

MARCADORES GENÉTICOS CON PREDISPOSICIÓN A ESCOLIOSIS IDIOPÁTICA DEL ADOLESCENTE.



Universidad de Valladolid

Facultad de Medicina



**FACULTAD
DE MEDICINA**

TRABAJO DE FIN DE GRADO 2019-2020

AUTOR: María Garay Llorente.

TUTOR: Juan José Tellería.

DEPARTAMENTO: Biología celular.

SERVICIO: Traumatología.

HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO.

Todo mi agradecimiento a **Juan José Tellería**,
tutor de este trabajo, por su paciencia y
dedicación en estos tiempos difíciles.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
PALABRAS CLAVE.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	3
MATERIAL Y MÉTODOS:	
• Recogida de muestras	4
• Genotipado con sondas KASP	4
• Análisis estadístico.....	9
RESULTADOS:	
• Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	10
• Resultados del estudio.....	10
DISCUSIÓN.....	12
CONCLUSIÓN.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	16
ANEXOS.....	19

RESUMEN.

La escoliosis idiopática del adolescente es una enfermedad compleja cuya prevalencia mundial es de aproximadamente un 2-3% (13). Varios estudios genéticos han demostrado que ciertos polimorfismos de genes muestran asociación con la etiología y desarrollo de la EIA. El conocimiento de estos nos ayudaría a conocer los pacientes en riesgo con el fin de realizar un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado. En este estudio se han analizado los genotipos de varios genes entre los pacientes con EIA y sus familiares comparándolos con los de la población española. Se han incluido a 90 pacientes diagnosticados y seleccionados en la Unidad de Columna del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y a 72 de sus progenitores. El genotipado se realizó mediante sondas KASP, esto se basa en una PCR con la utilización simultánea de cebadores específicos *forward*, en donde cada uno difiere en solo un nucleótido y reconoce uno de los alelos. Una vez obtuvimos los datos, procedimos a determinar si las frecuencias genotípicas observadas eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Las diferencias entre las distribuciones alélicas y genotípicas entre pacientes y población control fue comparada mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para cada polimorfismo. Encontramos diferencias entre sujetos con EIA y controles en dos de los estudiados: polimorfismo para el gen VDR (rs1544410) y polimorfismo para el gen TGFB1 (rs1800469), lo que significa que estos polimorfismos se asocian en nuestra población a una mayor susceptibilidad a presentar EIA. En el caso de los progenitores, el estudio de ambos polimorfismos no fue significativo, lo que sugiere un desequilibrio en la transmisión que confirmaría los hallazgos.

PALABRAS CLAVE.

Escoliosis, genética, polimorfismo, predisposición.

INTRODUCCIÓN.

La escoliosis es una deformidad común de la columna y afecta tanto a niños y a adolescentes, sanos durante la fase de crecimiento, como a adultos (1). Esta patología puede ser de etiología hereditaria, estar relacionada con una causa neuromuscular, con algún síndrome o ser consecuencia de la progresión de una deformidad anterior (3). El tipo más común de escoliosis es el idiopático, ya que en un 80% de los casos la causa es desconocida, a pesar de que factores hereditarios y genéticos parecen desempeñar un papel relevante (1,11).

En la mayor parte, estas enfermedades están causadas por una combinación de factores genéticos, ambientales y de estilo de vida, la mayoría de los cuales no han sido identificados aún. Probablemente se trata de una enfermedad poligénica influenciada por genes relacionados con la composición y regulación del desarrollo de los tejidos humanos, que actúan en el soporte de la columna. El interés del estudio de los polimorfismos de estos genes se deriva de su potencial para identificar individuos con alto riesgo de escoliosis idiopática del adolescente (EIA), de su potencial valor pronóstico y evolutivo y de su utilidad para poner en evidencia los mecanismos patogénicos subyacentes (2).

La curva de la escoliosis progresa durante el crecimiento de la columna, y se clasifica en tres categorías dependiendo de la edad en la que aparece: infantil (antes de los tres años), juvenil (entre los 3 y 10 años o al inicio de la pubertad) y del adolescente (después de los 10 años o de la pubertad) (10). La más común y menos conocida es la escoliosis idiopática del adolescente. Esta patología se define como la desviación lateral de la columna, asociada a la rotación de las vértebras en un sujeto sano sin ninguna causa conocida de la deformidad. Estos pacientes no tienen ninguna enfermedad, ni alteraciones neurológicas ni musculares (3).

Las manifestaciones clínicas son variables: el ápex de la curva mayor puede ser torácica, toracolumbar o lumbar y la convexidad puede ser derecha o izquierda, con curvas compensatorias por encima y por debajo. La forma más común es una convexidad torácica derecha con una convexidad lumbar izquierda compensatoria (7). Generalmente esta deformidad se presenta como una joroba, visible al flexionarse hacia delante, junto con una asimetría de hombros y cadera. El diagnóstico de confirmación se realiza mediante una radiografía de raquis completo en bipedestación, donde la curvatura lateral de la columna excede los 10° de Cobb (1,5).

El mayor desafío es identificar a los individuos afectados, ya que la gran variabilidad en la presentación de esta enfermedad hace que el diagnóstico sea difícil con tan solo medir la deformidad con el método Cobb (2).

La opción de tratamiento de la escoliosis idiopática del adolescente incluye observación, ortopedia y cirugía. Para los pacientes que tienen inmadurez ósea, está considerada la observación en curvas de menos de 25°, el tratamiento ortopédico para curvas de entre 25 y 45°, y el quirúrgico para curvas de más de 45° (12).

La mayoría de los individuos presentan pequeñas curvaturas y afectan tanto a mujeres como a hombres. Aproximadamente un 10% progresan a una curva moderada o severa, de los cuales, menos de un 10% son hombres (6). Por lo que además se debería considerar que ciertos grupos son más susceptibles, como las mujeres y los caucásicos (2).

El comienzo a una edad temprana, la presentación de una curva larga, una curva torácica, y la inmadurez del esqueleto axial, aumentan la probabilidad de progresión (8). Cuando un individuo finaliza su crecimiento, el riesgo de progresión disminuye. En la madurez del esqueleto, curvas de menos de 30° presentan poco riesgo de progresión; mientras que curvas que llegan a 50° tienden a continuar progresando hasta la edad adulta, aproximadamente 1° al año (9).

Una de las mayores dificultades en el tratamiento de la EIA es la ausencia de medios fiables para predecir el riesgo de progresión, lo que lleva a seguimientos y radiografías frecuentes y a tratamientos ortopédicos potencialmente innecesarios. Un mayor conocimiento de la patogénesis y genética en la escoliosis idiopática podría ayudar a identificar a los individuos en riesgo, lo que llevaría a un diagnóstico precoz y a mejores opciones preventivas y terapéuticas (1,4).

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.

El objetivo de nuestro estudio ha sido identificar polimorfismos de algunos genes candidatos, implicados en la progresión de la escoliosis idiopática del adolescente, con el fin de identificar a los individuos en riesgo. Para ello se han analizado los genotipos de seis polimorfismos entre los pacientes con EIA y sus familiares comparándolos con los de la población general.

MATERIAL Y MÉTODOS.

En este estudio se han incluido a 90 mujeres con EIA diagnosticadas y seleccionadas en la Unidad de Columna del Hospital Clínico Universitario de Valladolid y a 72 de sus progenitores. La recogida de muestras se realizó tras la obtención de su consentimiento informado (ANEXO), de acuerdo a los estándares legales Españoles y tras ser aprobado por el comité ético del hospital.

Los datos de la población control proceden de la base de datos Ensembl donde tomamos los precedentes del subgrupo IBS (Iberian population in Spain) para cada polimorfismo.

Recogida de muestras.

El DNA de los pacientes se extrajo a partir de sangre entera anticoagulada con EDTA mediante el sistema automatizado MagNA Pure de Roche®. Este es un sistema clínico de extracción de ácidos nucleicos totalmente automatizado que proporciona una automatización sin necesidad de supervisión, diseñado para reducir la intervención del usuario y la variabilidad entre extracciones.

Una vez extraído el DNA se hicieron diluciones (15µL de agua + 3µL de DNA) y se almacenaron en tubos hasta su futura utilización.

Genotipado con sondas KASP.

Esta técnica permite genotipar polimorfismos que difieren tan solo en un nucleótido (SNP), tiene una precisión mayor del 99,8%, y según el manual del fabricante bastan entre 0,1 y 10ng de DNA genómico. Se siguieron las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones (14,15)

La técnica se basa en una PCR con la utilización simultánea de cebadores específicos *forward*, en donde cada uno difiere en solo un nucleótido y reconoce uno de los alelos. Cada uno de ellos contiene en el extremo 5' una secuencia idéntica a una sonda, la cual está marcada con el fluorocromo HEX o con el FAM. El cebador *reverse* es universal. Las sondas marcadas están incluidas en la master mix y van unidas a un *quencher* para evitar que emita fluorescencia si no está unido a la secuencia específica (**Figura 1**).

En el primer ciclo, se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 94°C y los cebadores se unen a la secuencia complementaria de DNA genómico a 65°C: el cebador *forward*

específico a una hebra y el cebador *reverse* universal a la otra. Una vez unidos, la polimerasa elongará la cadena a partir de la hebra molde (**Figura 2**).

En el segundo ciclo se desnaturaliza la doble hebra de DNA a 94°C, y vuelven a unirse los cebadores a 65°C, en donde el cebador *reverse* universal se unirá al fragmento elongado por el primer *forward* específico del primer ciclo. La hebra amplificada por el cebador *reverse* contiene en su extremo 3' la secuencia complementaria de la sonda marcada (**Figura 3**).

En el tercer ciclo, se desnaturaliza de nuevo la doble hebra de DNA a 94°C y a 65°C, la sonda marcada liberada del *quencher*, se une a su secuencia complementaria que ya se ha señalado (**Figura 4**).

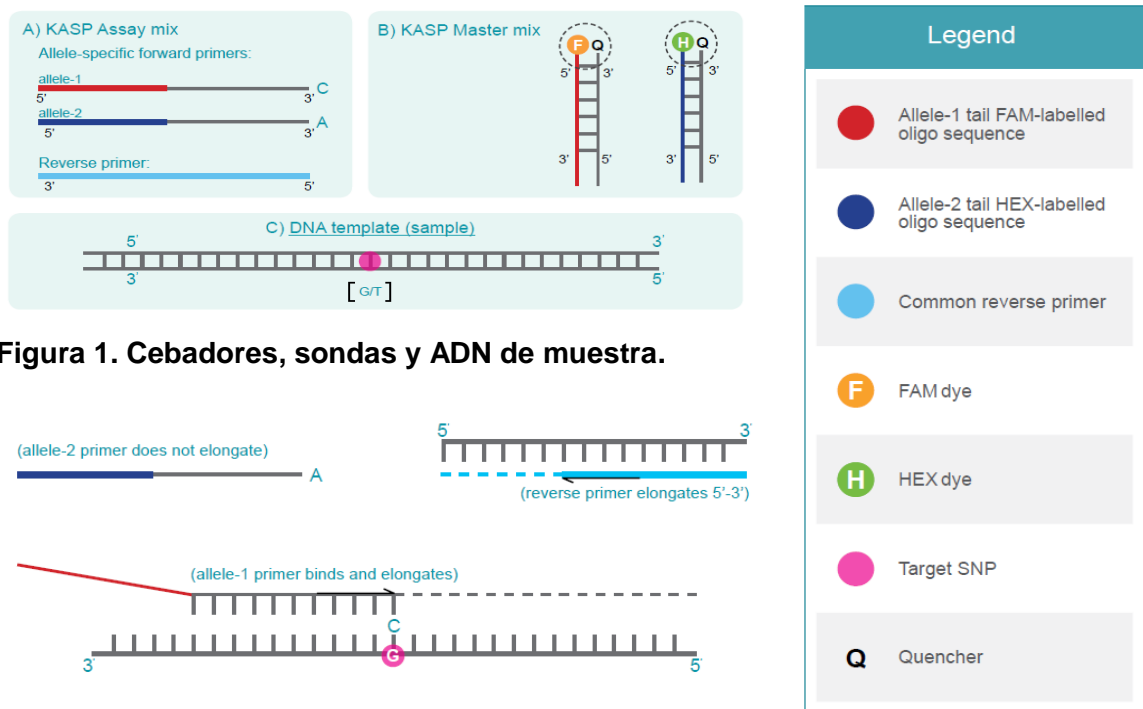


Figura 1. Cebadores, sondas y ADN de muestra.

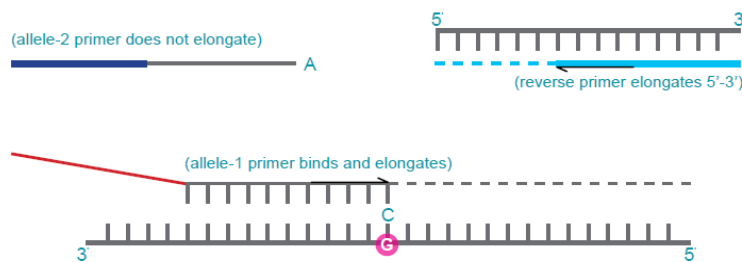


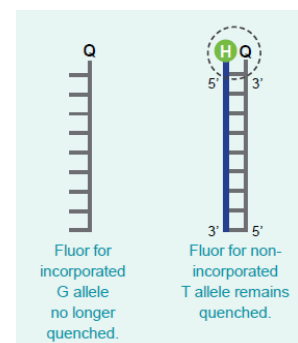
Figura 2. Primer ciclo de PCR con sondas KASP.



Figura 3. Segundo ciclo de PCR.



Figura 4. Tercer ciclo de PCR.



En los siguientes ciclos se amplifica el fragmento unido con el fluorocromo, aumentando la fluorescencia y de esta manera, determinando el polimorfismo.

Se deben analizar los 6 polimorfismos en cada paciente y cada progenitor.

Para ello, se utilizan hojas preparadas para indicar qué contiene cada pocillo de las placas blancas “FrameStar® 480/96 for Roche Lightcycler 480” de 96 pocillos, donde se pone la muestra y el polimorfismo estudiado (**Figura 5**).

Experiment: ESCOLIOSIS rs4782809 → **POLIMORFISMO UTILIZADO.**

Scientist: _____

Date: 14 NOVIEMBRE 2019 → **FECHA DE VISUALIZACIÓN DE RESULTADOS.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
B	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110
C	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122
D	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
E	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146
F	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158
G	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
H	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182

→ **NÚMERO DE LA MUESTRA.**

Figura 5. Ficha cumplimentada con el número de la muestra en el pocillo, el polimorfismo utilizado y la fecha de visualización de los resultados.

Preparación de la mix de trabajo por pocillo:

- ✓ Mix del kit comercial (dNTPs, polimerasa y sondas) → 3µL.
- ✓ Agua → 2µL.
- ✓ Mezcla de cebadores → 0,1µL.

Una vez preparada la mix de trabajo se añaden 5,1 µL por pocillo, además de 1µL de ADN (200 ug/uL) de las muestras a estudiar en el pocillo correspondiente. Se mezclan bien con la micropipeta.

Cuando se acaban de rellenar todos los pocillos que vamos a utilizar, se procede a precintar la placa con un pegatina transparente de Roche, “LightCycler® 480 Sealing Foil”, para después centrifugar las placas, dándole tan solo un spin.

Una vez realizado esto se hace la reacción de PCR específica usando el termociclador según el siguiente protocolo (**Figura 6**):

- 94°C, 15 minutos.
- 94°C, 20 segundos y 65°C, 1 minuto, 10 veces.
- 94°C, 20 segundos y 57°C, 1 minuto, 40 veces.
- 4°C, todo el tiempo que esté hasta que se recojan las muestras.

Realizada la PCR, se conserva la placa a -20°C overnight, ya que se ha comprobado que se obtienen mejores lecturas si se realiza de esta forma, si no fuese así, se podría realizar la reacción de PCR y el análisis en el mismo aparato (**Figura 6**).



Figura 6. Termociclador utilizado (imagen izquierda). Termociclador LightCycler 480® (imagen derecha).

La lectura de los resultados se realizó en un termociclador LightCycler 480®, según el siguiente protocolo:

- ✓ Modo de adquisición: sencillo.
- ✓ Rampa: 4,4°C/s.
- ✓ Formato de detección: Dual Hydrolysis Probe/ UPL Probe.
- ✓ Modo de análisis: Cuantificación.
- ✓ Lectura: Mantener 20 segundos a 37°C y a continuación medir la absorbancia de:
 - FAM 465-510nm.
 - HEX 533-580nm.

Cuando introducimos la placa en el termociclador LightCycler 480®, seleccionamos los pocillos a analizar y el polimorfismo a estudiar.

La medida de la absorbancia asigna los alelos (en homo o heterocigosis) en función de la fluorescencia emitida por FAM y/o HEX (**Figura 7**).

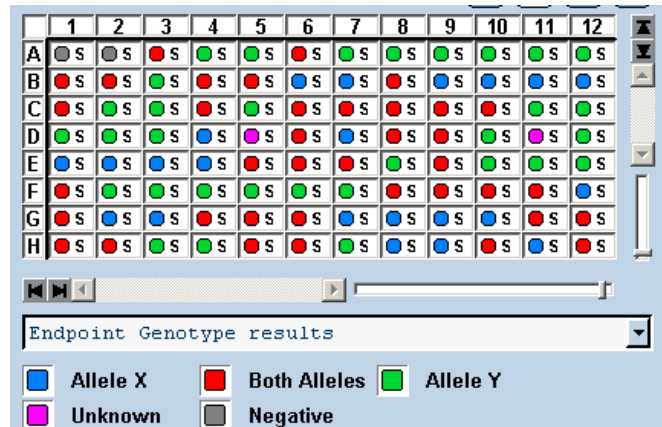


Figura 7. Asignación de muestras como FAM, HEX, BOTH, desconocido o control negativo en cada pocillo de la placa.

Una vez hecho esto, el programa elabora una gráfica:

- En el eje de abscisas coloca las muestras FAM, donde los dos cromosomas homólogos contengan la misma secuencia. Homocigotos para FAM.
- En el eje de ordenadas coloca las muestras HEX, donde los dos cromosomas homólogos contengan la misma secuencia. Homocigotos para HEX.
- En la recta bisectriz, entre la ordenada y la abscisa, se colocan los que tengan un cromosoma con un nucleótido y el homólogo con otro distinto. Heterocigotos.

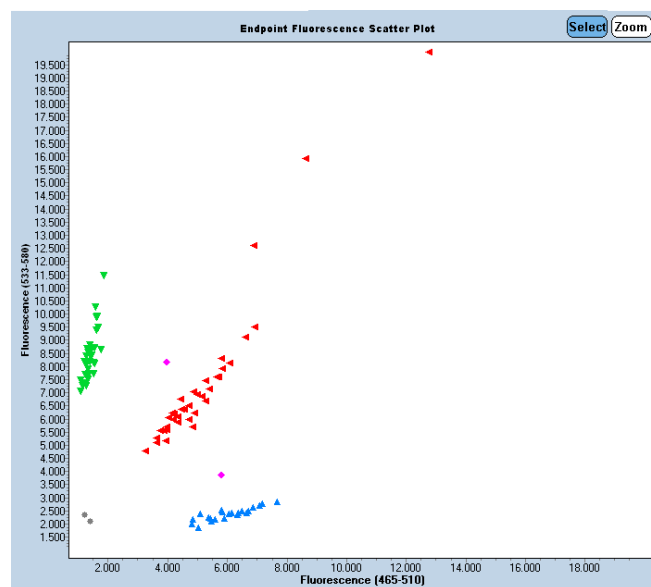


Figura 8. Gráfica representando las muestras según su fluorescencia. Verde: homocigotos HEX, Rojo: heterocigotos, Azul: homocigotos FAM, Gris: controles negativos.

La asignación de las muestras a los diversos genotipos de cada polimorfismo es revisada por el investigador. Se introducen controles negativos para identificar la fluorescencia de fondo.

A continuación se indican, los 6 polimorfismos estudiados, el gen en el que se encuentran, su secuencia de referencia y la posición en el cromosoma.

Tabla 1. Polimorfismos utilizados.

SNP	GEN	SECUENCIA DE REFERENCIA	POSICIÓN
rs1544410	VDR	NG_008731.1:g.63980G>A	12q13.11
rs1800469	TGFB1	NG_013364.1:g.4536T>C	19q13.2
rs7975232	VDR	NC_000012.12:g.47845054C>A	12q13.11
rs17044552		NC_000002.12:g.22994301G>A	2p24.1
rs4782809	CDH13	NC_000016.10:g.83519274C>G	16q23.3
rs11190870	LBX1	NC_000010.11:g.101219450T>C	10q24.32

Análisis estadístico.

Previo al estudio de relación entre los polimorfismos y el riesgo de escoliosis, se comprobó si todos los SNPs se encontraban en Equilibrio de Hardy-Weinberg para cada grupo de riesgo estudiado. El test de equilibrio de Hardy-Weinberg es un modelo teórico para valorar la genética de poblaciones, analiza las frecuencias genotípicas en una población con ciertas características.

Se elaboró un archivo Excel con los datos codificados. Los datos se compararon con tablas de contingencia utilizando el test de Chi cuadrado (comparación de grupos) con el fin de calcular la posible relación entre los polimorfismos estudiados y el riesgo de padecer EIA empleando la aplicación web de VassarStats (<http://vassarstats.net/newcs.html>).

Con la obtención del valor de p, determinamos las diferencias en la distribución genotípica y alélica entre los distintos grupos (pacientes/progenitores y la población general). Los valores **p<0.05** se consideraron significativos.

RESULTADOS.

Primero genotipamos a estos individuos a estudio con la técnica de sondas KASP y con los resultados del análisis de laboratorio procedimos a calcular las frecuencias alélicas y genotípicas. Se realizó este proceso para cada polimorfismo.

Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Una vez obtuvimos los datos de las frecuencias alélicas y genotípicas, hicimos una Chi-cuadrado (X^2) para determinar si las frecuencias genotípicas observadas eran consistentes con el equilibrio de Hardy-Weinberg. Todos los polimorfismos se encontraron en equilibrio.

Resultados del estudio.

A continuación se muestran las frecuencias genotípicas obtenidas en nuestro grupo a estudio para los diferentes polimorfismos, en comparación con la población española (frecuencia esperada):

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los diferentes polimorfismos.

SNP	rs1544410			rs1800469			rs11190870		
	GG	GA	AA	CC	CT	TT	TT	CT	CC
FRECUENCIA OBTENIDA PACIENTES	45.55%	47.77%	6.66%	54.54%	37.5%	7.95%	35.55%	53.33%	11.11%
FRECUENCIA OBTENIDA PROGENITORES	32.86%	51.42%	15.71%	50.75%	40.3%	8.96%	30.56%	50%	19.44%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	30.84%	50.47%	18.69%	36.45%	50.47%	13.08%	28.97%	49.53%	21.5%

SNP	rs7975232			rs17044552			rs4782809		
	TT	TG	GG	GG	AG	AA	GG	CG	CC
FRECUENCIA OBTENIDA PACIENTES	31.17%	45.45%	23.38%	95.45%	4.54%	0%	26.44%	48.28%	25.29%
FRECUENCIA OBTENIDA PROGENITORES	21.31%	49.18%	29.5%	93.55%	6.45%	0%	26.09%	49.28%	24.64%
FRECUENCIA ESPERADA (CONTROL)	37.38%	39.25%	23.37%	96.26%	3.74%	0%	23.36%	53.27%	23.36%

En el caso del polimorfismo rs17044552 podemos observar que no hay homocigotos AA para ninguno de los grupos, por lo que no se puede realizar ninguna comparación entre los diferentes grupos.

Las diferencias entre las distribuciones alélicas y genotípicas entre pacientes y población control fue comparada mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) para cada polimorfismo. También realizamos este procedimiento con los progenitores. Todos los resultados se muestran en el ANEXO.

En cuatro polimorfismos (rs4782809, rs7975232, rs11190870, rs17044552) los resultados fueron no significativos, lo que significa que no había diferencias entre los pacientes y la población control.

Se encontraron diferencias significativas en las siguientes comparaciones:

Tabla 3. Polimorfismos significativos en pacientes con EIA. No se muestran los polimorfismos no significativos.

		PACIENTES VS POBLACIÓN	PROGENITORES VS POBLACIÓN	
POLIMORFISMO rs 1544410	Frecuencia alélica alelo G y alelo A	p=0,0088	p>0,05	
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia GG, GA, AA	p=0,0162	p>0,05
		Hipótesis dominancia GG=GA, AA	p=0,023	p>0,05
		Hipótesis recesividad GG, GA=AA	p=0,048	p>0,05
POLIMORFISMO rs 1800469	Frecuencia alélica alelo C y alelo T	p=0,0205	p>0,05	
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia CC, CT, TT	p=0,038	p>0,05
		Hipótesis dominancia CC=CT, TT	p > 0,05	p>0,05
		Hipótesis recesividad CC, CT=TT	p=0,0171	p>0,05

El polimorfismo rs1544410, localizado en el gen del receptor para la vitamina D (VDR), mostró diferencias en la comparación entre pacientes y controles en todas las hipótesis.

- En la comparación de las frecuencias alélicas observamos que el alelo G era más frecuente en pacientes.
- En la comparación de las frecuencias genotípicas resultó que p era significativa tanto en la hipótesis de dominancia como en la hipótesis de recesividad, por lo que se concluye que existe codominancia para este polimorfismo (esta hipótesis también ha sido significativa).

El polimorfismo rs1800469, localizado en el gen del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), mostró diferencias en la comparación entre pacientes y controles:

- En la comparación de las frecuencias alélicas observamos que el alelo C era más frecuente en pacientes.
- En la comparación de las frecuencias genotípicas resultó que p era significativa en la hipótesis de recesividad.

En el caso de los progenitores, el estudio de ambos polimorfismos no fue significativo, lo que nos hace pensar que hay un desequilibrio en la transmisión.

DISCUSIÓN.

Nuestro objetivo ha sido obtener un mayor conocimiento sobre la predisposición genética de la EIA con el fin de identificar a individuos en riesgo, puesto que tiene una importante influencia en las condiciones físicas y psicológicas de los pacientes así como en su carga social, lo que hace que un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado sean esenciales. Varios estudios genéticos han demostrado que ciertos polimorfismos muestran una fuerte asociación con la etiología y desarrollo de la escoliosis idiopática del adolescente.

En el caso del polimorfismo rs17044552 podemos observar que debido a que la frecuencia alélica de A no es suficiente en ninguno de los casos, no fue posible el estudio de este polimorfismo en la población española. Sin embargo, en un estudio de asociación de genoma completo (GWAS) en la población china sí que encontraron diferencias significativas, sugiriendo una asociación entre el desarrollo de EIA y este polimorfismo (36).

En cuanto al polimorfismo rs4782809 para el gen CDH13, un metaanálisis sobre varios GWAS (37) sugiere un mayor riesgo de desarrollo de EIA en mujeres. A pesar de ello, en nuestro estudio no hallamos diferencias significativas entre pacientes y la población española.

En el caso del polimorfismo rs11190870 para el gen LBX1, un GWAS en la población japonesa y un estudio a gran escala de la población europea concluyeron que este gen estaba significativamente asociado con el desarrollo y la susceptibilidad de EIA (27-29). A pesar de ello, la comparación no fue significativa en nuestro estudio lo que sugiere que el gen LBX1 no está asociado a EIA para los diferentes grupos en nuestra población.

En el caso del polimorfismo rs7975232 para el gen VDR, a pesar de que un estudio en la población asiática comprobó que gen se relacionaba con la etiología y desarrollo de EIA (25), en nuestra población esta comparación no fue significativa.

Es cierto que se necesitan estudios más completos para confirmar esto, con muestras más grandes y estudios funcionales concluyentes (26).

El polimorfismo rs1544410 perteneciente al gen VDR mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EIA y el grupo de población control en lo que respecta a la frecuencia alélica. En el grupo de pacientes, el alelo G fue más frecuente con respecto al grupo de población lo que significa que tener este alelo incrementa el riesgo de presentar EIA. Además, las diferencias en las frecuencias genotípicas también fueron significativas en la hipótesis de codominancia., lo que significa que el alelo G se comporta como un rasgo cuantitativo, es decir, cuantas más copias de este alelo mayor es el riesgo de presentar EIA.

El VDR parece ser el producto de un solo gen que codifica el receptor para metabolitos de la vitamina D y que se localiza en el cromosoma 12 q12-14 (21,22). Este receptor, es un contribuyente fundamental en la función biológica de la vitamina D y juega un papel relevante tanto en la regulación de la densidad ósea como en el metabolismo y desarrollo del esqueleto (23,24). También en varios sistemas como el inmune, neurológico, epitelial y el musculoesquelético (32). La importancia de los polimorfismos de este gen está aumentando la susceptibilidad a muchas enfermedades, tales como el lupus eritematoso sistémico, osteoporosis y la artritis reumatoide (31-35).

El polimorfismo rs1800469 perteneciente al gen TGFB1, mostró diferencias significativas entre el grupo de pacientes con EIA y el grupo de población control en lo que respecta a la frecuencia alélica. En el grupo de pacientes, el alelo C fue más

frecuente con respecto al grupo de población, lo que significa que tener este alelo incrementa el riesgo. Además, las diferencias en las frecuencias genotípicas también fueron significativas en la hipótesis de recisividad para el alelo T por lo que se concluye que el alelo T es dominante como protector. Esto significa que el riesgo de padecer EIA aumenta en homocigosis, en pacientes que presentan CC.

TGFB1 es una citokina multifuncional que podría afectar a una variedad de procesos fisiológicos, incluyendo tanto la proliferación celular como la diferenciación, formación y degradación de proteínas de la matriz extracelular (18). Mutaciones en la familia de genes TGFB pueden conducir a formas sindrómicas de escoliosis tales como el síndrome de Marfan o el síndrome de Loeys Dietz (16,17). Por lo tanto, es posible que variantes comunes del TGFB1 puedan ser asociados con la escoliosis idiopática del adolescente a través de un camino similar (20).

El gen TGFB1 puede ser un predictor de la predisposición a EIA. Lo que es más, puede también ser un gen modificante de EIA, desde que se encontró que estaba relacionado con la edad de presentación y con la severidad de la curva (30). En estudios previos, un irregular aumento de la expresión de TGFB1 en los cartílagos articulares fue detectada en el lado cóncavo de la curva de escoliosis, comparado con el lado convexo. La diferencia de expresión de TGFB1 entre ambos lados de la curva podría estar implicada en la progresión de la curva (31), por lo que se podría usar para guiar a un tratamiento adecuado.

En el caso de los progenitores, el estudio de ambos polimorfismos no fue significativo, lo que nos hace pensar que hay un desequilibrio en la transmisión. Esto confirma que el alelo que se encuentra aumentado en los pacientes sugiere un riesgo para padecer EIA.

CONCLUSIÓN.

Existen factores genéticos que predisponen a la escoliosis idiopática del adolescente, lo que va a ser de ayuda a la hora de identificar individuos en riesgo y realizar un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado a cada caso.

Existe asociación entre los polimorfismos para el gen VDR (rs1544410) y TGFB1 (rs1800469) y la escoliosis idiopática del adolescente, por lo que juegan un papel importante en la etiología y desarrollo de esta patología y representan un marcador de predisposición a la EIA en nuestra población.

Otros polimorfismos estudiados fueron descartados por no mostrar diferencias entre los grupos a estudio. A pesar de ello, concluimos que es necesario continuar realizando estudios más completos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Grauers A, Einarsdottir E, Gerdhem P. Genetics and pathogenesis of idiopathic scoliosis. *Scoliosis and Spinal Disorders*. 2016; 11(1), 1–7.
2. Wajchenberg M, Astur N, Kanas M, Martins D E. Adolescent idiopathic scoliosis: current concepts on neurological and muscular etiologies. *Scoliosis and Spinal Disorders*. 2016; 11(1), 9–13.
3. Ikegawa S. Genomic study of adolescent idiopathic scoliosis in Japan. *Scoliosis and Spinal Disorders*. 2016; 11(1), 4–6.
4. Bohl DD, Telles CJ, Ruiz FK, Badrinath R, DeLuca PA, Grauer JN. A genetic test predicts brace success for adolescent idiopathic scoliosis when failure is defined as progression to > 45 degrees. *Clinical Spine Surgery*. 2016; 29(3), E146–E150.
5. Cobb J. Technique for study of scoliosis. W P Blount AAoOS ed AAOS Instructional Course Lectures. Ann Arbor: J. Edwards Inc; 1948. p. 261–75.
6. Montgomery F, Willner S. The natural history of idiopathic scoliosis. A study of the incidence of treatment. *Spine*. 1988; 13(4):401–4.
7. Wu L, Qiu Y, Wang B, Zhu ZZ, Ma WW. The left thoracic curve pattern: a strong predictor for neural axis abnormalities in patients with "idiopathic" scoliosis. *Spine*. 2010; 35 (2):182–5.
8. Lonstein JE, Carlson JM. The prediction of curve progression in untreated idiopathic scoliosis during growth. *J Bone Joint Surg Am*. 1984; 66(7):1061–71.
9. Weinstein SL, Zavala DC, Ponseti IV. Idiopathic scoliosis: long-term follow-up and prognosis in untreated patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1981; 63(5):702–12.
10. Lonstein JE. Adolescent idiopathic scoliosis. *Lancet*. 1994; 344(8934):1407–12.
11. Ueno M, Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shintani R, et al. A 5-year epidemiological study on the prevalence rate of idiopathic scoliosis in Tokyo: school screening of more than 250,000 children. *J Orthop Sci*. 2011; 16(1):1–6.
12. Newton P. Adolescent idiopathic scoliosis monograph series. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2004. p. 23–8.
13. Rogala EJ, Drummond DS, Gurr J. Scoliosis: incidence and natural history. A prospective epidemiological study. *J Bone Joint Surg Am*. 1978; 60(2):173–6.
14. KASP genotyping [Internet]. LGC, Biosearch Technologies. 2014 [citado 25 abril 2020]. Disponible en: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/kasp-explanation-fact-sheet.pdf>
15. Guide to running KASP genotyping reactions on the Roche LC480-Series instruments [Internet]. LGC, Biosearch Technologies. 2015 [citado 25 abril 2020].

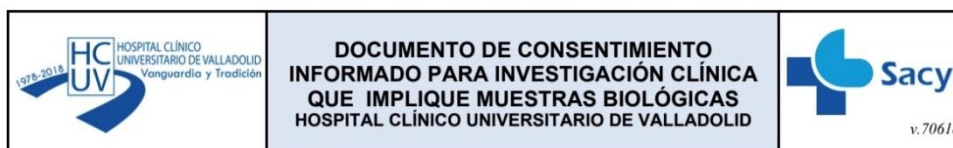
Disponible en: <https://biosearch-cdn.azureedge.net/assetsv6/running-KASP-on-Roche-LC480.pdf>

16. Rienhoff HJ, Yeo CY, Morissette R, Khrebtukova I, Melnick J, Luo S, et al. A mutation in TGFB3 associated with a syndrome of low muscle mass, growth retardation, distal arthrogryposis and clinical features overlapping with Marfan and Loeys-Dietz syndrome. *Am J Med Genet A*. 2013; 161A:2040–6.
17. Kuechler A, Altmuller J, Nurnberg P, Kotthoff S, Kubisch C, Borck G. Exome sequencing identifies a novel heterozygous TGFB3 mutation in a disorder overlapping with Marfan and Loeys-Dietz syndrome. *Mol Cell Probes*. 2015. doi:10.1016/j.mcp.2015.07.003.
18. Ingman WV, Robertson SA. The essential roles of TGFB1 in reproduction. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20:233–9.
19. Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression of fibronectin and TGF-beta1 mRNA and protein suggest altered regulation of extracellular matrix in degenerated disc tissue. *Eur Spine J*. 2005; 14:17–26.
20. Xu L, Sun W, Qin X, Qiu Y, Zhu Z. The TGFB1 gene is associated with curve severity but not with the development of adolescent idiopathic scoliosis: a replication study in the Chinese population. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2016; 17(1), 15–19. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-0863-8>
21. Wang W, Ma J, Li SY, et al. Advance on genetic mechanism of adolescent idiopathic scoliosis and genetic relationship map. *Zhongguo Gu Shang* 2015; 28:854–60.
22. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, et al. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004; 338:143–56.
23. Xu G, Mei Q, Zhou D, et al. Vitamin D receptor gene and aggrecan gene polymorphisms and the risk of intervertebral disc degeneration: a metaanalysis. *PLoS One* 2012; 7:e50243.
24. Martirosyan NL, Patel AA, Carotenuto A, et al. Genetic alterations in intervertebral disc disease. *Front Surg*. 2016; 3:59.
25. Yin X, Wang H, Guo J, Zhang L, Zhang Y, Li L, Hou S. Association of Vitamin D receptor Bsm1 rs1544410 and Apal rs7975232 polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis: a systematic review and meta-analysis. *Medicine (United States)*. 2018; 97(2). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009627>
26. Gao W, Peng Y, Liang G, Liang A, Ye W, Zhang L, Sharma S, Su P, Huang D. Association between Common Variants near LBX1 and Adolescent Idiopathic Scoliosis Replicated in the Chinese Han Population. *PLoS ONE*. 2013; 8(1), 31–33. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053234>

27. Takahashi Y, Kou I, Takahashi A, Johnson TA, Kono K, Kawakami N, et al. A genome-wide association study identifies common variants near *LBX1* associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2011; 43:1237–40.
28. Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, et al. Genetic variants in *GPR126* are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat Genet.* 2013; 45:676–9.
29. Grauers A, Wang J, Einarsdottir E, Simony A, Danielsson A, Akesson K, et al. Candidate gene analysis and exome sequencing confirm *LBX1* as a susceptibility gene for idiopathic scoliosis. *Spine J.* 2015; 15:2239–46.
30. Ryzhkov II, Borzilov EE, Churnosov MP, Ataman AP, Dedkov AA, Polonikov AP. Transforming Growth Factor Beta 1 is a Novel Susceptibility Gene for Adolescent Idiopathic Scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013; 12:E699–704.
31. Xu H, Qiu G, Wu Z, Wang Y, Zhang J, Liu Y, et al. Expression of transforming growth factor and basic fibroblast growth factor and core protein of proteoglycan in human vertebral cartilaginous endplate of adolescent idiopathic scoliosis. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005; 30:1973–8.
32. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, et al. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res* 1998; 13:325–49.
33. Hu W, Niu G, Lin Y, et al. Impact of the polymorphism in vitamin D receptor gene *BsmI* and the risk of systemic lupus erythematosus: an updated meta-analysis. *Clin Rheumatol* 2016; 35:927–34.
34. Wu J, Shang DP, Yang S, et al. Association between the vitamin D receptor gene polymorphism and osteoporosis. *Biomed Rep* 2016; 5:233–6.
35. Song GG, Bae SC, Lee YH. Vitamin D receptor *FokI*, *BsmI*, and *TaqI* polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis: a metaanalysis. *Z Rheumatol* 2016; 75:322–9.
36. Xu L, Qin X, Sun W, Qiao J, Qiu Y, Zhu Z. Replication of Association Between 53 Single-Nucleotide Polymorphisms in a DNA-Based Diagnostic Test and AIS Progression in Chinese Han Population. *Spine.* 2016; 41(4):306-10.
37. Khanshour AM, Kou I, Fan Y, Einarsdottir E, Makki N, Kidane YH, et al. Genomewide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci. *Hum Mol Genet.* 2018; 27(22):3986-98.

ANEXOS.

- **Consentimiento informado.**



**DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE
MUESTRAS BIOLÓGICAS. MENORES DE 12 AÑOS
HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID**

SERVICIO:

INVESTIGADOR RESPONSABLE:

TELÉFONO DE CONTACTO:

EMAIL:

NOMBRE DE LA LÍNEA DE TRABAJO:

VERSIÓN DE DOCUMENTO: (Número de versión, fecha):

I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:

I) Finalidad de la línea de trabajo propuesta:

La influencia de los factores genéticos en el desarrollo y evolución de la escoliosis es sospechada desde hace tiempo si bien en la actualidad dichos datos no presentan consistencia. La posibilidad de tener una vía de investigación que pueda contribuir en alguna medida a aclarar dicha influencia es altamente importante para poder modificar la aparición y el desarrollo de la EIA en el futuro.

El objetivo de este proyecto es el de definir los marcadores genéticos y epigenéticos relevantes en el riesgo y pronóstico de la EIA en nuestra población

Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente mejorar el enfoque de la escoliosis idiopática del adolescente

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vd., como potencial donante de muestras, conozca varios aspectos importantes:

A) La donación de muestras es totalmente voluntaria.

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre su participación en este estudio.

Se entrega copia de este documento al paciente

1



C) Se solicita su autorización para la toma y uso en investigación biomédica de muestras de **Sangre**. En dichas muestras se estudiarán marcadores genéticos y epigenéticos que el investigador principal considere necesarios para avanzar en la línea de trabajo arriba expuesta.

D) Se le tomará un volumen relativamente pequeño (**5cc**) de sangre venosa mediante una punción en el brazo (**toma unica**). La donación de sangre apenas tiene efectos secundarios; lo más frecuente es la aparición de pequeños hematomas en la zona de punción que desaparecen transcurridos 1 o 2 días.

E) No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y éstas no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre su muestra podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el donante.

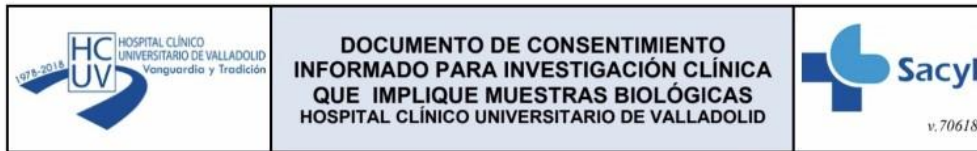
F) Las muestras y los productos obtenidos de las mismas serán almacenados y custodiados en (**IGBM-UVA**), lugar designado para este fin por el Investigador Principal del Estudio. La persona responsable de la custodia es el Dr. Tellería. La muestra quedará allí depositada de forma indefinida (siempre que no se haya consumido en su totalidad en el curso de los trabajos asociados a la misma). Si en dicho momento se propusiera el paso de las muestras a un Biobanco oficialmente reconocido, se le volverá a solicitar su consentimiento para ello.

G) Los datos personales asociados a las muestras serán tratados según lo dispuesto en la legislación vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999), de 13 de diciembre) y cualquier otra que resultara aplicable.

H) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente (Ley Orgánica 15/1999). Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el donante tendrá derecho de acceso, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio **Dr. Noriega Gonzalez**.

Se entrega copia de este documento al paciente

2



I) Las muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser utilizadas por el grupo del investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichas muestras y/o la información clínica asociada a las mismas podrán ser cedidas a otros investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización al CEIC (Comité Ético de Investigación Clínica) del Área de Salud Valladolid Este.

J) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que Vd. recibe/recibirá.

K) Es posible que los estudios realizados sobre sus muestras aporten información relevante para su salud o la de sus familiares. Vd. tiene derecho a conocerla y transmitirla a sus familiares si así lo desea.

L) Sólo si Vd. lo desea, existe la posibilidad de que pueda ser contactado en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

Los resultados de estos estudios ayudarán probablemente a diagnosticar y/o tratar de manera más precisa a los enfermos con una enfermedad como la de su hijo/a.

II) Algunas consideraciones sobre su participación:

Es importante que Vds., como padre y madre o tutor legal del niño menor de 12 años, conozca varios aspectos:

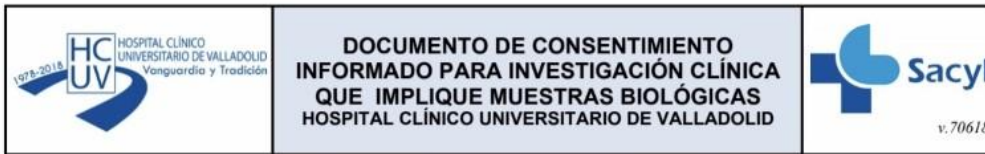
A) La participación es totalmente voluntaria. Dentro del proceso de asistencia hospitalaria por la enfermedad de su hijo/a, se realizará una encuesta clínica. Esta encuesta no interferirá con los procesos diagnósticos o terapéuticos que su hijo/a va a recibir por causa de su enfermedad

B) Puede plantear todas las dudas que considere sobre la participación de su hijo/a en este estudio.

C) No percibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por la participación en el estudio. No obstante, la información generada en el mismo podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población, aunque no de forma individual en el participante.

Se entrega copia de este documento al paciente

3



D) Los datos personales serán tratados según lo dispuesto en la normativa que resulte de aplicación, como es el Reglamento (UE) 2016/679, de 27 de abril, General de Protección de Datos Personales, y su normativa de desarrollo tanto a nivel nacional como europeo.

E) La información obtenida se almacenará en una base de datos, en soporte informático, registrada en la Agencia Española de Protección de Datos, según la legislación vigente.

F) Los datos registrados serán tratados estadísticamente de forma codificada. En todo momento el participante tendrá derecho de acceso, modificación, oposición, rectificación o cancelación de los datos depositados en la base de datos siempre que expresamente lo solicite. Para ello deberá ponerse en contacto con el investigador principal. Los datos quedarán custodiados bajo la responsabilidad del Investigador Principal del Estudio, **Dr./Dra. xxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxxx (indicar nombre)**. Así mismo, tienen derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no queda satisfecho.

G) Los datos serán guardados de forma indefinida, lo que permitirá que puedan ser utilizados por el grupo del investigador principal en estudios futuros de investigación relacionados con la línea de trabajo arriba expuesta. Dichos datos podrán ser cedidos a otros investigadores designados por el Investigador Principal para trabajos relacionados con esta línea, siempre al servicio de proyectos que tengan alta calidad científica y respeto por los principios éticos. En estos dos últimos casos, se solicitará antes autorización al CEIm (Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos) Área de Salud Valladolid Éste.


H) La falta de consentimiento o la revocación de este consentimiento previamente otorgado no supondrá perjuicio alguno en la asistencia sanitaria que su hijo/a recibe/recibirá.

I) Es posible que los estudios realizados aporten información relevante para la salud de su hijo/a o la de sus familiares. Vds. tienen derecho a conocerla y trasmitirla a sus familiares si así lo desea.

J) Sólo si Vds. lo desean, existe la posibilidad de que puedan ser contactados en el futuro para completar o actualizar la información asociada al estudio.

Se entrega copia de este documento al paciente

4

	DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA QUE IMPLIQUE MUESTRAS BIOLÓGICAS HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID	
---	---	---

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

Estudio _____

Yo, _____
(nombre y apellidos del padre ó representante legal)

Yo, _____
(nombre y apellidos de la madre ó representante legal)

He leído la información que me ha sido entregada.

He recibido la hoja de información que me ha sido entregada.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado del estudio con _____
(nombre y apellidos del investigador)

Comprendo que la participación de mi hijo/a es voluntaria.

Comprendo que mi hijo/a puede retirarse del estudio:

- 1.- Cuando quiera.
- 2.- Sin tener que dar explicaciones.
- 3.- Sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Por la presente, otorgo mi consentimiento informado y libre para que mi hijo/a participe en esta investigación.

Accedemos a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten con nosotros en el futuro en caso de que se necesite obtener nuevos datos. SI NO (marcar con una X lo que proceda)

Accedemos a que los médicos del HOSPITAL CLÍNICO UNIVERSITARIO DE VALLADOLID contacten con nosotros en caso de que los estudios realizados sobre los datos de mi hijo/a aporten información relevante para su salud o la de mis familiares SI NO (marcar con una X lo que proceda)

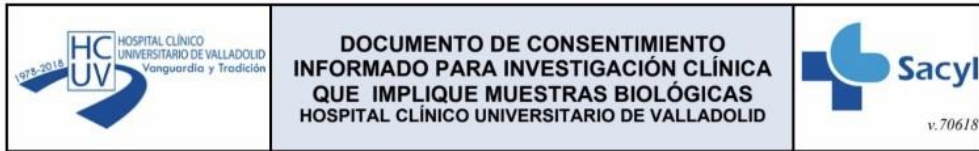
Una vez firmada, me será entregada una copia del documento de consentimiento.

FIRMA DEL PADRE/REPRESENTANTE LEGAL	NOMBRE Y APELLIDOS	FECHA
-------------------------------------	--------------------	-------

FIRMA DE LA MADRE/REPRESENTANTE LEGAL	NOMBRE Y APELLIDOS	FECHA
---------------------------------------	--------------------	-------

Se entrega copia de este documento al paciente

5



En mi presencia, se ha dado a mi hijo/a toda la información pertinente adaptada a su nivel de entendimiento, está de acuerdo en participar y consiento que participe en el estudio.

Nombre y apellidos del padre/representante legal

Firma del padre/representante legal Fecha.:

Nombre y apellidos de la madre/representante legal

Firma de la madre/representante legal Fecha.:

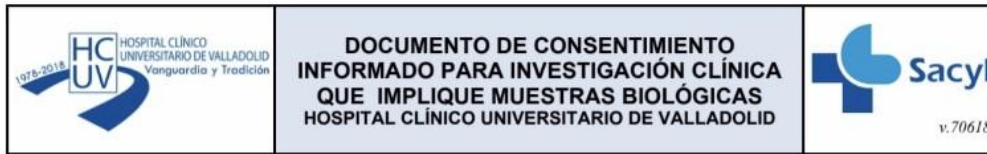
Hago constar que he explicado las características y el objetivo del estudio, sus riesgos y beneficios potenciales al padre/madre/representante legal del menor, que el menor ha sido informado de acuerdo a sus capacidades, ha comprendido esta explicación y no hay oposición por su parte. El padre/madre/representante legal otorga su consentimiento por medio de su firma fechada en este documento. (El menor firmará su asentimiento cuando por su edad y madurez sea posible).

Yo he explicado por completo los detalles relevantes de este estudio al paciente nombrado anteriormente y/o a los padres/representante legal de la persona autorizada a dar el consentimiento en nombre del paciente.

FIRMA DEL INVESTIGADOR	NOMBRE Y APELLIDOS	FECHA
------------------------	--------------------	-------

Se entrega copia de este documento al paciente

6



CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE POR ESCRITO.

APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (CONTACTAR CON EL INVESTIGADOR PRINCIPAL)

Yo _____ revoco el consentimiento de participación de mi hijo/a en el estudio, arriba firmado con fecha _____

Nombre y apellidos del padre/representante legal

Firma del padre/representante legal

Fecha.:

Nombre y apellidos de la madre/representante legal

Firma de la madre/representante legal

Fecha.:

Se entrega copia de este documento al paciente

7

SNP	GEN	SECUENCIA DE REFERENCIA	POSICIÓN
rs1544410	VDR	NG_008731.1:g.63980G>A	12q13.11
rs1800469	TGFB1	NG_013364.1:g.4536T>C	19q13.2
rs7975232	VDR	NC_000012.12:g.47845054C>A	12q13.11
rs17044552		NC_000002.12:g.22994301G>A	2p24.1
rs4782809	CDH13	NC_000016.10:g.83519274C>G	16q23.3
rs11190870	LBX1	NC_000010.11:g.101219450T>C	10q24.32

Tabla 1. Polimorfismos utilizados.

SNP	rs1544410			rs1800469			rs11190870		
GENOTIPO	GG	GA	AA	CC	CT	TT	TT	CT	CC
FRECUENCIA OBTENIDA PACIENTES	45.55%	47.77%	6.66%	54.54%	37.5%	7.95%	35.55%	53.33%	11.11%
FRECUENCIA OBTENIDA PROGENITORES	32.86%	51.42%	15.71%	50.75%	40.3%	8.96%	30.56%	50%	19.44%
FRECUENCIA ESPERADA	30.84%	50.47%	18.69%	36.45%	50.47%	13.08%	28.97%	49.53%	21.5%

SNP	rs7975232			rs17044552			rs4782809		
GENOTIPO	TT	TG	GG	GG	AG	AA	GG	CG	CC
FRECUENCIA OBTENIDA PACIENTES	31.17%	45.45%	23.38%	95.45%	4.54%	0%	26.44%	48.28%	25.29%
FRECUENCIA OBTENIDA PROGENITORES	21.31%	49.18%	29.5%	93.55%	6.45%	0%	26.09%	49.28%	24.64%
FRECUENCIA ESPERADA	37.38%	39.25%	23.37%	96.26%	3.74%	0%	23.36%	53.27%	23.36%

Tabla 2. Frecuencias genotípicas para los diferentes polimorfismos.

		PACIENTES VS POBLACIÓN	PROGENITORES VS POBLACIÓN
POLIMORFISMO rs 1544410	Frecuencia alélica	p=0,0088	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p=0,0162
		Hipótesis dominancia	p=0,023
		Hipótesis recesividad	p=0,048
POLIMORFISMO rs 1800469	Frecuencia alélica	p=0,0205	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p=0,038
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p=0,0171

Tabla 3. Polimorfismos significativos en pacientes con EIA.

		PACIENTES VS POBLACIÓN GENERAL	PROGENITORES VS POBLACIÓN GENERAL
POLIMORFISMO rs 1544410	Frecuencia alélica	p=0,0088	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p=0,0162
		Hipótesis dominancia	p=0,023
		Hipótesis recesividad	p=0,048
POLIMORFISMO rs 1800469	Frecuencia alélica	p=0,0205	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p=0,038
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p=0,0171
POLIMORFISMO rs 4782809	Frecuencia alélica	p > 0,05	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p > 0,05
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p > 0,05
POLIMORFISMO rs 7975232	Frecuencia alélica	p > 0,05	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p > 0,05
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p > 0,05
POLIMORFISMO rs 11190870	Frecuencia alélica	p > 0,05	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p > 0,05
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p > 0,05
POLIMORFISMO rs 17044552	Frecuencia alélica	p > 0,05	p>0,05
	Frecuencia genotípica	Hipótesis codominancia	p > 0,05
		Hipótesis dominancia	p > 0,05
		Hipótesis recesividad	p > 0,05

Tabla 3 ampliada. Resultados del estudio de todos los polimorfismos.

POLIMORFISMO 1544410		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
G	125	120
A	55	94
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	41	33
GA	43	54
AA	6	20
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+GA	84	87
AA	6	20
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	41	33
GA+AA	49	74

POLIMORFISMO 1800469		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
C	129	132
T	47	82
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC	48	39
CT	33	54
TT	7	14
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC+CT	81	93
TT	7	14
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC	48	39
CT+TT	40	68

Tabla 3. Tablas contingencia pacientes. Polimorfismos: rs1544410, rs1800469.

POLIMORFISMO 7975232		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
G	71	92
T	83	122
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	24	40
TG	35	42
GG	18	25
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT+TG	59	82
GG	18	25
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	24	40
TG+GG	53	67

POLIMORFISMO 11190870		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
T	112	115
C	68	99
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	32	31
CT	48	53
CC	10	23
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT+CT	80	84
CC	10	23
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	32	31
CT+CC	58	76

Tabla 4. Tablas contingencia pacientes. Polimorfismos: rs7975232, rs11190870.

POLIMORFISMO 4782809

FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
C	86	107
G	88	107

HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	23	25
CG	42	57
CC	22	25

HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+CG	65	82
CC	22	25

HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	23	25
CG+CC	64	82

POLIMORFISMO 1704452

FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
A	4	4
G	172	210

HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	84	103
AG	4	4
AA	0	0

HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+AG	88	107
AA	0	0

HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	84	103
AG+AA	4	4

Tabla 5. Tablas contingencia pacientes. Polimorfismos: rs4782809, rs1704452.

POLIMORFISMO 1544410

FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
G	82	120
A	58	94

HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	23	33
GA	36	54
AA	11	20

HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+GA	59	87
AA	11	20

HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	23	33
GA+AA	47	74

POLIMORFISMO 1800469

FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
C	95	132
T	39	82

HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC	34	39
CT	27	54
TT	6	14

HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC+CT	61	93
TT	6	14

HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
CC	34	39
CT+TT	33	68

Tabla 6. Tablas contingencia progenitores. Polimorfismos: rs1544410, rs1800469.

POLIMORFISMO 7975232		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
G	66	92
T	56	122
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	13	40
TG	30	42
GG	18	25
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT+TG	43	82
GG	18	25
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	13	40
TG+GG	48	67

POLIMORFISMO 11190870		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
T	80	115
C	64	99
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	22	31
CT	36	53
CC	14	23
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT+CT	58	84
CC	14	23
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
TT	22	31
CT+CC	50	76

Tabla 7. Tablas contingencia progenitores. Polimorfismos: rs7975232, rs11190870.

POLIMORFISMO 4782809		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
C	68	107
G	70	107
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	18	25
CG	34	57
CC	17	25
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+CG	52	82
CC	17	25
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	18	25
CG+CC	51	82

POLIMORFISMO 17044552		
FRECUENCIAS ALÉLICAS		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
A	4	4
G	120	210
HIPÓTESIS CODOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	58	103
AG	4	4
AA	0	0
HIPÓTESIS DOMINANCIA		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG+AG	62	107
AA	0	0
HIPÓTESIS RECISIVIDAD		
	PACIENTES	POBLACIÓN GENERAL
GG	58	103
AG+AA	4	4

Tabla 8. Tablas contingencia progenitores. Polimorfismos: rs4782809, rs17044552.