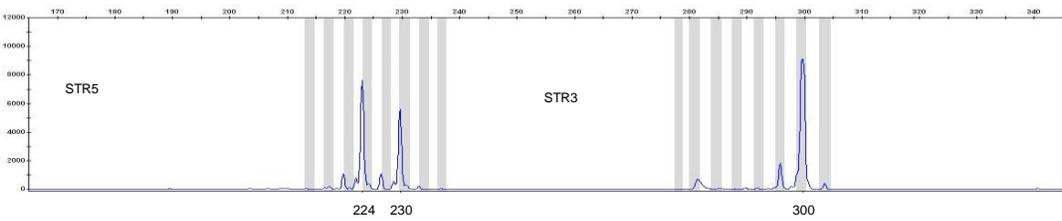
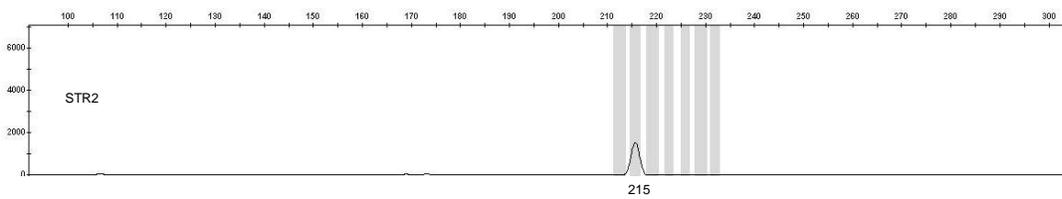
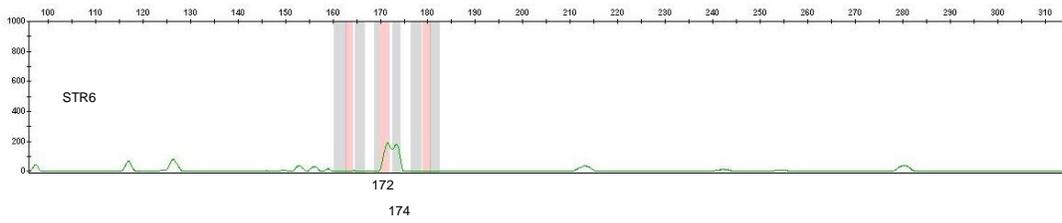
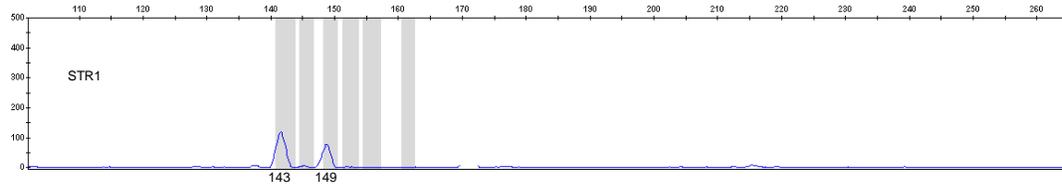
BOY228 (heterocigoto)



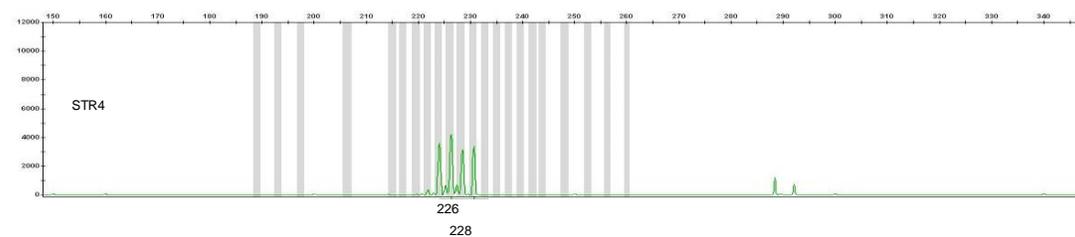
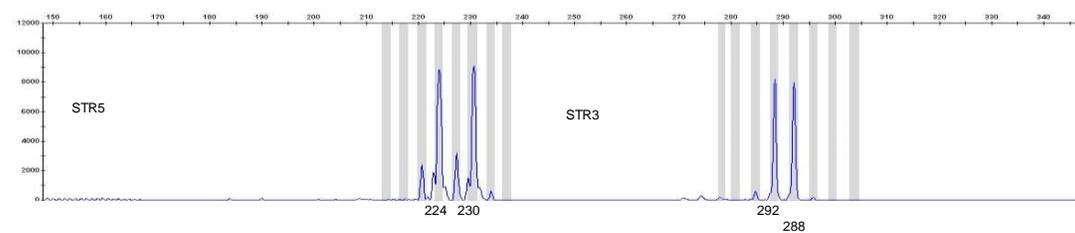
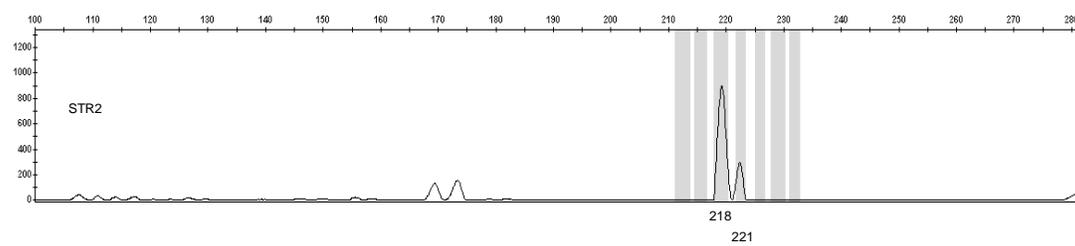
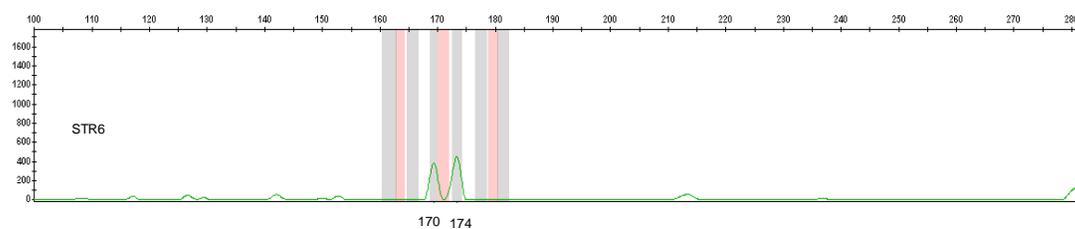
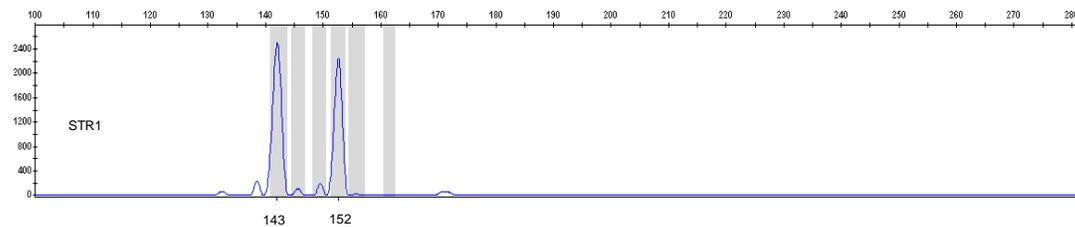
BOY234 (heterocigoto)



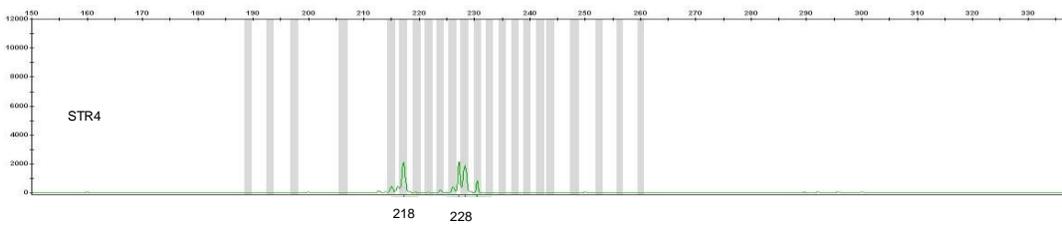
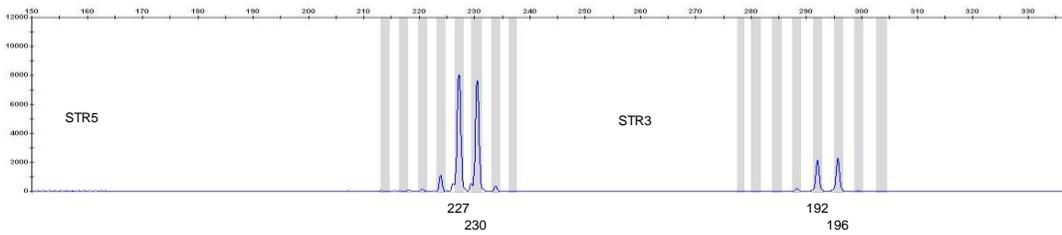
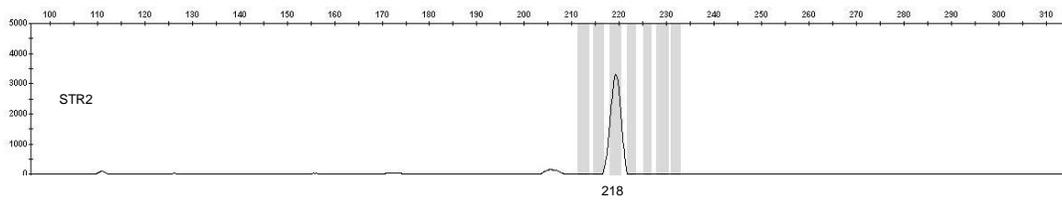
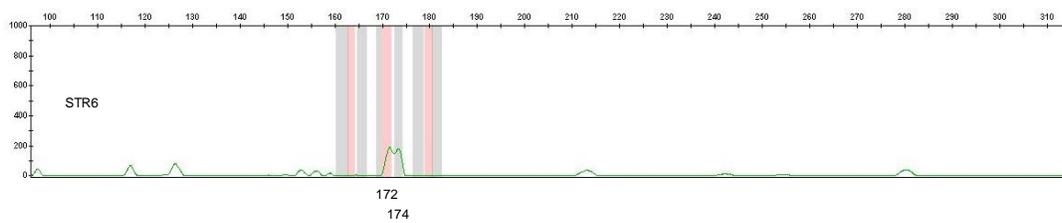
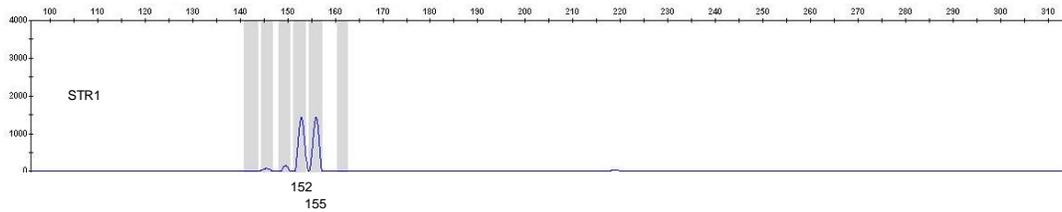
BOY236 (heterocigoto)



BOY237 (heterocigoto)



BOY403 (heterocigoto)



C. Anexo: Resultado desequilibrio de ligamiento y gráficas DMLE v3.1

Resultados de desequilibrio de ligamiento población de Tunja:

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:
Permutation test using the EM algorithm
Number of permutations : 10000
Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)
LnLHood LD : -359.19982 LnLHood LE : -377.02494
Exact P= 0.18634 +- 0.00388 (10100 permutations done) Chi-square test value=35.65025 (P = 0.21975, 30 d.f.)

Pair(0, 2)
LnLHood LD : -400.26901 LnLHood LE : -424.56807
Exact P= 0.06297 +- 0.00237 (10100 permutations done) Chi-square test value=48.59813 (P = 0.06301, 35 d.f.)

Pair(1, 2)
LnLHood LD : -368.92889 LnLHood LE : -397.42804
Exact P= 0.01376 +- 0.00105 (10100 permutations done) Chi-square test value=56.99830 (P = 0.06115, 42 d.f.)

Pair(0, 3)
LnLHood LD : -539.67052 LnLHood LE : -607.12872
Exact P= 0.00901 +- 0.00082 (10100 permutations done) Chi-square test value=134.91640 (P = 0.09893, 115 d.f.)

Pair(1, 3)
LnLHood LD : -515.64639 LnLHood LE : -579.98868
Exact P= 0.02119 +- 0.00144 (10100 permutations done) Chi-square test value=128.68458 (P = 0.70315, 138 d.f.)

Pair(2, 3)
LnLHood LD : -549.61405 LnLHood LE : -627.53182
Exact P= 0.02010 +- 0.00121 (10100 permutations done) Chi-square test value=155.83552 (P = 0.60013, 161 d.f.)

Pair(0, 4)
LnLHood LD : -374.35557 LnLHood LE : -393.71260
Exact P= 0.20228 +- 0.00418 (10100 permutations done) Chi-square test value=38.71406 (P = 0.30565, 35 d.f.)

Pair(1, 4)
LnLHood LD : -346.12782 LnLHood LE : -366.57257
Exact P= 0.19990 +- 0.00447 (10100 permutations done) Chi-square test value=40.88950 (P = 0.51965, 42 d.f.)

Pair(2, 4)
LnLHood LD : -391.17128 LnLHood LE : -414.11570
Exact P= 0.33634 +- 0.00487 (10100 permutations done) Chi-square test value=45.88883 (P = 0.60003, 49 d.f.)

Pair(3, 4)

LnLHood LD : -525.39562 LnLHood LE : -596.67634
Exact P= 0.00545 +- 0.00079 (10100 permutations done) Chi-square test value=142.56144 (P = 0.84899, 161 d.f.)

Pair(0, 5)
LnLHood LD : -410.76195 LnLHood LE : -435.15135
Exact P= 0.09059 +- 0.00294 (10100 permutations done) Chi-square test value=48.77882 (P = 0.32363, 45 d.f.)

Pair(1, 5)
LnLHood LD : -383.69826 LnLHood LE : -408.01132
Exact P= 0.24891 +- 0.00478 (10100 permutations done) Chi-square test value=48.62613 (P = 0.68103, 54 d.f.)

Pair(2, 5)
LnLHood LD : -422.97741 LnLHood LE : -455.55445
Exact P= 0.06010 +- 0.00236 (10100 permutations done) Chi-square test value=65.15409 (P = 0.40167, 63 d.f.)

Pair(3, 5)
LnLHood LD : -540.30070 LnLHood LE : -638.11510
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=195.62879 (P = 0.70420, 207 d.f.)

Pair(4, 5)
LnLHood LD : -399.99038 LnLHood LE : -424.69898
Exact P= 0.32594 +- 0.00465 (10100 permutations done) Chi-square test value=49.41719 (P = 0.89423, 63 d.f.)

Resultados de desequilibrio de ligamiento población de Runta:

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:
Permutation test using the EM algorithm
Number of permutations : 10000
Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)
LnLHood LD : -196.11158 LnLHood LE : -257.99990
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=123.77664 (P = 0.00000, 20 d.f.)

Pair(0, 2)
LnLHood LD : -203.50902 LnLHood LE : -246.38200
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=85.74595 (P = 0.00000, 16 d.f.)

Pair(1, 2)
LnLHood LD : -219.40591 LnLHood LE : -252.07445
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=65.33707 (P = 0.00000, 20 d.f.)

Pair(0, 3)
LnLHood LD : -247.98849 LnLHood LE : -327.74495
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=159.51293 (P = 0.00000, 60 d.f.)

Pair(1, 3)
LnLHood LD : -258.01130 LnLHood LE : -333.43740
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=150.85220 (P = 0.00000, 75 d.f.)

Pair(2, 3)
LnLHood LD : -273.19860 LnLHood LE : -321.81949
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=97.24179 (P = 0.00167, 60 d.f.)

Pair(0, 4)
LnLHood LD : -205.86388 LnLHood LE : -235.12006
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=58.51236 (P = 0.00000, 16 d.f.)

Pair(1, 4)
LnLHood LD : -203.71903 LnLHood LE : -240.81251

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=74.18696 (P = 0.00000, 20 d.f.)

Pair(2, 4)

LnLHood LD : -194.78425 LnLHood LE : -229.19460

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=68.82072 (P = 0.00000, 16 d.f.)

Pair(3, 4)

LnLHood LD : -241.82099 LnLHood LE : -310.55756

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=137.47314 (P = 0.00000, 60 d.f.)

Pair(0, 5)

LnLHood LD : -233.30070 LnLHood LE : -267.43726

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=68.27313 (P = 0.00003, 28 d.f.)

Pair(1, 5)

LnLHood LD : -241.73037 LnLHood LE : -273.12971

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=62.79868 (P = 0.00268, 35 d.f.)

Pair(2, 5)

LnLHood LD : -240.68021 LnLHood LE : -261.51181

Exact P= 0.00228 +- 0.00046 (10100 permutations done) Chi-square test value=41.66319 (P = 0.04663, 28 d.f.)

Pair(3, 5)

LnLHood LD : -264.00640 LnLHood LE : -342.87476

Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=157.73673 (P = 0.00067, 105 d.f.)

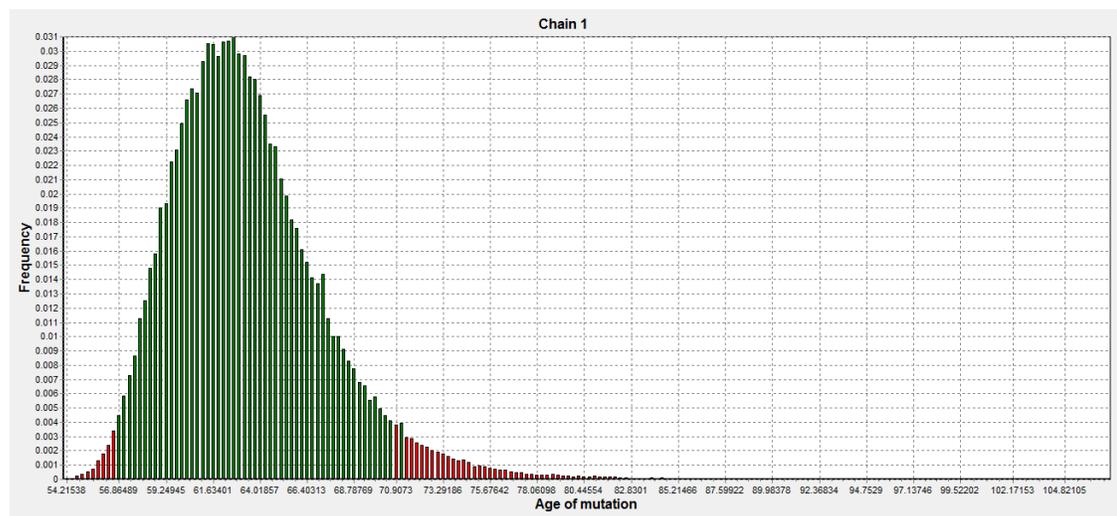
Pair(4, 5)

LnLHood LD : -218.16690 LnLHood LE : -250.24987

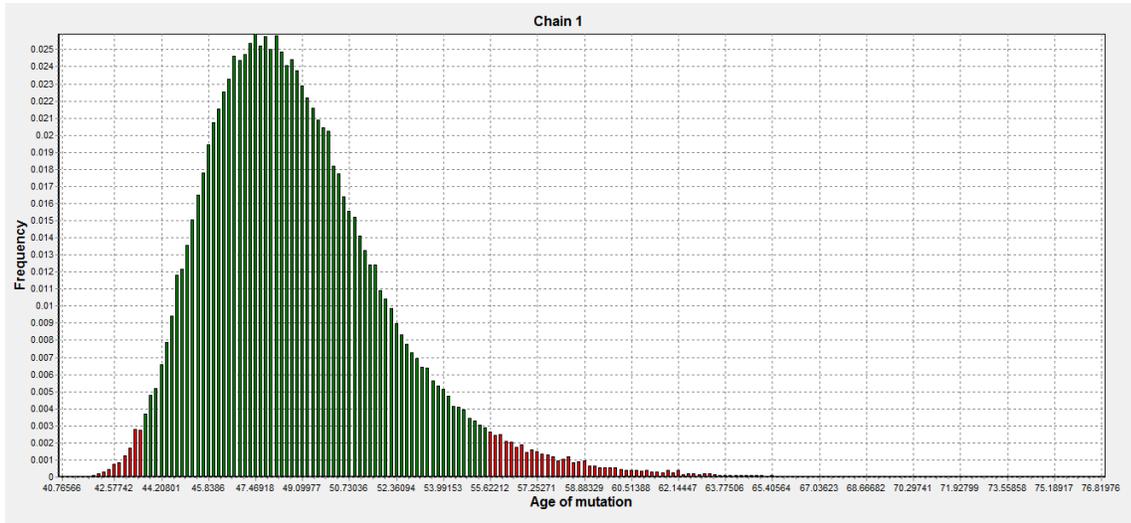
Exact P= 0.00000 +- 0.00000 (10100 permutations done) Chi-square test value=64.16594 (P = 0.00012, 28 d.f.)

Resultado de gráficas DMLE v3.1:

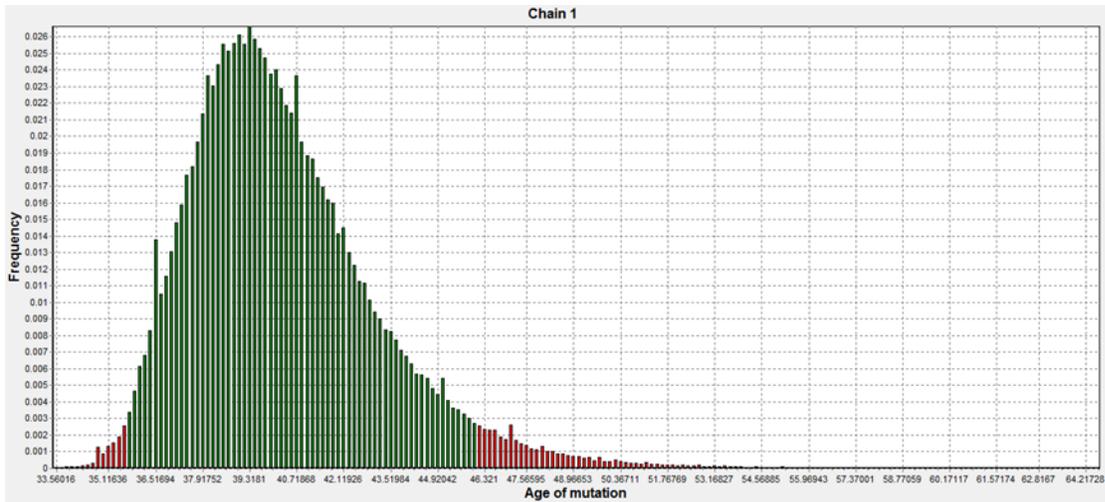
Población colombiana - 15 años por generación



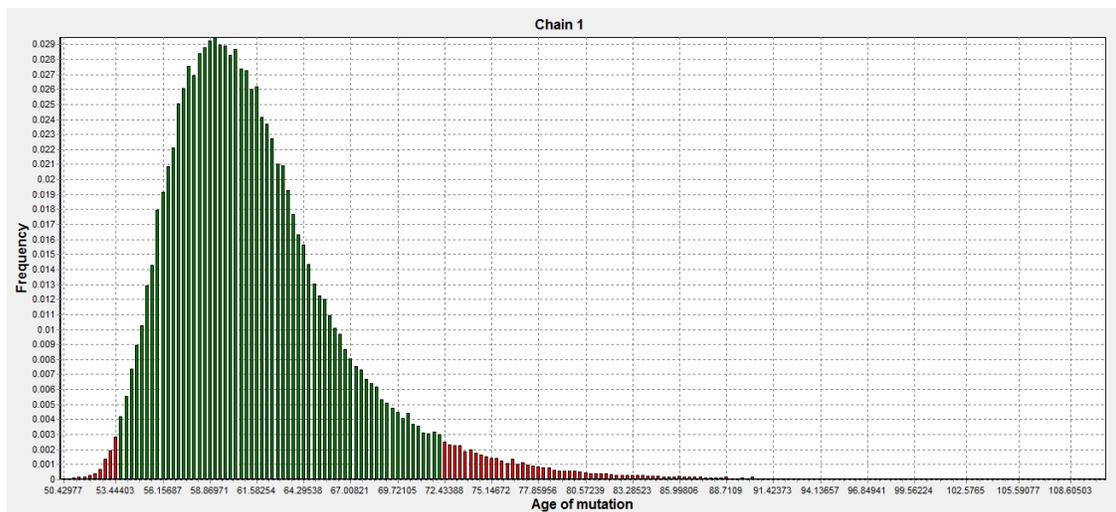
Población colombiana - 20 años por generación



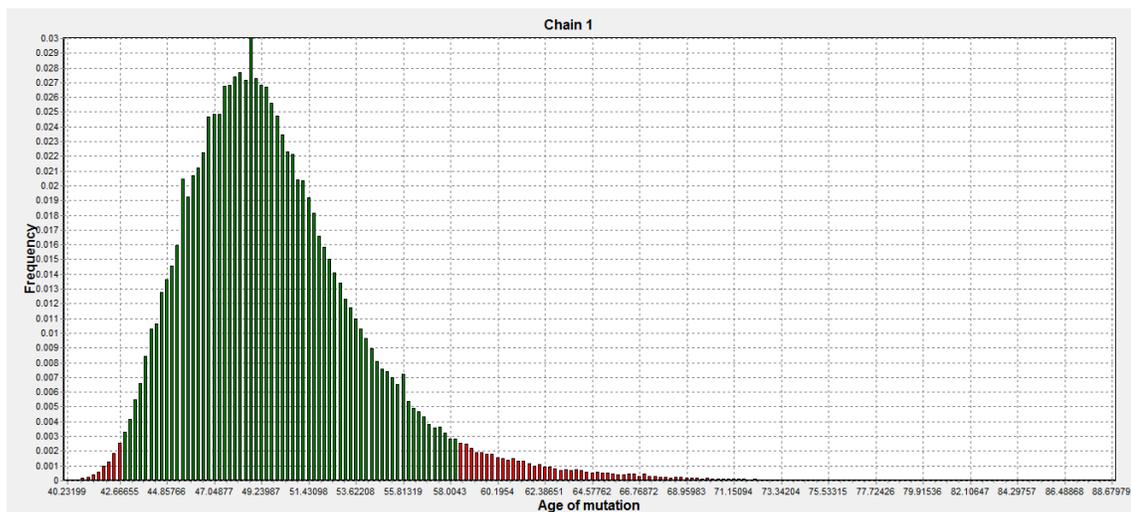
Población colombiana - 25 años por generación



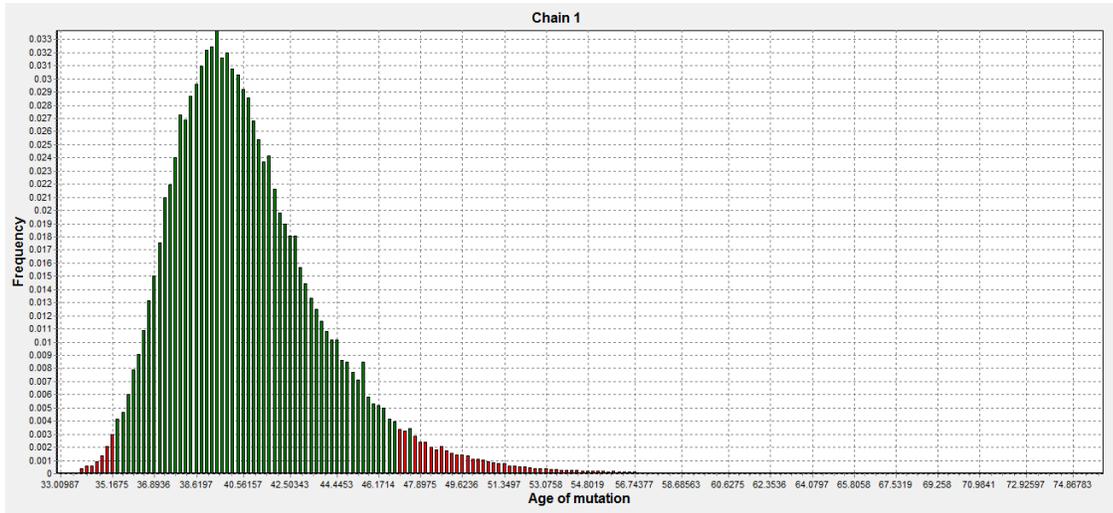
Población boyacense - 15 años por generación



Población boyacense - 20 años por generación



Población boyacense - 25 años por generación



Bibliografía

1. Fan X, Zhang H, Zhang S, Bagshaw RD, Tropak MB, Callahan JW, et al. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *American journal of human genetics*. 2006;79(4):738-44.
2. Hrebicek M, Mrazova L, Seyrantepe V, Durand S, Roslin NM, Noskova L, et al. Mutations in TMEM76* cause mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *American journal of human genetics*. 2006;79(5):807-19.
3. Ausseil J, Landry K, Seyrantepe V, Trudel S, Mazur A, Lapointe F, et al. An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: a candidate molecule for MPS IIIC. *Molecular genetics and metabolism*. 2006;87(1):22-31.
4. Klein U, Kresse H, von Figura K. Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1978;75(10):5185-9.
5. Gomez AM, Garcia-Robles R, Suarez-Obando F. Estimation of the mucopolysaccharidoses frequencies and cluster analysis in the Colombian provinces of Cundinamarca and Boyaca. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2012;32(4):602-9.
6. Velasco HM, Sanchez Y, Martin AM, Umana LA. Natural History of Sanfilippo Syndrome Type C in Boyaca, Colombia. *Journal of child neurology*. 2017;32(2):177-83.
7. Peltonen L, Pekkarinen P, Aaltonen J. Messages from an isolate: lessons from the Finnish gene pool. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*. 1995;376(12):697-704.
8. Herron JC, Freeman S. *Evolutionary Analysis*. 5 ed. Washington, United States: Pearson Education; 2014.
9. Arcos-Burgos M, Muenke M. Genetics of population isolates. *Clinical genetics*. 2002;61(4):233-47.

10. Ardlie KG, Kruglyak L, Seielstad M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(4):299-309.
11. Slatkin M, Rannala B. Estimating allele age. *Annual review of genomics and human genetics*. 2000;1:225-49.
12. Rao AN, Kavitha J, Koch M, Suresh Kumar V. Inborn errors of metabolism: Review and data from a tertiary care center. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2009;24(3):215-22.
13. Raimann B E. Diagnóstico de errores innatos del metabolismo. *Revista chilena de pediatría*. 2008;79:92-5.
14. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *British journal of haematology*. 2005;128(4):413-31.
15. Feldhammer M, Durand S, Mrazova L, Boucher RM, Laframboise R, Steinfeld R, et al. Sanfilippo syndrome type C: mutation spectrum in the heparan sulfate acetyl-CoA: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase (*HGSNAT*) gene. *Human mutation*. 2009;30(6):918-25.
16. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentations. *The Journal of pediatrics*. 2004;144(5 Suppl):S27-34.
17. Santos S, Lopez L, Gonzalez L, Dominguez MJ. [Hearing loss and airway problems in children with mucopolysaccharidoses]. *Acta otorrinolaringologica espanola*. 2011;62(6):411-7.
18. Simmons MA, Bruce IA, Penney S, Wraith E, Rothera MP. Otorhinolaryngological manifestations of the mucopolysaccharidoses. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*. 2005;69(5):589-95.
19. Morishita K, Petty RE. Musculoskeletal manifestations of mucopolysaccharidoses. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011;50 Suppl 5:v19-25.
20. Malm G, Lund AM, Mansson JE, Heiberg A. Mucopolysaccharidoses in the Scandinavian countries: incidence and prevalence. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2008;97(11):1577-81.
21. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *European journal of pediatrics*. 1997;156(8):650-4.

22. Barrera Avellaneda LA. Estudios bioquímicos de los errores innatos del metabolismo en Colombia, durante dos décadas. *Rev Acad Colomb Cienc.*33(128):377-94.
23. Costa-Motta FM, Acosta AX, Abe-Sandes K, Bender F, Schwartz IV, Giugliani R, et al. Genetic studies in a cluster of mucopolysaccharidosis type VI patients in Northeast Brazil. *Molecular genetics and metabolism.* 2011;104(4):603-7.
24. Cimaz R, La Torre F. Mucopolysaccharidoses. *Current rheumatology reports.* 2014;16(1):389.
25. Neufeld EF. *The online metabolic bases of inherited disease 8ed.* United States: McGraw-Hill Global Education Holdings, LLC; 2001.
26. Gallagher JT. Multiprotein signalling complexes: regional assembly on heparan sulphate. *Biochemical Society transactions.* 2006;34(Pt 3):438-41.
27. Ouesleti S, Brunel V, Ben Turkia H, Dranguet H, Miled A, Miladi N, et al. Molecular characterization of MPS IIIA, MPS IIIB and MPS IIIC in Tunisian patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2011;412(23-24):2326-31.
28. Wijburg FA, Wegrzyn G, Burton BK, Tytki-Szymanska A. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome) and misdiagnosis of idiopathic developmental delay, attention deficit/hyperactivity disorder or autism spectrum disorder. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992).* 2013;102(5):462-70.
29. Esposito S, Balzano N, Daniele A, Villani GR, Perkins K, Weber B, et al. Heparan N-sulfatase gene: two novel mutations and transient expression of 15 defects. *Biochimica et biophysica acta.* 2000;1501(1):1-11.
30. Burrows R, Muzzo S. [Sanfilippo's syndrome: typing of mucopolisaccharides in urine and enzymatic determination in plasma]. *Rev Chil Pediatr.* 1980;51(2):129-33.
31. Richtrova E, Mrazova LS, Musalkova D, Luksan O, Stolnaya L, Minks J, et al. HGSNAT has a TATA-less promoter with multiple starts of transcription. *Gene.* 2016;592(1):36-42.
32. Fedele AO, Hopwood JJ. Functional analysis of the HGSNAT gene in patients with mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C Syndrome). *Human mutation.* 2010;31(7):E1574-86.

33. Heron B, Mikaeloff Y, Froissart R, Caridade G, Maire I, Caillaud C, et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *American journal of medical genetics Part A*. 2011;155a(1):58-68.
34. Bartsocas C, Grobe H, van de Kamp JJ, von Figura K, Kresse H, Klein U, et al. Sanfilippo type C disease: clinical findings in four patients with a new variant of mucopolysaccharidosis III. *European journal of pediatrics*. 1979;130(4):251-8.
35. Cheema HA, Malik HS, Hashmi MA, Fayyaz Z, Mushtaq I, Shahzadi N. Mucopolysaccharidoses - Clinical Spectrum and Frequency of Different Types. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP*. 2017;27(2):80-3.
36. Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, van Weely S, et al. The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human genetics*. 1999;105(1-2):151-6.
37. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, et al. Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European journal of human genetics : EJHG*. 2004;12(2):87-92.
38. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*. 1999;281(3):249-54.
39. Hult M, Darin N, von Döbeln U, Mansson JE. Epidemiology of lysosomal storage diseases in Sweden. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 2014;103(12):1258-63.
40. Bame KJ, Rome LH. Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science (New York, NY)*. 1986;233(4768):1087-9.
41. Bame KJ, Rome LH. Acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for an active site histidine residue. *The Journal of biological chemistry*. 1986;261(22):10127-32.
42. Canals I, Soriano J, Orlandi JG, Torrent R, Richaud-Patin Y, Jimenez-Delgado S, et al. Activity and High-Order Effective Connectivity Alterations in Sanfilippo C Patient-Specific Neuronal Networks. *Stem cell reports*. 2015;5(4):546-57.
43. Canals I, Beneto N, Cozar M, Vilageliu L, Grinberg D. EXTL2 and EXTL3 inhibition with siRNAs as a promising substrate reduction therapy for Sanfilippo C syndrome. *Scientific reports*. 2015;5:13654.

44. Gomez-Grau M, Garrido E, Cozar M, Rodriguez-Sureda V, Dominguez C, Arenas C, et al. Evaluation of Aminoglycoside and Non-Aminoglycoside Compounds for Stop-Codon Readthrough Therapy in Four Lysosomal Storage Diseases. *PLoS one*. 2015;10(8):e0135873.
45. de Alencar DO, Netto C, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Ribeiro-dos-Santos Â, Pereira F, et al. Fabry disease: Evidence for a regional founder effect of the GLA gene mutation 30delG in Brazilian patients. *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 2014;1:414-21.
46. Diaz GA, Gelb BD, Risch N, Nygaard TG, Frisch A, Cohen IJ, et al. Gaucher disease: the origins of the Ashkenazi Jewish N370S and 84GG acid beta-glucosidase mutations. *American journal of human genetics*. 2000;66(6):1821-32.
47. Ruijter GJ, Valstar MJ, van de Kamp JM, van der Helm RM, Durand S, van Diggelen OP, et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Molecular genetics and metabolism*. 2008;93(2):104-11.
48. Fedele AO, Filocamo M, Di Rocco M, Sersale G, Lubke T, di Natale P, et al. Mutational analysis of the HGSNAT gene in Italian patients with mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C syndrome). *Mutation in brief #959*. Online. *Human mutation*. 2007;28(5):523.
49. Coutinho MF, Lacerda L, Prata MJ, Ribeiro H, Lopes L, Ferreira C, et al. Molecular characterization of Portuguese patients with mucopolysaccharidosis IIIC: two novel mutations in the HGSNAT gene. *Clinical genetics*. 2008;74(2):194-5.
50. Hartl DL, Ruvolo M. *Genetics: Analysis of Genes and Genomes*. 8 ed. Sudbury, Massachusetts: Jones & Bartlett Publisher; 2011.
51. Wright S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. 1931;16(2):97-159.
52. Griffiths AJF MJ, Suzuki DT. *An Introduction to Genetic Analysis. A synthesis of forces: variation and divergence of populations*. 7 ed. New York: W. H. Freeman; 2000.
53. Slatkin M. A population-genetic test of founder effects and implications for Ashkenazi Jewish diseases. *American journal of human genetics*. 2004;75(2):282-93.

54. Charlesworth B. Fundamental concepts in genetics: effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(3):195-205.
55. Hartl D, Clark A. *Principles of Population Genetics*. 3 ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc Published; 1997.
56. Thompson EA, Neel JV. Private polymorphisms: how many? How old? How useful for genetic taxonomies? *Molecular phylogenetics and evolution*. 1996;5(1):220-31.
57. Charlesworth D, Willis JH. The genetics of inbreeding depression. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(11):783-96.
58. Wright S. The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*. 1951;15(4):323-54.
59. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1973;70(12):3321-3.
60. Nei M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of human genetics*. 1977;41(2):225-33.
61. Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*. 1984;38(6):1358-70.
62. Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American journal of human genetics*. 1991;49(4):746-56.
63. Litt M, Luty JA. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*. 1989;44(3):397-401.
64. Eckert KA, Hile SE. Every microsatellite is different: Intrinsic DNA features dictate mutagenesis of common microsatellites present in the human genome. *Molecular carcinogenesis*. 2009;48(4):379-88.
65. Schlötterer C, Harr B. *Microsatellite Instability*. eLS: John Wiley & Sons, Ltd. Nature Publishing Group; 2001.

66. Oliveira EJ, Pádua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*. 2006;29:294-307.
67. Ellegren H. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature genetics*. 2000;24(4):400-2.
68. Levinson G, Gutman GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic acids research*. 1987;15(13):5323-38.
69. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews Genetics*. 2004;5(6):435-45.
70. Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(8):3166-70.
71. Ostrer H. A genetic profile of contemporary Jewish populations. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(11):891-8.
72. Arias-Valencia MM. Determinantes próximos de la fecundidad: comportamiento reproductivo de las indígenas Chamibida de Antioquia, Colombia. *Cadernos de Saúde Pública*. 2005;21:1087-98.
73. Ossa X, Bustos P, Muñoz S, Amigo H. Edad de menarquia y ascendencia indígena: Un estudio poblacional en Chile. *Revista médica de Chile*. 2012;140:1035-42.
74. Pozo J, Argente J. Delayed puberty in chronic illness. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2002;16(1):73-90.
75. Gluckman PD, Hanson MA. Changing times: the evolution of puberty. *Molecular and cellular endocrinology*. 2006;254-255:26-31.
76. Papadimitriou A. The Evolution of the Age at Menarche from Prehistorical to Modern Times. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*. 2016;29(6):527-30.
77. Westendorp RG, Kirkwood TB. Human longevity at the cost of reproductive success. *Nature*. 1998;396(6713):743-6.

78. Doblhammer G, Oeppen J. Reproduction and longevity among the British peerage: the effect of frailty and health selection. *Proceedings Biological sciences*. 2003;270(1524):1541-7.
79. Metcalf MG, Donald RA, Livesey JH. Classification of menstrual cycles in pre- and perimenopausal women. *The Journal of endocrinology*. 1981;91(1):1-10.
80. Metcalf MG, Skidmore DS, Lowry GF, Mackenzie JA. Incidence of ovulation in the years after the menarche. *The Journal of endocrinology*. 1983;97(2):213-9.
81. Vihko R, Apter D. Endocrine characteristics of adolescent menstrual cycles: impact of early menarche. *Journal of steroid biochemistry*. 1984;20(1):231-6.
82. Wood JW. Fecundity and natural fertility in humans. *Oxford reviews of reproductive biology*. 1989;11:61-109.
83. Wood JW, Weinstein M. A Model of Age-specific Fecundability. *Population Studies*. 1988;42(1):85-113.
84. Weinstein M, Wood JW, Stoto MA, Greenfield DD. Components of Age-Specific Fecundability. *Population Studies*. 1990;44(3):447-67.
85. Rodríguez-Cuenca JV. Las enfermedades en las condiciones de vida prehispanicas de Colombia. 1 ed. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Humanas. Departamento de Antropología. Guadalupe; 2006.
86. Lleras R. Arqueología del Alto Valle de Tenza. Bogotá, Colombia: Fundación de Investigaciones Arqueológicas Nacionales (FIAN) - Banco de la Republica; 1989.
87. Rodríguez-Cuenca JV. Los chibchas: hijos del sol, la luna y los Andes. Orígenes de su diversidad. 1 ed. Bogotá, Colombia: Instituto de Desarrollo Urbano (IDU): Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Humanas. Departamento de Antropología; 2011.
88. Martínez-Martín AF. Cultura y salud prehispanica. 1 ed. Tunja - Boyacá, Colombia: Academia Boyacense de Historia; 2010.
89. Castellanos J. Elegías de varones ilustres de indias. Santa Fe de Bogotá: Sic Editorial; 1997.

-
90. Silva-Celis E. Sobre Antropología Chibcha, Bogotá. Boletín Arqueológico. 1945;1(6):531-52.
 91. Silva-Celis E. Craneos de chiscas, Bogotá. Boletín arqueológico. 1946;2(2):46-60.
 92. Langabaek CH. Cuando los muisca diversificaron la agricultura y crearon el intercambio. 3 ed. Bogotá, Colombia: Boletín Cultural y Bibliográfico Banco de la República; 1985.
 93. Villate-Santander G. Tunja prehispanica - Estudio documental del asentamiento indígena en Tunja. 1 ed. Tunja-Boyacá, Colombia: Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia (UPTC) - Colciencias; 2001.
 94. Martínez-Martin AF, Alvarado-Guatibonza SV, Carvajal-Estupiñan JE. Aproximación histórica a la medicina y la salud pública de Tunja en el siglo XIX. 1 ed. Tunja-Boyacá, Colombia: Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia (UPTC). ; 2002.
 95. Colmenares G. La provincia de Tunja en el nuevo reino de Granada. 3 ed. Santa Fé de Bogotá: Tercer mundo editores; 1997.
 96. Paskulin DD, Giacomazzi J, Achatz MI, Costa S, Reis RM, Hainaut P, et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. PLoS one. 2015;10(11):e0143262.
 97. Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B. Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. American journal of human genetics. 1998;62(6):1408-15.
 98. Genin E, Tullio-Pelet A, Begeot F, Lyonnet S, Abel L. Estimating the age of rare disease mutations: the example of Triple-A syndrome. Journal of medical genetics. 2004;41(6):445-9.
 99. Matisse TC, Chen F, Chen W, De La Vega FM, Hansen M, He C, et al. A second-generation combined linkage physical map of the human genome. Genome research. 2007;17(12):1783-6.
 100. Myers S, Bottolo L, Freeman C, McVean G, Donnelly P. A fine-scale map of recombination rates and hotspots across the human genome. Science (New York, NY). 2005;310(5746):321-4.

101. Reeve JP, Rannala B. DMLE+: Bayesian linkage disequilibrium gene mapping. *Bioinformatics* (Oxford, England). 2002;18(6):894-5.
102. Rannala B, Bertorelle G. Using linked markers to infer the age of a mutation. *Human mutation*. 2001;18(2):87-100.
103. Borroni B, Bonvicini C, Galimberti D, Tremolizzo L, Papetti A, Archetti S, et al. Founder effect and estimation of the age of the Progranulin Thr272fs mutation in 14 Italian pedigrees with frontotemporal lobar degeneration. *Neurobiology of aging*. 2011;32(3):555.e1-8.
104. Winbo A, Diamant UB, Rydberg A, Persson J, Jensen SM, Stattin EL. Origin of the Swedish long QT syndrome Y111C/KCNQ1 founder mutation. *Heart rhythm*. 2011;8(4):541-7.
105. Casonato A, Daidone V, Barbon G, Pontara E, Di Pasquale I, Gallinaro L, et al. A common ancestor more than 10,000 years old for patients with R854Q-related type 2N von Willebrand's disease in Italy. *Haematologica*. 2013;98(1):147-52.
106. Caleca L, Putignano AL, Colombo M, Congregati C, Sarkar M, Magliery TJ, et al. Characterization of an Italian founder mutation in the RING-finger domain of BRCA1. *PloS one*. 2014;9(2):e86924.
107. Dusatkova P, Pruhova S, Borowiec M, Vesela K, Antosik K, Lebl J, et al. Ancestral mutations may cause a significant proportion of GCK-MODY. *Pediatric diabetes*. 2012;13(6):489-98.
108. Calderón-Schrader C. Atlas básico de historia de Colombia. 38 ed. Bogota, Colombia: Credencial Historia; 1993.
109. Fenner JN. Cross-cultural estimation of the human generation interval for use in genetics-based population divergence studies. *American journal of physical anthropology*. 2005;128(2):415-23.
110. Tremblay M, Vezina H. New estimates of intergenerational time intervals for the calculation of age and origins of mutations. *American journal of human genetics*. 2000;66(2):651-8.
111. Helgason A, Hrafnkelsson B, Gulcher JR, Ward R, Stefansson K. A populationwide coalescent analysis of Icelandic matrilineal and patrilineal genealogies: evidence for a faster evolutionary rate of mtDNA lineages than Y chromosomes. *American journal of human genetics*. 2003;72(6):1370-88.

112. Rojas KM, Roa M, Briceño I, Guaneme C, Gómez A. Polimorfismos de 17 marcadores STR del cromosoma-Y en una muestra poblacional del altiplano cundiboyacense. 2011;42:88-97.
113. Yunis JJ, Yunis EJ. Mitochondrial DNA (mtDNA) haplogroups in 1526 unrelated individuals from 11 Departments of Colombia. *Genet Mol Biol*. 2013;36(3):329-35.
114. Pachajoa H, Rodriguez CA. Mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy syndrome) in the pre-Columbian culture of Colombia. *Colombia medica (Cali, Colombia)*. 2014;45(2):85-7.
115. Bernal JE, Briceno I. Genetic and other diseases in the pottery of Tumaco-La Tolita culture in Colombia-Ecuador. *Clinical genetics*. 2006;70(3):188-91.
116. Manrique-Abril FG, Martínez-Martín AF, Meléndez-Álvarez BF. Defunciones en niños a principios de los siglos XX y XXI en Boyacá-Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2012;14:15-31.
117. Cornuet JM, Luikart G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*. 1996;144(4):2001-14.
118. Garza JC, Williamson EG. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular ecology*. 2001;10(2):305-18.
119. Velasco HM, Martin ÁM, Galvis J, Buelvas L, Sánchez Y, Umaña LA, et al. Genética clínica comunitaria: Exploración de patología genética en Boyacá, Colombia. *Revista de Salud Pública*. 2017;19:61-70.
120. Pinto-Cisternas J, Pineda L, Barraí I. Estimation of inbreeding by isonymy in Iberoamerican populations: an extension of the method of Crow and Mange. *American journal of human genetics*. 1985;37(2):373-85.
121. Crow JF, Mange AP. Measurement of inbreeding from the frequency of marriages between persons of the same surname. *Eugenics quarterly*. 1965;12(4):199-203.
122. Rodriguez Larralde A, Casique J. Genetic and demographic structure of the State of Aragua, Venezuela, estimated through the surnames. *Acta científica venezolana*. 1993;44(4):225-33.

123. Bedoya G, Garcia J, Montoya P, Rojas W, Amezquita ME, Soto I, et al. [Isonymy analysis between 2 populations in northwestern Colombia]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2006;26(4):538-45.
124. Pineda-Santís H, Arcos-Burgos M, Bravro-Ikguiarl ML. Aproximación a la estructura genética de la población de Granada, Antioquia (Colombia), a través de isonimia. *Actual Biol*. 1999;21(70):29-36.
125. Rodriguez-Larralde A, Barraí I. Isonymy structure of Sucre and Tachira, two Venezuelan states. *Human biology*. 1997;69(5):715-31.
126. Paradisi I, Ikonomu V, Arias S. Spinocerebellar ataxias in Venezuela: genetic epidemiology and their most likely ethnic descent. *Journal of human genetics*. 2016;61(3):215-22.
127. Pantoja-Melendez C, Ali M, Zenteno JC. An epidemiological investigation of a Forkhead box protein E3 founder mutation underlying the high frequency of sclerocornea, aphakia, and microphthalmia in a Mexican village. *Molecular vision*. 2013;19:1866-70.
128. Carranza C, Menendez I, Herrera M, Castellanos P, Amado C, Maldonado F, et al. A Mayan founder mutation is a common cause of deafness in Guatemala. *Clinical genetics*. 2015;89(4):461-5.
129. Kruglyak L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. *Nature genetics*. 1999;22(2):139-44.
130. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*. 2004;429(6990):446-52.
131. Peltonen L. Positional cloning of disease genes: advantages of genetic isolates. *Human heredity*. 2000;50(1):66-75.
132. Peltonen L, Palotie A, Lange K. Use of population isolates for mapping complex traits. *Nature reviews Genetics*. 2000;1(3):182-90.
133. Abbott WG, Winship IM, Gane EJ, Finau SA, Munn SR, Tukuitonga CE. Genetic diversity and linkage disequilibrium in the Polynesian population of Niue Island. *Human biology*. 2006;78(2):131-45.
134. Jenkins WD, Lipka AE, Fogleman AJ, Delfino KR, Malhi RS, Hendricks B. Variance in disease risk: rural populations and genetic diversity. *Genome*. 2016;59(7):519-25