

11216



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO



ESTUDIO CLINICO Y MOLECULAR DE UNA PACIENTE CON SINDROME OTOPALATODIGITAL TIPO I.M.

SECRETARIA DE SALUD
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
ORGANISMO DESCENTRALIZADO



DIRECCION DE ENSEÑANZA

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICO GENETISTA
PRESENTA:
ALBERTO HIDALGO BRAVO

TUTOR: JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ
ASESOR: SUSANA KOFMAN EPSTEIN



HOSPITAL GENERAL DE MEXICO. S. R. L.

MÉXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Genética del Hospital General de México bajo la tutoría de la Dra. Susana Kofman E. y el Dr. Juan Carlos Zenteno R.

A mi mamá y papá porque ellos son mi mayor fuente de inspiración y de amor.

A mis hermanos que siempre han estado a mi lado.

A Aline por haberme acompañado durante un camino tan largo y lleno de sorpresas.

A la Dra, Susana Kofman por haberme dado la oportunidad de formar parte del mejor equipo de trabajo.

A Juan Carlos por brindarme la confianza y permitirme trabajar a su lado

A todos mis maestros que compartieron conmigo dos de las cosas más valiosas que existen en el mundo, su conocimiento y su amistad.

A todos mis compañeros y amigos que han crecido conmigo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, porque mi corazón siempre será azul y mi piel dorada.

Índice

1. Introducción	
1.1.- Displasias óseas	3
1.2.- Síndrome Otopalatodigital tipo I	7
1.3.- Enfermedades relacionadas al síndrome Otopalatodigital	8
1.4.- Estudios moleculares en el síndrome OPD I enfermedades relacionadas	9
1.5.- Gen <i>FLNA</i> y su producto	12
1.6- Funciones de la Filamina A	17
2. Objetivos	21
3. Justificación	22
4. Planteamiento del problema	23
5. Material y métodos	
5.1.- Descripción clínica de la paciente	24
5.2.- Extracción de DNA de sangre periférica	25
5.3.- Análisis espectrofotométrico para cuantificación de DNA	26
5.4.- Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 3 del gen <i>FLNA</i>	26
5.5.- Electroforesis en gel agarosa	28
5.6.- Purificación de productos de PCR para secuenciación nucleotídica automatizada	29
5.7.- Cuantificación del DNA purificado	30
5.8.- Secuenciación automatizada de los productos de PCR	30

5.9.- Análisis de la inactivación del cromosoma X	32
5.10.- Amplificación y secuenciación del repetido polimórfico de CAG del receptor de andrógenos	33
5.11.- Análisis del estado de metilación del repetido polimórfico CAG del receptor de andrógenos.....	33
5.12.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	34
6. Resultados	36
7. Discusión	45
8. Bibliografía	50

INTRODUCCIÓN

Displasias óseas

Las enfermedades genéticas que afectan al hueso comprenden un amplio grupo de condiciones clínicamente distintas y genéticamente heterogéneas. Las manifestaciones clínicas pueden ir desde muerte neonatal hasta un leve retardo en el crecimiento. Aunque de manera individual son raras, en conjunto las displasias óseas son de relevancia clínica por su frecuencia. La gran diversidad clínica dificulta el diagnóstico y se han hecho diversos intentos para delinear clasificaciones de entidades individuales o grupos de padecimientos que faciliten el diagnóstico. De manera convencional las displasias óseas han sido subdivididas en disostosis, que se definen como malformaciones de huesos individuales o un grupo de huesos y las osteocondrodisplasias, consideradas desordenes del desarrollo del tejido condro-óseo. En base a las características clínicas y radiológicas, se ha creado una clasificación llamada “Nomenclatura y clasificación de las osteocondrodisplasias”. Recientemente se han incorporado a la clasificación los descubrimientos de las bases moleculares de los padecimientos para integrar una clasificación más completa (Hall C.M. *et al.* 2002) y que tome en cuenta las bases moleculares y el proceso embriológico normal (Kornak U. *et al.* 2003).

El desarrollo óseo comienza con la formación de un patrón, un proceso durante el cual se delinear el número, tamaño, y forma de cada uno de los elementos óseos. Después del establecimiento de este patrón, los precursores de las células mesenquimatosas migran hacia los sitios de osteogénesis para condensarse e iniciar su diferenciación. El crecimiento óseo se lleva a cabo principalmente en las placas de

cartilago de crecimiento, estructuras altamente especializadas localizadas en los extremos de los huesos largos.

Las células óseas permanecen activas aún después de que ha finalizado la fase de crecimiento, para mantener la homeostasis del hueso mediante un proceso llamado “remodelación”. En base a los eventos que deben ocurrir para la formación del tejido óseo y su mantenimiento, los desordenes del hueso se pueden clasificar en cuatro grupos mayores: padecimientos que afectan el patrón de desarrollo óseo, los que alteran la condensación/diferenciación de los precursores de las estructuras óseas, los que dañan el crecimiento y los que bloquean la homeostasis. (Kornak U. *et al.* 2003).

Desordenes que afectan el patrón óseo

El tejido óseo se origina de tres sitios diferentes: el esqueleto axial, constituido por vértebras y costillas se deriva de las somitas; el esqueleto apendicular tiene su origen en las células mesenquimatosas localizadas en la placa lateral del mesodermo y la mayor parte de los huesos craneofaciales se originan de las células de la cresta neural. Dentro de este grupo se incluyen a las displasias espándilo-torácicas, las polidactilias y la ectrodactilia entre otros. En varios de estos padecimientos se han demostrado mutaciones en genes como los miembros de la familia *HOX* y en *SHH* y en la mayor parte de ellos se identifican alteraciones en otros tejidos diferentes a hueso. (Kornak U. *et al.* 2003).

Desordenes que afectan la diferenciación

Una vez que el patrón ha sido determinado, las células migran hacia el lugar de la futura osteogénesis y forman condensaciones que anticipan la formación de tejido óseo. Las

células empiezan a secretar hacia la matriz extracelular las moléculas necesarias para brindar la consistencia del tejido óseo. El siguiente paso es inducir la diferenciación de las células hacia condrocitos en los sitios de osificación endocondral o hacia osteoblastos en los sitios de osificación membranosa. Algunos de los genes que se ha demostrado que participan en la diferenciación celular son *SOX9*, *IHH*, *BMP*, entre otros.

Alteraciones genéticas en este proceso dan lugar a padecimientos como las braquidactilias, la displasia campomélica, el síndrome de Ellis-van Creveld, la displasia cleidocraneal y la discondroostosis de Leri-Weill (Kornak U. *et al.* 2003).

Defectos en el crecimiento

A diferencia de los huesos del cráneo que se forman por una transformación directa de las células mesenquimatosas hacia osteoblastos, la mayor parte del esqueleto se forma por osificación endocondral. En la osificación endocondral, primero se forma un molde cartilaginoso, el cual es subsecuentemente remplazado por hueso. Durante este proceso es fundamental la formación de la placa de crecimiento, estructura altamente especializada que genera el crecimiento longitudinal del hueso. Los condrocitos de la placa de crecimiento están invariablemente organizados en tres capas: los condrocitos de reserva, los condrocitos proliferantes y los condrocitos hipertróficos. Existe un complejo tráfico de señales que regula la tasa de proliferación y de conversión de condrocitos proliferantes hacia condrocitos hipertróficos.

Con el crecimiento subsiguiente, el centro de osificación se expande hacia el extremo del hueso y se forman centros de osificación secundarios dentro de los remanentes del cartílago. La nueva placa de crecimiento se localiza entre la epífisis y la

metáfisis y permanece activa hasta el final de la pubertad, cuando los centros de osificación primario y secundario se fusionan.

La hormona del crecimiento (GH) es secretada por la hipófisis y el Factor de Crecimiento Parecido a la Insulina 1 (IGF1) es producido por los condrocitos proliferantes e hipertróficos, ambos factores actúan de manera independiente para controlar la tasa de proliferación de los condrocitos. Los padecimientos que afectan esta vía de regulación resultan en talla baja proporcionada con pocos datos de displasia ósea. La gran mayoría de los demás síndromes que se presentan con talla baja, originan una desproporción de segmentos, probablemente porque no sólo afectan el crecimiento óseo, sino también los mecanismos de diferenciación de los condrocitos.

Desordenes que afectan la homeostasis

Tan pronto como se forma el tejido óseo los osteoclastos/condroclastos comienzan su función degradando el cartílago calcificado, así como el hueso maduro. La resorción es un prerequisite para el crecimiento del hueso, debido a que el tejido óseo sólo se puede formar hasta que el cartílago calcificado ha sido removido. Por otro lado, la arquitectura del hueso debe ajustarse a los cambios metabólicos y mecánicos propios del desarrollo, de tal manera que la preservación de la masa ósea depende del funcionamiento sincronizado de osteoblastos y osteoclastos, a lo que se le llama “remodelación ósea”. Si la remodelación pierde su balance, originando pérdida o ganancia de tejido óseo, puede resultar en osteoporosis u osteopetrosis respectivamente.

La hipofosfatasa, la displasia craneometafisiaria, y la osteopetrosis tipo I, son ejemplos de enfermedades donde se ve afectado el remodelamiento óseo.

Síndrome Otopalatodigital tipo I

El síndrome Otopalatodigital tipo I (OPD I) [MIM 311300] es un ejemplo de displasia ósea en donde se ve afectada la etapa de crecimiento y diferenciación del tejido óseo, tiene un patrón de herencia dominante ligada al X y fue descrita por primera vez por Taybi en 1962. Se caracteriza por retraso mental leve, sordera, paladar hendido, alteraciones faciales típicas y displasia ósea generalizada (Taybi *et al*, 1962). Las alteraciones esqueléticas incluyen talla baja, generalmente proporcionada, defectos en el hueso temporal que llevan a sordera conductiva, deformidades del esternón, camptodactilia, campomelia (encurvamiento de huesos largos) y alteraciones en las falanges de manos y pies. Las anomalías craneofaciales incluyen occipucio y frontal prominentes, prominencia de las regiones supraciliares, puente nasal deprimido (facies de boxeador), hipertelorismo, ausencia de senos paranasales, microstomía, alteraciones dentales y paladar hendido. El paladar hendido es un dato clínico que se presenta en todos los hombres afectados. Además, se han reportado malformaciones en los senos de la duramadre (Suzumura *et al*, 1998). En las mujeres afectadas se observa un fenotipo similar, pero con una expresión más leve del espectro de alteraciones. Por ejemplo el paladar hendido es un hallazgo extraordinariamente infrecuente en mujeres con la enfermedad. (Poznanski AK *et al*, 1974)

Enfermedades relacionadas al síndrome OPD I

Se han descrito otras 3 entidades clínicas que presentan características fenotípicas que se superponen con las del síndrome OPD I; estas son el síndrome Otopalatodigital tipo II, (OPD II) (MIM 304120), el síndrome de Melnick-Needles (MNS) (MIM 309350) y la

Displasia Frontometafisiaria (FMD) (MIM 305620). El síndrome OPD II fue descrito por primera vez en 1976 por Fitch, (Fitch, N. *et al.* 1976), presenta un fenotipo más severo que el síndrome OPD I y aunque usualmente es letal en varones (la mayor parte de los pacientes varones son óbitos o mueren en el primer año de vida), algunos han llegado a sobrevivir hasta los 10 años de edad. Además de las características fenotípicas similares a las del OPD I, el síndrome OPD II puede incluir también anomalías del sistema nervioso central, onfalocelo y cardiopatías congénitas; las portadoras generalmente presentan manifestaciones mínimas de la enfermedad (hipertelorismo, puente nasal amplio y deprimido) (Verloes, A. *et al.* 2000). El Síndrome de Melnick-Needels, descrito por primera vez en 1966, es una osteodisplasia poco frecuente y aunque se han descrito de manera esporádica varones severamente afectados, la enfermedad generalmente es letal en varones en etapas tempranas de la gestación. El cuadro clínico se caracteriza principalmente por talla baja, displasia ósea severa, esclerosis de la base del cráneo, alteraciones vertebrales y deformidades del tórax (Gorlin R.J. *et al.* 2001). La Displasia Frontometafisiaria es la entidad que comparte un fenotipo más parecido al síndrome OPD I, ya que presenta una facies muy similar, limitación en la movilidad de algunas articulaciones, displasia ósea generalizada y alteraciones renales (Gorlin R.J. *et al.* 1969). Debido a que los síndromes OPD I, OPD II, MNS y la FMD comparten varias características fenotípicas, algunos autores han propuesto que estas enfermedades son parte de un espectro clínico causado por mutaciones en un mismo gen, es decir, heterogeneidad alélica (Superti-Furga A. *et al.*, 1987; Corona Rivera J.R. *et al.*, 1999; Verloes *et al.*, 2000).

Estudios moleculares en el síndrome OPD I y enfermedades relacionadas

Los árboles genealógicos de los casos de familiares de OPD I muestran un patrón de herencia ligado al cromosoma X y a principios de la década de los noventa se realizaron los primeros estudios de ligamiento para asignar un locus al padecimiento. En 1991 se demostró por primera vez que existía ligamiento de la enfermedad con la porción distal de la región Xq28 (Hoo J.J. *et al*, 1991). Posteriormente, en 2001 se estudió una familia con síndrome OPD II que mostró ligamiento para esa misma región, (Robertson S.P. *et al*, 2001) lo que reforzó la posibilidad de que ambas enfermedades fueran variantes alélicas.

Recientemente se realizó el análisis molecular de la región Xq28 en casos de síndrome OPD I y síndrome OPD II y en pacientes diagnosticados clínicamente y radiológicamente como MNS y FMD. El primer paso fue acotar la región Xq28 con nuevos marcadores polimórficos en una familia con el síndrome OPD II que había mostrado ligamiento para esa región. El intervalo candidato que se obtuvo abarcó 1.95 Mb y se encontraba flanqueado por el gen *IRAK1* en su extremo proximal y por el telómero de Xq en su extremo distal. Se realizó el análisis de los genes localizados en esta región mediante polimorfismo conformacional de cadena sencilla y ensayos de tipo Southern blot. Después de excluir 24 genes situados en esta región, se encontraron mutaciones en un gen que codifica para una proteína de citoesqueleto llamada filamina A (*FLNA*), en pacientes con las cuatro entidades clínicas. Las mutaciones identificadas en los pacientes eran mutaciones de sentido equivocado, ocasionando el cambio en un solo aminoácido, (Robertson S.P. *et al*, 2003). Por lo tanto, las mutaciones en el gen *FLNA* son la causa de por lo menos cuatro osteodistrofias severas ligadas al cromosoma X:

síndrome OPD I, síndrome OPD II, MNS y FMD, confirmando la heterogeneidad alélica propuesta previamente en base a la similitud de las características fenotípicas.

Es importante señalar que anteriormente se habían demostrado mutaciones en este mismo gen en pacientes con una enfermedad llamada Heterotopía Nodular Periventricular ligada al X, padecimiento neurológico generalmente letal en varones, caracterizado por crisis convulsivas de difícil control, en el que existe una falla en la migración celular de algunas neuronas, que origina la formación de nódulos ectópicos de neuronas localizados en los márgenes de la superficie ventricular. Las mutaciones reportadas en los pacientes con Heterotopía Nodular Periventricular son mutaciones sin sentido o pequeñas deleciones o inserciones que alteran el marco de lectura. (fig. 1) (Fox J.W. *et al*, 1998; Sheen V.L. *et al*, 2001; Moro F. *et al*, 2002).

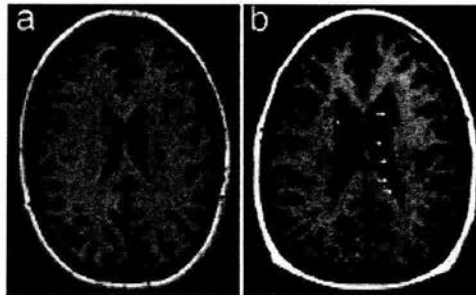


Fig. 1.- a) Corte axial de RMN en T1 de la corteza cerebral de un sujeto sano donde se muestran los ventrículos y su epitelio de características normales. b) Corte axial de RMN con la misma técnica de un individuo con diagnóstico de heterotopía nodular periventricular, donde se muestran los nódulos neuronales ectópicos. Tomada de Fox J.W. *et al*, 1998.

Hasta el año 2003 no se habían reportados pacientes que presentaran Heterotopía Nodular Periventricular junto con el fenotipo del síndrome OPD I o enfermedades

relacionadas. Recientemente se presentó el caso de una paciente femenina con diagnóstico clínico de FMD en la cual se demostró Heterotopía Nodular Periventricular mediante resonancia magnética nuclear. El análisis molecular de esta paciente reveló una nueva mutación puntual en estado heterocigoto en el exón 45 del gen *FLNA*, consistente en una transversión de C a A en el nucleótido 7315 cerca del sitio de corte y empalme. La mutación originó la síntesis de dos RNAm aberrantes: uno que porta una mutación de sentido equivocado que ocasiona en la secuencia de la proteína la sustitución del residuo 2439 de leucina por uno de metionina y otro que resulta de un nuevo sitio de corte y empalme con una delección de 21pb y que al momento de su traducción da lugar a una proteína truncada por la incorporación de un codón de paro prematuro (Zenker M. *et al* 2004).

En base al tipo de mutaciones reportadas en pacientes con o sin manifestaciones neurológicas se propuso que el mecanismo fisiopatológico era diferente en cada caso. Para el síndrome OPD I y enfermedades relacionadas se propone que el mecanismo sea una ganancia de función o un efecto dominante negativo, en tanto que en los casos de Heterotopía Nodular Periventricular se propone que sea una pérdida de función. La paciente con el fenotipo dual presenta ambas alteraciones, una proteína con una sustitución en un aminoácido y una proteína truncada, lo cual apoya la existencia de mecanismos fisiopatológicos diferentes.

Gen *FLNA* y su producto

El gen *FLNA* ha sido mapeado en la parte distal de la región Xq28, adyacente al gen de la emerina. *FLNA* abarca 26 kb de DNA genómico, está constituido por 48 exones y tiene

un marco de lectura abierto de 7.9 kb el cuál codifica para una proteína de 280-kD conformada por 2647 aminoácidos (van der Flier A. *et al*, 2001).

La proteína Filamina A pertenece a una familia de proteínas del citoesqueleto con propiedades de unión a actina y en el humano existen dos genes homólogos que codifican Filamina B y Filamina C. Las Filaminas A y B son las que tienen una expresión ubicuota, sin embargo las concentraciones de Filamina B tienen una mayor variabilidad en diferentes tejidos, en tanto que la expresión de la Filamina C está limitada al músculo esquelético y cardíaco (van der Flier A. *et al*, 2001).

La Filamina A tiene un primer dominio N-terminal de unión a actina, similar a los dominios observados en la distrofina y α -actinina, dentro del cual se encuentran dos dominios con homología a calponina (CHD1 y CHD2) y un segundo dominio en forma de “bastón” el cual está constituido de 24 unidades repetidas parecidas a inmunoglobulina, cada una de ellas constituidas por aproximadamente 96 aminoácidos. Entre los repetidos 15 y 16 y 23 y 24 se encuentran dos dominios tipo “bisagra” que le confieren flexibilidad a la molécula. Finalmente, se identifica un tercer dominio C-terminal formado por un repetido truncado; se ha demostrado que mediante este dominio la Filamina A puede formar homodímeros y heterodímeros con la Filamina B. (Fox J.W. *et al*, 1998) (Fig. 2)

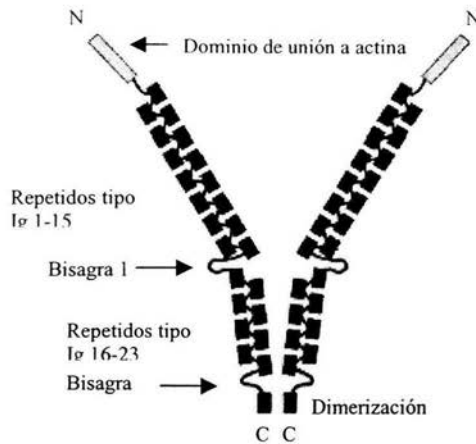


Fig. 2 Representación esquemática del homodímero de Filamina A mostrando sus dominios

El análisis molecular del gen *FLNA* reveló que las mutaciones presentes en los pacientes con síndrome OPD I, OPD II, MNS y FMD son mutaciones puntuales que ocasionan cambios de sentido equivocado en la proteína. Los residuos mutados son aminoácidos que se encuentran altamente conservados a través de la evolución en una amplia variedad de organismos vertebrados e invertebrados. Se observó que comparando los cuadros clínicos y las mutaciones identificadas es posible establecer una correlación genotipo-fenotipo, ya que en pacientes varones con síndrome OPD I y síndrome OPD II las mutaciones se encontraron en el dominio CHD II, en pacientes con diagnóstico de MNS se localizaron en el repetido 10 del dominio tipo “bastón” y en pacientes con FMD y en mujeres con síndrome OPD II; éstas se situaron en diferentes repetidos dentro del dominio tipo “bastón” (Robertson S.P. *et al*, 2003). La tabla 1 muestra la distribución de las mutaciones reportadas y en la figura 3 se esquematiza la localización de las mutaciones en la proteína.

Diagnóstico clínico y radiológico	Sexo	Exón	Dominio
OPD I	Varones	3	CHD II
OPD II	Varones	3, 5	CHD II
OPD II	Mujeres	5, 29	CHD II, Rep, 14/15
MNS	Mujeres	22	Repetido 10
FMD	Varones	11, 22	Repetido 3, 10

Tabla 1.- Localización de las mutaciones reportadas en un grupo de pacientes con OPD I, OPD II, MNS y FMD. (Robertson S.P. *et al*, 2003)

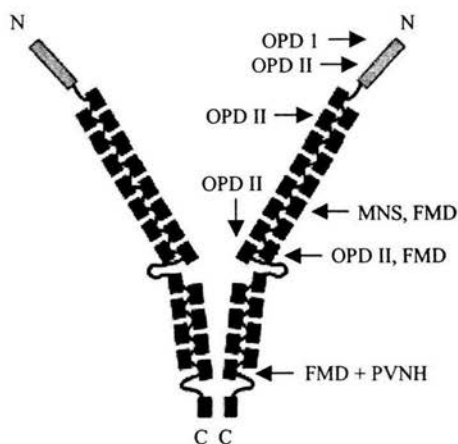


Fig 3. Esquema de las mutaciones en la filamina A en los pacientes con síndrome OPD I, OPD II, MNS, FMD y FMD+PVNH. (Robertson S.P. *et al*, 2003)

En los pacientes con Heterotopía Nodular Periventricular la mayoría de las mutaciones dan origen a codones de alto prematuro o cambios en el marco de lectura, lo que sugiere un mecanismo fisiopatológico diferente en la presentación del fenotipo con

Heterotopía Nodular Periventricular y sin manifestaciones neurológicas como el síndrome OPD I y las enfermedades relacionadas (Robertson S.P. *et al*, 2003).

El tipo de mutación encontrada en los pacientes con síndrome OPD I, OPD II, MNS, FMD y PVNH sugieren que el mecanismo fisiopatológico es diferente; para las entidades que no presentan los nódulos ectópicos de neuronas se propone que existe una ganancia de función de la proteína mutada, debido a que se sintetiza un producto con un cambio en un aminoácido, en tanto que para los pacientes con PVNH se plantea que existe una pérdida de función, ya que las mutaciones dan origen a proteínas truncadas. El paciente descrito con ambos cuadros clínicos puede ser un modelo para estudiar los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades. De esta manera, las mutaciones en el gen *FLNA* pueden resultar en un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y no neurológicas.

En las mujeres, y en general en las hembras de mamíferos, es necesario que uno de los dos cromosomas X sufra un fenómeno de inactivación a fin de compensar la dosis génica, ya que los varones sólo poseen un cromosoma X. La inactivación de uno de los cromosomas X en condiciones normales ocurre de manera aleatoria, es decir, que la célula no adquiere o pierde ventajas al inactivar el cromosoma X de origen paterno o el cromosoma X de origen materno; sin embargo, una vez que una célula inactiva uno de sus cromosomas X, éste permanece inactivo durante el resto de la vida de la célula y la clona de células que se originen de ella portarán el mismo cromosoma X inactivo. Al final del desarrollo se espera que 50% de las células inactiven el cromosoma de origen materno y el otro 50% el de origen paterno. A este proceso se le ha llamado Lyonización, en honor a Mary Lyon quien lo describió por primera vez y explica porqué las mujeres

son mosaicos naturales para los genes que se localizan en el cromosoma X: poseen líneas celulares que expresan los alelos de origen materno y otras que expresan los alelos de origen paterno.

El fenómeno de Lyonización cobra mayor importancia en los padecimientos ligados al cromosoma X, ya que la célula puede inactivar el cromosoma X con el alelo mutado o el alelo sano y en base a esto adquirir alguna ventaja o desventaja selectiva. En algunos casos la mutación de un determinado alelo en el cromosoma X no afecta el fenómeno de Lyonización, sin embargo existen algunos alelos que pueden afectar el patrón de inactivación del cromosoma X, haciendo que este se sesgue hacia el cromosoma X que porta el alelo mutado. Este mecanismo implica la existencia de una mayor proporción de células que inactivan el cromosoma X portador del alelo mutado, muy probablemente como mecanismo compensatorio a una mutación que origina una desventaja selectiva a la célula y que comprometa su viabilidad.

Otro de los aspectos importantes en los padecimientos ligados al cromosoma X es que puede existir una correlación entre el patrón de inactivación y la severidad del padecimiento en las mujeres. Los estudios realizados para analizar el patrón de inactivación del cromosoma X en mujeres con síndrome OPD I y enfermedades relacionadas han mostrado que, con excepción de los pacientes con Heterotopía Nodular Periventricular (Robertson S.P. *et al*, 2003), las pacientes con mutaciones en el gen *FLNA* muestran una inactivación del cromosoma X preferencialmente hacia el cromosoma que porta el alelo mutado. Esto se ha observado especialmente en los casos asociados con los fenotipos más severos, lo que sugiere que las células que expresan la filamina A mutada se encuentran en desventaja selectiva (Fox J.W. *et al* 1998; Robertson S.P. *et al*, 2003).

Funciones de la Filamina A

Se ha demostrado que la filamina A es el miembro más abundante de la familia de proteínas de unión a actina (Fox J.W. *et al*, 1998). A la fecha no se conoce exactamente cual es la función de la Filamina A en la organización del citoesqueleto. La identificación de aspectos como su estructura, capacidades de dimerización y de unión actina y su asociación con receptores de membrana ha servido para proponer algunas de sus posibles funciones.

Estudios histopatológicos realizados en pacientes con diagnóstico de OPD II han demostrado la existencia de defectos en la osificación membranosa y engrosamiento del periostio, en tanto que la osificación endocondral se encuentra intacta, evidencias que sugieren que la Filamina A puede intervenir en la formación del hueso membranoso. (Ogata *et al*, 1990). Se ha demostrado que el dominio C-terminal puede unirse a receptores de membrana, por lo que se ha propuesto que tenga un papel fundamental en la transducción de señales, probablemente mediante una reorganización de los filamentos de actina del citoesqueleto (van der Flier A. *et al*, 2001). Otros estudios revelaron que existen ciertos receptores de membrana que interactúan con la Filamina A mediante los repetidos 17 a 19 del dominio en forma de “bastón” (Fox J.W. *et al*, 1998).

La Filamina A está sujeta a regulación mediante reacciones de fosforilación que modifican su localización celular y su unión tanto a las fibras de actina como a receptores de membrana. Fig. 4. (Fox J.W. *et al*, 1998).

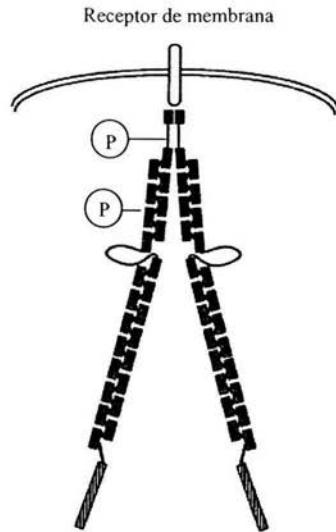


Fig 4. Representación del homodímero de Filamina A y su interacción con un receptor de membrana. Se muestran los sitios de fosforilación de la proteína (Fox J. W. *et al*, 1998)

Otra propiedad de la Filamina A es que a bajas concentraciones es capaz de inducir ramificaciones perpendiculares de los filamentos de actina (Fox J.W. *et al*, 1998).

La Filamina A también tiene funciones relacionadas con el sistema hemostático y de remodelación de vasos sanguíneos, lo que podría explicar la alta letalidad observada en los varones con mutaciones en el gen *FLNA*. Se han observado malformaciones en vasos sanguíneos y un estado de hipercoagulabilidad en mujeres con mutaciones en el gen *FLNA*. (Fox J.W. *et al*, 1998). Por otra parte, se han sugerido funciones de la Filamina A en el desarrollo del sistema inmune, ya que se reportó un caso de un varón con una mutación puntual en el gen *FLNA* que presentaba defectos inmunológicos y falleció en la etapa neonatal (Fox J.W. *et al*, 1998).

Una de las funciones más importantes que se han estudiado de la Filamina A es su papel en los procesos de migración celular, principalmente a nivel del sistema nervioso

central. Estudios realizados en embriones han indicado que la proteína se expresa de manera importante en las primeras etapas de desarrollo del cerebro y es probablemente una señal para que las neuronas migren desde las placas periventriculares hacia la corteza cerebral. Además, se ha demostrado que durante esta misma etapa del desarrollo la Filamina A es capaz de formar heterodímeros con la Filamina B. Estos hallazgos sugieren que ambas proteínas intervienen en la migración neuronal y que en caso de que exista un alelo mutado del gen *FLNA*, la Filamina B podría dirigir, aunque de manera menos eficiente, la migración de algunas neuronas. Estas observaciones explican parcialmente el hecho de que existan varones con Heterotopía Nodular Periventricular en los que se observan tanto neuronas ectópicas como neuronas localizadas adecuadamente. En el caso de las mujeres que presentan mutaciones en *FLNA*, la severidad del cuadro clínico no sólo está en función del patrón de inactivación del cromosoma X, sino que intervienen otros factores que determinan la migración de las neuronas hacia la corteza cerebral como el papel de la Filamina B (Sheen V.L. *et al* 2002).

Debido a que aún no se han podido establecer claramente las funciones de la Filamina A, no ha sido posible determinar la fisiopatología de las entidades clínicas que se asocian a ella. Se ha propuesto que para los síndromes OPD I, OPD II, MNS y MFD, en los que las mutaciones en la filamina A son de sentido equivocado, el mecanismo es una ganancia de función, ya que en los leucocitos de las heterocigotas se observa un patrón de inactivación del cromosoma X muy sesgado, sobre todo en los cuadros clínicos más severos, sugiriendo que las células en las que se expresa el alelo mutado se encuentran en desventaja selectiva (Robertson *et al.* 2003); en tanto que en la Heterotopía Nodular Periventricular, en la que las mutaciones dan lugar a una proteína truncada, se

trataría de una pérdida de función, ya que los leucocitos de las heterocigotas presentan un patrón de inactivación del X al azar, indicando que la expresión del gen FLNA es dispensable para la supervivencia celular (Robertson *et al.* 2003).

OBJETIVOS

- ❖ Identificar la mutación en el gen *FLNA* en una paciente con datos clínicos compatibles con Síndrome Otopalatodigital tipo I.
- ❖ Determinar el patrón de inactivación del cromosoma X en la paciente.
- ❖ Contribuir a establecer una correlación genotipo-fenotipo para el espectro de malformaciones asociadas a mutaciones en el gen *FLNA*.

JUSTIFICACIÓN

El análisis molecular de este caso permitirá ampliar el espectro mutacional del gen FLNA en las enfermedades relacionadas al síndrome OPD I y contribuirá a establecer una correlación genotipo-fenotipo en este grupo de displasias esqueléticas ligadas al cromosoma X.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Determinar el tipo y la mutación en el gen *FLNA* en una paciente con datos clínicos compatibles con síndrome OPD I y examinar el patrón de inactivación del cromosoma X.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción clínica de la paciente

Se presenta el caso de una paciente femenina producto de la gesta 3, hija de padres clínicamente sanos, no consanguíneos, originarios del estado de Guerrero; la madre cursó con un embarazo normoevolutivo, obtenida por parto eutócico, con un peso al nacimiento de 3100 gr., talla 50 cm; los padres refieren que presentó retraso en el desarrollo psicomotor desde la infancia temprana y un episodio de crisis convulsivas a los 5 años de edad sin causa aparente y controlado con medicamentos no especificados; a los 25 años se presentó un nuevo episodio de crisis convulsivas. No existen datos relevantes dentro de la familia acerca de enfermedades genéticas, malformaciones congénitas o retraso psicomotor no explicable; la paciente tiene 9 hermanos clínicamente sanos al momento del interrogatorio. Actualmente la propósita tiene 26 años y a la exploración física se encontraron los siguientes datos: talla baja (130 cm., por debajo de la percentila 3), peso 41.5 kg. (por debajo de la percentila 3). En región craneofacial se observa frontal prominente, proptosis ocular bilateral, regiones supraciliares prominentes, hipertelorismo, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, nariz pequeña con puente nasal deprimido, microstomía, hendidura medial en el paladar blando y dientes en mala posición. El tórax y abdomen fueron de apariencia normal, las extremidades superiores mostraron deformidad bilateral en codos y limitación a la extensión, braquidactilia, pulgares anchos y uñas hipoplásicas y displásicas. En los miembros inferiores presenta ligero encurvamiento de ambos fémures, acortamiento de los primeros ortejos, diástasis entre segundo y tercer ortejo y entre tercero y cuarto y uñas distróficas. Todos los dedos del pie presentan ensanchamiento distal, lo que ha sido descrito como dedos de "rana".

Se realizaron audiometría y radiografías de cráneo, tórax y extremidades superiores e inferiores. Se realizó estudio citogenético en linfocitos de sangre periférica con técnica de bandeo GTG. Debido al antecedente de crisis convulsivas se solicitó un RMN de cráneo simple y contrastada para descartar la presencia de malformaciones encefálicas o de Heterotopía Nodular Periventricular. Los padres y una hermana de la paciente fueron examinados de manera conjunta sin mostrar ninguna malformación.

Extracción de DNA de sangre periférica

Después de obtener el consentimiento informado por escrito de la paciente, sus padres y su hermana se extrajeron por punción venosa 3 ml de sangre periférica a cada uno de los 4 sujetos. Una vez obtenida la muestra se procedió a extraer el DNA genómico a partir de los leucocitos utilizando el reactivo DNAzol BD (GIBCO). Se transfirieron 500 µl de sangre total a un microtubo eppendorf de 2 ml, se mezclaron con 1 ml de reactivo DNAzol BD y se agitó la preparación por 30 segundos. Inmediatamente se agregaron 400 µl de alcohol isopropílico y nuevamente se agitó la muestra, en esta ocasión por 1 minuto. La mezcla se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos y después se centrifugó a 6000 rpm por 6 minutos y se decantó el sobrenadante con cuidado; el botón residual en el tubo fue lavado añadiendo 500 µl de DNAzol BD y se agitó hasta disolver el botón. Se centrifugó la muestra a 6000 rpm, esta vez por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 ml de etanol al 75%, agitando el tubo hasta disolver y homogenizar. La muestra fue centrifugada nuevamente a 6000 rpm por 5 minutos, se decantó el sobrenadante y se retiró el exceso de alcohol con pipeta. Se procedió a añadir 200 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 8mM y se incubó el botón por 5 minutos a

temperatura ambiente. Finalmente, el DNA disuelto en NaOH se transfirió a tubos eppendorf limpios de 0.5 ml.

Análisis espectrofotométrico para cuantificación de DNA

El análisis espectrofotométrico del DNA tuvo la finalidad de determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260 nm y 280 nm). A partir de la lectura a 260 nm (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calculó la concentración del DNA con la fórmula siguiente:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$

$$1 \text{ D.O. }_{260} = 50\mu\text{g de DNA/ml} = 0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

La cantidad total de DNA (en μg) se calculó como sigue: $\mu\text{g totales de DNA} = [] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$. Además, la relación 260 nm/280 nm permitió conocer la cantidad de proteínas en la muestra considerando que la lectura a 280 nm, corresponde a la fracción proteica.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del exón 3 del gen *FLNA*

En todos los sujetos de estudio se realizó amplificación del exón tres del gen *FLNA* mediante PCR usando un par de oligonucleótidos que se diseñaron específicamente para tal exón, derivados de la secuencia normal del gen *FLNA* (GenBank no. NT_025965) y adquiridos en una casa comercial (Accesolab). En la tabla 2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos:

Exón	Secuencia de oligonucleótidos	Tamaño del producto de PCR (pb)	Temp. de alineación	MgCl ₂ (Mm)
3				
F	5'- CCAGAATCTGTTCCAGAGCG-3'	503	58° – 68° C	3
R	5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTCCT-3'			

Tabla 2.- Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para amplificar el exón 3 del gen *FLNA*. Se indica además el tamaño del amplicón, la temperatura de alineamiento y las concentraciones de cloruro de magnesio utilizadas para la amplificación del exón.

Cada oligonucleótido fue llevado a una concentración final de 100 µM con agua bidestilada.

Es importante señalar que se decidió amplificar inicialmente sólo el exón 3 del gen debido a que el cuadro clínico de la paciente sugería el diagnóstico de síndrome OPD I y las mutaciones causantes de síndrome OPD I sólo han sido identificadas en este exón.

Cada reacción de PCR se realizó en un volumen total de 50 µl contenidos en un microtubo de 200µl. Las concentraciones finales de las reacciones incluyeron: buffer 1x, 100-200 ng de DNA genómico, 0.2 mM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa, 1 mM de cada uno de los oligonucleótidos y 3 mM de MgCl₂. Cada exón fue amplificado utilizando una variante de la PCR llamada “PCR Touchdown”, que utiliza un intervalo decreciente de temperatura para el alineamiento, que en nuestro caso fue de 68°C a 58°C; el programa inicia con la temperatura más alta y disminuye 0.5°C cada ciclo hasta llegar a la temperatura más baja, de esta manera completa 20 ciclos; posteriormente realiza otros 20 ciclos a una temperatura específica de alineamiento, que en nuestro caso fue 58°C, completando así 40 ciclos de polimerización. De tal manera que el programa consistió en

un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por un 40 ciclos que comprendían una temperatura de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, 1 minuto para el alineamiento que oscilaba entre 58° a 68°C en los primeros 20 ciclos, y en los siguientes 20 permanecía a 58°C, la polimerización a 72°C durante 1 minuto y un ciclo final de polimerización a 72°C por 7 minutos. La figura 5 muestra las temperaturas y tiempos utilizados en cada fase de la PCR.

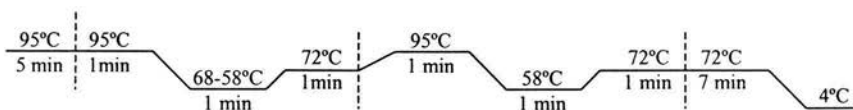


Fig. 5 Programa de temperaturas utilizado para la PCR

Electroforesis en gel agarosa

La electroforesis del DNA es el procedimiento que permite la migración de esta macromolécula a través de un campo eléctrico en un gel de agarosa, en base a su peso molecular. Debido a su carga negativa, el DNA migra desde el polo negativo hacia el polo positivo. Esta técnica permite detectar la presencia de productos amplificados por PCR mediante la visualización de una banda específica, así como la calidad de la muestra. En nuestro estudio los productos de amplificación del exón tres del gen *FLNA* se analizaron en geles de agarosa al 1.2% y se compararon con marcadores de peso molecular.

Para la preparación del gel de agarosa se realizó el siguiente procedimiento: se disolvieron 0.6 g de agarosa en 50 ml de TAE 1X (Tris, ácido acético glacial y EDTA) dentro de un matraz Erlenmeyer, se calentó la muestra en un horno de microondas hasta disolver completamente la agarosa, se restituyó el agua que se pierde por evaporación y

se agregó bromuro de etidio (0.625 mg/ml). la mezcla fue vaciada en un porta geles y una vez gelificado, se retiró el peine y se colocó en la cámara de electroforesis añadiéndose buffer TAE 1X hasta cubrir el gel. Se mezclaron 5 µl de colorante (azul de bromofenol) con los 50 µl del producto de PCR y se colocó cada una de las muestras en los pozos del gel, en uno de los pozos se colocaron 5 µl marcador de peso molecular de 100 pb que fue utilizado como referencia. Una vez llevada a cabo la electroforesis, se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta y se procedió a cortar la banda del producto amplificado.

Purificación de productos de PCR para secuenciación nucleotídica automatizada

Los fragmentos de PCR amplificados presentes en cada banda deben ser purificados antes de la reacción de secuencia para eliminar los excesos de dNTPs, oligonucleótidos, o enzima. Las bandas escindidas del gel se purificaron utilizando el kit QIAquick (QIAGEN). Inicialmente, se colocó cada banda de agarosa en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadieron 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen del gel. Se incubó la muestra a 50°C durante 10 minutos o hasta que se disolvió completamente la agarosa, mezclando el tubo cada 3 minutos para disolver la agarosa más rápido. Una vez disuelta la agarosa el buffer muestra un color amarillo, similar a su color original y se agrega un volumen de isopropanolol, la muestra se transfirió a una columna con una membrana semipermeable, la columna se colocó en un tubo de recolección y se centrifugó a 6000 rpm por 1 minuto, se desechó el filtrado. Se agregaron 0.75 ml de buffer PE a la columna para lavar y se centrifugó a 6000 rpm por 1 minuto desechando el filtrado. Se colocó la columna en un microtubo limpio de 1.5 ml y para eluir el DNA se agregaron 50 ml de

agua bidestilada y se centrifugó la columna a 13 000 rpm por 1 minuto. Una vez que se recuperó el DNA en el microtubo, se concentró mediante desecación en una centrifuga de vacío sin aplicar calor hasta alcanzar un volumen de 25 μ l.

Cuantificación del DNA purificado

Se realizó la cuantificación del producto de PCR recuperado (templado) mediante comparación con un estándar (DNA low mass ladder, GIBCO). Se preparó un gel de agarosa de 20 ml al 1.2% (procedimiento antes descrito). Se mezclaron 4 μ l del producto de PCR purificado con un 1 μ l de colorante y se colocó en cada pozo del gel para llevar a cabo la electroforesis. La estimación de la concentración de DNA en cada muestra se realizó por comparación de la intensidad de las bandas de los productos purificados con el estándar mencionado.

Secuenciación automatizada de los productos de PCR

Cada templado correspondiente al exón 3 se sometió a una nueva reacción de PCR en la que se utilizó el kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems), el cual contiene: dideoxinucleótidos marcados con fluorescencia (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs), tris-HCl (pH 9), MgCl₂ y ampliTaq polimerasa. Para esto se preparó una reacción de 20 μ l que contenía ~15 ng del templado de DNA, 4 μ l del kit Big Dye Terminator, 1 μ l del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 10 μ M y agua bidestilada para un volumen final de 20 μ l. En cada reacción, se utilizó un programa de 25 ciclos con los siguientes tiempos y temperaturas:

desnaturalización a 97°C por 30 seg, alineamiento a 50°C por 15 seg, y extensión a 60°C por 4 minutos.

Después de esta reacción de PCR se llevó a cabo la purificación de los productos de extensión con el fin de eliminar el exceso de ddNTPs marcados con fluorescencia. Este procedimiento fue realizado con columnas Centri Sep (Applied Biosystems) hidratadas por un periodo mínimo de 2 horas con 0.8 ml de agua bidestilada. Posteriormente las columnas fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 minutos para eliminar el exceso de agua. A continuación las columnas fueron colocadas en tubos de 1.5 ml y sobre el centro de la columna se añadieron los 20 µl del producto de PCR de secuencia. Las columnas fueron colocadas en un tubo receptor y centrifugadas 3 minutos a 3000 rpm. Finalmente, las muestras que se obtuvieron en cada tubo receptor fueron desecadas en una centrifuga de vacío. Posteriormente, las muestras fueron resuspendidas en 25 µl de amortiguador de carga TSR (Template supression reagent, Applied Biosystems) y se procedió a desnaturalizar cada muestra a 95°C durante 5 minutos en un termociclador. Finalmente, las muestras se analizaron en el equipo ABI Prism 310 (Applied biosystems) y se analizaron tanto la cadena sentido como la antisentido. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la secuencia normal publicada en la base de dato GeneBank (No. NT_025965)

La figura 6 resume la metodología utilizada en para la obtención de la secuencia del exón 3 del gen *FLNA*

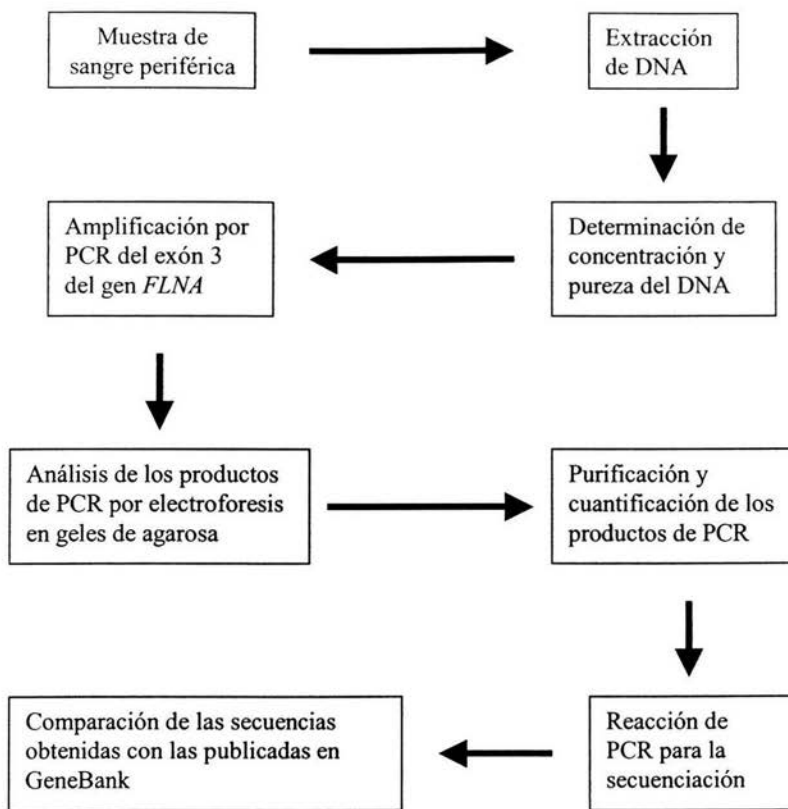


Fig. 6 diagrama de flujo de la metodología utilizada en la amplificación del exón 3 del gen *FLNA*

Análisis de la inactivación del cromosoma X

El patrón de inactivación del cromosoma X fue determinado utilizando la región polimórfica del gen del receptor de andrógenos, como fue descrito por Allen y cols. (1992). El gen del receptor de andrógenos contiene un repetido CAG altamente polimórfico en el primer exón. Se han correlacionado sitios de metilación cercanos a esta región microsatélite con la inactivación del cromosoma X y la metilación de estos sitios los hace resistentes al corte de las enzimas de restricción sensibles a metilación. Por lo

tanto sólo se obtiene el producto de PCR que deriva del cromosoma X metilado o inactivo. En las mujeres que son heterocigotas para la región polimórfica del repetido del receptor de andrógenos este ensayo permite distinguir el alelo materno del paterno e identificar el estado de metilación de cada uno de los dos alelos.

Amplificación y secuenciación del repetido polimórfico de CAG

Para confirmar el número de repetidos CAG de cada alelo del gen del receptor de andrógenos se realizó la amplificación del fragmento del exón 1 de este gen que contiene la región polimórfica del repetido CAG; se agregaron ~200 ng de DNA genómico a cada reacción de 50 µl, utilizando los oligonucleótidos previamente descritos (Allen *et al*, 1992): F 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCG-3' y R 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCT-3'; el programa de amplificación consistió en un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos con una desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, alineamiento a 60°C durante 1 minuto y polimerización a 72°C durante 1 minuto. Las muestras fueron purificadas y cuantificadas en geles de agarosa al 1.2% y secuenciadas en el equipo ABI Prism 310 (Applied biosystems) utilizando los mismos protocolos descritos en la sección anterior.

Análisis del estado de metilación del repetido polimórfico CAG

Se realizaron dos reacciones de manera paralela para cada una de las muestras de DNA: en la primera se realizó una digestión con 2 µg de DNA genómico, 20 U de *HpaII* (endonucleasa de restricción sensible a metilación), 2 µl del buffer de la enzima, y se aforó con agua bidestilada para obtener un volumen final de 20 µl; en la segunda se

incubaron 2 μg de DNA sólo con 2 μl del buffer de la enzima y se aforó con agua bidestilada hasta alcanzar un volumen final de 20 μl . Las reacciones se incubaron a 37°C por 12 horas en un termociclador, posteriormente la digestión se detuvo refrigerando las muestras a -20°C. De cada una de estas reacciones se tomaron 8 μl para una reacción de PCR con un volumen final de 50 μl (condiciones descritas anteriormente). Los productos obtenidos por PCR tuvieron una longitud aproximada de 280 pb, se purificaron y cuantificaron en geles de agarosa al 1.2%.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida permiten separar fragmentos de DNA con pocas pares de bases de diferencia, debido a que forman poros más pequeños que discriminan mejor las moléculas de DNA de acuerdo a su tamaño. El principio se basa en la carga negativa del DNA, de manera que generando un campo eléctrico la molécula de DNA migra del polo negativo hacia el polo positivo.

El producto purificado de la reacción de PCR descrita en la sección anterior fue sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15%; el gel fue preparado con 5 ml de la mezcla de 29:1 acrilamida/bisacrilamida, 1 ml de buffer TAE 5X, 20 μl de APS 10%, 10 μl de TEMED y 4 ml de agua bidestilada. Cada uno de los pozos fue cargado con 80 ng de DNA mezclados con 5 μl de buffer de carga, además en uno de los pozos se cargaron 5 μl de marcador de peso molecular. La electroforesis se realizó a 70 mV durante 7 horas, posteriormente el gel fue teñido con bromuro de etidio. Las bandas de DNA correspondientes a los diferentes alelos fueron medidas mediante densidad óptica

usando el software 1D Image Analysis de KODAK, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

RESULTADOS

Las características clínicas y radiológicas observadas en la paciente fueron compatibles con un diagnóstico de Síndrome Otopalatodigital tipo I. (Fig. 7)



a)



b)



c)



d)



e)



f)



g)



h)

Fig. 7. a) En cara se observa prominencia de las regiones supraciliares, puente nasal amplio y deprimido, punta de la nariz ancha, microstomía, comisuras bucales oblicuas hacia abajo. Estas características dan la apariencia de facies de "boxeador" b) Paladar blando hendido medial. c) y d) Acortamiento y ensanchamiento de los dedos de ambas manos. e y f) Acortamiento del primer orjejo de los pies bilateral, aumento del espacio entre los dedos 1 y 2 y entre 2 y 3 en ambos pies. g y h) Deformidad bilateral de los codos.

El estudio de audiometría confirmó la sordera conductiva bilateral. Las radiografías revelaron engrosamiento del hueso frontal y de la base del cráneo, ausencia de senos frontales, encurvamiento de huesos largos, crestas ilíacas hipoplásicas, acortamiento de las falanges distales de los dedos de manos y pies y ensanchamiento de las falanges distales de los primeros orjejos de pies y manos bilateral (fig. 8).



a)



b)



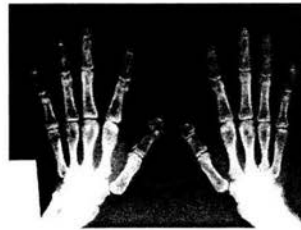
c)



d)



e)



f)



g)



h)

Fig. 8. a) y b) Radiografías AP y lateral de cráneo que demuestran ausencia de senos frontales, engrosamiento del frontal y de la base del cráneo, c) y d) radiografías de miembros superiores; se observa encurvamiento e irregularidad en la superficie de los huesos largos; e) radiografía AP de pelvis que muestra la hipoplasia de las crestas ilíacas; f) acortamiento de las falanges distales de todos los dedos y ensanchamiento de las falanges distales de los pulgares; g) y h) radiografías AP de pies donde se observa el acortamiento de las falanges distales en todos los ortejos y el especial ensanchamiento de las falanges distales de los primeros ortejos, en el cuarto y quinto ortejos, además de deformación de las falanges proximal y media.

La RMN no reportó datos de Heterotopía Nodular Periventricular y sólo se observó un ligero descenso de las amígdalas cerebelares a través del foramen magno. De acuerdo a los criterios radiológicos existentes, se considera una herniación de las amígdalas cerebelares cuando estas se encuentran con un descenso igual o mayor a 5 mm por debajo del foramen magno; el descenso que se encontró en la paciente fue menor a 5 mm por lo que no se consideró un dato patológico (fig. 9). Además, la paciente no presentaba síntomas como cefalea o pérdida del equilibrio

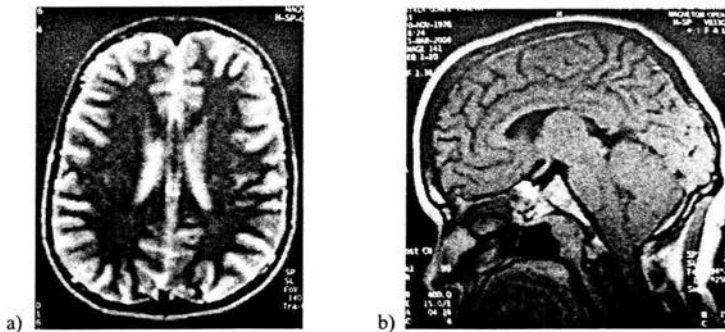


Fig. 9. RMN de cráneo. a) Corte axial de T2. No se observan datos de heterotopía nodular periventricular, b) Corte sagital se aprecia un descenso de las amígdalas cerebelares menor de 5 mm.

El estudio citogenético de alta resolución mostró un complemento cromosómico 46,XX,9qh+, lo cual corresponde a un cariotipo normal para un individuo del sexo femenino con un polimorfismo de heterocromatina del cromosoma 9, considerado una variante normal en la población (fig. 10).

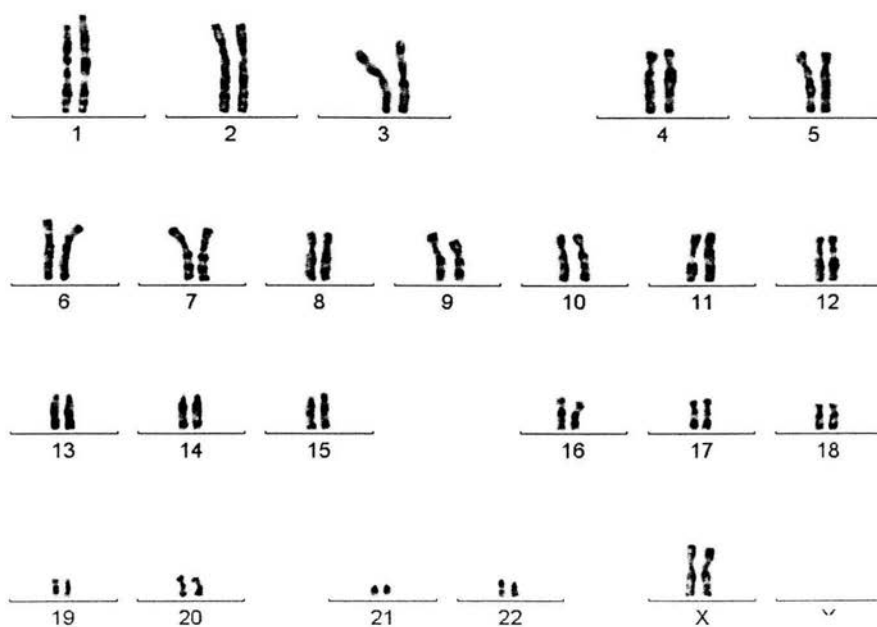


Fig. 10. Cariotipo mostrando un complemento cromosómico 46,XX,9qh+

Después de secuenciar el producto de PCR que abarcaba el exón 3 del gen *FLNA*, se identificó una mutación puntual en estado heterocigoto, que consistió en una transversión de G a T (fig. 11) en el nucleótido 607 (numeración basada en la secuencia N_025965 de GeneBank). Esta substitución resulta en un cambio de un residuo de ácido

aspártico (GAC) a uno de tirosina (TAC) y se designó como D203Y. El ácido aspártico es un aminoácido polar con carga negativa con un grupo lateral pequeño, en tanto que la tirosina es un aminoácido no polar que tiene un grupo lateral con un anillo aromático, lo que lo hace de mayor tamaño (fig 12). Este cambio se localiza en la región que codifica para el dominio de unión a actina de la Filamina A, dentro del dominio CHD II y no se encontró en el DNA de los padres de la paciente ni en 60 cromosomas de controles sanos de población mexicana.

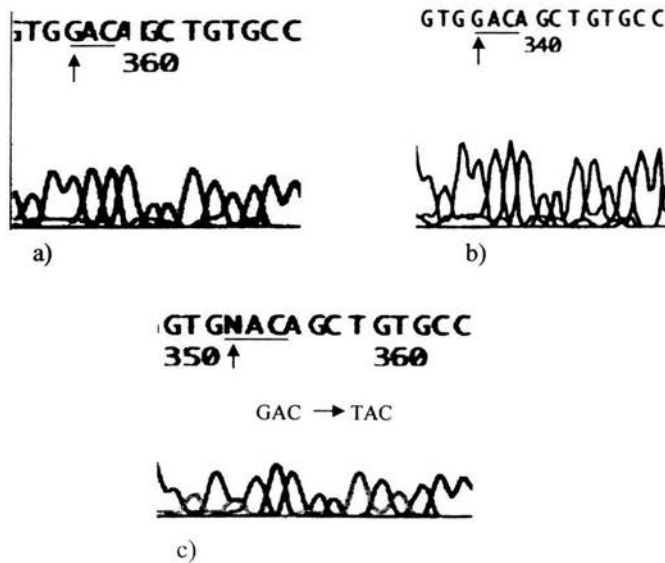


Fig. 11. a) y b).- Electroferograma parcial del exón 3 de los padres de la paciente mostrando el codón normal GAC (subrayado) y el nucleótido 607 (flecha). c).- Electroferograma parcial del exón 3 de la paciente señalando el codón GAC y el nucleótido 607 donde ocurre la transversión G → T, que resulta en el la formación del codón TAC en estado heterocigoto.

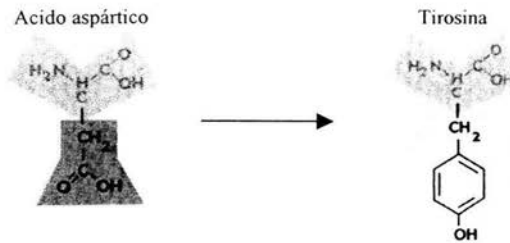


Figura 12. Representación de los aminoácidos ácido aspártico y tirosina

Esta mutación crea un sitio de corte para la endonucleasa de restricción *RsaI* (5'-GT↓AC-3') y genera dos bandas adicionales, una de 373 pb y otra de 130 pb correspondientes a la digestión de un producto de PCR de 503 pb del alelo mutado en la paciente (fig. 13).

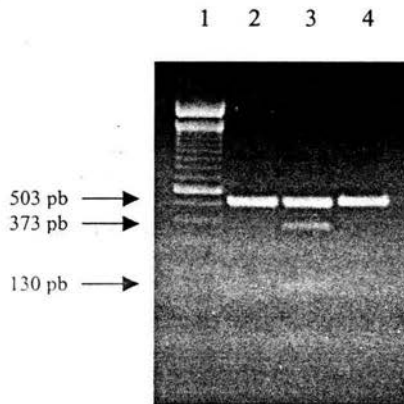


Fig. 13 Electroforesis de la digestión del producto de PCR del exón 3 con la enzima *RsaI*. Carril 1.- marcador de peso molecular. Carril 2.- madre de la paciente. Carril 3.- propósito, se observan dos bandas adicionales generadas por la digestión del alelo mutado. Carril 4.- padre de la paciente.

El análisis de la secuencia del repetido CAG del receptor de andrógenos reveló que la madre de la paciente era homocigota para una repetición de 23 CAGs; el alelo

paterno demostró un tracto de 28 repetidos. Por lo tanto, la paciente y su hermana no afectada son heterocigotas para el repetido polimórfico del receptor de andrógenos con 23 repetidos en un alelo y 28 en el otro (fig 14).

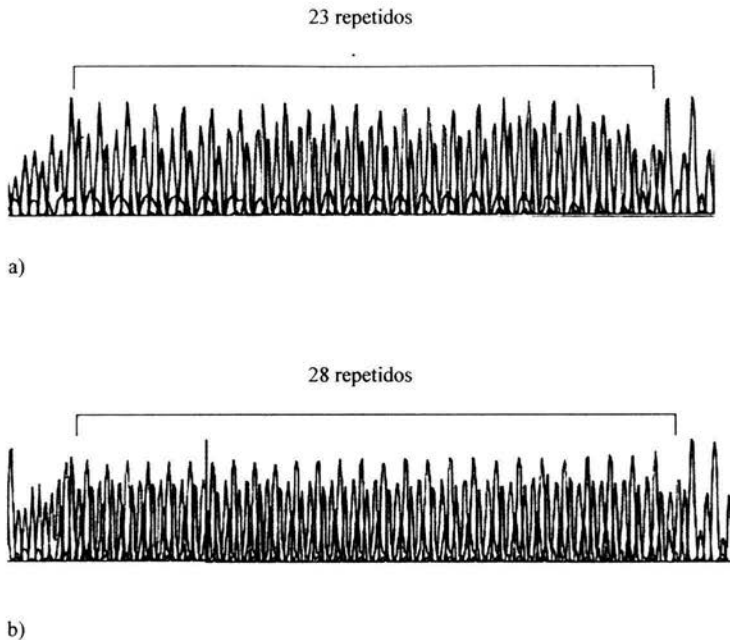


Fig. 14. a) Electroferograma parcial del primer exón del gen del receptor de andrógenos de la madre demostrando homocigosidad para un trinucleótido CAG de 23 repetidos, b) Electroferograma parcial del primer exón del receptor de andrógenos del padre mostrando hemicigosidad para un alelo de 23 repetidos de CAG.

El patrón de inactivación del cromosoma X fue determinado en la paciente y en su hermana sana, en las que se observó una diferencia de 15 pb entre ambos alelos del gen del receptor de andrógenos (repetido CAG). Como se muestra en la figura 15, antes de la digestión con la enzima *HpaII* no se encontró ninguna diferencia en la intensidad de

ambas bandas tanto en la paciente como en su hermana; sin embargo, después de la digestión, sólo se obtuvo producto de amplificación del alelo materno en el DNA de la paciente, sin evidencia de amplificación del producto del alelo paterno. Este resultado se obtuvo de manera constante después de repetir 4 veces el ensayo, utilizando templados nuevos en cada uno de ellos. Estos datos indican que existe un patrón de inactivación del cromosoma X extremadamente sesgado hacia el alelo materno en la paciente. En contraste, ambos alelos de la hermana sana no mostraron diferencias en la intensidad de las bandas después de la digestión con *HpaII*, lo que indica un patrón al azar de inactivación del cromosoma X. No se observó producto de amplificación después de la digestión del alelo del control masculino.

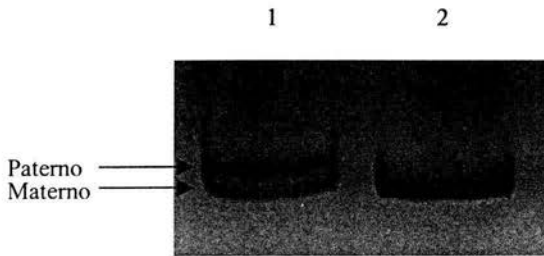


Fig. 15. Gel de poliacrilamida del ensayo de inactivación del cromosoma X. El carril 1 corresponde al ensayo sin digestión con *HpaII* y se observa amplificación de ambos fragmentos del exón 1 del gen del RA y a intensidades comparables; en el carril 2 amplificación después de la digestión con *HpaII*, demostrando ausencia de amplificación del alelo paterno e indicando que es el alelo activo (no metilado) y que existe una inactivación sesgado o preferencial hacia el alelo materno.

DISCUSIÓN

El síndrome OPD I es una osteodisplasia con un patrón de herencia dominante ligado al cromosoma X y causado por mutaciones en la proteína de citoesqueleto Filamina A. El gen *FLNA* esta localizado en Xq28, abarca más de 26 Kpb de DNA genómico y tiene 48 exones que codifican una proteína de 2647 aminoácidos. Las filaminas son una familia de proteínas de citoesqueleto que tienen la capacidad de organizar a los filamentos de actina en una disposición paralela o formando redes tridimensionales. Además, las filaminas sirven para unir varias proteínas transmembranales, entre ellas algunos receptores, con el esqueleto de actina y pueden servir como transductores de señales.

Los síndromes OPD I, OPD II, MNS, FMD son osteodisplasias ligadas al cromosoma X y se consideran variantes alélicas, debido a que clínicamente sus características se superponen y son ocasionadas por mutaciones en el mismo gen. En el presente estudio se describieron las características clínicas y moleculares en una paciente femenina con datos fenotípicos compatibles con el síndrome OPD I de ocurrencia esporádica. A pesar de que en algunas ocasiones es difícil hacer un diagnóstico diferencial basado únicamente en las características clínicas en las mujeres afectadas con síndrome OPD I u OPD II, en este caso el fenotipo es más compatible con el síndrome OPD I por otros datos presentes como retraso psicomotor leve, sordera conductiva, regiones supraciliares prominentes, base nasal amplia, ausencia de senos frontales y esfenoidales y un leve encurvamiento bilateral del fémur; por el contrario no se encontraron datos tales como deformidades de tórax que ocasionen dificultad respiratoria y encurvamiento severo de huesos largos relacionados al síndrome OPD II (Verloes *et al*, 2000). La presencia de paladar hendido en esta paciente, hallazgo muy raro en mujeres

afectadas, ilustra el amplio espectro fenotípico (heterogeneidad clínica) de este grupo de osteodisplasias.

La resonancia magnética de cráneo mostró sólo una ligera herniación de las amígdalas cerebelares, pero no mostró defectos en la migración neuronal. La herniación de las amígdalas cerebelares es causada por un desplazamiento caudal de las amígdalas cerebelares a través del foramen magno hacia el canal cervical. El criterio empleado para considerar una localización ectópica de las amígdalas cerebelares es cuando se encuentran desplazadas más de 5mm por debajo del borde del foramen magno (Furuya *et al*, 1998; Milhorat *et al*, 1999). En el caso de la paciente el descenso fue menor de 5mm y ella no refería sintomatología como pérdida del equilibrio o cefalea que pudiera estar relacionada a este descenso. Debido a que la mayor parte de los huesos del cráneo tienen una osificación membranosa, la cual se ha demostrado que se ve afectada en presencia de mutaciones en la filamina A, (Ogata T. *et al*. 1990), el leve descenso de las amígdalas que se presentó en la paciente, aunque asintomático, podría ser secundario a las alteraciones óseas de la base del cráneo, más que a un defecto embriológico primario, tal como se ha sido sugerido para otras displasia óseas (Gripp *et al*, 1997).

Hasta la fecha las mutaciones en la filamina A asociadas al fenotipo del síndrome OPD I han sido localizadas en 3 aminoácidos, el primero es el aminoácido 172, el cual sufre un cambio de un residuo de leucina por uno de fenilalanina; aunque ambos aminoácidos son neutros e hidrofóbicos, la fenilalanina contiene un anillo aromático que es un grupo de mayor tamaño y con menos probabilidades de formar enlaces, lo que alteraría de manera importante la unión de la filamina A con los filamentos de actina; el segundo cambio se situó en la posición 196, donde se substituyó un residuo de arginina

por uno de triptofano, involucrando el cambio de un aminoácido básico por uno neutro e hidrofóbico, que además tiene un grupo lateral grande que porta dos anillos aromáticos, por lo que es de esperarse una repercusión importante en la interacción con los filamentos de actina ocasionada por esta mutación. También se reportó una segunda mutación en esta misma posición en un varón con diagnóstico de síndrome OPD II, en el que el residuo de arginina fue substituido por un residuo de glicina, este último es un aminoácido neutro y polar, con un grupo lateral constituido por un solo átomo de hidrógeno. Sin embargo resulta interesante la diferencia fenotípica observada en este paciente masculino con síndrome OPD II a pesar de tratarse del mismo aminoácido. Estos datos dificultan la integración de una relación genotipo-fenotipo. El tercer cambio se observó en la posición 207, donde hubo una substitución de un residuo de prolina por uno de leucina, ambos aminoácidos están considerados dentro del grupo de los no polares e hidrofóbicos, sin embargo, la leucina tiene un grupo lateral de mayor tamaño, lo cual podría interferir con la unión a los filamentos de actina. En este caso, la mutación en el residuo de ácido aspártico ocurre en la posición 203, y es substituido por un residuo de tirosina, resultando en la presentación clínica del síndrome OPD I. Estos datos sugieren que los defectos génicos causantes de este padecimiento se encuentran agrupados en un mismo dominio de la proteína. El residuo de ácido aspártico en la posición 203 mutado en nuestra paciente se localiza en la hélice C del segundo dominio de homología a calponina (CHD2) dentro del dominio de unión a actina de la filamina A. Es un aminoácido que se encuentra altamente conservado entre la filamina B y la filamina C (Robertson *et al*, 2003). No se han reportado mutaciones en este residuo en ninguna de las otras proteínas que contienen dominios CHD tales como la filamina B, la distrofina, la

β -espectrina o la α -actinina-4. (Robertson *et al*, 2003; Krakow *et al*, 2004). Los dominios CHD están directamente involucrados en la unión a actina, cada uno de ellos contiene 4 α -hélices (A, C, E y G), las cuales están formadas por 11 a 18 aminoácidos (Van der Flier *et al*, 2001). Uno de los aspectos moleculares interesantes es que todas las mutaciones asociadas al síndrome OPDI que se han reportado hasta ahora se localizan en el dominio CHD2 de la filamina A (Robertson *et al*, 2003), lo que sugiere una correlación genotipo-fenotipo constante.

El análisis de inactivación del cromosoma X en mujeres con un alelo mutado del gen *FLNA* había demostrado que en las mutaciones causantes de heterotopía nodular periventricular no se observa un patrón de inactivación sesgado del cromosoma X. Sin embargo, las mutaciones causantes de los fenotipos relacionados al síndrome OPD I se asocian a una inactivación sesgada o preferencial del cromosoma X que porta el alelo mutado, principalmente en las pacientes que presentan un fenotipo más severo (Robertson *et al*, 2003). En este caso la paciente muestra un fenotipo característico del síndrome OPD I y un patrón de inactivación del cromosoma X sesgado de manera importante hacia el alelo materno, sugiriendo que este cromosoma es el portador del alelo mutado del gen *FLNA*. Actualmente se desconoce si el patrón de inactivación del cromosoma X extremadamente sesgado pudiera estar relacionado con el grado de variación fenotípica, particularmente con la presencia del paladar hendido en esta paciente, lo cual es muy raro en mujeres.

La mayor parte de las mutaciones en el gen *FLNA* asociadas a heterotopía nodular periventricular son mutaciones sin sentido que originan codones de alto prematuro, o en menor proporción pequeñas deleciones o inserciones que corren el marco de lectura, y

ocasionan formas truncadas de la proteína, sugiriendo que la pérdida de función de la filamina A ocasiona la falla de la migración neuronal (Sheen *et al*, 2001). Por otra parte, todas las mutaciones que se han encontrado relacionadas al espectro del síndrome OPD I son mutaciones de sentido equivocado o pequeñas deleciones en las que se conserva el marco de lectura y que parecen estar agrupadas en dominios específicos de la proteína (Robertson *et al*, 2003). Por esta razón se ha propuesto que las entidades relacionadas al síndrome OPD I se deban a una ganancia de función de la proteína mutada. En el presente caso la mutación da lugar al cambio de un residuo de ácido aspártico (Asp), aminoácido pequeño y con carga negativa, por un residuo de tirosina (Tyr), que es un aminoácido grande con un grupo aromático no polar. El resultado esperado es que se altere la capacidad de la filamina A de unirse a los filamentos de actina por una disrupción de las interacciones entre las α -hélices del segundo dominio CHD. Por otro lado, debido a que la filamina A está sujeta a una estricta regulación mediante reacciones de fosforilación y defosforilación que determinan su localización subcelular y unión tanto a actina como a receptores de membrana (Wang *et al*, 1996), es posible que la mutación Asp203Tyr genere un nuevo sitio de fosforilación que modifique la capacidad de unión a actina de la filamina A, así como su papel en la transducción de señales.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Allen R.C. *et al.* (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(6):1229-39
- ❖ Biancalana V. *et al.* (1991) Oto-palato-digital síndrome type I: further evidence for assignment of the locus to Xq28. *Hum Gen.* 88: 228-230
- ❖ Corona Rivera J.R. *et al.* (1999) Infant with manifestations of oto-palato-digital syndrome type II and Melnick-Needles syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 85: 79-81
- ❖ Fitch N. *et al.* (1976) A familial syndrome of cranial, facial oral and limb anomalies. *Clin. Gen.*, 10:226
- ❖ Fox J.W. *et al.* (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* 21: 1315-1325
- ❖ Furuya K. *et al.* (1998) Symptomatic tonsillar ectopia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 64(2):221-6.
- ❖ Gorlin R.J. *et al.* (1969) Frontometaphyseal dysplasia: A new Syndrome. *Am J Dis Child* 118: 487-494
- ❖ Gorlin R.J. *et al.* *Syndromes of the head and neck.* 4a edición. Ed. Oxford. USA 2001, pp 292-294, 339-343, 844-849
- ❖ Gripp K.W. *et al.* (1997) Chiari malformation and tonsillar ectopia in twin brothers and father with autosomal dominant spondylo-epiphyseal dysplasia tarda. *Skeletal Radiol.* 26(2):131-3.

- ❖ Hall C.M. *et al.* (2002) International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am J Med Gen* 113:65-77
- ❖ Hoar D.I. *et al.* (1992) Tentative assignment of gene for otopalatodigital syndrome to distal Xq (q26-q28). *Am J Med Gen* 42: 170-172
- ❖ Holder S.E. *et al.* (1995) Otoplatodigital syndrome type II. *J Med Gen* 30:510-515
- ❖ Hoo J.J. *et al.* (1991) Tentative assignment of gene for oto-palato-digital syndrome to distal Xq (q26-q28). *Adv Gene Technol* 1:11
- ❖ Kosho T. *et al.* (2002) Refined mapping of the gene for otopalatodigital syndrome type I. *J Med Gen* 39: E7
- ❖ Krakow D. *et al.* (2004) Mutations in the gene encoding filamin B disrupt vertebral segmentation, joint formation and skeletogenesis. *Nat Genet* 36(4):405-10
- ❖ Kornak U. *et al.* (2003) Genetic disorders of the skeleton: A developmental approach. *Am J Hum Genet* 73:447-474
- ❖ Milhorat T.H. *et al.* (1999) Chiari I malformation redefined: clinical and radiographic findings for 364 symptomatic patients. *Neurosurgery* 44(5):1005-17.
- ❖ Moro F. *et al.* (2002) Familial periventricular heterotopia. Missense and distal truncating mutations of the *FLN1* gene. *Neurology* 58, 916-921
- ❖ Nishimura G. *et al.* (1997) Atypical skeletal changes in otopalatodigital syndrome type II: Phenotypic overlap among otopalatodigital syndrome type II, Boomerang dysplasia, atelosteogenesis type I and type III, and lethal male phenotype of Melnick-Needles syndrome. *Am J Med Gen* 73: 132-138

- ❖ Ogata T. *et al.* (1990) Oto-palato-digital síndrome, type II: Evidence for defective intramembranous ossification. *Am J Med Gen* 36: 226-231
- ❖ Pazzaglia U.E. *et al.* (1986) Oto-palato-digital syndrome in four generations of a large family. *Clin Genet* 30(4):338-44
- ❖ Poznanski AK. *et al.* (1974) Otopalatodigital syndrome: Radiologic findings in the hand and foot. *Birth Defects* 10 (5): 125-149
- ❖ Robertson, S.P. *et al.* (1997) Are Melnick-Needles syndrome and Otopalatodigital syndrome type II allelic? Observations in a four generation kindred. *Am J Med Gen* 71: 341-347
- ❖ Robertson, S.P. *et al.* (2001) Linkage of otopalatodigital syndrome type 2 (OPD2) to Distal Xq28: Evidence for allelism with OPD1. *Am J Hum Genet* 69: 223-228
- ❖ Robertson S.P. *et al.* (2003) Localized mutations in the gene encoding the cytoskeletal protein filamin A cause diverse malformations in humans. *Nat Gen* 33: 487-491
- ❖ Sheen V.L. *et al.* (2001) Mutations in the X-linked filamin 1 gene cause periventricular nodular heterotopia in males as well as in females. *Hum Mol Gen* 10: 1775-1783
- ❖ Sheen V.L. *et al.* (2002) Filamin A and Filamin B are co-expressed within neurons during periods of neuronal migration and can physically interact. *Hum Mol Gen* 11;23: 2845-2854
- ❖ Suzumura H. *et al.* (1998) Hypoplasia of the transverse sinus in Oto-Palato-Digital syndrome type I. *Am J Med Gen* 79: 401-402

- ❖ Superti-Furga A. *et al.* (1987) Fronto-metaphyseal dysplasia and the otopalatodigital syndrome. *Dysmorphol Clin Genet* 1: 2-5
- ❖ Superti-Furga A. *et al.* (2000) Otopalatodigital syndrome and Frontometaphyseal dysplasia, splitters and lumpers, and paternity of ideas. *Am J Med Gen* 95:86
- ❖ Takato T. *et al.* (1985) Otopalatodigital síndrome. *Ann Plas Surg* 14: 371-374
- ❖ Taybi H *et al.* (1962) Generalized skeletal displasia with multiple anomalies. A note on Pyle's disease. *Am J Roentgenol* 88, 450-457
- ❖ Van der Flier A. *et al.* (2001) Structural and functional aspects of filamins. *Biochim Biophys Acta* 1538: 99-117
- ❖ Verloes A. *et al.* (2000) Fronto-otopalatodigital osteodysplasia: clinical evidence for a single entity encompassing Melnick-Needles syndrome, otopalatodigital syndrome types 1 and 2, and frontometaphyseal dysplasia. *Am J Med Gen* 90: 407-422
- ❖ Vincent A. *et al.* (1989) A new polymorphic marker very closely linked to DXS52 in the q28 region of the human X chromosome. *Hum Gen* 82: 85-86
- ❖ Wang Q. *et al.* (1996) Filamin translocation is an early endothelial cell inflammatory response to bradykinin: regulation by calcium, protein kinases, and protein phosphatases. *J Cell Biochem* 62(3):383-96.
- ❖ Zenker M. *et al.* (2004) A dual phenotype of periventricular nodular heterotopia and frontometaphyseal dysplasia in one patient caused by a single *FLNA* mutation leading to two functionally different aberrant transcripts. *Am J Hum Genet* 74: 731-737