



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ

**Determinación de la Frecuencia del Alelo TWIST2 en  
el Síndrome Blefarofimosis-Ptoxis-Epicanto Inverso**

**TESIS DE POSGRADO**

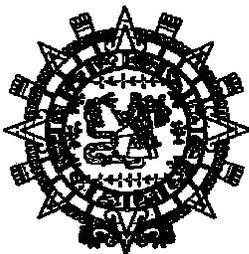
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
SUBESPECIALISTA EN CIRUGÍA PLÁSTICA  
Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA:

DR. MARIO HECTOR MUCHARRAZ DÍAZ

TUTOR:

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA



MÉXICO D.F.

AGOSTO 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Dr. Octavio Sierra Martínez.  
Director de Enseñanza.

Dr. Alfonso Galván Montaña.  
Director de Investigación

Dr. Fernando Molina Montalvo  
Jefe de la División de cirugía Plástica Reconstructiva  
Asesor de Tesis

Dra. Rita Valenzuela Romero  
Jefa de la División de Enseñanza de Pregrado y Postgrado

## **Agradecimientos**

Al Hospital General Dr. Manuel Gea González por ser una parte fundamental en mi desarrollo profesional

A todos mis maestros del Departamento de Cirugía Plástica y Reconstructiva por compartir su experiencia y conocimientos

Al Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad en especial a M en C Mirza Romero Valdovinos y a la Dra. Maria Angelica Olivo Díaz por su apoyo y paciencia para la realización de este trabajo

A mis compañeros residentes por haber hecho de estos tres años una experiencia inolvidable

## **DEDICATORIAS**

A mis padres por todo su amor, dejarme alcanzar mis sueños y ser los mejores padres que alguien puede tener

A mis abuelos por haber hecho de mi vida algo maravilloso y estar siempre a mi lado aun cuando ya no los tengo

A mi hermana por su paciencia y cariño

A Yamile por ser el amor de mi vida

## INDICE

Índice.....	5
Antecedentes.....	6
Planteamiento del Problema.....	8
Justificación.....	9
Objetivo.....	9
Hipótesis.....	9
Diseño.....	10
Materiales y Método.....	10
Resultados.....	14
Discusión.....	17
Bibliografía.....	19

## **ANTECEDENTES.**

La blefarofimosis o síndrome blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso, es un padecimiento genético raro y que puede ocurrir de forma esporádica o con patrón hereditario autosómico dominante. Se cree que es consecuencia de defectos genéticos actuando sobre la orbita y el párpado durante la embriogenesis. Existen dos formas de este padecimiento: el tipo I donde existe una malformación compleja del párpado y la orbita asociado a falla ovárica temprana y el tipo II donde el defecto del párpado y la orbita ocurren de forma aislada. La blefarofimosis fue reportada por primera vez en 1841 por Von Ammon, la triada de blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso en 1889 por Vignes y el reconocimiento como síndrome fue hecho por Kohn. Por lo general ambos lados de la cara están afectados aunque no de forma simétrica. Algunas otras alteraciones presentes son telecanto, desplazamiento de la salida del conducto lagrimal, párpado superior en forma de S, lagofthalmos, ectoprion, nistagmus, microoftalmia, amblioplia, estrabismo e hipoplasia de la caruncula además de las anomalías en la orbita. Este padecimiento se había rastreado al cromosoma 3q23, sin embargo por medio de un estudio de enlace se encontró que esta patología esta también asociada al cromosoma 7p21-p13.

El gen TWIST codifica un factor de transcripción de la familia de proteínas básicas hélice-asa-hélice, y se cree que es un regulador río arriba de los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFRs), además de que tiene un papel importante en la morfogénesis del tubo neural craneal y la diferenciación las células mesodérmicas. Las mutaciones en este gen a sido relacionado con las creneosinostosis sindrómicas mayores como Apert, Crouzon, Pfeiffer y mas estrechamente con el síndrome de Saethre-Chotzen.

Estas patologías son mas comunes que la blefarofimosis y es la asociación del gen TWIST, el cromosoma 7, el Síndrome de Saethre-Chotzen con el hallazgo del involucro de este cromosoma con la blefarofimosis lo que despertó el interés de conocer si en efecto existen mutaciones del gen TWIST en nuestros pacientes con blefarofimosis.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

¿Las mutaciones en el gen TWIST, causa de las craneosinostosis sindromáticas, juega un papel en el desarrollo de la blefarofimosis?

## **JUSTIFICACIÓN.**

La blefarofimosis presenta malformaciones que causan inconformidades estéticas importantes así como algunas implicaciones funcionales. El manejo de estos pacientes, aun en manos expertas, es un reto debido a su complejidad y resultados variables. La etiología exacta del síndrome blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso, continúa siendo una interrogante. Aunque se ha observado que en el caso de craneosinostosis sindrómica una sola mutación puede ser la responsable. Por lo que consideramos de suma importancia éstos estudios para esclarecer la asociación de mutaciones en estos genes para que se presente éste padecimiento.

## **OBJETIVO.**

Identificar la presencia del alelo ins 308A gen TWIST2 en pacientes con blefarofimosis y la asociación de este gen en dicho padecimiento.

## **HIPÓTESIS.**

Si las mutaciones en el gen TWIST están presentes como causa de las craneosinostosis sindromáticas, entonces éstas mutaciones se encontrarán con mayor frecuencia en la población afectada por el síndrome blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso .

## **DISEÑO.**

Se trata de un estudio descriptivo, abierto, observacional, prospectivo y transversal.

## **MATERIALES Y MÉTODO.**

Universo de estudio.

Pacientes con blefarofimosis, conocidos del Servicio de Cirugía Plástica y Reconstructiva del hospital Dr. Manuel Gea González durante los últimos 10 años.

Número total de casos del estudio = 8

y 24 controles de población sana que acudió al banco de sangre

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio:  
Secuencial.

Características del grupo control y del (los) grupo(s) experimental(es)

Un grupo lo forman los pacientes afectados y otro, pacientes sanos tomados de la población general

. Criterios de selección:

Personas que presenten blefarofimosis.

. Criterios de Inclusión.

Pacientes con blefarofimosis, que acudan al servicio de cirugía plástica y reconstructiva y acepten participar en el estudio.

Criterios de exclusión.

Pacientes con alguna enfermedad, síndrome o condición concomitante que pueda alterar los resultados del estudio. Pacientes y familiares que no deseen participar

en el estudio..

Criterios de eliminación.

Aquellos pacientes de los que no se pueda obtener una muestra de sangre para la extracción de DNA.

Definición de variables

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Blefarofimosis Sexo Edad	Nominal: SI, NO	Mutaciones Alelos del gen twist	Nominal: SI, NO

Descripción de procedimientos.

### SELECCIÓN DE PACIENTES.

Todos los pacientes casos serán valorados por un cirujano plástico y por un genetista para establecer el diagnóstico clínico de blefarofimosis y descartar una condición sindromática.

Todos los pacientes del grupo control serán valorados por cirujano plástico y por genetista para confirmar que no sean portadores de craneosinostosis así como de ningún síndrome.

### TOMA DE MUESTRAS.

A todos los pacientes se les tomará una muestra de 3 ml de sangre periférica con técnica estéril, en tubos con EDTA. Éstos serán procesados para extracción de

ADN y análisis genético en el laboratorio de biología molecular e histocompatibilidad de la dirección de Investigación del Hospital por los mismos investigadores en todos los casos, tanto en los pacientes del grupo de casos como en los del grupo control, de manera ciega.

### ANÁLISIS GENÉTICO.

Obtención de DNA (22, 23): Se tomarán de cada sujeto, 3 ml de sangre periférica, con EDTA como anticoagulante. Se obtendrá el paquete de leucocitos por centrifugación a 1,600 xg a 4<sup>0</sup>C, durante 15 min. Se obtendrá el paquete de leucocitos. Los eritrocitos se eliminarán con dos o tres lavados de 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, centrifugando cada vez a 1,600 xg a 4<sup>0</sup>C durante 15 min, hasta obtener el paquete de leucocitos libre de eritrocitos. El paquete se tratará con: 50 mM NaCl; 10 mM EDTA, pH 8.0; 10 mM Tris-HCl, pH 7.6; 0.2% SDS; 300 µg/ml proteinasa K y se incubará durante 12 h a 53<sup>0</sup>C.

El DNA se extraerá dos veces con fenol equilibrado (v/v), dos con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (v/v) y dos con cloroformo alcohol isoamílico (24:1) (v/v). En cada extracción se agitará suavemente la mezcla hasta su homogeneización y se centrifugará durante 15 min a 4<sup>0</sup>C. El DNA será precipitado con 100 mM final de NaCl y un volumen de isopropanol. Una vez precipitado, se lavará con etanol al 70%, se dejará secar y se resuspenderá en 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0).

Cuantificación del DNA. El DNA extraído de cada sujeto se diluirá 1:100 y se leerá a 240 nm, 260 nm y 280 nm. La concentración del DNA se calculará tomando la lectura a 260 nm X la dilución X 50 (coeficiente de extinción molar del DNA). La

pureza se verificará haciendo las relaciones de las lecturas a 260/240 y 260/280, que deben estar entre 1.7 y 2.0.

Se analizará la presencia de la mutación ins A en la posición 308 del gen twist 2:

Gen TWIST localizado en el cromosoma fwd 5'-CAAGAAGTCTGCGGGCTGTG-3' y rev 5'-AATCGAGGTGGACTGGGAACCG-3' con 512-bp.

Verificación de la amplificación por electroforesis en gel de agarosa.

Los productos de amplificación se analizarán en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (10 µg/µL)

Con la ayuda del transiluminador deberá observarse una sola banda cuyo tamaño debe corresponder al indicado en el párrafo anterior .

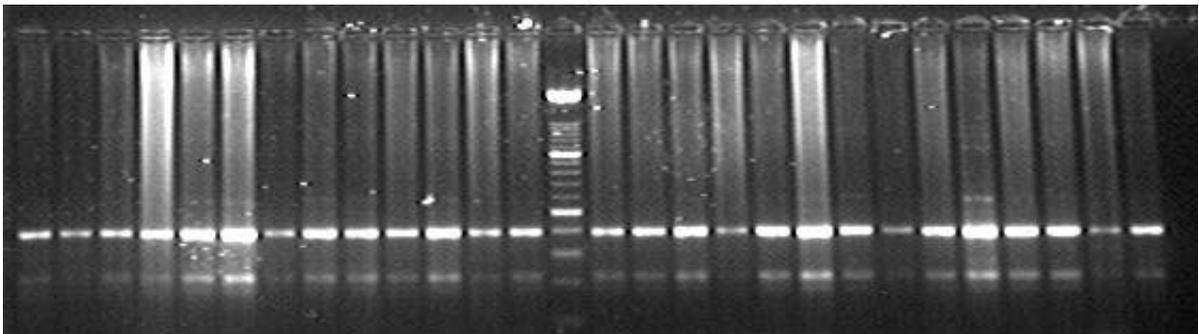
El método de RFLP (fragmentos polimórficos de longitud variable) consiste en identificar un alelo específico digiriendo el DNA con la endonucleasa Tru 9 que reconoce sitios restringidos del DNA, que dan lugar a fragmentos de diferentes tamaños. Estos fragmentos se separan por electroforesis en agarosa al 3%. Las bandas se harán evidentes por tinción con bromuro de etidio.

## Resultados

### Amplificación del alelo del gen TWIST2-

Todas las muestras de DNA de los pacientes con blefarofimosis, así como los testigos correspondientes de cada grupo, se amplificaron con el par de iniciadores. En las figuras se observan las bandas obtenidas de algunas de las amplificaciones de la región 308 TWIST2 con un tamaño de 512 pb, lo cual confirma que la amplificación específica de la región se llevó a cabo.

Fig 1:



B1 B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 T1 T2 T3 T4 T5 PM T6 T7 T8 T9 T10 T11 T12 T13 T14 T15 T16 T17 T18 T19

Se Muestran las amplificaciones de los pacientes de blefarofimosis B con un número consecutivo, PM (100pb Roche) y los testigos T con un número consecutivo.

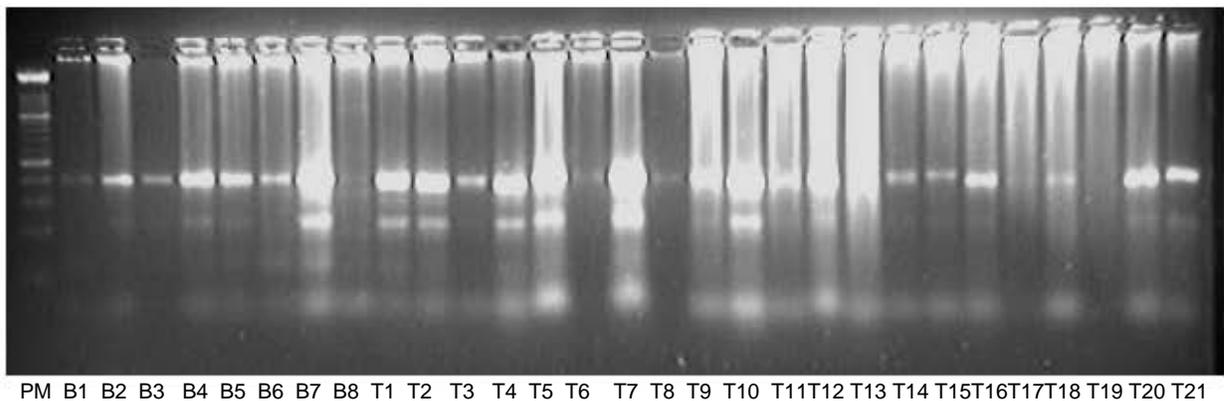
## Digestiones de los alelos del gen TWIST2-

Para determinar los alelos de la población, todos los productos de la PCR se digirieron con endonucleasas de restricción especificas (Tru9) y los productos de la digestión se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Para determinar los alelos de la población, todos los productos de la PCR se digirieron con endonucleasas de restricción especificas (Tru9) y los productos de la digestión se analizaron por medio de electroforesis en geles de agarosa.

Se muestran geles representativos de la amplificación de la región que contiene la mutación

Fig 2: Digestiones de los alelos del gen TWIST2



Se Muestran las digestiones de los productos de PCR con la endonucleasa Tru 9 PM (100pb Roche), los pacientes de blefarofimosis B con un número consecutivo y los testigos T con un número consecutivo.

## Genotipos y alelos-

Los resultados de los experimentos anteriores permitieron identificar el tipo de genotipo de cada paciente y testigo de blefarofimosis, para cada región polimorfica. A partir de estos datos se calcularon las frecuencias genotípicas y alélicas correspondientes para cada polimorfismo.

TABLA 1: Frecuencia Genotípica

Genotipo	Pacientes	Testigos
	FG %	FG %
Twist 1/1	10.00	31.82
Twist ½	0.00	0.00
Twist 2/2	90.00	68.18

Tabla 2: Frecuencia Alélica

Genotipo	Pacientes	Testigos
		56.25
twist insA 1		43.75
Twist ins A 2		34.0909091

Análisis estadístico:

El análisis estadístico de los alelos y genotipos realizadas con prueba de Yates y chi cuadrada no mostraron diferencias significativas entre los pacientes afectados con blefarofimosis y la población sana.

## **Discusión**

Las variantes génicas o SNPs heredadas en la secuencia de DNA, contribuyen a la variación fenotípica, influenciando las características antropomórficas individuales, la respuesta al medio ambiente y el riesgo a enfermedades. Con la secuenciación del genoma humano, se ha visto que del 0.1% de variación que separa a un individuo de otro, la mayoría proviene de los SNPs. A través del análisis del genoma humano se han identificado variaciones en genes relacionadas con enfermedades, lo cual ha abierto la posibilidad de identificar las variantes genéticas de diferentes poblaciones humanas, asociar su presencia con fenotipos individuales, incluyendo susceptibilidad a enfermedades y determinar el impacto funcional de la variación. Son pocos los padecimientos en los que la mutación de un sólo gen es suficiente para causar la enfermedad. La mayoría de las enfermedades tienen una arquitectura genética compleja, en la que se involucra más de un gen. La asociación de SNPs con enfermedades tiene un gran potencial para la aplicación clínica directa, al proporcionar más y nuevos marcadores genéticos específicos para su uso en el diagnóstico y como posibles blancos terapéuticos

Un ejemplo de lo anterior es el gen TWIST el cual junto con otros genes como

el FGFR, FOX, HOXA etc. Pueden causar por si solos con una simple mutación síndromes de craniosinostosis como Apert, Crouzon, Pfeiffer, Sathre-Chotzen entre otros.

Dado que el gen TWIST es un regulador de otros genes surgió la hipótesis de si era factible que dicho gen jugara un papel importante en la etiología del síndrome blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso el cual es una patología mucho más rara que las anteriores.

Los resultados del presente estudio no arrojaron diferencias significativas con el resto de la población general, esto muy probablemente al numero reducido de pacientes afectados. Es necesario reunir una muestra mayor de estos pacientes aunque debido a la rareza de la patología, juntar un numero mayor de pacientes tomara bastante tiempo.

Este estudio muestra la población de pacientes con blefarofimosis del Departamento de Cirugía Plástica del Hospital General Dr. Manuel Gea González y que en ellos no hay una clara evidencia de que el gen TWIST sea causa de esta patología. Sin embargo esto puede cambiar si se logra capturar un numero mayor de pacientes. También abre la posibilidad para buscar otros genes que pudieran estar mas íntimamente relacionados con la blefarofimosis.

Perspectivas: Se pretende aumentar el tamaño de la muestra con un mayor número de pacientes y testigos, así como estudiar otros SNP's en genes que ya se han observado que están involucrados en Craneosinostosis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.-Zeiger J, Beaty T, Hetmanski J, et al. **Genetic and Environmental Risk Factors for Sagittal Craniosynostosis.** *J Craniofac Surg.* 2002;13(5):602-606.
- 2.-Lajeunie E, Le Merrer M, Bonaiti-Pellie C, et al. **Genetic Study of Scaphcephaly.** *Am J Med Genet.* 1996;62:282-285.
- 3.- Park WJ, Bellus GA, Jabs EW. **Mutations in Fibroblast Growth Factor Receptors: Phenotypic Consequences During Eukariotic Development.** *Am J Hum Genet.* 1995;57:748-754.
- 4.- De Baere, D., Dixon, M.J., et al. **Spectrum of FOXL2 Mutations in Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus Inversus Families Demonstrates a Genotype-Phenotype Correlation** *Hum Mol Gen* 2001 10(15): pp 1591-1600
- 5.- Anderson, P.J. et al. **Somatic FGFR and TWIST Mutations are not a Common Cause of Isolated Nonsyndromic Single Suture Craniosynostosis** *Journ Craniofac Surg* 2007; 18(2): pp 312-314
- 6.- Taylor, A. et al. **Blepharophimosis-Ptoxis-Epicanthus Inversus Syndrome: Objective Analysis of Surgical Outcome in Patients from a Single Unit** *Clin&Exp Oph* 2007; 35(5): pp 262-269
- 7.- Yoshida, T. et al. **TWIST is Required for Establishment of the Mouse Coronal Suture** *J Anat* 2005; 206(4): pp 437-444
- 8.- de Heer, I.M. et al. **Genetic and Clinical Analysis of Patients with Saethre-Chotzen Syndrome** *Plast & Recons Surg* 2005; 115(7): pp 1894-1902
- 9.- de Heer, I.M. et al. **Deletion of the TWIST Gene in a Five Generation Family** *Clin Genet* 2004; 65(8): pp 396-399
- 10.- Kosaki, R. et al. **Deletion Involving the TWIST Locus and the HOXA Cluster: A Contiguous Gene Syndrome on 7p?** *Cong Anom* 2005; 45(2): pp 35-38 .