

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN EL GEN *FGD1* EN PACIENTES  
CON FENOTIPO DE SINDROME DE AARSKOG”

Por

DRA. MARIANA PÉREZ CORIA

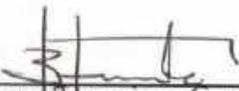
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
GENÉTICA MÉDICA

MONTERREY, N.L.

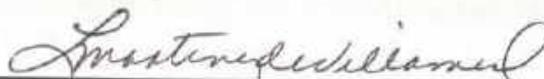
FEBRERO 2014

**"IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *FGD1* EN PACIENTES  
CON FENOTIPO DE SINDROME DE AARSKOG"**

Aprobación de la tesis:



**Dra. Beatriz de la Fuente Cortez**  
Director de tesis



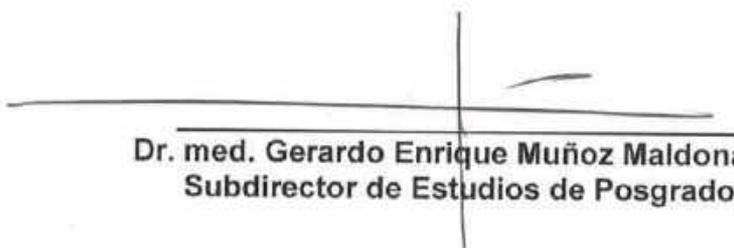
**Dra en Med. Laura Elia Martínez Garza**  
Miembro de la Comisión de Tesis



**QFB. José Lugo Trampe**  
Miembro de la Comisión de Tesis



**MC Michelle Zamudio Osuna**  
Miembro de la Comisión de Tesis



**Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Ante la cristalización de uno de mis grandes sueños quiero agradecer a toda la gente que directa o indirectamente estuvo involucrada en la realización de este proyecto.

Agradezco infinitamente a mis maestros Dra. Laura Martínez, Dra. Beatriz de la Fuente, Dr. Daniel Campos, Dra. Arellí López por compartirme sus conocimientos y experiencia, al QFB José Lugo Trampe por su profesionalismo y entusiasmo ante cada labor asignada, a la MC Michelle Zamudio por su esfuerzo y entrega,

Quiero agradecer a mis compañeros durante estos 3 años de preparación profesional, a Aideé por transitar este camino juntas y brindarme su amistad invaluable, a Marisol por sus consejos, sus conocimientos pero sobre todo por su grandiosa amistad, a Fabiola, Dalia, César y Carlos por hacer más ameno el día a día y mostrar siempre su amistad y apoyo.

Pero en especial quiero dedicar estas líneas a mi familia; la cual siempre se mantuvo firme apoyándome en todo momento, aun cuando las circunstancias no fueran las mejores; nunca dejaron de creer en mí, sin ustedes este sueño jamás nunca se hubiese logrado. Gracias a mi padre Armando por sus consejos, su apoyo y fortaleza, a mi hermano Ricardo por estar ahí en mis momentos más críticos y vulnerables, siempre afrontando todo con la mejor de sus sonrisas, a mi madre María Elena por su ternura y apoyo incondicional, siempre preocupada por mi bienestar y confort y por último a Daniel por apoyarme, brindarme su amor y paciencia en la recta final de este mi gran sueño.

A todos y cada uno de ustedes solo puedo decirles ¡Gracias Totales!

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I	Página
1. RESÚMEN .....	1
Capítulo II	
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Definición y Epidemiología.....	2
2.2 Características Clínicas.....	3
2.3 Diagnóstico.....	6
2.4 Seguimiento y manejo.....	6
2.5 Estado de Portadora.....	8
2.6 Gen <i>FGD1</i> .....	8
2.7 Expresión del gen <i>FGD1</i> .....	11
2.8 Análisis mutacional del gen <i>FGD1</i> .....	13
2.9 Inactivación del X y <i>FGD1</i> .....	15
2.10 Mosaicismo germinal en Síndrome de Aarskog.....	16
2.11 Justificación.....	17

### Capítulo III

3. OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo General.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18

### Capítulo IV

4. MATERIAL Y MÉTODOS .....	19
4.1 Tipo de estudio.....	19
4.2 Población de estudio.....	19
4.2.1 Criterios de Inclusión.....	19
4.2.2 Criterios de Exclusión.....	20
4.2.3 Criterios de Eliminación.....	20
4.3 Descripción del Diseño.....	20
4.3.1 Recolección de la muestra.....	20
4.3.2 Extracción automatizada de DNA.....	21
4.3.3 Cuantificación y calidad del DNA.....	24
4.3.4 PCR.....	27
4.3.5 Secuenciación.....	29
4.3.5.1 Análisis mutacional.....	29

Capítulo V

5. RESULTADOS.....	30
--------------------	----

Capítulo VI

6. DISCUSIÓN.....	42
-------------------	----

Capítulo VII

7. CONCLUSIONES.....	51
----------------------	----

Capítulo VIII

8. ANEXOS.....	53
8.1 Consentimiento Informado para menores de 12 años.....	53
8.2 Consentimiento Informado para preescolares.....	57
8.3 Consentimiento para ser sujeto de estudio.....	60
8.4 Cuadro de contingencia de características clínicas.....	68

Capitulo IX

9. BIBLIOGRAFIA ..... 70

Capitulo X

10. RESUMEN AUTOBIOGRAFICO ..... 76

10. Concentración y calidad del DNA .....	40
11. Tabla de contingencia de características clínicas, cambios en cDNA, y su efecto a nivel proteico.....	41

## INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Vías de señalización intracelular FGD1.....	10
2. Ejemplos de electroferogramas en pacientes con la mutación.....	41
3. Frecuencia de características primarias en varones.....	36
4. Frecuencia de características secundarias en varones.....	37
5. Frecuencia de características adicionales en varones.....	38
6. Frecuencia de características primarias en femeninas.....	38
7. Frecuencia de características secundarias en femeninas.....	39
8. Frecuencia de características adicionales en femeninas .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAS:** Síndrome de Aarskog

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**T:** Timina

**A:** Adenina

**G:** Guanina

**Mg:** Miligramos

**Mts:** Metros

**C:** Citocina

**cc:** centímetros cúbicos

**FGD1:** Factor de Intercambio de Guanina 1

## CAPITULO I

### 1. RESUMEN

El síndrome de Aarskog-Scott (AAS) (OMIM #305400) también conocido como displasia faciogenital es un síndrome con herencia ligada al X que se caracteriza por presentar dismorfismo facial, manos cortas y anchas, escroto en chal, y una talla baja de predominio acromélico. Hasta la fecha se conocen más de 50 mutaciones en el gen *FGD1*, sin embargo los reportes han sido en pacientes de origen caucásico, no teniendo datos moleculares de nuestra población. En el presente estudio se reporta la caracterización clínica y genética de 4 familias no consanguíneas con fenotipo de síndrome de Aarskog en quienes se realiza secuenciación del gen *FGD1* identificándose en dos familias dos mutaciones de paro no reportadas en la literatura: p.(Gln664\*) y p.(Glu380\*) y dos familias con 2 cambios (rs2239809) y (rs3830137) no deletéreos y previamente reportados como variantes o polimorfismos. Fenotípicamente todos los pacientes varones cumplen con criterios clínicos del síndrome, encontrando discrepancia de fenotipos en las pacientes femeninas portadoras de la mutación. Nuestros hallazgos sostienen la heterogeneidad genética descrita en el síndrome de Aarskog, evidenciando que mujeres portadoras de la mutación pueden cursar asintomáticas y que pacientes con fenotipo clásico pudieran no presentar cambios detectables por análisis de secuenciación convencional.

## CAPITULO II

### 2. INTRODUCCIÓN

El síndrome de Aarskog-Scott (AAS) (OMIM #305400) también conocido como displasia faciogenital fue descrito por primera vez en 1970 por Aarskog quien observó 7 varones afectados en una familia al oeste de Noruega<sup>2</sup> con talla baja, facies similares y anomalías genitales incluyendo hipertelorismo, nariz corta y escroto en chal y en 1971 Scott<sup>3</sup> reporta las mismas características en 3 individuos más.

#### 2.1 Definición y Epidemiología

Se define como un síndrome con herencia ligada al cromosoma X caracterizado por talla baja, hipertelorismo, nariz corta, manos cortas y anchas y escroto en chal.

Tiene una incidencia de 1 en 25,000 recién nacidos vivos, la cual es una frecuencia estimada; ya que a la fecha se han publicado cerca de 29 casos molecularmente probados a nivel mundial, sin embargo el número de casos con diagnóstico clínico es mucho mayor.

Según la experiencia en Bélgica y Manchester indican que hay alrededor de 2-3 nuevos pacientes con una mutación probada en el gen *FGD1* por año; la misma prevalencia que para el síndrome de Angelman y Prader-Willi<sup>11</sup>.

## 2.2 Características Clínicas

Los estudios demuestran que los pacientes con estudio molecular confirmado para el síndrome presentan las características clínicas de hipertelorismo, nariz corta, manos cortas y anchas, escroto en chal, y una talla baja de media a moderada de predominio acromelico<sup>3,4,29</sup>.

El fenotipo de la mayoría de los pacientes está caracterizado por dismorfismo craneofacial distintivo consistente en abombamiento frontal, pico de viuda, hipertelorismo, puente nasal ancho, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, ptosis, hipoplasia maxilar, nariz corta con narinas antevertidas, filtrum largo, pliegue transverso en el mentón, pabellones auriculares displásicos con lóbulos adelgazados<sup>38</sup>.

Dentro de las descripciones hechas se enlistan las siguientes características: en extremidades la braquidactilia (84%) con cintillas interdigitales, manos anchas y pequeñas con articulaciones hiperextensibles, pliegues profundos y clinodactilia. Desde 1990, Aarskog y colaboradores describieron como signo de la mano característico la hiperextensibilidad de las articulaciones interfalángicas proximales con la flexión concomitante de las articulaciones distales.

El hipertelorismo (91%), hipoplasia maxilar (74%), hiperlaxitud articular (72%), puente nasal ancho (69%), sindactilia (65%), anomalías cervicales (56%), anomalías en costillas y esternón (43%), problemas de aprendizaje y déficit de conducta (30%).

Anormalidades radiográficas incluyen falanges hipoplásicas (77%) y edad ósea retrasada (88%), también se han reconocido una variedad de anomalías vertebrales incluyendo espina bífida oculta, hipoplasia del odontoides, retraso en la maduración ósea (50%)<sup>7</sup>. Otras anomalías esqueléticas descritas incluyen pectus excavatum, pie plano y ancho, camptodactilia y linfedema descritos como raros<sup>39</sup>. La edad ósea usualmente suele verse retardada. A nivel radiográfico se puede encontrar defectos en los cuerpos vertebrales cervicales, escoliosis, costillas supernumerarias, y calcificaciones en los discos intervertebrales<sup>40,41</sup>.

Dentro de las anomalías urogenitales se encuentra escroto en chal, criptorquidia uni o bilateral e hipospadias<sup>40</sup>. Además se ha descrito como anomalías concomitantes hernia inguinal, umbilical y ombligo prominente, drenaje venoso anómalo, enfermedad de Hirshprung, malrotación intestinal, vólvulos, riñones hipoplásicos, hipoplasia del esmalte dental, retraso en la erupción dentaria<sup>8,42-43</sup>.

La discapacidad intelectual según Logie y Porteous<sup>30</sup> no es un hallazgo típico ya que ellos demostraron en un grupo de pacientes una distribución de IQ normal; sin embargo estudios recientes demuestran que un tercio de los varones afectados presenta discapacidad intelectual de leve a moderada.

Hiperactividad y déficit de atención han sido encontradas en 68% de los pacientes con intelecto normal y en el 84% de los pacientes con discapacidad moderada<sup>25,31,32</sup> pudiendo estar acompañado por defectos cardíacos congénitos, además una gama de condiciones oftalmológicas pueden aunarse al cuadro como: oftalmoplegía, estrabismo, megalocórnea<sup>38</sup>.

Asociada a la discapacidad intelectual y a los problemas de conducta se encuentra la mutación de sentido equivocado R402W en la posición 1204 (c.1204C>T) localizada en el exón 6 del gen *FGD1*<sup>26</sup>.

### 2.3 Diagnóstico

Ya que las anomalías clínicas son muy variadas; se han consensado criterios (Criterios de Teebi) para poder establecer un diagnóstico clínico, los cuales se dividen en criterios primarios, secundarios y adicionales. (Tabla 1)

Tabla 1.  
Criterios de Teebi.

<i>Criterios Primarios</i>	<i>Criterios Secundarios</i>	<i>Características Adicionales</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hipertelorismo</li><li>• Narinas Antevertidas</li><li>• Pliegue debajo del labio inferior</li><li>• Braquidactilia/Dedos anchos</li><li>• Cintillas Interdigitales</li><li>• Escroto en chal</li><li>• Sindactilia</li><li>• Clinodactilia 5to dedo</li><li>• Camptodactilia</li><li>• Talla Baja</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Pico de viuda</li><li>• Ptosis palpebral</li><li>• Fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo</li><li>• Hiperlaxitud articular</li><li>• Pie ancho</li><li>• Hernia inguinal/umbilical</li><li>• Criptorquidia</li><li>• Pabellones auriculares anormales</li><li>• Ombligo prominente</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Obesidad</li><li>• Filtrum largo</li><li>• Hipoplasia medio facial</li><li>• Maloclusión dental</li><li>• Pliegue palmar transverso</li><li>• Edad ósea retrasada</li><li>• Hipospadias</li><li>• Abombamiento frontal</li><li>• Retraso psicomotor</li></ul>

### 2.4 Seguimiento y manejo

- Crecimiento y desarrollo: La talla al nacimiento puede ser normal, al igual que el perímetro cefálico, sin embargo conforme comienzan a desarrollarse puede manifestarse la desproporción del perímetro cefálico. La disminución de la talla comienza a hacerse evidente dentro del primer año de vida, sin embargo la maduración sexual es normal. Usualmente la talla final en varones esta reportada hasta 1.60 metros en población caucásica.

El uso de terapia con hormona de crecimiento no está especialmente recomendado en estos pacientes; ya que en 1999 Petryk y colaboradores realizaron un estudio donde incluyeron a pacientes con síndrome de Aarskog y se observó que la talla en estos pacientes no incremento significativamente para su talla final de adultos<sup>48</sup>.

- Desarrollo Neurológico y Comportamiento: en la niñez temprana el desarrollo de las habilidades motoras y el lenguaje no se observa alterado, del 20 al 30% de los pacientes pueden tener IQ por debajo de 70, documentándose también déficit de atención e hiperactividad.
- Oftalmológico: Además del hipertelorismo y la ptosis reportada, se puede aunar estrabismo, miopía o astigmatismo, por lo que se recomienda una evaluación oftalmológica en los pacientes antes que comiencen la edad escolar<sup>49</sup>.
- Odontológico: anomalías dentales se han documentado como retraso en la erupción de los dientes, incisivos anchos, oligodontia y exceso de caries.

## 2.5 Estado de portadoras

Establecer el estado de portador en las mujeres es complicado ya que pueden pasar asintomáticas o con una expresión parcial de las manifestaciones clínicas<sup>7</sup>.

Presentan talla baja, manos y pies pequeños, no se han encontrado características urogenitales distintivas dentro las portadoras ni características faciales distintivas<sup>39</sup>.

## 2.6 Gen *FGD1*

En 1993 se mapeo por primera vez el locus para el AAS en Xp11.12 por medio de estudios en familias que a través de una translocación balanceada 8;X en una mamá y un hijo con expresión completa del síndrome, el cariotipo del varón afectado fue interpretado con la siguiente fórmula cromosómica: 46,XY,t(8;X)(q13;p21.1). Posteriormente el gen fue identificado por Pateris y colaboradores en 1994 utilizando clonas de YAC<sup>9</sup>.

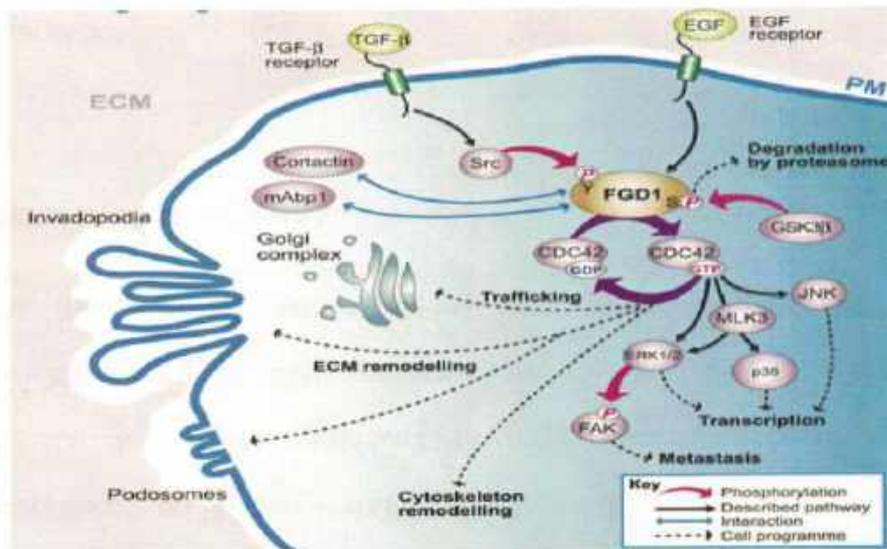
El gen *FGD1* (OMIM; 300546) se encuentra compuesto por 18 exones expandiéndose sobre 51 kb de DNA genómico, que se transcribe a 4.4 kb de RNA mensajero y que codifican a una proteína de 961 aminoácidos resultando en un factor de intercambio de nucleótidos de guanina uniéndose específicamente a la proteína Rho Cdc42<sup>35</sup>.

La proteína FGD1 es miembro de la familia DBL, actúa como un factor de intercambio de guanina que específicamente catalizando el GDP a GTP de la GTPasa Rho Cdc42 perteneciente a una familia de Rho GTPasas de bajo peso molecular induciendo un cambio conformacional que permite la interacción con los efectores,<sup>12</sup> las cuales interaccionan con proteínas efectoras que manejan una variedad de procesos biológicos incluyendo la regulación del crecimiento celular, el remodelamiento del citoesqueleto (tamaño celular, polaridad, movimiento celular, citokinesis), el tráfico vesicular, transcripción génica, progresión en el ciclo celular, adhesión celular y transformación oncogénica.(Fig. 1)

Señales aberrantes a través de las Rho GTPasas a menudo se han implicado en enfermedades humanas<sup>14,15</sup> generalmente las mutaciones ocurren río arriba de los reguladores (GEFs) implicados como componente de invasión y metástasis permitiendo un crecimiento aberrante<sup>16</sup>.

Siendo *FGD1* uno de los GEF con actividad específica para CDC42, (tal como muchos otros Rho) GEFs contiene un dominio de homología DBL (DH) posicionado justo adyacente al dominio de homología a pleckstrina (PH), juntos estos dominios catalizan el intercambio de cdc42 unido a GDP por GTP, además presenta un dominio terminal rico en prolina (PRD), un anillo Fab-1 de zinc rico en cisteína EEA1 (FYVE) dominio y un segundo dominio PH C-terminal<sup>7</sup>.

Fig. 1.  
Vía de señalización FGD1



Encontrándose potenciales sitios de unión en PRD con SH3 ( Homologo 3Src), SPRE1, y profilina.

El producto génico contiene un sitio de unión H3 rico en prolina (residuos 1-355), un dominio RhoGEF , un dominio de homología DBL y un pleckstrina (residuos 390-714), dominio FYVE (residuos 714-821) y dominio PH terminal (822-961).

La región N terminal se piensa que recluta a la actina del citoesqueleto subcortical y al aparato de Golgi a través de interacciones proteína-proteína sobre los tractos de poliprolina. Además de regular negativamente la actividad de intercambio de nucleótidos de guanina el dominio PH N-terminal puede servir como blanco de una adecuada localización intracelular.

El dominio FYVE usualmente se une con alta afinidad y especificidad al fosfatidil inositol 3 fosfato siendo crucial para la interacción membranal y del sistema endosoma<sup>17</sup>.

## **2.7 Expresión del gen *FGD1***

En el desarrollo del esqueleto del ratón *FGD1* se expresa casi exclusivamente en las condensaciones mesenquimales pre-cartilaginosas, pericondrio y periostio, activando la proliferación de condrocitos y condroblastos, no siendo expresado en las fases tempranas de la esquelotogénesis pero es detectado en los componentes de osificación esquelética de huesos craneofaciales, vertebrales, costillas, huesos largos y falanges, componentes esqueléticos derivados de la cresta neural y del mesodermo lateral y paraxial, siendo un importante regulador del desarrollo óseo.

Se sugiere que a través de la modulación de la activación de CDC42, *FGD1* se involucre en la regulación de la exportación de proteínas del complejo de Golgi<sup>18</sup>.

En 2011, Gao y colaboradores encontraron que *FGD1* es expresado en células madre mesenquimales aisladas de médula ósea de un adulto, las cuales pueden diferenciarse en fibroblastos, adipositos, osteoblastos y

condrocitos, lo cual es consistente con las manifestaciones clínicas de FGDY, extendiendo el papel del remodelado óseo hasta la vida adulta<sup>19,20</sup>.

Últimos estudios le han implicado un potencial rol en el control del remodelamiento de la matriz extracelular, la función vascular y la progresión de cáncer,<sup>12,13</sup> considerando que las Rho GTPasa Cdc42 es un regulador principal de la polimerización del core de la maquinaria de la actina en los invadopodios, mediando la regulación de la actina en el citoesqueleto en la respuesta a señales extracelulares, implicándose en la polaridad, motilidad y expresión génica, así como la transformación y metástasis por lo que Ayala y colaboradores utilizando muestras de células cultivadas de adenocarcinoma ductal infiltrante y de cáncer prostático mostraron como Fgd1 es expresado en cáncer de mama y próstata en oposición a las células normales y correlacionando con la agresividad del tumor; dichos niveles altos de expresión no fueron encontrados en células de tejido sano. Además la descripción de la función de FGD1 en la estimulación de TGF- $\beta$  de la célula endotelial durante la diferenciación osteoblástica y de la función de la remodelación endotelial<sup>21</sup>.

## 2.8 Análisis mutacional del gen *FGD1*

Hasta la fecha e incorporando la información de artículos publicados, datos no publicados y reportes de congresos se han caracterizado 56 mutaciones diferentes identificadas a través de los 18 exones del gen, con el siguiente espectro mutacional: 29 mutaciones con sentido erróneo, 16 con cambio de sentido, 5 sin sentido, 3 en el sitio de splicing, y 3 deleciones.

En todas las mutaciones reportadas en donde se ha testado a las madres se han encontrado portadoras indicando que existe un poco porcentaje de mutaciones de novo<sup>11,29</sup>.

A nivel mundial, se han publicado 29 casos molecularmente comprobados, casi todos los casos de población caucásica, no teniendo reportes de otros grupos étnicos.

Interesantemente, mutaciones que involucran la función de *FGD1* encontradas en los pacientes conllevan 3 tipos de alteraciones:

- a) deleciones de toda la región codificante *FGD1*
- b) mutaciones con pérdida de sentido o con cambio en el marco de lectura formando una proteína trunca
- c) c) mutaciones sin sentido localizadas en los dominios funcionales.

Las mutaciones se han encontrado distribuidas al azar en todos los dominios, modificando la localización intracelular o la actividad catalítica de Fgd1, dentro de estas últimas podemos encontrar E380A, R402Q, R408Q, R442H, R443L, M466V, R522H, S558W y adyacente al dominio de pleckstrina R610Q, también se han descrito como con mayor frecuencia en el dominio PRD (S205I, P312L), y en el dominio FYVE (K748E).

Sin embargo, los casos con mutaciones comprobadas reportados en la literatura son los siguientes: Pasteris y cols (1994) p.L464fsX469 en 2 personas emparentadas con estado de madre portadora, Schwartz y cols. (2000) p.R522H y delección de exones 9-12 en una persona con madre portadora de la mutación y presente en 2 varones no emparentados, Orrico y cols (2000) describen una mutación p.R610Q en 3 varones emparentados con madre portadora, Lebel y cols (2002) reportan p.P312L en 3 varones emparentados con madre portadora.

Posteriormente Orrico (2004) documenta una mutación p.F843fsX862 en un propósito con estado de portador en la madre, p.P438fsX470 en 2 varones no emparentados y en sus madres portadoras, p.R443H en un varón sin encontrarse en la madre, p.E380A en 2 varones emparentados con estado de madre portadora, p.P314fsX525 en un varón, p.P327fsX359, p.S205I en un varón y en su madre portadora, p.176fsX216 en un varón y en 1 pareja de gemelos y su madre portadora asimismo en 2005 reporta varón con su madre portadora de una mutación p.R408Q.

Shalev y cols (2006) describen una mutación nueva en 7 varones emparentados y en la madre portadora (E730fsX862). Kaname (2006) reporta una proteína que codifica en codón de paro (p.E714X) en un varón, y p.R443L en un varón con determinación de estado de portadora en la madre.

Posteriormente Orrico (2007) describe una mutación en p.P315fsX319 en 2 varones emparentados con madre portadora. Bottani y cols (2007) reportan un paciente con madre portadora de mutación p.M466V.

Bedoyan (2009) reporta delección completa en paciente varón sin determinar estado de portadora en la madre. En ese mismo año Orrico reporta p.L268fsX359, p.R402Q, p.Y530X, p.P539fsX550, p.S558W, c.1934+3A>C mutación en el sitio de splicing, p. E674del, p.K748E cada una encontrada en un paciente varón y en su madre como portadora y en 3 pacientes no relacionados encuentra p.R656X.

## **2.9 Inactivación DEL X y *FGD1***

El proceso de inactivación del cromosoma X es debido a la compensación de dosis que haría diferencia entre hombres y mujeres, sin embargo existen algunos genes que escapan a la inactivación y son expresados en ambos X

27,28

Sin embargo la porción más proximal del brazo corto, se ha encontrado que se expresa tanto en el cromosoma activo como en el inactivo (Xp11.21-

Xp11.22), que corresponde a una región que escapa a la inactivación del X<sup>44</sup> correspondiendo dicha porción el locus del gen *FGD1*.

### **2.10 Mosaicismo germinal en Síndrome de Aarskog**

En todos los pacientes reportados con mutación identificada, se habían encontrado a las madres como portadoras de los casos indicando pocos pacientes con mutaciones de novo.

Pilozzi-Edmonds en 2011 reportó unos gemelos con síndrome de Aarskog producto de mosaicismo germinal en la madre, ambos gemelos dicigóticos fueron hemicígotos para la mutación nueva c.175T>C (p.Gln59X), la cual es una mutación sin sentido en el exón 1, substituyendo una T por una C en la posición 175 determinando un codón de paro, en los padres no se encontró que fueran portadores de la mutación, confirmándose la maternidad por marcadores polimórficos. Reportes previos indican 2 familias en donde la mutación ocurrió de novo o por mosaicismo germinal, en estas familias, los parientes no fueron testados para evaluar el mosaicismo germinal<sup>4</sup>.

Sin embargo, se cuenta con evidencia de un posible patrón de herencia dominante (OMIM#100050) reportado en 1983<sup>23,24</sup>.

### **2.11 Justificación**

El diagnóstico de SAA se basa en las características clínicas sin embargo las manifestaciones fenotípicas pueden superponerse a otras entidades clínicas por lo que sería importante poder ofrecer un diagnóstico molecular confirmado en estos pacientes, así como brindar un adecuado asesoramiento genético a la familia.

Hasta la fecha en población mexicana no se han documentado mutaciones en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Aarskog.

Por lo que sería importante poder ofrecer una técnica diagnóstica en donde se pueda realizar el diagnóstico molecular en estos pacientes y en las mujeres portadoras.

## CAPITULO III

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante análisis de secuenciación convencional del gen *FGD1* las mutaciones encontradas en familias nucleares con fenotipo de síndrome de Aarskog.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Realizar un análisis clínico de las características prevalentes en los pacientes con fenotipo SAA.
- Brindar asesoramiento genético y riesgo de recurrencia en los individuos afectados.
- Identificar mujeres portadoras con fenotipo atenuado.

## CAPITULO IV

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Tipo de estudio.

- Serie de casos
- Descriptivo
- Observacional

#### 4.2 Población de Estudio.

Familias nucleares (Probandos/Madre) de pacientes con fenotipo compatible con síndrome de Aarskog.

##### 4.2.1 Criterios de Inclusión.

1. Pacientes Varones de 0 a 99 años en quienes de acuerdo a una evaluación genética y con respecto a los criterios clínicos para síndrome de Aarskog se sospechara dicha patología, que otorgaran su autorización por consentimiento informado de participar en el estudio.
2. Pacientes femeninas de 0 a 99 años con descendientes con el fenotipo clínico de síndrome de Aarskog que otorgaran su autorización por consentimiento informado de participar en el estudio.

#### **4.2.2 Criterios de Exclusión.**

1. Pacientes con fenotipo compatible con síndrome de Aarskog con resultado de estudio citogenético anormal.

#### **4.2.3 Criterios de Eliminación.**

1. Individuos que retiren su consentimiento para participar en el estudio.

#### **4.3 Descripción del Diseño.**

El presente estudio se basa en el análisis clínico, dismorfológico y molecular de familias con fenotipo sugestivo de síndrome de Aarskog, a través del uso de la secuenciación automática de los 18 exones del gen *FGD1*.

Se decidió utilizar los cebadores diseñados para amplificar los exones 1-18 con el software ( [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ); las secuencias y las condiciones de cebadores se encuentran disponibles bajo petición ( l.galli @ ao- siena.toscana.it )

##### **4.3.1 Recolección de la muestra.**

Se llevo a cabo previo consentimiento informado la recolección de una muestra de 3 a 4 cc de sangre periférica en un tubo de EDTA, dichas muestras fueron recolectadas en la sala de toma de muestras del departamento de Genética del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Este estudio fue previamente evaluado y aprobado por el comité de ética de la subdirección de investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **4.3.2 Extracción Automatizada de DNA**

Se realizó extracción de DNA genómico de leucocitos de sangre periférica con el uso del equipo QIAcube® y el kit de extracción QIAamp® DNA Mini and Blood Mini que realiza la purificación del ADN de una muestra de sangre periférica basado en el uso de columnas de sílica que facilitan la eliminación de inhibidores lo que nos permite tener una buena calidad y concentración de ADN.

Este método se realiza en tres pasos: la ruptura de la membrana celular usando una combinación de actividad enzimática y lisis mecánica (calor y agitación); la unión del ADN a una membrana a base de sílica que se encuentra en una columna por donde pasa la muestra para eliminar los contaminantes y un último paso de elución donde obtendremos nuestro ADN para su posterior cuantificación.

#### Equipo:

- QIAcube

#### Reactivos

- Etanol grado Biología Molecular
- QIAamp® DNA Mini and Blood Mini

#### Material

- Tubos CB (2ml) especiales para el QIAcube
- Tubos de elusión de 1-5 mL
- Micropipeta de 20-200 $\mu$ L
- Puntas con filtro, 200  $\mu$ l especiales para el QIAcube
- Puntas con filtro, 1000  $\mu$ l especiales para el QIAcube
- Adaptadores del Rotor
- Porta adaptadores del Rotor.

#### Procedimiento

Se agregan los 200 $\mu$ L de la muestra de sangre periférica en los tubos CB previamente rotulados con el código de identificación de cada paciente.

Posteriormente se retiró el adaptador colocado dentro del QIAcube y se colocaron en el mismo orden los tubos CB con las muestras.

Se colocaron en el equipo el rack con las puntas indicadas, tubos de elusión y los reactivos de acuerdo al protocolo que se realizó.

Se encendió el QIAcube y se seleccionó la aplicación "DNA" en la pantalla del menú principal

Se eligió el nombre del Kit, el tipo de muestra así como el Protocolo, presionando las flechas "▲" o "▼" y se oprimió el botón "select" entre cada paso.

Finalmente se inicio la corrida del protocolo al presionar "Start"

El equipo realizó paso a paso una revisión del sistema (muestras, materiales y reactivos necesarios), al terminar solamente se oprimió "Continuar" en cada paso.

Posteriormente se realizó una revisión automática final del material y al no encontrar el equipo problema, se procedió a realizar la extracción del DNA.

Una vez terminada la corrida, se retiraron los tubos que contienen el DNA purificado para su cuantificación con el espectrofotómetro NanoDrop.

### 4.3.3 Cuantificación y calidad del DNA

#### Fundamento

La concentración adecuada, (aproximadamente 10-100 ng/ $\mu$ l) y una óptima calidad de la muestra de ADN en una PCR son datos cruciales para la obtención de resultados.

La estimación de la calidad de una muestra de ADN es obtenida por la relación de absorbancia 260/280. En una muestra pura de ADN, la relación de absorbancia 260/280 debe ser de 1.8, valores menores indican contaminación de la muestra con proteínas y valores mayores de hasta 2.0 indican preparaciones altamente purificadas, si los valores son todavía mayores a 2.0 indica que el ADN se encuentra contaminado con fenol.

#### Equipo

- NanoDrop® ND-1000
- Micropipeta de 10  $\mu$ L

#### Reactivos

- Agua libre de nucleasas

#### Material

- Puntas con filtro (10  $\mu$ l)
- Toallas absorbentes Kimwipes

### 4.3.3 Cuantificación y calidad del DNA

#### Fundamento

La concentración adecuada, (aproximadamente 10-100 ng/ $\mu$ l) y una óptima calidad de la muestra de ADN en una PCR son datos cruciales para la obtención de resultados.

La estimación de la calidad de una muestra de ADN es obtenida por la relación de absorbancia 260/280. En una muestra pura de ADN, la relación de absorbancia 260/280 debe ser de 1.8, valores menores indican contaminación de la muestra con proteínas y valores mayores de hasta 2.0 indican preparaciones altamente purificadas, si los valores son todavía mayores a 2.0 indica que el ADN se encuentra contaminado con fenol.

#### Equipo

- NanoDrop® ND-1000
- Micropipeta de 10  $\mu$ L

#### Reactivos

- Agua libre de nucleasas

#### Material

- Puntas con filtro (10  $\mu$ l)
- Toallas absorbentes Kimwipes

## Procedimiento

Se abrió el software del equipo en la computadora a la que se encuentra conectado.

Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas sobre la superficie óptica inferior, para una lectura de calibración.

Posteriormente se presionó "blank" un blanco de muestra, con 1  $\mu\text{L}$  agua libre de nucleasas.

Se limpió el resto de agua con una toalla absorbente libre de polvo (Kimwipe).

Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de muestra y se presionó "Measure".

Se limpió el resto de muestra con una toalla absorbente libre de polvo (Kimwipe).

Se obtuvo la cuantificación en  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de ADN y la calidad mediante las lecturas de absorbancia A260/A280.

Se presionó "Exit" una vez obtenidos los resultados.

- Electroforesis en gel de agarosa

La estimación de la cantidad de DNA en la muestra de interés se efectuó al someter la misma a un campo electroforético, en un gel de agarosa.

Al concluir el corrimiento, la muestra se tiñó con bromuro de etidio, esta sustancia se intercala entre las bases del DNA, permitiendo visualizar el

DNA, al emitir fluorescencia inducida por luz UV, y de esta manera fue posible compararla con la fluorescencia de una serie de estándares.

También se evaluó la integridad del DNA en base a su perfil electroforético, la degradación del DNA se evidencio por la presencia de un barrido hacia abajo del gel, y con inicio en la porción inferior de la banda de DNA. Se efectuó el procedimiento siguiente.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE, el cuál una vez polimerizado se depositó en una cámara horizontal de electroforesis y se cubrió con buffer. Se mezclo 1µl de la muestra a cuantificar con 1µl de azul de bromofenol al 0.25%, xilencianol al 0.25%, y glicerol al 30%. De la misma manera se preparó una serie de estándares a diferentes concentraciones. Las muestras y los estándares se colocaron en los carriles del gel y se realizó electroforesis a 60 V durante 1 hora.

Concluida la electroforesis se procedió a su observación en un transiluminador de luz UV. con las diferentes muestras de DNA purificado y cuantificado.

A partir del DNA obtenido de sangre y/o tejido, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa, (conocida como PCR por sus siglas en inglés) utilizando los primers descritos en el trabajo de Orrico y colaboradores ([l.galli@ao-siena.toscana.it](mailto:l.galli@ao-siena.toscana.it)), en la cual se amplificaron los exones del 1 al 18 del gen *FGD* y poseen las secuencias nucleotídicas indicadas en la tabla 2 del cual nos basamos.

#### 4.3.4 PCR

Se optimizó la reacción para los 18 exones, obteniendo productos de PCR de un tamaño de 150 a 250 pb. Todas las muestras se sometieron a amplificación.

La reacción de PCR fue preparada en 25  $\mu$ l, conteniendo 100 ng de DNA genómico, 1 X PCR buffer (Perkim Elmer), 0.5 pmol de cada primer, 180  $\mu$ M de dNTP's y 1 U de taq polimerasa.

Las muestras amplificadas se diluyeron 1:1 en un buffer de formamida desnaturalizando al 95° durante 5 minutos y posteriormente siendo congelado, 4-8  $\mu$ l de los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 5% durante 4 horas a 30 W.

Tabla 2.  
Primers utilizados para secuenciación del gen *FGD1*

Exon	Primer Forward	Primer Reverse
Promotor	5' agccaagccctaggaacactgag 3'	5' gcagccgcagccacagc 3'
1	5' ctggagccaagcggggagct 3'	5' ggttgagggaaacccaaagg 3'
2	5' acaccattttctccctcc 3'	5' gtggctccctatccttcaaca 3'
3	5' aggctcaaatccagctcac 3'	5' gtctatccgaggcgacaat 3'
4	5' ggaaggatagttaggag 3'	5' gaagaatcaagcacaaaaag 3'
5	5' gggctgggtgagggttacgat 3'	5' ggcctatcactgcctcctgaaa 3'
6	5' gaaatccatctccccaata 3'	5' aggaagagcaagcagaaa 3'
7&8	5' ccaccaggggaccgctat 3'	5' aactcattgggcatccttgc 3'
9	5' tctctgctagtccccatctga 3'	5' cctcctgccccctaaca 3'
10	5' cgtgccttttctccctgtcttt 3'	5' gggcatgaccaccacaat 3'
11	5' acatccccactaggccctctgc 3'	5' ttctcccaacaccaatgc 3'
12	5' cctcaccatgccctttctgc 3'	5' tctgggcctggaatgcctag 3'
13	5' gggcctacctaaccaaacatctt 3'	5' caccctcacctatacacccctcag 3'
14	5' acgaaggtagggcaggggtaga 3'	5' ggtcaggtagggcatttgaagt 3'
15	5' aacaagggtggctggac 3'	5' ttgggctgccattctg 3'
16	5' aagtctgctgtggagttgg 3'	5' tgtgggagagttcgtcagg 3'
17	5' ggtggcactggacaaatca 3'	5' ccaaggccaaggagaggt 3'
18	5' aggtggcccagctctgtcc 3'	5' cccctgtttccctgtcctg 3'

Optimización de la PCR

Verificación de la amplificación

Se preparó un gel de agarosa al 1.5% con TBE 1X, se tomaron 5 µl de la reacción y se mezclaron con 1 µl de azul 6 X y se realizó electroforesis a 100V durante 1 hora.

Se observaron las bandas amplificadas en un transiluminador de luz UV

#### **4.3.5 Reacción de Secuenciación.**

Los productos de PCR se secuenciaron bidireccionalmente con el estuche de secuenciación bigdye 3.1 de Applied Biosystems, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se analizaron con un secuenciador fluorescente modelo ABI Prism 310 Sequence analyzer.

##### **4.3.5.1 Análisis mutacional**

La estructura genómica de las secuencias del gen FGD1 fueron deducidas del contenido genómico del cromosoma X contenido NT\_011630 y la secuencia del cDNA NM\_004463.

## CAPITULO V

### 5. RESULTADOS.

Se estudiaron 4 familias (madre/hijo) no consanguíneas con fenotipo de síndrome de Aarskog, de las cuales se obtuvieron 10 muestras de pacientes: 6 masculinos y 4 femeninas.

La edad promedio de los pacientes varones fue de 6 años y de las mujeres de 31 años, con un rango de edad de 1 año 6 meses a 36 años.

El 100% son originarias de la región noreste del país que incluye los estados de Nuevo León, Tamaulipas, Coahuila, Zacatecas y San Luis Potosí.

El 100% de los pacientes acudieron a consulta por 1ª vez por talla baja y síndrome dismórfico.

Evaluando las características clínicas se obtienen los siguientes datos con respecto a la somatometría. (Tabla 3)

Tabla 3  
Somatometría

Paciente	Edad	Talla (cm)	Peso (kg)	PC (cm)	B (cm)	SI (cm)	Pie (cm)	Mano (cm)	Palma (cm)	AO (cm)	DIP (cm)
1	6 años	102	16.7	50	105	47.5	15	11.8	7.5	4	7.57
2	1a 6m	81	11	48	84	36	12.5	10.3	5.9	4	7.41
3	1a 8m	75	10	47	75	30	11	8.5	4.8	3.5	7.5
4	14 años	153	72	53	153	72	24	16	9.5	4	7.83
5	4a 4m	98	16	50	90	45	12.5	11	6	4	7.74
6	9 años	130	35	55	128	62.5	20	15	8	3.4	6.9
7	29 años	150	42	54	152	68	23.5	17	9.5	4.5	7.42
8	28 años	158	60	57	157	76	24	18.3	10.5	5	8.65
9	31 años	150	50	55	155	67	24	17.5	10	4	10.4
10	36 años	154	64.5	56	161	70	25	17.5	10	3.5	7

De los criterios clínicos para el diagnóstico de Síndrome de Aarskog (Tabla 1) podemos agrupar a los pacientes según su género en 3 tablas distintas con respecto a las características primarias (tabla 4,7), secundarias (tabla 5,8) y adicionales. (tabla 6,9)

Tabla 4  
Características Clínicas Primarias encontradas en pacientes masculinos

Característica	1	2	3	4	5	6
Hipertelorismo	✓	✓	✓	✓	✓	×
Narinas antevertidas	✓	×	✓	×	✓	✓
Pliegue labio inf	✓	✓	✓	✓	✓	×
Braquidactilia/Dedos anchos	✓	×	✓	✓	✓	✓
Cintillas interdigitales	✓	×	✓	✓	✓	×
Escroto en chal	✓	✓	×	✓	✓	✓
Sindactilia	×	×	✓	✓	×	×
Clinodactilia	✓	×	×	×	✓	×
Camptodactilia	×	×	×	✓	✓	×
Talla baja	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Total	8	4	7	8	9	4

✓ característica presente × característica ausente

Tabla 5.  
Criterios secundarios en pacientes varones

Características	1	2	3	4	5	6
Pico de viuda	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Ptosis	×	×	×	✓	✓	×
AP oblicuas hacia abajo	×	×	×	✓	✓	×
Hiperlaxitud Articular	✓	✓	×	✓	✓	×
Pie ancho	✓	×	×	✓	✓	×
Hernia inguinal/umbilical	×	✓	✓	×	✓	×
Criptorquidia	✓	✓	×	✓	✓	×
Pabellones auriculares displásicos	✓	✓	×	✓	✓	×
Ombliigo prominente	×	×	✓	×	×	×

✓ característica presente × característica ausente

Tabla 6.  
Características Adicionales en pacientes varones

Características	1	2	3	4	5	6
Obesidad	✓	x	x	✓	x	x
Filtrum largo	✓	✓	x	✓	✓	✓
Hipoplasia medio facial	✓	x	✓	✓	✓	✓
Maloclusión dental	✓	x	✓	✓	x	✓
Pliegue palmar transverso	✓	x	x	x	✓	x
Hipospadias	x	✓	x	x	x	x
Abombamiento frontal	✓	✓	✓	x	x	x
Retraso psicomotor	x	x	x	✓	x	✓

✓ característica presente x característica ausente

Tabla 7.  
Criterios Primarios en Pacientes femeninas

Características	7	8	9	10
Hipertelorismo	✓	✓	✓	x
Narinas antevertidas	✓	x	✓	x
Pliegue labio inf	✓	✓	x	✓
Braquidactilia/Dedos anchos	✓	x	✓	x
Cintillas interdigitales	x	x	✓	x
Sindactilia	x	x	x	x
Clinodactilia	✓	x	x	x
Camptodactilia	✓	x	x	x
Talla baja	✓	x	✓	x
Total	7	2	5	1

✓ característica presente x característica ausente

Tabla 8.  
Características Secundarias en Femeninas

Características	7	8	9	10
Pico de viuda	✓	✓	✓	✓
Ptosis	x	x	x	x
AP oblicuas hacia abajo	x	x	x	x
Hiperlaxitud Articular	x	✓	✓	x
Pie ancho	x	x	x	✓
Hernia inguinal/umbilical	x	x	x	x
Pabellones auriculares displásicos	x	x	x	x
Ombigo prominente	x	x	✓	x

✓ característica presente x característica ausente

Tabla 9.  
Características Adicionales en Femeninas

Características	GEP4166	GEP4202	GEP4177	GEP4303
Obesidad	x	x	x	x
Filtrum largo	x	x	✓	x
Hipoplasia medio facial	✓	✓	✓	x
Maloclusión dental	x	x	x	x
Pliegue palmar transverso	x	x	x	x
Abombamiento frontal	x	x	✓	x
Retraso psicomotor	x	x	x	x

✓ característica presente x característica ausente

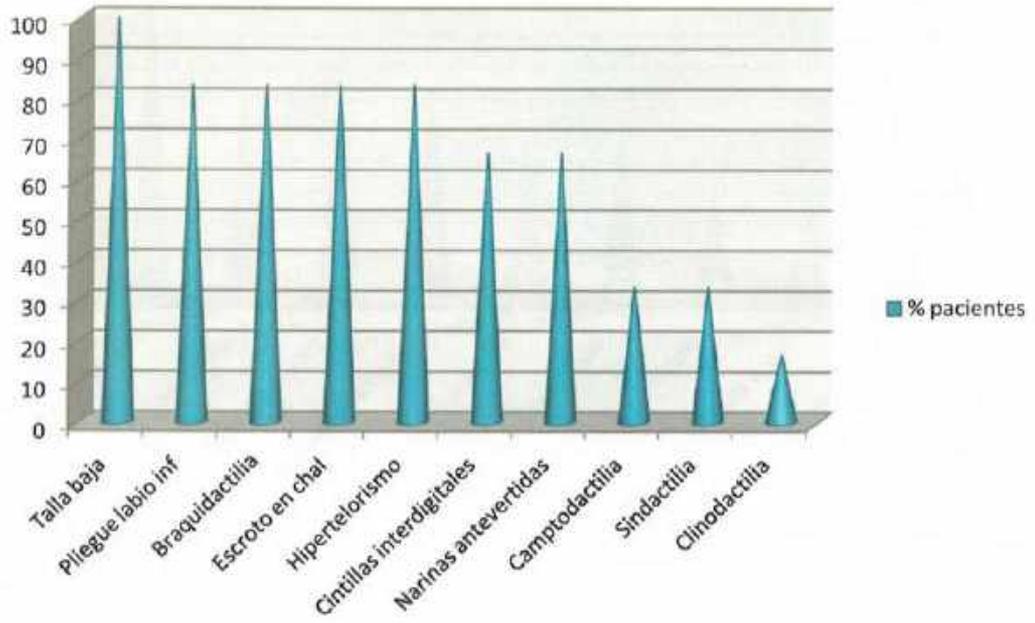
Dentro de la evaluación de los criterios de Teebi encontrados en nuestros pacientes estudiados se observó como características más prevalentes en varones la talla baja con 100% de ocurrencia; así como la braquidactilia, el pliegue en el labio inferior y el escroto en chal con una frecuencia de presentación en el 83% de los pacientes. (Gráfica 1).

En cuanto a los criterios secundarios en varones: el pico de viuda se encontró en el 100% de los pacientes, le siguen criptorquidia, pabellones auriculares displásicos y la hiperlaxitud articular encontrados en el 66% de los pacientes (Gráfica 2), y por último dentro de las características adicionales la mas prevalente encontrada en el 83% de los pacientes fue el filtrum largo y la hipoplasia medio facial; seguido de mal oclusión dental presente en el 50% de los pacientes (Gráfica 3).

En cuanto a los hallazgos clínicos de las pacientes femeninas; encontramos dentro de las características primarias más frecuentes; el hipertelorismo y el pliegue debajo del labio inferior que se presentaron en 75% de las pacientes (Gráfica 4). Como características secundarias principales, el pico de viuda fue prevalente en el 100% de las pacientes (Gráfica 5) y dentro de las características adicionales más frecuentes se encuentra hipoplasia medio facial en el 75% de las pacientes (Gráfica 6).

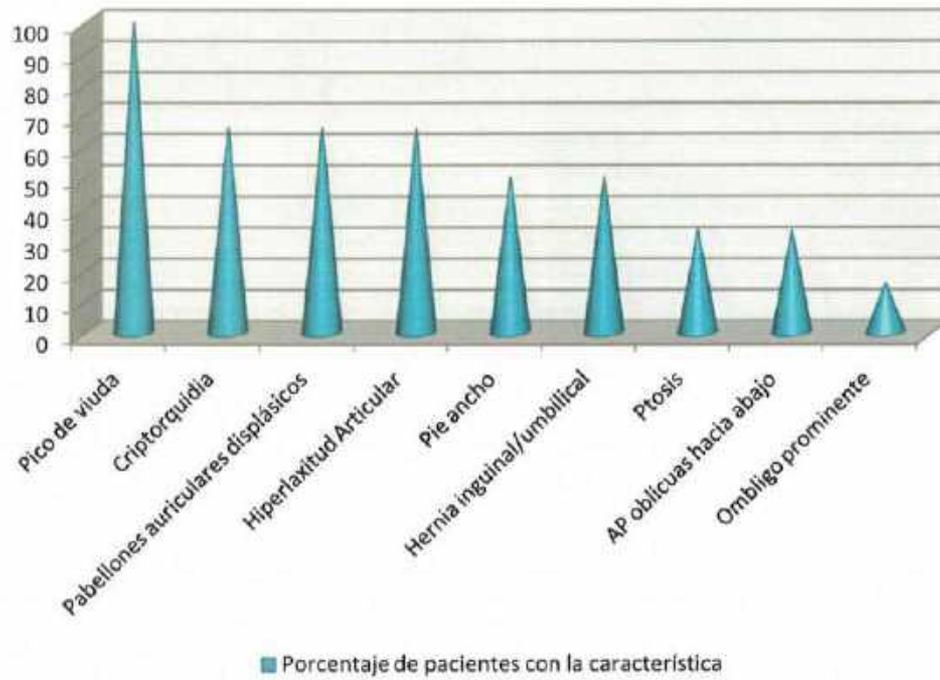
Gráfica 1.

Frecuencia de características primarias en pacientes varones



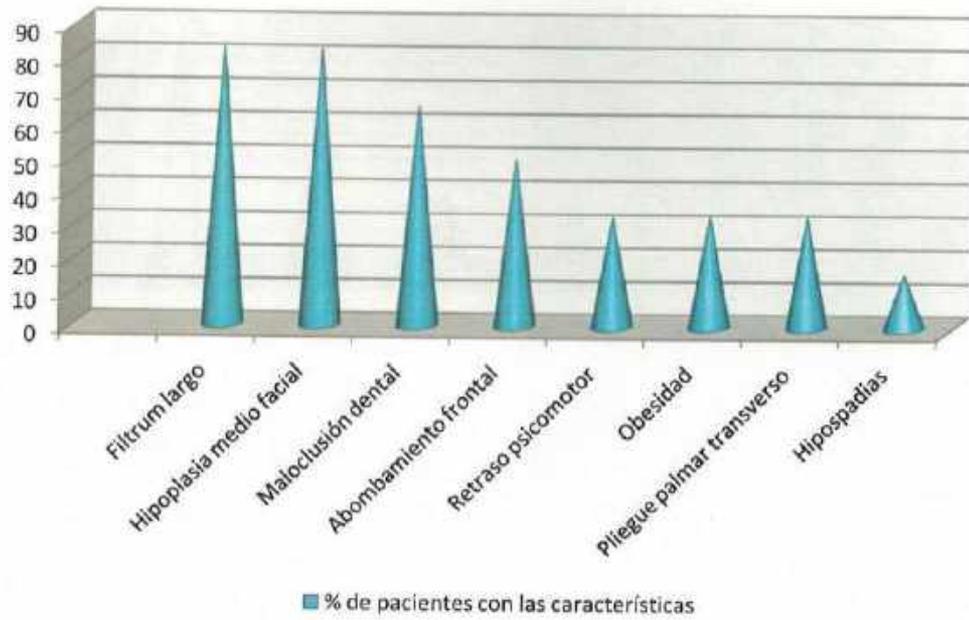
Gráfica 2.

Frecuencia de características secundarias en varones



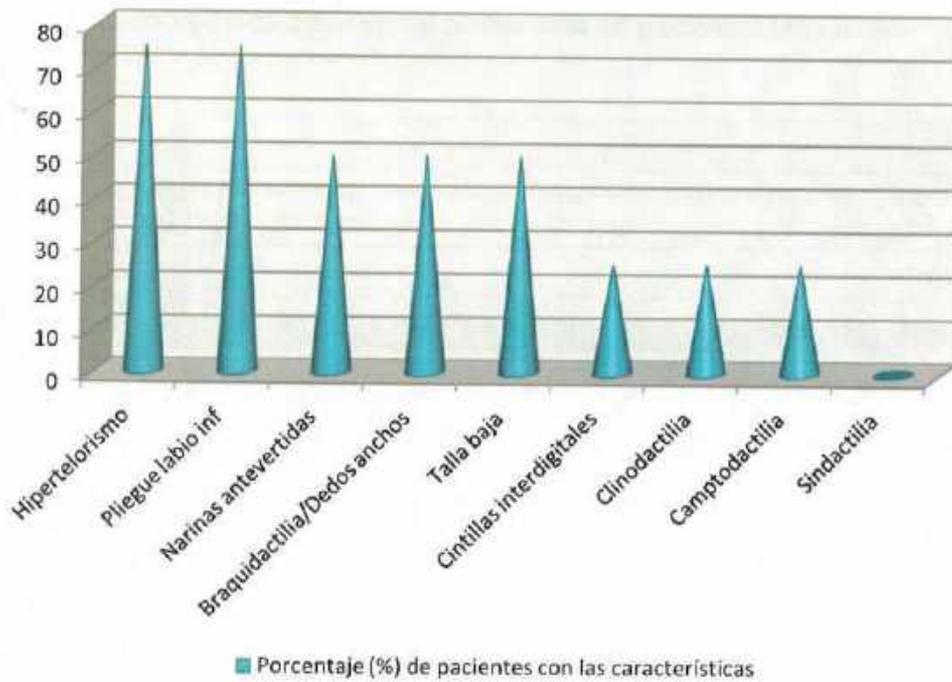
Gráfica 3.

Frecuencia de características adicionales en varones



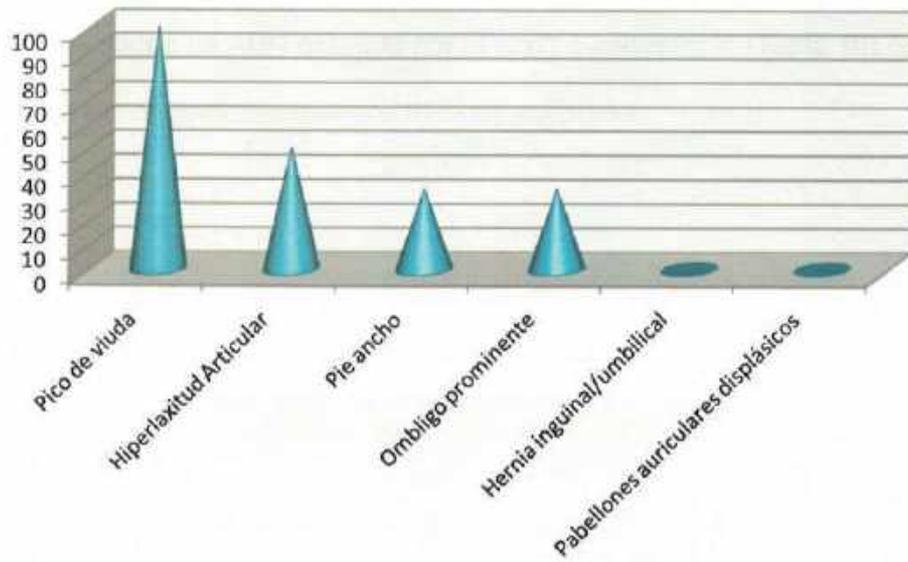
Gráfica 4.

Frecuencia de características primarias en pacientes femeninas



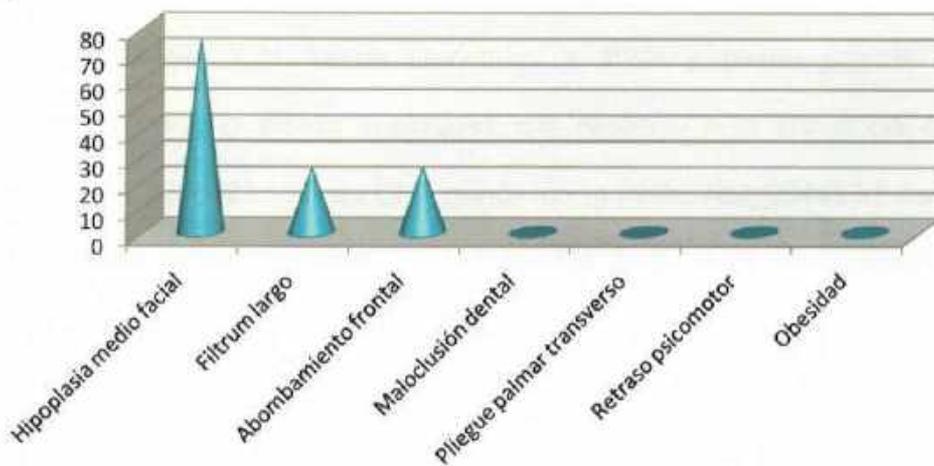
Gráfica 5.

Frecuencia de características secundarias en pacientes femeninas



Gráfica 6.

Frecuencia de características adicionales en pacientes femeninas



Con la sangre periférica de los pacientes incluidos en el estudio, se realizó una extracción de ADN por el equipo QIAcube de QUIAGEN® se evaluó la calidad y cantidad de ADN extraído por el equipo nanodrop® (Tabla 10) para que cumpla con los requerimientos básicos solicitados.

Tabla 10.  
Concentración y calidad del DNA obtenido

No.	Concentración	Calidad
1	53.7 ng/ul	1.94/1.49
2	82.7 ng/ul	1.90/1.82
3	193.9 ng/ul	1.89/2.24
4	96 ng/ul	1.87/1.94
5	84.5 ng/ul	1.6/1.51
6	168.2 ng/ul	1.68/1.06
7	68.3 ng/ul	1.93/1.95
8	74.3 ng/ul	1.91/1.80
9	91.8 ng/ul	1.90/1.89
10	14.4 ng/ul	1.30/0.91

Las muestras de ADN fueron sometidas a PCR y posteriormente a secuenciación (Fig.2) siendo analizadas con respecto a la secuencia de referencia NC\_000023.10 para DNA genómico (g.DNA), NM\_004463.2 para DNA complementario (c.DNA), NP\_004454.2 a nivel de proteína, obteniendo los siguientes resultados (Tabla 11)

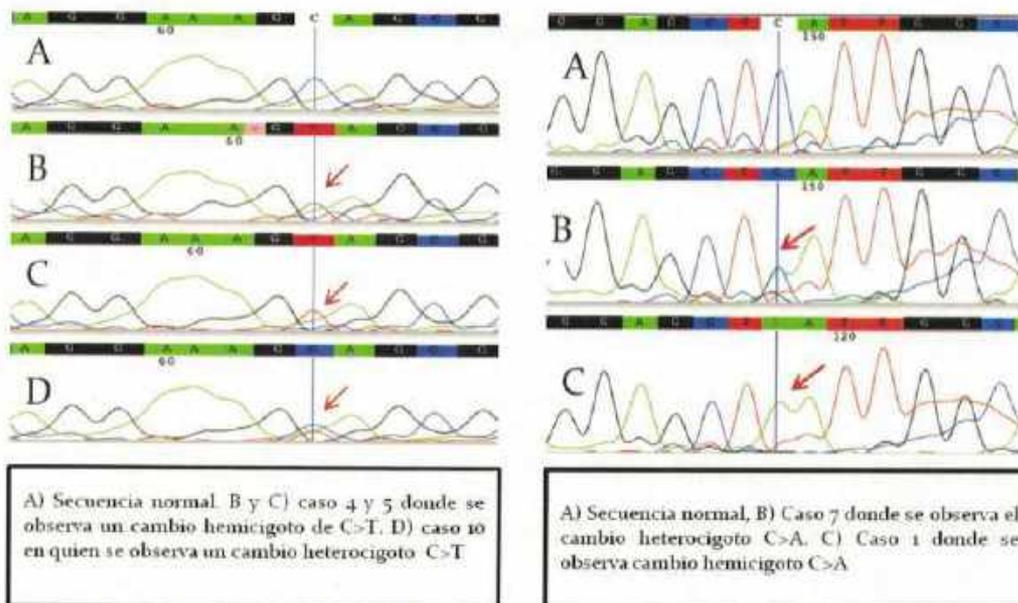
Tabla 11.

Cambios encontrados en c.DNA y su efecto a nivel de proteína.

CASO	C. Prim	C. Sec	C. Adicionales	g DNA	c.DNA	Proteína
1	8	5	6	g.54495273C>A	c.1138G>T	p.(Glu380*)
2	4	5	3	g.30611T>C	c.659+27T>C / c.2015+48G>C	No patogénico
3	7	3	3	g.30611T>C	c.659+27T>C/ c.2015+48G>C	No patogénico
4	8	7	5	g.54481906G>A	c.1990C>T	p.(Gln664*)
5	9	8	3	g.54481906G>A	c.1990C>T	p.(Gln664*)
6	4	1	4	No	No	No patogénico
7	7	1	1	g.54495273C>A	c.1138G>T	p.(Glu380*)
8	2	2	3	g.30611T>C	c.659+27T>C	No patogénico
9	5	3	3	g.30611T>C	c.659+27T>C	No patogénico
10	1	2	0	g.30611T>C	c.659+27T>C	No patogénico

Figura 2

Ejemplos de electroferogramas obtenidos del análisis de secuenciación del gen *FGD1*



## CAPITULO VI

### 6. Discusión

Se analizaron un total de 4 familias no consanguíneas, donde se estudio el binomio madre/hijo; resultando en un total de 10 pacientes, de los cuales 4 son femeninas y 6 masculinos, los cuales presentan fenotipo sugestivo de síndrome de Aarskog.

Utilizando los criterios de Teebi para el diagnóstico clínico, observamos que las características clínicas primarias fueron las más prevalentes dentro de nuestra población estudiada, siendo la talla baja el criterio que definió a todos nuestros pacientes varones, cabe destacar que tanto la braquidactilia, el escroto en chal, hipertelorismo y el pliegue debajo del labio inferior fueron de los criterios primarios más frecuentes, en contraste con otras anomalías digitales como la clinodactilia o la sindactilia encontrada únicamente en un paciente.

Con respecto a los hallazgos clínicos en las mujeres, podemos hacer notar el hipertelorismo y el pliegue del labio inferior como las características más predominantes, seguidos por la talla baja, braquidactilia y narinas antevertidas, siendo las anomalías digitales al igual que en el grupo de varones las menos frecuentes.

Analizando los criterios secundarios; sobresale en frecuencia tanto en varones como en mujeres el "pico de viuda", continuado por la criptorquidia, hiperlaxitud articular y los pabellones auriculares displásicos como características mayormente encontradas en pacientes varones, siendo la ptosis, las aperturas palpebrales oblicuas hacia abajo y el ombligo prominente las menos frecuentes, y que al contrario que en varones; los pabellones auriculares no fue una característica prevalente en las mujeres evaluadas.

Y por último, dentro de las características adicionales el filtrum largo y la hipoplasia medio facial fueron los rasgos más frecuentemente encontrados tanto en varones como en mujeres, siendo el retraso psicomotor, la hipospadias y la obesidad de las características con menor frecuencia encontrados únicamente en un paciente.

Haciendo énfasis en que las características primarias más frecuentes encontradas en nuestros pacientes corresponden a lo reportado en la literatura,<sup>8,11,29</sup> no así dentro de las características secundarias ya que además del "pico de viuda" la literatura reporta el pie ancho y las aperturas palpebrales oblicuas hacia abajo como características frecuentes; encontrando discrepancia con nuestro grupo de pacientes.

Dentro de las características adicionales se reporta el abombamiento frontal y el filtrum largo como de mayor frecuencia dentro de esta categoría, reproduciéndose lo ya reportado en nuestro grupo de pacientes.

El análisis de secuenciación en los casos del binomio hijo/madre (Caso 1 y 7) detecta un cambio a nivel de DNA genómico (NC\_000023.10:g.54495273C>A), que en DNA complementario corresponde con la siguiente nomenclatura NM\_004463.2:c.1138G>T, perteneciendo al exón 5 y tratándose de una mutación inédita, considerando la posición en el DNA complementario.

Se encuentra reportado que en 2004, Orrico y colaboradores localizan una mutación en el exón 5 (c.1139 A>C), sin embargo se traduce en un cambio en la posición 380 (E380A) de un ácido glutámico por alanina, en contraste con nuestros pacientes, a pesar de encontrarse en un nucleótido posterior el resultado se traduce en un codón de paro en la Glutamina 380 p.(Glu380\*), por lo que se produce una proteína trunca la cual se encuentran entre el dominio N rico en prolina y el dominio RhoGTP (DBL). La generación de un codón de paro a este nivel es delétero, ya que no permite la traducción del dominio catalítico afectando la función principal de la proteína.

Fenotípicamente el paciente reportado en la literatura<sup>4</sup> presentaba hipertelorismo, "pico de viuda", narinas antevertidas, filtrum largo, sindactilia, clinodactilia y braquidactilia dentro de anomalías en extremidades hernia inguinal e umbilical, escroto en chal, con desarrollo cognitivo normal.

Con respecto a nuestros pacientes, el caso 1 es un varón de 6 años, quien comienza su estudio por talla baja a los 2 años, dentro de las características distintivas se encuentran ocho criterios primarios con excepción de la clinodactilia y la camptodactilia, cinco secundarios y seis adicionales; mientras que su madre (caso 7) presentaba características atenuadas del

fenotipo, observándose características compartidas entre la madre y el probando, teniendo como discrepancias entre ambos la ausencia de cintillas interdigitales y camptodactilia en la madre.

Con respecto a los probandos 4 y 5, los cuales son hermanos y su madre (caso 10), en quienes se detecta una transición de una Adenina por una Guanina en DNA genómico en la posición 54481906, la cual a nivel proteico codifica para un codón de paro en la glicina 664, lo que conlleva la formación de una proteína trunca que corresponde al dominio catalítico RhoGTP (DBL).

Dentro de los hallazgos fenotípicos encontrados en ambos hermanos, el probando 4 presenta una edad de 12 años, y es el paciente quien presenta más características reportadas por Teebi y comparte la gran mayoría de datos clínicos con su hermano menor de 4 años (Caso 5), interesantemente el probando 4 presenta retraso en el aprendizaje que aun no es evidente en su hermano; su madre quien resultó heterocigoto para la mutación fenotípicamente solo presenta "pico de viuda" y pies anchos como únicos rasgos compatibles con el síndrome de Aarskog, llegándose a considerar la posibilidad de encontrarnos ante un caso de mosaicismo germinal; que aunque resulta un fenómeno raro, ya se ha reportado en la literatura<sup>46</sup>.

Es importante mencionar que tanto en los probandos 2 y su madre (caso 8), como en los probandos 3 y su madre (caso 9) se identificó un SNP (rs2239809) común en los 4 pacientes que en DNA genómico se localiza en la posición 30611 en donde se observa un cambio de una timina por una

citocina, el cual no se ha documentado ser deletéreo para la función, el alelo ancestral T/T es el más predominante en europeos, encontrando el alelo C en población asiática y de África sub-sahariana. Aunado a este hallazgo únicamente en los pacientes 2 y 3, no así en sus madres se encontró adicionalmente otro SNP (rs3830137) localizado en la región intrónica 27 nucleótidos posteriores al codón 659, con significancia clínica no documentada.

Sin embargo es interesante que tanto en el probando 3 como en su madre (Caso 9) se encuentren suficientes hallazgos clínicos que soporten el diagnóstico de síndrome de Aarskog, y que el paciente 2 presente otro SNP en la región intrónica, teniendo en cuenta la heterogeneidad clínica y la superposición de fenotipos; un resultado negativo no excluye el síndrome; como lo sugiere una reciente publicación donde se documenta por medio de secuenciación de exoma, la aparición de una mutación en el punto de ramificación del exón 13, determinando un completo salto de dicho exón condicionando una terminación de la traducción prematura<sup>35</sup>, por lo que es importante el considerar otras tecnologías moleculares en el diagnóstico.

Dentro del espectro de mutaciones encontradas en el gen *FGD1*, se ha documentado que las mutaciones con cambio de sentido son las más frecuentes. En el presente estudio encontramos dos mutaciones sin sentido, las cuales no se habían reportado antes en la literatura, y que representan el tercer lugar en frecuencia con respecto al tipo de mutaciones encontradas en

los pacientes con síndrome de Aarskog; no evidenciando una clara correlación fenotipo-genotipo<sup>11,29,49</sup>.

El hipertelorismo, las narinas antevertidas, el abombamiento frontal, la talla baja y la criptorquidia son las características más prevalentes dentro de los pacientes descritos en la literatura con mutaciones en *FGD1*, podemos observar que en nuestros pacientes aunado a estas características que también fueron frecuentes, el "pico de viuda" y el pliegue debajo del labio inferior mostraron mayor incidencia.

Con respecto a las madres de los probandos, se estudiaron a cuatro mujeres de entre 28 y 37 años de edad, encontrando heterogeneidad clínica y fenotípica; la paciente 7, madre del probando 1 es la paciente con mayor número de características clínicas primarias, compartiendo los mismos rasgos fenotípicos que su hijo con excepción de las cintillas interdigitales, no así con las características secundarias y las adicionales donde solo comparte el "pico de viuda" y la hipoplasia medio facial.

Molecularmente se encontró en ella la misma mutación reportada en su hijo (cambio en la posición 1138 de una Guanina por una Citocina en el exón 5), que codifica para un codón de paro generando una proteína trunca. Como ya había sido descrito en otros textos, las portadoras de una mutación pueden presentar fenotipo atenuado de las características como en este caso donde la madre del probando muestra características primarias del síndrome expresándose sobre todo la talla baja, el hipertelorismo y el pico de viuda.

En el caso de la paciente 10 (madre del paciente 4 y 5) se encuentra una mutación con un cambio de Citosina por Timina en la posición 1990 codificando un codón de paro a nivel proteico en la Glicina 664 generando una proteína trunca, en donde en ambos hijos se encuentra la misma mutación con expresión fenotípica de síndrome de Aarskog cumpliendo la gran mayoría de criterios primarios, secundarios y adicionales sin embargo en la madre no se encuentra fenotipo atenuado, únicamente cabe señalar como característica predominante en los 3 pacientes el "pico de viuda".

Interesantemente aún cuando encontramos en 2 de las madres de los probandos mutaciones patogénicas ellas no presentan las mismas características clínicas, si bien en la literatura se habla que existen mujeres asintomáticas portadoras de una mutación, ¿Qué es lo que permite la expresión fenotípica atenuada en algunas mujeres? Queda claro que el proceso de inactivación del cromosoma X no es un evento que esté afectando directamente este fenómeno, debido a que el gen *FGD1* escapa a dicha inactivación, cabe tal vez la posibilidad de que otros genes o factores reguladores modulen su expresión, o que la posición o el dominio funcional en donde recae la mutación así como la naturaleza de la misma provoquen un impacto en el fenotipo.

La paciente 9, madre del paciente 3 en quienes se reporta un SNP intrónico el cual no resulta deletéreo (c.659+27T>C) presenta rasgos atenuados del

síndrome tales como talla baja, hipertelorismo y pico de viuda. Curiosamente el probando 3 presenta otro SNP intrónico también reportado como una variante no causante de la enfermedad. Sin embargo aún cuando por esta metodología de secuenciación convencional no fue posible documentar una mutación patogénica no excluye la posibilidad de encontrar un cambio a nivel intrónico como ya ha sido reportado en la literatura por medio de otras metodologías moleculares<sup>35</sup>; ya que ambos pacientes cumplen criterios clínicos de síndrome de Aarskog.

Con respecto a la familia de los pacientes 2 y 8; encontramos que ambos presentan un SNP intrónico no patogénico reportado con amplia homogeneidad dentro de las poblaciones; particularmente el paciente 2 cuenta con la mitad de los criterios primarios, cumpliendo en su mayoría los criterios secundarios y los adicionales; y observando que su madre (caso 8) cuenta con un fenotipo muy atenuado de la enfermedad encontrando en ella el 28% de las características.

Y por último destacar que el paciente 6, es un varón de 9 años, quien clínicamente presenta 36% del total de criterios clínicos, dentro del análisis molecular por secuenciación convencional no se detectaron cambios o variantes en la secuencia del gen *FGD1*.

Cabe mencionar en estos pacientes (2,8,6) que si bien es cierto que cumplen con menor número de características descritas por Teebi, el fenotipo y la amplia variabilidad clínica en el síndrome de Aarskog permite

sospecharlo ya que la talla baja, anomalías faciales y urogenitales están presentes en nuestros probandos, y tomando en cuenta que un resultado molecular de secuenciación convencional normal no excluye la patología. También es necesario considerar si en estos pacientes se estuvieran superponiendo características clínicas sugestivas de algún otro síndrome como Noonan o Robinow, los cuales representan los principales diagnósticos diferenciales a considerar, tomando en cuenta que dentro de las características primarias en ambos probandos varones (2 y 6) únicamente cumplen con el 40%.

## CAPITULO VII

### 7. CONCLUSIONES

El presente trabajo representa el primer estudio molecular del gen *FGD1* en pacientes de origen mexicano con fenotipo de síndrome de Aarskog, encontrando 2 mutaciones nuevas no reportadas en la literatura.

Se confirma la variabilidad fenotípica descrita en publicaciones previas, encontrando como características principales en nuestros probandos la talla baja, el hipertelorismo y el pico de viuda.

Nuestros datos demuestran que aún cumpliendo las características clínicas dictadas por los criterios de Teebi solo el 33% de nuestros probandos presento una mutación reconocible y deletérea en el gen *FGD1* por la técnica de secuenciación convencional, no excluyendo otras posibles causas como deleciones o mutaciones intrónicas no detectables por dicha técnica.

Los resultados obtenidos en las madres portadoras de la enfermedad nos permiten brindar un adecuado asesoramiento genético, donde por cada embarazo tienen un 50% de riesgo de hijos afectados y un 50% de riesgo de hijas portadoras, teniendo en cuenta que al ser portador heterocigoto pueden o no manifestar fenotipo atenuado del síndrome.

Queda la interrogante al respecto de si existen otros genes involucrados en la fisiopatología y la caracterización fenotípica del síndrome de Aarskog que conlleven un papel regulador sobre la expresión clínica.

## CAPITULO VIII

### 8. ANEXOS

#### 8.1 Consentimiento Informado para menores de 12 años

##### ESCRITO PARA EL ASENTIMIENTO PARA MENORES DE 12 AÑOS

##### IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN FGD1 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SINDROME DE AARSKOG

*Hola, mi nombre es Mariana Pérez Coria y yo soy un investigador de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la UANL, que está tratando de aprender sobre el síndrome de Aarskog*

*El propósito de este estudio es determinar las mutaciones causantes de las características clínicas en los pacientes*

*Se te pide a participar en este estudio porque presentas características compatibles con el síndrome.*

*Yo seré el responsable de este estudio y que se llevará a cabo en el Departamento de Genética del Hospital Universitario de octubre de 2012 a julio de 2013*

*¿En qué vas a participar? Consiste en una toma de sangre venosa de tu brazo para poder analizar el gen FGD1*

*A fin de mantener todo en privado, tus nombres no serán utilizados en los formularios que obtengamos de ti. Estos serán reemplazados por los números de identificación compuesto con las iniciales de tu nombre y apellidos, ejemplo: Mariana Pérez Coria (MPC)*

*Tus padre (s) han dicho que está bien para ti participar en este estudio de investigación. Tu no tiene que estar en este estudio si no quieres. Puedes cambiar de opinión en cualquier momento antes de decirle a tu mamá, papá o a el Ayudante de Investigador o Investigador.*

\_\_\_\_ *No, no quiero estar en este estudio.*

\_\_\_\_ *Sí, quiero estar en este estudio.*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Nombre del Niño*                      *Edad*

***Declaración de los Padres o tutores.***

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Padre o Tutor*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Madre o Tutor*                      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Primer Testigo*                      *Nombre en letra de*  
*molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio*                      *Dirección*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha  
molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Firma del Segundo Testigo Nombre en letra de*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección*

*Declaración de la persona que lleva a cabo la discusión del Asentimiento.*

1. He explicado todos los aspectos de la investigación al menor en la medida de su capacidad de entender.
2. He respondido a todas las preguntas del sujeto en relación con esta investigación.
3. El menor acepta participar en la investigación.
4. Creo que la participación del menor es voluntaria.
5. El Médico y el personal del estudio aceptan respetar el disentiimiento físico o emocional del sujeto en cualquier momento de la investigación cuando dicho disentiimiento sea relativo a algo que se hace únicamente con los fines de esta investigación.

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Firma de la persona que lleva*

*Firma*

*Acabo el asentimiento.*

## 8.2 Consentimiento Informado para niños en edad pre-escolar

### *ASENTIMIENTO PARA NIÑOS EN EDAD PRE-ESCOLAR*

#### **IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN FGD1 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SINDROME DE AARSKOG**

Escrito para el asentimiento verbal

Hoy durante la reunión, voy a realizar un cuestionario acompañado de exploración física y toma de muestra de sangre periférica . Esto me ayudará a entender la relación que existe entre los cambios (mutaciones) en el gen FGD1 y las características clínicas que presentan los pacientes. Después de completar la toma de sangre periférica voy a darle las gracias por su cooperación. ¿Es esto aceptable?

Encierre

Si

No

**Declaración de los Padres o tutores.**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Padre o Tutor*      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Madre o Tutor*      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Primer Testigo*      *Nombre en letra de*  
*molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio*                      *Dirección*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                      *Firma del Segundo Testigo*      *Nombre en letra de*  
*molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Relación del Segundo Testigo con la Sujeto del Estudio*      *Dirección*

Declaración de la persona que lleva a cabo la discusión del Asentimiento.

1. He explicado todos los aspectos de la investigación al menor en la medida de su capacidad de entender.
2. He respondido a todas las preguntas del sujeto en relación con esta investigación.
3. El menor acepta participar en la investigación.
4. Creo que la participación del menor es voluntaria.
5. El Médico y el personal del estudio aceptan respetar el disentiimiento físico o emocional del sujeto en cualquier momento de la investigación cuando dicho disentiimiento sea relativo a algo que se hace únicamente con los fines de esta investigación.

\_\_\_\_\_

Fecha

\_\_\_\_\_

Firma de la persona que lleva

\_\_\_\_\_

Firma

Acabo el asentimiento.

### 8.3 Consentimiento para ser sujeto en la investigación.

#### CONSENTIMIENTO PARA SER UNA SUJETO EN LA INVESTIGACIÓN

*Este documento se presenta de conformidad con el artículo 100 Sección IV de la Ley General de Salud en vigor con la última modificación del mismo, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de junio del 2005. El consentimiento informado por escrito debe ser obtenido de la sujeto en quien se llevará a cabo la investigación, o de su representante legal en el caso de incapacidad legal de la sujeto, una vez que hayan sido informados de los objetivos de la investigación y de las posibles consecuencias positivas o negativas que podría tener para su salud.*

*Esta forma de consentimiento describe el estudio de investigación y su papel como participante. Por favor lea este formulario cuidadosamente. No dude en hacer cualquier pregunta con respecto a la información proporcionada. Esto debería estimular sus preguntas. Su médico, enfermera, o una persona del equipo le describirá el estudio y responderá a sus preguntas.*

---

#### 1.- CONSENTIMIENTO INFORMADO

##### **"IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN FGD1 EN PACIENTES CON FENOTIPO DE SINDROME DE AARSKOG"**

*Se le pide participar en un estudio de investigación. Antes de dar su consentimiento para ser voluntario, es importante que lea la siguiente información y hacer tantas preguntas como sea necesario para asegurarse de que entiende lo que se le pide que haga.*

#### 2.- LOS INVESTIGADORES

Los responsables de este estudio son: Dra. Mariana Pérez Coria médico residente de 2º año de la especialidad en Genética Médica e investigador principal, como director de tesis: Dra. Beatriz de la Fuente Cortes, Profesor del Departamento de Genética, los co-Directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna profesor del departamento de Genética, y Dra. Med Laura Martínez de Villareal Jefe del Departamento de Genética. El departamento de Genética se localiza en el 4to piso del Centro Universitario contra el Cáncer y se puede comunicar a los teléfonos (81) 83 48 3 7 04, (81) 81 23 16 98 de lunes a viernes en horarios de 8:00 a 19:00 hrs.

### 3.- INTRODUCCIÓN

El síndrome de Aarskog es también conocido como displasia facio-digito-genital presentando una incidencia de 1/25,000 recién nacidos vivos, es un padecimiento clínica y genéticamente heterogéneo, caracterizado por presentar: Talla baja, hipertelorismo, escroto en chal y braquidactilia

Es causado por mutaciones en el gen FGD1 localizado en Xp11.21, dicho gen se compone de 18 exones (31-1040 pb) y se han reportado a nivel mundial alrededor de 56 distintas mutaciones de las cuales hasta el momento no se ha podido establecer correlación evidente entre genotipo-fenotipo, no se han encontrado «hotspots» y la mayoría de las mutaciones son únicas en cada familia reportada.

El gen se expresa principalmente al inicio de la osificación durante la embriogénesis, también se ha visto su expresión en células madres mesenquimales, en las regiones de formación ósea activa, en la corteza y trabéculas diafisarias de desarrollo de los huesos largos, huesos craneofaciales, vértebras, costillas, y las falanges; codifica para un factor de intercambio que nucleótidos (GEF); activa específicamente Cdc42 (miembro de la familia Rho GTPasas) la cual propicia la estimulación de fibroblastos y la formación de filopodios.

Dentro de las características clínicas mas relevantes se encuentran: Hipertelorismo en un 91% de los pacientes, Talla Baja en 89%, osificación ósea retrasada 88%, Braquidactilia 84%, Falanges Hipoplásicas 77%, Hipoplasia maxilar 74%, Hiperlaxitud articular 72%, Puente nasal ancho 69%, Sindactilia 65%, Anormalidades cervicales 56%, Anomalías en costillas y esternón 43%

En nuestro país se han publicado dos estudios: 1) El síndrome facio-digito-genital (síndrome de Aarskog ): una determinación detallada de los distintos hallazgos radiológicos, publicado por Lizcano-Gil y cols. en la Universidad de Guadalajara, Jalisco; 1994 y 2) Diagnóstico Clínico de portadoras de Síndrome de Aarskog. A propósito de 3 familias mexicanas por J. Jesús Guizar Vázquez y cols. en el Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, Feb 1997.

### 4.- OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN

Este estudio tiene como objetivo analizar el gen FGD1 por medio de la técnica de secuenciación en búsqueda de mutaciones que expliquen el fenotipo encontrado en pacientes con síndrome de Aarskog; así como la segregación de dicho gen en los familiares que comparten características con el paciente en estudio.

Los datos de esta investigación serán utilizados para el conocimiento del síndrome de Aarskog en pacientes mexicanos, específicamente del noreste del país, contribuyendo a su vez como parte del requisito para titulación de la especialidad en Genética Médica.

#### **5.- PROCEDIMIENTOS**

Si usted se ofrece como voluntario para participar en este estudio, se le pedirá que asista al departamento de Genética del Hospital Universitario para completar el árbol genealógico, somatometría y exploración física correspondiente a una historia clínica completa.

El mismo día de la entrevista se le realizará una toma de sangre periférica venosa.

Su participación tendrá una duración aproximada de 1 hora con 30 minutos; que es el tiempo estimado de la consulta y evaluación; la obtención de la muestra toma aproximadamente 15 minutos.

#### **6.- ENTRE LOS POSIBLES RIESGOS O MOLESTIAS**

Durante la toma de sangre periférica, puede existir cierta molestia al momento de la punción; sin embargo dicha molestia es momentánea y pasajera, también pudiera presentarse un hematoma en el sitio de punción; la realización de la toma será efectuada por una técnica en enfermería debidamente capacitada y no pone en peligro su salud.

#### **7.- LOS BENEFICIOS POTENCIALES DE LA INVESTIGACIÓN/JUSTIFICACION**

Recientemente se han reportado más de 20 diferentes mutaciones, pero existen pocos datos disponibles de pacientes con estudio molecular confirmado. En población mexicana no se han documentado mutaciones en pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Aarskog; por lo que sería importante conocer las mutaciones prevalentes en nuestra población y establecer diferencias entre lo reportado en la literatura.

Además para los involucrados en el protocolo sería beneficioso en el sentido de ser un estudio informativo; obtendríamos datos precisos sobre la o las mutaciones

prevalentes en el sujeto de estudio y en su familia; lo cuál nos permite brindar un asesoramiento genético más específico e individualizado a cada familia.

## **8.- CONFIDENCIALIDAD Y ALMACENAMIENTO DE DATOS**

Los resultados de estas pruebas únicamente se compartirán con la Dra. Mariana Pérez Coria quien es la investigadora principal, la directora de tesis: Dra. Beatriz de la Fuente Cortes y los co-Directores: M.C. Michelle Zamudio Osuna, Dr. Ricardo Cerda Flores y Dra. Med Laura Martínez de Villareal.

A cada muestra se le asignará un número de folio el cuál permitirá su identificación para el resto del personal de laboratorio, impidiendo su acceso a la identidad de dicha muestra la cuál únicamente conocerán los autores de este estudio, la información se almacenará en una base de datos de uso exclusivo del grupo de trabajo y los resultados obtenidos tienen como finalidad publicarse en una tesis y en un artículo de publicación médica y en ningún momento la identidad de los participantes será revelada

La toma de fotografías clínicas con el fin de documentar las características fenotípicas de las participantes serán totalmente voluntarias y no es un requisito para la participación de este estudio por lo cual se solicita que agregue sus iniciales en las siguiente línea \_\_\_\_\_ en caso de autorizar la toma de las fotografías, las cuales pueden ser usadas en publicaciones médicas donde la identidad del paciente no será revelada por los autores.

\_\_\_\_\_ aceptó que el ADN obtenido será almacenado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario "José E. González" de la U.A.N.L. y podrá ser empleado con motivos de investigación o educación. La solicitud de estudios adicionales deben ser realizadas por los responsables de este estudio. Entiendo que tengo el derecho de revocar este consentimiento en cualquier momento. En caso de no aceptar que se utilice el ADN extraído con motivos de investigación en otro estudio de forma anónima, este será eliminado al concluirse este estudio.

## **9.- PARTICIPACIÓN EN EL RETIRO**

Su participación en este estudio es voluntaria. Como participante, usted puede negarse a participar en cualquier momento. Para retirarse del estudio por favor contacte a la Dra. Mariana Pérez Coria en el departamento de Genética y se puede comunicar a los tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 en cualquier horario.

#### **10.- LAS PREGUNTAS SOBRE LA INVESTIGACIÓN**

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación, por favor hable con Dra. Mariana Pérez Coria en el departamento de Genética y se puede comunicar a los tel. (81) 83 48 37 04, (81) 81 23 16 98 en cualquier horario.

#### **11.- EN EL CASO DE LESIÓN**

Es poco probable que la participación en este proyecto dará como resultado un daño a los participantes.

#### **12.- COSTOS:**

No habrá ningún cargo para el participante por ninguna de las pruebas requeridas y procedimientos realizados en este estudio.

#### **13.- INCENTIVOS PARA PARTICIPAR**

No recibirá ninguna compensación monetaria ni en especie por participar en este estudio.

#### 14. -LAS RAZONES PARA LA EXCLUSIÓN DE ESTE ESTUDIO

Se excluirá de este estudio a personas que con cuenten con características sugestivas de síndrome de Aarskog, evaluadas por un Médico Genetista certificado.

*Este proyecto ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética y el Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio Gonzalez" de la Universidad de Autónoma de Nuevo León. Si usted cree que hay alguna violación a sus derechos como sujeto de investigación, puede comunicarse con el Presidente del Comité,*

*Dr. José Gerardo Garza Leal*

*Presidente del Comité de Ética*

*Teléfono de Contacto: 8329-4050 ext 2870-74*

*Se le ha dado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a su satisfacción. Si firma abajo indica que está de acuerdo para participar como voluntario en este estudio de investigación.*

PARTE 2: FIRMAS QUE DOCUMENTAN EL ACUERDO

16.- ACUERDO

*Su consentimiento para participar en la investigación será voluntario e informado. Si usted está de acuerdo en participar y si sus preguntas han sido contestadas a su entera satisfacción, usted deberá firmar esta forma. Una vez firmada la forma, usted está de acuerdo en participar en este estudio. En caso de que usted se rehúse a participar, usted podrá retirarse sin pérdida de alguno de sus beneficios médicos.*

*Una vez que usted haya consentido, usted aún tendrá el derecho de retirarse en cualquier momento sin que esto afecte su atención médica. Para retirarse, lo único que usted deberá hacer es informar a su médico de su decisión.*

*Se le ha proporcionado una copia de esta forma para quedársela y para que haga referencia a ella cuando sea necesario.*

\_\_\_\_\_

*Fecha*

*Firma de la Sujeto*

*Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_

*Fecha  
molde*

*Firma del Primer Testigo*

*Nombre en letra de*

\_\_\_\_\_

*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                                      *Firma del Segundo Testigo*      *Nombre en letra de molde*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio*      *Dirección*

*II.      ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO*

*He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.*

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
*Fecha*                                      *Firma de la Persona que Obtuvo el*      *Nombre en letra de molde*  
*Consentimiento/Investigador Principal*

### 8.4 Cuadro de contingencia de características clínicas en el Síndrome de Aarskog

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR. JOSE ELEUTERIO GONZÁLEZ"

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

#### BUSQUEDA DE MUTACIONES EN EL GEN FGD1 EN PACIENTES CON SINDROME DE AARSKOG

NOMBRE DEL

PACIENTE: \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_ PESO: \_\_\_\_\_ TALLA: \_\_\_\_\_ PC: \_\_\_\_\_ brazada: \_\_\_\_\_ SI: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pie: \_\_\_\_\_ Palma: \_\_\_\_\_ Mano completa: \_\_\_\_\_ Apertura Ocular: \_\_\_\_\_

DII: \_\_\_\_\_

DIE: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_

CRITERIOS PRIMARIOS	
Hipertelorismo	
Narinas antevertidas	
Pliegue debajo del labio inferior	
Braquidactilia/Dedos anchos	
Cintillas interdigitales	
Escroto en chal	
Sindactilia	
Clinodactilia 5to dedo	
Camptodactilia	
Talla baja	
CRITERIOS SECUNDARIOS	
Pico de viuda	
Ptoxis	
Fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo	
Hiperlaxitud articular	
Pie ancho	
Hernia inguinal/umbilical	
Criptorquidia	
Pabellones auriculares anormales	

Ombigo prominente	
CARACTERÍSTICAS ADICIONALES	
Obesidad	
Filtrum largo	
Hipoplasia medio facial	
Maloclusión dental	
Pliegue palmar transverso	
Edad ósea retrasada	
Hipospadias	
Abombamiento frontal	
Retraso psicomotor	

Otras:

## CAPITULO IX

### 9. Bibliografia.

1 J.M. Wit et al. (2011) *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25 1–17

2 Aarskog D (1970) "A familial syndrome of short stature associated with facial dysplasia and genital anomalies" *J Pediatr*; 77:856– 861.

3 Scott Jr CI (1971) "Unusual facies, joint hypermobility, genital anomaly and short stature. A new dysmorphic syndrome" *The clinical delineation of birth defects*. Baltimore: Williams and Wilkins.10: pp 240– 246.

4 Alfredo Orrico, Lucia Galli, Maria Luigia Cavaliere et al (2004): "Phenotypic and molecular characterisation of the Aarskog–Scott syndrome: a survey of the clinical variability in light of FGD1 mutation analysis in 46 patients". *European Journal of Human Genetics* 12, 16–23

5 A. Orrico et al. (2000) *FEBS Letters* 478 216–220

6 Glover, T.W., Verga, V., Rafael, J., Gorski, J.L., Bawle, L. and Higgins, J.V. (1993) *Hum. Mol. Genet.* 10, 1717-1718.

7 Pasteris, N.G., Cadle, A., Logie, L.J., Porteous, M.E.M., Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., Glover, T.W., Wilroy, R.S. and Gorski, J.L. (1994) *Cell* 79, 669-678.

8 Fryns, J. P. (1992). "Aarskog syndrome: the changing phenotype with age". *Am. J. Med. Genet.* 43,420-427.

9 Stevenson, R. E., May, M., Arena, J. F., Millar, E. A., Scott, C. I., Jr., Schroer, R. J., Simensen, R. J., Lubs, H. A., and Schwartz, C. E. (1994). "Aarskog-Scott syndrome: confirmation of linkage to the pericentric region of the X chromosome". *Am. J. Med. Genetic*

10. N. German Pasteris , Gerome L. Gorski et al (1994) "Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor" *Cell*, Vol 79; 669-678.
11. Alfredo Orrico, Lucia Galli, Jill Clayton-Smith, Jean-Pierre Fryns. (2011) Clinical utility gene card for: Aarskog-Scott syndrome (faciogenital dysplasia); *European Journal of Human Genetics*
12. Elisabeth Genot. Et al (2012) "FGD1 as a central regulator of extracellular matrix remodeling lessons from faciogenital dysplasia" *Journal of Cell Science* 125, 3265-3270
13. Daubon, T. Buccione, R. and Ge'not, et al (2011). The Aarskog-Scott syndrome protein Fgd1 regulates podosome formation and extracellular matrix remodeling in transforming growth factor b-stimulated aortic endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 31, 4430-4441.
14. Ellenbroek, S. I. and Collard, J. G. (2007). Rho GTPases: functions and association with cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 24, 657-672.
15. Vega, F. M. and Ridley, A. J. (2008). Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett.* 582, 2093-2101.
16. Vigil, D., Cherfils, J., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2010). Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy *Nat. Rev. Cancer* 10, 842-857
17. Estrada, L., Caron, E. and Gorski, J. L. (2001). "Fgd1, the Cdc42 guanine nucleotide exchange factor responsible for faciogenital dysplasia, is localized to the subcortical actin cytoskeleton and Golgi membrane" *Hum. Mol. Genet.* 10, 485-495.
18. Egorov, M. V., Capestrano, M., Vorontsova, O. A., Di Pentima, A., Egorova, A. V., Mariggio` , S., Ayala, M. I., Tete` , S., Gorski, J. L., Luini, A. et al. (2009). Faciogenital dysplasia protein (FGD1) regulates export of cargo proteins from the golgi complex via Cdc42 activation. *Mol. Biol. Cell* 20, 2413-2427.

19. Gao, L., Gorski, J. L. and Chen, C. S. (2011). The Cdc42 guanine nucleotide exchange factor FGD1 regulates osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Am. J. Pathol.* 178, 969-974.
20. Zou, W., Greenblatt, M. B., Shim, J. H., Kant, S., Zhai, B., Lotinun, S., Brady, N., Hu, D. Z., Gygi, S. P., Baron, R. et al. (2011). MLK3 regulates bone development downstream of the faciogenital dysplasia protein FGD1 in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 4383-4392.
21. Ayala, I., Giacchetti, G., Caldieri, G., Attanasio, F., Mariggio, S., Tete, S., Polishchuk, R., Castronovo, V. and Buccione, R. (2009). Faciogenital dysplasia protein Fgd1 regulates invadopodia biogenesis and extracellular matrix degradation and is up-regulated in prostate and breast cancer. *Cancer Res.* 69, 747-752.
22. DiLuna, M. L., Amankulor, N. M., Johnson, M. H. and Gunel, M. (2007). Cerebrovascular disease associated with Aarskog-Scott syndrome. *Neuroradiology* 49, 457-461.
23. Grier, R. E., Farrington, F. H., Kendig, R., Mamunes, (1983) Autosomal dominant inheritance of the Aarskog syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 15: 39-46.
24. Van de Vooren, M. J., Niermeijer, M. F., Hoogeboom, (1983). The Aarskog syndrome in a large family, suggestive for autosomal dominant inheritance. *Clin. Genet.* 24: 439-445,
25. Fryns aarskog, *Am J Med Genet.* (1992) Aarskog syndrome: the changing phenotype with age. Apr 15-May 1;43(1-2):420.
26. Verhoeven, W M A; Egger, J I M; Hoogeboom (2012). X-linked aarskog syndrome: report on a novel fgd1 gene mutation. *A j m genetic counseling*; 23, 2.
27. Andrew p. Miller\* and huntington f. Willard (1998) Genetics chromosomal basis of X chromosome inactivation: Identification of a multigene domain in Xp11.21-p11.22 that escapes X inactivation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 95, pp. 8709-8714

28. Lyon, M. F. (1961) *Nature* 190, 372–373.
29. Orrico A, Galli L, Faivre L, Clayton-Smith J, Azzarello-Burri SM, Hertz JM, Jacquemont S, Taurisano R, Arroyo Carrera I, Tarantino E, Devriendt K, Melis D, Thelle T, Meinhardt U, Sorrentino V. (2010). Aarskog–Scott syndrome: Clinical update and report of nine novel mutations of the FGD1 gene. *Am J Med Genet Part A* 152A:313–318
30. Logie LJ, Porteous MEM. (1998). "Intelligence and development in Aarskog syndrome". *Arch Dis Child* 79:359–360.
31. Lebel RR, May M, Pouls S, Lubs HA, Stevenson RE, Schwartz CE.(2002). Non-syndromic X-linked mental retardation associated with a missense mutation (P312L) in the FGD1 gene. *Clin Genet* 61:139–145.
32. Shalev SA, Chervinski E, Weiner E, Munoz G, Friez MJ, Schwartz CE. (2006). Clinical variation of Aarskog syndrome in a large family with 2189delA in the FGD1 gene. *Am J Med Genet* 140A:162–165.
33. Bedoyan JK.(2009). First case of deletion of the faciogenital dysplasia 1 (FGD1) gene in a patient with Aarskog-Scott syndrome.*Eur J Med Gen* 52:262-264
34. Orrico A, Galli L, Bouni S, Hayek G, Luchetti A, Lorenzini S, Zapella M, Pomponi MG, Sorrentino V. (2005). Attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) and variable clinical expression of Aarskog-Scott syndrome due to a novel FGD1 gene mutation (R408Q). *Am J Med Genet* 135A:99-102.
35. Emmelien Aten, Yu Sun, Rowida Almomani, Gijs W.E. Santen, Tobias Messemaker, Saskia M. Mass, Martijn H. Breuning, and Johan T. den Dunnen (2012). Exome Sequencing identifies a branch point variant in aarskog-Scott Syndrome. *Human Mutation*.
36. Moore, D. (1994) in: *Current Protocols in Molecular Biology*, Sections 2.1.1-2.1.8, Wiley, New York.
37. Xu M, Qi M, Zhou H, Yong J, Qiu H, Cong P, Hong X, Li C, Jiang Y, Chen X, Yu Y. (2010). Familial syndrome resembling Aarskog syndrome.. *Am J Med Genet Part A* 152A:2017–2022

38. Ahmad S, Teebi, J.K. Rucquoi, and M.S. Meyn (1993) Aarskog Syndrome: Report of a Family With Review and Discussion of Nosology American Journal of Medical Genetics 46501-509
39. Mikelsaar RV-A, Lurie IW (1992): A typical case of Aarskog syndrome. J Med Genet 29:349-350.
40. Duncan PA, Klein RM, Wilmot PI, Shapiro LR (1977): Additional features of the Aarskog syndrome. J Pediatr 91:769-770.
41. Hoo JJ (1979): The Aarskog (facio-digito-genital) syndrome. Clin Genet 16269-276.
42. Van den Bergh P, Fryns JP, Wilms G, Piot R, Dialands G, Van den Berg R (1984): Anomalous cerebral venous drainage in Aarskog syndrome. Clin Genet 25:288-294.
43. Pedersen JC, Fryns JP, Bracke P, Geeraert M, Van Den Berghe H (1980): The Aarskog syndrome. Ann Genet 23:108-110.
44. Andrew p. Miller, huntington f. Willard (1998), chromosomal basis of x chromosome inactivation: identification of a multigene domain in xp11.21-p11.22 that escapes x inactivation *proc. Natl. Acad. Sci. Usa* vol. 95, pp. 8709-8714.
45. CE Schwartz et al (2000). Two novel mutations confirm FGD1 is responsible for the Aarskog syndrome European Journal of Human Genetics 8, 869-874
46. Pilozzi-Edmonds L, Maher TA, Basran RK, Milunsky A, Al-Thihli K, Braverman NE, Alfares A. (2011). Fraternal twins with Aarskog-Scott syndrome due to maternal germline mosaicism. Am J Med Genet Part A 155:1987-1990
47. Baldi M, Mural, De Cassan P et al.: Sindrome di Aarskog: nuove mutazioni del gene FGD1. XII Congresso SIGU.; Abstract book: poster 105. Torino 8-10 Novembre 2009.

48. Petryk A, Richton S, Sy JP, Blethen SL (1999). The effect of growth hormone treatment on stature in aarskog syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 12:161-165

49. Brodsky MC, Keppen LD, Rice CD, Ranells JD (1990) Ocular and systemic findings un the Aarskog syndrome. *Am J Ophtalmol* 109:450-456.

## CAPITULO X

### 10. RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

**Mariana Pérez Coria**

**Candidato para el grado de Especialista en Genética Médica.**

Tesis: "IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *FGD1* EN  
PACIENTES CON FENOTIPO DE SÍNDROME DE AARSKOG"

Campo de estudio: Ciencias de la Salud

Datos Personales: Nacida en Pachuca, Hidalgo el 10 de Agosto de 1985,  
hija de Armando Pérez López y María Elena Coria Gómez

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Hidalgo con grado  
de Médico Cirujano en 2010.