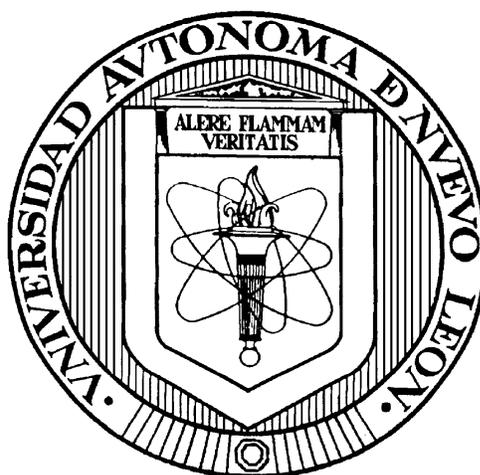


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**MAPEO GENÉTICO DE UN NUEVO SÍNDROME LIGADO
AL CROMOSOMA X EN UNA FAMILIA MEXICANA**

Por

M. C. MARÍA DEL CARMEN BARBOZA CERDA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Morfología**

Junio, 2012

MAPEO GENÉTICO DE UN NUEVO SÍNDROME LIGADO AL CROMOSOMA X EN UNA FAMILIA MEXICANA

Aprobación de la tesis:

DR. med. LAURA ELIA MARTÍNEZ DE VILLARREAL
Directora de Tesis

DR. C. MIGUEL ÁNGEL DÉCTOR CARRILLO
Co-Director de Tesis

DR. C. ROBERTO RANGEL OROZCO
Co-Director de Tesis

DR. med. MARÍA ESTHELA MORALES PÉREZ
Comisión de Tesis

Ph.D. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Comisión de Tesis

DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

MAPEO GENÉTICO DE UN NUEVO SÍNDROME LIGADO AL CROMOSOMA X EN UNA FAMILIA MEXICANA

Presentado por:

M. C. María del Carmen Barboza Cerda

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la DR. med. Laura Elia Martínez de Villarreal y bajo la co-dirección interna del DR. C. Miguel Ángel Déctor Carrillo y la co-dirección externa del DR. C. Roberto Rangel Orozco. Durante la realización de este trabajo conté con una beca de Doctorado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, 1998-1911, registro 215681).

FIRMAS

DIRECTOR

DR. med. Laura Elia Martínez de Villarreal

CO-DIRECTOR INTERNO

CO-DIRECTOR EXTERNO

DR. C. Miguel Ángel Déctor Carrillo

DR. C. Roberto Rangel Orozco

RESUMEN

M. C. María del Carmen Barboza Cerda

Fecha de Graduación: Junio 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: MAPEO GENÉTICO DE UN NUEVO SÍNDROME LIGADO AL CROMOSOMA X EN UNA FAMILIA MEXICANA

Número de páginas: 113

Candidato para Doctor en Ciencias con Orientación en Morfología

Área de estudios: Morfología

Propósito y Método de Estudio:

El presente trabajo tuvo como objetivo mapear una familia con anomalías genéticas múltiples, integrada por varones afectados y mujeres asintomáticas. Los pacientes compartían anomalías digitales, como polidactilia postaxial, braquidactilia y sindactilia cutánea. Además, presentaban braquicefalia, escoliosis, estatura baja, hipoplasia cerebelar y renal, así como retraso mental de leve a moderado. En el caso índice no se encontraron ni alteraciones cromosómicas ni variaciones en el número de copia como causas genéticas. El análisis de ligamiento genético enfocado sobre el cromosoma X en base a lo sugerido por el árbol genealógico, junto con el análisis de haplotipos evidenciaron una región candidata de ~15.74 Mb localizada en Xp11.4-p11.21 (lod score >3.0). De manera adicional, se encontró que la mitad de las madres portadoras obligadas mostraron un patrón de ICX sesgado favorablemente y el resto mostró patrones aleatorios. La región candidata incluye 28 genes que codifican proteínas, que todavía no han sido implicados en algún desorden genético humano. A la fecha, aproximadamente la mitad de los genes que codifican para proteínas en el cromosoma X, ya han sido asociados al menos a un fenotipo de enfermedad. Los desórdenes monogénicos ligados al cromosoma X están caracterizados por una alta penetrancia en varones, sin transmisión de varón a varón y en las mujeres tanto por una penetrancia incompleta como por una expresividad variable.

Conclusiones y Contribuciones:

De acuerdo con los resultados obtenidos, se especula que el fenotipo es compatible con un desorden monogénico cuyo gen involucrado probablemente juega un papel significativo durante el desarrollo embrionario. En base a las características clínicas de los pacientes, junto con los estudios paraclínicos, el árbol genealógico, la localización cromosómica y los ensayos de ICX, se sugiere que esta familia mexicana probablemente presenta un nuevo síndrome específico con un patrón de herencia ligado al cromosoma X. Se sugiere llamar a esta nueva entidad genética síndrome Beto debido a que tres de los varones afectados tenían el diminutivo de Beto.

FIRMA DEL DIRECTOR

DR. med. Laura Elia Martínez de Villarreal

CO-DIRECTOR INTERNO

CO-DIRECTOR EXTERNO

DR. C. Miguel Ángel Déctor Carrillo

DR. C. Roberto Rangel Orozco

“Yo soy el alfa y la omega, el principio y el fin dice el Señor, el Dios Todopoderoso, el que es y era y a de venir.....”

Apocalipsis, 22:13

“Toda persona debe decidir una vez en su vida, si se lanza a triunfar arriesgándolo todo, o se sienta en su balcón tranquilamente a contemplar el desfile de los triunfadores”

Thomas Alva Edison.

“El mundo esta en las manos de aquellos que tienen el coraje de soñar y correr el riesgo de vivir sus sueños”

Paulo Coelho.

“Tú tiempo es limitado, así que no lo malgastes viviendo la vida de otra persona. No dejes que te atrape el dogma, que es vivir con los resultados de lo que otra persona piensa. No dejes que el ruido de las opiniones de los demás ahogue tu voz interior. Y lo más importante, ten el coraje de seguir tu propio corazón y tu intuición. Ellos saben de alguna manera lo que realmente quieres ser. Todo lo demás es secundario”

Steve Jobs.

DEDICATORIA

*A mis cuatro amores que Dios me dio
Mi amado esposo Miguel Ángel, mi compañero, mi otro yo, mi razón de existir
Mis hermosos hijos Axel, Iker y Aitor, mi orgullo, amor que encarno
Por ser más hermosa la vida con ustedes de lo yo pude haber imaginado
A ustedes con todo mi amor.....*

*A mis padres Carmen y Esteban por haberme dado la vida, por ser un ejemplo de
trabajo, por todo su amor, comprensión y apoyo.....ayer, hoy y siempre
A mis hermanos Sergio, César y Angie por su cariño y apoyo incondicional
A mis sobrinitos Estefanía, Abelito y Meredith
A toda mi familia abuelita Pancha, tíos, tías, primos.....por todo su cariño
A la memoria de mi abuelita Tina...porque sé lo orgullosa que estarías de mí
A mi familia Déctor por su apoyo a través de la distancia y por hacerme sentir
siempre como un miembro más de la familia*

*A mis amigas y amigos: Cecy, Walky, Cristy, Edith, Raquel, Ana Laura, Oli, Ruth,
Lolís, Roxy, Vero, Rosario, Ramiro y Mario Alberto por brindarme su amistad, por
todo su apoyo y por hacerme sentir una persona muy especial*

*A los pacientes y sus familiares por su cooperación y disponibilidad para la realización
de este proyecto*

Finalmente a Jehová mi Dios por guiar mi vida.....

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Dra. med. Laura Elia Martínez de Villarreal por permitirme formar parte del Departamento de Genética, por apoyarme en mi desarrollo profesional, por aceptar ser mi directora de tesis, por sus enseñanzas, sugerencias y comentarios que fueron factores clave para la realización de esta tesis. Gracias por apostar por mi.

Al Dr. C. Miguel Ángel Déctor Carrillo por haber aceptado ser mi co-director y maestro, por sus enseñanzas directas e indirectas, por su dedicación y comprensión, pero sobre todo por su PACIENCIA. *Gracias por creer en mi y por bríndame tu apoyo incondicional en todo momento.*

A los miembros de la Comisión de Tesis, Dr. C. Roberto Rangel Orozco, Dr. med. María Esthela Morales Pérez y el Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra por sus acertados comentarios y su interés en la revisión de este trabajo.

Al genetista Dr. Luis Daniel Campos Acevedo por su valiosa colaboración y buena disposición en el análisis clínico de los pacientes.

A la M. C. Viviana Maricela Gómez Puente y la Q.C.B. Luz Rojas Patlán por su valiosa colaboración en la interpretación de los cariotipos.

Al Q.F.B. José Lugo Trampe por su apoyo en el manejo del secuenciador.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Doctorado otorgada No. 215681

A mis maestros del posgrado en Morfología por sus enseñanzas que contribuyeron a mi formación.

A mis compañeros del posgrado de Morfología: Rubén, Jaime, Adolfo, Salomón, Cecy, Laurita, Marichuy, Arnulfo, Sergio e Iván por compartir una parte de nuestras vidas.

TABLA DE CONTENIDO

CAPÍTULO

Página

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	GENERALIDADES DE LOS DEFECTOS AL NACIMIENTO	2
1.2	CLASIFICACIÓN DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS.....	5
1.3	ANORMALIDADES DE LOS CROMOSÓMICAS.....	7
1.4	ALTERACIONES GENÉTICAS	9
1.5	DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES	10
1.5.1	<i>Inicio del desarrollo de las extremidades</i>	<i>10</i>
1.5.2	<i>Inducción temprana de la yema del miembro: Factores de crecimiento de fibroblastos</i>	<i>11</i>
1.5.3	<i>Cresta ectodérmica apical (CEA).....</i>	<i>13</i>
1.5.4	<i>Zona de actividad polarizante (ZAP).....</i>	<i>16</i>
1.5.5	<i>Control morfogénico del desarrollo inicial de la extremidad</i>	<i>17</i>
1.5.6	<i>Muerte celular y desarrollo de los dedos.....</i>	<i>21</i>
1.5.7	<i>Desarrollo de las extremidades y enfermedad</i>	<i>22</i>
1.6	HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X.....	25
1.7	INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	26
1.8	MAPEO DE GENES HUMANOS.....	29

1.8.1	<i>Análisis de ligamiento</i>	31
1.9	ENFERMEDADES GENÉTICAS	33
1.10	CONSULTA GENÉTICA.....	34
1.11	ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X.....	35
1.12	JUSTIFICACIÓN	36
1.13	HIPÓTESIS.....	37
1.14	OBJETIVO GENERAL.....	38
1.15	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
2	MATERIAL Y MÉTODOS	39
2.1	HISTORIA FAMILIAR.....	39
2.1.1	<i>Descripción del caso índice IV:5</i>	40
2.1.2	<i>Paciente IV:17</i>	44
2.1.3	<i>Paciente V:12</i>	44
2.1.4	<i>Paciente V:17</i>	45
2.2	COMITÉ DE ÉTICA	47
2.3	ANÁLISIS CITOGÉNÉTICO CONVENCIONAL CON CARIOTIPO BANDAS GTG.....	47
2.4	ARREGLO DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (ACGH).....	48
2.5	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	49
2.6	GENOTIPIFICACIÓN	49
2.6.1	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	52
2.6.2	<i>Análisis de fragmentos</i>	53
2.6.3	<i>Análisis de datos</i>	55
2.7	ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	56
2.8	ANÁLISIS DE LIGAMIENTO.....	57

2.9	ANÁLISIS DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X (ICX).....	58
2.10	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>HUMARA</i> MEDIANTE PCR.....	59
3	RESULTADOS	62
3.1	DELINEACIÓN DEL FENOTIPO.....	62
3.2	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	64
3.3	BÚSQUEDA DE ALTERACIONES NUMÉRICAS Y ESTRUCTURALES	67
3.4	BÚSQUEDA DE MICRODUPLICACIONES/MICRODELECIONES.....	68
3.5	GENOTIPIFICACIÓN	68
3.6	DETERMINACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS	73
3.7	DETERMINACIÓN DEL LIGAMIENTO GENÉTICO	75
3.8	DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X	77
3.9	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA REGIÓN CANDIDATA	80
4	DISCUSIÓN	83
5	CONCLUSIONES	101
6	PERSPECTIVAS	103
	BIBLIOGRAFÍA.....	105
	APÉNDICES.....	111

LISTA DE CUADROS

CUADRO 1. IDENTIFICACIÓN DE DEFECTOS CONGÉNITOS EN UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE MÉXICO.....	3
CUADRO 2. MARCADORES DEL ESTUCHE LINKAGE MAPPING SET VERSIÓN 2.5 HD5.....	51
CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA FAMILIA Y SU DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	66
CUADRO 4. RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	72
CUADRO 5. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.....	74
CUADRO 6. ANÁLISIS DE LOD SCORE.....	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE LAS SEÑALES REQUERIDAS PARA LA INICIACIÓN Y SUBSECUENTE CRECIMIENTO DE LA EXTREMIDAD EN EL RATÓN (MUS MUSCULUS).....	11
FIGURA 2. ORGANIZACIÓN DE LAS EXTREMIDADES HUMANAS.....	13
FIGURA 3. CRESTA ECTODÉRMICA APICAL.....	14
FIGURA 4. MODELO MOLECULAR DE LA INICIACIÓN DEL LA YEMA DE LAS EXTREMIDADES EN EL POLLO.	15
FIGURA 5. ESPECIFICACIÓN DEL TIPO DE EXTREMIDAD POR LOS GENES T-BOX.....	18
FIGURA 6. CONTROL MOLECULAR DEL EJE DORSO-VENTRAL.....	20
FIGURA 7. MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA YEMA DEL MIEMBRO.....	22
FIGURA 8. ÁRBOL GENEALÓGICO DE LA FAMILIA.....	40
FIGURA 9. FENOTIPO DEL CASO ÍNDICE.....	42
FIGURA 10. ESTUDIOS PARACLÍNICOS DEL CASO ÍNDICE.....	43
FIGURA 11. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EXTERNAS DE LOS 4 VARONES AFECTADOS.....	46
FIGURA 12. ANORMALIDADES DIGITALES DEL FENOTIPO.....	64
FIGURA 13. CARIOTIPO DE BANDAS GTG DEL CASO ÍNDICE.....	67

FIGURA 14. EJEMPLIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN.....	70
FIGURA 15. ESTUDIOS DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	78
FIGURA 16. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIAR DE CINCO GENERACIONES.	79
FIGURA 17. REGIÓN CANDIDATA Xp11.4-p11.21.	81
FIGURA 18. GENES ASOCIADOS A LAS ANORMALIDADES DIGITALES.....	93
FIGURA 19. GENES CANDIDATOS.....	95

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

n	juego de cromosomas
DNA	ácido desoxirribonucleico
μ l	microlitros (10^{-6} litros)
ml	mililitros (10^{-3} litros)
mM	milimolar
μ M	micromolar
nm	nanómetros
ng	nanogramos
kb	kilobases
K	mil
Mb	megabases
cM	centiMorgan
LOD <i>score</i>	puntuación del logaritmo de las posibilidades
θ	fracción de recombinación
U	unidades internacionales
NEB	New England Biolabs
PAP-A	Polidactilia postaxial tipo A

PAP-B	Polidactilia postaxial tipo B
Het	heterocigocidad
ASR	rango de tamaños de alelos esperados
GT (1347-02)	genotipos del control CEPH 1347-02
DXS	secuencias únicas del cromosoma X
OMIM	Base de datos en línea sobre herencia mendeliana en el hombre
6-FAM™	6-Carboxifluoresceína de color azul, λ excitación=495 nm y λ emisión=520 nm
VIC™	fluoróforo de color verde con λ emisión= \approx 555 nm
NED™	fluoróforo de color amarillo con λ emisión= \approx 576 nm
LIZ™	marcador de peso molecular fluorescente de color naranja
MgCl ₂	cloruro de magnesio
dNTPs	desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP y dTTP)
Log ₁₀	logaritmo base 10
<i>Hpa</i> II	<i>Haemophilus parainfluenzae</i> II
Xp	brazo corto del cromosoma X
Xq	brazo largo del cromosoma X
del7p	delección del brazo corto del cromosoma 7
MIM	número de acceso a la base de datos electrónica OMIM

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos se presentan en alrededor del 3-4% de los recién nacidos vivos. La etiología puede ser cromosómica, monogénica o multifactorial. Es importante que cuando se presenta un caso de malformaciones múltiples se trate de establecer el origen de las mismas. Sin embargo en un gran porcentaje de los casos esto no es posible y los defectos congénitos de causa desconocida es de alrededor del 60%.

El abordaje diagnóstico en estos casos se basa en la exploración clínica, el árbol genealógico y se apoya en las herramientas genéticas, las cuales han permitido actualmente elucidar casos en donde se presentaban asociaciones de malformaciones en distintos aparatos y sistemas de causa desconocida. El desciframiento del genoma humano y el desarrollo biotecnológico y bioinformático han permitido dilucidar la causas en muchos casos.

El presente trabajo está relacionado con la presentación de una familia mexicana, en la que hay miembros afectados con múltiples anomalías congénitas entre las cuales resaltan las anormalidades de las extremidades. La

historia clínica sugirió un forma hereditaria. No existen reportes en la literatura con un fenotipo similar por lo que se hace uso de las herramientas genéticas para tratar de identificar el origen de este probable nuevo síndrome.

1.1 GENERALIDADES DE LOS DEFECTOS AL NACIMIENTO.

Defectos al nacimiento, malformaciones congénitas y anomalías congénitas son sinónimos usados para describir los trastornos estructurales, de comportamiento, funcionales y metabólicos presentes al nacimiento. La teratología es la ciencia que estudia estos trastornos (Sadler y Langman, 2006).

Los defectos congénitos interfieren con el proceso de adaptación del feto a la vida extrauterina. Son responsables directos o indirectos de una proporción de muertes perinatales e infantiles, pues dejan secuelas graves, repercusiones emocionales y económicas en las familias. Los defectos congénitos en nuestro país y en el estado de Nuevo León, son la segunda causa de muerte en menores de un año (Martínez-de Villarreal et al., 2001). La frecuencia de defectos mayores al nacimiento varían del 3 al 5% en los recién nacidos vivos, pero aumenta si se consideran los óbitos y los abortos.

En el 2007 Gallegos Rivas y cols., encontraron la presencia de defectos congénitos en proporción de 5.5 por 1,000 recién nacidos vivos en un hospital de tercer nivel de la ciudad de México. Los defectos con mayor frecuencia fueron las cardiopatías (15.3%), defectos del tubo digestivo (14.2%) y

síndromes genéticos específicos (13.2%) Cuadro 1. Se registraron además 10 defunciones ocasionadas por los defectos congénitos (13.2%). En las madres con algún padecimiento, como la diabetes mellitus tipos 1 y 2, la incidencia de malformaciones congénitas es del 7.8% y la tasa de mortalidad del 15.1%, mayor que la mortalidad perinatal general, la cual se estima ser del 12.2% (Gallegos-Rivas et al., 2007).

CUADRO 1. IDENTIFICACIÓN DE DEFECTOS CONGÉNITOS EN UN HOSPITAL DE LA CIUDAD DE MÉXICO.

<i>Defecto</i>	<i>Casos</i>	<i>Prevalencia</i>
Cardiopatías congénitas	15	0.85
Defectos del tubo digestivo	14	0.797
Síndromes específicos	13	0.74
Síndrome dismorfológico	13	0.74
Malformaciones del sistema nervioso central	12	0.68
Cromosomopatías	10	0.56
Arcos branquiales	5	0.28
Alteraciones genitourinarias	5	0.28
Alteraciones músculo-esqueléticas	4	0.22
Defectos en el pulmón y la pleura	3	0.17
Otros	4	0.22

Modificada de Gallegos-Rivas MC et al, 2007.

Actualmente, los métodos de diagnóstico tales como los marcadores séricos y ultrasonográficos, permiten identificar más casos con defectos congénitos en la población sin riesgo obstétrico o reproductivo. Esto obliga a mejorar la atención multidisciplinaria e integral en los centros hospitalarios (Sadler y Langman, 2006).

La formación de un ser humano, proceso a veces denominado morfogénesis, implica una interacción de factores genéticos y ambientales extremadamente complicada y hasta el momento, no del todo comprendida. Se calcula que alrededor del 50% de todas las concepciones humanas se pierden antes de la implantación, a los 5-6 días de la concepción o poco después. Los estudios realizados en un gran número de embriones provenientes de abortos espontáneos ha demostrado que entre el 80 y el 85% de los casos hay graves anomalías estructurales, que van desde la ausencia completa del embrión en el saco embrionario hasta una severa deformación corporal o una anomalía específica en un solo sistema orgánico (Turnpenny y Ellard, 2012).

Los defectos congénitos afectan cualquier parte del cuerpo y se manifiestan en los primeros tres meses de vida intrauterina; algunos son insignificantes y sólo tienen repercusión estética (malformaciones menores). En promedio, 3% de los neonatos presentan al nacimiento un defecto estructural grave (malformaciones mayores) que interfieren con sus funciones corporales o la aceptación social del individuo. Estas alteraciones pueden ocasionar discapacidad permanente e incluso la muerte en etapa temprana (Sadler y Langman, 2006).

1.2 CLASIFICACIÓN DE LOS DEFECTOS CONGÉNITOS.

La clasificación de los defectos congénitos, según su mecanismo patogénico, permiten sospechar el riesgo de recurrencia en la pareja. En esta clasificación se encuentran los términos de **malformación**, **disrupción** y **deformación**. Con la agrupación de dismorfias en un paciente puede integrarse un **síndrome**, una secuencia, un complejo o una asociación, cuyo reconocimiento favorecerá los procedimientos que integrarán el diagnóstico prenatal y la atención médica de la madre y el neonato (Gallegos-Rivas et al., 2007).

Las **malformaciones** ocurren durante la formación de estructuras, principalmente en el periodo de organogénesis y que resultan en la ausencia parcial o completa de una estructura o en alteraciones de su configuración normal. Las malformaciones son causadas por factores ambientales y/o genéticos que actúan independientemente o en conjunto. La mayoría de las malformaciones que se limitan a un único órgano muestran una herencia multifactorial, lo que implica la interacción de muchos genes con otros factores. Las malformaciones múltiples tienen mayor probabilidad de deberse a anomalías cromosómicas. Las malformaciones tienen su origen durante la tercera a la octava semanas de gestación, aunque algunas, principalmente las internas, se pueden presentar durante el segundo y el tercer trimestre de la gestación.

La **disrupción** resulta de alteraciones morfológicas de estructuras ya formadas y se debe a procesos destructivos. Un ejemplo de disrupción es el efecto ejercido sobre el desarrollo de un miembro cuando una banda de tejido amniótico se desarrolla alrededor de los dedos o del antebrazo de un bebe. Por definición, una disrupción no es genética, aunque en ocasiones factores genéticos pueden predisponer a hechos de este tipo. Por ejemplo, una pequeña proporción de las bandas amnióticas se debe a defectos del colágeno genéticamente determinados, que debilitan el amnios y aumentan su propensión a rasgarse de forma espontánea.

Las **deformaciones** se deben a fuerzas mecánicas que moldean una parte del feto durante un periodo prolongado. El pie equinovaro, por ejemplo, se debe a la compresión en la cavidad uterina. Las deformaciones involucran frecuentemente el sistema músculo esquelético y pueden ser reversibles posnatalmente, como en el caso del pie equinovaro que se resuelve mediante procesos ortopédicos relativamente sencillos (Turnpenny y Ellard, 2012).

Por otra parte, un **síndrome** es un grupo de anomalías que ocurren en conjunto y que tienen una causa común específica. Este término indica que se conoce la etiología y el riesgo de recurrencia, por ejemplo en el síndrome Down la etiología es un cromosoma 21 extra (Turnpenny y Ellard, 2012). En contraste, la **asociación** es la aparición aleatoria de dos o más anomalías que ocurren más frecuentemente juntas por casualidad, pero cuya causa no ha sido determinada (Sadler y Langman, 2006); por ejemplo el VACTERL (vértebras, ano, corazón, región traqueoesofágica, riñón y extremidades inferiores).

Existen descritos alrededor de 2,400 síndromes dismórficos que al parecer se deben a una patología molecular en un gen único; en cerca de 500 de estos síndromes el gen ya ha sido identificado, mientras que en otros 200 o más, no se ha precisado la localización del gen en el cromosoma. Aproximadamente, otros 500 síndromes son esporádicos cuyas causas precisas no han podido determinarse (Turnpenny y Ellard, 2012).

1.3 ANORMALIDADES CROMOSÓMICAS.

El DNA genómico (DNAg) no es una entidad estática, por el contrario, está sujeto a una variedad de cambios hereditarios (mutación). Las malformaciones pueden producirse por alteraciones en la división cromosómica (no disyunción) o por mutaciones en los genes. Las anomalías cromosómicas pueden definirse como cambios que dan como resultado una alteración visible de los cromosomas. Las anomalías cromosómicas pueden clasificarse en dos tipos según la extensión con que ocurren en las células del cuerpo; siendo las anomalías **constitucionales** cuando existen en todas las células corporales y las anomalías **somáticas** cuando solo existen en ciertas células o tejidos de un individuo. Las anomalías cromosómicas, ya sean constitucionales o somáticas, caen en dos categorías: anomalías numéricas y anomalías estructurales. Ambas se originan en la división celular, especialmente durante la meiosis.

Es posible distinguir tres clases de anomalías cromosómicas numéricas: **aneuploidias**, **poliploidias** y **mixoploidias**. Las **aneuploidias** consisten en la pérdida o ganancia de uno o más cromosomas, por ejemplo la monosomía es la falta de uno de los elementos en un par de cromosomas ($2n-1$ cromosoma); mientras que una trisomía es la presencia de tres miembros en un par cromosómico ($2n+1$ cromosoma). Las **poliploidias** es la adición de uno o más complementos haploides (ejemplos, $3n$ es una triploidia; $4n$ es una tetraploidía). Por otro lado, las **mixoploidias** se refieren a la presencia de dos o más linajes de células diferentes en sentido genético en un mismo individuo (Strachan y Read, 2004).

Algunas alteraciones en la estructura de los cromosomas pueden dar lugar a malformaciones durante el desarrollo. Algunas de estas anomalías cromosómicas se deben a la rotura de los propios cromosomas, inducida por factores ambientales como la radiación y ciertos teratógenos químicos. Este tipo de error estructural suele ser específico para un individuo dado y no se transmite a las generaciones sucesivas.

Otros tipos de alteraciones estructurales cromosómicas se generan durante la meiosis y afectan a las células germinales, por lo cual son hereditarias. Las traslocaciones recíprocas, la formación de isocromosomas, las deleciones y duplicaciones son anomalías frecuentes en la estructura de los cromosomas (Carlson, 2004).

Las investigaciones realizadas en Europa y en Estados Unidos muestran que entre el 25 y el 30% de todas las muertes perinatales obedecen a

anomalías estructurales cromosómicas graves. En el 80% de los casos están implicados factores genéticos, y tienen un riesgo de recurrencia del 1% o más para futuros embarazos (Turnpenny y Ellard, 2012).

1.4 ALTERACIONES GENÉTICAS.

Muchas de las mutaciones genéticas repercuten en alteraciones morfológicas. Estas pueden afectar a cualquier gen de los autosomas o de los cromosomas sexuales y generar patrones de herencia dominantes o recesivos.

De todas las anomalías congénitas, alrededor del 7.5% corresponden a defectos monogénicos. Algunas de estas anomalías son aisladas, es decir, implican a un solo órgano o sistema, por ejemplo, la hidrocefalia y la microcefalia, entre otras. Otros defectos monogénicos resultan en síndromes de anomalías múltiples, que implican a muchos órganos y sistemas que no poseen ninguna relación embriológica evidente, como sucede en el síndrome EEC caracterizado por: displasia ectodérmica, ectrodactilia y labio hendido/paladar hendido (Turnpenny y Ellard, 2012).

1.5 DESARROLLO DE LAS EXTREMIDADES.

1.5.1 Inicio del desarrollo de las extremidades.

La formación de los miembros comienza al final de la cuarta semana del desarrollo embrionario en el ser humano con la activación de un grupo de células mesenquimatosas del mesodermo lateral somático. Esas células se acumulan bajo el tejido epidérmico para crear una protuberancia circular llamada yema o esbozo de la extremidad. Estudios en etapas tempranas del desarrollo indican que las células del mesodermo de la placa lateral secretan al factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10). FGF-10 es capaz de iniciar las interacciones formadoras del miembro entre el ectodermo y el mesodermo (Figura 1). Además, el ácido retinoico parece ser crítico en la iniciación del crecimiento del miembro, ya que cuando se bloquea la síntesis de ácido retinoico con ciertas drogas se previene la iniciación de la yema, sugiriendo que un gradiente de ácido retinoico a lo largo del eje anteroposterior puede activar ciertas proteínas homeóticas en células particulares y ahí especificar cuales de ellas van a ser incluidas en el campo del miembro (Gilbert, 2000).

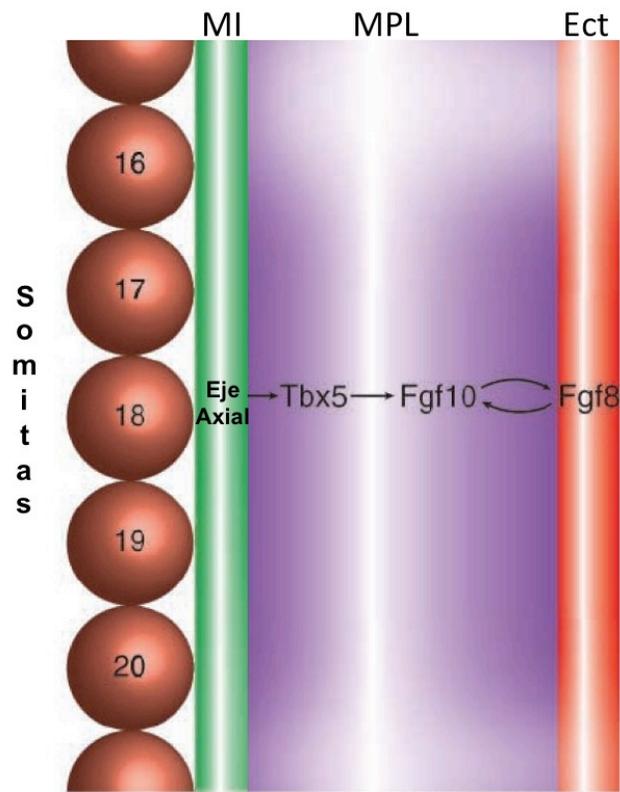


FIGURA 1. REPRESENTACIÓN DE LAS SEÑALES REQUERIDAS PARA LA INICIACIÓN Y SUBSECUENTE CRECIMIENTO DE LA EXTREMIDAD ANTERIOR EN EL RATÓN (*Mus musculus*). Una señal axial del mesodermo intermedio (MI) induce la expresión de *Tbx5* en la placa lateral del mesodermo (MPL) éste activa a *Fgf10* que a su vez activa a *Fgf8* en las células del ectodermo (Ect) (Modificada de Logan, 2003).

1.5.2 Inducción temprana de la yema del miembro: Factores de crecimiento de fibroblastos.

Los primordios mesodérmicos de las extremidades se forman en lugares separados bajo una banda ancha de ectodermo engrosado que rodea la cara

ventrolateral del embrión. En los primeros estadios de su desarrollo, el principal actor es el mesodermo de las extremidades, probablemente actuando a través de *FGF-10*, que estimula al ectodermo que lo recubre para que produzca *FGF-8* y se convierta en parte funcional de un primordio mesodérmico-ectodérmico en interacción, con la capacidad para producir un miembro incluso aunque se encuentre aislado del resto del cuerpo.

La organización de un miembro suele referirse de acuerdo al sistema de coordenadas cartesianas (Figura 2), de este modo, el eje anteroposterior discurre desde el primer dedo (anterior) hasta el quinto dedo (posterior). Las palmas y las plantas son consideradas ventrales, mientras que las partes opuestas de las manos y los pies son consideradas dorsales. Finalmente, el eje proximodistal es aquel que se extiende desde la base del miembro hasta las puntas de los dedos.

Los experimentos de trasplante y rotación de los primordios de los miembros en vertebrados inferiores han demostrado que estos ejes se establecen en el siguiente orden siguiente: anteroposterior (AP), dorsoventral (DV) y proximodistal (PD) (Carlson, 2004).

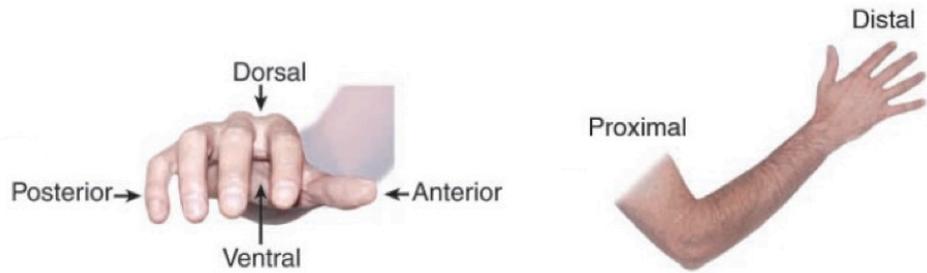


FIGURA 2. ORGANIZACIÓN DE LAS EXTREMIDADES HUMANAS. Representación de los tres ejes principales (AP, DV y PD) del desarrollo de los miembros y las estructuras equivalentes de la extremidad humana que forman. (Modificada de Logan, 2003).

1.5.3 Cresta ectodérmica apical (CEA).

La CEA es el centro de señalización que dirige el crecimiento de la extremidad en el eje PD. La CEA es una estructura engrosada que se forma en los límites del eje DV en estadios iniciales del desarrollo de la yema del miembro (Figura 3).

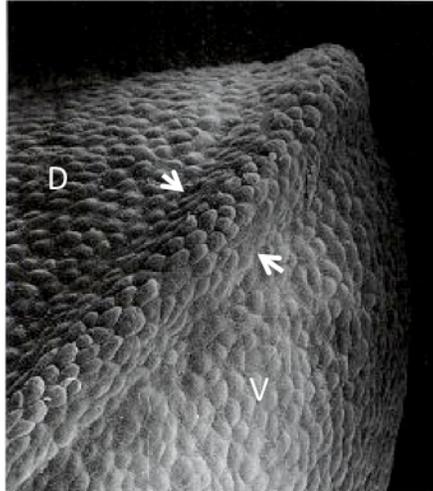


FIGURA 3. CRESTA ECTODÉRMICA APICAL. Micrografía electrónica de barrido de una yema de un miembro anterior del pollo. Las flechas indican el engrosamiento ectodérmico correspondiente a la CEA. **D:** porción dorsal; **V:** porción ventral (Modificado de Gilbert, 2000).

Entre las principales funciones que desempeña la CEA se encuentran: 1) el mantenimiento del mesénquima en una fase activa de proliferación que permita el crecimiento PD del miembro; 2) mantiene la expresión de aquellas moléculas señalizadoras que generan el eje AP; 3) responde a las proteínas señalizadoras especificando el eje AP y DV de tal manera que cada célula tenga las instrucciones sobre como diferenciarse.

El factor secretado por las células mesenquimatosas responsable de inducir la formación de la CEA es probablemente *FGF-10*. La CEA sufre una serie de cambios morfogénéticos que consisten en cuatro etapas: iniciación, maduración, mantenimiento y regresión; cada una caracterizada por cambios celulares de forma y en expresión génica.

En los estadios iniciales de la formación de la extremidad (Figura 4), el ectodermo lateral comienza a fabricar *FGF-8* a medida que se engrosa para generar la CEA. Cuando la yema del miembro empieza a sobresalir, la CEA también produce *FGF-2* a lo largo de toda su extensión y *FGF-4* en su mitad posterior (Gilbert, 2000).

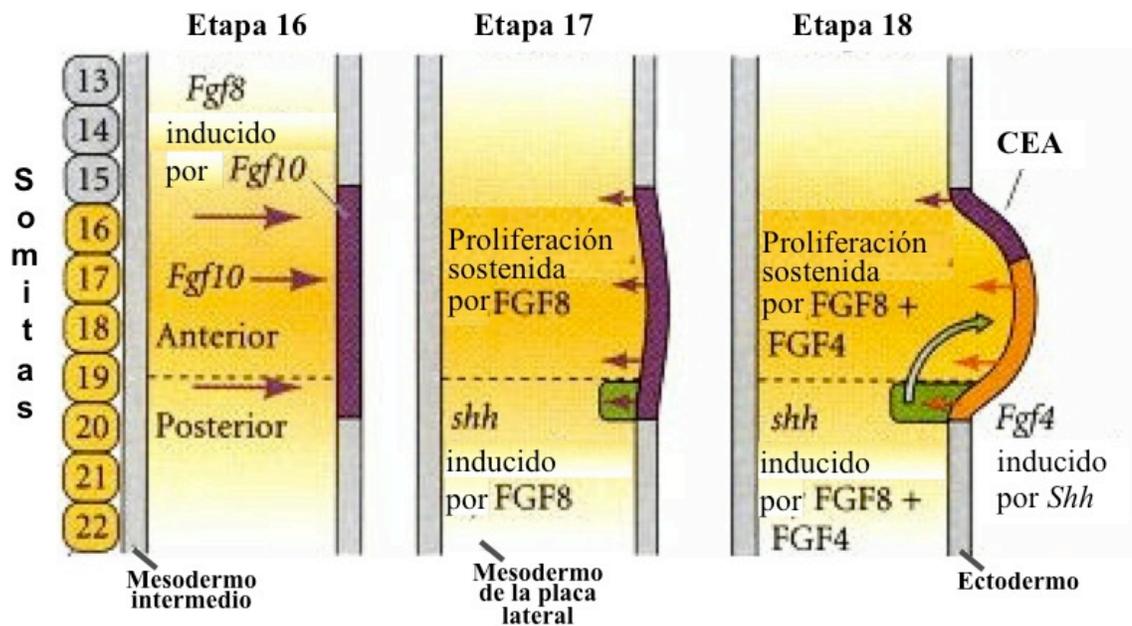


FIGURA 4. MODELO MOLECULAR DE LA INICIACIÓN DEL LA YEMA DE LAS EXTREMIDADES EN EL POLLO. El *FGF10* es secretado por el mesodermo de la placa lateral e induce la expresión de *FGF8* en el ectodermo, en los límites del eje dorso-ventral. La secreción de *FGF8* induce la proliferación de las células mesenquimales e induce la expresión de Sonic Hedgehog en la región posterior de la yema de la extremidad (Modificado de Gilbert, 2000).

1.5.4 Zona de actividad polarizante (ZAP).

En los humanos la especificación del eje AP del miembro es el cambio más temprano de la condición pluripotente. La ZAP actúa como un centro de transmisión de señales a lo largo del eje AP del miembro en desarrollo. Se ha demostrado que la señal en cuestión es Sonic Hedgehog (SHH). Este gen *SHH* es considerado un morfógeno, el cual instruye a la célula con respecto a su destino AP y especifica la identidad digital. La expresión de *SHH* es regulada por interacciones dinámicas entre las vías de señalización de retroalimentación entre el epitelio y el mesenquima que operan entre la CEA (que expresa FGFs) y el mesenquima de la yema del miembro a lo largo del eje PD, el cual expresa al antagonista de la proteína morfogénica de hueso (BMP), Gremlin1 (*GREM1*). La expresión de *GREM1* se activa en paralelo a la vía de señalización de *SHH* y antagoniza a la vía de señalización de BMP para permitir el establecimiento y la propagación de la señalización de retroalimentación entre el epitelio y el mesenquima. En modelos animales, las mutaciones con pérdida de la función en *Shh* y *Grem1* interrumpen el establecimiento de la identidad del eje AP, resultando en fusión (sindactilia) y en pérdida de dígitos. Por otro lado, la expresión ectópica de la señalización por *Shh* causa formación de dígitos adicionales en el extremo anterior del miembro, lo que se conoce como polidactilia preaxial (PPD). Por lo tanto, la regulación dinámica de la expresión

SHH y *GREM1* es crucial para el desarrollo normal de la yema del miembro en humanos (Carlson, 2004).

1.5.5 Control morfogénico del desarrollo inicial de la extremidad.

Debido a que la yema del miembro inicial es simplemente un núcleo de mesodermo cubierto por ectodermo, la iniciación del desarrollo requiere la interacción amplia entre el epitelio y el mesenquima. Sin embargo, los trabajos embrionarios clásicos en pollo, han demostrado que son las células del mesenquima lateral las que proveen las señales para iniciar el proceso del desarrollo de las extremidades y las que determinan tanto la identidad específica del tipo de extremidad (anterior-alas/posterior-piernas) como los ejes de la yema del miembro (Moody, 2007).

Dos de estas señales, son los factores de transcripción que se expresan en el mesodermo y que pertenecen a una familia génica llamada T-box (por el locus brachyury). El gen *Tbx-5* se expresa de forma exclusiva en los miembros anteriores (brazos), mientras que *Tbx-4* lo hace solo en las extremidades posteriores (piernas). En estas últimas otro factor de transcripción, *Pitx-1*, se expresa de una manera mutuamente excluyente con respecto a *Tbx-4* en la especificación del miembro (Figura 5). Estudios realizados en embriones de pollo indican que los tres genes son efectivamente expresados en el mesénquima y no en el ectodermo del miembro (Carlson, 2004).

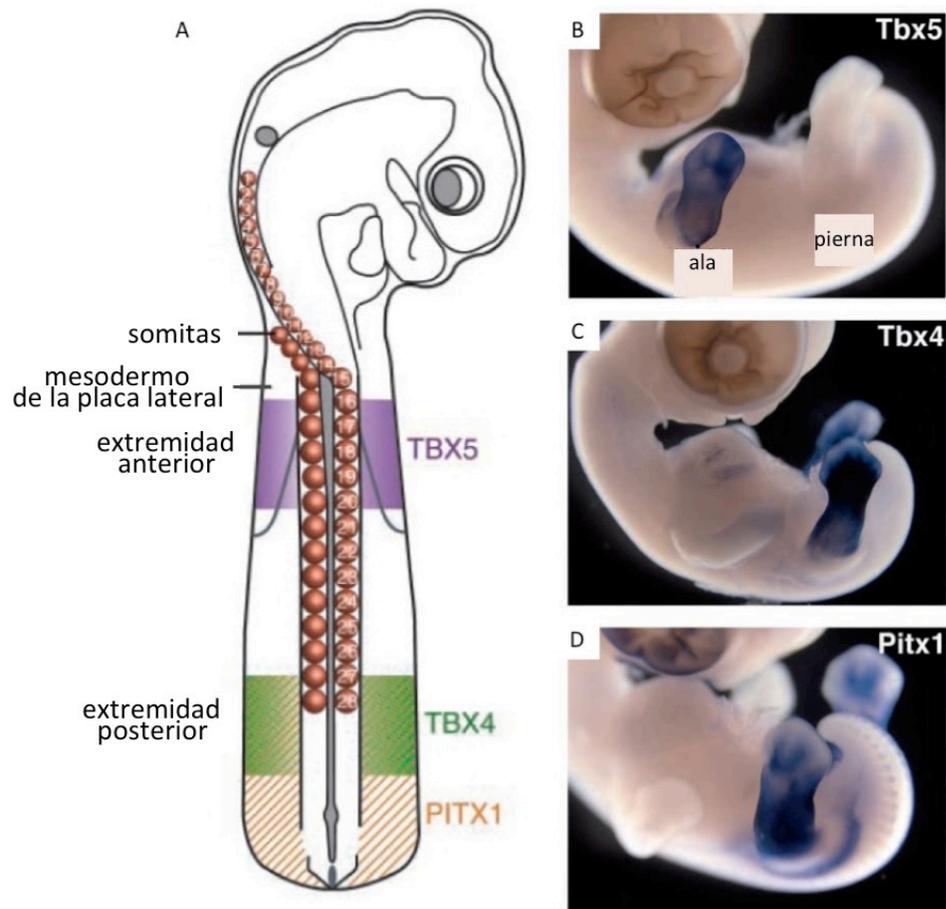


FIGURA 5. ESPECIFICACIÓN DEL TIPO DE EXTREMIDAD POR LOS GENES T-BOX. A) *Tbx-5* y *Tbx-4* se expresan en las regiones de las futuras extremidades (alas/piernas); mientras que *Pitx1* es expresado en un dominio más caudal. Preparaciones de hibridación *in situ* de embriones completos de pollo en el estadio 29, muestran la expresión de *Tbx-5* (B), *Tbx-4* (C) y *Pitx1* (D). (Modificado de Logan, 2003).

De manera interesante, el patrón de expresión de cada gen está restringido al tipo de miembro, es decir, que se conserva en injertos el tejido del ala en la yema de la pierna, o el tejido de la pierna en la yema del ala en embriones de pollo (Carlson, 2004).

FGF-10 juega un papel crítico en la iniciación del desarrollo de los miembros aparentemente mediando el papel de *Tbx-5* a través de señalizaciones en el ectodermo subyacente. Estudios recientes indican que *Tbx-5* y *Tbx-4* actúan río arriba de *FGF-10* durante la iniciación del desarrollo de las extremidades. Otra señal que juega un papel crítico es la trayectoria de señalización Wnt/ β -catenina que junto a los FGF's median la interacción entre el epitelio y el mesénquima en el miembro en desarrollo. Después de que *Tbx-5* es expresado, la señalización Wnt actúa en concierto con éste para activar la expresión completa de *FGF-10* (Moody, 2007).

A medida que la yema del miembro comienza a sobresalir de la pared corporal, sus principales características axiales son controladas por centros de transmisión de señales que interaccionan en cada uno de los tres ejes cardinales. La ZAP a través de la secreción de *SHH* es fundamental para regular el desarrollo a lo largo del eje AP, y la CEA que estimula el crecimiento del miembro en el eje PD mediante la secreción de factores de la familia FGF. La organización del eje DV de la extremidad comienza cuando el ectodermo dorsal produce la molécula de señalización *Wnt-7a*, que estimula al mesénquima subyacente de la yema del miembro para que exprese el factor de transcripción *Lmx-1b*, una molécula que confiere el carácter dorsal al mesodermo situado bajo el ectodermo dorsal (Figura 6). El ectodermo ventral por su parte expresa *Engrailed 1 (En-1)*, que inhibe la expresión de *Wnt-7a* y en consecuencia también la de *Lmx-1b* en lo que llegará a ser el mesodermo ventral de la extremidad, posiblemente por omisión. La CEA señala el borde

entre los ectodermos dorsal y ventral de la yema del miembro, el cual se caracteriza por ser el límite entre la expresión de otro factor de señalización, radical fringe (*r-Fng*), secretado por el ectodermo dorsal, y la de *En-1*, producido por el ectodermo ventral (Carlson, 2004).

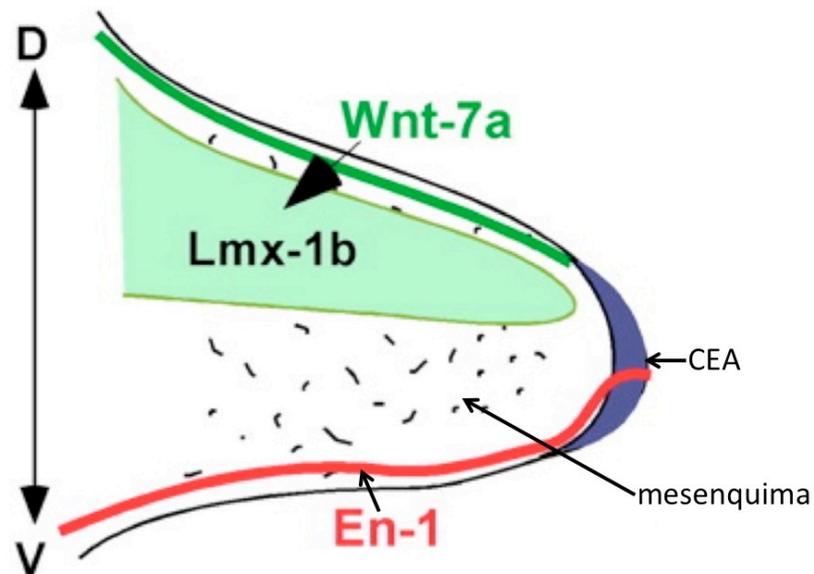


FIGURA 6. CONTROL MOLECULAR DEL EJE DORSO-VENTRAL. El esquema muestra la expresión de *Wnt-7a* en el eje dorsal, el cual induce la expresión de *Lmx-1b* en el mesodermo dorsal subyacente. El gen *En-1* es expresado en el ectodermo ventral. D=dorsal, V=ventral. (Modificada de Rieger, et al. 2010).

Los tres centros axiales de transmisión de señales AP (ZAP), PD (CEA) y DV (*Wnt-7a* y *En-1*) interactúan en la yema inicial del miembro. La presencia de *Wnt-7a* procedente del ectodermo dorsal posee un efecto estimulante sobre la ZAP, mientras que la expresión del gen *SHH*, originado en esta última región, es necesario para la producción de los FGF's por parte de la CEA, que a su vez

ejerce una retroalimentación positiva añadida sobre ZAP. De manera simultánea a la constitución de la ZAP, existe una secuencia ordenada de genes que contienen homeodominios, desde *HOXD-9* hasta *HOXD-13*, así como ciertos genes *HOXA*, se expresan en la yema inicial de miembro (Carlson, 2004).

1.5.6 Muerte celular y desarrollo de los dedos.

La muerte celular juega un papel importante en la escultura de la extremidad. De hecho, es esencial que las articulaciones se formen y que los dedos se separen. La muerte de células específicas en la extremidad de los vertebrados está genéticamente programada y se ha seleccionado durante la evolución. Esas células mueren por apoptosis, por lo que la muerte del tejido interdigital esta asociada con la fragmentación de su DNA.

La señal de apoptosis en la mano es llevada a cabo por las BMP's (Figura 7): *BMP2*, *BMP4* y *BMP7* que son expresadas en el mesenquima interdigital, ya que el bloqueo de esta vía de señalización previene la apoptosis interdigital (Gilbert, 2000).

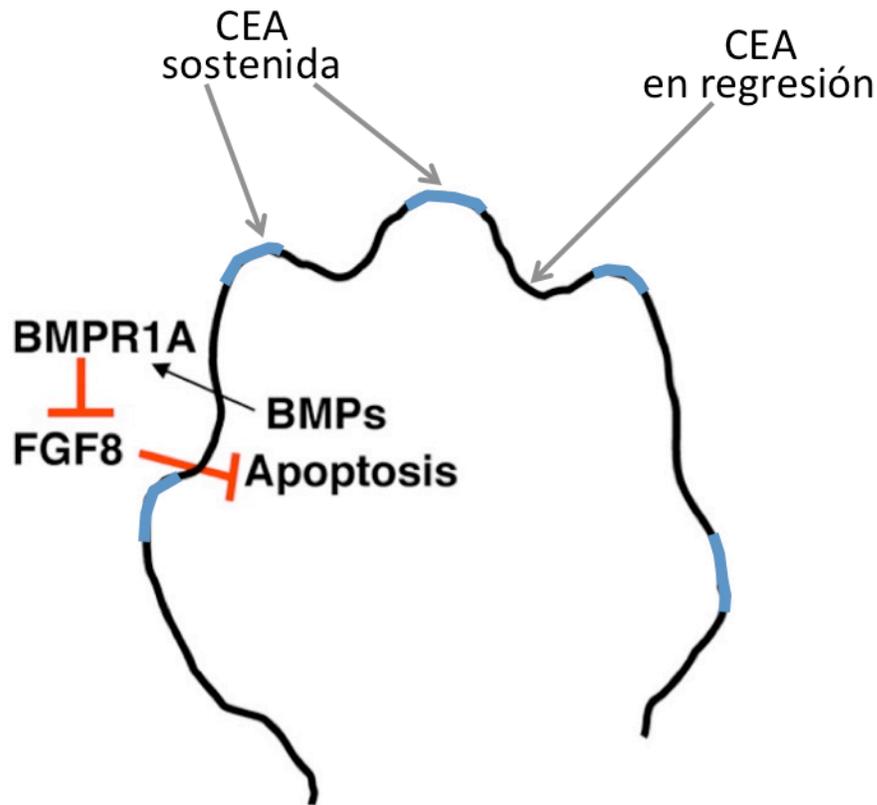


FIGURA 7. MUERTE CELULAR EN EL DESARROLLO DE LA YEMA DEL MIEMBRO. Durante el desarrollo, la señalización de BMP hacia el receptor BMPR1A en la CEA causa una desregulación de FGF-8, el cual normalmente previene la apoptosis en la región interdigital. Por lo tanto, la desregulación de FGF-8 permite que ocurra la apoptosis. (Modificada de Pajni-Underwood et al., 2007).

1.5.7 Desarrollo de las extremidades y enfermedad.

El desarrollo tridimensional de las extremidades está orquestado por una adecuada regulación de la señalización celular y de las redes transcripcionales. Los estudios genéticos moleculares del desarrollo de los miembros en modelos animales (principalmente en pollo y ratón) han proporcionado información

importante en la identificación de mutaciones y los mecanismos patogénicos de las deformidades congénitas de las extremidades en humanos. Debido a que la mayoría de las trayectorias de señalización que controlan el desarrollo de las extremidades también juegan un papel importante en otros procesos del desarrollo, por lo tanto la identificación de la alteración molecular de las deformación de los miembros también potencia nuestro entendimiento de las enfermedades congénitas que afectan otros sistemas, tales como el riñón y el sistema nervioso central (Moody, 2007).

En humanos, por ejemplo, una mutación sin sentido en *WNT3* genera una proteína trunca en el extremo amino terminal que causa la enfermedad genética tetra-amelia (OMIM #273395) encontrada en cuatro fetos afectados de una familia turca no consanguínea. (Niemann et al., 2004). La tetra-amelia se caracteriza por la ausencia completa de los cuatro miembros y otras anomalías en el desarrollo craneofacial y urogenital.

La importancia de la señalización de los FGF's en el desarrollo de las extremidades se destaca por los hallazgos de que las mutaciones en los receptores de FGF's conducen a deformidades esqueléticas y de las extremidades asociadas en los síndromes de Apert (AS; OMIM #101200), de Jackson-Weiss (JWS; OMIM # 123150) y de Pfeiffer (PS; OMIM # 101600). (Ornitz and Marie, 2002). AS y JWS resultan de mutaciones en *FGFR2*, éstos se caracterizan por sindactilia de manos y pies, además de una fusión prematura de todas las suturas craneales. PS resulta de una sola mutación en *FGFR1* o de varias mutaciones en *FGFR2*; este síndrome es caracterizado por

presentar el primer orjejo y el pulgar anchos, además de una fusión prematura de las suturas craneales.

La trayectoria de señalización de *SHH* controla el patrón antero-posterior del desarrollo de las extremidades. Lettice y cols. en 2003 mostraron que la polidactilia preaxial tipo II (PPD2; OMIM #174500) puede resultar de mutaciones puntuales en *SHH*, o cuando, es expresado adicionalmente de manera ectópica en la parte anterior en un modelo murino, cuando normalmente se expresa en la ZAP.

GLI3 es un factor de transcripción que funciona como un mediador bidireccional de la ruta de señalización de *SHH* (Biesecker, 2006); mutaciones en *GLI3* resultan en el síndrome de Cefalopolisindactilia de Greig (GCPS; OMIM #175700). Deleciones grandes o traslocaciones que resultan en haploinsuficiencia del gen *GLI3* se han asociado a GCPS (Pettigrew et al., 1991); (Vortkamp et al., 1991); (Brueton et al., 1988), mientras que mutaciones dominantes negativas son encontradas en el síndrome de Pallister-Hall (PHS; OMIM #146510) (Johnston et al., 2005). Además, una mutación en el codon 764 del gen *GLI3*, causa la polidactilia postaxial tipo A1(PAPA1; OMIM #174200). (Radhakrishna et al., 1997). Esta condición es resultado de un rasgo autosómico que se caracteriza por un dedo extra en el cúbito y/o lateral del peroné de las extremidades superiores o inferiores.

1.6 HERENCIA LIGADA AL CROMOSOMA X.

Un rasgo recesivo ligado al cromosoma X es aquel determinado por un gen del cromosoma X y que se manifiesta habitualmente en varones. Un varón con un alelo mutante en su único cromosoma X se dice que es hemicingótico para dicho alelo. Las enfermedades heredadas de forma ligada al cromosoma X se transmiten por las mujeres portadoras heterocigóticas sanas a los varones afectados, así como los varones afectados a sus hijas portadoras obligadas, con el riesgo consiguiente para los nietos masculinos a través de estas hijas. A veces se dice que este tipo de genealogía muestra un patrón de transmisión “diagonal” o de “movimiento de caballo de ajedrez” (Turnpenny & Ellard, 2012).

De manera diferente, en algunos padecimientos dominantes ligados a X, la presencia del alelo dominante es letal para los varones incluso antes del nacimiento. Por consiguiente, los varones afectados no nacen y se observa un padecimiento que sólo afecta a mujeres, quienes estadísticamente lo pueden transmitir a la mitad de sus hijas pero a ninguno de sus hijos. Es posible que haya un antecedente de abortos espontáneos, pero las familias rara vez son lo bastante grandes para demostrar que el número de hijos sólo es la mitad que el de las hijas (Nussbaum et al., 2007).

1.7 INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.

Hay miles de genes en el cromosoma X, pero relativamente pocos en el cromosoma Y. La explicación del porqué los hombres sobreviven bastante bien con un solo cromosoma X mientras que las mujeres tienen dos, involucra el concepto llamado “compensación de dosis” que fue propuesto por la Dra. Lyon en 1999. Se sabe por estudios citogenéticos que uno de los dos cromosomas X está inactivo en las células femeninas por condensación extrema, este mecanismo recibe el nombre de lyonización en honor a la Dra. Lyon o también inactivación del cromosoma X (ICX). Éste es el origen de la cromatina sexual, o corpúsculo de Barr, que se puede observar naturalmente en células femeninas pero no en la de los varones (Logan, 2003).

La ICX es un proceso que ocurre en todos los mamíferos y resulta en el silenciamiento selectivo de casi todos los alelos de uno de los dos cromosomas X en las mujeres y esto ocurre en forma aleatoria (~50:50). Por consiguiente, mediante la inactivación de uno de los dos cromosomas X parentales, los mamíferos hembra se convierten en hemicigotos funcionales para la mayor parte de los genes ligados a X. Mientras en los varones el cromosoma X se encuentra activo, por lo que son hemicigotos para los genes ligados a X.

La ICX ocurre en etapas tempranas de la vida embrionaria, comenzando alrededor de 3 días posfertilización y se completa al final de la primera semana del desarrollo. Los estudios de expresión génica sobre el cromosoma X en

ratones, han demostrado que ambos cromosomas experimentan una transcripción activa durante la segmentación temprana de los embriones femeninos. Inicialmente, todas las células del estadio de pre-implantación en los embriones de ratón sufren una inactivación exclusiva del cromosoma X paterno, en un proceso referido como inactivación del X por impronta. En las células de la masa celular interna ambos cromosomas X continúan activos, mientras que en todas las del trofoblasto (trofoectodermo), el cromosoma X derivado del padre es inactivado de forma selectiva. Más tarde, en el momento de la implantación, el cromosoma X inactivo (Xi) paterno se reactiva selectivamente en las células de la masa celular interna destinadas a formar el feto.

El Xi tiene características similares a la heterocromatina, con una replicación tardía del DNA en la fase S del ciclo celular y permanece condensado durante la interfase. Las histonas asociadas al Xi se encuentran desacetiladas y las citosinas en las islas CpG están metiladas. Ambas situaciones, son características del silenciamiento génico.

La ICX se inicia en el centro de inactivación del X (CIX), este locus se encuentra localizado en la banda Xq13; esta tarea es llevada a cabo por el gen *XIST* (X-inactive-specific transcript) el cual solo se expresa a partir del Xi. *XIST* codifica para un RNA, el cuál parece cubrir o literalmente pintar el Xi y es responsable de la inactivación del cromosoma. Mientras que el Xi se distingue por la expresión del RNA de *Xist*, el cromosoma X activo (Xa) es caracterizado por la expresión de un transcrito no codificante largo anti-sentido llamado *Tsix*. La expresión de *Tsix* se cree que evita la expresión del RNA *Xist* evitando así la inactivación del Xa (Kalantry, 2011).

Una vez que una célula progenitora en el embrión temprano se comprometió a inactivar el cromosoma X paterno o el X materno, el patrón de inactivación muestra una herencia clonal, donde todos los descendientes de la célula dentro del linaje celular resultante llevan el mismo patrón de ICX que la célula progenitora. Esto significa que todos los mamíferos hembra son mosaicos y comprenden mezclas de líneas celulares en las que se inactiva el X paterno y líneas celulares en las que se inactiva el X heredado de la madre (Strachan y Read, 2004).

La ICX puede llegar a ser no aleatoria o sesgada (~80-100:20-0), es decir, un mismo cromosoma X sufre el silenciamiento en la mayoría o todas las células de un tejido y puede resultar tanto de procesos selectivos como estocásticos. Está bien documentado que las anomalías del cromosoma X, tales como deleciones grandes, duplicaciones y traslocaciones no balanceadas de X/autosoma resultan en patrones sesgados de inactivación, donde el cromosoma X anormal se encuentra inactivo en la mayoría de las células. De manera inversa, en el caso de rearrreglos balanceados X/autosoma, el cromosoma X normal es el que usualmente es inactivado, con el fin de mantener la euploidia funcional (Sharp et al., 2000). Por los estudios en el desarrollo de embriones se ha demostrado que la inactivación sesgada del X en los casos anteriores, resulta de una selección secundaria favorable de aquellas células que retienen el mejor balance genético.

Tales procesos de selección celular se cree que operan en los humanos con mutaciones genéticas ligadas a X. En muchos síndromes ligados a X se han descrito mujeres portadoras que exhiben una ICX con sesgo cercano al

100%. Invariablemente, el cromosoma X normal es activo en la mayoría de las células, presumiblemente como un resultado de la selección contra aquellas que expresan la mutación. En algunos casos, tales mutaciones resultan letales para los varones hemicigotos quienes las heredan, resultando en un incremento en las frecuencias de abortos espontáneos en las mujeres portadoras (Sharp et al., 2000).

1.8 MAPEO DE GENES HUMANOS.

La aplicación más importante del mapeo de genes para la genética médica es la localización e identificación de genes asociados a enfermedad. El mapeo genético se apoya en el conocimiento de las posiciones en el mapa físico de los marcadores polimórficos utilizados en el análisis de ligamiento. El mapeo genético depende de la recombinación genética y la segregación de haplotipos los cuales permiten establecer los límites entre los que debe situarse el gen de la enfermedad. Los mapas genéticos y los físicos son interdependientes y complementarios.

El mapeo de genes implicados en una enfermedad comienza identificando y reuniendo familias con el número suficiente de sujetos o individuos para establecer un ligamiento genético. Sin embargo, encontrar tales familias apropiadas puede ser complicado, en especial para trastornos raros o en las que las personas afectadas mueren a edades tempranas (y no se

dispone de muestras de DNA). Los miembros de la familia son cuidadosamente examinados para determinar quién está afectado y quién no lo está, y se obtiene DNA de la mayoría o si es posible de todos los miembros relevantes disponibles. Cualquier célula nucleada puede servir como fuente de DNA: en general, se utilizan las células sanguíneas (leucocitos), pero también pueden emplearse células del interior de las mejillas, células en cultivo e, incluso tejidos fijados en parafina.

En la práctica genética humana se espera encontrar ligamiento a una distancia de aproximadamente 10 cM o menos, porque a distancias superiores, en general no puede encontrarse un número suficiente de familias para establecer una evidencia significativa de ligamiento (lod scores o puntuación de razones de probabilidad de >3). En otras palabras, en general, un marcador polimórfico tiene que estar a un máximo de 7.5 millones de pares de bases del gen de la enfermedad para que pueda detectarse un ligamiento. A diferencia de las enfermedades con rasgos autosómicos, en las cuales es adecuado analizar unos 400 marcadores polimórficos para probar su ligamiento con la colección de familias; en las enfermedades ligadas a X, la situación es más sencilla porque ya se conoce la localización cromosómica del gen y puede ser mapeada utilizando sólo 15-20 marcadores (Strachan y Read, 2004).

1.8.1 Análisis de ligamiento.

El ligamiento genético puede definirse como la tendencia de los alelos cercanos en el mismo cromosoma de ser transmitidos juntos, como una unidad intacta, a través de la meiosis. La definición anterior está estrechamente relacionada con la de haplotipo. El análisis de ligamiento genético es un método de mapeo de genes que utiliza estudios familiares para determinar si un gen y un marcador muestran ligamiento (están ligados) cuando pasan de una generación a la siguiente.

El objetivo del análisis de ligamiento es determinar la frecuencia con la que se separan dos loci mediante recombinación meiótica. Cuando dos loci se encuentran en diferentes cromosomas, se segregan de manera independiente. Por consiguiente, al final de la meiosis en promedio habrá 50% de los gametos son recombinantes, mientras que el otro 50% será no recombinante. La fracción de recombinación es 0.5.

Durante la meiosis I cuando hay cuatro cromátides por cada par de cromosomas se producen entre 1 y 4 recombinaciones a lo largo de cada cromosoma. Si no se produce ninguna recombinación entre los loci dentro del segmento de las cromátides, los cromosomas resultantes serán iguales a los de los progenitores, por lo tanto, son **no recombinantes**. En cambio, si se producen recombinaciones entre los loci, los cromosomas resultantes serán diferentes a los de los progenitores y por lo tanto, se llaman **recombinantes**.

Los eventos de recombinación genética a través de una generación separan con baja frecuencia dos loci situados muy cerca entre sí en un cromosoma, pero cuando más distantes se encuentren dos loci en un cromosoma, más probable que éstos los separen. Por consiguiente, los grupos de genes en un mismo segmento cromosómico dado tienden a transmitirse como un bloque a través de la genealogía; tal bloque de alelos se conoce como **haplotipo**.

En consecuencia, la fracción de recombinación es una medida de la distancia entre dos loci. Las fracciones de recombinación definen la distancia genética, que no es lo mismo que la distancia física. Dos loci que muestran 1% de recombinación se definen como separados un cM en un mapa genético (Strachan y Read, 2004). Cuando dos loci se encuentran en diferentes cromosomas, se segregan de manera independiente. Por consiguiente, al final de la meiosis en promedio habrá 50% de los gametos son recombinantes, mientras que el otro 50% será no recombinante. La fracción de recombinación es de 0.5 para cualesquier genes o marcadores separados a una distancia genética de X cM o en diferentes cromosomas.

1.9 ENFERMEDADES GENÉTICAS.

La detección de mutaciones ha contribuido al entendimiento de la función de los genes y ha tenido una repercusión directa en la exactitud del diagnóstico y asesoramiento genético.

Actualmente se reconocen cerca de 7,289 trastornos genéticos (OMIM, Marzo 2012) de los cuales solo en el 49% se conoce el gen o el *locus* implicado y se ha caracterizado el tipo de mutación involucrada. Esto significa que es posible encontrar nuevos fenotipos debidos al 51% de genes no asociados a alguna patología. Sin embargo, debido a la heterogeneidad genética del humano, la demostración de la existencia de una nueva entidad genética en lugar de una más probable forma alélica de un síndrome ya conocido; se convierte en una tarea difícil de llevar a cabo. Esta tarea pudiera ser cumplida exitosamente mediante el empleo de diferentes enfoques, empezando siempre por una exhaustiva delineación clínica complementada con la búsqueda en las bases de datos con el propósito de descartar una forma alélica.

Por otro lado, el establecimiento de un nuevo síndrome debe estar basado en la identificación del gen y la mutación implicada. Para aislar los genes alterados en patologías, forzosamente se ha recurrido al mapeo genético para determinar en un principio la región candidata, esto si no se tienen indicios acerca de la función del gen (clonación funcional) o la magnitud de la alteración

es suficientemente pequeña para no ser visible al microscopio (clonación posicional) (Strachan & Read, 2004).

1.10 CONSULTA GENÉTICA.

Los objetivos de la genética humana son establecer el diagnóstico, el pronóstico y el riesgo de recurrencia de una enfermedad genética dada. Por lo tanto, la historia familiar completa y precisa es la piedra angular en todo el proceso de evaluación y consejo. Por otra parte, una delineación clínica exhaustiva es crucial para establecer en primera instancia el diagnóstico de una enfermedad conocida o para describir la existencia de una nueva entidad genética. Para apoyar esta labor, los genetistas cuentan actualmente, además de libros y revistas científicas especializados en el área, con bases electrónicas tales como Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>), geneatlas (<http://www.genatlas.org/>) y OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>), así como programas computacionales como PossumWeb (<http://www.possum.net.au/>), entre otras.

Ahora bien, cuando se encara una entidad, la cual pudiera o no ser de causa genética, se debe proceder al abordaje de la patología con enfoque científico. Para investigar si un rasgo o un trastorno particular de los seres vivos es de tipo genético o hereditario, habitualmente hay que basarse en la

observación de la forma en que se transmite de una generación a la siguiente, o en el estudio de su frecuencia entre familiares.

Un apoyo importante en la consulta genética es el **árbol genealógico**, el cual es un sistema simplificado de registro de la información pertinente sobre la familia. Habitualmente, el paciente por el cual se inicia un estudio genético se denomina **caso índice, probando o propositus**. La posición del probando en el árbol genealógico se indica con una flecha. Junto con la delineación clínica de un supuesto nuevo desorden genético, el análisis del árbol genealógico continúa mostrando ser un punto de entrada esencial a la genética humana, pero sólo es un punto de inicio para definir genes o al menos para establecer el modo de herencia (Strachan & Read, 2004).

1.11 ENFERMEDADES LIGADAS AL CROMOSOMA X.

A la fecha, aproximadamente la mitad de los genes que codifican para proteínas y que están en el cromosoma X, ya han sido asociados al menos a un fenotipo de enfermedad. Los desórdenes monogénicos ligados al cromosoma X están caracterizados principalmente por una alta penetrancia en varones, sin transmisión de varón a varón y en las mujeres tanto por una penetrancia incompleta como por una expresividad variable.

1.12 JUSTIFICACIÓN.

En el estudio de las enfermedades de origen genético, la búsqueda de los genes responsables de dichas alteraciones ha permitido aportar nuevos conocimientos al estudio de las bases moleculares que dirigen el desarrollo morfológico de un organismo. Por lo tanto, el mapeo y la identificación de genes candidatos para la presente entidad genética puede ayudar a un mejor entendimiento del proceso de formación del esqueleto con enfoque en las extremidades y su relación con otras estructuras corporales.

1.13 HIPÓTESIS.

El gen mutante responsable de las alteraciones morfogénicas encontradas en los varones afectados de esta familia mexicana se encuentra en el cromosoma X.

1.14 OBJETIVO GENERAL.

Mapear la región sobre el cromosoma X que esta ligada a las alteraciones genéticas presentes en los varones afectados.

1.15 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Realizar el análisis de ligamiento.
2. Determinar el LOD score para cada marcador genético.
3. Buscar genes candidatos.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 HISTORIA FAMILIAR.

La familia mexicana estudiada incluye ocho varones afectados provenientes de tres diferentes generaciones, cuatro de los cuales pudieron ser examinados clínica y molecularmente; todos ellos comparten anomalías congénitas múltiples. Los varones afectados son hijos de padres no consanguíneos, aparentemente sanos y con un fenotipo normal. El árbol genealógico (Figura 8) de 5 generaciones muestra al caso índice (IV.5), 3 tíos abuelos, 2 primos hermanos y 2 primos segundos por rama materna. Debido a su retraso mental, ninguno de los pacientes trabaja, pero son altamente sociables. El quinto individuo afectado (IV:22) no pudo ser contactado para su valoración clínica, pero tanto para él como para los individuos II.6-II.8 solo se tuvo información a través de la familia, la cual refería que ellos mostraban el mismo parecido con los dos individuos de la generación IV.

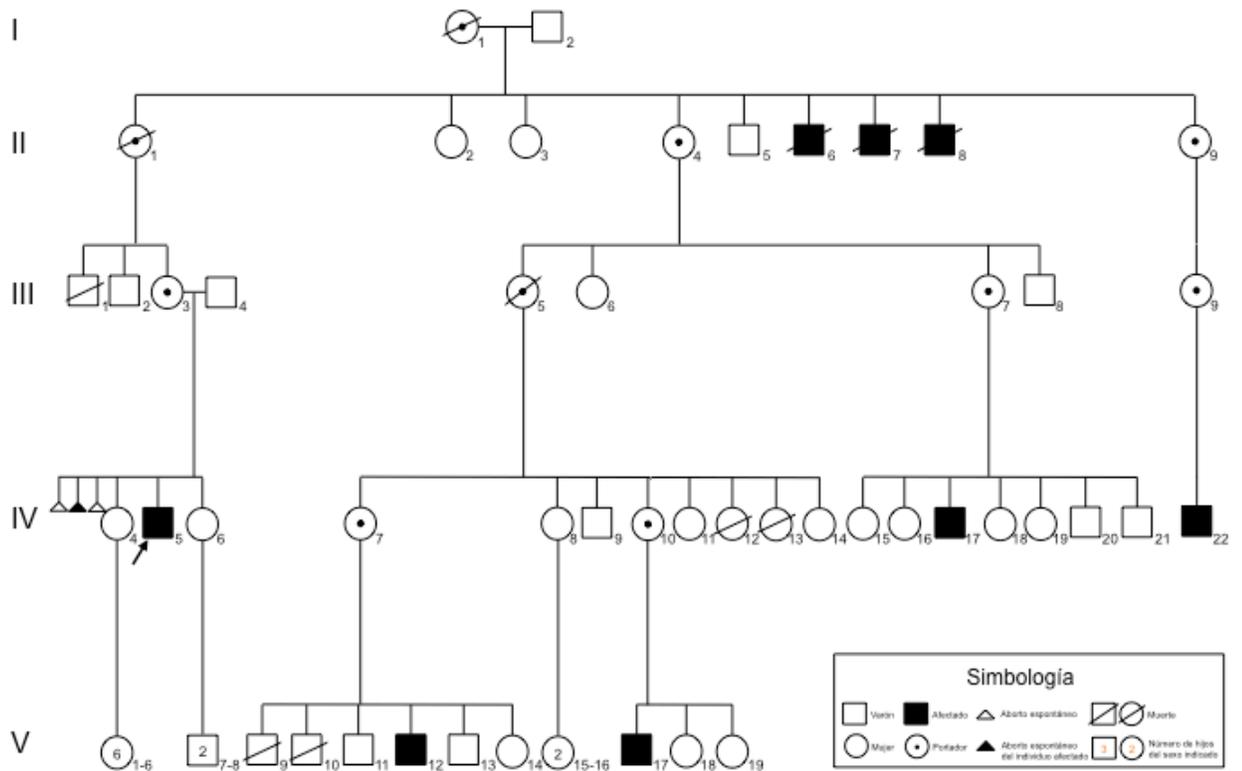


FIGURA 8. ÁRBOL GENEALÓGICO DE LA FAMILIA. Las posiciones de los ocho varones afectados, así como de las mujeres portadoras obligadas en las cinco generaciones están indicadas usando la nomenclatura genética estándar. La flecha señala al caso índice.

2.1.1 Descripción del caso índice IV:5.

Fue el primer paciente en ser valorado clínicamente, él resultó ser el más severamente afectado y con el mayor número de características entre los varones afectados en la familia por lo cual fue considerado como el caso índice.

El individuo IV.5 es un masculino de 37 años de edad al momento de la examinación clínica, producto de la quinta gesta de padres no consanguíneos,

aparentemente sanos. Nace a las 40 semanas de gestación por parto vaginal atendido por partera. La madre refiere antecedentes de 3 abortos espontáneos de los cuales, al menos uno de ellos fue un producto masculino afectado. Al nacimiento presentó hipotonía, búsqueda y succión ausente durante la etapa neonatal, sostén cefálico al 2º año de vida, caminó hasta los 8 años de edad, inicio con monosílabos al 5º año de vida y tuvo un control de esfínteres hasta los 10 años de edad.

A la exploración física se mostró cooperador, obedeciendo órdenes sencillas. Presenta cráneo braquicéfalo, frente estrecha, hipoplasia medio facial, cejas arqueadas, aperturas palpebrales rectas y estrechas, ptosis con epicanto interno derecho, estrabismo convergente, nistagmus, nariz gruesa, filtrum plano, labios gruesos, paladar alto, hiperplasia gingival, microdontia, prognatia, implantación baja tanto de las orejas como de la línea del pelo, sin alteración en la forma de las orejas (Figura 9_A,B). Presenta cuello cilíndrico sin masas palpables, tórax sin compromiso cardiopulmonar evidente, abdomen blando, plano, sin megalias, ni hernias y con peristalsis presente. Los genitales masculinos con testículos en bolsa escrotal sin alteraciones evidentes.

En las extremidades superiores presenta cubitus valgus, limitación de la extensión del codo, braquidactilia bilateral del 2º dedo, campodactilia bilateral, sindactilia bilateral del 4º y del 5º dedo, así como polidactilia postaxial bilateral (Figura 9_C,D). En las extremidades inferiores presenta sindactilia bilateral del 2º-3^{er} ortejo y polidactilia postaxial derecha (Figura 9_E,F).

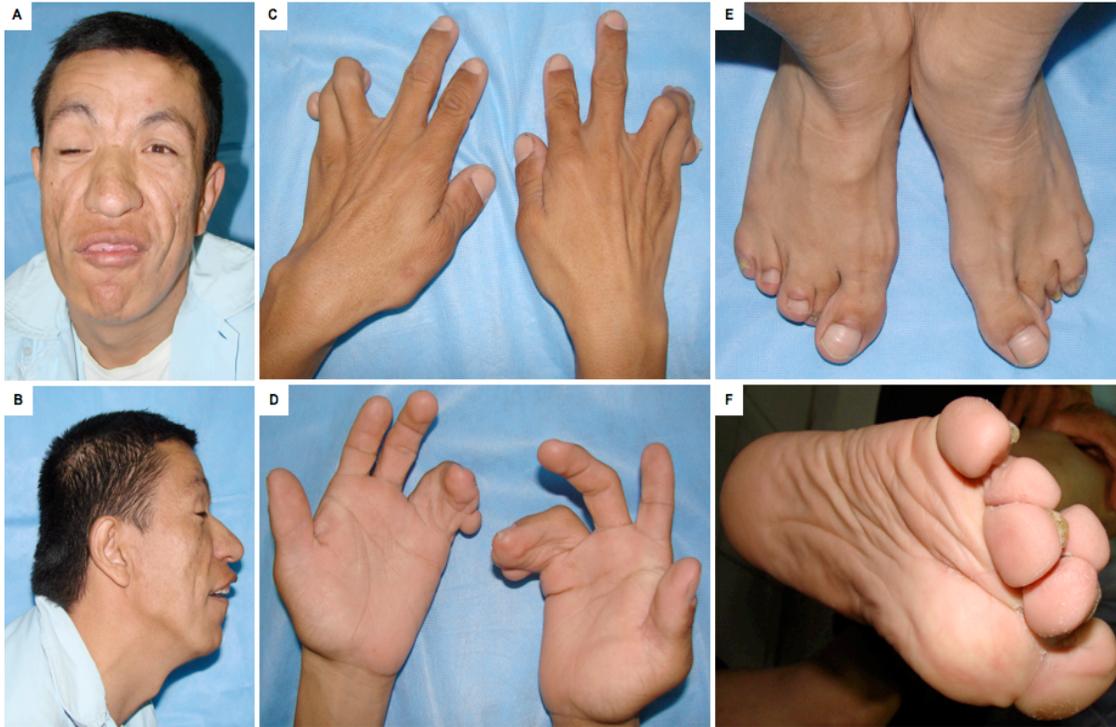


FIGURA 9. FENOTIPO DEL CASO ÍNDICE. Se muestran las dismorfias faciales tanto en vista frontal (A) como de perfil (B). También se muestran las alteraciones en los dígitos de las manos tanto en vista dorsal (C) como ventral D); así como las alteraciones de los pies como son la sindactilia bilateral del 2º y 3º orjejo (E) y la polidactilia postaxial del pie izquierdo (F).

Algunos estudios paraclínicos solamente fueron practicados al caso índice. Entre éstos, los análisis radiográficos de las manos mostraron sindactilia bilateral ósea del 4º y 5º dedo, así como la braquidactilia de la falange intermedia del 2º dedo, además de la presencia de polidactilia bilateral postaxial tipo B (Figura 10A). En los pies se observaron tanto la duplicación de la falange distal del 4º orjejo izquierdo como la polidactilia postaxial tipo A en el pie derecho (Figura 10B). La radiografía de columna confirmó la escoliosis a expensas de los cuerpos vertebrales 10 y 11 (Figura 10C). Por otra parte, la

resonancia magnética cerebral reveló una atrofia cortical parietal e hipoplasia tanto del cuerpo calloso como hipoplasia olivo ponto cerebelosa (Figura 10D,E). Finalmente, el ultrasonido renal reveló riñones hipoplásicos (Figura 10F).

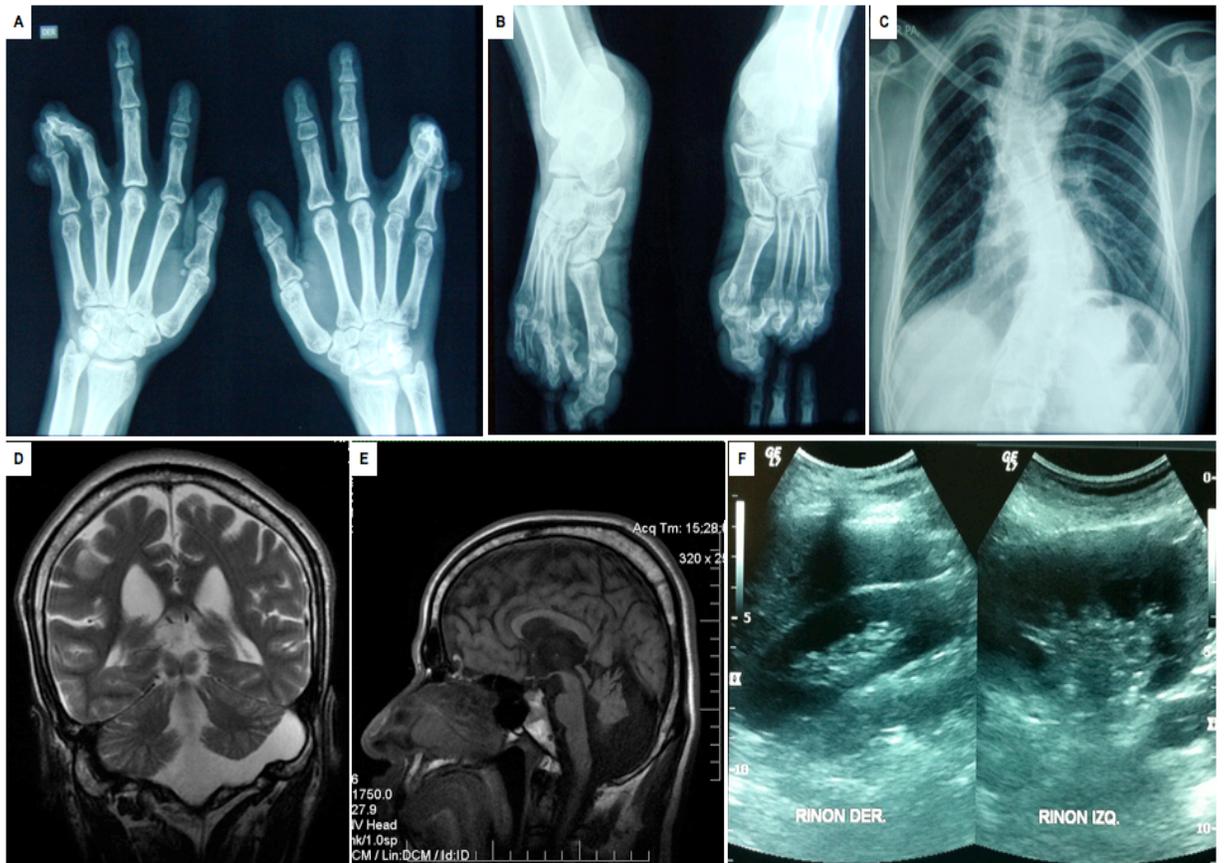


FIGURA 10. ESTUDIOS PARACLÍNICOS EN EL CASO ÍNDICE. A) Radiografías de las manos confirmando la braquidactilia de la falange media de los dedos 2º, 4º y 5º, así como la sindactilia ósea del 4º al 5º dedos. B) Radiografía de los pies. C) Radiografía de tórax, D) Resonancia magnética de cerebro en corte coronal y E) en corte sagital; F) ultrasonido renal.

2.1.2 Paciente IV:17.

Masculino de 43 años de edad al momento de la valoración clínica. Él sólo fue evaluado clínicamente y comparte la mayoría de las características con el caso índice, las cuales incluyen; el retraso mental de leve a moderado, las alteraciones esqueléticas, las dismorfias faciales y las anormalidades de los dígitos, con excepción de la polidactilia (Figura 11E-H). Entre las pocas diferencias resaltan: la frente rugosa y el estrabismo divergente izquierdo. Aunque no se le realizaron estudios de gabinete, se asume por la exploración clínica que están presentes tanto la escoliosis, como los riñones hipoplásicos, así como las alteraciones en el cerebro.

2.1.3 Paciente V:12.

Masculino de 26 años de edad al momento de la valoración clínica, presenta un retraso mental más leve que los varones afectados de la IV generación, pero sí comparte la mayoría de las características fenotípicas con el caso índice, como son la braquicefalia y las dismorfias faciales; sin embargo, no presenta ni la ptosis, ni la implantación baja de las orejas. Las anormalidades digitales presentan ligeras variaciones, por ejemplo, en las manos la braquidactilia bilateral cursa con ausencia total de los pliegues

interfalángicos distales en los dedos 2º, 4º y 5º, además muestra una clinodactilia bilateral del 5º dedo. La polidactilia postaxial esta presente solo en el pie derecho, y tiene la uña bifurcada del 3^{er} ortejo (Figura 11I-L).

2.1.4 Paciente V:17.

Masculino de 23 años de edad, este es el último individuo afectado que pudo ser examinado en la familia. Presenta el retraso mental más leve entre todos los varones, lo cual le permitió concluir aunque con dificultades sus estudios de educación primaria. Él comparte con todos los afectados la braquicefalia, la mayoría de las dismorfias faciales con el caso índice y las anomalías de las extremidades con el individuo V:12 de la misma generación. Particularmente presenta prognatismo y aunque al nacimiento presentó la polidactilia bilateral postaxial el dígito extra le fue removido quirúrgicamente a la edad de 5 años. Presenta también la braquidactilia bilateral en las manos pero esta vez con una ausencia total del pliegue interfalángico distal bilateral en los dedos 2º, 4º y 5º (Figura 11M-P).



FIGURA 11. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS EXTERNAS DE LOS 4 VARONES AFECTADOS. Se muestran en forma vertical las fotos representativas de los rostros, manos y pies, respectivamente de los cuatro varones afectados, donde se pueden observar las dismorfias faciales de frente (A,E,I,M) y de perfil (B,F,J,N); así como las alteraciones en las manos (C,G,K,O) y las anomalías en los pies (D,H,LP).

2.2 COMITÉ DE ÉTICA.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo el número de registro GN10-001. Las cartas de consentimiento informado fueron firmadas por las madres de los pacientes afectados al iniciar el proyecto.

2.3 ANÁLISIS CITOGENÉTICO CONVENCIONAL CON CARIOTIPO BANDAS GTG.

Se obtuvieron 5ml de sangre periférica (con heparina como anticoagulante), y se llevó a cabo la siembra y cosecha de la muestra de linfocitos siguiendo el protocolo descrito por la Asociación de Tecnólogos Genéticos AGT (Brown et al,1997), para su posterior tinción con Wright y Giemsa siguiendo el protocolo estandarizado en el Departamento de Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Para realizar el análisis citogenético se contaron 20 metafases, se analizaron 6 y finalmente se registraron fotográficamente dos de ellas. El análisis citogenético se realizó utilizando el analizador de imágenes Cytovision 3.9 System (Applied imaging, Grand Rapids, MI). El análisis alcanzó una resolución de 550 bandas utilizando y el resultado se emitió de acuerdo a la

nomenclatura del sistema internacional de citogenética Humana (ISCN) de 2009.

2.4 ARREGLO DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (aCGH).

Para la búsqueda de microdeleciones/microduplicaciones (variaciones en el número de copia o CNVs) en el genoma del caso índice se solicitó un estudio de hibridación genómica comparativa en microarreglo de sondas de oligos (aCGH). Para este propósito se colectó una muestra de sangre periférica en EDTA la cual fue enviada al laboratorio de diagnóstico molecular (GeneDx, Gaithersburg, MD, USA). El aCGH consta del microarreglo *GenomeDX* v3.2, el cual contiene ~105,000 sondas de oligonucleótidos que han sido seleccionadas (en base la secuencia del genoma humano hg18); para conseguir una cobertura promedio de 1 sonda cada 37 kb a través de secuencias no repetitivas conocidas del genoma humano (22 autosomas, junto con los cromosomas X y Y). Además, el aCGH está enriquecido con 2 a 10 veces más sondas para alcanzar una cobertura de 1 sonda cada 9-17 kb en: 150 loci cromosómicos con significado clínico, regiones de alta densidad génica, regiones pericentroméricas, subteloméricas y el cromosoma X completo. En base a su diseño, el aCGH puede detectar regiones de desbalance genómico tan pequeñas como 50 kb en regiones de seleccionadas que están asociadas con

síndromes de delección/duplicación y tan pequeñas como 200 kb en otras áreas del genoma.

2.5 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO.

Para este fin, se incluyeron los 4 binomios madre-hijo afectado, que aceptaron participar en el estudio. El DNAg de cada muestra se obtuvo a partir de sangre periférica utilizando el estuche comercial DNeasy Blood and Tissue Kit Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. El DNA se cuantificó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop y se dividió en alícuotas de 50ng/ μ L, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su uso.

2.6 GENOTIPIFICACIÓN.

El proceso de genotipificación se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) multiplex utilizando el estuche comercial Linkage Mapping Set versión 2.5 HD5 (*Applied Biosystem*, Foster City, CA, USA) de alta densidad. El estuche consiste de 48 marcadores microsatélites (STRs) (Cuadro 2) que cubren el cromosoma X a una resolución de 5cM. Para la PCR multiplex los primers están marcados con diferentes fluoróforos (6-

FAM™, VIC™ o NED™) lo que permitió realizar mezclas de marcadores y analizarlos en una sola línea mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI 3100 *Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystem)*. El análisis de fragmentos se realizó utilizando el software GeneMapper (*Applied Biosystem*).

CUADRO 2. MARCADORES DEL ESTUCHE LINKAGE MAPPING SET VERSIÓN 2.5 HD5.

Panel	Locus	Dye Label	Het	ASR		GT (1347-02)	
						87	93
28	DXS1227	FAM	0.73	79	99	87	93
	DXS990	FAM	0.74	122	132	122	126
	DXS986	FAM	0.77	151	181	163	163
	DXS987	FAM	0.83	205	229	207	217
	DXS993	FAM	0.79	267	293	269	271
	DXS1073	FAM	0.80	306	334	310	316
	DXS8091	VIC	0.78	80	102	82	88
	DXS1106	VIC	0.67	126	140	130	130
	DXS1047	VIC	0.81	156	172	158	166
	DXS1001	VIC	0.82	191	211	195	205
	DXS1068	VIC	0.79	244	264	252	254
	DXS1214	VIC	0.79	284	298	290	290
	DXS8055	VIC	0.65	312	324	314	316
	DXS8051	NED	0.88	104	134	116	120
	DXS8043	NED	0.80	146	180	146	164
	DXS1060	NED	0.84	244	268	248	254
	DXS1226	NED	0.84	280	302	284	298
	DXS991	NED	0.80	313	341	313	327
83	DXS1224	VIC	0.55	160	174	162	162
	DXS7593	VIC	0.74	214	237	218	227
	DXS8009	VIC	0.63	252	266	257	259
	DXS8067	NED	0.73	91	115	103	103
	DXS8019	NED	0.82	160	178	165	169
	DXS8088	NED	0.62	250	266	262	264
84	DXS1223	FAM	0.77	139	161	147	157
	DXS1039	FAM	0.56	177	201	185	189
	DXS8045	FAM	0.54	215	227	220	220
	DXS7108	FAM	0.74	236	258	238	256
	DXS1196	VIC	0.79	212	232	214	216
	DXS1062	NED	0.75	89	115	102	102
	DXS8077	NED	0.72	179	199	187	187
	DXS8064	NED	0.60	214	230	216	220
	DXS1216	NED	0.68	242	256	246	246
85	DXS1205	FAM	0.65	184	202	186	192
	DXS8106	FAM	0.72	264	290	270	278
	DXS8102	VIC	0.56	99	105	100	102
	DXS984	VIC	0.71	160	190	182	184
	DXS8069	NED	0.66	134	148	134	140
	DXS8083	NED	0.73	163	181	165	165
	DXS8020	NED	0.80	216	246	230	236

Panel	Locus	Dye Label	Het	ASR		GT (1347-02)	
						92	96
86	DXS8080	FAM	0.69	76	104	92	96
	DXS1055	FAM	0.68	142	158	146	150
	DXS8015	FAM	0.77	179	195	189	189
	DXS1061	FAM	0.78	228	248	240	244
	DXS1217	VIC	0.60	235	253	239	247
	DXS8090	VIC	0.77	288	306	298	302
	DXS998	NED	0.58	114	122	116	118
	DXS1059	NED	0.71	184	204	200	202

2.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para facilitar el uso en etapas posteriores, las PCRs de los 48 STRs se llevaron a cabo en un formato de placa de 96 pozos de 0.2 ml (MicroAmp® 96-Well Reaction Plate). Se prepararon las mezclas maestras de reacción de PCR para cada marcador (hasta 12 marcadores/placa) y se agregaron en forma individual (columnas) a cada pozo que contenía el DNAG de un solo individuo (filas, hasta 6 diferentes muestras/placa).

Las concentraciones de reactivos en las mezclas de PCR se montaron de acuerdo a las recomendaciones del proveedor como sigue:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer II GeneAmp® PCR	10X	1X
MgCl ₂	25mM	2.5mM
dNTP's	10mM	0.25mM
Primer mix	5μM	0.33μM
AmpliAq Gold® DNA polimerasa	5U/μL	0.6U
DNAG	50ng/μL	60ng

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μL. En cada placa se incluyó siempre como control positivo el DNAG del individuo CEPH 1347-02 y un control negativo consistente en sólo agua grado

biología molecular. Las muestras fueron analizadas por duplicado para cada marcador.

Una vez preparadas las reacciones de PCR, éstas se colocaron en un termociclador PCR Express (Hybaid) y se amplificaron con el siguiente programa:

Paso inicial	10 ciclos			20 ciclos			Paso final
HOLD 12 min. 95°C	Desnaturalización	Desnaturalización	Apareamiento	Apareamiento	Extensión	Extensión	HOLD 10 min. 72°C
	Ciclo			Ciclo			
	94°C/15 seg.	55°C/15 seg.	72°C/30 seg.	89°C/15 seg.	55°C/15 seg.	72°C/30 seg.	

Una vez concluida la reacción la placa se almacenó a 4°C protegida de la luz hasta el análisis de fragmentos.

2.6.2 *Análisis de fragmentos.*

Para este paso se realizaron mezclas de los productos de PCR en tubos de 0.2 µL, de tal manera que los productos fueran diferentes en tamaño y en tipo de fluoróforo, de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Las mezclas de los productos se transfirieron a una placa de 96 bajo las siguientes concentraciones y en la siguiente secuencia:

- 1 Se mezclaron los siguientes productos de PCR para un panel:
 - ♦ 2.5 µl del primer producto de PCR marcado con 6-FAM™
 - ♦ 2.5 µl del primer-producto de PCR marcado con VIC™
 - ♦ 5 µl del primer producto de PCR marcado con NED™
 - ♦ 40 µl de agua ultrapura

Nota: Los productos de PCR marcados con 6-FAM™ y VIC™ fueron diluidos 1:20, mientras que los marcados con NED™ se diluyeron 1:10.

- 2 Se repitió la misma relación de mezcla con los segundos, terceros marcadores, etc., hasta completar el panel. Lo mismo se realizó con el resto de los paneles.

Nota: Si no se contaba con los 3 fluoróforos, se reemplazó el volumen del fluoróforo ausente con un volumen igual de agua ultrapura, para mantener la relación constante.

- 3 Se taparon los pozos de la placa.
- 4 Se agitó la placa con vortex brevemente y se centrifugó brevemente a 2500 rpm en una microcentrífuga para placas MPS1000™ Mini Plate Spinner (Labnet International, Inc) para colectar las muestras.

Antes de cargar las muestras en el secuenciador, se realizaron las siguientes nuevas mezclas que incluyen el marcador de peso molecular

GeneScan™-500 LIZ™ Size Standard y formamida para desnaturalizar como a continuación se describe:

- 1 Se preparó una mezcla de formamida:LIZ usando:
900 µl de formamida Hi-Di™
50 µl del estándar de peso molecular GeneScan™-500LIZ™
- 2 Para cargar las reacciones, se mezclaron 0.5 µl de la mezcla de productos de PCR con 10 µl de la mezcla formamida:LIZ y se colocaron en los pozos de la placa.

Las muestras fueron desnaturalizadas a 95°C por 10 min., posteriormente la placa fue colocada en frío por 5 minutos antes de colocar la placa en el secuenciador.

Finalmente, las mezclas de productos de PCR fueron resueltas mediante electroforesis capilar en un secuenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer.

2.6.3 Análisis de datos.

Los datos de la corrida de cada placa fueron importados al programa ABI PRISM® 3100 GeneMapper™ para realizar el análisis de fragmentos, para lo cual se realizó la siguiente secuencia:

1. Se seleccionó el Panel Manager en la barra de navegación.

2. Se eligió la carpeta titulada LMS HD5-V2.5, que corresponde al estuche que se utilizó para realizar la genotipificación.
3. Posteriormente, se seleccionó el tipo de panel que se desea analizar. El cuadro 2 muestra los 5 paneles utilizados para realizar el análisis.
4. Cada electroferograma correspondiente a cada paciente se analizó de forma individual y se asignó el genotipo correspondiente a cada marcador STR (tamaño de los alelos en pb y posteriormente en nomenclatura de números cardinales del 1 al 4 de acuerdo a la gama de alelos de cada marcador, empezando por 1 del alelo más pequeño).

2.7 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.

La fase cromosómica de los varones afectados fue obtenida directamente y de forma manual a partir de los datos de genotipificación, en base a que se conoce el orden exacto de los marcadores a lo largo del cromosoma X. Por otro lado, para determinar la fase de cada cromosoma X en las madres portadoras, se tomó como base la fase obtenida del caso índice (asumiendo ser un cromosoma completo sin recombinación y los marcadores diferentes se tomaron como el otro cromosoma de su madre). La fase cromosómica de las tres madres restantes fue obtenida de la misma manera, excepto que esta vez se asignó un color distinto a los alelos diferentes para cada marcadores. Para la designación final de los haplotipos se buscaron

bloques de marcadores (haplotipos) que fueran compartidos entre todos cromosomas X, asignando el color tomando en cuenta el orden jerárquico de las generaciones (preferencia de la generación III > IV > V).

2.8 ANÁLISIS DE LIGAMIENTO.

Se llevó a cabo de forma manual un análisis paramétrico de dos-puntos utilizando la fórmula original descrita por Morton, (Morton., 1955), que se expone abajo, pero con adecuaciones para una herencia ligada a X (un solo cromosoma en varones y fase conocida en las madres), considerando una penetrancia completa en hombres, sin heterogeneidad de *locus* y con una frecuencia alélica de 0.0001.

$$LOD = \text{Log}_{10} \frac{\text{Probabilidad ligamiento}}{\text{Probabilidad no ligamiento}}$$

$$LOD = \text{Log}_{10} \frac{(\theta)^R (1-\theta)^{NR}}{(0.5)^R (0.5)^{NR}}$$

Donde:

1- θ = frecuencia de no recombinación

θ = frecuencia de recombinación

NR = número de no recombinantes

R = número de recombinantes

Con el fin de maximizar el ligamiento genético y minimizar los posibles errores en las fases derivadas del análisis de haplotipos para las cuatro madres portadoras, el valor de puntuación LOD fue calculado a partir de la suma de cuatro análisis de ligamiento independientes. Para cada análisis independiente, el grupo estuvo compuesto por un varón afectado y las cuatro madres portadoras.

2.9 ANÁLISIS DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X (ICX).

Para evaluar posibles alteraciones en el patrón de inactivación del cromosoma X en cada una de las cuatro madres portadoras, se utilizó el método de amplificación del gen del receptor de andrógenos humano (HUMARA) descrito inicialmente por Allen et al, 1992, pero con la variación de detección fluorescente (Allen et al 1994). Este método hace uso del gen HUMARA, el cual es altamente polimórfico y responde a la inactivación del cromosoma X, para establecer la proporción relativa de inactivación entre ambos cromosomas en una mujer.

Previo a la amplificación, cada DNAg se digirió con la enzima de restricción *HpaII* sensible a metilación, para diferenciar el alelo no metilado del metilado, como se indica a continuación:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer 1 (NEB)	10X	1X
<i>Hpa</i> II (NEB)	10 U/ μ L	0.1 U
DNAg	30 ng/ μ L	150 ng

El volumen final de reacción fue de 10 μ L (ajustando con agua ultrapura) e incubado toda la noche a 37°C. Posteriormente la enzima fue inactivada a 65°C por 20 min. Las reacciones se guardaron a 4°C hasta su uso.

2.10 AMPLIFICACIÓN DEL GEN *HUMARA* MEDIANTE PCR.

Para la amplificación del gen *HUMARA* se utilizaron los siguientes iniciadores descritos por Allen y cols., en 1992:

ARfor: 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'

ARrev_6-FAM™: 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGTC-3'

Las muestras de DNAg sin digerir, así como el previamente digerido con *Hpa*II se amplificaron bajo las siguientes condiciones de reacción:

Reactivo	Concentración inicial	Concentración final
Buffer PCR	10X	1X
Solución-Q	5X	0.5X
dNTP's	10mM	0.2mM
Primer ARfor	10pmol/ μ L	5pmol
Primer ARrev	10pmol/ μ L	5pmol
HotStarTaq DNA Polimerasa	10U/ μ L	2U
DNAg (nativo o digerido <i>Hpa</i> II)	15ng/ μ L	75ng

Todas las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l y se preparó una mezcla maestra para cada corrida. En cada placa se incluyó siempre como control positivo de digestión, el DNAg de los varones afectados, porque no deben estar metilados. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

Una vez preparadas las reacciones de PCR, éstas se protegieron de la luz y se colocaron en un termociclador PCR Express (Hybaid) bajo el siguiente programa de ciclado:

Etapas	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	15 min.
30 ciclos que incluyen:		
Desnaturalización	95°C	30 seg.
Apareamiento	58°C	30 seg.
Síntesis	72°C	30 seg.
Desnaturalización extra	72°C	1 min.

Los productos de PCR fluorescentes se trataron, se resolvieron y se analizaron de la misma manera que para los productos de PCR fluorescentes en la genotipificación.

El valor de la ICX fue calculado con la siguiente fórmula, la cual se dedujo a partir de la descripción dada por Sharp et al., 2000:

$$\% \text{inactivación A1} = [\text{CR} \div (\text{CR} + 1)] \times 100$$

$$\text{CR} = \left(\frac{\text{altura del pico del alelo A1 digerido}}{\text{altura del pico del alelo A2 digerido}} \right) \div \left(\frac{\text{altura del pico del alelo A1 no digerido}}{\text{altura del pico del alelo A2 no digerido}} \right)$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 DELINEACIÓN DEL FENOTIPO.

El caso índice (IV.5) se examinó clínica y molecularmente con la finalidad de establecer una posible alteración genética como la causa de las anomalías congénitas múltiples que presenta. Primero mediante un análisis de cariotipo de bandas GTG (550 bandas de resolución) y posteriormente un aCGH (105K). Ambas pruebas no evidenciaron la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales, ni de microdeleciones/microduplicaciones no incluidas en el aCGH.

Posteriormente, se identificaron otros 7 varones afectados que son familiares del caso índice por línea materna, de estos solo 3 fueron examinados clínicamente y todos compartían características fenotípicas con el caso índice (IV.5). El árbol genealógico completo (Figura 8) mostró solamente varones

afectados y no se detectó transmisión de varón a varón. Las madres de estos pacientes son fenotípicamente normales. Se observó una expresión clínica variable entre los varones de las generaciones IV y V.

En conjunto, las anomalías digitales encontradas en los varones (Figura 12) resultaron ser una característica grupal muy específica, en las manos incluye: PAP-B bilateral, braquidactilia bilateral única del 2º, 4º y 5º dedos (por ejemplo, el 4º dedo no está incluido en la braquidactilia tipo A) con ausencia total del pliegue interfalángico distal de los mismos dedos, camptodactilia bilateral y sindactilia cutánea bilateral del 4º y 5º dedos. En los pies las anomalías incluyen: PAP-A del pie derecho o del izquierdo y la sindactilia cutánea del 2º y 3º orjejo. Las anomalías digitales junto con el retraso mental y la talla baja representan los criterios mayores del fenotipo, mientras que tanto las dismorfias faciales como la braquicefalia, la escoliosis, la atrofia parietal cortical y la hipoplasia, tanto olivopontocerebellar como del corpus callosum representaron los criterios menores.

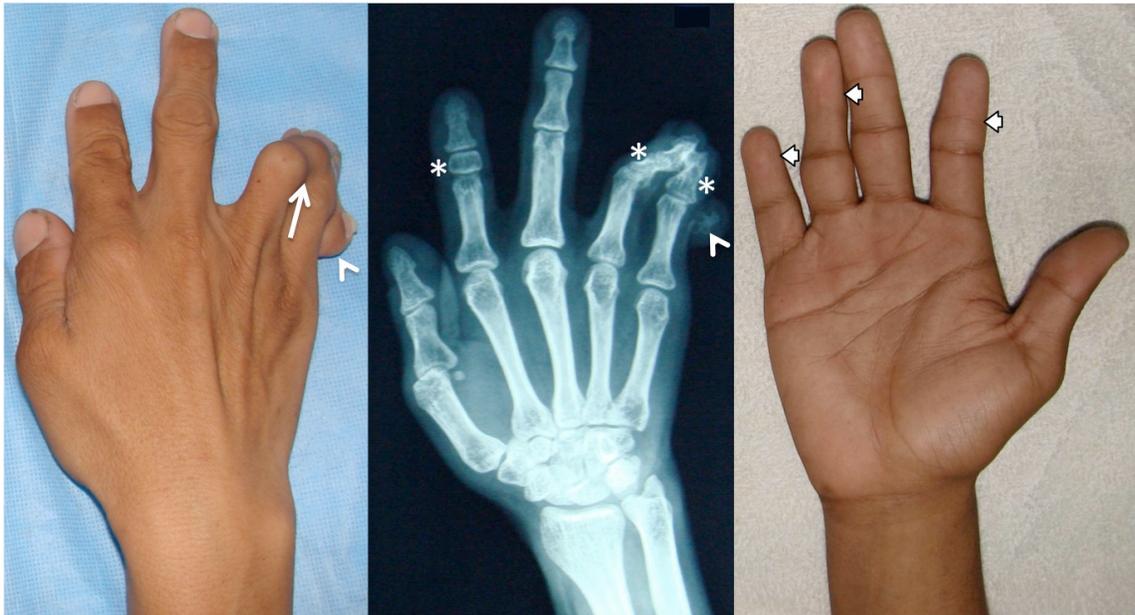


FIGURA 12. ANORMALIDADES DIGITALES DEL FENOTIPO. A-B) Fotografía y radiografía de la mano derecha del caso índice (IV.5), respectivamente. La flecha blanca indica la sindactilia, las puntas de flecha la PAP-B, mientras que los asteriscos indican la braquidactilia. C) La fotografía muestra la mano derecha del varón V.17 donde claramente se evidencia la ausencia de los pliegues interfalángicos distales como resultado de la braquidactilia (cabezas de flecha blancas).

3.2 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Para determinar si la enfermedad presente en esta familia podría ser el resultado de un desorden alélico, se realizó una búsqueda en las bases de datos de (ncbi.nlm.nih.gov/, geneatlas.org/ y ensamble.org/index.html) y un análisis con el software POSSUM Web (possum.net.au/). Los datos bioinformáticos predijeron la presencia de cuatro formas alélicas de posibles

síndromes cuya comparación en base a las características fenotípicas de cada uno de los varones afectados se resumen en el Cuadro 3.

CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA FAMILIA Y SU DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.

Características	IV-5	IV-17	V-12	V-17	OFDI	OFDII	Síndrome Greig	Simpson-Golabi-Behmel
Herencia	Ligada-X	Ligada-X	Ligada-X	Ligada-X	Ligada-X	AR	AD	Ligada-X
Braquicefalia	✓	✓	✓	✓	-	-	macrocefalia	macrocefalia
Braquidactilia (2° dedo)	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓
Braquidactilia (4° dedo)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
Braquidactilia (5° dedo)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓
Sindactilia de 4°-5° dedos	bilateral	bilateral	bilateral	bilateral	✓	-	✓ (3-4)	✓
Sindactilia de 2°-3° orjeos	bilateral	bilateral	bilateral	bilateral	✓	-	✓ (1-3)	✓
Polidactilia postaxial manos	bilateral	-	bilateral	bilateral	✓	✓	✓	✓
Polidactilia postaxial pies	derecha	derecha	derecha	izquierda	-	✓	-	✓
Estatura	baja	baja	baja	baja	-	-	alta	alta
Retraso mental de leve a moderado	✓	✓	✓	✓	✓	-	✓	✓
Riñones	hipoplásicos	NE	NE	NE	poliquísticos	-	-	nefromegalia
Escoliosis	✓	✓	✓	✓	-	-	-	✓
Criterio de exclusión					Hamartomas Letal varones	Herencia	Herencia Sobrecrecimiento	Sobrecrecimiento

NE= no evaluado
POSSUM Web

3.3 BÚSQUEDA DE ALTERACIONES NUMÉRICAS Y ESTRUCTURALES.

Después del análisis clínico del caso índice y con el fin de establecer una posible alteración genética de naturaleza cromosómica se le realizó un estudio de cariotipo de bandas GTG (Figura 13). El cariotipo no evidenció alteraciones numéricas o estructurales visibles a la resolución de 550 bandas, por lo que la fórmula cromosómica de 46, XY resultó ser la de un varón normal.

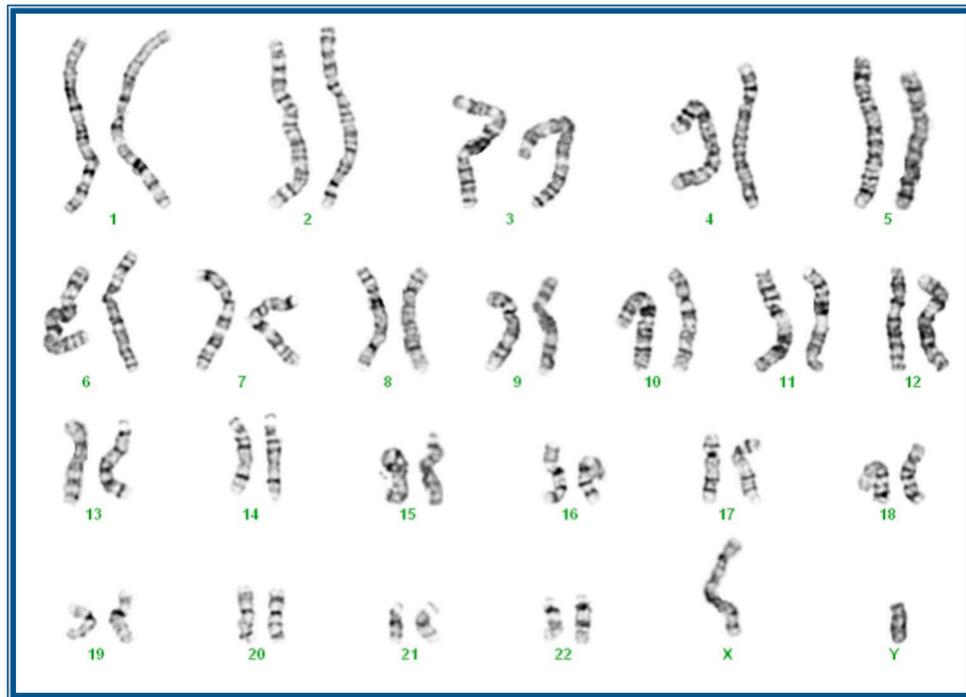


FIGURA 13. CARIOTIPO DE BANDAS GTG DEL CASO ÍNDICE. La fotografía representa el cariograma de 550 bandas de resolución. Se observan los 22 pares de cromosomas autosómicos y el par de cromosomas sexuales con ausencia de alteraciones numéricas o estructurales visibles a esta resolución. La fórmula cromosómica fue 46,XY.

3.4 BÚSQUEDA DE MICRODELECCIONES/MICRODUPLICACIONES.

Con el fin de buscar alguna mutación <5 Mb o quizás evidenciar un síndrome de genes contiguos en el DNA del caso índice, se procedió a la búsqueda de la presencia de microdelecciones/microduplicaciones como causas probables responsables del fenotipo, para esto se realizó un análisis de aCGH (105K) tanto al caso índice como a sus padres.

El aCGH mostró un perfil normal para el caso índice y sus padres, sin anomalías en el número de copia en al menos 150 regiones de significancia clínica conocida incluidas en el arreglo. (Anexo 1, resultado enviado por el laboratorio GeneDx).

3.5 GENOTIPIFICACIÓN.

Para mapear la región que se segrega con el fenotipo en esta familia y probar la hipótesis de un patrón de herencia ligado a X, se llevó a cabo la genotipificación de los individuos afectados y sus respectivas madres portadoras (binomios) con 48 marcadores STR dispersos a lo largo del cromosoma X distribuidos a una densidad de 5cM. Algunos electroferogramas representativos de la genotipificación se muestran en la Figura 14.

Todos los alelos encontrados excepto aquel del marcador DXS8091 en IV.5 (70 pb, rango normal 80-102 pb), estuvieron dentro del rango de tamaño esperado y se pudieron distinguir claramente en las mujeres los dos alelos, incluso aquellos que diferían en una repetición de dinucleótido. También frecuentemente se encontraron tartamudeos (stutters) de los alelos, lo que es normal para STRs con repeticiones de dinucleótidos, por lo que siempre se eligió como el alelo verdadero el pico de mayor tamaño, que coincidentemente siempre era el de mayor intensidad de fluorescencia relativa (Figura 14).

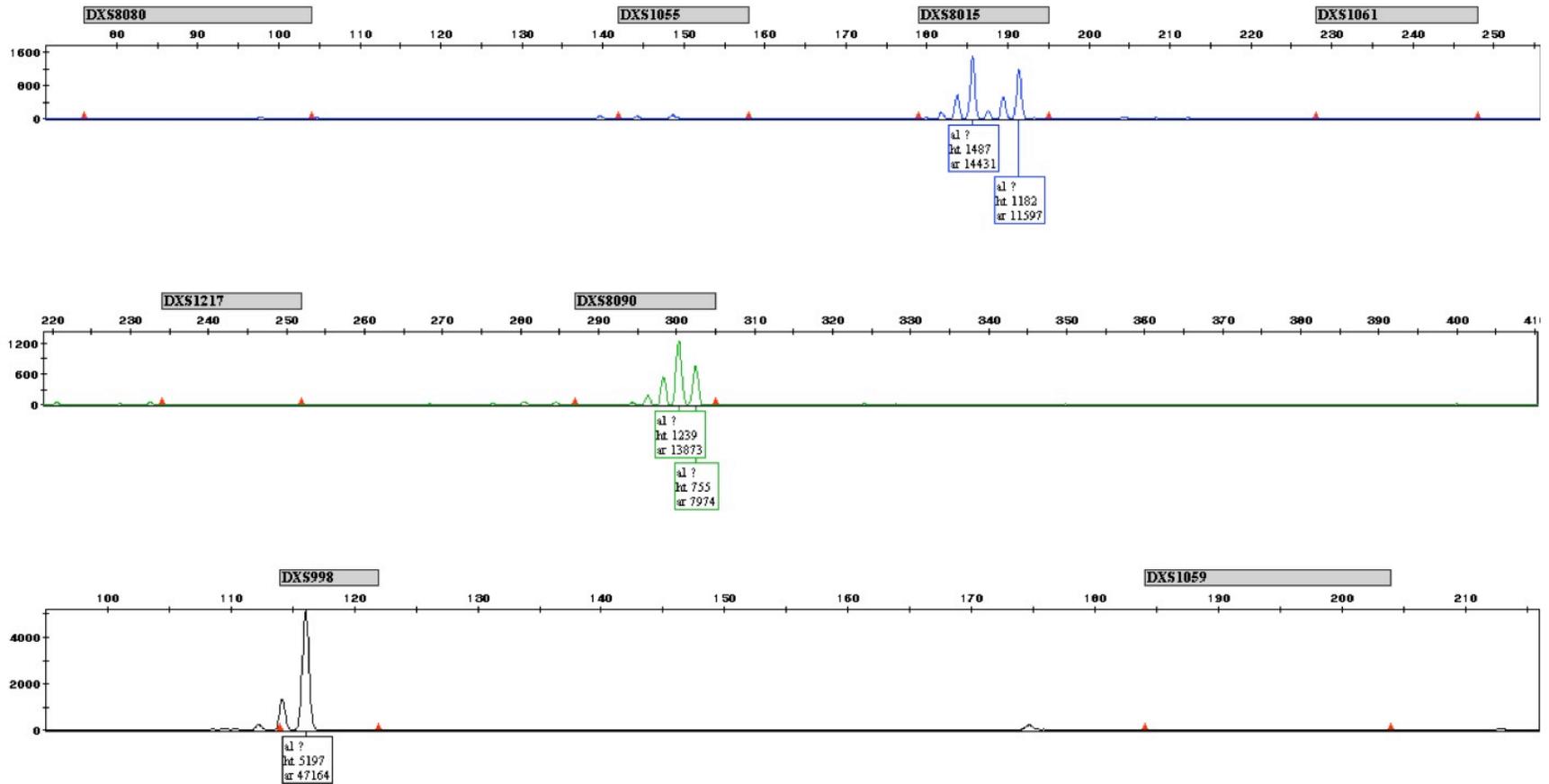


FIGURA 14. EJEMPLIFICACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN. Los electroferogramas muestran los resultados de la genotipificación de tres marcadores de una de las madres portadoras (III.7). Observe que la madre es heterocigota para dos marcadores DXS8015 y DXS8090 (dos picos), mientras que es homocigota para el marcador DXS998 (un solo pico). Las barras grises indican el nombre del marcador STR, así como el rango de alelos que presenta y en el eje de las Y las intensidades relativas de fluorescencia.

Los resultados de la genotipificación de los 48 marcadores STRs incluidos fueron traducidos a la nomenclatura numérica de alelos esperados para cada marcador. Estos resultados para cada uno de los 8 individuos se muestran en el Cuadro 4, donde los alelos en las madres portadoras se muestran en la celda de color gris mientras los correspondientes a los hijos afectados en la celda de color blanco.

CUADRO 4. RESULTADOS DE LA GENOTIPIFICACIÓN DEL CROMOSOMA X.

MARCADOR	IV.5	III.3	IV.17	III.7	V.17	IV.10	V.12	IV.7
DXS1060	1	1,1	1	1,2	1	1,1	2	1,2
DXS1223	3	3,4	4	1,4	2	2,4	1	1,2
DXS8051	1	1,3	3	2,3	4	3,4	2	2,4
DXS7108	4	4,4	1	1,2	3	3,4	2	2,3
DXS1224	1	1,1	2	1,2	1	1,1	1	1,1
DXS987	4	3,4	1	1,2	5	3,5	3	3,5
DXS8019	3	3,4	1	1,2	4	4,4	4	4,4
DXS7593	2	2,2	3	3,3	1	1,2	2	1,2
DXS1226	1	1,3	4	4,5	2	2,2	2	2,2
DXS1061	2	2,3	1	1,3	3	2,3	3	2,3
DXS1214	4	3,4	1	1,2	1	1,1	1	1,1
DXS8102	5	3,5	4	1,4	2	2,4	2	2,4
DXS8090	2	1,2	1	1,3	2	2,2	2	2,2
DXS1068	1	1,1	1	1,2	2	2,2	2	2,2
DXS8015	2	1,2	1	1,1	3	1,3	3	1,3
DXS993	1	1,1	1	1,1	1	1,1	1	1,1
DXS8080	3	2,3	3	1,3	3	2,3	3	2,3
DXS8083	3	3,3	3	1,3	3	2,3	3	2,3
DXS1055	1	1,2	1	1,2	1	1,2	1	1,2
DXS1039	2	2,2	2	1,2	2	2,2	2	2,2
DXS991	1	1,2	1	1,2	2	1,2	1	1,1
DXS1216	1	1,1	1	1,2	2	1,2	1	1,1
DXS986	1	1,1	1	1,3	3	2,3	1	1,2
DXS1196	2	1,2	2	2,2	2	2,3	2	2,3
DXS1217	2	2,2	2	2,2	2	1,2	2	1,2
DXS990	3	1,3	3	1,3	1	1,2	1	1,2
DXS8077	3	3,3	3	2,3	2	1,2	2	1,2
DXS8020	1	1,2	3	3,4	4	2,4	4	2,4
DXS1106	3	3,3	1	1,4	4	2,4	4	2,4
DXS1059	1	1,2	2	2,2	2	2,2	2	2,2
DXS8088	1	1,2	2	1,2	1	1,1	1	1,1
DXS8055	1	1,1	1	1,1	1	1,1	1	1,1
DXS8064	1	1,1	2	2,3	3	1,3	3	1,3
DXS8067	3	2,3	2	1,2	1	1,4	1	1,4
DXS1001	1	1,1	1	1,2	1	1,1	1	1,1
DXS8009	1	1,2	3	3,3	3	1,3	3	1,3
DXS1047	2	1,2	3	2,3	3	1,3	2	1,2
DXS1062	3	2,3	2	2,2	2	2,2	1	1,2
DXS984	2	2,2	1	1,1	1	1,1	3	1,3
DXS1205	1	1,2	3	1,3	3	3,3	1	1,3
DXS1227	3	3,4	4	2,4	1	1,4	1	1,1
DXS8106	3	2,3	3	1,3	4	3,4	1	1,4
DXS8043	3	3,3	1	1,2	3	2,3	1	1,3
DXS8045	2	2,2	1	1,2	2	2,2	1	1,2
DXS998	1	1,1	1	1,2	2	2,2	1	1,2
DXS8091	2	1,2	1	1,3	1	1,3	1	1,1
DXS8069	2	2,2	3	2,3	1	1,2	3	1,3
DXS1073	2	1,2	3	2,3	3	2,3	3	3,3

3.6 DETERMINACIÓN DE LOS HAPLOTIPOS.

Para determinar la fase de los cromosomas X de las madres y los haplotipos, primero se tomó como base el cromosoma X completo del caso índice (IV.5) como un cromosoma X sin recombinación y se le asignó arbitrariamente el color verde. Por lo tanto la madre del caso índice teniendo dos cromosomas X, a uno de ellos se le asignó el color verde y los marcadores no coincidentes se les asignó arbitrariamente el color amarillo. El haplotipo compartido entre los individuos afectados se le asignó el mismo color verde que el caso índice, mientras que cuando los alelos no coincidían, se les asignaba un diferente color; esto se repitió para los restantes 3 afectados y sus respectivas madres. De esta manera se lograron deducir hasta siete haplotipos (colores) en los cuatro binomios madre-hijo, como se muestra en el Cuadro 5.

El haplotipo que se comparte (color verde, Cuadro 5) entre los cuatro varones afectados inicia comúnmente en el marcador DXS993 (Xp11.4), pero termina variablemente en los marcadores: DXS8077 (Xq21.33) para el varón IV.17, en DXS1217 (Xq21.31) para el varón V.12 y en DXS1039 (Xp11.23) para el varón V.17.

CUADRO 5. ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS.

MARCADOR	IV.5	III.3	IV.17	III.7	V.17	IV.10	V.12	IV.7				
DXS1060	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	2	1
DXS1223	3	3	4	4	4	1	2	2	4	1	1	2
DXS8051	1	1	3	3	3	2	4	4	3	2	2	4
DXS7108	4	4	4	1	1	2	3	3	4	2	2	3
DXS1224	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
DXS987	4	4	3	1	1	2	5	5	3	3	3	5
DXS8019	3	3	4	1	1	2	4	4	4	4	4	4
DXS7593	2	2	2	3	3	3	1	1	2	2	2	1
DXS1226	1	1	3	4	4	5	2	2	2	2	2	2
DXS1061	2	2	3	1	1	3	3	3	2	3	3	2
DXS1214	4	4	3	1	1	2	1	1	1	1	1	1
DXS8102	5	5	3	4	4	1	2	2	4	2	2	4
DXS8090	2	2	1	1	1	3	2	2	2	2	2	2
DXS1068	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
DXS8015	2	2	1	1	1	1	3	3	1	3	3	1
DXS993	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DXS8080	3	3	2	3	3	1	3	3	2	3	3	2
DXS8083	3	3	3	3	3	1	3	3	2	3	3	2
DXS1055	1	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	2
DXS1039	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2
DXS991	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1
DXS1216	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1
DXS986	1	1	1	1	1	3	3	3	2	1	1	2
DXS1196	2	2	1	2	2	2	2	2	3	2	2	3
DXS1217	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1
DXS990	3	3	1	3	3	1	1	1	2	1	1	2
DXS8077	3	3	3	3	3	2	2	2	1	2	2	1
DXS8020	1	1	2	3	3	4	4	4	2	4	4	2
DXS1106	3	3	3	1	1	4	4	4	2	4	4	2
DXS1059	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
DXS8088	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1
DXS8055	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
DXS8064	1	1	1	2	2	3	3	3	1	3	3	1
DXS8067	3	3	2	2	2	1	1	1	4	1	1	4
DXS1001	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
DXS8009	1	1	2	3	3	3	3	3	1	3	3	1
DXS1047	2	2	1	3	3	2	3	3	1	2	2	1
DXS1062	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
DXS984	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	1
DXS1205	1	1	2	3	3	1	3	3	3	1	1	3
DXS1227	3	3	4	4	4	2	1	1	4	1	1	1
DXS8106	3	3	2	3	3	1	4	4	3	1	1	4
DXS8043	3	3	3	1	1	2	3	3	2	1	1	3
DXS8045	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2
DXS998	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1	2
DXS8091	2	2	1	1	1	3	1	1	3	1	1	1
DXS8069	2	2	2	3	3	2	1	1	2	3	3	1
DXS1073	2	2	1	3	3	2	3	3	2	3	3	3

3.7 DETERMINACIÓN DEL LIGAMIENTO GENÉTICO.

Para determinar la región del cromosoma X que se segrega con la enfermedad, se realizó de forma manual un análisis de ligamiento paramétrico de dos-puntos. Se calcularon los valores de LOD score para cada marcador a partir de la suma de cuatro análisis de ligamiento independientes como se describe en la sección de métodos.

El Cuadro 6 muestra los resultados obtenidos para cada marcador a diferentes valores de θ (0.0, 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4). Los resultados del análisis de ligamiento mostraron inicialmente 3 loci (en recuadro verde) sobre el cromosoma X, uno sobre el brazo corto y dos sobre el brazo largo con lod scores significativos a $(\theta)= 0.0$. El primer locus está compuesto por 6 marcadores; 4 de ellos con un valor de lod score de 4.8 (DXS993 a DXS1055) y 2 con un valor de 3.6 (DXS1039 y DXS991). El segundo locus fue en un intervalo entre los marcadores DXS1196 y DXS1217 con valores de lod score de 4.8 y 2.4, respectivamente. El tercer locus incluyó solamente al marcador DXS8088 y con un valor de lod score de 3.6.

CUADRO 6. ANÁLISIS DE LOD SCORE.

θ = fracción de recombinación

Marcador	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	
Xp22.33	DXS1060	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xp22.32	DXS1223	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xp22.31	DXS8051	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
	DXS7108	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
Xp22.2	DXS1224	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
	DXS987	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
Xp22.13	DXS8019	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
	DXS7593	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
Xp22.12	DXS1226	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
Xp22.11	DXS1061	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
Xp21.2	DXS1214	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
	DXS8102	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
Xp21.1	DXS8090	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
	DXS1068	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,142
Xp11.4	DXS8015	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	1,267
	DXS993	4,804	4,084	3,266	2,338	1,267
Xp11.23	DXS8080	4,804	4,084	3,266	2,338	1,267
	DXS8083	4,804	4,084	3,266	2,338	1,267
Xp11.22	DXS1055	4,804	4,084	3,266	2,338	1,267
Xp11.21	DXS1039	3,603	2,176	2,062	1,602	0,915
Xp11.1	DXS991	3,603	2,176	2,062	1,602	0,915
Xq11.1	DXS1216	0,000	-0,687	0,256	0,498	0,386
	DXS986	0,000	-0,687	0,256	0,498	0,386
Xq11.2	DXS1196	4,804	4,084	3,266	2,338	1,267
	DXS1217	2,402	0,267	0,858	0,866	0,563
Xq12	DXS990	0,000	-1,641	-0,346	0,130	0,210
Xq13.1	DXS8077	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
	DXS8020	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq13.2	DXS1106	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq13.3	DXS1059	0,000	-2,595	-0,949	-0,238	1,034
Xq21.1	DXS8088	3,603	2,176	2,062	1,602	0,915
	DXS8055	0,000	-1,641	-0,346	0,130	0,210
Xq21.2	DXS8064	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq21.31	DXS8067	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
Xq21.32	DXS1001	0,000	0,267	0,858	0,866	0,563
Xq21.33	DXS8009	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
Xq22.1	DXS1047	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
	DXS1062	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq22.2	DXS984	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq22.3	DXS1205	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
Xq23	DXS1227	0,000	-5,458	-2,755	-1,342	-0,494
	DXS8106	0,000	-6,412	-3,357	-1,710	-0,670
Xq24	DXS8043	0,000	-1,641	-0,346	0,130	0,210
	DXS8045	0,000	-3,550	-1,551	-0,606	-0,142
Xq25	DXS998	0,000	-2,595	-0,949	-0,238	0,034
Xq26.1	DXS8091	0,000	-4,504	-2,153	-0,974	-0,318
	DXS8069	0,000	-2,595	-0,949	-0,238	0,034
Xq26.2	DXS1073	0,000	-2,595	-0,949	-0,238	0,034
Xq26.3						
Xq27.1						
Xq27.2						
Xq27.3						
Xq28						

Los resultados de ligamiento junto con el análisis de haplotipos realizados, mostraron al primer locus como la región candidata para esta entidad genética mapeada específicamente a Xp11.4 – Xp11.21. Esta región cubre una longitud de 15.74 Mb y está delimitada por los marcadores DXS8015 y DXS991. El segundo locus fue descartado porque mostró que al menos la madre portadora III.7 fue homocigota para un haplotipo. Finalmente, en el tercer locus se descartó porque al menos 3 haplotipos diferentes estaban implicados en el ligamiento, incluso las madres portadoras IV.7 y IV.10 resultaron ser homocigotas para algunos marcadores.

3.8 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.

Se determinó que tres de las cuatro madres (II.3, III.7 y IV.7) heredaron el mismo alelo AR (276 pb) a sus respectivos hijos (IV.5, IV.17 y V.12) dentro del haplotipo involucrado en el fenotipo. Por otro lado, un evento de recombinación previo en la madre portadora III.10 había ligado otro alelo AR (279 pb) al haplotipo involucrado en el fenotipo y así lo heredó a su hijo V.17.

Se encontró que dos de las madres portadoras III.7 y IV.10 poseen un patrón de inactivación sesgado (80:20) para el cromosoma X que porta la mutación, mientras que las otras dos madres portadoras III.3 y IV.7 muestran un patrón prácticamente aleatorio (48:52 y 46:54, respectivamente) (Figura 15).

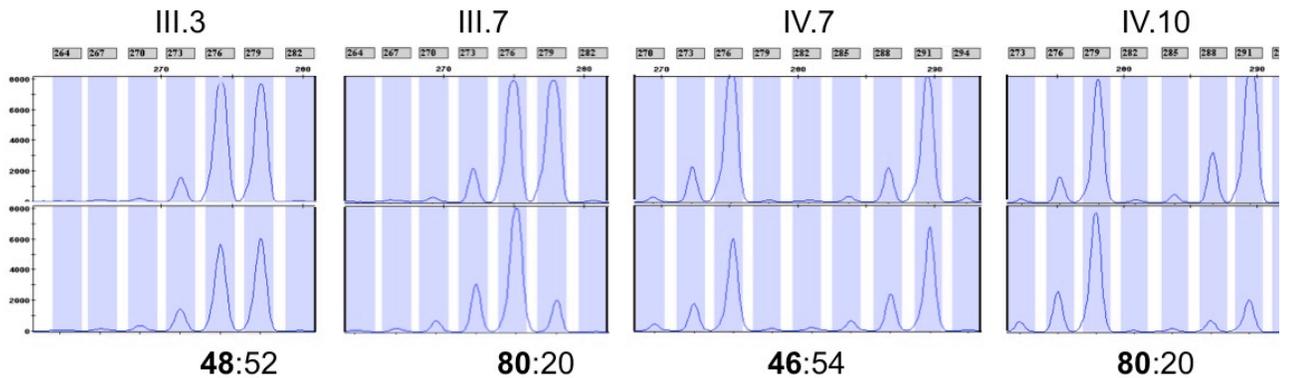


FIGURA 15. ESTUDIOS DE INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X. Electroferogramas de los productos de PCR obtenidos del gen *AR* a partir de DNAg tanto nativo (línea superior) o digerido previamente con la enzima de restricción *Hpa* II (línea inferior) correspondientes a las cuatro madres. En la parte superior se indica la posición de cada una de ellas en el árbol genealógico. El porcentaje de inactivación de cada alelo *AR* esta dado en la parte inferior de cada electroferograma. El alelo que co-segrega con el haplotipo está representado en negritas. El tamaño de cada alelo *AR* está indicado tanto por las barras grises como por los recuadros grises arriba de cada electroferograma.

Los resultados globales de los estudios de ligamiento, de los análisis de haplotipos y de los ensayos de ICX, son mostrados en el árbol genealógico de la familia en la Figura 16.

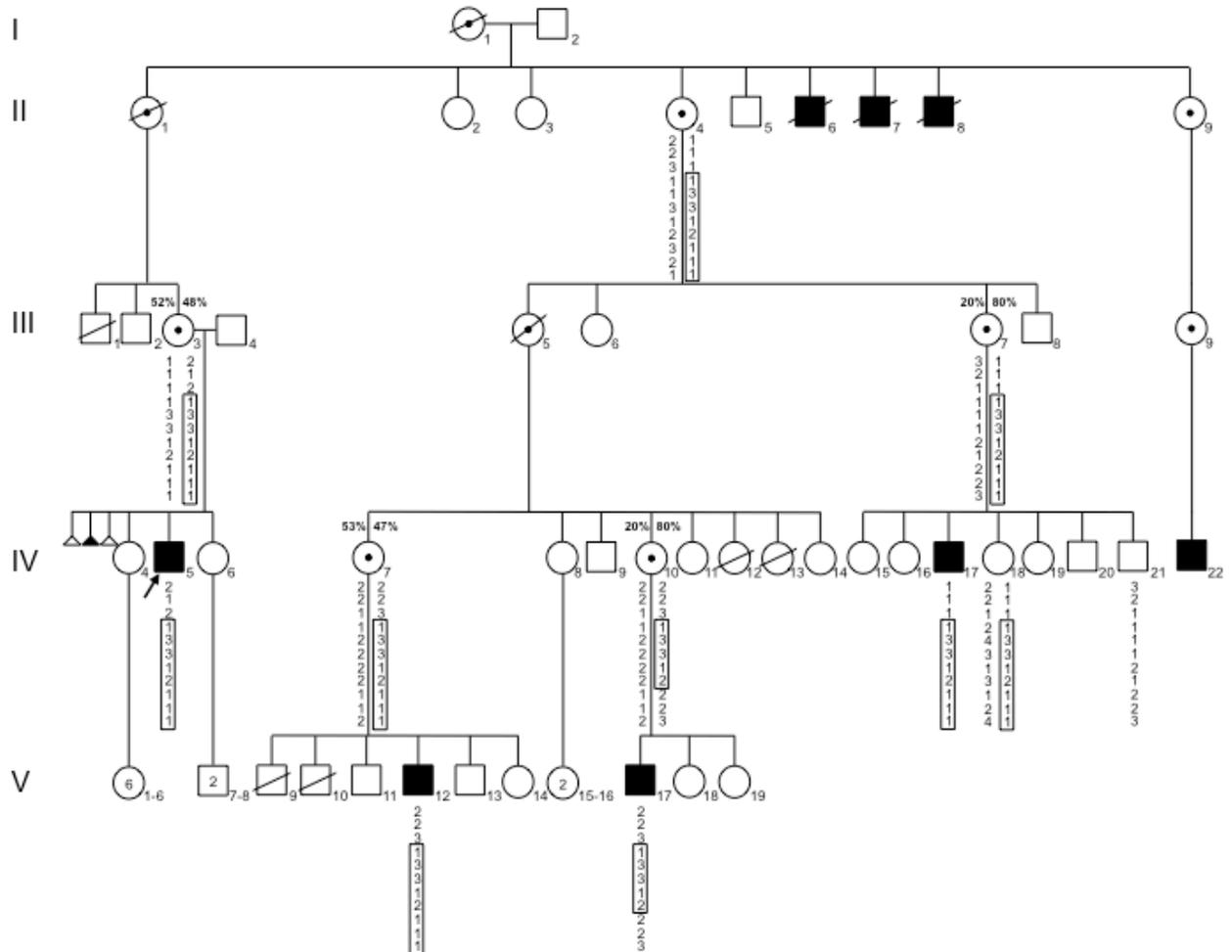
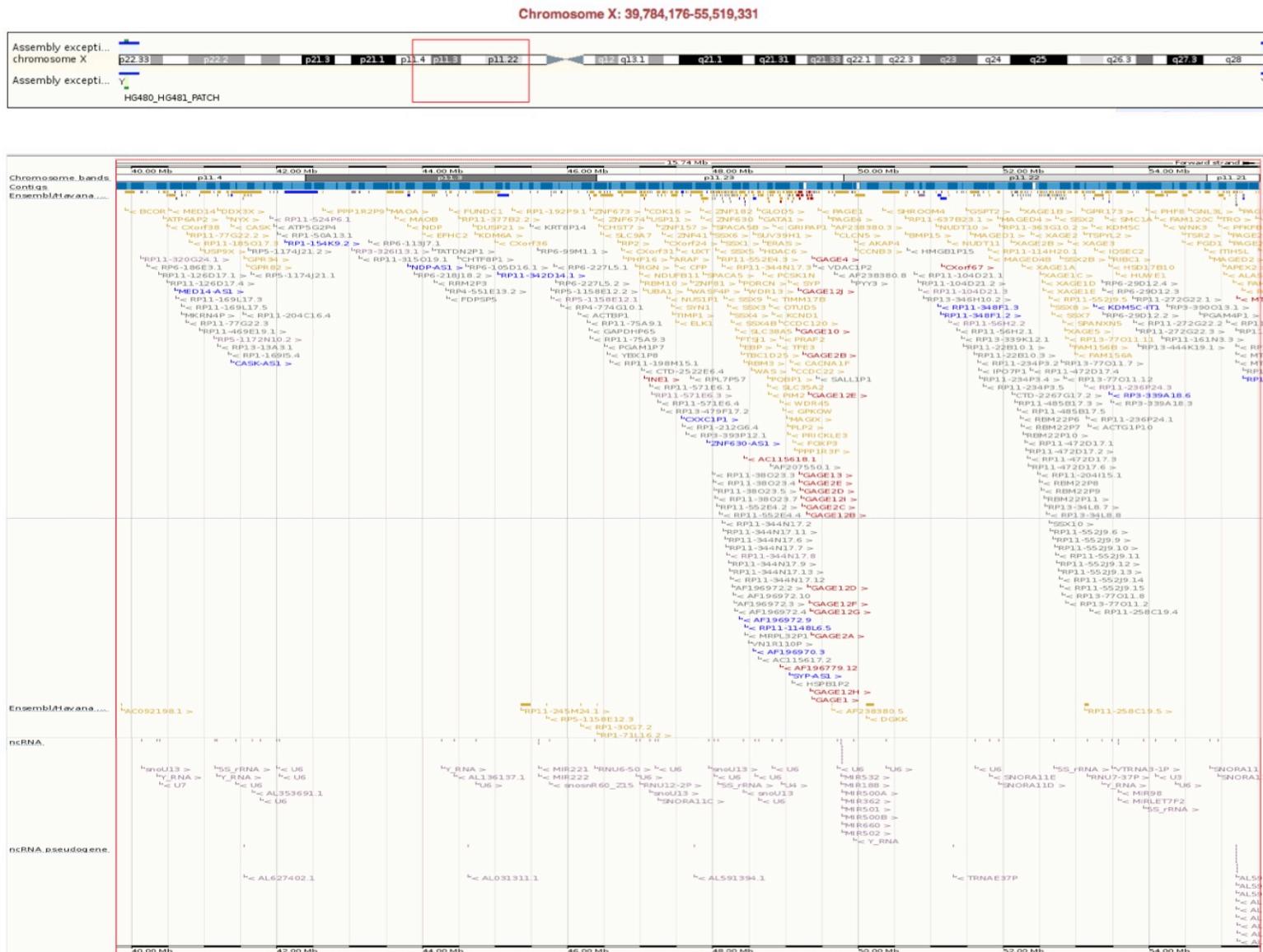


FIGURA 16. ÁRBOL GENEALÓGICO FAMILIAR DE CINCO GENERACIONES. Las posiciones de los 8 varones afectados y las madres portadoras son indicados con la nomenclatura estándar. Debajo de cada individuo genotipificado se enlistan 11 marcadores pericentroméricos (Xp11.4-q13.3), resaltando con un recuadro el haplotipo compartido. La flecha indica el caso índice.

3.9 ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA REGIÓN CANDIDATA

De acuerdo a las bases de datos electrónicas de Ensembl y Geneatlas, la región Xp11.4-p11.21 posee 250 genes (Figura 17), de los cuales 145 genes que codifican para proteínas conocidas, mientras que otros 23 corresponden a genes que codifican para proteínas teóricas.

Mapeo genético de un nuevo síndrome ligado al cromosoma X en una Familia Mexicana



<http://www.ensembl.org/index.html>

FIGURA 17. REGIÓN CANDIDATA Xp11.4-p11.21. El esquema de la base de datos Ensembl muestra un ideograma del cromosoma X en la parte superior, marcando con un recuadro rojo el locus candidato Xp11.4 –p11.21. En el recuadro inferior se muestra los 250 genes contenidos en las 15.74 Mb del locus, entre ellos; los genes que codifican para proteínas conocidas en letras amarillas, los genes que codifican para proteínas desconocidos en letras rojas, los pseudogenes en letras grises, transcritos procesados en letras azules y los genes que codifican para RNA en letras moradas.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

El genoma de los humanos al igual que el de cualquier otro organismo, está sujeto a cambios hereditarios conocidos como mutaciones. Independientemente de la escala del cambio, ya sea por anomalías cromosómicas o cambios simples, estas pueden tener una consecuencia patológica (enfermedad) o simplemente ninguna y fijarse en al menos el 1% de la población para constituir un polimorfismo. Por ejemplo, el estimado de heterocigosidad dado por los polimorfismos de un solo nucleótido es del 0.08%, es decir que en una secuencia de 1,250pb de un genoma humano existe una base diferente (Reich et al, 2002).

Cuando se detecta alguna anomalía fenotípica en un individuo aislado, es muy poco probable que se deba a un tipo de mutación hereditaria. Por otro lado, cuando existe agregación familiar o se demuestra que el fenotipo se ha heredado a través de varias generaciones, entonces la probabilidad de que haya existido una mutación hereditaria es absoluta.

El hallazgo de una familia con un desorden genético nuevo es un evento raro en la naturaleza que sin duda alguna proporciona una oportunidad quizás irrepetible para definir la función de un gen en base a su alteración.

En este estudio, el caso índice se identificó en la población abierta y se le invitó a recibir una consulta genética en el departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la UANL.

Desde un inicio se sospechó de un defecto genético, sin embargo, ni alteraciones cromosómicas ni variaciones en el número de copia fueron encontrados mediante cariotipo de bandas GTG o aCGH, respectivamente.

Subsecuentemente, después de una búsqueda deliberada de otros familiares afectados, se tuvo conocimiento de otros 7 varones afectados de la misma familia, de los cuales solo 3 fueron examinados clínica y molecularmente en este estudio. Todos los varones presentaban las mismas anomalías congénitas que el caso índice, a saber, las anomalías esqueléticas, la talla baja y el retraso mental de leve a moderado.

Aunque las características clínicas entre los varones afectados fueron similares y consistentes, hubo variaciones entre las generaciones IV y V; tanto las anomalías esqueléticas como el retraso mental fueron más severas entre los individuos de la IV generación que las de la V generación. Además, las madres portadoras son asintomáticas por lo que estos hallazgos sugieren que la enfermedad no tiene penetrancia en las madres portadoras y quizás en otras mujeres que son posibles portadoras, mientras que la expresión clínica es variable en los varones. Entre todas las características clínicas presentes en los

varones afectados, las anomalías digitales se consideraron como la firma característica de este probable nuevo síndrome.

El árbol genealógico de la familia sugiere una herencia ligada al cromosoma X, en base a que solo se encontraron varones afectados y no se detectó una transmisión varón a varón (Strachan & Read, 2004).

Las herramientas de bioinformática arrojaron cuatro síndromes que comparten características clínicas con los varones afectados en esta familia y de los cuales podría ser una forma alélica.

Uno de los síndromes sugeridos fue el Simpson-Golabi-Behmel (SGBS, Xq26.2, MIM:312870) (Golabi et al, 1993). Este síndrome es el más parecido al caso que se presenta en este estudio, cuyas características comunes son: polidactilia, braquidactilia, sindactilia, retraso mental y escoliosis; además que también se hereda de una forma ligada al X. Sin embargo, SGBS está clasificado como un síndrome de sobrecrecimiento, esto fuertemente contrasta con la estatura baja, braquicefalia y riñones hipoplásicos descritos en esta familia mexicana.

El síndrome Cefalopolisindactilia de Greig (GCPS, 7q14.1, MIM:1757700) (Biesecker, 2008) también es un síndrome de sobrecrecimiento, el cual comparte con nuestro caso la polidactilia y el retraso mental; aunque tanto la polidactilia en pies (preaxial) como la sindactilia (3^{er} y 4^o dígitos, y 1^o-3^{er} ortejo) son diferentes. También difiere en el tipo de herencia la cual es de tipo autosómica recesiva en GCPS (del7p).

El síndrome oral-facial-digital tipo I (OFD1, Xp22.2, MIM:311200) (Toriello & Franco, 1993), es también ligado al X y comparte con esta familia, la polidactilia, la sindactilia, la braquidactilia y el retraso mental; pero los hamartomas, los riñones poliquísticos característicos de OFD1 están ausentes entre los afectados del presente estudio. De manera contrastante, la mayor parte de los individuos afectados con OFD1 son sólo mujeres debido a su elevada letalidad en varones (Feather et al, 1997).

Finalmente, el síndrome autosómico recesivo oral-facial-digital tipo II (OFD2, MIM:252100) (Toriello & Franco, 1993) solamente comparte con los varones afectados de la familia la braquidactilia y la polidactilia postaxial.

Por lo anteriormente expuesto, las diferencias clínicas apoyan la existencia de una nueva entidad genética, la cual bien podría llamarse **síndrome Beto** una vez que se determine el gen alterado; Beto no es un acrónimo mas bien es debido a la coincidencia en la contracción de los nombres de los tres primos segundos IV.5, IV.17 y IV.22.

Con la finalidad de mapear este fenotipo bajo la hipótesis de una herencia recesiva ligada a X como lo sugiere el árbol genealógico, se realizó una genotipificación del cromosoma X y posteriormente un análisis de ligamiento genético.

Los resultados de ligamiento junto con la inspección del haplotipo, revelaron una región candidata la cual mapea en Xp11.4-p11.21. Este intervalo cubre una longitud de 15.74 Mb y esta delimitado por los marcadores DXS8015 (distal) y DXS991 (proximal). Por una parte, la identificación del locus apoya la

hipótesis inicial de la herencia ligada a X el cual fue deducido a partir del árbol genealógico. Por otra parte, el mapeo apoya la propuesta de este fenotipo como una nueva entidad genética. Interesantemente, el individuo V.17 fue el más informativo porque heredó el haplotipo más corto y es el menos afectado entre los cuatro varones, contrariamente IV.5 y IV.17 quienes portan los haplotipos más largos son los más afectados. Estos datos parecen sugerir que otros factores genéticos diferentes de la mutación, quizás en el mismo contexto genómico o más probablemente en el fondo genético de cada individuo pueden modificar en cierta medida la expresividad del fenotipo entre las generaciones. Sin embargo, este fenotipo no es resultado de un evento de delección de genes contiguos como pudo ser descartado mediante el análisis de aCGH practicado en el caso índice (IV.5)

De acuerdo a la base de datos electrónica OMIM, se reporta que la región candidata Xp11.4-p11.21 incluye solo 63 genes que están asociados a fenotipos conocidos. Existen genes implicados en algunas oculopatías tales como: la ceguera nocturna congénita estacionaria ligada a X tipo 2A (*CACNA1F*, MIM 300110), la retinitis pigmentosa (*RP2*, MIM 300757), la distrofia 1 de conos–bastones (*RPGR*, MIM 312610), la enfermedad de Norrie (*NDP*, MIM 300658), la vitroretinopatía exudativa familiar 2 (*EVR2*, MIM 305390), la microftalmia (*BCOR*, MIM 300485). También están mapeadas otras oculopatías con base molecular desconocida, tales como la atrofia óptica 2 ligada a X (*OPA2*, MIM 311050) y el nistagmus 5 (*NYS5*, MIM 300589) (Cabot et al, 1999).

En la región candidata también existen 26 fenotipos de retraso mental ligado a X, 11 de estos corresponden a formas sindrómicas (MRXS), de las cuales solo 5 (45%) tienen bases moleculares conocidas, en estas formas los genes implicados son: *CASK* (MIM 300172), *KDM5C* (MIM 314690), *HUWE1* (MIM 300697), *PHF8* (MIM 300560) y *FGD1* (MIM 300546). Solo 7 (46%) de las formas no sindrómicas de retraso mental (MRX) tienen bases moleculares conocidas, en estas formas los genes implicados son: *ATP6AP2* (MIM 300556), *ZNF674* (MIM 300573), *ZNF41* (MIM 314991), *FTSJ1* (MIM 300499), *SYP* (MIM 313475), *IQSEC2* (MIM 300522) y *HSD17B10* (MIM 300256).

Entre otros fenotipos relevantes que merecen atención tanto por estar dentro de esta región candidata como por compartir algunas características clínicas con los miembros afectados de la familia en estudio, se encuentran la hipoplasia dermal focal (FDH, MIM 305600) causada por mutaciones en el gen *PORCN* (MIM 300651) el cual es un desorden multisistémico caracterizado principalmente por alteraciones en la piel, del sistema esquelético, en ojos y en la cara. De manera importante FDH incluye también malformaciones en las extremidades tales como oligo/sindactilia, así como ectrodactilia en pies y manos; aunque estas son prácticamente diferentes a las esperadas para una forma alélica del fenotipo en estudio. FDH además difiere con el fenotipo de la familia en estudio por tener una herencia dominante ligada a X y las mujeres son heterocigotas o mosaicos, mientras que los varones afectados nacidos vivos son únicamente mosaicos y se presume que los varones hemicigotos que no son mosaicos no son viables (Sutton & Van den Veyver, 1993).

Recientemente, algunas mutaciones en otro gen relevante en la región candidata, el gen *CASK*, se han asociado a espectro clínico diverso que va desde una forma de MRX hasta una de MRXS asociado con microcefalia, malformaciones del cerebro y dismorfias faciales (Hackett, et al, 2010). Interesantemente, entre el espectro clínico reportado; las características como la escoliosis, el nistagmus, el retraso mental, la hipoplasia cerebellar y alteraciones en la protuberancia (Najm et al, 2008) son parte del fenotipo de la familia en estudio. Sin embargo, aún en el fenotipo más severo por mutaciones en *CASK* no se presentan las alteraciones digitales y las dismorfias faciales son diferentes por lo que probablemente se trata de entidades genéticas distintas.

En el intervalo cromosómico mapeado solo se han descrito dos alteraciones en el número de copia, estas son un síndrome de delección (DELXp11.3 MIM 300578) y un síndrome de duplicación (DUPXp11.23p11.22 MIM 300801). La delección que involucra a los genes *RP2*, *SLC9A7*, *ZNF673*, *CHST7*, *MIRN221* y *MIRN222*; se asocia a retraso mental, microcefalia y retinitis pigmentosa (Aldred et al, 1994). Por otro lado, la microduplicación puede ser un área que puede incluir desde 6 hasta 27 genes, incluyendo al gen *PORCN* en la duplicación con el intervalo más pequeño. Fenotípicamente tanto las mujeres y los varones afectados presentan retraso mental (de límite a severo), retraso del lenguaje y un patrón característico en el electroencefalograma durante la infancia. Algunos individuos presentan anomalías en extremidades inferiores como pies planos o pies cavus, hipoplasia del 5º orjejo y sindactilia (Giorda et al, 2009). Mientras que para el

caso de la delección el fenotipo de retinitis pigmentosa parece reflejar la ausencia de gen *RP2*, por otro lado, el fenotipo de duplicación debería reflejar el aumento de la dosis génica y por lo tanto, ser distinto al del estudio, ya que este último no está relacionado con ninguno de estos dos eventos como fue demostrado confiablemente por el análisis de aCGH. Tanto el retraso mental como la sindactilia en pies son características compartidas con el fenotipo de los varones en estudio, muy probablemente los mecanismos moleculares son distintos.

Con la finalidad de encontrar los genes candidatos para este fenotipo, la búsqueda se basó en la localización cromosómica y en la naturaleza tanto recesiva como sindrómica. De hecho, la localización descartó automáticamente los cuatro síndromes clínicamente similares como son el SGBS, el GPCS, el OFD1 y el OFD2, como un producto de heterogeneidad alélica, pero no se pudo descartar la heterogeneidad de locus por la cual este fenotipo podría ser una variante más leve de alguno de ellos.

Ya que este fenotipo cumple con los requisitos para ser considerado como un síndrome de anomalías congénitas múltiples, se esperaba que la mayoría de las características estuvieran presentes en cualquier forma alélica, principalmente las anormalidades digitales aunque estas pudieran variar en severidad. Sin embargo, en la región candidata únicamente pudieran representar formas alélicas más leves aquellas mutaciones en el gen *CASK* que están asociadas a escoliosis, retraso mental e hipoplasia cerebelar o las mutaciones en el gen *PORCN* que han sido asociadas a anomalías en las

extremidades inferiores, aunque estas últimas alteraciones son prácticamente diferentes. En contraste, es poco probable que puedan representar formas alélicas, las mutaciones en los genes que ocasionan oculopatías o aquellas involucradas en las formas no sindrómicas de retraso mental dentro de la región candidata.

Además, las variantes de número de copia reportadas en la región, ya sea DELXp11.3 y el síndrome de DUPXp11.23-p11.22, fueron confiablemente descartadas como mecanismos moleculares por el aCGH que se le practicó al caso índice. Si bien, tanto el retraso mental y la sindactilia de pies del síndrome de duplicación son compartidas con los varones afectados de esta familia en estudio, los mecanismos moleculares involucrados son probablemente diferentes.

Debido a que este fenotipo no muestra un curso progresivo de la enfermedad, se especula que el gen involucrado probablemente este regulado de manera espacial y temporal durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, la constelación de características presentes en este probable nuevo síndrome tal vez reflejen el patrón de expresión del gen o dónde éste probablemente juegue su papel principal. El gen involucrado en este fenotipo probablemente codifica una proteína regulatoria con una función similar a aquella de los genes de síndromes de anomalías congénitas múltiples relacionados (Figura 18). En tales síndromes están alterados algunos procesos celulares tales como proliferación y apoptosis, por ejemplo, el gen involucrado para GCPS es un factor de transcripción (gen *GLI3*) (Vortkamp et al, 1991), para SGBS es una

molécula señalizadora (gen *GPC3*) (Pilia et al, 1996). Para el síndrome con el fenotipo más severo como OFD1 la molécula reguladora involucrada el gen *OFD1*, interactúa directamente con la maquinaria de remodelación de la cromatina y de esta manera puede regular la expresión de varios genes blanco (Giorgio et al, 2007). La alteración de una ruta de señalización que controla los procesos celulares mencionados podría explicar el efecto pleiotrópico del fenotipo observado en los varones de esta familia mexicana, donde la participación de una molécula señalizadora o un factor de transcripción e incluso un cofactor de los complejos de remodelación de la cromatina pueden estar involucrados.

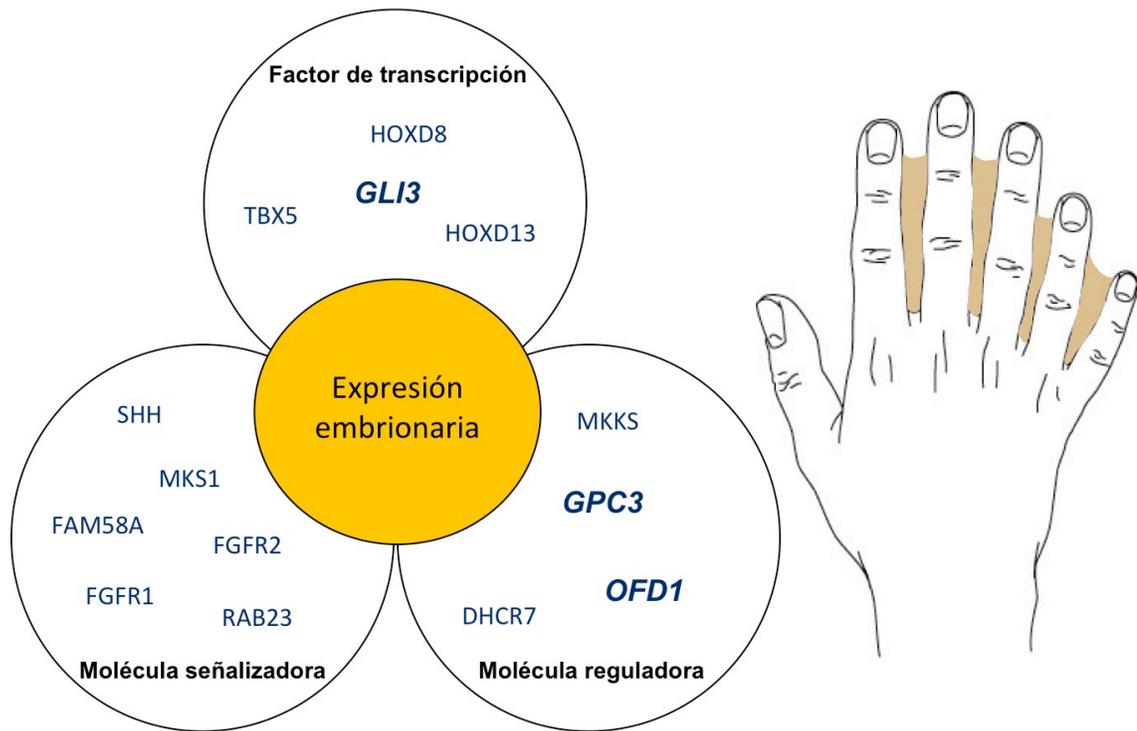
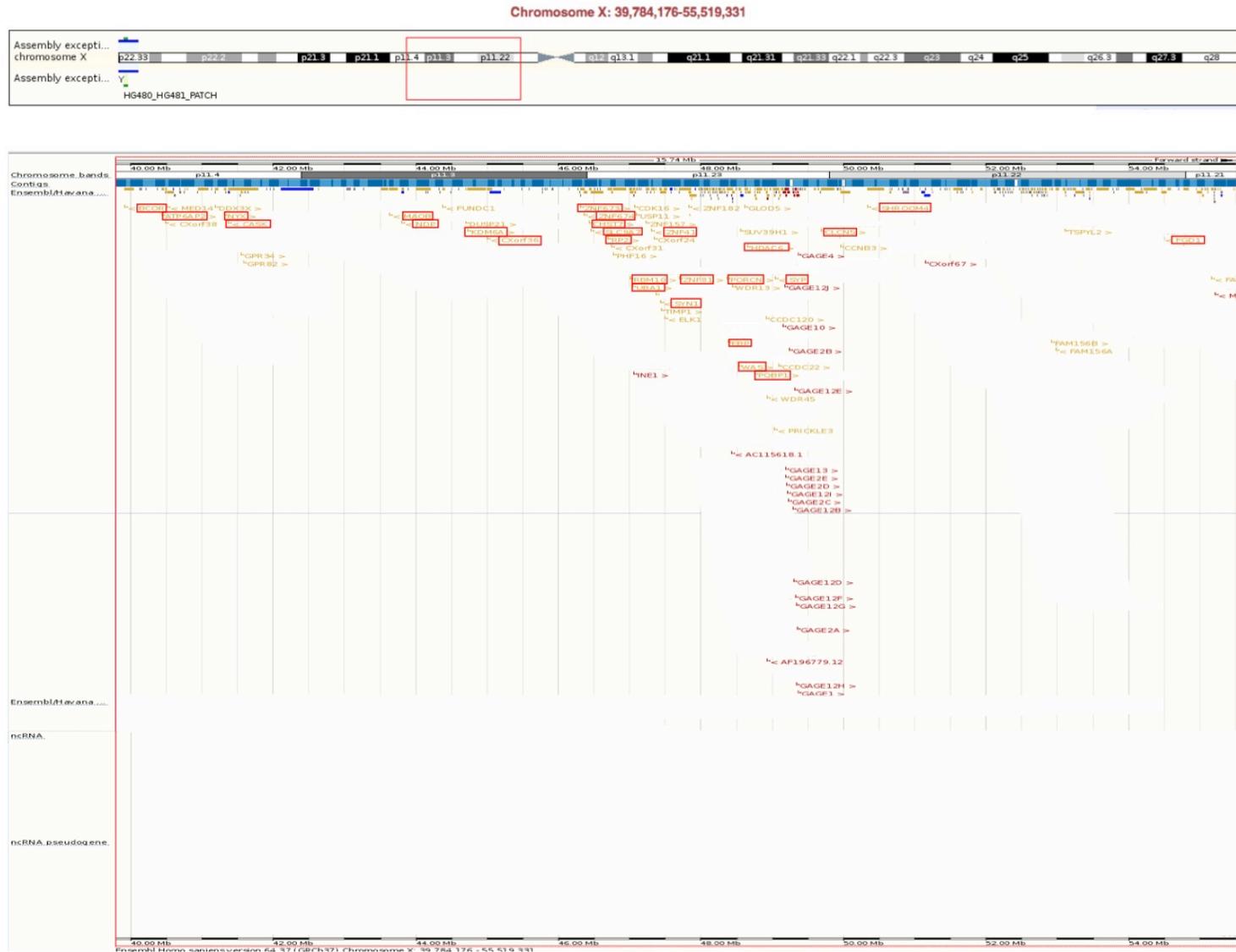


FIGURA 18. GENES ASOCIADOS A LAS ANORMALIDADES DIGITALES. El esquema muestra los tres diferentes tipos de genes regulatorios que se conoce se expresan en etapa embrionaria y que están asociados con alteraciones en el desarrollo de las extremidades como son la polidactilia, la sindactilia o la polisindactilia; en diversos síndromes (OMIM). A la derecha, se esquematiza una mano humana con polisindactilia.

Debido a que las características clínicas no parecen corresponder a un síndrome conocido, se concluyó en consecuencia que la búsqueda del gen candidato debería estar enfocada en los genes que no han sido asociados hasta la fecha con algún fenotipo conocido.

De acuerdo a la base de datos de Geneatlas, 28 genes codifican para proteínas de las cuales 6 son moléculas regulatorias que no han sido implicadas previamente en algún fenotipo humano. Los genes *ZNF182*,

WDR13 y *WDR45* se sabe que participan en procesos celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. Genes tales como *ZNF182*, *PRICKLE3* y *ZNF157* se sabe que codifican para factores de transcripción, mientras que el gen *PHF16* que codifica para una acetil transferasa que actúan al mismo nivel de regulación génica que la proteína OFD1. Recientemente, la identificación de mutaciones patogénicas en el gen *KDM6A* como el segundo locus del síndrome de Kabuki, expandió el papel importante que tienen los factores modificadores de histonas en discapacidad intelectual y en las anomalías congénitas múltiples (Lederer et al, 2012). Cabe señalar que el gen *KDM6A*, que escapa de la ICX (Greenfield et al, 1998), antes de encontrarse asociado al síndrome Kabuki, fue un candidato promisorio para el fenotipo en estudio en base a que se unía al promotor del gen *HOXB1*, gen que a su vez participa en el desarrollo embrionario del cerebro anterior (Agger et al, 2007).



<http://www.ensembl.org/index.html>

FIGURA 19. GENES CANDIDATOS. Este esquema representa el escrutinio del locus Xp11.4 –p11.21 para la selección de genes candidatos, donde se eliminaron los genes que codifican para RNA, los pseudogenes, los transcritos procesados y se colocaron en un recuadro rojo los genes asociados a enfermedades conocidas. En amarillo se mantienen los 28 genes candidatos y en rojo los genes que codifican para proteínas teóricas.

Otro enfoque para encontrar el gen responsable es la naturaleza recesiva del fenotipo. Para obtener pistas acerca del fenotipo aparente sano de todas las madres portadoras obligadas e incluso quizás, de otras posibles portadoras en la familia, se realizó un ensayo de ICX. Las madres portadoras (III.7 y IV.10) poseen un sesgo favorable de ICX (80:20), lo cual es una característica común de los rasgos recesivos ligados a X, como en al menos la mitad de las familias con retraso mental ligado a X (Plenge et al, 2002) o para las mutaciones en genes autónomos celulares que causan muerte celular temprana (Dobyns et al, 2004). Diferentemente, las madres III.3 y IV.7 mostraron tener patrones aleatorios, lo cual significa que en estas mujeres la mitad de las células expresan el alelo mutante y por lo tanto, ni su viabilidad ni la proliferación se vieron comprometidas durante el desarrollo. Este fenómeno ocurre en la mayoría de las enfermedades ligadas a X (Dobyns et al, 2004).

Si bien, es común la penetrancia completa en varones en las enfermedades ligadas a X, el estatus asintomático de las mujeres de esta familia mexicana, incluso experimentando patrones aleatorios de ICX realmente resulta intrigante; efectivamente estas mujeres pueden de una forma u otra resolver exitosamente la deficiencia de la función génica.

La presencia de ambos tipos de patrones de ICX, sesgo favorable o aleatorio, detectados en las mujeres de esta familia en estudio, pudieran ser más compatibles con mutaciones en genes que codifican para productos no autónomos celulares (Dobyns et al, 2004), los cuales incluyen proteínas secretadas, enzimas metabólicas y proteínas que son expresadas en células multinucleadas. Las versiones alélicas silvestres de tal clase de genes son capaces de compensar, ya sea directamente o a través de sus productos metabólicos, la deficiencia de las células que expresan el alelo mutante y generar un patrón de herencia recesiva ligado a X (fenotipo asintomático en mujeres heterocigotas). Sin embargo, la mayoría de los genes que están localizados en la región candidata no pertenecen a esta categoría.

Por lo tanto, otro factor genético que podría contar para el fenotipo de enfermedad o quizás la no afectación de mujeres y varones en algunos desordenes ligados a X es aquel que está relacionado con la dosis génica. La presencia de ciertas mutaciones en un alelo altera el nivel de expresión o aún la habilidad de compensar la dosis dependiendo de la sensibilidad de cada gen, provocando un estado alterado de las células debido a sobreexpresión o haploinsuficiencia, diferente a dominancia negativa. Es factible que la expresión bialélica tanto de genes que escapan a la ICX (en mujeres) o genes sobre el cromosoma X los cuales tienen homologos/parálogos sobre el cromosoma Y (en varones), puedan ocultar la deficiencia de un alelo mutante por un alelo silvestre en la misma célula. En efecto, *OFD1* es un gen de escape ICX cuyas mutaciones causan letalidad en varones y el síndrome OFD1 (de Concilis et al, 1998) en mujeres, esto es probablemente debido a un efecto dominante

negativo del alelo mutante sobre el alelo silvestre (Ferrante et al, 2001), más bien que debido a un fenómeno de haploinsuficiencia. En contraste, y debido probablemente al fenómeno de haploinsuficiencia el mismo gen *OFD1* puede producir síndromes recesivos ligados al cromosoma X tales como, el síndrome Simpson-Golabi-Behmel tipo 2 (SGBS2; MIM 300209) o el síndrome de Joubert-10 (JBTS10; MIM 300804), en los cuales esta vez los varones están afectados, mientras que las mujeres portadoras no lo están. En la región candidata se conocen algunos genes que no están asociados a ningún fenotipo conocido y que escapan a la ICX, entre ellos *TIMP1* (Brown et al, 1990) y *CDK16* (Carrel et al, 1996) que codifican para enzimas, además de los genes reguladores *MED14* (Yoshikawa et al, 1998) y *SUV39H1* (Chung et al, 2006).

De acuerdo con las bases de datos de NCBI y GeneCards (<http://www.genecards.org/>), solamente los genes candidatos *DDX3X* y *TSPYL2* tienen un gen homólogo sobre el cromosoma Y. Interesantemente, el nivel de expresión máxima de ambas copias del gen *KDM6A* ya sea *KDM6A/KDM6A* o *KDM6A/paralogUTY*, parecen ser necesarias tanto en mujeres como en varones, respectivamente, para exhibir un fenotipo normal, de otra manera las mutaciones en un solo alelo *KDM6A* puede causar síndrome de Kabuki; sugiriendo que el mecanismo involucrado es haploinsuficiencia (Lederer et al, 2012). Para este tipo de genes, parece poco probable que la expresividad fenotípica variable encontrada entre los pacientes, podría depender de su gen parálogo en el cromosoma Y; por lo que esta posibilidad no puede ser descartada.

Se propone la hipótesis de que en esta familia mexicana la alteración genética recae en un gen exclusivo del cromosoma X, por lo cual los varones siendo hemicigotos ellos invariablemente se verán afectados. Por otro lado, la alteración involucrada debería ser una mutación de tipo hipomórfica más bien que una mutación de tipo dominante negativa, sino las madres heterocigotas también deberían haber expresado la enfermedad independientemente del patrón de ICX (Ferrente et al, 2001). En apoyo a la asunción previa, las mutaciones hipomórficas en el gen *GPC3*, un gen exclusivo del cromosoma X, provocan SBGB (Pilia et al., 1996), en el cual la presencia de mujeres afectadas solamente es debido a un sesgo de inactivación del cromosoma X que porta el alelo silvestre. Sin embargo, tal sesgo desfavorable no fue detectado en esta familia estudiada lo cual pudiera haber sugerido el mismo tipo de asociación.

Finalmente, otra manera de encontrar genes candidatos es mediante la búsqueda sistemática de fenotipos en modelos animales. Las bases de datos de Información del Genoma del Ratón (informatics.jax.org/) y el Instituto Wellcome Trust Sanger (sanger.ac.uk/) actualmente son las fuentes de información más completas sobre fenotipos en el ratón generados mediante mutagénesis sistemática. Por ejemplo, los embriones mutantes en *Kdm6a*, mencionado previamente como gen candidato, presentan excencefalia en la región media y posterior del cerebro, además de expresión en las extremidades (Cox et al, 2010), lo cual explica las anomalías en el cerebro presentes en los pacientes con síndrome de Kabuki. Desafortunadamente, ambas bases de datos solo tienen reportados fenotipos irrelevantes para los genes candidatos *Timp1*, *Phf16* y *Med14*.

Al final de este trabajo todavía permanecen sin responder algunas preguntas tales como ¿cuál es el gen candidato? y ¿cómo la mutación respectiva causa el fenotipo en esta familia?. De la misma manera, queda pendiente confirmar si la mutación involucrada resulta en una pérdida de función. Pero independientemente del avance de este trabajo, no cabe duda alguna de que la identificación del la mutación responsable del fenotipo, proveerá pistas acerca del papel del gen en procesos sutiles tales como, el control de número, el crecimiento y la individualización de los dígitos durante el desarrollo. Del mismo modo, también cómo la mutación en este gen provoca tanto la discapacidad intelectual como la motora, lo cual es probablemente una consecuencia de la hipoplasia cerebelar en los cuatro varones afectados.

Finalmente, para confirmar la identidad del gen involucrado, se requiere la búsqueda sistemática de mutaciones en las regiones codificantes y en las regiones intrón-exón de genes candidatos. Actualmente, este objetivo puede ser acelerado por medio de la secuenciación de DNA de próxima generación (Next Generation Sequencing; NGS), una estrategia que recientemente ha probado ser sumamente exitosa en el descubrimiento de nuevos genes asociados a enfermedades genéticas cuya base molecular permanecía desconocida (Johnston et al, 2010; Ng et al, 2010; Guelly et al, 2011; Tarpey et al, 2009; Sobreira et al, 2010).

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Aunque se desconoce exactamente el gen involucrado y su mutación, los hallazgos clínicos, la localización cromosómica de la alteración y los patrones de inactivación del cromosoma X en la familia estudiada, junto a la falta de similitud con otros síndromes reportados, son criterios suficientes para que este fenotipo sea considerado como un síndrome; el cual además es nuevo.
2. Mediante análisis de ligamiento se confirmó la hipótesis inicial de una herencia ligada al cromosoma X en esta familia, sugerida por el árbol genealógico.
3. El gen involucrado probablemente es un gen exclusivo del cromosoma X, que codifica para una molécula reguladora, que podría escapar a la inactivación del cromosoma X y que porta una mutación tipo hipomorfa.

4. Se sugiere que el gen involucrado se regula de manera espacial y temporal durante la etapa embrionaria generando un efecto pleiotrópico, participando en procesos celulares tales como proliferación y apoptosis; que son requeridos para el establecimiento de los patrones AP/PD y la escultura de las extremidades, así como para el desarrollo de diversos órganos alterados en el fenotipo.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS

1. Identificar el gen implicado y la mutación

Para confirmar la identidad del gen involucrado, se requerirá de la búsqueda sistemática de mutaciones en las regiones codificantes y en las regiones intrón-exón de los genes candidatos mediante PCR-secuenciación o indirectamente por la secuenciación de DNA de próxima generación del exoma.

2. Brindar asesoría genética a la familia

Una vez identificada la mutación se puede desarrollar un ensayo molecular alelo específico que permita confirmar la mutación en los afectados y descartar el estado de portador en otras mujeres de la familia para propósitos de asesoramiento genético.

3. Generar un modelo murino de la mutación

La generación de un ratón tipo knock-in con la mutación en el mismo gen involucrado en la familia estudiada con la finalidad de recrear el fenotipo, permitirá emplearlo como una herramienta poderosa para explorar la función génica humana.

BIBLIOGRAFÍA

- Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**: 731-734
- Aldred MA, Dry KL, Knight-Jones EB, Hardwick LJ, Teague PW, Lester DH, Brown J, Spowart G, Carothers AD, Raeburn JA, et al. (1994) Genetic analysis of a kindred with X-linked mental handicap and retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet* **55**: 916-922
- Allen RC, Nachtman RG, Rosenblatt HM, Belmont JW (1994) Application of carrier testing to genetic counseling for X-linked agammaglobulinemia. *Am J Hum Genet* **54**: 25-35
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW (1992) Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* **51**: 1229-1239
- Biesecker LG (2006) What you can learn from one gene: GLI3. *J Med Genet* **43**: 465-469
- Biesecker LG (2008) The Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Orphanet J Rare Dis* **3**: 10
- Brown CJ, Flenniken AM, Williams BR, Willard HF (1990) X chromosome inactivation of the human TIMP gene. *Nucleic Acids Res* **18**: 4191-4195
- Brown MG, Lawce, J. (1997) *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, Philadelphia, PA: Philadelphia: Lippincott-Raven publishers, c1997.
- Brueton L, Huson SM, Winter RM, Williamson R (1988) Chromosomal localisation of a developmental gene in man: direct DNA analysis demonstrates that Greig cephalopolysyndactyly maps to 7p13. *Am J Med Genet* **31**: 799-804

- Cabot A, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Ducroq D, Smahi A, Souied E, Munnich A, Kaplan J (1999) A gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus (NYS1) maps to chromosome Xp11.4-p11.3. *Am J Hum Genet* **64**: 1141-1146
- Carlson BM (2004) *Human embryology and developmental biology*, 3rd edn. St. Louis, Mo.: Mosby.
- Carrel L, Clemson CM, Dunn JM, Miller AP, Hunt PA, Lawrence JB, Willard HF (1996) X inactivation analysis and DNA methylation studies of the ubiquitin activating enzyme E1 and PCTAIRE-1 genes in human and mouse. *Hum Mol Genet* **5**: 391-401
- Chung IH, Lee HC, Park JH, Ko JJ, Lee SH, Chung TG, Kim HJ, Cha KY, Lee S (2006) The biallelic expression pattern of X-linked genes in Klinefelter syndrome by pyrosequencing. *Am J Med Genet A* **140**: 527-532
- Cox BJ, Vollmer M, Tamplin O, Lu M, Biechele S, Gertsenstein M, van Campenhout C, Floss T, Kuhn R, Wurst W, Lickert H, Rossant J (2010) Phenotypic annotation of the mouse X chromosome. *Genome Res* **20**: 1154-1164
- de Conciliis L, Marchitello A, Wapenaar MC, Borsani G, Giglio S, Mariani M, Consalez GG, Zuffardi O, Franco B, Ballabio A, Banfi S (1998) Characterization of Cxorf5 (71-7A), a novel human cDNA mapping to Xp22 and encoding a protein containing coiled-coil alpha-helical domains. *Genomics* **51**: 243-250
- Dobyns WB, Filauro A, Tomson BN, Chan AS, Ho AW, Ting NT, Oosterwijk JC, Ober C (2004) Inheritance of most X-linked traits is not dominant or recessive, just X-linked. *Am J Med Genet A* **129A**: 136-143
- Feather SA, Woolf AS, Donnai D, Malcolm S, Winter RM (1997) The oral-facial-digital syndrome type 1 (OFD1), a cause of polycystic kidney disease and associated malformations, maps to Xp22.2-Xp22.3. *Hum Mol Genet* **6**: 1163-1167
- Ferrante MI, Giorgio G, Feather SA, Bulfone A, Wright V, Ghiani M, Selicorni A, Gammara L, Scolari F, Woolf AS, Sylvie O, Bernard L, Malcolm S, Winter R, Ballabio A, Franco B (2001) Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* **68**: 569-576
- Gallegos Rivas MC, Romero Gutierrez G, Perez Lopez NM, Salazar Torres M (2007) [Major and multiple birth defects in newborns of women attended in a tertiary care hospital]. *Ginecol Obstet Mex* **75**: 247-252
- Gilbert SF (2000) *Developmental biology*, 6th edn. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P, Urquhart J, Sharkey FH, Zucca C, Grasso R, Marelli S, Castiglia L, Di Benedetto D, Musumeci SA,

- Vitello GA, Failla P, Reitano S, Avola E, Bisulli F, Tinuper P, Mastrangelo M, Fiocchi I, Spaccini L, Torniero C, Fontana E, Lynch SA, Clayton-Smith J, Black G, Jonveaux P, Leheup B, Seri M, Romano C, dalla Bernardina B, Zuffardi O (2009) Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(X)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and EEG anomalies in males and females. *Am J Hum Genet* **85**: 394-400
- Giorgio G, Alfieri M, Prattichizzo C, Zullo A, Cairo S, Franco B (2007) Functional characterization of the OFD1 protein reveals a nuclear localization and physical interaction with subunits of a chromatin remodeling complex. *Mol Biol Cell* **18**: 4397-4404
- Golabi M, Leung A, Lopez C (1993) Simpson-Golabi-Behmel Syndrome Type 1. *GeneReviews*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301398>.
- Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, Siggers P, Steiner K, Tam PP, Monaco AP, Willard HF, Koopman P (1998) The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet* **7**: 737-742
- Guelly C, Zhu PP, Leonardis L, Papic L, Zidar J, Schabhuettl M, Strohmaier H, Weis J, Strom TM, Baets J, Willems J, De Jonghe P, Reilly MM, Frohlich E, Hatz M, Trajanoski S, Pieber TR, Janecke AR, Blackstone C, Auer-Grumbach M (2011) Targeted high-throughput sequencing identifies mutations in atlastin-1 as a cause of hereditary sensory neuropathy type I. *Am J Hum Genet* **88**: 99-105
- Hackett A, Tarpey PS, Licata A, Cox J, Whibley A, Boyle J, Rogers C, Grigg J, Partington M, Stevenson RE, Tolmie J, Yates JR, Turner G, Wilson M, Futreal AP, Corbett M, Shaw M, Gecz J, Raymond FL, Stratton MR, Schwartz CE, Abidi FE (2010) CASK mutations are frequent in males and cause X-linked nystagmus and variable XLMR phenotypes. *Eur J Hum Genet* **18**: 544-552
- Johnston JJ, Olivos-Glander I, Killoran C, Elson E, Turner JT, Peters KF, Abbott MH, Aughton DJ, Aylsworth AS, Bamshad MJ, Booth C, Curry CJ, David A, Dinulos MB, Flannery DB, Fox MA, Graham JM, Grange DK, Guttmacher AE, Hannibal MC, Henn W, Hennekam RC, Holmes LB, Hoyme HE, Leppig KA, Lin AE, Macleod P, Manchester DK, Marcelis C, Mazzanti L, McCann E, McDonald MT, Mendelsohn NJ, Moeschler JB, Moghaddam B, Neri G, Newbury-Ecob R, Pagon RA, Phillips JA, Sadler LS, Stoler JM, Tilstra D, Walsh Vockley CM, Zackai EH, Zadeh TM, Brueton L, Black GC, Biesecker LG (2005) Molecular and clinical analyses of Greig cephalopolysyndactyly and Pallister-Hall syndromes: robust phenotype prediction from the type and position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet* **76**: 609-622
- Johnston JJ, Teer JK, Cherukuri PF, Hansen NF, Loftus SK, Center NHIS, Chong K, Mullikin JC, Biesecker LG (2010) Massively parallel sequencing of exons on the X chromosome identifies RBM10 as the gene that causes a syndromic form of cleft palate. *Am J Hum Genet* **86**: 743-748

- Kalantry S (2011) Recent advances in X-chromosome inactivation. *J Cell Physiol* **226**: 1714-1718
- Lederer D, Grisart B, Digilio MC, Benoit V, Crespín M, Ghariani SC, Maystadt I, Dallapiccola B, Verellen-Dumoulin C (2012) Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. *Am J Hum Genet* **90**: 119-124
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E (2003) A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet* **12**: 1725-1735
- Logan M (2003) Finger or toe: the molecular basis of limb identity. *Development* **130**: 6401-6410
- Lyon MF (1999) Imprinting and X-chromosome inactivation. *Results Probl Cell Differ* **25**: 73-90
- Martínez-de Villarreal LE, Limón-Benavides C, Valdez-Leal R, Sánchez-Pena MA, Villarreal-Pérez JZ (2001) [Impact of weekly administration of folic acid on folic acid blood levels]. *Salud Pública Mex* **43**: 103-107
- Moody SA (2007) *Principles of developmental genetics*, Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press.
- Morton NE (1955) Sequential tests for the detection of linkage. *Am J Hum Genet* **7**: 277-318
- Najm J, Horn D, Wimplinger I, Golden JA, Chizhikov VV, Sudi J, Christian SL, Ullmann R, Kuechler A, Haas CA, Flubacher A, Charnas LR, Uyanik G, Frank U, Klopocki E, Dobyns WB, Kutsche K (2008) Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum. *Nat Genet* **40**: 1065-1067
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC, Lee C, Turner EH, Smith JD, Rieder MJ, Yoshiura K, Matsumoto N, Ohta T, Niikawa N, Nickerson DA, Bamshad MJ, Shendure J (2010) Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* **42**: 790-793
- Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Müller U (2004) Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* **74**: 558-563

- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Thompson MW, Hamosh A (2007) Thompson & Thompson genetics in medicine, 7th edn. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Ornitz DM, Marie PJ (2002) FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev* **16**: 1446-1465
- Pajni-Underwood S, Wilson CP, Elder C, Mishina Y, Lewandoski M (2007) BMP signals control limb bud interdigital programmed cell death by regulating FGF signaling. *Development* **134**: 2359-2368
- Pettigrew AL, Greenberg F, Caskey CT, Ledbetter DH (1991) Greig syndrome associated with an interstitial deletion of 7p: confirmation of the localization of Greig syndrome to 7p13. *Hum Genet* **87**: 452-456
- Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D (1996) Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* **12**: 241-247
- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF (2002) Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. *Am J Hum Genet* **71**: 168-173
- Radhakrishna U, Blouin JL, Mehenni H, Patel UC, Patel MN, Solanki JV, Antonarakis SE (1997) Mapping one form of autosomal dominant postaxial polydactyly type A to chromosome 7p15-q11.23 by linkage analysis. *Am J Hum Genet* **60**: 597-604
- Reich DE, Schaffner SF, Daly MJ, McVean G, Mullikin JC, Higgins JM, Richter DJ, Lander ES, Altshuler D (2002) Human genome sequence variation and the influence of gene history, mutation and recombination. *Nat Genet* **32**: 135-142
- Rieger ME, Sims AH, Coats ER, Clarke RB, Briegel KJ (2010) The embryonic transcription cofactor LBH is a direct target of the Wnt signaling pathway in epithelial development and in aggressive basal subtype breast cancers. *Mol Cell Biol* **30**: 4267-4279
- Sadler TW, Langman J (2006) Langman's medical embryology, 10th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P (2000) Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet* **107**: 343-349
- Sobreira NL, Cirulli ET, Avramopoulos D, Wohler E, Oswald GL, Stevens EL, Ge D, Shianna KV, Smith JP, Maia JM, Gumbs CE, Pevsner J, Thomas G, Valle D, Hoover-Fong JE, Goldstein DB (2010) Whole-genome sequencing of a single proband together with linkage analysis identifies a Mendelian disease gene. *PLoS Genet* **6**: e1000991

- Strachan T, Read AP (2004) Human molecular genetics 3, 3rd edn. London ; New York: Garland Press.
- Sutton VR, Van den Veyver IB (1993) Focal Dermal Hypoplasia. *GeneReviews*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301712>.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR (2009) A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat Genet* **41**: 535-543
- Toriello HV, Franco B (1993) Oral-Facial-Digital Syndrome Type I. *GeneReviews*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301367>.
- Turnpenny PD, Ellard S (2012) Emery's elements of medical genetics, 14th edn. Philadelphia, PA: Elsevier/Churchill Livingstone.
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH (1991) GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **352**: 539-540
- Yoshikawa H, Fujiyama A, Nakai K, Inazawa J, Matsubara K (1998) Detection and isolation of a novel human gene located on Xp11.2-p11.4 that escapes X-inactivation using a two-dimensional DNA mapping method. *Genomics* **49**: 237-246

APENDICES

APENDICE A

RESULTADO DEL ANÁLISIS DE aCGH DEL CASO ÍNDICE



Genetic Testing Results

GeneDx

207 Perry Parkway
Gaithersburg, MD 20877
Phone: 301-519-2100
Fax: 301-519-2892

E-mail: genedx@genedx.com
www.genedx.com

Patient Name: Caso índice (IV.5)
Date of Birth: 12/20/1971

Specimen Type: Blood

Test(s) requested: GenomeDx: Whole-Genome Oligonucleotide Array CGH (105K)

Test Indication(s): Male with developmental delay, brachycephaly, scoliosis, polydactyly/syndactyly, ptosis and cerebellar hypoplasia. Previous karyotype performed by outside laboratory reported as normal (46,XY).

Result: **NEGATIVE (NORMAL)**

Sex: male

Interpretation: Genome-wide microarray analysis with approximately 105,000 oligonucleotide probes yielded normal results in the genomic DNA obtained from this male individual. DNA copy number abnormalities of known clinical significance were not identified.

Methods: Whole-genome array-based comparative genomic hybridization (aCGH) was performed using the GenomeDx microarray, v3.2. The array contains ~105,000 oligonucleotide probes spaced at an average distance of 37 kb based on the human genome sequence build hg18. The GenomeDx array can detect copy number changes >50 kb in more than 150 targeted regions (microdeletion/duplication loci, and pericentromeric and subtelomeric regions) and >200 kb in the remainder of the genome. Copy number changes that have been published or identified in clinically normal individuals as per the Database of Genomic Variants (projects.tcag.ca/variation) may not be reported. With some exceptions, carrier status for recessive disorders due to a deletion/duplication of a single gene is not routinely reported.

Report electronically signed by:

Liz Butler, MS, CGC

Senior Genetic Counselor

Report electronically signed by:

Swaroop Aradhya, Ph.D., FACMG

Director, Clinical Cytogenetics

Citations: **DISCLAIMER:** This microarray identifies gain or loss of DNA segments (duplications/deletions; segmental aneusomy) and chromosomal aneuploidy in the human genome. GenomeDx microarray does not detect balanced chromosomal aberrations, including Robertsonian translocation, reciprocal translocations, inversions, and balanced insertions, and it is limited in its ability to detect mosaicism. The GenomeDx array will also not detect imbalances in genomic regions that are not represented on the microarray. Normal findings do not rule out the diagnosis of any disorder since some genetic abnormalities may be undetectable with this assay. Clinical implications of some copy number alterations may be unknown at the time of analysis.

This test was developed and its performance determined by GeneDx. It has not been cleared or approved by the U.S. Food and Drug Administration. The FDA has determined that such clearance or approval is not necessary. This test is used for clinical purposes. Pursuant to the requirements of CLIA '88, this laboratory has established and verified the test's accuracy and precision. Genetic testing using the methods applied at GeneDx is expected to be highly accurate. However, the chance of a false positive or false negative result, due to laboratory errors incurred during any phase of testing can not be completely excluded. CLIA ID#: 21D0969951. MD License 953.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María del Carmen Barboza Cerda

Candidato para el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS

con Orientación en Morfología

Título de la Tesis: Mapeo genético de un nuevo síndrome ligado al cromosoma X en una familia mexicana

Área de estudio: Morfología

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 28 de Febrero de 1970 en Monterrey N.L.; hija del Sr. Esteban Barboza Barboza y la Sra. María Carmen Cerda Torres.

Escolaridad:

- Obtención del Título de Licenciatura de Químico Clínico Biólogo, en la Facultad de Medicina, UANL. (1993)
- Obtención del grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genéticas, en la Facultad de Medicina, UANL (1998).

Experiencia Profesional:

- Investigador Asociado "A" del Instituto Nacional de Salud Pública de Febrero de 1998 a Enero de 2003.
- Investigador de Tiempo Completo de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde Enero de 2003.

Reconocimientos:

- Miembro del Comité Científico en el marco del XXVI Congreso Nacional de Investigación en Medicina; Septiembre del 2011.
- Estudiante distinguido en el programa de Doctorado en Ciencias con orientación en Morfología; Octubre del 2011.