



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

BIOQUÍMICA CLÍNICA

**"ESTUDIO DE LOS GENES ASOCIADOS A DAÑO  
CARDIOVASCULAR EN PACIENTES CON SÍNDROME DE MARFÁN"**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**Q.F.B. VANESSA LÓPEZ PÉREZ**

TUTOR:

**DR. RICARDO GAMBOA ÁVILA**

México, D.F. Junio 2016



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: DR. SAMUEL CANIZALES QUINTERO**

**SECRETARIO: DR. ADRIÁN OCHOA LEYVA**

**VOCAL: DR. RICARDO GAMBOA ÁVILA**

**VOCAL: DRA. CLAUDIA HUESCA GÓMEZ**

**VOCAL: DR. MIGUEL ANGEL PEÑA RICO**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA “IGNACIO CHÁVEZ”**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Ricardo Gamboa Ávila**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. Claudia Huesca Gómez**

**SUSTENTANTE:**

**Vanessa López Pérez**



**Este trabajo fue realizado en la Unidad de Fisiología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" en la Ciudad de México, en conjunto con el Centro de Genética Médica del Hospital de la Universidad de Ambéres, Bélgica**

*Life is essentially a cheat and its conditions are those of defeat; the redeeming things are not happiness and pleasure but the deeper satisfactions that come out of struggle.*

**F. Scott Fitzgerald**

## **Agradecimientos**

A Dios, por disponer de todo aquello y a todos quienes me permitieron estar aquí, donde debo estar.

A mis ejemplos de vida, mis padres, ustedes son los pilares de mi fuerza y la luz de mi corazón.

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, fuente de sabiduría y testigo de voluntad, constancia y sacrificio, gracias por forjar mi futuro y persona.

A los profesores Bart Loeys, Lut van Laer y Josephine Meester de la Universidad de Amberes, por abrirme las puertas a sus instalaciones y brindarme su total respaldo. Sin ustedes este trabajo no hubiera sido posible.

A cada uno de los maestros que dieron su tiempo y esfuerzo para transmitir su experiencia y conocimiento a las futuras generaciones, gracias por contagiar su dedicación y pasión.

A la Dra. Claudia Huesca Gómez y al Dr. Ricardo Gamboa Ávila, quienes no solo me ofrecieron su apoyo y paciencia, sino también su amistad, gracias por creer en mí.

En especial quisiera agradecer a Rubén Reyes Salgado por su infinito apoyo y cariño, a Valeria López por sus inigualable folklore, a Denisse Cobos y Dan Carrier por dejarme unir a sus aventuras y a Raphaël De Ridder y su familia por alegrar y hacer más cálidos mis días.

***Para mi familia***

## Contenido

1. Índice de figuras, gráficas y tablas.....	10
2. Resumen.....	11
3. Abstract.....	13
4. Abreviaturas.....	14
5. Introducción.....	19
5.1. Genética del Síndrome de Marfán.....	20
5.2. FBN1.....	22
5.3. Patología.....	25
5.4. Herencia.....	29
5.5. Penetrancia.....	30
5.6. Características físicas y clínicas.....	30
5.7. Diagnóstico.....	32
5.7.1. Diagnóstico diferencial.....	34
5.8. Tratamiento.....	35
5.9. Correlaciones genotipo – fenotipo.....	36
6. Justificación.....	38
7. Hipótesis.....	39
8. Objetivo principal.....	40
8.1. Objetivos secundarios.....	40
9. Metodología.....	42
9.1. Tamaño de la muestra.....	42
9.2. Población de estudio.....	42
9.3. Toma de muestra.....	43
9.4. Extracción y Control de Calidad de DNA genómico.....	43
9.5. HRM.....	44
9.5.1. Diseño de cebadores.....	44
9.6. Selección de exones a analizar.....	45
9.7. Secuenciación de DNA tipo Sanger.....	47
9.8. Secuenciación masiva.....	48
9.8.1. NGS y Análisis de Datos.....	51
9.9. Recolección de variables y construcción de base de datos.....	53

9.10.	Análisis Estadístico .....	54
10.	Resultados .....	56
10.1.	Tamaño de la muestra .....	56
10.2.	Características de la población de estudio .....	57
10.3.	Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	60
10.4.	HRM.....	61
10.5.	Secuenciación masiva.....	62
10.5.1.	Clasificación de variantes genéticas.....	63
11.	Análisis de Resultados .....	65
12.	Conclusiones.....	69
13.	Anexo 1. Técnicas Utilizadas .....	70
1.12.	Extracción de DNA por equipo comercial .....	70
1.13.	Purificación de DNA por equipo comercial .....	71
1.14.	Secuenciación de DNA .....	73
1.15.	Purificación de productos amplificados.....	74
1.16.	Reacción de secuenciación.....	74
1.17.	Sistema de enriquecimiento dirigido Haloplex®.....	74
7.7.	Validación de digestión y enriquecimiento .....	79
14.	Anexo II. Manejo de datos, NGS .....	80
15.	Anexo III. Variantes genéticas encontradas .....	83
16.	Bibliografía .....	86

## 1. Índice de figuras, gráficas y tablas.

<i>Figura 2 Estructura proteica del gen FBN1.</i> .....	23
Figura 3 Representación esquemática de los principales pasos que subyacen en el ensamble de microfibrillas <sup>36</sup> .....	24
Figura 4. <i>Corte transversal aórtico.</i> .....	27
<i>Figura 5. Mecanismo general de la señalización del factor de crecimiento transformante beta a través de las vías canónica y no canónica.</i> .....	28
Figura 6 <i>Sobreposición dentaria en un paciente femenino de 10 años de edad con SMF</i> <sup>61</sup> .....	31
Figura 7. <i>Sistema de enriquecimiento dirigido Sure Select.</i> .....	50
Figura 8 Cuantificación y evaluación de ADN genómico. ....	60
Figura 9 Curvas de fusión de alta resolución. ....	61
Figura 10 Ejemplo de secuenciación tipo Sanger. ....	61
Tabla 1. Número total de casos reportados clasificados según el tipo de mutación presentada <sup>29</sup> .....	21
Tabla 2 <i>Criterios de Gante utilizados para el diagnóstico del SMF</i> <sup>62</sup> .....	33
Tabla 3. Diagnóstico diferencial para las fibrinilopatías .....	34
Tabla 4. <i>Lista de genes incluidos en el panel utilizado en el CMG para el diagnóstico molecular de aneurisma aórtico.</i> .....	49
Tabla 5. <i>Resumen del enfoque estadístico utilizado. Se muestran los diferentes tipos de variable, la metodología de obtención y el tipo de análisis efectuado sobre ellas.</i> .....	54
Tabla 6. <i>Valores de raíz aortica de una población adulta control y de la población adulta en estudio con diagnóstico de SMF corregidos por BSA. Se muestran los valores como medias ± desviación estándar.</i> .....	56
Tabla 7. <i>Descripción por edad de los pacientes seleccionados con SMF</i> .....	59
Tabla 8 Descripción por edad de los pacientes seleccionados con diagnóstico diferente a SMF .....	60
Tabla 9. Clasificación de variantes genéticas.....	63
Tabla 10 Correlaciones de Spearman de la población adulta negativa a variante con SMF. ....	64
Tabla 11 Diferencias estadísticamente significativas al comparar las poblaciones negativas a variantes .....	64
Tabla 12 Número de variantes clínicamente significativas reportadas en la base UMD ver 14, y en la población en estudio.....	67
<i>Gráfica 1 Reporte de mutaciones clínicamente significativas en el gen FBN1.</i> .....	46
<i>Gráfica 2 Reporte de mutaciones clínicamente significativas en el gen TGFBR2.</i> .....	46
<i>Gráfica 3. Poder estadístico en función del tamaño muestral con un valor <math>\alpha = 0.05</math> y un tamaño de efecto de 1.</i> .....	57

## 2. Resumen

El síndrome de Marfán (SMF) es un desorden sistémico del tejido conectivo, con alto grado de variabilidad clínica que afecta principalmente a los sistemas cardiovascular, musculo-esquelético, ocular, respiratorio y tegumentario. Tiene una incidencia baja considerándose una enfermedad genética rara de carácter autosómico dominante, 75% de los casos son de origen hereditario. Este síndrome y algunas otras fibrinilopatías similares se han asociado con más de 700 mutaciones en el gen para la proteína fibrilina (FBN1); así como en otros genes relacionados en el control del crecimiento, tales como el factor de crecimiento tumoral (TGF- $\beta$ ) y sus receptores (TGFR- $\beta$ 1 y  $\beta$ 2), presentando características fenotípicas similares.

Nuestro país no cuenta con estudios moleculares y debido a la baja incidencia del síndrome, la información es escasa, lo que dificulta el correcto diagnóstico y tratamiento del síndrome.

Se analizó a una población de 92 pacientes, el diagnóstico clínico lo determinó un médico especialista en el síndrome; y los diagnósticos moleculares diferenciales se realizaron utilizando las técnicas de análisis de curvas de fusión de alta resolución y secuenciación masiva. Se logró completar el diagnóstico molecular para el 80% de la población. De las variantes genéticas encontradas en este estudio, 74% de ellas no se han reportado, representando un panorama excitante para la investigación nacional y mundial del SMF.

Al realizar un análisis de correlación entre el tipo de variantes genéticas y las características fenotípicas y clínica no se encontró un patrón claro de correlación entre el tipo de variantes genéticas y características fenotípicas y clínicas.

Con este estudio se espera promover el conocimiento del síndrome, mostrar la importancia y complejidad del diagnóstico clínico y molecular, para así poder mejorar la calidad de vida los pacientes; ya que al obtener un diagnóstico y

tratamiento oportuno, tanto el número, como la frecuencia y gravedad de complicaciones se verán disminuidas.

### **3. Abstract**

Marfan Syndrome (SMF) is a connective tissue disorder with elevated clinical variability characterized by affections in the cardiovascular, skeletal, ocular, respiratory and tegumentary systems. SMF is considered as a rare genetic disease due its low incidence with an autosomal dominant mechanism in which 75% of the cases are caused by family inheritance. This syndrome along with other similar fibrinilopathies are associated with more than 700 mutations in the fibrillin-1 protein, codified by the FBN1 gene, as wells as other genes involved in growth control, such TGF $\beta$  and its receptors TGFBR1 and 2; resulting in akin phenotypic characteristics.

Currently there are not molecular studies in our country, moreover the information of the syndrome is limited because of the low incidence of the syndrome, and for all of this reasons the diagnosis and treatment of the disease is troublesome and complex.

We analyze a population of 92 patients, clinical diagnosis was determined by an expert physician and molecular and differential diagnosis was executed using high resolution melting analysis and massive sequence. We managed to complete molecular diagnosis in 80% of the population, of the variants found in this study 74% are not reported in the literature, which represents an exciting challenge for the national and international marfan syndrome investigation.

With this study we hope to promote knowledge of the syndrome, show its importance and complexity of clinical and molecular diagnosis, in this way we can improve quality of life of patients due to the fact that an opportune diagnosis and treatment will prevent the number and frequencies of complications

## 4. Abreviaturas

ACC	Aracnodactilia Contractural Congénita
ACTA2	Actina Alfa-2 de músculo liso
AD	Aurícula derecha
ADAM10	Desintegrina y Mealoproteínasa, dominio 10
ADAM17	Desintegrina y Mealoproteínasa, dominio 17
ADAMTS1	Desintegrina y Mealoproteínasa con trombospondina tipo 1, motivo 1
ADAMTS13	Desintegrina y Mealoproteínasa con trombospondina tipo 1, motivo 13
ADAMTS8	Desintegrina y Mealoproteínasa con trombospondina tipo 1, motivo 8
ADN	Ácido Desoxiribonucleíco
AI	Aurícula izquierda
ARN	Ácido Ribonucleíco
Ao	Aorta
BMP	Proteínas Morfogénicas Óseas
CE	Electroforesis capilar
CIAP	Fosfatasa alcalina
CMG	Centro de enfermedades genéticas del Hospital de la Universidad de Ambéres
COL3A1	Colágeno tipo III, alfa I

dNTP	Mezcla de Desoxinucleótidos
dsADN	Ácido Desoxiribonucleíco de doble cadena
E/A	Relación onda de llenado / contracción auricular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFEMP2	Proteína 2 de la matriz extracelular EGF que contiene dominios tipo fibulina
EGF	Factor de crecimiento epidermal
EXO1	Exonucleasa 1
FBN1	Fibrilina 1
FBN2	Fibrilina 2
FBN3	Fibrilina 3
FEVI	Fracción de eyección del ventrículo izquierdo
FLNA	Filamina A
FOXE1	Proteína caja E1 en forma de tenedor
ADNg	ADN genómico
HGMD	Base de datos de mutaciones génicas en humanos
HRM	Curvas de fusión de alta resolución
IC	Intervalo de confianza
IGV	Visualizador Interactivo Genómico
LD	Desequilibrio de ligamiento
LTBP	Proteína de factor de crecimiento tumoral beta de unión latente
MAF	Frecuencia de alelo menor

MASS	Desorden de miopía, prolapso de la válvula mitral, dilatación aórtica, hallazgos esqueléticos y estrías
MAT2A	Adenosiltransferasa II, alfa 1, metiltransferasa
MFAP5	Microfibrila asociada a la proteína 5
MMP2	Metaloproteínasa de matriz 2
MVPS	Síndrome de Prolapso de Válvula Mitral
MYH11	Miosina de músculo liso, polipéptido de cadena pesado 11
MYLK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ncRNA	Ácido ribonucleico no codificante
NGS	Secuenciación de nueva generación
NOTCH1	Proteína 1 neurogénica homóloga al locus notch
Nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en la Cadena de Polimerasa
PPVI	Pared posterior del ventrículo izquierdo
Q valor	Valor de Calidad Q en secuenciación masiva
qPCR	Reacción en la Cadena de Polimerasa cuantitativa
RA	Raíz aórtica
RD	Rama derecha del tronco arterial pulmonar
RI	Rama izquierda del tronco arterial pulmonar
RFU	Unidades de fluorescencia relativa

SATF	Síndrome de aneurisma torácico familiar
SED	Síndrome Ehlers-Danlos
SEL	Síndrome Ectopia Lentis
SKI	Proto-oncogén Ski
SLC2A10	Acarreador de solutos de la familia 2 (transportador facilitado de glucosa), miembro 10
SLD	Síndrome de Loeys-Dietz
SMAD	Familia de factores de transcripción
SMAD1	Miembro uno de la familia de factores de transcripción SMAD
SMAD2	Miembro dos de la familia de factores de transcripción SMAD
SMAD3	Miembro tres de la familia de factores de transcripción SMAD
SMAD4	Miembro cuatro de la familia de factores de transcripción
SMAD5	Miembro cinco de la familia de factores de transcripción
SMAD6	Miembro seis de la familia de factores de transcripción
SMAD7	Miembro siete de la familia de factores de transcripción
SMAD9	Miembro nueve de la familia de factores de transcripción
SMF	Síndrome de Marfán
SMF2	Síndrome de Marfán tipo 2
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido
SSG	Síndrome de Sphrintzen-Goldberg
SWM	Síndrome de Weill-Marchesani
TAAD	Aneurisma torácico y disección aórtica

TAP	Tronco de la arteria pulmonar
TaqPol	Enzima Taq Polimerasa
TIV	Tabique interventricular
TGFB2	Factor de crecimiento transformante beta 2
TGFB3	Factor de crecimiento transformante beta 3
TGFBI	Factor de crecimiento transformante beta 1
TGFBR1	Receptor 1 del factor de crecimiento transformante beta
TGFBR2	Receptor 2 del factor de crecimiento transformante beta
TGFBR3	Receptor 3 del factor de crecimiento transformante beta
TGFBRAP1	Proteína 1 asociada al factor de crecimiento transformante beta
Tm	Temperatura media de fusión
TSVD	Tracto de salida del ventrículo derecho
TSVI	Tracto de salida del izquierdo
UCSC	Base de datos de la Universidad de Santa Cruz en California
UMD	Base de datos Universal de Mutaciones
UTR	Región no traducida del gen
UZA	Hospital de la Universidad de Ambéres
VI	Ventrículo izquierda
VM	Válvula Mitral

## 5. Introducción

Las primeras observaciones del Síndrome de Marfán (SMF) se realizaron por el médico pediatra francés Antoine Bernard-Jean Marfán en 1896 quien presentó el caso de una niña de 5 años llamada Gabrielle en la Sociedad Médica del Hospital de París con extremidades y dedos desproporcionadamente largos y delgados, hipotonía muscular y anomalías esqueléticas<sup>1</sup>; actualmente se sabe que Gabrielle no era portadora de SMF sino de aracnodactilia contractural congénita (CCA). Sin embargo, fue a partir de estas observaciones que se reconoció la existencia del síndrome, hubo descripciones similares por William<sup>2</sup> y Conan-Doyle<sup>3</sup>, no obstante, el síndrome ha requerido décadas de investigación clínica y molecular para conocer su etiología.<sup>4,5</sup> Tuvo que transcurrir casi un siglo (1986) para que se Sakai y colegas<sup>6</sup> identificaran a la proteína fibrilina-1 como el componente principal de la matriz extracelular de microfibrillas presente en todos los tejidos con manifestaciones fenotípicas de la enfermedad, y en 1991, tras varios estudios de ligamiento se relacionó el gen de la fibrilina-1 (*FBN1*) con el SMF.

EL SMF es un desorden sistémico del tejido conectivo con un notorio pleiotropismo y variabilidad clínica demostrada por mutaciones en el gen *FBN1* que codifica para una proteína llamada fibrilina-1. Las manifestaciones cardinales se producen en los sistemas esquelético, ocular y cardiovascular<sup>7</sup>. Se considera que tiene una incidencia mundial de 1 en 10,000 personas; sin embargo no existen cifras estadísticas fiables y no se conoce la incidencia en México<sup>8,9</sup>. El 75% de estos casos son por herencia familiar y un 25% por mutaciones *de novo*. Hoy en día se sabe que el mecanismo de herencia tiene un patrón autosómico dominante<sup>10,11,12</sup> por mecanismos actualmente en discusión, ya sea por dominancia negativa o por haploinsuficiencia<sup>12,13,14,15,16,17</sup>. Además, el SMF tiene una penetrancia elevada que se considera cercana al 100%<sup>18,19</sup>.

El SMF no muestra relación étnica o geográfica y afecta tanto a hombres y mujeres por igual<sup>5</sup>, sin embargo estudios de cohorte han demostrado mayor supervivencia en mujeres<sup>20</sup>. La incidencia mundial estimada de la enfermedad varía de 1 en 5,000, a 1 de cada 10,000 recién nacidos vivos<sup>21</sup>.

Las personas con SMF tienen mayor riesgo de desprendimiento de retina, glaucoma y principios de formación de cataratas, a nivel esquelético el síndrome se caracteriza por crecimiento excesivo del hueso y laxitud articular. Sin embargo las principales causas de morbilidad y mortalidad se relacionan con el sistema cardiovascular. Las manifestaciones cardiovasculares incluyen la dilatación de la aorta a nivel de los senos de valsalva, una predisposición al desgarre y/o ruptura de la aorta, prolapso de válvula mitral con o sin regurgitación, prolapso de la válvula tricúspide y la ampliación de la arteria pulmonar proximal<sup>21</sup>.

Los embarazos en pacientes con SMF se consideran de alto riesgo, las complicaciones incluyen la rápida progresión de dilatación aórtica, disección aórtica o ruptura durante el embarazo, parto y puerperio<sup>6</sup>.

### **5.1. Genética del Síndrome de Marfán**

La proteína del tejido conectivo fibrilina-1 se aisló a partir de cultivos de fibroblastos humanos y fue nombrada y caracterizada por Sakai y colegas<sup>6</sup>. Usando anticuerpos monoclonales específicos para la fibrilina-1, se demostró que la fibrilina es el principal componente de la matriz extracelular de las microfibrillas además de tener una amplia distribución tanto en matrices de tejido conectivo elástico y no elástico, como pulmones, riñón, vasos sanguíneos, cartílago, tendones, músculo, cornea y zónulas ciliares<sup>22</sup>. En 1997 el cDNA fue identificado y mapeado con resultados que coincidían con ser la principal causa del SMF<sup>23,24</sup>.

La evidencia conjunta de la relación entre el gen de la fibrilina-1 y el fenotipo del SMF; junto con la certidumbre de mutaciones puntuales en el gen de

la fibrilina-1 en pacientes con SMF concluyeron el hecho de que FBN1 es el gen causal del SMF<sup>18,25</sup>.

Tras un gran número de estudios en pacientes y familias con diagnóstico de SMF los resultados sugieren que la mayoría de individuos poseen mutaciones únicas, y que además tienen un notorio pleiotropismo y variabilidad clínica<sup>15,26,27</sup>. Dada esta gran variabilidad, se han propuesto diversos algoritmos para clasificar las mutaciones causales dependiendo de su sitio de afectación: en la formación de enlaces di-sulfuro, sitios de unión a calcio y las interacciones intra e intermoleculares<sup>28</sup>.

Collod-Beroud y colegas han construido una base de datos mundial (UMD/FBN1, *Universal Mutation Database, Marfan Syndrome*) en la cual se registran las mutaciones reportadas, se clasifican según la posición, el tipo de mutación, dominio afectado y se describen de acuerdo a la posición exónica, según el número de aminoácidos, o el número de reportes; e incluso se han realizado las primeras correlaciones genotipo-fenotipo, véase Tabla 1.<sup>29</sup>

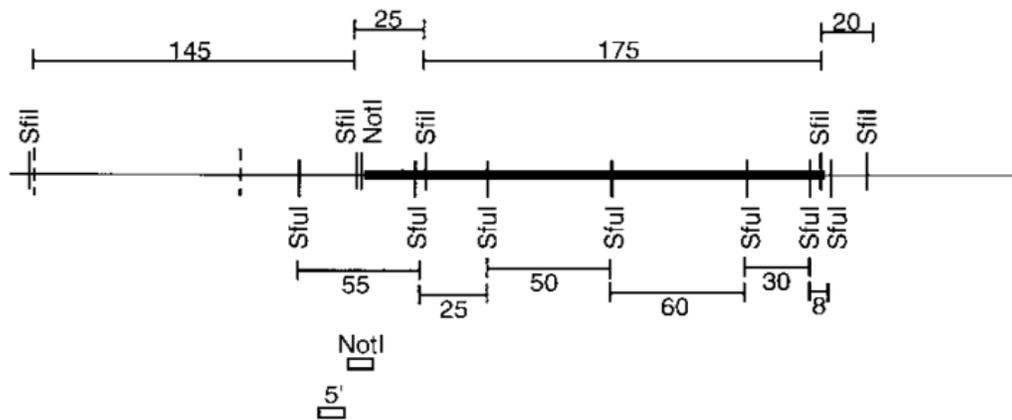
**Tabla 1. Número total de casos reportados clasificados según el tipo de mutación presentada<sup>29</sup>**

<b>Tipo de mutación</b>	<b>Total de casos</b>
Rearreglos grandes	51
Depleciones mayores ( $\geq 1$ exón)	48
Duplicaciones mayores ( $\geq 1$ exón)	3
Rearreglos pequeños	3006
Depleciones pequeñas ( $< 1$ exón)	331
Inserciones pequeñas ( $< 1$ exón)	107
Sitios de empalme ( $< 10$ pb del exón)	317
Mutaciones puntuales	317
Sin sentido	434
Con cambio de sentido	1815
Variaciones a la mitad de intrones	20
Indel	2
<b>Total</b>	<b>3077</b>

## 5.2. FBN1

El gen FBN1 es un gen relativamente grande ubicado en el brazo largo del cromosoma 15 en la posición 15q15-q21.1<sup>30</sup>, tienen un tamaño estimado mayor a 200k, la secuencia codificante se divide en 65 exones con un ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de 10kb y se han descrito 3 sitios de empalme alternativo estos delimitan a los exones B, A y C<sup>31</sup>. Aunado a estos se ha identificado una isla CpG que abarca los primeros dos sitios de empalme alternativo, véase Figura 1<sup>32</sup>.

**Figura 1. Estructura del gen FBN1.**

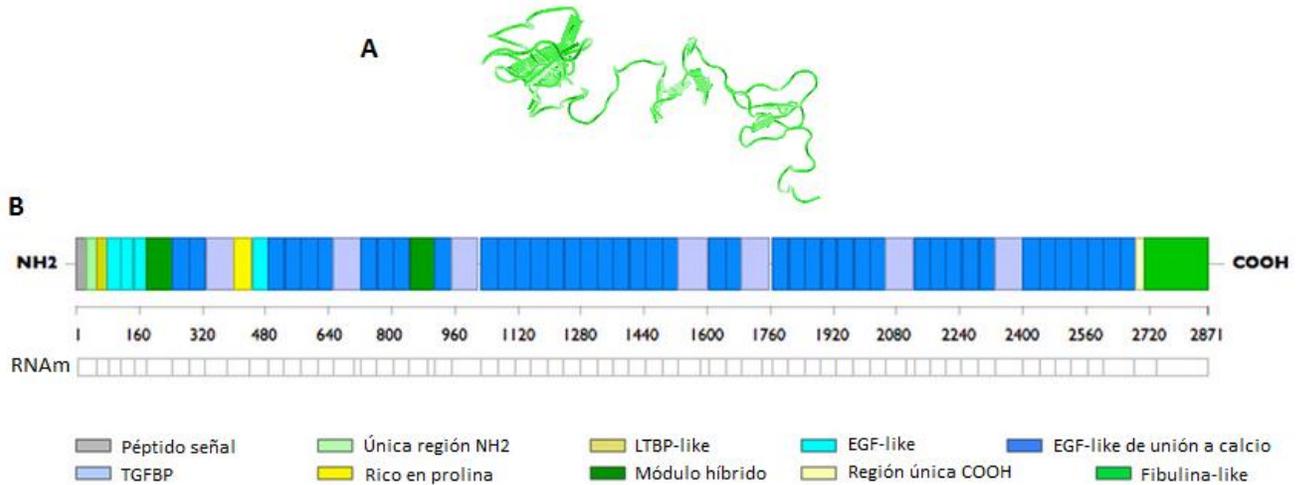


La región codificante está representada por la línea gruesa, los sitios de restricción están representados por las líneas verticales y el tamaño de los mismos se indica por arriba (Sfi1) y por debajo (Sfu1)<sup>32</sup>.

Cuando el gen FBN1 fue clonado, se identificó otro gen que compartía un alto nivel de homología, este gen fue identificado y localizado en el cromosoma 5, este gen denominado FBN2 es el responsable de un trastorno de poca incidencia que comparte algunas características físicas con el SMF, aranodactilia congénita contractural (AAC)<sup>25</sup>. El gen FBN1 codifica para la proteína fibrilina-1 de 2871 aminoácidos, véase Figura 2, la cual es multidominios siendo éstos altamente repetitivos<sup>33,31,34</sup>. La proteína contiene 47 dominios en tándem con homología a un módulo presente en el precursor del factor de crecimiento epidérmico humano (EGF). Este módulo está caracterizado por un arreglo conservado de 6 residuos de cisteína que forman 3 enlaces disulfuro espaciados que forman una

conformación estable de hoja plegada  $\beta$  antiparalela. En 43 de los 47 módulos similares al factor de crecimiento epidérmico humano (EGF-like), fue identificada una secuencia consenso de unión a calcio. El estudio de este módulo en otras proteínas sugiere un papel en interacciones proteína-proteína, proteína-ligando y célula-célula. Intercalados existen de 7 a 8 módulos de cisteína o módulos TGF- $\beta$ -like, que son homólogos con la proteína de unión del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) y dos módulos híbridos que combinan las características de los dos primeros. Finalmente los tres últimos dominios encontrados en la proteína incluyen una sección única amino-terminal de residuos básicos, un dominio rico en prolina y la región carboxi-terminal. El peso molecular de la proteína fibrilina-1 es de 350 kDa y contiene aproximadamente 14% de cisteínas, de los cuales un tercio parece estar en forma de sulfhídrido reactivo libre<sup>6,23</sup>.

**Figura 2 Estructura proteica del gen FBN1.**



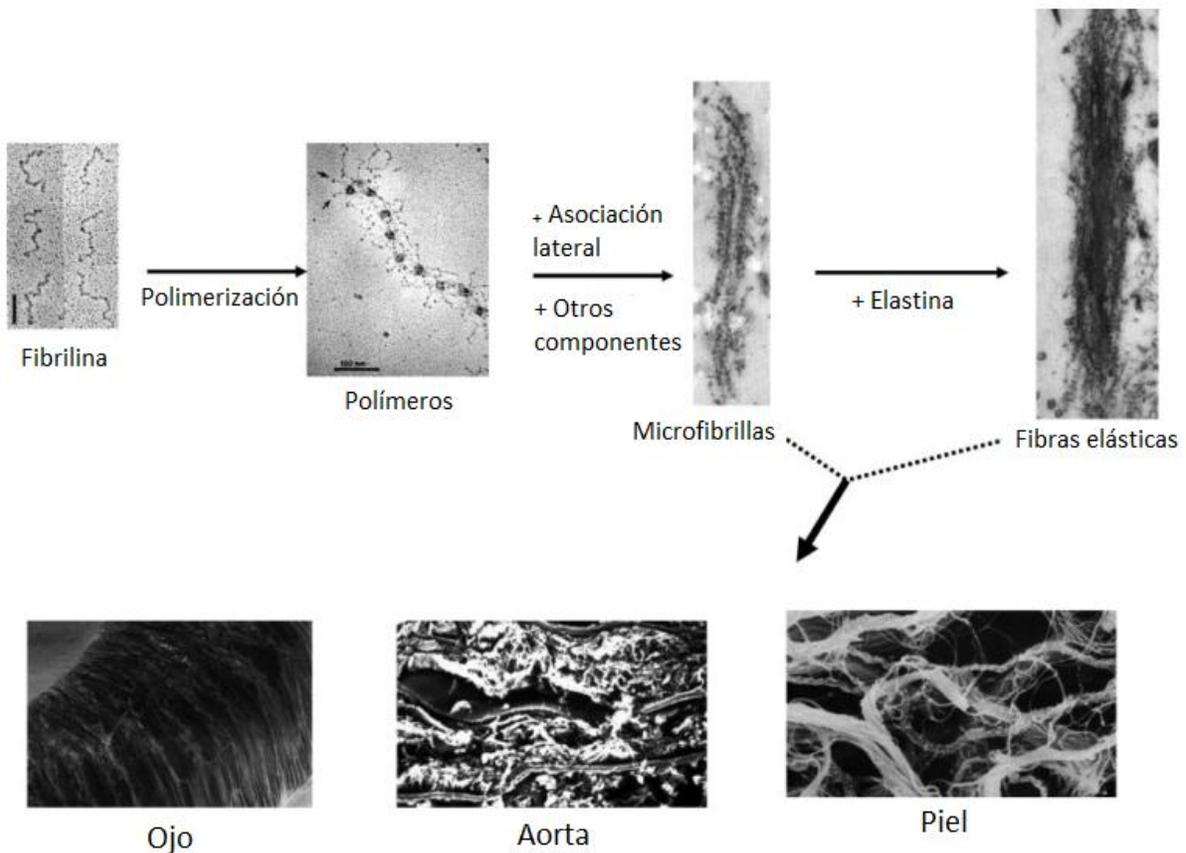
**A. Estructura tridimensional de la proteína fibrilina-1, B. Estructura lineal de la proteína FBN1 con sus respectivos dominios<sup>23</sup>.**

La fibrilina-1 tiene 2 funciones fisiológicas fundamentales: participar en el ensamblaje de matrices especializadas que le confieren propiedades estructurales a los tejidos conectivos y proporcionar especificidad contextual para las señales del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y de la proteína morfogénica

ósea (BMP), ambos encargados de la regulación de la formación y remodelación de la misma matriz<sup>35</sup>.

La fibrilina-1 forma una red compleja de proteínas que integran los espacios intercelulares, sus polímeros forman filamentos filiformes de 10nm llamados microfibrillas que a su vez se pueden unir a otras moléculas como la elastina para formar las fibras elásticas. Estas fibras elásticas permiten a la piel, ligamentos y vasos sanguíneos estirarse. Las microfibrillas también proporcionan apoyo a los tejidos más rígidos como el tejido nervioso, ocular y muscular, véase Figura 3<sup>36,6</sup>.

**Figura 3 Representación esquemática de los principales pasos que subyacen en el ensamble de microfibrillas<sup>36</sup>.**



Las microfibrillas también almacenan al TGF- $\beta$ , el cual es un factor de crecimiento crítico, ya que participa en el control y regulación del crecimiento, división, diferenciación y muerte celular. Al almacenar a este factor las

microfibrillas, ayudan a regular su disponibilidad y función, ya que este se inactiva cuando se almacena en las microfibrillas y se activa cuando se libera. Las microfibrillas también se ven involucradas en el control de la maduración de osteoblastos al almacenar otras moléculas como la proteína morfogénica de hueso (BMP)<sup>36</sup>.

### **5.3. Patología**

Debido a las características físicas de los pacientes en un principio se sugirió que el síndrome podría ser causado por alteraciones en la elastina. En 3 pacientes con características fenotípicas clásicas del síndrome se encontraron valores reducidos aproximadamente a la mitad con respecto de los controles, de desmosina e isodesmosina, que funcionan como marcadores de degradación de elastina, y valores incrementados de residuos de lisil oxidasa. La concentración, solubilidad y composición de aminoácidos del colágeno soluble e insoluble, no tuvieron cambios al comparar tejidos aórticos de pacientes con SMF contra personas sanas<sup>37</sup>.

La revisión de la naturaleza del ligamiento suspensorio del cristalino o zónula de Zinn, reveló que las fibras zonulares son muy similares a las microfibrillas de tejido elástico en sus características de tinción, morfología estructural y composición de aminoácidos. Además comparten determinantes antigénicos (o epítomos) con las microfibrillas de tejido elástico<sup>38</sup>. La dolicoostenomelia, aracnodactilia y deformidades en pecho son característicos del crecimiento longitudinal excesivo de los huesos tubulares en las extremidades, los dedos y costillas presentes en los pacientes con SMF. Por lo cual se postuló que la etiología de la enfermedad podría ser debido a un desencadenamiento del crecimiento longitudinal resultado de un defecto en los elementos fibrosos del periostio. El periostio es la membrana de tejido conectivo que cubre al hueso por su superficie externa, excepto en zonas de inserción de ligamentos, tendones y superficies articulares<sup>39</sup>.

Cuando se descubrió la proteína fibrilina-1<sup>6</sup> y su presencia en la zónula de Zinn, en tejido aórtico y en el periostio impulsó a los investigadores a estudiar su relación con el SMF<sup>40</sup>. Existen tres diferentes tipos de proteínas fibrilina: 1, 2 y 3, todas codificadas por diferentes genes<sup>6</sup>; sin embargo tras determinar que alteraciones en la proteína fibrilina-1 son responsables del SMF y al realizar varios estudios en fibroblastos de pacientes con SMF<sup>41</sup>, se observó que los individuos afectados presentaban mutaciones que afectaban a la síntesis, la secreción o la incorporación de fibrilina-1 en la matriz extracelular. Experimentos realizados en fibroblastos dérmicos de 26 pacientes las células eran capaces de sintetizar una cantidad normal de fibrilina-1, pero el proceso de secreción era menos eficiente; otras células eran capaces de sintetizar y secretar de manera normal, pero la incorporación era inadecuada.<sup>42</sup> También se ha presentado evidencia de anomalías en la estructura primaria del colágeno<sup>43</sup>, de ensamblaje<sup>44</sup> y síntesis del ácido hialurónico<sup>45</sup>, estas mutaciones generalmente asociadas a casos de SMF atípicos<sup>44,46</sup>.

La fibrilina-1 y las proteínas de unión latente al TGF- $\beta$  (LTBPs) constituyen la familia de proteínas fibrilina-LTBP, este complejo que comparte un alto nivel de homología contiene múltiples repeticiones del dominio EGF-like que también se encuentran en las microfibrillas. La región terminal del LTBP se une con la región N-terminal de las microfibrillas y de esta manera los LTBPs se unen al complejo latente menor del TGF- $\beta$  reteniéndolo dentro de la matriz. Es así como se estabilizan los complejos almacenando y regulando al TGF- $\beta$  para su actividad en la matriz extracelular<sup>47</sup>, véase Figura 4.

Modelos murinos de SMF han demostrado un incremento en la señalización de TGF- $\beta$  en pulmón, cuyo fenotipo fue corregido con un anticuerpo neutralizante. Esto cambia por completo la fisiopatología, ya que hoy en día se considera que las manifestaciones típicas del síndrome son consecuencia de la falta de homeostasis en la matriz extracelular, en la que el bajo número o formas mutadas de la fibrilina-1 con llevan a alteraciones en las propiedades mecánicas de los tejidos,

incrementando la actividad y señalización de TGF- $\beta$ , así como falta de interacciones de la matriz extracelular<sup>49,21</sup>.

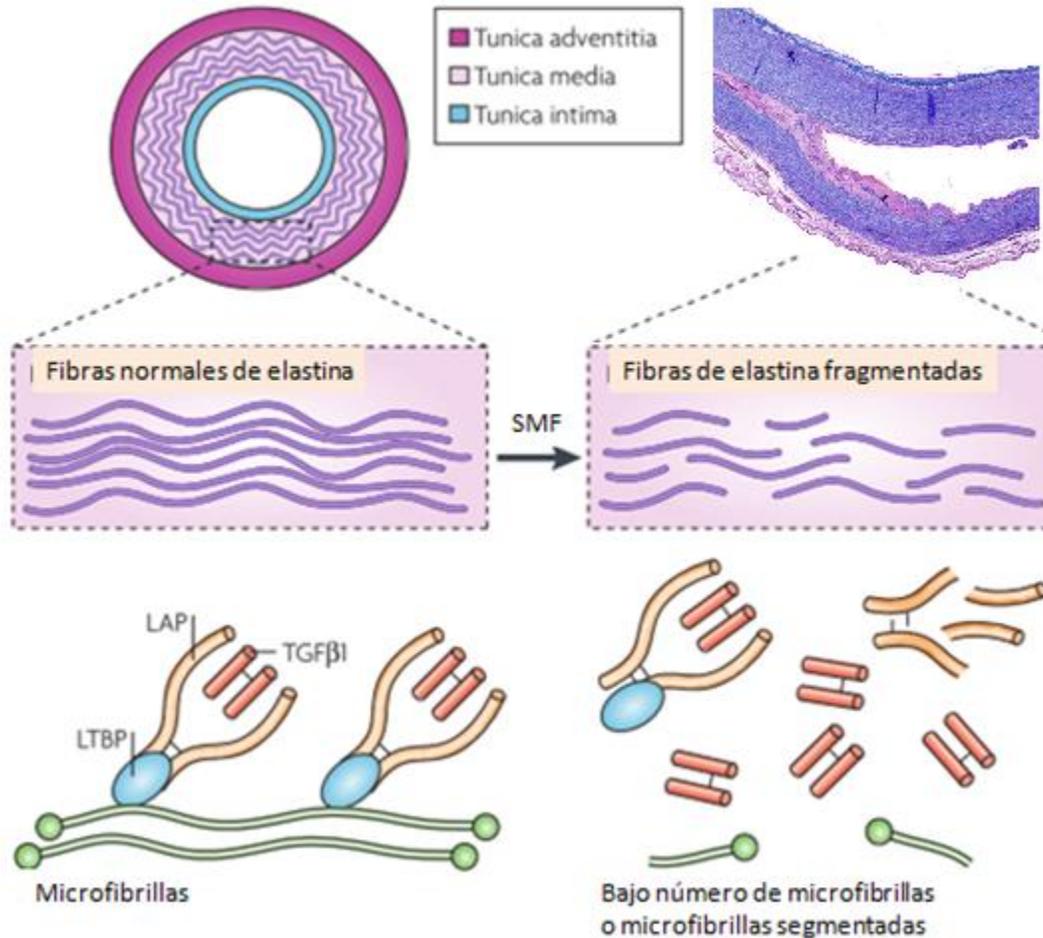


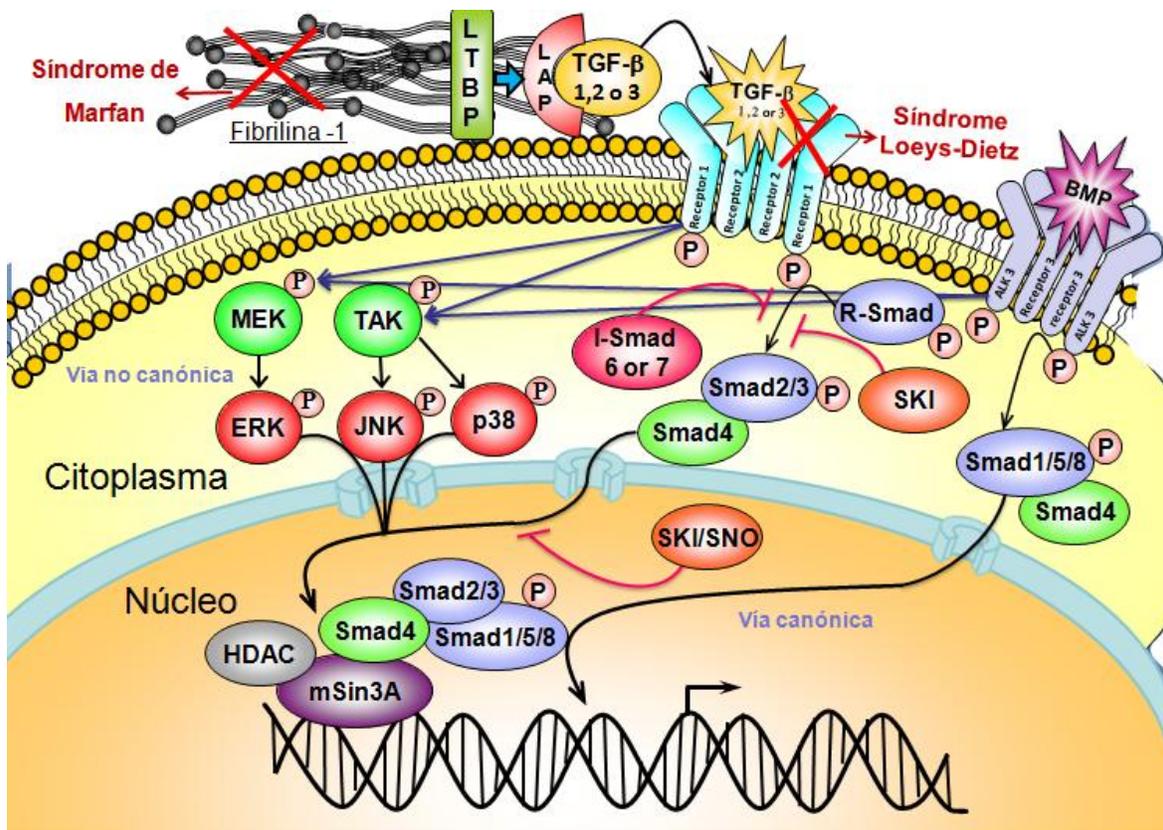
Figura 4. Corte transversal aórtico.

*Se aprecian las tres capas de vaso: túnica adventicia que contiene colágeno, fibroblastos, nervios y capilares; túnica media, que contiene células músculo liso, fibras elásticas/microfibrillas, colágeno y proteoglicanos; y la túnica íntima, que contiene células endoteliales y lamina basal. Las fibras elásticas fragmentadas son comunes en el SMF<sup>47, 48</sup>.*

Esta falta de control sobre el TGF- $\beta$  da como resultado una remodelación vascular caracterizada por una exagerada elastólisis resultado de la sobreexpresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) y un incremento de ácido hialurónico que lentamente degrada las fibras de elastina así como otros componentes de matriz extracelular. Este aumento de señalización en

la matriz de la aorta genera fibras no elásticas y propensas a desgaste, causando que la pared de la aorta no sea capaz de resistir la fuerza resultante de la presión arterial lo que lleva a la formación de las patologías típicas del síndrome <sup>50</sup>.

Estos estudios que señalan la relación funcional entre la fibrilina-1, el TGF- $\beta$ <sup>51</sup>, y la vía de señalización en la matriz extracelular sugieren que niveles elevados de TGF- $\beta$ , en pacientes con SMF correlacionan con diámetros aórticos mayores y de rápida evolución patológica, y sus niveles podrían funcionar como biomarcador para predecir eventos cardiovasculares <sup>52</sup>. Se ha demostrado la falta de homeostasis por la activación de la vía de señalización canónica (dependiente de SMAD) del TGF- $\beta$ , sin embargo las vías de activación no canónicas que son activadas por mitógenos también tienen un papel importante en las patologías cardiovasculares.<sup>53,54</sup>



**Figura 5. Mecanismo general de la señalización del factor de crecimiento transformante beta a través de las vías canónica y no canónica.**

*En la superficie celular, el TGF- $\beta$  se une al TGF- $\beta$  receptor tipo II (TGF- $\beta$ R2), después el TGF- $\beta$  receptor tipo I (TGF- $\beta$ R1) es reclutado para formar el complejo receptor. Las quinasas (serina/treonina) del TGF- $\beta$ R2 provocan fosforilación de los segmentos GS en el receptor tipo I. Este receptor activado fosforila RSMAD (Smad2/3), tras lo que el receptor (R-Smad) es activado formando un complejo con Smad4. Estos complejos activado se translocan en el núcleo y regulan la transcripción de genes diana mediante la interacción física y la cooperación funcional con factores de transcripción de unión al ADN (TFS). La señalización independiente de Smad a través de la vía MAPK (vía no canónica) y el TGF- $\beta$  y la angiotensina II (AngII) Ras activo, pueden inducir la señalización vía ERK MAP. JNK y la señalización de MAPK p38 son activadas por diversas cinasas MAPK en respuesta a diversos estímulos. Mientras que las cinasas MAP/ERK (MEK1) pueden activar cinasas ERK, cinasas activadas de TGF- $\beta$ , JNK y p38, es posible que transmitan la señal en el núcleo causando la transcripción de genes diana. La activación inducida de TGF- $\beta$  por Raz/ERK MAPK puede inducir la expresión de TGF- $\beta$ R1, amplificando así la respuesta de TGF- $\beta$  y la inducción de respuestas secundarias de TGF- $\beta$ . CTGF, factor de crecimiento de tejido conjuntivo; IL-6, interleucina 6; LTBP, proteína latente de unión al factor de crecimiento transformante beta; MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; MMO, metaloproteínasas de matriz; PAI-1, inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante beta; TIMP, inhibidor tisular de la metaloproteínasa 1; TSP-1 trombospondina-1<sup>55</sup>.*

## 5.4. Herencia

El mecanismo de herencia que presenta el síndrome es autosómico dominante. Alrededor de una cuarta parte de las personas afectadas son debido a mutaciones esporádicas o de *novo*, y el 75% de los casos son debido a herencia familiar; lo que significa que el riesgo de que el hijo de un padre afectado o de una madre afectada desarrolle la enfermedad es del 50%. Adicionalmente se ha relacionado el incremento de la edad del padre con la presencia de mutaciones de *novo*<sup>35</sup>.

Los mecanismos patogénicos del SMF son complejos y actualmente son el foco de estudio de muchas investigaciones. Las correlaciones genotipo-fenotipo observadas podrían indicar diferentes mecanismos patológicos subyacentes, incluyendo mecanismos genéticos: dominancia negativa vs haploinsuficiencia y mecanismos funcionales: función estructural de la fibrilina-1 vs mediador de señalización del TGF- $\beta$ . Además, debemos considerar otros factores modificadores genéticos e inflamatorios que puedan ser responsables por la variabilidad fenotípica en los pacientes<sup>35</sup>.

## 5.5. Penetrancia

Se define como el porcentaje de portadores de la mutación que manifiestan el fenotipo a una determinada edad. La penetrancia de las mutaciones en FBN1 es en general elevada y se considera cercana al 100%; sin embargo, se han reportado casos excepcionales en los que la penetrancia ha sido incompleta. Se debe tener en consideración que muchas de las manifestaciones del síndrome son dependientes de la edad; así, un menor puede ser portador de la mutación y solo desarrollar rasgos de la enfermedad cuando este llegue a la edad adulta <sup>10</sup>.

## 5.6. Características físicas y clínicas

El diagnóstico del síndrome de Marfán se realiza en base a las características físicas de los pacientes. Las manifestaciones oculares, cardiovasculares y musculo-esqueléticas son la clásica triada del SMF, aunque otras manifestaciones pueden comprometer otros sistemas incluyendo el sistema nervioso central, sistema respiratorio, piel y tegumentos. Los pacientes con SMF muestran un desarrollo cognitivo y de inteligencia normal. Cabe señalar que una elevada estatura, extremidades y dígitos desproporcionadamente largos para el tamaño del tronco (dolicoostenomelia), deformidad de la columna vertebral, y un paladar estrecho y arqueado con apiñonamiento de dientes son características esqueléticas frecuentes del SMF <sup>56</sup>.

Según un estudio realizado en el año 1995 con 113 pacientes, encontró que el 73% de los pacientes tenía inmadurez esquelética, 46% escoliosis y el 98% presentaba deformidades en el pecho, el 92% de los pacientes fueron diagnosticados con ectasia dural; todas las manifestaciones con igual prevalencia en ambos sexos.<sup>57</sup> Alrededor del 70% de los pacientes sufren alguna alteración dental, siendo el apiñonamiento de dientes y el paladar ojival las manifestaciones más frecuentes <sup>56</sup>. Miopía, aumento de la longitud axial, plenitud de la córnea y *ectopia lentis* (subluxación del cristalino) son hallazgos comunes en

aproximadamente un 60% de los pacientes <sup>58</sup>. A nivel cardiovascular las principales complicaciones que amenazan la vida son aneurisma de la aorta y disección aórtica. Además del riesgo de prolapso de la válvula mitral, regurgitación mitral, dilatación de la raíz aórtica y la regurgitación aórtica. Otras manifestaciones comunes incluyen estrías de distensión, vesículas pulmonares y quistes aracnoides espinales o divertículos <sup>7</sup>. La esperanza de vida de estos pacientes ha incrementado un 25% desde 1972 debido al aumento en la frecuencia del diagnóstico, al tratamiento médico y sobre todo a los beneficios e incremento de las cirugías cardiovasculares <sup>59</sup>.

Un estudio realizado en población mexicana por nuestro equipo de trabajo con 166 pacientes, de los cuales 89 son adultos y 77 son menores mostró que el 65% de los casos son debido a herencia familiar. Se encontró además que un 55% de los pacientes tiene características faciales típicas, el 58% de menores y 35% de adultos sufren de ectasia dural, un 2% apiñonamiento de los dientes y un 62% paladar ojival, véase Figura 6. A nivel ocular el 62% de los menores y un 45% en adultos padecen de *ectopia lentis* y en menor proporción otras características como elongación de orbitales, desprendimiento de córnea, estrabismo, miopía, glaucoma y ceguera. El 77% de menores y 57% de adultos tienen estrías cutáneas atróficas, y 18 pacientes en total tuvieron complicaciones pulmonares. Con respecto a las manifestaciones cardiovasculares el 53% de la población presentó complicaciones, ya sea por dilatación de la aorta ascendente, aneurisma y/o disección de la aorta. Además, fue realizada cirugía cardiovascular en el 22% de menores y 78% en adultos. También un 14% de pacientes han fallecido a la fecha de término del estudio <sup>60</sup>.



**Figura 6 Sobreposición dentaria en un paciente femenino de 10 años de edad con SMF <sup>61</sup>.**

## 5.7. Diagnóstico

En el año de 1986 un panel de expertos definió un grupo de criterios clínicos para el diagnóstico de SMF denominados criterios de Berlín con el objetivo de facilitar la comunicación entre los profesionales de la salud, investigadores y pacientes <sup>40</sup>. Tras la identificación de FBN1 como el gen causal del SMF, se reconoció que los criterios de Berlín permitían un diagnóstico erróneo del síndrome, en individuos con una historia familiar positiva para SMF, quienes no tenían alteraciones del tejido conectivo ni poseían mutaciones en el gen causal. Por lo tanto, nuevos criterios de diagnóstico fueron establecidos en 1996 denominados criterios de Gante, estos eran más estrictos que los anteriores y proponen una serie de guías y pautas para diferenciar el SMF de otros síndromes con solapamiento de manifestaciones <sup>62</sup>.

Dado que los médicos asocian al SMF por encima de todo con el riesgo de aneurisma o disección de aorta, puede ser perjudicial para las personas sufrir un mal diagnóstico; ya que estas personas podrían tener restricciones deportivas, crisis depresivas, decisiones maritales injustificadas, acceso limitado a los beneficios de seguro médico, carga financiera adicional, etc. Debido a lo anterior estos criterios fueron revisados en el año 2010, véase Tabla 2, con el propósito de facilitar el diagnóstico temprano en adultos pero sobretodo en niños, ya que en estos las manifestaciones clínicas pueden manifestarse solamente con la edad; así mismo se buscó facilitar el entendimiento sobre el puntaje y las características de los criterios mayores y menores, y poder realizar un diagnóstico diferencial preciso <sup>62</sup>.

El diagnóstico requiere un criterio mayor en dos sistemas con la participación de un tercero, aunque estos criterios otorgan un importante peso a la presencia de *ectopia lentis* y dilatación de la raíz aórtica, siendo suficiente la presencia de ambos para realizar el diagnóstico positivo de SMF. Otras manifestaciones cardiovasculares y oculares u alteraciones en el esqueleto, dural,

piel y pulmones contribuyen a un puntaje sistémico, véase Tabla 2 . Los antecedentes familiares también se consideraron criterios mayores, y en la medida de lo posible, se recomienda el uso del diagnóstico molecular <sup>62</sup>.

<b>Criterios de Gante (Resumen, 2010)</b>	
Ausencia de historia familiar	<p>Aneurisma aórtico <math>Z \geq 2</math> y <i>Ectopia Lentis</i></p> <p>Aneurisma aórtico <math>Z \geq 2</math> y Mutación FBN1</p> <p>Aneurisma aórtico <math>Z \geq 2</math> y Puntaje sistémico <math>\geq 7</math></p> <p><i>Ectopia Lentis</i> y Mutación FBN1 con aneurisma aórtico</p>
Con Historia Familiar	<p><i>Ectopia lentis</i> e historia familiar (SMF)</p> <p>Puntaje sistémico <math>\geq 7</math> e historia familiar (SMF)</p> <p>Aneurisma aórtico <math>Z \geq 2</math> (adulto), <math>Z \geq 3</math> (menores 20 años) e historia familiar</p>
Puntaje sistémico	<p>Signo de muñeca y pulgar – 3 puntos</p> <p>Pectus carinatum – 2 puntos</p> <p>Pectus excavatum o asimetría de pecho – 1 punto</p> <p>Deformidad en retropié – 2 puntos</p> <p>Pie plano – 1 punto</p> <p>Neumotórax – 2 puntos</p> <p>Ectasia Dural – 2 puntos</p> <p>Protrusión acetabular – 2 puntos</p> <p>Reducción US/LS e incremento brazo/altura, sin escoliosis severa – 1 punto</p> <p>Escoliosis o cifosis toracolumbar – 1 punto</p> <p>Reducción en extensión del codo – 1 punto</p> <p>Características faciales (3/5) – 1 punto (dolicocefalia, enoftalmos, fisuras palpebrales, hipoplasia malar, retrognacia)</p> <p>Estrías en piel – 1 punto</p> <p>Miopía <math>&gt; 3</math> dioptrías – 1 punto</p> <p>Prolapso de válvula mitral – 1 punto</p> <p>Total máximo= 20 puntos; puntaje <math>\geq 7</math></p>

**Tabla 2 Criterios de Gante utilizados para el diagnóstico del SMF <sup>62</sup>.**

### 5.7.1. Diagnóstico diferencial

Al comienzo de la enfermedad las características clínicas varían considerablemente entre los individuos afectados e incluso entre las familias afectadas; es por eso que la primera evaluación debe ser meticulosa porque hay datos clínicos discretos que solo se encuentran en las enfermedades aórticas como SMF u algún síndrome similar, sin embargo el grado de evolución será diferente, en algunos casos acelerando la progresión de daño cardiovascular y con un mal pronóstico. Realizar la clasificación clínica de estos síndromes para darles el seguimiento apropiado, es un arte<sup>60</sup>.

Entre los síndromes fenotípicamente similares a SMF se incluyen, homocistinuria, Síndrome de Marfán neonatal, Loey-Dietz (SLD)<sup>63</sup>, Shprintzen-Goldberg (SSG)<sup>64</sup>, Furlong<sup>65</sup>, Beals-Hecht<sup>66</sup>, Stickler<sup>67</sup> y Marshall<sup>68</sup>, Camurati-Engelman<sup>69</sup>, Ehlers-Danlos (SED)<sup>70</sup>, Weill-Marchesani (SWM)<sup>71</sup>, *Ectopia lentis* (SEC)<sup>72</sup>, MASS (miopía, prolapso de la válvula mitral, dilatación aórtica, hallazgos esqueléticos y estrías)<sup>73,62</sup>, aneurisma torácico familiar (SATF)<sup>74</sup>, MVPS (síndrome de prolapso de válvula mitral)<sup>75</sup>, hipermovilidad articular benigna, aracnodactilia contractural congénita (ACC)<sup>76</sup>, véase Tabla 3.

Diagnóstico diferencial	Gen
SLD	TGFBR1/2
SSG	SKI, FBN1
ACC, SMF2	FBN2
SWM	ADAMTS10, FBN1
SEL	FBN1, LTBP2, ADAMTSL4
SATF	TGFBR1/2, ACTA2
SED	COL3A1, COL1A2, PLOD1

Tabla 3. Diagnóstico diferencial para las fibrinopatías .

*SLD, Síndrome Loey-Dietz, SSG, Síndrome Shprintzen-Goldberg; ACC, Aracnodactilia congénita; SMF2, Síndrome de Marfán tipo 2; SWM. Síndrome Weill-Marchesani; SEL, Síndrome Ectopia Lentis; SATF, Síndrome Aneurisma Torácico Familiar; SED, Síndrome Ehlers-Danlos.*

Debido a que las mutaciones causantes de los síndromes mencionados están involucrados en las mismas vías de señalización y metabolismo, tienen en común numerosas características físicas y clínicas. Sin embargo, son los síndromes SLD, SSG y SED los que se encuentran más relacionados con el SMF<sup>77</sup>.

Se recomienda el uso del diagnóstico molecular para tener la certeza de un diagnóstico diferencial correcto; así como en familias que presentan una variabilidad clínica intrafamiliar. El análisis de mutaciones debe ser crítico para identificar pacientes y familiares que requieren un seguimiento cardiaco, *ectopia lentis* aislada, o alguna otra manifestación mayor<sup>77</sup>.

## 5.8. Tratamiento

El manejo de los pacientes deberá realizarse con un equipo interdisciplinario; cardiólogo, oftalmólogo, ortopedista, especialista cardiorácico y genetista. El seguimiento de los pacientes y de sus familiares será crucial para la prevención y el diagnóstico oportuno de complicaciones. Con respecto al sistema ocular, la mayoría de los problemas podrán ser manejados con el uso de lentes; sin embargo, la luxación del cristalino requerirá de corrección quirúrgica. A nivel esquelético, el sobrecrecimiento y laxitud de ligamentos pueden desencadenar severos problemas que deberán ser manejados por el ortopedista. Debe controlarse la estabilización de la columna, la rotación de la pisada y vigilar la evolución de la cavidad torácica en caso de presentar alguna anomalía como *pectum excavatum / pectum carinatum*; en algunos casos será necesaria la corrección quirúrgica. Se deben controlar y corregir algunos otros aspectos odontológicos<sup>21, 78</sup>. A nivel cardiovascular el cardiólogo será el indicado para determinar el tipo de tratamiento y seguimiento de cada paciente<sup>79</sup>.

Actualmente el estándar de oro para el tratamiento de la prevención de un aneurisma aórtica es la administración de beta-bloqueadores. El cambio de enfoque de la enfermedad sugiere que la inhibición de la sobre-señalización del TGF- $\beta$ , ofrece un mejor resultado a largo plazo <sup>80</sup>. En ausencia de un anticuerpo anti- TGF- $\beta$  aprobado se buscaron otras opciones terapéuticas, se puso especial atención a la angiotensina, un potente vasoconstrictor que interacciona con los receptores de la angiotensina en los vasos sanguíneos e induce la fosforilación de SMAD2/3 <sup>81</sup>. Este cambio de enfoque demostró ser acertado cuando el losartán (Cozaar; Merck), antagonista del receptor tipo 1 de la angiotensina, demostró un efecto protector para la formación de aneurisma aórtico reduciendo la activación de SMAD2, aunque este mecanismo de acción no está completamente elucidado.<sup>82</sup>

Desafortunadamente estas son las únicas alternativas existente hoy en día.

## **5.9. Correlaciones genotipo – fenotipo**

La identificación de mutaciones asociadas con el SMF es el paso inicial para evaluar las manifestaciones clínicas y la severidad del fenotipo asociado a cada una de las variantes o a un determinado tipo de variante<sup>83,84</sup>.

Los pacientes con las formas más severas y más progresivas de la enfermedad lo que en ocasiones se denominan síndrome de Marfan neonatal, suelen presentar mutaciones en la parte central del gen, entre los exones 24 y 32 . Sin embargo, esta no es una norma general, ya que hay individuos con esta forma neonatal que presentan mutaciones en otros exones, e individuos con formas ligeras de la enfermedad que sí presentan alteraciones en estos exones <sup>85</sup>.

Como regla general, las mutaciones que producen inserciones o depleciones con cambio o desplazamiento del marco de lectura, o errores en la zona de corte y empalme (*splicing*) se asocian con formas más severas de la enfermedad. Sin embargo, mutaciones que crean un codón prematuro de

terminación provocando una rápida degradación de los mutantes transcritos pueden asociarse con formas menos agresivas de la enfermedad que en ocasiones no cumplen los criterios diagnósticos. Los pacientes con mutaciones que alteran el proceso del propéptido C-terminal han sido relacionadas con afectaciones predominantemente esqueléticas de la enfermedad <sup>86, 87</sup>.

Es evidente que se necesita recopilar información sobre las consecuencias clínicas y el fenotipo asociado a las diferentes mutaciones, ya que mutaciones con un mismo mecanismo pueden tener consecuencias clínicas diferentes, como se demuestra en otras patologías de causa genética.<sup>10</sup>

## 6. Justificación

Debido a la elevada mortalidad de las personas que padecen este síndrome se requiere un estudio más detallado del Síndrome de Marfán. Un punto importante a destacar es la falta de información en nuestro país, ya que no se tiene conocimiento de un registro de casos por año, ni se cuentan con estudios moleculares de cualquier índole. Esta alarmante falta de información provoca que el diagnóstico de los pacientes sea complejo y confuso, al igual que el manejo del síndrome y el control de las diversas complicaciones. Aunado a esto, el establecimiento del diagnóstico sea correcto o no, puede ser estigmatizante, ya que puede obstaculizar las aspiraciones profesionales, restringir las oportunidades de seguros de vida y crear una carga psicosocial en etapas tempranas de la vida.

El hecho de que no exista una prueba diagnóstica específica no hace más que empeorar el panorama para los pacientes. Los criterios de diagnóstico se refieren al daño en los sistemas ocular, músculo esquelético y cardiovascular, como criterios mayores, mientras que el sistema pulmonar, de piel y tegumentos, la ectasia dural y la historia familiar/genética proporcionan únicamente criterios menores. Las características físicas presentes en el Síndrome de Marfán tienen un alto grado de solapamiento y similitud con otras características físicas en otros síndromes, como son el Síndrome de Loeys-Dietz, el Síndrome de Shprintzen-Goldberg y el Síndrome de Ehlers-Danlos, principalmente; dejando la valoración de estas características físicas al criterio del médico en turno a pesar de la existencia de patrones establecidos. Además, algunas de estas características físicas únicamente están presentes cuando los pacientes están en edad adulta, dejando a la población infantil completamente desprotegida. Al obtener un diagnóstico clínico y molecular en estos pacientes nos permitiría realizar un diagnóstico temprano y certero asegurando la prevención de complicaciones propias de la enfermedad, así como un manejo y tratamiento personalizado, mejorando significativamente la calidad de vida tanto de pacientes como sus familiares.

## **7. Hipótesis**

Si, las mutaciones en el gen FBN1 están asociadas con el fenotipo de los pacientes con SMF, entonces esto permitirá establecer un patrón para la caracterización y diagnóstico diferencial del síndrome y determinar con ello señales de la severidad del síndrome.

## **8. Objetivo principal**

Realizar una búsqueda de variantes génicas, en el gen FBN1 así como en los genes relacionados a otras fibrinilopatías, y determinar si existe alguna correlación entre estas variantes con las características fenotípicas de pacientes mexicanos

### **8.1. Objetivos secundarios**

- 1.1. Realizar una búsqueda exhaustiva en la literatura para seleccionar las variables a extraer del expediente clínico de los pacientes seleccionados; y realizar la construcción de la correspondiente base de datos.
- 1.2. Construir una base de datos clínicos y demográficos de los pacientes incluidos en el estudio, así como una genoteca y una seroteca de las muestras de pacientes con diagnóstico de Síndrome de Marfán, fibrinilopatías asociadas y de ser posible de sus familiares cercanos.
- 1.3. Realizar una búsqueda exhaustiva en la literatura para seleccionar las zonas con mayor número de variantes clínicamente significativas en el SMF.
- 1.4. Realizar un tamizaje molecular utilizando la técnica HRM, en las zonas de mayor frecuencia polimórfica y mayor número de eventos clínicamente significativos en los genes FBN1 y TGF $\beta$ R-2.
- 1.5. Realizar por enriquecimiento selectivo y secuenciación masiva, el escaneo de variantes génicas de 14 genes relacionados al Síndrome de Marfán y fibrinilopatías asociadas.
- 1.6. Evaluar la calidad de datos y realizar la limpieza de los mismos para filtrar las variantes genéticas sin importancia clínica.

- 1.7. Analizar la predicción funcional, así como la conservación de dominios proteicos, para seleccionar las variantes genéticas que pudieran actuar como mutaciones causales.
- 1.8. Confirmar por secuenciación tipo Sanger las variantes genéticas cuyo resultado de balance alélico en la secuenciación masiva sea menor a 0.30 o mayor a 0.70; así como algunas que caigan dentro del balance alélico 0.31 – 0.69 a manera de control de calidad.
- 1.9. Comparar las características clínicas de los pacientes con Síndrome de Marfán contra las fibrinopatías asociadas (LDS, SGS, EDS).
- 1.10. Realizar los árboles genealógicos correspondientes para estudiar penetrancia de enfermedad y/o mutaciones.
- 1.11. Analizar si existe alguna correlación genotípica-fenotípica entre los genes estudiados y las características fenotípicas.

## **9. Metodología**

Este es un estudio observacional, transversal, retrolectivo y retrospectivo cuya recolección de muestras y reclutamiento de pacientes se realiza desde el año 2010 en el Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"; así como en las reuniones anuales magistrales de pacientes con Síndrome de Marfán realizadas también en el INC.

### **9.1. Tamaño de la muestra**

El poder estadístico muestral se determinó al final del proyecto, sin embargo, al ser parte de una institución nacional de alta especialidad, se cuenta con un número elevado de pacientes considerando que el SMF es un síndrome de baja incidencia.

### **9.2. Población de estudio**

Nuestra población está compuesta por pacientes de la consulta externa del INC. En todos los casos, los individuos fueron valorados previa e individualmente y cuentan con diagnóstico de fibrinilopatía por la especialista y experta en el tema la Dra. María Elena Soto López. Los pacientes no cuentan con alguna otra enfermedad crónica.

Así mismo, se realizó el reclutamiento de los familiares cercanos a los pacientes si así lo permitían. Con fines técnicos de la metodología seleccionada se realizó el reclutamiento de 90 controles, estos individuos no presentan alguna característica física de alguna fibrinilopatía, ni contaban con diagnóstico de alguna enfermedad crónica.

Se consideraron como pacientes de nacionalidad mexicana a aquellos con al menos 2 generaciones anteriores de nacimiento y características físicas mexicanas.

Este proyecto está aprobado por el comité de ética del Instituto Nacional de Cardiología y se cuentan con los consentimientos firmados de los pacientes. En los casos de los pacientes menores de edad se cuenta con el aprobación oral de los menores, así como del consentimiento firmado por sus tutores legales.

### **9.3. Toma de muestra**

Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa de todos los sujetos después de ocho horas de ayuno y se colectó en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (1 mg/mL) y en tubos sin aditivos. De los tubos recolectados se separó el plasma y suero por centrifugación en frío a 3500 r.p.m. durante 5 minutos. Se separaron 2 mL del plasma y 2 mL del suero para la construcción de la seroteca correspondiente. La capa leucocitaria fue aislada para la posterior extracción de DNA genómico.

### **9.4. Extracción y Control de Calidad de DNA genómico**

La extracción de DNA se realizó a partir de la fracción leucocitaria extraída de sangre total mediante el equipo comercial para extracción de DNA de sangre completa *Wizard Genomic DNA Isolation Kit*, (Promega, Wisconsin) de acuerdo con lo especificado por el fabricante. La técnica se explica detalladamente en el anexo 1. El DNA fue disuelto y rehidratado en TE. Posteriormente se evaluó la cantidad y calidad de DNA obtenido se evaluó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

La integridad y pureza del DNA fue evaluado por electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando Midori Green (Labgene Scientific, Suiza) como agente revelador, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Las muestras que cumplieron una relación  $A_{260/280}$  de 1.8 a 2.2 y una relación  $A_{260/230}$  de 1.6 a 2.4 y no se encontraron degradadas fueron utilizadas

para preparar diluciones a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L para su posterior estudio.

Debido a la alta sensibilidad de la técnica seleccionada se realizó una etapa adicional de purificación, si así lo requirió la muestra utilizando el equipo comercial *Wizard Genomic DNA Clean Up System*, (Promega, Wisconsin) de acuerdo lo especificado por el fabricante. Esta técnica se explica a detalle en el anexo 1.

## **9.5. HRM**

El análisis HRM por sus siglas en inglés *High Resolution Melting Analysis* es un abordaje de nueva generación para la búsqueda de mutaciones. Esta técnica se ha utilizado con anterioridad para la búsqueda de mutaciones en el gen FBN1<sup>88,89</sup>.

El DNA de doble cadena (dsDNA) desnaturalizado puede ser detectado por cambios de fluorescencia al incrementar la temperatura de fusión, revelando diferencias sutiles en las curvas de fusión<sup>89</sup>. Para este fin requerimos la población control, de esta manera se podrán establecer las curvas de fusión de referencia en nuestra población<sup>90,91</sup>.

Esta técnica fue seleccionada debido a que es una técnica de bajo costo y alta especificidad; y que además al trabajar con un gen de gran tamaño como es el gen de la fibrilina, nos permite realizar un tamizaje para la búsqueda de mutaciones. Los ensayos se realizaron utilizando un termociclador de tiempo real de la casa comercial Bio-Rad, modelo CFX96.

### **9.5.1. Diseño de cebadores**

En la primera etapa de esta técnica se requiere de la amplificación de la zona seleccionada, lo que hace necesario el diseño de cebadores específicos y selectivos. Este diseño se realizó siguiendo los parámetros necesarios para el tipo

de enzima y colorante seleccionado. En este caso se seleccionó el complejo enzimático-colorante *Luminaris Color HRM Master Mix*, de la casa comercial Thermo Scientific, esta mezcla contiene el colorante Eva-Green® el que ha demostrado superioridad y especificidad ante otros colorantes comúnmente utilizados como SYBR-Green® y LCGreen®<sup>88</sup>.

El diseño de cebadores se realizó utilizando el software en línea gratuito *Primer 3*<sup>92,93</sup> ver. 4.0.0 y todos los cebadores cumplieron con las siguientes características:

- Contenido GC: 30 a 60%
- Longitud: 18 – 30 nucleótidos
- Temperatura de fusión (Tm): Aprox. 60°, y sin diferir de 2°C entre cada par
- Evitar la formación de estructuras secundarias en el amplicón, con un puntaje menor a 3 eventos por par.
- Evitar auto-complementaridad de los cebadores, con un puntaje mínimo menor a 3 eventos por par.
- Calidad: Desalados
- Tamaño del producto final: Menor a 450 pb

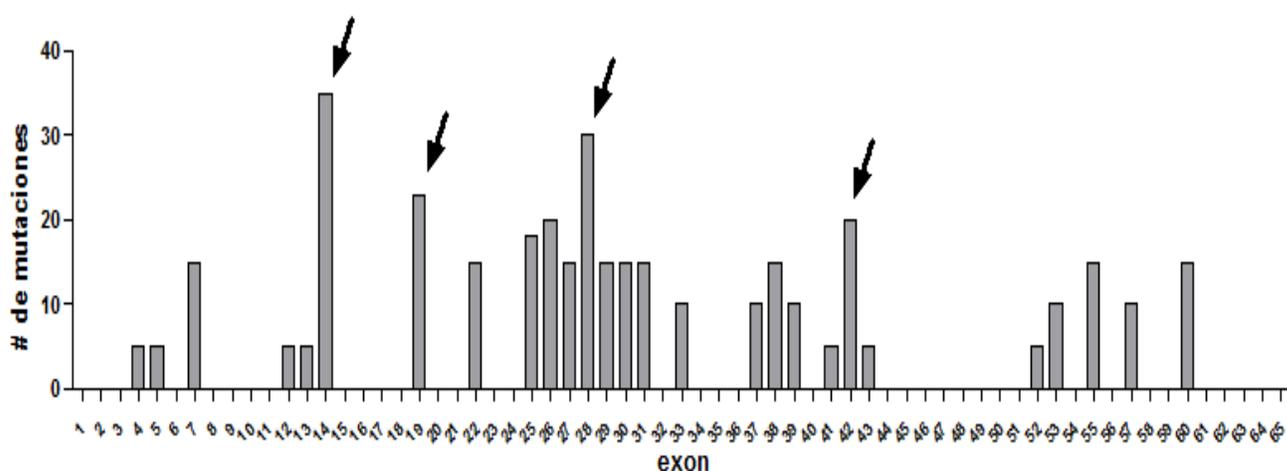
Finalmente los cebadores fueron revisados en el software gratuito en línea *SNPCheck* ver. 3, esta es una herramienta para efectuar revisiones de la presencia de SNPs en los sitios predichos de unión de cebadores. Así mismo, se efectuaron PCR *In-silico* en las bases de datos UCSC y NCBI (Blastn) para la confirmación de especificidad de productos.

## **9.6. Selección de exones a analizar**

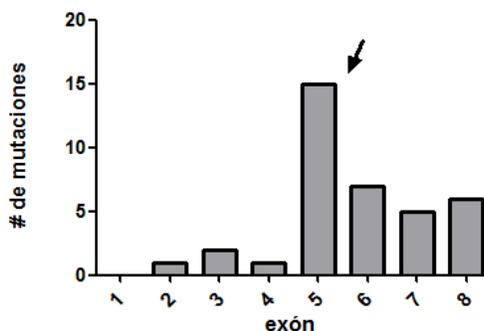
Debido al gran tamaño del gen FBN1 y al elevado número de variaciones reportadas, se realizó una búsqueda en las bases de datos dbSNP (37.1) y UMD (ver, 2013), para seleccionar las zonas que presenten un mayor número de reportes de mutaciones de mayor relevancia clínica, es decir, aquellas mutaciones

que provoquen un codón de termino prematuro o un cambio de aminoácido. El resultado de esta selección se muestra en la Gráfica 1 y Gráfica 2. Para ambas gráficas los reportes se encuentran agrupados según exones, utilizando la base de datos dbSNP (versión, 2014) y los exones se encuentran señalados con flechas.

Se abordó este tipo de análisis para poder enfocarnos en aquellas mutaciones que podrían ser responsables de la mayoría de los fenotipos patognómicos del Síndrome de Marfan. De esta manera seleccionamos los exones 14, 19, 28 y 42. Bajo estos mismos criterios se seleccionó el exón 5 del gen TGFβR2.



**Gráfica 1** Reporte de mutaciones clínicamente significativas en el gen FBN1.



**Gráfica 2** Reporte de mutaciones clínicamente significativas en el gen TGFBR2.

## 9.7. Secuenciación de DNA tipo Sanger

Para confirmar las variantes encontradas se realizó la secuenciación de la zona estudiada en un reacción de secuenciación basada en electroforesis capilar (CE). Estos sistemas basados en CE representan la próxima generación de secuenciación automática y permiten obtener lecturas de aproximadamente 500pb con un 99% de precisión. La metodología de electroforesis capilar consiste en los siguientes pasos:

- a) Amplificación de la zona seleccionada. Para realizar esta etapa se requiere de la amplificación de la zona seleccionada utilizando cebadores diseñados que cumplan todas las características previamente mencionadas. La técnica se explica en detalle en el anexo 1.
  
- b) Purificación de los productos amplificados. Tras amplificar la zona seleccionada se deberá realizar la purificación de estos productos utilizando las enzimas Exonucleasa I (Exo I) y alcalina fosfatasa (CIAP). Exo I degrada el ADN de una sola cadena en una cadena dirección 3' --> 5', liberando desoxirribonucleósidos 5' monofosfatos en una manera escalonada, dejando dinucleótidos 5' intactos. La enzima CIAP hidroliza los grupos 5' monofosfato del ADN. El protocolo se describe a detalle en el anexo 1.
  
- c) Reacción de secuenciación. Esta reacción se realizó utilizando el equipo comercial para secuenciación *Big Dye Terminator v 3.1* el cual es un sistema listo para usar que contiene la enzima provista y una mezcla maestra que contiene los reactivos para la reacción de PCR, así como los reactivos encargados de la limpieza de la reacción, estos digieren los nucleótidos no incorporados. Los cebadores se utilizan en una concentración de 3.2 pmol y se utiliza 1  $\mu$ L de la reacción resultante de la etapa de purificación.

d) **Análisis de datos.** Finalmente la reacción de secuenciación es analizada en la plataforma *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* siguiendo el procedimiento requerido. Finalmente las secuencias fueron visualizadas y analizadas utilizando el software *CLC DNA Workbench ver 5.7.1.*

## **9.8. Secuenciación masiva**

Hasta ahora, los métodos convencionales tales como HRM y secuenciación tipo Sanger siguen siendo el estándar de oro para la búsqueda de mutaciones y el diagnóstico molecular de muchas enfermedades genéticas; sin embargo, estos procedimientos requieren una cantidad considerable de tiempo y son costosos, especialmente la secuenciación tipo Sanger<sup>94</sup>. Hoy en día la secuenciación de nueva generación (NGS), o secuenciación masiva, ha alcanzado su madurez y a superado las dificultades técnicas, dando lugar a una nueva herramienta que permite la secuenciación, como su nombre lo indica, de numerosas regiones pequeñas de interés, en una gran cantidad de pacientes simultáneamente<sup>95,96</sup>.

En el Centro de Enfermedades Genéticas de la Universidad de Amberes (CMG) desarrollaron una estrategia de diagnóstico molecular para un conjunto de genes que son causantes de aneurisma aórtico (TAAD) utilizando secuenciación masiva<sup>97,98</sup>.

Este panel está formado por 14 genes causantes de TAAD congénito o genes involucrados en el desarrollo de TAAD, este panel incluye genes como: Actina Alfa-2 de músculo liso (ACTA2), Colágeno tipo III, alfa I (COL3A1), Proteína 2 de la matriz extracelular EGF que contiene dominios tipo fibulina (EFEMP2), Fibrilina 1 (FBN1), Filamina A (FLNA), Miosina de músculo liso, polipéptido de cadena pesada 11 (MYH11), Cinasa de la cadena ligera de miosina (MYLK), Proteína 1 neurogénica homóloga al locus notch (NOTCH1), Proto-oncogén tipo Ski (SKI), Acarreador de solutos de la familia 2 (transportador facilitado de glucosa), miembro 10 (SLC2A10), Miembro tres de la familia de factores de transcripción SMAD (SMAD3), Factor de crecimiento tumoral beta 2 (TGFB2),

Receptor 1 del factor de crecimiento tumoral beta (TGFBR1) y Receptor 2 del factor de crecimiento tumoral beta (TGFBR2), los productos finales y su cobertura se muestran a detalle en la Tabla 4.

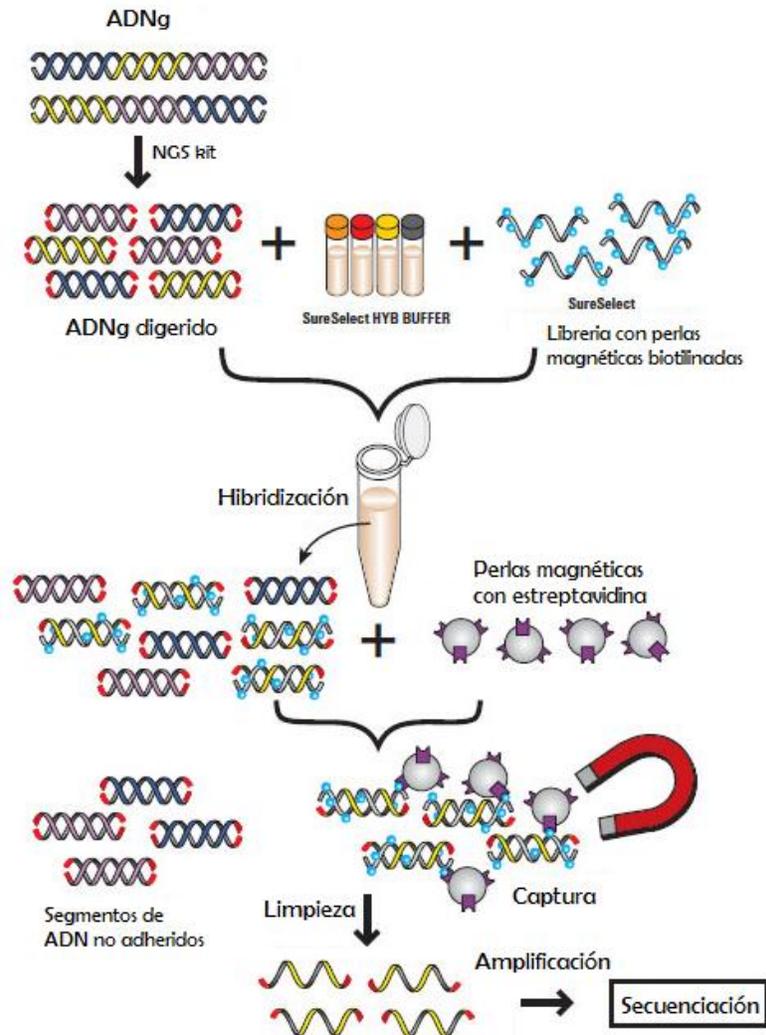
Gen	OMIM	Número de exones cubiertos	Transcrito	% teórico de cobertura
ACTA2	102620	8	ENST00000458208	99.9
COL3A1	120180	51	ENST00000304636	99.7
EFEMP2	604633	10	ENST00000307998	100.0
FBN1	134797	65	ENST00000316623	100.0
FLNA	300017	47	ENST00000369850	100.0
MYH11	160745	41	ENST00000452625	100.0
MYLK	600922	31	ENST00000360304	99.3
NOTCH1	190198	34	ENST00000277541	100.0
SKI	164780	7	ENST00000359271	100.0
SLC2A10	606145	5	ENST00000327367	100.0
SMAD3	603109	9	ENST00000378536	100.0
TGFB2	190220	8	ENST00000366929	100.0
TGFBR1	190181	9	ENST00000374994	100.0
TGFBR2	190182	8	ENST00000359013	100.0

**Tabla 4. Lista de genes incluidos en el panel utilizado en el CMG para el diagnóstico molecular de aneurisma aórtico.**

El enriquecimiento de las zonas de interés fue realizado mediante un diseño personalizado para el panel de genes previamente mencionados, utilizando un equipo comercial Haloplex (*Haloplex target enrichment kit, Agilent Technologies, Santa Clara, CA*), seguido de una secuenciación de 150 pb doblemente pareada para su uso en la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, California).

Los ensayos fueron diseñados para cubrir todos los exones, incluyendo regiones intrónicas-exónicas  $\pm$  200 pb, utilizando el software gratuito en línea (*Haloplex Design Wizard*) de la casa comercial mencionada, El tamaño aproximado del enriquecimiento por cada muestra es de fragmentos de 189 kb

para cubrir una región total de 62,321 pb. Los enriquecimientos fueron realizados de acuerdo al protocolo provisto que se detalla en el anexo 1.



**Figura 7. Sistema de enriquecimiento dirigido Sure Select.**

Una breve explicación de este protocolo se muestra en la Figura 7. Tras la digestión del DNAg por una serie de 16 reacciones enzimáticas, estas muestras son hibridadas con los ensayos diseñados y etiquetas individuales para cada paciente. Estos ensayos son marcados con biotina y están diseñados para hibridarse por ambos costados de los fragmentos digeridos, generando así fragmentos circulares. Este DNA hibridado se captura con perlas magnéticas con

estreptavidina para eliminar los fragmentos lineales al igual que los fragmentos no hibridados. Tras una reacción de ligación para completar por completo los fragmentos circulares; el DNA es eluido de estas perlas y amplificado por una reacción PCR. Posteriormente se realiza una reacción de purificación para los productos obtenidos utilizando perlas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Finalmente las muestras son cuantificadas por un método fluorométrico (Qubit, Life Technologies, Carlsbad, CA) y por una reacción de PCR cuantitativo (qPCR) para generar una mezcla equimolar de las muestras a secuenciar.

### **9.8.1. NGS y Análisis de Datos**

El enriquecimiento de muestras fue realizado de acuerdo al diseño personalizado en el equipo comercial Haloplex, tras una secuenciación de nueva generación (NGS) mediante la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA) utilizando lecturas de 150 pb doblemente pareadas. Se cargaron en las celdas de flujo mezclas de las muestras a una concentración equimolar de 8pM. Para manejar los archivos resultantes en formato FASTQ, fue diseñada una serie de pasos resumida en el anexo 2. Primeramente las secuencias adaptadoras fueron cortadas tomando como base umbral una puntuación Phred > 30 utilizando un software desarrollado en el CMG<sup>99</sup> y fue mapeado utilizando el software BWA mem v.0.7.4, contra el genoma de referencia GRCh37<sup>100</sup>.

Este software fue seleccionado por su alta especificidad al manejar lecturas mayores a 70 pb, que son típicas de la plataforma MiSeq. El mapeo de las lecturas fue optimizado utilizando el kit de herramientas GATK v2.8.1, siguiendo las buenas prácticas recomendadas<sup>101</sup>. Esto incluye un re-alineamiento alrededor de inserciones y depleciones putativas, seguidas por una recalibración de los valores de calidad. Ambos pasos se realizaron para cada muestra. La genotipificación se realizó a través del software Genotyper unified GATK<sup>102,103</sup>.

Al combinar el uso de genotipado de una sola muestra y el genotipado de múltiples muestras a la vez, se incrementa la sensibilidad para la detección de

ambos casos, aquellas variantes comunes que son cubiertas moderadamente y aquellas variantes que son poco comunes, pero que tienen un buen nivel de cobertura. La anotación de inserciones y deleciones fue normalizadas para una comparación óptima entre muestras utilizando el método GATK LeftAlignAndTrim. Finalmente el llamado de variantes fue reorganizado para generar archivos independientes según la muestra. Con fines de control de calidad se realizaron informes FastQC pre y post recortado para todos los archivos FastQ.

Para evaluar el rendimiento del análisis, se generaron informes detallados de cobertura utilizando las herramienta desarrolladas en CMG, estas se basan en el software de análisis Coverage Bed. Estos informes contienen la especificidad del objetivos, resumen de la cobertura total, reportes de nivel de cobertura a nivel exón y base por base. Los archivos resultantes en formato VCF fueron integrados a la plataforma desarrollada en CMG Variant DB para la anotación y filtrado de variantes. VariantDB combina anotaciones de GATK, ANNOVAR, snpEff, Gene ontology, entre otros, permitiendo el filtrado de datos por cualquiera de las bases de datos utilizadas. Los datos utilizados fueron filtrados utilizando dbSNP (NCBI), Exome Variant Server (NHLBI Go Exome Sequencing Project (ESP), Seattle WA), utilizando el genoma de referencia GRCh37 <sup>104</sup> .

Se realizó una inspección visual de las listas de variantes resultantes utilizando el visor IGV y para evaluar el efecto del sitio de empalme de variantes sinónimas e intrónicas. fue utilizado el software ALAMUT (Biosoftware interactiva, Rouen, Francia) <sup>105,106</sup>. Para encontrar la mutación causal del SMF fueron removidas aquellas variantes que se encontraban en zonas no codificantes. (UTR5', UTR3', ncRNA, intrónicas e intergénicas) y fuera de equilibrio alélico. De la misma manera fueron eliminadas mutaciones que representaban un cambio sinónimo, excepto aquellas en posible sitio de empalme ( $\pm 25$  pb), Igualmente fueron eliminadas aquellas variantes con un frecuencia de alelo menor (MAF) mayor a 0.05. Posteriormente se eliminaron aquellas variantes con valor benigno según los análisis de predicción funcional de los software MutTast<sup>107</sup>, Polyphen 2<sup>108</sup>, SIFT<sup>109</sup> y fueron mantenidas aquellas que presentaban valor desconocido,

dañino o tolerado en al menos una puntuación de estos análisis. Finalmente se realiza una inspección utilizando el visor IGV para eliminar la posible presencia de falsos positivos. En el anexo II se muestra un diagrama que detalla esta serie de pasos, así como los valores de selección<sup>110</sup>.

### **9.9. Recolección de variables y construcción de base de datos.**

Tras la evaluación clínica se accedió al expediente clínico electrónico de los pacientes del INC, se obtuvo información de variables antropométricas como: género, edad, altura, peso, fecha de nacimiento, brazada; así como información de herencia familiar. También se obtuvo información del tipo de tratamiento asignado, del tipo de cirugía y fecha de inicio de complicaciones. Se obtuvo información de presencia de características fenotípicas como: dolicocefalia, micrognatia, retrognatia, tipo de afectación en pectum, tipo de paladar, escoliosis, luxación del cristalino, ectasia dural, arnodactilia, hipoplasia malar, afectaciones en pies, sobreposición dentaria, miopía, campodactilia, hipermovilidad, úvula bífida, estrías, signos de Walker-Murdock, Steinberg, retraso mental y comorbilidades ajenas al síndrome. Se recolectó información de las ecocardiografías realizadas periódicamente a los pacientes. Se obtuvo información correspondiente a las dimensiones en milímetro de válvula mitral (VM), raíz aórtica (RA), aorta (Ao), aurícula izquierda (AI), ventrículo izquierdo (VI), tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), tabique interventricular (TIV), pared posterior del ventrículo izquierdo (PPVI), tracto de salida del ventrículo izquierdo (TSVI), aurícula derecha (AD), tracto de salida del ventrículo derecho (TSVD), tronco de la arteria pulmonar (TAP) y sus ramas derecha e izquierda (RD) y (RI), relación E/A y la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI).

La selección de variables se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por Soto-López et al. en un estudio previo en nuestra población<sup>8</sup>, además de los criterios establecidos para el diagnóstico del SMF<sup>62,111</sup>.

## 9.10. Análisis Estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los programas SPSS (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp) y R (R-project para Windows ver 3.2.0, Viena Austria). En la tabla 5 se muestra un resumen de los análisis efectuados.

Tipo de Variable	Metodología	Análisis
Sexo, Edad	Revisión de expediente clínico	Descriptivo
Características físicas		Diagnóstico clínico
Alteraciones esqueléticas, oculares y cardiovasculares		contrastes ortogonales, correlaciones según Spearman
Antecedentes familiares		
Inicio de complicaciones		
Razón y tipo de intervención quirúrgica		
Información genética	HRMA/NGS	Análisis de predicción funcional. Correlación según Spearman.

**Tabla 5. Resumen del enfoque estadístico utilizado. Se muestran los diferentes tipos de variable, la metodología de obtención y el tipo de análisis efectuado sobre ellas.**

Para fines descriptivos se usaron las variables de sexo, edad, estatura, peso, así como las variables de características físicas previamente mencionadas.

Tras comprobar el cumplimiento de criterios de Gante de nuestra población, la población fue sub-clasificada de acuerdo a la edad, los individuos con una edad mayor o igual a 18 años conforman el grupo de adultos, mientras que los sujetos menores a 18 años conforman la población menor de edad. Los valores z de dilatación aórtica fueron calculados pre y post cirugía utilizando dos métodos de ajuste diferentes, el valor z2 el cual realiza un ajuste por el área superficial corporal (BSA) y el valor z3 el cual realiza un ajuste por peso y altura<sup>112</sup>. Para la población infantil se calcularon los mismos valores z, tomando en consideración los ajustes necesarios<sup>113,114, 115</sup>. También fue calculada la dilatación aórtica por año.

En cuanto a la información molecular se realizaron análisis de predicción funcional utilizando los programas SIFT, Polyphen2 y MutTast, y tras encontrar la posible mutación causal se realizó una búsqueda en la literatura para localizar reportes previos así como alguna correlación fenotípica reportada. Estas posibles mutaciones fueron clasificadas de acuerdo a las guías para la evaluación y clasificación de patogenicidad para variantes genéticas<sup>116</sup>.

Para esclarecer las diferencias clínicas y físicas entre grupos, se utilizó una prueba T-Student para muestras independientes comparando la población adulta contra la población menor de edad. Se buscó la correlación entre las variantes genéticas previamente clasificadas con alguna variable cardiovascular y/o fenotípica, esto último se realizó individualmente por paciente y en la población total, utilizando contrastes ortogonales.

## 10. Resultados

### 10.1. Tamaño de la muestra

El poder estadístico muestral fue calculado al finalizar la recolección de pacientes para el proyecto, la población final consistió en 59 pacientes adultos con diagnóstico de SMF. Ya que nuestro país no cuenta con datos de la incidencia del síndrome, se utilizó la variable de dimensión de raíz aórtica de los pacientes pre quirúrgica obtenida por ecocardiografía y estos valores fueron comparados contra una población control adulta perteneciente al INC<sup>117</sup>. Se muestran los valores en la tabla 6.

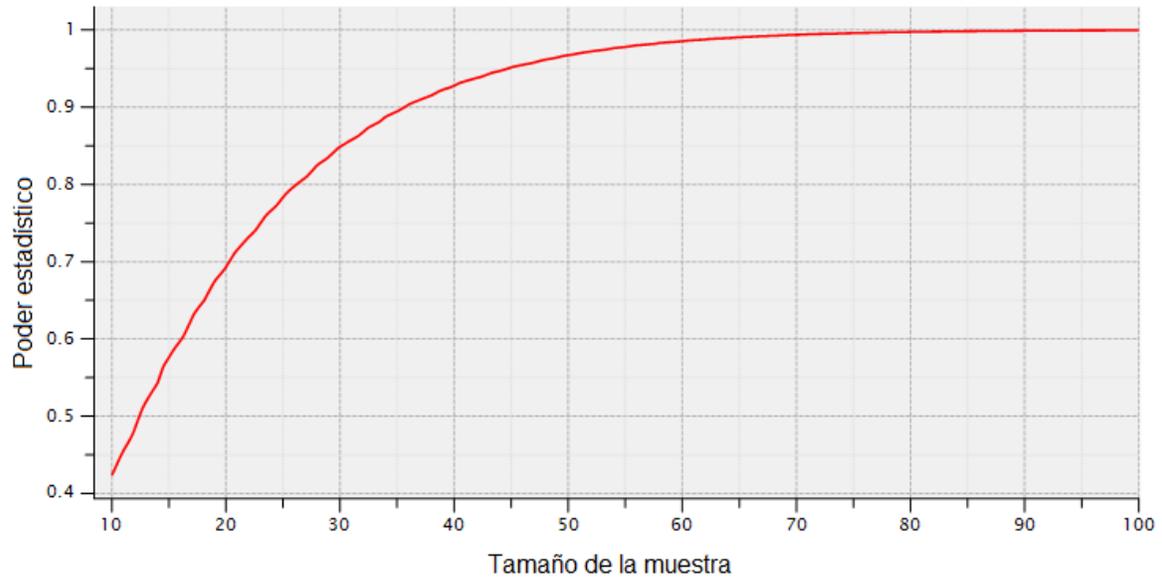
	Grupo Control	Población SMF
n	22	59
Ao (mm)	14.84 ± 1.85	17.92 ± 3.93

**Tabla 6. Valores de raíz aórtica de una población adulta control y de la población adulta en estudio con diagnóstico de SMF corregidos por BSA. Se muestran los valores como medias ± desviación estándar.**

Los valores de la población de nuestro estudio fueron corregidos por superficie corporal de la misma manera que fue corregida la población control utilizando la fórmula siguiente<sup>118</sup>:

$$BSA = \text{Peso (kg)}^{0.5378} * \text{altura (cm)}^{0.3964} * 0.024265$$

El tamaño de efecto calculado es de 1.00383. Se realizó el cálculo del poder estadístico muestral mediante una prueba post-hoc de diferencias de medias para muestras independientes a dos colas, con un valor de error alfa de 0.05 utilizando el programa *G Power* ver 3.1 (Erdfelder, Faul, & Buchner, 1996). En la gráfica 3 se muestra el poder estadístico en función del tamaño de la población. Nuestro poder estadístico muestral es de un 95%.



**Gráfica 3. Poder estadístico en función del tamaño muestral con un valor  $\alpha = 0.05$  y un tamaño de efecto de 1.**

## 10.2. Características de la población de estudio

El diagnóstico clínico fue realizado por la especialista en el tema la Dra. María Elena Soto López este diagnóstico fue adquirido en el expediente clínico de cada paciente. Para fines de diagnóstico molecular solo fueron seleccionados los pacientes índices y un representante de cada familia para su análisis en el panel de 14 genes por secuenciación masiva. En la Tabla 7 se muestran las características clínicas y fenotípicas de los pacientes seleccionados con diagnóstico clínico de SMF clasificados por edad, es decir, en población mayor y menor de 18 años.

Variable	SMF adulta	SMF menor de edad
n	59	28
Altura (cm)	177 ± 11.7 (142-202)	161 ± 28.0 (73-189)
Edad (años)	31 ± 13.6 (18-60)	12.5 ± 4.4 (1-17)
Brazada (cm)	184.0 ± 13.9 (162-228)	168 ± 28.0 (80-191)
Edad de inicio de complicaciones (años)	30.5 ± 15.3 (2-57)	6 ± 5.05 (0.3 - 16)
Sin complicaciones (%)	7.7%	7.4%
<b>Antecedentes familiares</b>		
Con historia familiar (%)	71.8	74.2
Sin historia familiar (%)	28.1	25.8
<b>Alteraciones oculares</b>		
Ectopia Lentis (%)	39.5	46.4
Otros (%)	24.1	32.5
<b>Alteraciones cardiovasculares</b>		
Complicaciones cardiovasculares (%)	86.3	92.3
Raíz aórtica pre quirúrgica (mm)	57 ± 13.9 (33-87)	37 ± 11.6 (23-51)
Dilatación aórtica por año (mm)	2.0 ± 8.7 (1-26)	1.5 ± 1.3 (0.1-4)
<b>Intervenciones quirúrgicas</b>		
Cardiovasculares (%)	46.5	16.0
Correctivas (%)	2.3	4.0
<b>Diagnóstico Molecular</b>		
Corresponde (%)	74.3	59.3
Negativo (%)	25.6	40.7
<b>Características fenotípicas</b>		
Dolicocefalia (%)	61.4	82.1
Migronatia (%)	65.2	64.3
Pectum (%)	63.0	67.9
Pie (%)	54.3	75.0
Hipoplasia malar (%)	69.6	71.4
Paladar ojival (%)	91.3	81.5
Escoliosis (%)	44.4	55.5
Ectasia dural (%)	46.6	42.3
Aracnodactilia (%)	47.8	39.3
Sobreposición dentaria (%)	56.5	44.4
Signo de Walcker Murdock (%)	62.7	71.4
Signo de Steinberg (%)	52.5	57.1
Estrías (%)	70.5	50.0
<b>Tratamiento</b>		
B-bloqueadores	44.4	28.6
Inhibidores de la ECA	11.1	5.0
Agente antiarrítmico	8.9	5.0
Agente anticoagulante	23.7	28.6
Agente antiplaquetario	28.9	5.0

Antagonista de la Ag II	54.5	70.0
-------------------------	------	------

**Tabla 7. Descripción por edad de los pacientes seleccionados con SMF**

**Los resultados se muestran como mediana  $\pm$  desviación estándar y (rango).**

Fue comparada la población adulta contra la menor de edad encontrando diferencias estadísticamente significativas en peso ( $p > 0.001$ ; IC95% 22.2-39.2), talla ( $p > 0.001$ ; IC95% 16.5-39.2), edad ( $p > 0.001$ ; IC95% 18.6-27.1), brazada ( $p > 0.001$ ; IC95% 16.9-40.0), porcentaje de cirugías cardiovasculares ( $p = 0.003$ ; IC95% -0.1 a -0.6), dilatación aórtica anual ( $p = 0.009$ ; IC95% 1.3 a 8.09) y dilatación aórtica actual ( $p = 0.033$ ; IC95% 1.6 a 35.4).

En la Tabla 8 se muestran los pacientes con diagnóstico diferente a SMF igualmente clasificados según la edad.

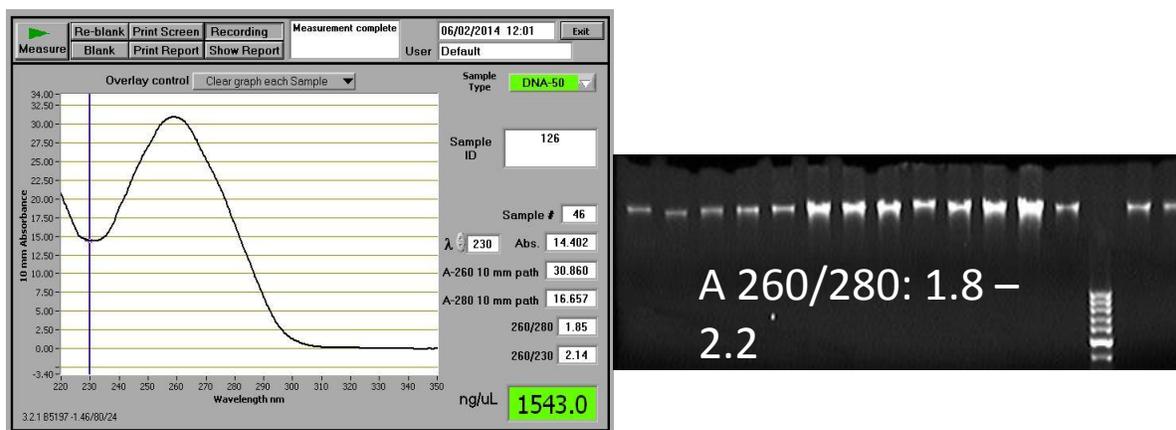
Variable	LDS infantil	EDS infantil
n	2	3
Altura (cm)	164.5 $\pm$ 14.8 (154-175)	163.5 $\pm$ 9.2 (157-170)
Edad (años)	15 $\pm$ 1.4 (14-16)	14 $\pm$ 1.2 (12-14)
Brazada (cm)	173.5 $\pm$ 20.5 (159-188)	172.0 $\pm$ 16.9 (160-184)
Edad de inicio de complicaciones (años)	-	-
Sin complicaciones (%)	100	100
<b>Antecedentes familiares</b>		
Con historia familiar (%)	100	66.6
Sin historia familiar	0%	33.3
<b>Alteraciones oculares</b>		
Ectopia Lentis (%)	0	33.3
Otros (%)	0	0
<b>Alteraciones cardiovasculares</b>		
Raíz aórtica pre quirúrgica (mm)	21 $\pm$ 1.4 (20-22)	37 $\pm$ 10.1 (23-51)
Dilatación aórtica por año (mm)	-	1.4 $\pm$ 0.8 (0-3)
<b>Intervenciones quirúrgicas</b>		
Cardiovasculares (%)	0	66.6
Correctivas (%)	0	0
<b>Diagnóstico Molecular</b>		
Corresponde (%)	100	100
Negativo (%)	0	0
<b>Características fenotípicas</b>		
Dolicocefalia (%)	100	33.3

Migronatia (%)	50	33.3
Pectum (%)	50	66.6
Pie (%)	100	66.6
Hipoplasia malar (%)	100	33.3
Paladar ojival (%)	100	0
Escoliosis (%)	50	66.6
Ectasia dural (%)	0	33.3
Aracnodactilia (%)	100	33.3
Sobreposición dentaria (%)	100	33.3
Signo de Walcker Murdock (%)	50	3.3
Signo de Steinberg (%)	50	33.3
Estrías (%)	50	33.3

**Tabla 8 Descripción por edad de los pacientes seleccionados con diagnóstico diferente a SMF**

### 10.3. Extracción y cuantificación de ADN genómico

Se realizó la extracción y cuantificación de material genético de 225 individuos en total, tanto de pacientes como de familiares, utilizando un equipo comercial. Las muestras fueron leídas y ajustadas en alícuotas a una concentración de 10 ng/ $\mu$ L (véase Figura 8). Las muestras que no cumplieron con los mencionados estándares de calidad fueron purificadas.



**Figura 8 Cuantificación y evaluación de ADN genómico.**

## 10.4. HRM

Se realizó el análisis de las curvas de fusión de alta resolución (HRM) de 225 muestras de los exones 14, 19, 28 y 42 del gen FBN1; y el exón 5 del gen TGFBR2. En total se analizaron 99 muestras correspondientes a individuos control y 126 a pacientes con diagnóstico de fibrinopatía .

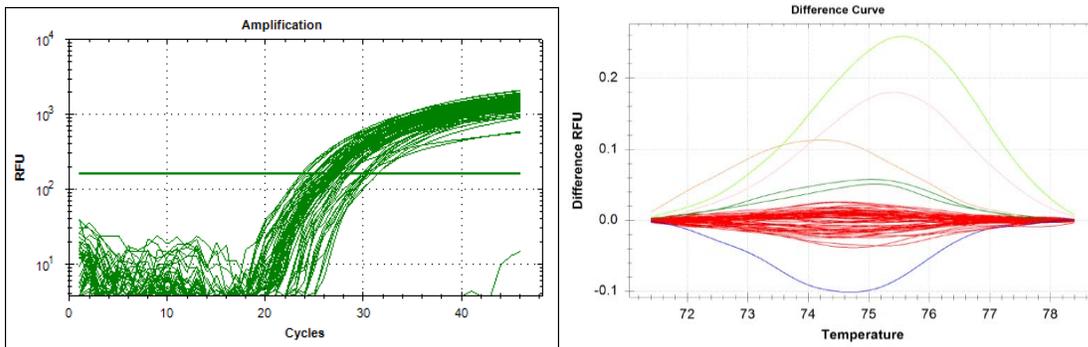


Figura 9 Curvas de fusión de alta resolución.

Después de completar las pruebas, aquellas muestras que mostraron un perfil diferente al perfil control, fueron analizadas mediante una secuenciación tipo Sanger, se muestra un ejemplo de este tipo de secuenciación en la Figura 10.

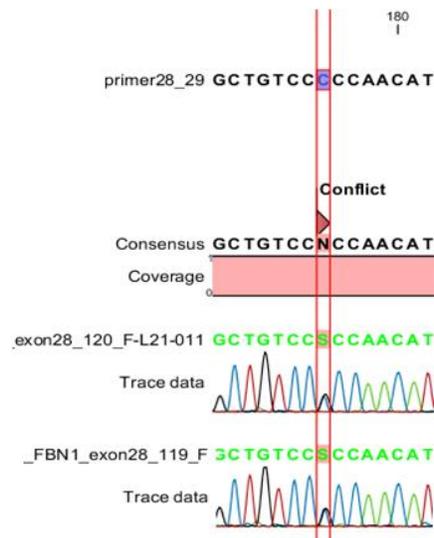


Figura 10 Ejemplo de secuenciación tipo Sanger.

En la Figura 9 se muestran los 6 diferentes perfiles de fusión hallados para el gen FBN1, en donde las curvas de color rojo corresponden al perfil control, mientras que los colores azul, verde, limón, rosa y naranja corresponden a muestras de pacientes con diagnóstico de SMF. Estos perfiles fueron normalizados y ajustados individualmente y por conjunto de exones y genes, haciendo uso del software provisto con el equipo CFX96 de Biorad.

Se ejecutó el análisis de resultados utilizando el software *CLC DNA Workbench*, y se estableció la búsqueda de las variantes encontradas en las bases de datos de acceso libre: NCBI dbSNP, eENSEMBL y UCSC. Todas las muestras analizadas bajo esta metodología demostraron ser variantes genéticas comunes ( $MAF > 0.01$ ), y/o variantes sinónimas sin relevancia clínica significativa.

## **10.5. Secuenciación masiva**

Fueron realizadas 98 reacciones de enriquecimiento selectivo para su posterior proceso de secuenciación masiva. Se siguió el algoritmo del Anexo II para la limpieza, control de calidad y extracción de datos. Fueron descartadas aquellas variables cuya  $MAF > 0.010$ , variables que no representaban ningún cambio en la estructura proteica, ya sea en base a su naturaleza (no sinónimas) y a su puntaje según los análisis de estructura proteica de SIFT, PolyPhen y MutTaster. En la Tabla 9 se muestran los resultados finales de las variantes genéticas filtradas.

Si tras la búsqueda en zonas codificantes no se encontraba alguna probable mutación se realizaba la búsqueda en las zonas intrónicas hasta con un rango de 50 pb. El porcentaje final de casos negativos en donde no fue hallada ninguna variante que pudiera ser causal, fue de 22.4%. En caso de encontrar alguna variante genética que pudiera actuar como mutación y tener material genético de familiares, se realizó la búsqueda de esta variante en la familia correspondiente. Con fines de control de calidad, fueron re-secuenciadas mediante secuenciación tipo Sanger algunas variables al azar para corroborar el

correcto orden y manejo de muestras. Las variantes que no cumplían con un equilibrio de lecturas entre 0.4 y 0.8 también fueron secuenciadas utilizando la misma técnica.

Tras la revisión de estos parámetros, se realizó un análisis de género utilizando la técnica de HRM con un posterior análisis por electroforesis de agarosa al 1.5% (véase Figura 11); así como un análisis de SNP altamente polimórficos para determinar la calidad y pureza de las muestras.

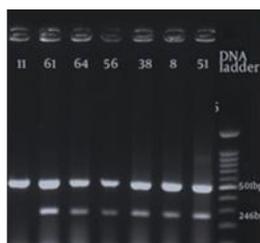


Figura 11 Electroforesis de género.

### 10.5.1. Clasificación de variantes genéticas

Tras filtrar los datos fueron encontradas 57 variantes genéticas diferentes y se confirmaron 114 variantes en total. Estas variantes fueron clasificadas según guías internacionales para la determinación de patogenicidad (véase Tabla 9 ).

Gen	Clase	Reporte	Número
FBN1	5	Sí	14
	4	Diferente	11
	3	No	21
	1	Si	1
COL3A1	4	No	1
	4	Diferente	1
	3	No	1
TGFBR1	4	No	1
TGFBR2	4	No	1
MYH11	3	No	2
MYLK	4	Sí	1
NOTCH1	3	No	2
Negativo		0	22.4%
Total			57

Tabla 9. Clasificación de variantes genéticas

FBN1, fibrilina-1; COL3A1, colágeno tipo 3 alfa 1; TGFBR1, receptor 1 del factor de crecimiento transformante; TGFBR2, receptor 2 del factor de crecimiento transformante; MYH11, miosina de cadena pesada 11 de músculo liso; MYLK, Cinasa de la cadena ligera de miosina, NOTCH1, Proteína 1 neurogénica homóloga al locus notch.

Esta clasificación fue utilizada para realizar correlaciones entre las clases de variantes y características fenotípicas. La población que resultó negativa tras la búsqueda de variantes fue comparada contra las poblaciones de diferentes clases. Y se realizaron correlaciones de Spearman comparando las diferentes clases contra las características clínicas y físicas. Solo se encontró correlación en la población adulta con diagnóstico de SMF, los valores de estas correlaciones se muestran en la Tabla 10.

Clase	Talla	Brazada
0	0.003	0.002

**Tabla 10 Correlaciones de Spearman de la población adulta negativa a variante con SMF.**

Al comparar mediante contrastes ortogonales a la población adulta y menor de edad que no presentó variantes (negativas) contra aquellas que si presentaron se encontraron las siguientes diferencias estadísticamente significativas.

Clase	Población adulta			Población menor de edad	
	3	4	5	5	5
0	RA; p=0.036; IC95% 0.9 a 4.5	ED; p=0.021; IC95% -0.8 a -0.6	BR; p=0.008; IC95% 34.9 a 5.9	lnC; p=0.045; IC95% 66.2 a 0.9	ED; p<0.001; IC95% -1.1 a -4.1

**Tabla 11 Diferencias estadísticamente significativas al comparar las poblaciones negativas a variantes**

RA, raíz aórtica; ED, ectasia dural; BR, brazada; lnC, inicio de complicaciones; IC95%, intervalo de confianza al 95%.

## **11. Análisis de Resultados**

Al pertenecer a una institución nacional de alta especialidad, como es el INC, nos permite estudiar un alto número de pacientes con diagnóstico de fibrinilopatías. A pesar de ser un síndrome genético de baja incidencia y sin datos epidemiológicos, se obtuvo un alto número de pacientes con SMF, 59 pacientes adultos y 28 niños, y 5 pacientes con otras fibrinilopatías, lo que nos permite tener un poder estadístico elevado (95%) y determinar con exactitud las diferencias clínicas y fenotípicas entre síndromes e intra-población.

Con este estudio se espera ampliar y promover la información acerca del síndrome, así como evidenciar la complejidad de diagnóstico y complicaciones presentadas; ya que actualmente nuestro país no cuenta con estudios moleculares en este tipo de población. Es importante resaltar el hecho de contar con un alto número de pacientes menores de edad, esto resalta el excelente trabajo realizado en el INC, ya que el diagnóstico clínico depende de las características físicas de la población; y muchas de estas características no son evidentes en población infantil. Se requiere de una muy alta experiencia y dedicación para poder realizar la detección del síndrome en pacientes de corta edad.

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas entre la población adulta y menor de edad, denota la correcta clasificación de las mismas. Con base a la evidencia clínica, se puede observar que la estatura promedio de los pacientes adultos es ligeramente más elevada que la estatura nacional promedio (cm), sin embargo esta diferencia es más notoria en la población menor de edad. También se puede observar que en ambas poblaciones la relación de la brazada es más elevada que la talla misma.

En relación a la edad de inicio de complicaciones, se puede observar que esta es menor a la edad, presentando valores desde los meses de edad, lo que acentúa la importancia en difusión y estudio del síndrome; ya que además de representar un alto riesgo de mortalidad, ya que al no existir tratamiento específico para el síndrome, las complicaciones asociadas causan un alto impacto en la

calidad de vida de los pacientes, de los familiares, así como un alto impacto económico para el país.

Con respecto a la diferencia estadísticamente significativa en los eventos quirúrgicos cardiovasculares entre la población adulta y menor de edad, esta se puede explicar debido a la edad y la frecuencia de complicaciones, ya que a mayor edad, mayor es la probabilidad de sufrir alguna complicación. Esta misma explicación aplica para las diferencias estadísticamente significativas en la dilatación aórtica ya que esta es directamente proporcional al paso de los años.

Debido a la baja frecuencia de pacientes con otras fibrinilopatías no fue posible efectuar pruebas de diferencias de medias, incluso realizando ajuste por método de Fischer.

Los resultados de HRM no llevaron a la correcta detección de mutaciones, esto debido a dos causas.

1. La selección de exones fue realizada en el mes de Agosto del año 2013, utilizando las bases de datos UMD y dbSNP del correspondiente año (UMD versión, 2013); sin embargo, estas bases fueron actualizadas en Noviembre del año 2014 (UMD, versión 2014), siendo imposible realizar cambios metodológicos.. Si se realiza el mismo análisis con las bases actualizadas, los exones seleccionados para el gen FBN1 serían 24, 15, 37 y 63. Además, estas bases están construidas principalmente por reportes en población europea, y solo un pequeño porcentaje corresponde a casos de Norte América, en específico USA.
2. El hecho de trabajar con un gen altamente polimórfico que presenta más de 8000 reportes de variantes genéticas, y del cual no se cuenta con información previa en población latinoamericana

Con este trabajo se pretende empezar a colaborar con información correspondiente a nuestra población, la cual ha demostrado ser muy diferente a los casos reportados en la literatura, véase Figura X. En esta figura se observa

claramente la diferencia entre las variantes clínicamente significativas reportadas en la base de datos UMD (ver.2014), contra las variantes clínicamente significativas encontradas en nuestra población, al realizar una prueba de t de Student, la diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

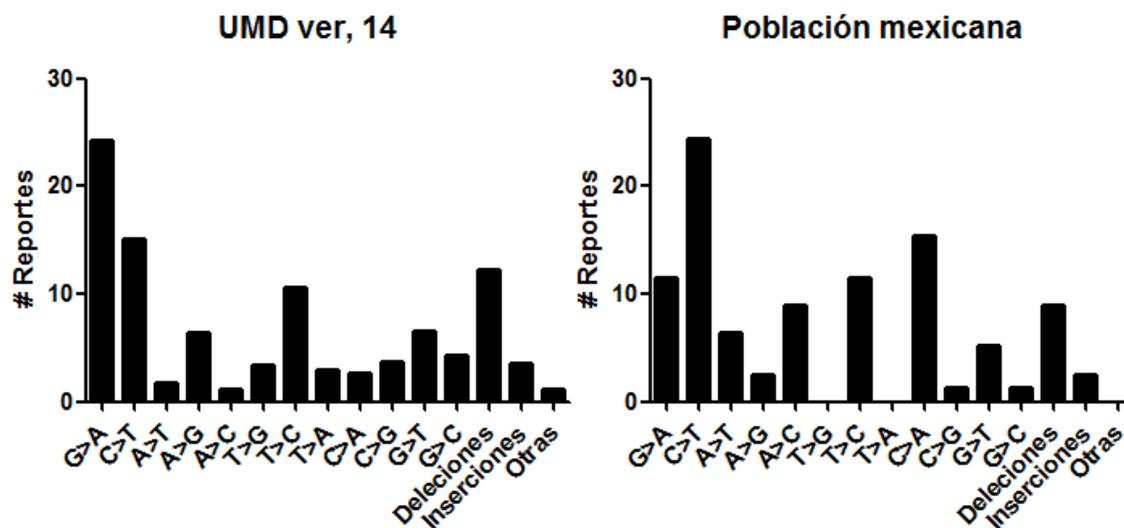


Tabla 12 Número de variantes clínicamente significativas reportadas en la base UMD ver 14, y en la población en estudio.

Con este trabajo se pretende empezar a establecer la base para la estandarización, normalización y la obtención de un perfil control para la el diagnóstico molecular utilizando la tecnología HRMA, el uso de esta técnica es de fácil aplicación en diversos centros de salud debido a su bajo costo y alta especificidad. Está técnica también podrá ser empleada para la búsqueda de mutaciones en familiares; si es que se tiene conocimiento previo de la misma en los pacientes afectados.

Gracias a las técnicas de nueva generación de amplificación selectiva y secuenciación masiva del CMG de la UZA, se pudo realizar la búsqueda de mutaciones en 92 pacientes en 14 genes. La base de datos utilizada para mapear

las muestras en estudio fue GRCh37, la cual contiene genomas de mexicanos residentes en Los Ángeles, California, USA.

Se realizó el diagnóstico molecular exitoso en el 78% de la población estudiada. Generalmente para el SMF, existe una población de alrededor del 10% que resulta negativa para la presencia de mutaciones, nuestro número de población negativa podría ser alto debido a la falta de MLPA (Amplificación de sondas dependientes de ligandos múltiples), técnica que permite la detección de deleciones, duplicaciones e inserciones cromosómicamente largas.

El 51% de las variantes encontradas no exhibe un reporte previo, lo que representa un panorama excitante para la investigación nacional del SMF, ya que a pesar de ser una enfermedad genética, la población mexicana representa un reto, pues no sigue los patrones mundiales ya estudiados.

Para determinar si estas variantes nuevas son efectivamente mutaciones, restaría realizar análisis de funcionalidad de cada variante, así como para las variantes cuyo reporte previo es diferente al encontrado.

Solo para el 26% de las variantes encontradas se puede ultimar que son verdaderas mutaciones causales, ya que para estos casos, ya se han realizado estudios de funcionalidad.

A pesar de que fueron encontradas algunas correlaciones y diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tipo de clase de variante y características fenotípicas, no se observa un claro patrón de correlación; lo que corresponde a la literatura y a la naturaleza de alta variabilidad clínica del SMF. Aunque el hecho de presentar o no alguna variante sospechosa, se tiene una diferencia estadísticamente significativa en cuanto a la presencia de ectasia dural y dilatación aórtica.

## **12. Conclusiones**

Fue analizada una población de 92 pacientes con diagnóstico de fibrinilopatía, se realizó el diagnóstico clínico para el 100% de la población, y se determinó el correcto diagnóstico molecular y diferencial para el 80% de la población.

El hecho de ser el primer estudio molecular en nuestro país y encontrar claras diferencias con lo reportado en la literatura, ya que el 74% de las variantes genéticas encontradas en nuestra población no han sido reportadas previamente, representa un panorama excitante para la investigación nacional del SMF.

No se encontró un patrón claro de correlación entre el tipo de variantes genéticas y las características fenotípicas y clínicas al analizar la población en su totalidad; sin embargo, una interesante alternativa sería realizar los mismos análisis a nivel familiar.

Con este estudio se espera aportar información sobre nuestra población y así incrementar el conocimiento del síndrome, mostrar la importancia y complejidad del diagnóstico clínico y molecular, para así poder mejorar la calidad de vida los pacientes; ya que al obtener un diagnóstico y tratamiento oportuno, tanto el número, como la frecuencia y gravedad de complicaciones se verán disminuidas.

## 13. Anexo 1. Técnicas Utilizadas

### 1.12. Extracción de DNA por equipo comercial

El equipo comercial utilizado fue *Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Wisconsin)*.

Tamaño de muestra	Solución de lisis		Solución de precipitación proteínas	Isopropanol	TE
	Celular	Nuclear			
300 $\mu$ l	900 $\mu$ l	300 $\mu$ l	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l	50 $\mu$ l
1 ml	3 ml	1 ml	330 $\mu$ l	1 ml	50 $\mu$ l
2 ml	6 ml	2 ml	667 $\mu$ l	2 ml	50 $\mu$ l
3 ml	9 ml	3 ml	1 ml	3 ml	50 $\mu$ l
10 ml	30 ml	10 ml	3.3 ml	10 ml	50 $\mu$ l

**Tabla 12. Reactivos y cantidades a adicionar según el tamaño de la muestra.**

#### Metodología:

- Por inversión mezclar la muestra con la cantidad necesaria de solución de lisis celular en tubos Falcon apropiados a las cantidades.
- Incubar por 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
- Descartar sobrenadante y agitar vigorosamente el botón utilizando vortex.
- Agregar la solución de lisis nuclear de acuerdo a la tabla y mezclar por inversión. La solución debe hacerse viscosa, si tiene cúmulos incubar a 37°C hasta por 1 hora. Si después de una hora siguen teniendo cúmulos, agregar nuevamente solución de lisis nuclear (ojo, ver notas).
- Agregar la solución de precipitación de proteínas y agitar vigorosamente utilizando vortex por 20 segundos. (ver notas)

- g) Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
- h) Recoger el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y agregar la cantidad de isopropanol puro de acuerdo a los volúmenes de la tabla.
- i) Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
- j) Descartar el sobrenadante por decantación y agregar la misma cantidad que en el paso 8, pero de etanol al 70%
- k) Centrifugar a 2500 rpm 10 minutos.
- l) Decantar el etanol y dejar secar el pellet
- m) Rehidratar el DNA con la solución de kit o TE.
- n) Almacenar a 4°C para su posterior lectura y ajuste.

**NOTAS:**

- a. La sangre debe de estar en tubos con anticoagulante de citratos, EDTA o heparina.
- b. Si después del paso 1 no se observa el pellet blanco y pareciera que solo hay glóbulos rojos, quitar el sobrenadante y repetir los pasos del 1 al 4.
- c. Si en el paso 5 se adicionó nuevamente solución de lisis nuclear, se tiene que agregar un 21.2% más de la solución de precipitación de proteína.  
(Total 121.2%)

**1.13. Purificación de DNA por equipo comercial**

El equipo comercial utilizado fue *Wizard Genomic DNA Clean Up System (Promega, Wisconsin)*.

Antes de empezar:

Agitar vigorosamente la resina del equipo comercial, si hay cristales o agregados presentes disolverlos calentando la resina 37°C por 10 minutos. La resina por si sola es insoluble. Enfriar entre 25°C y 30°C antes de usar.

#### Unión de DNA

- a) Usar una columna Wizard® por cada muestra
- b) Colocar el cilindro contenedor tipo jeringa provisto en la minicolumna. Insertar la punta del émbolo en el cilindro contenedor unido a la minicolumna al colector para crear vacío.
- c) Adicionar 1mL de la resina en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Adicionar la muestra y agitar por inversión. La muestra no debe exceder un volumen de 500 µL.
- d) Pipetear la mezcla de resina y muestra dentro de la minicolumna. Aplicar vacío con el émbolo de la jeringa para introducir el contenido dentro de la minicolumna.

#### Lavado

- a) Adicionar 2mL de una solución de isopropanol al 80% al tubo recolector previamente unido a la minicolumna y volver a aplicar vacío utilizando el émbolo de la jeringa para permitir el paso de la solución a través de la minicolumna.
- b) Secar la resina aplicando vacío durante 30 segundos después de que la solución atravesara la minicolumna. No secar la resina por más de 30 segundos. Remover el tubo recolector y transferir la minicolumna a un tubo eppendorf de 1.5 mL nuevo.
- c) Centrifugar la minicolumna a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 2 minutos para remover cualquier isopropanol residual.

#### Elución

- a) Transferir la minicolumna a un tubo eppendorf 1.5 mL nuevo. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de agua precalentada (65-70°C) o buffer TE a la minicolumna y esperar 1 minuto.
- b) Centrifugar la minicolumna durante 20 segundos a máxima velocidad para eluir el DNA unido.
- c) Remover y descartar la minicolumna.
- d) El DNA purificado deber ser almacenado a una temperatura de entre 4°C - 20°C.

### 1.14. Secuenciación de DNA

Se realiza una reacción de PCR utilizando el equipo comercial *GoTaq Green Master Mix*® de la casa comercial Promega, con cebadores diseñados siguiendo las especificaciones mencionadas, la concentración de los mismos deberá optimizarse para cada caso, sin embargo, deberán caer en un rango de 0.1 a 1.0  $\mu\text{M}$ . El protocolo a seguir es el siguiente. El volumen final de la reacción es 30  $\mu\text{L}$ , 29  $\mu\text{L}$  de la mezcla maestra y 1  $\mu\text{L}$  de DNA a una concentración final de 15  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Temperatura	Tiempo	
94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	20 ciclos
65°C - 55°C*	30 segundos	
72°C	30 segundos	
94°C	30 segundos	15 ciclos
55°C**	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	7 minutos	
4°C	1 minuto	

**Tabla 13. Protocolo para la reacción PCR. \***, con un decremento de 0.5°C cada 30 segundos; **\*\***, Ajustar la temperatura según la Tm requerida de cada par de cebadores.

### **1.15. Purificación de productos amplificados**

Se utilizó la enzima CIAP y su respectivo buffer de la casa comercial Roche en una concentración final de 800 unidades por reacción. La enzima Exo I utilizada pertenece a la casa comercial Applied Biosystems y se utilizó en una concentración final de 100 unidades por reacción. El volumen final de la reacción es de 20  $\mu\text{L}$ . El periodo de incubación es un ciclo de 37°C durante 30 minutos y un ciclo de 80°C durante 20 minutos.

### **1.16. Reacción de secuenciación**

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el equipo comercial para secuenciación *Big Dye Terminator v 3.1* el cual es un sistema listo para usar que realiza el paso de reacción de PCR y limpieza de productos en una sola reacción. Los cebadores se utilizan en una concentración de 3.2 pmol y se utiliza 1  $\mu\text{L}$  de la reacción resultante de la etapa de purificación. El protocolo a seguir es el siguiente: 25 ciclos a 96°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos y 60°C durante 2 minutos y un solo ciclo de a4C durante 1 minuto. El volumen final de la reacción es de 5  $\mu\text{L}$ , utilizando 2  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción, 2  $\mu\text{L}$  de los cebadores y 1  $\mu\text{L}$  del producto previamente purificado.

### **1.17. Sistema de enriquecimiento dirigido Haloplex®**

Paso 1. Digestión de DNA genómico con enzimas de restricción

- a) Utilizar un método de lectura fluorométrico para una cuantificación precisa de DNA genómico.
- b) Preparar las muestras de DNAg y un muestra con DNA control incluido en el kit. Diluir 225 ng de cada muestra en 45  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, para una concentración final de 5 ng/ $\mu\text{L}$ . Almacenar en hielo.

- c) Preparar la mezcla de enzimas de restricción. El ADNg es digerido en 8 diferentes reacciones en la que cada una contiene 2 reacciones. Las 16 enzimas de restricción son provistas en dos tiras de 8 tubos etiquetadas con colores verde y rojo.
- d) Dispensar la cantidad apropiada de buffer RE y de BSA en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Distribuir esta mezcla en tiras de 8 tubos de 0.2 mL.
- e) Centrifugar las enzimas antes de usar y alinear ambas tiras en dirección A hacia H. Dispensar la cantidad apropiada de enzimas en la tira de 8 tubos de 0.2 mL. Primero dispensar las enzimas de la tira verde y después dispensar las enzimas de la tira de color rojo.
- f) Sellar la tira de tubos, mezclar por inversión y centrifugar brevemente.
- g) Distribuir 5  $\mu$ L de la mezcla de enzimas en una placa de 96 pozos alineada en una dirección de A hacia H.
- h) Dispensar 5  $\mu$ L de las muestras de ADNg en una placa de 96 pozos alineada en dirección de 1 a 12.
- i) Sellar la placa, agitar brevemente y centrifugar.
- j) Colocar la placa en un termociclador corriendo el programa siguiente: 37°C por 30 minutos, con un paso final de 8°C y mantener la temperatura.
- k) Tras el periodo de incubación validar la reacción de digestión enzimática del ADN control, utilizando un sistema de automatizado de electroforesis capilar *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical, analizando los resultados con el software de la misma casa *PROSize*).

Paso 2. Hibridizar el DNAg digerido a las sondas Haloplex para el enriquecimiento dirigido y etiquetado de las muestras.

- a) Preparar la mezcla de hibridación con la cantidad apropiada de la solución de hibridación y los ensayos haloplex. Agitar suavemente y centrifugar.

- b) Dispensar esta mezcla en la cantidad apropiada de tubos de 0.2 mL y adicionar 10  $\mu$ L de la etiqueta apropiada del cassette provisto en el kit.
- c) Transferir las 8 reacciones enzimáticas a su correspondiente mezcla de hibridación. Mezclar por pipeteo cada reacción antes de adicionar la siguiente reacción enzimática, ya que esto permite la inactivación de las enzimas evitando que estas realicen cortes inapropiados en pasos posteriores.
- d) Sellar los tubos, agitar suavemente y centrifugar.
- e) Colocar los tubos en un termociclador y correr el siguiente programa. 95°C durante 10 min, 54°C durante el tiempo especificado en el kit.

### Paso 3. Capturar el DNA blanco

En este paso la mezcla de DNA y ensayos Haloplex que contienen biotina se hibridan y son capturados con las perlas con estreptavidina.

- a) Antes de iniciar, asegurarse que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente.
- b) Preparar las perlas magnéticas Haloplex agitando vigorosamente y dispensando la cantidad a utilizar en tubos de 0.2 mL.
- c) Colocar estos tubos en una placa magnética compatible durante 5 minutos.
- d) Después de que la solución se aclare, remover el sobrenadante y resuspender mediante pipeteo las perlas en la solución de captura.
- e) Remover la reacción de hibridación del termociclador y adicionar inmediatamente 40  $\mu$ L de la mezcla de perlas magnéticas. Agitar vigorosamente mediante pipeteo.
- f) Incubar la reacción de captura a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- g) Tras el periodo de incubación sellar los tubos y centrifugar brevemente.

- h) Transferir los tubos a una placa magnética, esperar a que la solución se aclare (30 segundos aproximadamente), remover y descartar el sobrenadante.
- i) Remover los tubos de la placa magnética y adicionar 100  $\mu$ l de la mezcla de lavado a cada tubo. Resuspender las perlas por pipeteo e incubar en un termociclador a 46°C durante 10 minutos.
- j) Tras el periodo de incubación sellar los tubos y centrifugar brevemente.
- k) Esperar a que la solución aclare (30 segundos) y descartar el sobrenadante.

#### Paso 4. Ligar los fragmentos circulares capturados.

En este paso la enzima DNA ligasa es adicionada para cerrar los huecos en los fragmentos circulares capturados.

- a) Prepara la mezcla maestra adicionando los volúmenes apropiados de solución de ligación y la enzima DNA ligasa. Y adicionar 50  $\mu$ l a las perlas magnéticas .
- b) Resuspender las perlas magnéticas por pipeteo e incubar en un termociclador 55°C durante 10 minutos con un paso de enfriado a 4°C al final del periodo.

#### Paso 5. Elusión de DNA capturado con NaOH

- a) Centrifugar brevemente los tubos de ligación y después transferirlos a la placa magnética. Esperar a que la solución aclare y remover el sobrenadante.
- b) Adicionar 100  $\mu$ L de buffer SSC a cada tubo y resuspender vigorosamente mediante pipeteo. Centrifugar los tubos brevemente y colocar nuevamente en la placa magnética.

- c) Esperar a que la solución aclare y remover cuidadosamente el sobrenadante.
- d) Adicionar 25  $\mu\text{L}$  de NaOH 50 mM preparado el mismo día y resuspender las perlas mediante pipeteo. Centrifugar brevemente los tubos y colocar en la placa magnética.
- e) Incubar las muestras 1 minuto a temperatura ambiente para permitir la elución de DNA capturado. Centrifugar brevemente los tubos y colocar en la placa magnética nuevamente.

#### Paso 6. Amplificación de las librerías capturadas.

- a) Preparar previamente la mezcla de PCR siguiendo las condiciones del fabricante y preparar la mezcla final utilizando 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido en el paso 5 y adicionar 30  $\mu\text{L}$  de la mezcla PCR.
- b) Mezclar la solución final suavemente y centrifugar brevemente.
- c) Colocar los tubos sellados en una termociclador siguiendo el programa: 98°C durante 2 minutos, 19 ciclos de 98°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minutos; 72°C durante 1 minutos y un paso de enfriado final a 8°C. El número de ciclos puede cambiar según el diseño del equipo comercial ordenado.

#### Paso 7. Purificación de las librerías amplificadas.

- a) Prepara la solución de perlas magnéticas AMPure XP con los volúmenes apropiados de perlas magnéticas y agua libre de nucleasas.
- b) Transferir 40  $\mu\text{L}$  de la solución resultante en el paso 6 en tubos de 0.2 mL y adicionar 140  $\mu\text{L}$  de la mezcla de perlas magnéticas AMPure XP. Agitar vigorosamente e incubar por 5 minutos en agitación continua.
- c) Centrifugar la solución y colocar en la placa magnética, esperar a que la solución aclare (5 minutos).

- d) Mientras los tubos se encuentran en la placa magnética adicionar 200  $\mu$ L de etanol al 70% preparado recientemente. Esperar 30 segundos para que las perlas magnéticas se asienten y remover por completo el sobrenadante. Repetir este paso para realizar un total de 2 lavados para cada muestra.
- e) Secar las perlas magnéticas a temperatura ambiente
- f) Cuando las perlas magnéticas se encuentren secas adicionar a cada pozo 40  $\mu$ L de 10 mM Tris-HCl buffer a un pH=8,0 preparado recientemente; e incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos para permitir la elución de DNA.
- g) Mezclar y resuspender la solución mediante pipeteo. Colocar nuevamente en un la placa magnética y esperar a que la solución aclare durante 2 minutos para evitar contaminación por perlas magnéticas.
- h) Remover el sobrenadante y tomar un total de 38  $\mu$ L de esta solución sin tocar las perlas magnéticas para su posterior uso.
- i) Validar el enriquecimiento de todas las muestras utilizando un sistema de automatizado de electroforesis capilar *Fragment Analyzer* (Advanced Analytical, analizando los resultados con el software de la misma casa *PROSize*.

## **7.7. Validación de digestión y enriquecimiento**

Para realizar la validación de las digestiones así como de los enriquecimientos se utilizó la plataforma automatizado de electroforesis capilar *Fragment Analyzer (Advanced Analytical)* utilizando el equipo comercial de alta sensibilidad *High Sensitivity Large Fragment Analysis Kit* de la misma casa comercial, siguiendo el protocolo impuesto por el proveedor.

## 14. Anexo II. Manejo de datos, NGS

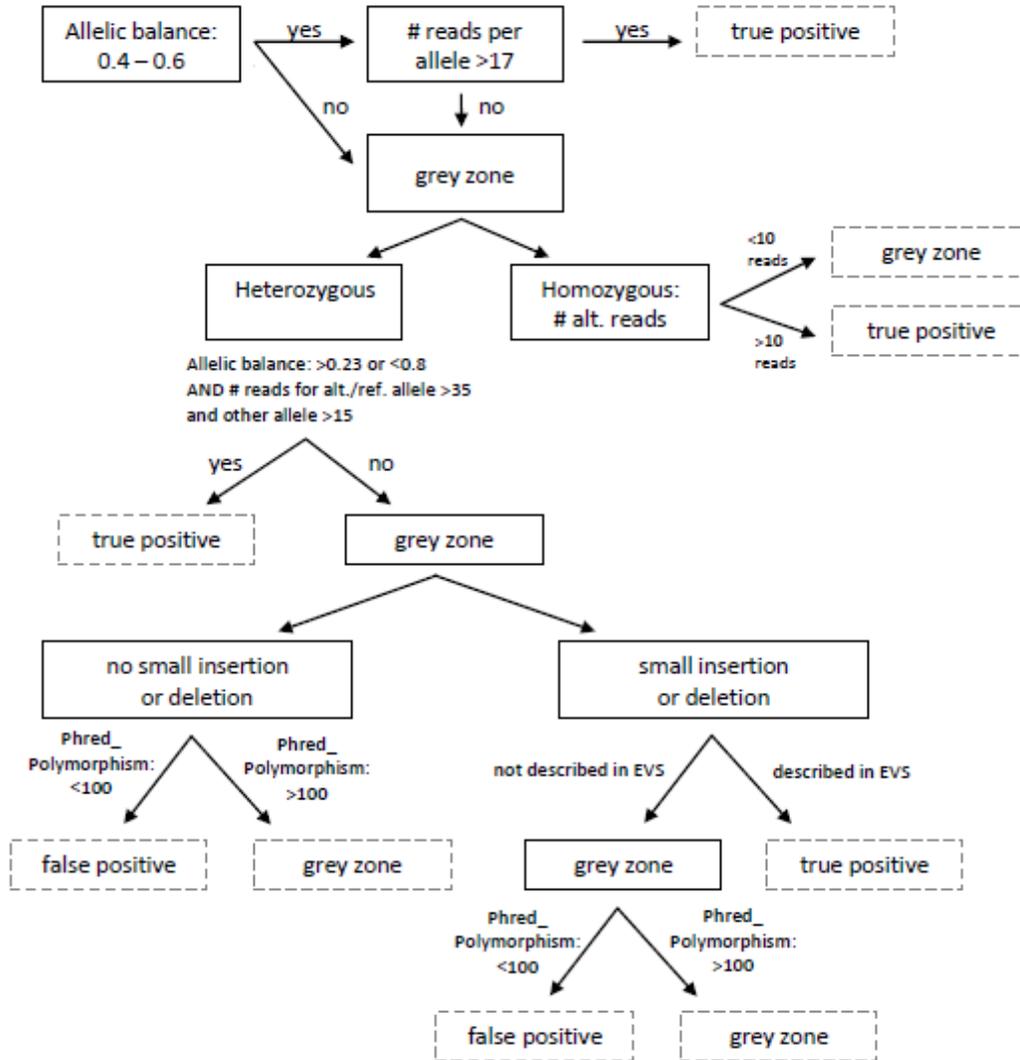
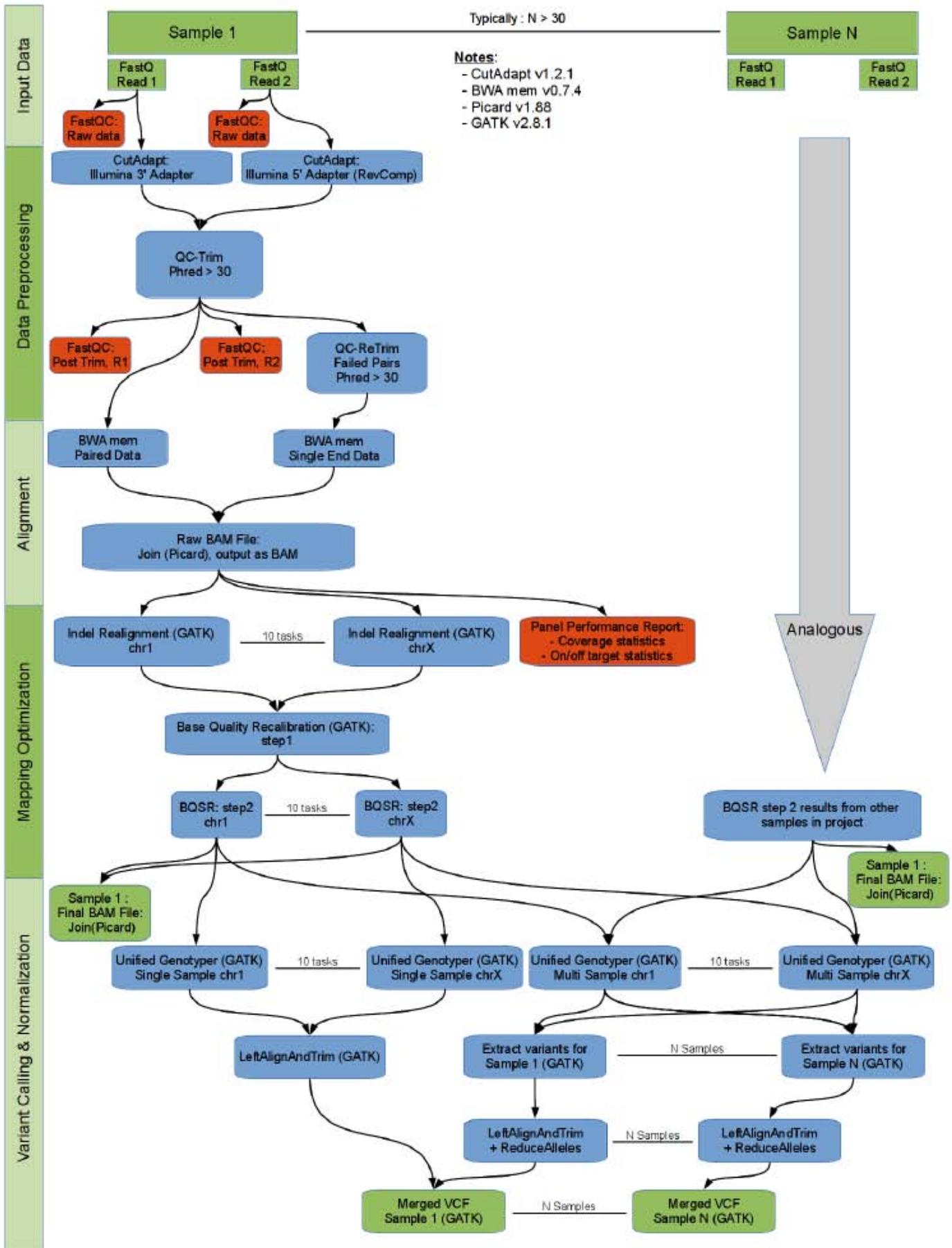


Figura 12. Guía diseñada para la selección de variantes a confirmar<sup>110</sup>.

# TAA\_Panel Analysis Pipeline



**Figura 13. Resumen de la tubería de análisis de datos. Los conjuntos de datos de entrada y salida están representados en bloques verdes. El análisis se puede dividir en 4 pasos que se indican a la izquierda. Pre-procesamiento de datos: Remove secuencias artificiales (CutAdapt) y de baja calidad (QC-Trim). Alineamiento: Se utilizan los datos de mapas de la base BWA mem. Lecturas huérfanas resultado de un emparejamiento de baja calidad son mapeadas como datos individuales y fueron fusionados nuevamente al archivo BAM utilizando la herramienta Picard. Optimización de mapeo. Siguiendo las prácticas de GATK, las lecturas son mapeadas nuevamente para la búsqueda de depleciones. Se utilizan estándares de oro de bases como 1000G para el entrenamiento y la búsqueda de depleciones. El llamado de variantes conocidas se realiza utilizando la base de datos dbSNP ver137. Llamado y normalización de variantes, esta etapa se realiza combinando genotipificación individual y en conjunto para alcanzar una optima sensibilidad para la detección de variantes.**

## 15. Anexo III. Variantes genéticas encontradas

No	Gen	Exón	Anotación genómica	Anotación proteica	Tipo de Variante	Reporte	Referencia
1	COL3A1	25	c.C1804A	p.P602T	No sinónima	No	
2	COL3A1	29	c.C2002T	p.P668S	No sinónima	Reporte diferente	
3	COL3A1	44	c.3252_3253T		Desplazamiento del marco de lectura	No	
4	FBN1	0	c.2540-1G>A		Sitio de corte y empalme	No	
5	FBN1	0	c.5546-1G>T		Sitio de corte y empalme	Reporte diferente	Baumgartner (2005) Methods Inf Med 44, 487
6	FBN1	0	c.8052-2A>G		Sitio de corte y empalme	Si	Grossfield (1993) Am J Hum Genet 53S A1167
7	FBN1	3	c.G239T	p.C80F	No sinónima	Reporte diferente	
8	FBN1	5	c.434_434delinsTG		Desplazamiento del marco de lectura	No	
9	FBN1	6	c.G449T	p.C150F	No sinónima	No	
10	FBN1	7	c.G640A	p.G214S	No sinónima	Reporte diferente	
11	FBN1	8	c.762_763G		Desplazamiento del marco de lectura	Reporte diferente	
12	FBN1	9	c.T986C	p.I329T	No sinónima	Si	Stheneur (2009) Eur J Hum Genet 17, 1121
13	FBN1	12	c.C1417T	p.R473W	No sinónima	No	
14	FBN1	13	c.T1539G	p.C513W	No sinónima	Reporte diferente	
15	FBN1	15	c.1809_1810C		Desplazamiento del marco de lectura	No	
16	FBN1	16	c.G1883A	p.C628Y	No sinónima	No	

17	FBN1	18	c.2113+1G>T	.	Sitio de corte y empalme	No	
18	FBN1	18	c.2114-1A>C		Sitio de corte y empalme	No	
19	FBN1	19	c.G2258T	p.G753V	No sinónima	No	
20	FBN1	19	c.T2238A	p.Y746X	Codón de termino prematuro	Reporte diferente	
21	FBN1	22	c.G2638A	p.G880S	No sinónima	Si	Rommel (2002) Hum Mutat 20, 406
22	FBN1	27	c.A3302G	p.Y1101C	No sinónima	Si	Loeys (2001) Arch Intern Med 161, 2447
23	FBN1	29	c.A3557G	p.Y1186C	No sinónima	Si	Matyas (2002) Hum Mutat 19, 443
24	FBN1	30	c.C3697T	p.Q1233X	Codón de termino prematuro	No	
25	FBN1	35	c.T4262C	p.L1421P	No sinónima	No	
26	FBN1	35	c.T4330A	p.C1444S	No sinónima	Reporte diferente	
27	FBN1	36	c.C4383A	p.C1461X	Codón de termino prematuro	No	
28	FBN1	38	c.4583-2A>G		Sitio de corte y empalme	No	
29	FBN1	38	c.C4621T	p.R1541X	Codón de termino prematuro	Si	Halliday (1999) Hum Genet 105, 587
30	FBN1	45	c.5504_5504delins TTG		Desplazamiento del marco de lectura	No	
31	FBN1	47	c.G5714C	p.C1905S	No sinónima	Reporte diferente	
32	FBN1	48	c.1096-13G>T		Sitio de corte y empalme	Si	Attanasio (2008) Clin Genet 74, 39
33	FBN1	48	c.5901_5906G		Desplazamiento del marco de lectura	No	
34	FBN1	48	c.C5863T	p.Q1955X	Codón de termino prematuro	Si	Schrijver (2002) Am J Hum Genet 71, 223
35	FBN1	50	c.6101_6102C		Desplazamiento del marco de lectura	No	
36	FBN1	50	c.C6095T	p.T2032I	No sinónima	No	

37	FBN1	51	c.G6170A	p.R2057Q	No sinónima	Si	Liu (1997) Genet Test 1, 237
38	FBN1	54	c.G6591T	p.E2197D	No sinónima	No	
39	FBN1	54	c.T6554C	p.I2185T	No sinónima	Si	Comeglio (2007) Hum Mutat 28, 928
40	FBN1	58	c.C7180T	p.R2394X	Codón de termino prematuro	Si	
41	FBN1	58	c.G7133A	p.C2378Y	No sinónima	Reporte diferente	rs111798283
42	FBN1	60	c.G7376A	p.C2459Y	No sinónima	Reporte diferente	
43	FBN1	61	c.7461_7464G		Desplazamiento del marco de lectura	No	
44	FBN1	61	c.G7499T	p.C2500F	No sinónima	Reporte diferente	
45	FBN1	61	c.T7498A	p.C2500S	No sinónima	Si	Ng (2002) Genome Res 12, 436
46	FBN1	61	c.T7525G	p.C2509G	No sinónima	No	
47	FBN1	63	c.G7742T	p.C2581F	No sinónima	Si	Loeys (2001) Arch Intern Med 161, 2447
48	FBN1	64	c.A7996G	p.T2666A	No sinónima	No	
49	FBN1	64	c.T7950A	p.N2650K	No sinónima	Reporte diferente	
50	FBN1	66	c.8516_8517G	.	Desplazamiento del marco de lectura	Si	Loeys (2004) Hum Mutat 24, 140
51	MYH11	39	c.C5383A	p.Q1795K	No sinónima	No	
52	MYH11	42	c.C5818G	p.P1940A	No sinónima	No	
53	MYLK	25	c.C4141T	p.R1381W	No sinónima	Si	
54	NOTCH1	6	c.C1023A	p.S341R	No sinónima	No	
55	NOTCH1	16	c.G2542A	p.E848K	No sinónima	No	
56	TGFBR1	5	c.C605T	p.A202V	No sinónima	No	
57	TGFBR2	6	c.C1373A	p.T458K	No sinónima	No	

**Tabla 14 Resumen de variantes genéticas encontradas.**

## 16. Bibliografía

1. Marfan, A. Un cas de deformation congenitale des quatre membres plus prononcee aux extremités caracterisee par allongement de os avec un certain degre d'amincissement. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* **13**, 6 (1896).
2. Williams, E. Rare cases with practical remarks. *Ophthalmol Soc* **2**, 291–301 (1879).
3. Conan-Doyle, A. in *Penguin books* (1887).
4. Gray, J. R. & Davies, S. J. Syndrome of the month Marfan syndrome. *J. Med. Genet.* **33**, 403–408 (1996).
5. Judge, D. P. & Dietz, H. C. Marfan ' s syndrome. in *The Lancet* 1965–1976 (2005).
6. Sakai, L. Y., Keene, D. R. & Engvall, E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J. Cell Biol.* **103**, 2499–509 (1986).
7. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, J. H. U. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. (*Baltimore, MD*) (2015).
8. Soto López, M. E., Barragan, R. & Vasquez, C. Evolution and Analysis of Heterogeneity in the Clinical expression of Aortic Diseases Similar to Marfan's Syndrome: Challenge and Art in Clinical Diagnosis. *Curr. Rheumatol. Rev.* **8**, 1–11 (2012).
9. Rangasetty, U. C. & Karnath, B. M. Clinical Signs of Marfan Syndrome. *Rev. Clin. Signs* 33–38 (2006).
10. Barriales-Villa, R., García-Giustiniani, D. & Monserrat, L. Genética del síndrome de Marfan. *Cardiocyte* **46**, 101–104 (2011).
11. Herrera, R. N., Carrero Valenzuela, R. & Luciardi, H. Expresión fenotípica del síndrome de Marfán. Seguimiento de tres generaciones sucesivas. *Actualizaciones. Hosp. Cent. Salud Argentina* (2004).
12. Salamanca-gómez, C. F. & Salamanca-gómez, F. Nuevos hallazgos moleculares en el síndrome de Marfán. *Gac. Médica Mex.* **144**, 349–350 (2008).

13. Charbonneau, N. L. *et al.* In vivo studies of mutant fibrillin-1 microfibrils. *J. Biol. Chem.* **285**, 24943–55 (2010).
14. Stheneur, C. *et al.* Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loeys-Dietz syndrome and related disorders. *Hum. Mutat.* **29**, E284–95 (2008).
15. Faivre, L. *et al.* Clinical and mutation-type analysis from an international series of 198 probands with a pathogenic FBN1 exons 24-32 mutation. *Eur. J. Hum. Genet.* **17**, 491–501 (2009).
16. Rommel, K. *et al.* Identification of 29 novel and nine recurrent fibrillin-1 (FBN1) mutations and genotype-phenotype correlations in 76 patients with Marfan syndrome. *Hum. Mutat.* **26**, 529–39 (2005).
17. von Kodolitsch, Y. & Robinson, P. N. Marfan syndrome: an update of genetics, medical and surgical management. *Heart* **93**, 755–60 (2007).
18. Dietz, H. C. *et al.* Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* **352**, 337–9 (1991).
19. Kielty, C. A. Y. M. & Adrian, C. Fibrillin-containing Microfibrils : Structure and Function in Health and Disease. *J. Biochem Cell Biol* **27**, 747–760 (1995).
20. Faivre, L. *et al.* Clinical and molecular study of 320 children with Marfan syndrome and related type I fibrillinopathies in a series of 1009 probands with pathogenic FBN1 mutations. *Pediatrics* **123**, 391–8 (2009).
21. Kumar, A. & Agarwal, S. Marfan syndrome: An eyesight of syndrome. *Meta Gene* **2**, 96–105 (2014).
22. Sengle, G. *et al.* Microenvironmental regulation by fibrillin-1. *PLoS Genet.* **8**, e1002425 (2012).
23. Sakai, L. Y., Keene, D. R., Glanville, R. W. & Bachinger, H. P. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J. Biol. Chem.* **266**, 14763–14770 (1991).
24. Baldock, C. *et al.* The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J Cell Biol* **152**, 1045–1056 (2001).
25. Lee, B. *et al.* Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to

- two different fibrillin genes. *Nature* **352**, 330–334 (1991).
26. Robinson, P. N. *et al.* Mutations of FBN1 and genotype-phenotype correlations in Marfan syndrome and related fibrillinopathies. *Hum. Mutat.* **20**, 153–61 (2002).
  27. Jin, C., Yao, K., Sun, Z. & Wu, R. Correlation of the recurrent FBN1 mutation (c.364C>T) with a unique phenotype in a Chinese patient with Marfan syndrome. *Jpn. J. Ophthalmol.* **52**, 497–9 (2008).
  28. Frédéric, M. Y. *et al.* UMD-predictor, a new prediction tool for nucleotide substitution pathogenicity -- application to four genes: FBN1, FBN2, TGFBR1, and TGFBR2. *Hum. Mutat.* **30**, 952–9 (2009).
  29. Collod-Bérout, G. *et al.* Update of the UMD-FBN1 mutation database and creation of an FBN1 polymorphism database. *Hum. Mutat.* **22**, 199–208 (2003).
  30. Magenis, R. E., Maslen, C. L., Smith, L., Allen, L. & Sakai, L. Y. Localization of the fibrillin (FBN) gene to chromosome 15, band q21.1. *Genomics* **11**, 346–351 (1991).
  31. Corson, G. M., Chalberg, S. C., Dietz, H. C., Charbonneau, N. L. & Sakai, L. Y. Fibrillin binds calcium and is coded by cDNAs that reveal a multidomain structure and alternatively spliced exons at the 5' end. *Genomics* **17**, 476–484 (1993).
  32. Biery, N. J. *et al.* Revised genomic organization of FBN1 and significance for regulated gene expression. *Genomics* **56**, 70–7 (1999).
  33. Maslen, C. L., Corson, G. M., Maddox, B. K., Glanville, R. W. & Sakai, L. Y. Partial sequence of a candidate gene for the Marfan syndrome. *Nature* **352**, 334–337 (1991).
  34. Pereira, L. *et al.* Genomic organization of the sequence coding for fibrillin, the defective gene product in Marfan syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 961–968 (1993).
  35. Gao, L.-G., Luo, F., Hui, R.-T. & Zhou, X.-L. Recent molecular biological progress in Marfan syndrome and Marfan-associated disorders. *Ageing Res. Rev.* **9**, 363–8 (2010).
  36. Ramirez, F., Sakai, L. Y., Dietz, H. C. & Rifkin, D. B. Fibrillin microfibrils : multipurpose extracellular networks in organismal physiology. *Physiol. Genomics* **19**, 151–154 (2004).
  37. Abraham, P. a, Perejda, a J., Carnes, W. H. & Uitto, J. Marfan syndrome.

- Demonstration of abnormal elastin in aorta. *J. Clin. Invest.* **70**, 1245–52 (1982).
38. Streeten, B. W. The nature of the ocular zonule. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **80**, 823–54 (1982).
39. McKusick, V. A. *The cardiovascular aspects of Marfan's syndrome.* (1956).
40. International Nosology of Heritable Disorders of Connective Tissue, Berlin. *Am J Med Genet* **581**, 24–94 (1986).
41. Godfrey, M. *et al.* Unilateral microfibrillar abnormalities in a case of asymmetric Marfan syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **46**, 661–71 (1990).
42. McGookey, D. J., Pyeritz, R. E., Byers, P. H. Marfan syndrome: altered synthesis, secretion or extracellular matrix incorporation of fibrillin. *J. Hum. Genet* **47**, (1990).
43. Byers, P. H. *et al.* Marfan syndrome: abnormal alpha 2 chain in type I collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7745–9 (1981).
44. Boucek, R. J., Noble, N. L., Gunja-Smith, Z. & Butler, W. T. The Marfan syndrome: a deficiency in chemically stable collagen cross-links. *N. Engl. J. Med.* **305**, 988–91 (1981).
45. Appel, A. *et al.* Cell-free synthesis of hyaluronic acid in Marfan syndrome . • When this article is cited Cell-free Synthesis of Hyaluronic Acid in Marfan Syndrome \*. *J. Biol. Chem.* **254**, 12199–12203 (1979).
46. Pyeritz, R. E. & McKusick, V. A. Basic defects in Marfan syndrome. *The New England journal of medicine* **305**, 1011–1012 (1981).
47. Hubmacher, D., Tiedemann, K. & Reinhardt, D. P. Fibrillins: From Biogenesis of Microfibrils to Signaling Functions. *Curr. Top. Dev. Biol.* **75**, 93–123 (2006).
48. Boundless. Marfan Syndrome. *Human Physiology--KCC* (2015). at <<https://www.boundless.com/users/371805/textbooks/human-physiology-kcc/tissues-4/clinical-cases-57/marfan-syndrome-375-7442/>>
49. El-Hamamsy, I. & Yacoub, M. H. Cellular and molecular mechanisms of thoracic aortic aneurysms. *Nat. Rev. Cardiol.* **6**, 771–786 (2009).
50. Nataatmadja, M., West, J. & West, M. Overexpression of transforming growth

- factor-B is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation* **114**, 371–378 (2006).
51. Boileau, C., Jondeau, G., Mizuguchi, T. & Matsumoto, N. Molecular genetics of Marfan syndrome. *Curr. Opin. Cardiol.* **20**, 194–200 (2005).
  52. Franken, R. *et al.* Circulating transforming growth factor- $\beta$  as a prognostic biomarker in Marfan syndrome. *Int. J. Cardiol.* 1–6 (2013). doi:10.1016/j.ijcard.2013.03.033
  53. Holm, T. M. *et al.* Noncanonical TGF $\beta$  signaling contributes to aortic aneurysm progression in Marfan syndrome mice. *Science* **332**, 358–361 (2011).
  54. Loeys, B. L. *et al.* Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N. Engl. J. Med.* **355**, 788–798 (2006).
  55. Bolar, N., Van Laer, L. & Loeys, B. L. Marfan syndrome: from gene to therapy. *Curr. Opin. Pediatr.* **24**, 498–504 (2012).
  56. Westling, L., Mohlin, B. & Bresin, A. Craniofacial manifestations in the Marfan syndrome: palatal dimensions and a comparative cephalometric analysis. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* **18**, 211–8 (1998).
  57. Ahn, N. U. *et al.* Dural ectasia in the Marfan syndrome: MR and CT findings and criteria. *Genet. Med.* **2**, 173–9 (2000).
  58. Ahram, D. *et al.* A homozygous mutation in ADAMTSL4 causes autosomal-recessive isolated ectopia lentis. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 274–8 (2009).
  59. Silverman, D. I. *et al.* Life expectancy in the Marfan Syndrome. *Am. J. Cardiol.* **75**, 157–160 (1995).
  60. Soto, M. E. *et al.* Evolution and Analysis of Heterogeneity in the Clinical Expression of Aortic Diseases Similar to Marfan ' s Syndrome : Challenge and Art in Clinical Diagnosis. *Curr. Rheumatol. Rev.* 1–11 (2012).
  61. Tsang, A. K. L., Taverne, A. & Holcombe, T. Marfan syndrome: a review of the literature and case report. *Spec. Care Dentist.* **33**, 248–54 (2013).
  62. Loeys, B. L. *et al.* The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J. Med. Genet.* **47**, 476–85 (2010).

63. Loeys, B. L. *et al.* A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat. Genet.* **37**, 275–81 (2005).
64. Doyle, A. J. *et al.* Mutations in the TGF- $\beta$  repressor SKI cause Shprintzen-Goldberg syndrome with aortic aneurysm. *Nat. Genet.* **44**, 1249–1254 (2012).
65. Akutsu, K., Morisaki, H., Takeshita, S. & Sakamoto, S. Phenotypic Heterogeneity of Marfan-Like Connective Tissue Disorders Associated With Mutations in the Transforming. *Circ. J.* **71**, 1305–1309 (2007).
66. Jones, J. L., Lane, J. E., Logan, J. J. & Vanegas, M. E. *Beals-Hecht syndrome*. *The Southern medical journal* **95**, 753–755 (2002).
67. Snead, M. P. & Yates, J. R. W. Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome Review article Clinical and molecular genetics of Stickler syndrome. 353–359 (1999). doi:10.1136/jmg.36.5.353
68. Annunen, S. *et al.* Splicing mutations of 54-bp exons in the COL11A1 gene cause Marshall syndrome, but other mutations cause overlapping Marshall/Stickler phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 974–983 (1999).
69. Janssens, K. *et al.* Camurati-Engelmann disease: review of the clinical, radiological, and molecular data of 24 families and implications for diagnosis and treatment. *J. Med. Genet.* **43**, 1–11 (2006).
70. Callewaert, B., Malfait, F., Loeys, B. & De Paepe, A. Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22**, 165–89 (2008).
71. Faivre, L. *et al.* Clinical homogeneity and genetic heterogeneity in Weill-Marchesani syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **123A**, 204–207 (2003).
72. Tsipouras, P., Del Mastro, R., Mansoor, S. & Et, A. Genetic Linkage of the Marfan Syndrome, Ectopia Lentis, and Congenital Contractural Arachnodactyly to the Fibrilline Genes on Chromosomes 15 and 5. *N. Engl. J. Med.* **326**, 905–909 (1992).
73. Freed, L. A. *et al.* Prevalence and clinical outcome of mitral-valve prolapse. *N. Engl. J. Med.* **341**, 1–7 (1999).
74. Booher, A. M. & Eagle, K. A. Diagnosis and management issues in thoracic aortic aneurysm. *American Heart Journal* **162**, (2011).

75. Loeys, B., Delvaux, I., De Bie, S. & De Paepe, A. Genotype and Phenotype Analysis of 171 Patients Referred for Molecular Study of the Fibrillin-1 Gene FBN1 Because of Suspected Marfan Syndrome. *Arch. Intern. Med.* **161**, 2447–2454 (2001).
76. Callewaert, B. L. *et al.* Comprehensive clinical and molecular assessment of 32 probands with congenital contractural arachnodactyly: Report of 14 novel mutations and review of the literature. *Hum. Mutat.* **30**, 334–341 (2009).
77. Akhurst, R. J. The paradoxical TGF- $\beta$  vasculopathies. **44**, 838–839 (2012).
78. Ramirez, F. & Dietz, H. C. Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**, 252–8 (2007).
79. Konin, C. *et al.* Assessment of the cost of the curative treatment of myocardial infarction in the Abidjan Cardiology Institute. *Bull Soc Pathol Exot* **100**, 201–204 (2007).
80. Van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, O. E. D. of microRNAs after myocardial in. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **2008**, 13027–13032
81. Habashi, J. P. *et al.* Losartan, an AT1 antagonist, prevents aortic aneurysm in a mouse model of Marfan syndrome. *Science* **312**, 117–121 (2006).
82. Franken, R. *et al.* Marfan syndrome: Progress report. *Prog. Pediatr. Cardiol.* **34**, 9–14 (2012).
83. Faivre, L. *et al.* Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 454–66 (2007).
84. Dietz, H. & Pyeritz, R. E. in *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (eds. Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W. & del Valle-Mondragón, L.) 5287–311 (McGraw-Hill, New York, 2001).
85. Jacobs, A. M. *et al.* A Recurring FBN1 Gene Mutation in Neonatal Marfan Syndrome. *ARCH PEDIATR ADOLESC MED* **156**, 1081–1085 (2002).
86. Gillis, E. *et al.* An FBN1 Deep Intronic Mutation in a Familial Case of Marfan Syndrome: An Explanation for Genetically Unsolved Cases? *Hum. Mutat.* **35**, 571–574 (2014).

87. Mizuguchi, T. *et al.* Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* **36**, 855–60 (2004).
88. Wittwer, C. T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum. Mutat.* **30**, 857–9 (2009).
89. Vossen, R. H. a M., Aten, E., Roos, A. & den Dunnen, J. T. High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening. *Hum. Mutat.* **30**, 860–6 (2009).
90. Table, S. Mutation scanning of FBN1 gene by HRM. 18–21
91. Hung, C.-C. *et al.* Identification of fibrillin-1 gene mutations in Marfan syndrome by high-resolution melting analysis. *Anal. Biochem.* **389**, 102–6 (2009).
92. Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, R. S. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* **40**, 115 (2012).
93. Koressaar T, R. M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* **23**, 1289–91 (2007).
94. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 31–46 (2010).
95. Mardis, E. R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* **24**, 133–141 (2008).
96. Johansson, H. *et al.* Targeted resequencing of candidate genes using selector probes. *Nucleic Acids Res.* **39**, (2011).
97. Baetens, M. *et al.* Applying massive parallel sequencing to molecular diagnosis of Marfan and Loeys-Dietz syndromes. *Hum. Mutat.* **32**, 1053–62 (2011).
98. Proost, D. *et al.* Performant Mutation Identification using Targeted Next Generation Sequencing of Fourteen Thoracic Aortic Aneurysm Genes. *Hum. Mutat.* n/a–n/a (2015). doi:10.1002/humu.22802
99. Helsmoortel, C. *et al.* Challenges and opportunities in the investigation of unexplained intellectual disability using family based whole exome sequencing. *Clin. Genet.* (2014). doi:10.1111/cge.12470

100. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754–1760 (2009).
101. McKenna, A. *et al.* The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
102. DePristo, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–498 (2011).
103. Van der Auwera, G. A. *et al.* From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr. Protoc. Bioinforma.* (2013). doi:10.1002/0471250953.bi1110s43
104. Vandeweyer, G., Van Laer, L., Loeys, B., Van den Bulcke, T. & Kooy, R. F. VariantDB: a flexible annotation and filtering portal for next generation sequencing data. *Genome Med.* **6**, 1–10 (2014).
105. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology* **29**, 24–26 (2011).
106. Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T. & Mesirov, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief. Bioinform.* **14**, 178–192 (2013).
107. Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M. & Seelow, D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat. Methods* **11**, 361–2 (2014).
108. Adzhubei, I. a *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
109. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).
110. Sillis, Y. Contribution to the identification of modifying genes in Marfan syndrome. (University of Antwerp, 2015).
111. Faivre, L. *et al.* The new Ghent criteria for Marfan syndrome: What do they change? *Clin. Genet.* **81**, 433–442 (2012).

112. Devereux, R. B. *et al.* Normal limits in relation to age, body size and gender of two-dimensional echocardiographic aortic root dimensions in persons >15 years of age. *Am. J. Cardiol.* **110**, 1189–1194 (2012).
113. Sluysmans, T. & Colan, S. D. *Theoretical and empirical derivation of cardiovascular allometric relationships in children.* *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **99**, (2005).
114. Pettersen, M. D., Du, W., Skeens, M. E. & Humes, R. A. Regression Equations for Calculation of Z Scores of Cardiac Structures in a Large Cohort of Healthy Infants, Children, and Adolescents: An Echocardiographic Study. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* **21**, 922–934 (2008).
115. Groenink, M. *et al.* Marfan syndrome in children and adolescents: predictive and prognostic value of aortic root growth for screening for aortic complications. *Heart* **80**, 163–169 (1998).
116. Wallis, Y. *et al.* Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. 16 (2013).
117. Espinola-Zavaleta, N. *et al.* Echocardiometric evaluation of cardiovascular abnormalities in Marfan syndrome. *Arch. Cardiol. Mex.* **75**, 133–140 (2005).
118. Peter N. Robinson & Godfrey, M. in *Marfan Syndrome: A Primer for Clinicians and Scientists (Medical Intelligence Unit)* (eds. Peter N. Robinson & Matthias Winzen) 47–49 (Springer Science & Business Media, 2004).