



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

*Identificación por secuenciación de segunda generación
de posibles variantes patogénicas en pacientes con
síndrome de Hallermann-Streiff*

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:
DRA. AMÉRICA VILLASEÑOR DOMÍNGUEZ

TUTOR:
DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CO-TUTOR:
DR. JESÚS AGUIRRE HERNÁNDEZ
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COMITÉ TUTORIAL:

Presidente:

Dra. Margarita Valdés Flores
Subdirectora de Investigación
Instituto Nacional de Rehabilitación

Secretario:

Dr. Marco Cerbón Cervantes
Investigador UNAM
Instituto Nacional de Perinatología

Vocal 1:

Dra. Verónica Fabiola Morán Barroso
Jefe del Departamento de Genética Médica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Vocal 2:

Dr. Jesús Aguirre Hernández
Jefe del Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Vocal 3:

Dr. Antonio Miranda Duarte
Investigador "D"
Instituto Nacional de Rehabilitación

Dr. Onofre Muñoz Hernández
Responsable de la Entidad Académica
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dedicatoria

A mi padre, Jorge. Mi mejor amigo desde que llegué a este mundo. Mi fuerza y mi ejemplo a seguir. El que ha trabajado duro para darme lo mejor. Eres mi héroe, papito. Gracias por todo, esto es tuyo.

A mi madre, Maura. La mujer que me dio su amor incondicional y luchó hasta el último día de su vida para verme feliz. Te llevo siempre conmigo mami, esto es para tí.

Al hombre de mi vida, Jesús. La persona que me ha enseñado a amar lo que tengo y lo que soy. El que camina conmigo comprometido y apasionado. Todo tiene sentido cuando estoy a tu lado. Valió la pena nuestro esfuerzo amor, este logro es de ambos.

Agradecimientos

Quisiera agradecer a los pacientes y familiares que participaron en este proyecto. A la UNAM, al CONACyT y a cada una de las personas abajo mencionadas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, ya que sin su colaboración, sin su apoyo y motivación, no hubiera sido posible la realización de este proyecto y no hubiera sido tan placentero este camino de la Maestría.

- **Dirección y Subdirección de Investigación:**
 - Dr. Onofre Muñoz Hernández
 - Dr. Juan Garduño Espinosa
- **Profesores:**
 - Dr. Miguel Ángel Villasis Keever
 - Dra. Carmen Martínez
 - Dra. Ma. Fernanda Castilla Peón
- **Unidad de Investigación de Medicina Basada en Evidencias:**
 - Maricela Zárate Paredes
- **Archivo del HIMFG y Trabajo social:**
 - Lic. Elsa Cerón.
- **Departamento de Genética del HIMFG:**
 - Dra. Verónica Morán Barroso
 - Dra. Constanza García Delgado
 - Dra. Alejandra Reyes de la Rosa
 - Dr. Francisco Flores
 - Dra. Nayla León Carlos
- **Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática:**
 - Dr. Jesús Aguirre Hernández
 - M. en C. Patricia Baeza Capetillo
 - Dr. Leonardo Mejía Marín
 - Dra. Yolanda Bárcenas Gómez
 - Ángeles Rangel Téllez
 - Biól. Guadalupe Fernanda Godinez Zamora
 - Pablo Miguel Valencia Segura

Abreviaciones

BWA	<i>Burrows-Wheeler Aligner</i> , herramienta bioinformática para el alineamiento.
CNVs	<i>Copy number variation</i> , variación en el número de copias.
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i> , base de datos de polimorfismos de un nucleótido.
DE	Displasias Esqueléticas.
DNA	Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA	Etilendiaminotetraacético.
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i> , base de datos de exomas de 60 706 individuos.
Exomiser (hiPHIVE)	<i>Exomiser human interactome-PHENotypic Interpretation of Variants in Exomes</i> , programa de Exomiser para priorización de genes.
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i> , herramienta bioinformática para el llamado de variantes.
GRCh37	<i>Genome Reference Consortium Human Build 37</i> , genoma humano de referencia versión 37.
hg19	<i>Human Genome version 19</i> , genoma humano de referencia versión 19 (GRCh37).
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez.
HPO	<i>Human Phenotype Ontology</i> , ontología fenotípica humana.
LGGB	Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática.
ml	Mililitro.
mM	Milimolar.
mRNA	RNA mensajero.
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , Centro Nacional para la información biotecnológica, Bethesda, EEUA.
nM	Nanomol.
°C	Grados Celsius.
ped	Archivos de pedigrí.
pM	Picomolar.
PolyPhen	<i>Polymorphism Phenotyping</i> , herramienta bioinformática de predicción de efecto en la proteína.
RNA	Ácido ribonucleico.
RNV	Recién nacidos vivos .
SHS	Síndrome de Hallermann-Streiff.
SIFT	<i>Sorting intolerant from tolerant</i> , herramienta bioinformática de predicción de efecto en la proteína.
vcf	<i>Variant call file</i> , archivo del llamado de variantes.
µl	Microlitro.

Resumen

Introducción. El síndrome de Hallermann-Streiff (SHS; MIM %234100) es un padecimiento congénito poco frecuente, de etiología, prevalencia y herencia desconocidas. Los individuos afectados presentan talla baja proporcionada, hipotricosis, braquicefalia con abombamiento frontal, microftalmia, catarata congénita, atrofia de la piel del centro de la cara y de la nariz, alteraciones dentales y micrognatia. En este trabajo se describen las posibles variantes patogénicas identificadas por secuenciación del exoma de tres individuos no relacionados con diagnóstico clínico de SHS.

Planteamiento del problema. Para establecer las características moleculares de este síndrome se requiere identificar el gen cuyas variantes patogénicas dan origen a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. En el HIMFG se atiende a pacientes no relacionados entre sí, con diagnóstico de SHS. El análisis genético del exoma de estos pacientes, así como el estudio de la distribución de las distintas variantes a lo largo del gen o genes candidatos, junto con la predicción del efecto que tienen estas variantes en el fenotipo, brindará un mayor conocimiento sobre el desarrollo de este padecimiento.

Pregunta de investigación. Este proyecto pretende contestar la pregunta: ¿Cuáles serán las posibles variantes patogénicas identificadas por secuenciación del exoma en pacientes con diagnóstico clínico de SHS?

Hipótesis. Se identificarán variantes genéticas en el exoma de los pacientes con SHS que podrán estar implicadas en la etiología de la enfermedad.

Justificación. La identificación de variantes patogénicas en un gen responsable del SHS permitirá comprender mejor las bases moleculares, la vía celular implicada, el papel del gen involucrado en el desarrollo esquelético, así como descubrir el patrón de herencia de esta enfermedad. Todo esto contribuirá al conocimiento universal y eventualmente conducirá a un manejo integral de los individuos afectados por este síndrome.

Objetivo general. Identificar, por secuenciación del exoma, las posibles variantes genéticas en pacientes con SHS que puedan explicar la etiología de esta enfermedad.

Metodología. Estudio observacional, transversal, descriptivo. Criterios de inclusión: tríos formados por los pacientes afectados y sus dos padres. Criterios de exclusión: pacientes con antecedentes de exposición a agentes teratógenos o con cointraíndicación para toma de muestra. Criterios de eliminación: que manifestaran su decisión de retirarse del estudio o que la calidad del DNA genómico fuera inadecuada para el análisis. Se identificaron 3 individuos no relacionados con SHS. Se realizó una evaluación clínica a los tres pacientes. Se extrajo DNA de sangre periférica de los tres pacientes y sus padres. Se realizó secuenciación del exoma para conocer la secuencia de las regiones codificantes de los nueve individuos (Nextera Rapid Capture Exome Kit, y NextSeq500, Illumina). Los fragmentos de DNA secuenciados fueron alineados usando el genoma hg19 como referencia.

Las variantes fueron filtradas por calidad, consecuencia, frecuencia poblacional y segregación en la familia, asumiendo dos patrones de herencia, *de novo* y autosómico recesivo basándonos en la presentación esporádica de los pacientes. Las variantes restantes se buscaron en una base de datos interna del Laboratorio de Genómica, Genética y bioinformática (LGGB). Se utilizó Exomiser para la priorización de genes y, como control de calidad final, se retuvieron sólo las variantes en las que la información del genotipo estuviera en al menos 70% de los individuos de la base de datos del LGGB.

Resultados. No se identificaron variantes en los genes candidatos *GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24* e *ICMT*; que han sido estudiados en otros pacientes, por otros investigadores del SHS. En el resto del exoma, se encontraron variantes candidatas diferentes para cada paciente, tanto en el modelo autosómico recesivo, como con presentación *de novo*. En el paciente 1 quedaron 7 variantes en el modelo recesivo y 7 en la presentación *de novo*. En el paciente 2 se obtuvieron 13 variantes en el modelo recesivo y 53 al asumir presentación *de novo*. En el paciente 3 se identificaron 2 variantes en el modelo recesivo y 77 al asumir presentación *de novo*.

Discusión y conclusiones. En la actualidad no existen reportes en la literatura de pacientes con SHS a los que se haya realizado análisis molecular mediante secuenciación del exoma. En este trabajo se reportan las posibles variantes patogénicas del SHS identificadas en tres individuos afectados no relacionados. Las variantes encontradas en el modelo recesivo tuvieron una frecuencia elevada con relación a la incidencia de esta enfermedad, por lo que se descartaron como posibles causantes del SHS. Asumiendo una presentación *de novo*, se postulamos a las variantes en estado heterocigoto que se identificaron en los genes *FUT4*, *FAT3*, *TCF7L2*, *BCOR* y *KMT2D* (*MLL2*) para continuar con el estudio y determinar si es posible asociarlas con el SHS. Cabe la posibilidad de que la causa del SHS corresponda a algún tipo de alteración no analizada en este trabajo, como es el caso de las variantes sinónimas, variantes estructurales, variantes intrónicas o variantes en el número de copias (CNVs). Debe considerarse que la alteración molecular pueda estar fuera del exoma, en cuyo caso tendría que buscarse mediante la secuenciación del genoma completo. La descripción en la literatura de gemelos discordantes con SHS sugiere que la causa del SHS puede deberse a una mutación somática, sin embargo, el SHS no presenta características clínicas usuales de las enfermedades ocasionadas por mosaicismo somático como asimetrías hemicorporales, mosaicismo pigmentario y malformaciones vasculares, por lo que es poco probable que el SHS sea causado por este mecanismo molecular. Otra posibilidad es que el SHS tenga una herencia no tradicional con frecuencia incrementada de mosaicismo geminal y una marcada alteración en la función reproductiva. En conclusión, los hallazgos de este trabajo amplían la información hasta ahora conocida sobre la causa genética de este síndrome al apoyar la teoría de que la herencia autosómica recesiva es improbable, y confirma que las enfermedades anteriormente asociadas con el SHS como las laminopatías y la displasia óculodentodigital no son alélicas de este padecimiento.

Índice

1. Introducción	9
2. Planteamiento del problema	29
3. Pregunta de Investigación	30
4. Hipótesis	31
5. Justificación	32
6. Objetivos	33
Objetivo general	33
Objetivos específicos	33
7. Materiales y métodos	34
Diseño del estudio	34
Lugar	34
Periodo de realización	34
Población objetivo	34
Tamaño de muestra y tipo de muestreo	34
Criterios de selección	35
8. Variables y definiciones	37
9. Desarrollo general del estudio	38
10. Limitaciones del estudio	47
11. Financiamiento	48
12. Resultados	49
Presentación de casos clínicos	49
Resultados de la secuenciación del exoma	57
13. Discusión	81
14. Conclusiones	107
15. Referencias	109
16. Anexos	109

1. Introducción

Las displasias esqueléticas (DE) son enfermedades congénitas y hereditarias que afectan la morfogénesis y el desarrollo del sistema óseo. A la fecha, las DE constituyen un grupo de más de 400 entidades causadas por mutaciones en más de 300 genes (Polla et al. 2015; Krakow 2015).

Si bien algunas DE no se presentan de forma frecuente en lo individual, la incidencia de las alteraciones esqueléticas de forma colectiva es de aproximadamente 1 en 5000 recién nacidos vivos (RNV), lo que corresponde al 5% de RNV con un defecto congénito. Se sospecha que la incidencia de DE es mayor a consecuencia de los casos subdiagnosticados. (Cho et al. 2015).

Debido al número tan extenso de DE, en el año 1970 la Sociedad Internacional de Displasias Esqueléticas, con la intención de facilitar la identificación de estos padecimientos realizó la primera clasificación y publicó la primera nomenclatura (Krakow 2015). Esta primera clasificación ha sufrido modificaciones y se ha actualizado en los años 1977, 1983, 1991, 1997, 2001, 2005 y 2010. La más reciente nomenclatura, que corresponde a la novena edición, se elaboró en el año 2015 en Bologna, Italia y en ella se describieron 436 enfermedades esqueléticas y 364 genes asociados con la etiología de dichos desórdenes. Estas 436 entidades fueron agrupadas en 42 categorías, en función de sus características clínicas (Tabla 1), radiológicas y moleculares (Bonafe et al. 2015b). Hay DE para las cuales se desconoce la causa molecular, por lo que aún quedan genes por identificar y etiologías por comprender.

Tabla 1. Clasificación de las displasias esqueléticas, nomenclatura del año 2015 (Bonafe et al. 2015b).

1. Condrodisplasias FGFR2	22. Displasias neonatales osteoescleróticas
2. Grupo colágena tipo 2	23. Osteopetrosis y enfermedades relacionadas
3. Grupo colágena tipo 11	24. Otras enfermedades óseas esclerosantes
4. Trastornos de sulfatación	25. Grupo de osteogénesis imperfecta
5. Grupo perlecan	26. Grupo mineralización anormal
6. Grupo agrecan	27. Enfermedades de depósito lisosomal y compromiso esquelético
7. Filamina y enfermedades relacionadas	28. Grupo osteolisis
8. Grupo TRPV4	29. Desarrollo esquelético deorganizado
9. Ciliopatías con presentación esquelética	30. Síndromes de sobrecrecimiento y compromiso esquelético
10. Displasia epifisaria múltiple y pseudocondroplasia	31. Osteoartropatías genéticas inflamatorias
11. Displasias metafisiarias	32. Displasia cleidocranial y defectos de osificación
12. Displasias espondilometafisiarias	33. Síndromes de craniosinostosis
13. Displasias espíndiloepimetafisiarias	34. Disostosis de compromiso craneofacial
14. Displasias espondilodisplásicas severas	35. Disostosis con compromiso vertebral y costal
15. Displasias acromélicas	36. Disostosis rotulianas
16. Displasias acromesomélicas	37. Braquidactilias sin manifestaciones esqueléticas
17. Displasias mesomélicas y rizomélicas	38. Braquidactilias con manifestaciones esqueléticas
18. Displasia campomélica y enfermedades relacionadas	39. Defectos de reducción hipoplasia de extremidades
19. Displasias de huesos delgados	40. Ectrodactilia con otras manifestaciones
20. Displasias con múltiples luxaciones	41. Grupo de polidactilia, sindactilia, trífalangismo
21. Grupo de condrodisplasia punctata	42. Defectos en la formación articular y sonostosis

En el grupo número 19 que corresponde a aquellas DE de huesos delgados, se encuentra clasificado el síndrome de Hallermann-Streiff (MIM %234100), el síndrome 3-M (MIM #273750, #612921, #614205), la displasia de Kenny-Caffey (MIM #244460, #127000), la osteocranioestenosis (MIM #602361), el síndrome de IMAGE (por las siglas en inglés de *intrauterine growth retardation, metaphyseal dysplasia, adrenal hypoplasia, and genital anomalies*) (MIM #614732) y el enanismo primordial osteodisplásico microcefálico tipos 1, 2 y 3 (MIM #210710).

El síndrome de Hallermann-Streiff (SHS) es la única entidad clínica dentro de este grupo que tiene una causa molecular desconocida, únicamente se ha reportado una mutación en el gen *GJA1* en un paciente, sin embargo, se ha secuenciado este gen en otros individuos afectados sin encontrar ninguna mutación (Bonafe et al. 2015b).

El presente proyecto de investigación propone identificar el gen o los genes candidatos que puedan asociarse con la causa molecular del síndrome de Hallermann-Streiff mediante la identificación de variantes patogénicas o mutaciones presentes en individuos afectados quienes son pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG).

Síndrome de Hallermann-Streiff

El síndrome de Hallermann-Streiff (SHS) es un padecimiento congénito poco frecuente, de etiología y patrón de herencia desconocidos que afecta principalmente el desarrollo óseo y de los tejidos blandos de la región craneofacial. No se conoce la prevalencia mundial de esta enfermedad debido a los pocos casos descritos. En una encuesta realizada en un hospital de Tokio, Japón, para conocer la prevalencia de síndromes dismórficos, de 27 472 nacimientos, sólo se reportó un caso con SHS (Higurashi et al. 1990).

Desde las primeras descripciones del SHS en el año 1948, hasta la actualidad, se han reportado un poco más de 150 casos (Numabe et al. 2011).

Los individuos afectados con SHS se caracterizan por presentar una forma típica del cráneo denominada discefalia (braquicefalia con abombamiento frontal), hipotricosis, microftalmia, catarata congénita, atrofia de la piel del centro de la cara y de la nariz, micrognatia, alteraciones dentales como agenesia, malformación o mala alineación dental; envejecimiento prematuro y talla baja proporcionada (Kortüm et al. 2011). Se ha reportado discapacidad intelectual en el 15% de los casos (Cohen 1991).

Historia del síndrome de Hallermann-Streiff

El primer caso de un individuo con SHS, fue descrito en 1893 por Aubry en el reporte titulado “Variedad singular de alopecia congénita: alopecia sutural” (Aubry 1893). En ese documento, el autor destacó la presencia de alopecia en el paciente pero no describió el cuadro clínico completo del síndrome (Cohen 1991).

Fue hasta 1948 que Hallermann, y posteriormente Streiff en 1950, describieron de forma separada a pacientes con malformaciones de cráneo y cara, “aspecto de pájaro”, cataratas congénitas y microftalmia (Hallermann 1948; Streiff 1950).

François, en 1958, tuvo un papel muy importante en la delimitación clínica del síndrome, pues incluyó en el diagnóstico la hipotricosis, la atrofia de piel, las alteraciones dentales y la talla baja proporcionada (Barrucand et al.1978). A partir de entonces a esta enfermedad se le ha nombrado de diferentes maneras como síndrome de Hallermann-Streiff, síndrome de Hallermann-Streiff-François, síndrome de François, síndrome discefálico y oculomandibulodiscefalia (Cohen 1991).

Manifestaciones clínicas del síndrome de Hallermann-Streiff

Los datos clínicos del SHS pueden variar entre los individuos afectados y también la gravedad es distinta entre cada paciente (Figura 1). Las principales características de esta condición incluyen anomalías del cráneo y de los huesos faciales. Los individuos afectados tienen características faciales distintivas, alteraciones oculares, alteraciones dentales, alteraciones en piel y estatura baja (Kirzioğlu et al. 2009).

Características craneofaciales. El cráneo presenta abombamiento frontal o parietal y occipital aplanado (braquicefalia); a este conjunto de alteraciones craneales se le denomina discefalia. La cara es pequeña con una nariz delgada que se estrecha y se adelgaza en la punta (Sclaroff et al. 19871). El dorso de la nariz es usualmente curvo o convexo. Los afectados pueden tener desviación septal nasal (Blodi 1957; Ponte 1962).

La mandíbula es pequeña y subdesarrollada (micrognatia), la rama ascendente es corta, y el cóndilo puede estar ausente lo que ocasiona desplazamiento de la articulación temporomandibular. El paladar es alto y estrecho y los senos paranasales están disminuidos de tamaño. Es frecuente la hipoplasia malar.

De forma conjunta, estas alteraciones craneofaciales son las responsables del aspecto tan particular de los individuos afectados, conocido históricamente en la literatura como “facies de pájaro” (Figura 1). Esta última denominación está en desuso por considerarse que tiene una connotación despectiva (Cohen 1991).

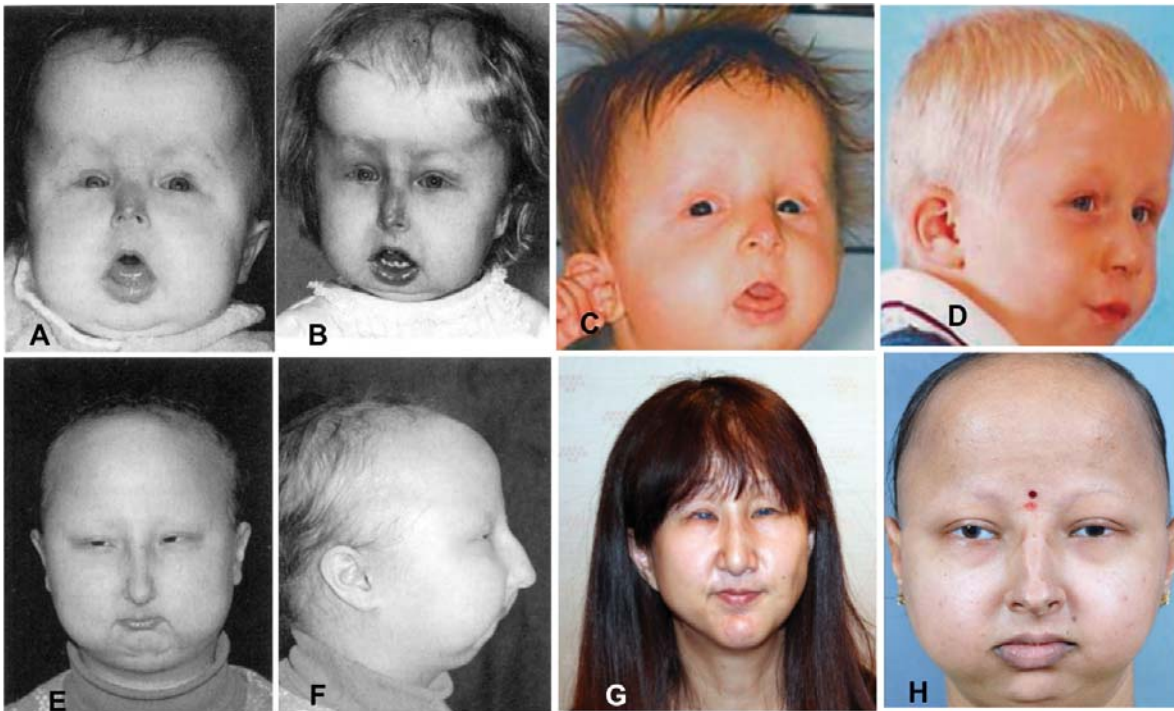


Figura 1. Fotografías clínicas de 6 pacientes con SHS. A) y B) Paciente 1 a los 1 y 3 años de edad, respectivamente. Obsérvese la hipotricosis de cabello, cejas y pestañas; el abombamiento frontal; microftalmia; nariz con punta delgada; alteraciones dentales y micrognatia. C) y D) Pacientes 2 y 3 respectivamente, ambos con fenotipo leve. E) y F) Paciente 4 con vista frontal y lateral, respectivamente. Nótese un fenotipo más grave con mayor alopecia, nariz convexa, microftalmia y micrognatia. G) Paciente 5 con alteraciones oculares severas. H) Paciente 6 con fenotipo similar a la paciente 4. Imágenes modificadas de Cohen 1991; Kortüm et al. 2011; Muthugaduru et al. 2013; Numabe et al. 2011.

Alteraciones oftalmológicas. Las cataratas congénitas se presentan en 80-90% de los casos, y en algunos pacientes se reabsorben espontáneamente (Kirzioğlu et al. 2009). La microftalmia tiene gravedad variable y ocurre en 78-83% de los casos. Las escleras azules se han descrito en 22-31% de los casos, nistagmus en 32-45%, estrabismo en 33-37%, glaucoma en 7-11%, atrofia de iris en 10-14%, y coloboma de iris en 5% de los pacientes (Figura 2). También se han descrito alteraciones del *fundus*, conjuntiva, córnea y párpados, como entropión o blefaroptosis (Cohen 1991).



Figura 2. Alteraciones oftálmicas en el SHS. A) Entropión del párpado inferior y superior derechos, estrabismo izquierdo, blefaroptosis. B) Microftalmia con microcórnea y estrabismo de ojo derecho. C) Microftalmia y estrabismo de ojo izquierdo. Imagen modificada de Chen et al. 2017; Cho et al. 2011; Pasyanthi et al. 2016.

Alteraciones dentales. Están presentes en 80-85% de los casos, incluyen ausencia de piezas dentales, persistencia de los dientes deciduos, ausencia, malformación o alineamiento incorrecto de los dientes; caries severas y prematuras, dientes supernumerarios y dientes natales (Singh et al. 2015) (Figura 3).

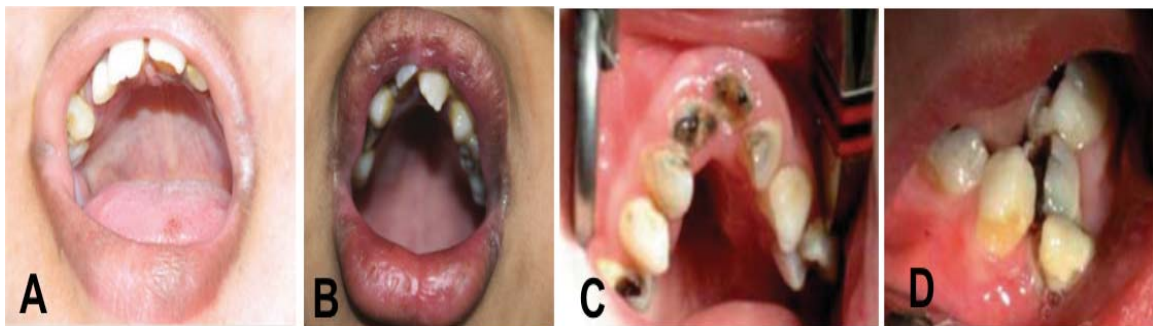


Figura 3. Alteraciones dentales en el SHS. Se muestran diferentes grados de paladar alto y estrecho. A), B) Alteraciones en el esmalte, alineamiento incorrecto y ausencia de piezas dentales. C), D) Regiones maxilar y mandibular, respectivamente. Se observa mayor alteración en el paladar, caries grave y menor número de piezas dentales. Imagen modificada de Muthugaduru et al. 2013; Kirzioğlu et al. 2009; Singh et al. 2015.

Hipotricosis (pelo escaso). Se presenta en 80% de los casos y afecta de manera particular el cuero cabelludo, cejas y pestañas (Barrucand et al. 1978) (Figuras 1 y 4). La alopecia es más notoria en las regiones frontales, parietales y sobre las suturas. El vello axilar y púbico pueden ser escasos (Falls et al. 1960; François 1958) .

Atrofia de piel. Se ha descrito en 68-70% de los casos y está limitada a la piel del cuero cabelludo y a la piel de la nariz. La piel del cuero cabelludo es delgada y tensa, resaltan a través de ella las venas subyacentes. Los mismos cambios se observan en la piel de la nariz (Carles-Mermet 1979) (Figura 4).

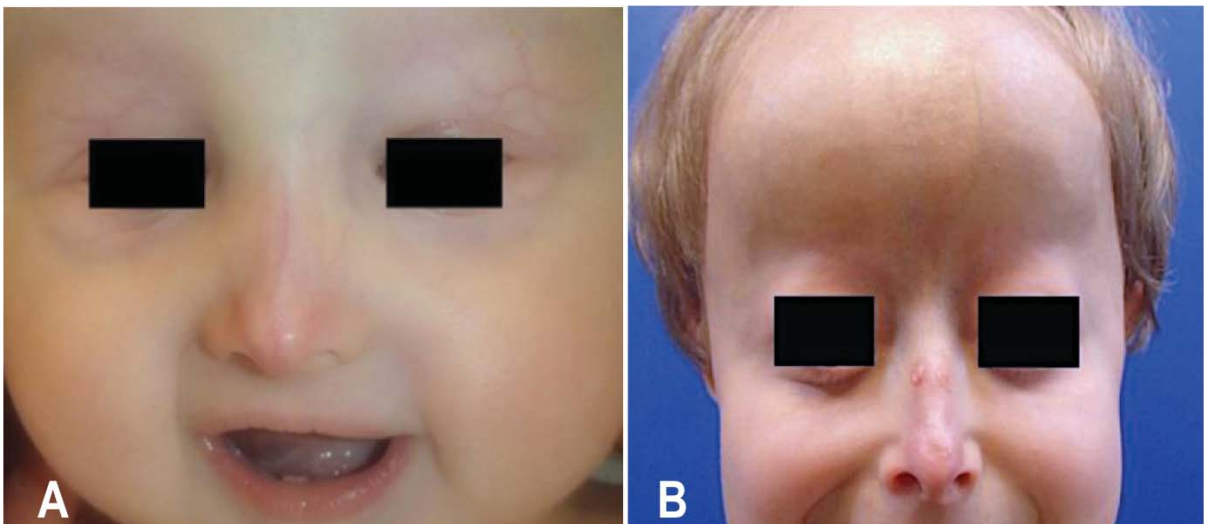


Figura 4. Atrofia cutánea en el SHS. A) Adelgazamiento de la piel de la nariz, se observan las venas subyacentes. B) Piel tensa y delgada del cuero cabelludo y de la nariz. Imagen modificada de Bénateau et al. 2015.

Alteraciones esqueléticas. Otras alteraciones esqueléticas descritas además de las mencionadas, son retraso en el cierre de las fontanelas, suturas amplias, huesos de la bóveda craneal adelgazados, presencia de huesos wormianos, calcificación de la hoz del cerebro, órbitas pequeñas, escápula alada, *pectus carinatum*, *pectus excavatum*, hipoplasia de las clavículas y costillas, lordosis, escoliosis, espina bífida, platispondilia, osteoporosis y sindactilia (Cohen 1991).

Crecimiento y desarrollo. El peso al nacimiento es normal en 64% de los casos y en el 36% restante se presenta un peso bajo (Suzuki 1970).

La talla baja se ha observado en 45-68% de los individuos afectados (François 1982). El crecimiento está disminuido de forma proporcionada, con al menos 2-5 desviaciones estándar debajo de la media. La talla final para las mujeres adultas afectadas es de aproximadamente 152.4 cm, y en varones de 154.9 cm-157.4 cm (Steele et al. 1970). Se ha reportado hipogenitalismo en 10-12% de los casos. Se ha documentado criptorquidia e hipospadias en varones; así como alargamiento del clítoris, asimetría y atrofia de las glándulas mamarias en mujeres (Barrucand et al. 1978; François 1982).

Alteraciones intelectuales y del comportamiento. Se presenta deficiencia intelectual en 15% de los casos en diversos grados, desde retraso en el desarrollo psicomotor hasta deficiencia intelectual grave. Se han descrito también otros síntomas neurológicos como hiperactividad, coreoatetosis y convulsiones tónico-clónicas ocasionales. Sin embargo, estos aspectos psicométricos sólo se han descrito por observación y sin escalas de medición (Crevits et al. 1977).

Otras manifestaciones. Se han descrito malformaciones cardíacas en 4.8% de los pacientes con SHS como estenosis pulmonar, comunicación interauricular, comunicación interventricular, persistencia del conducto arterioso y tetralogía de Fallot (Dinwiddie et al.1978). En un paciente se reportó deficiencia humoral e hipoparatroidismo (Chandra et al.1978).

Complicaciones. Las complicaciones en el SHS son secundarias a la estrechez de la vía aérea superior ocasionada por las malformaciones craneofaciales antes descritas. Ejemplo de éstas son infecciones pulmonares tempranas, compromiso respiratorio, apnea obstructiva del sueño y aumento en el riesgo anestésico.

Debido a que de manera usual estos pacientes se someten a cirugías reconstructivas es importante considerar estas posibles complicaciones (Cohen 1991).

Abordaje diagnóstico del síndrome de Hallermann-Streiff

El diagnóstico del SHS es totalmente clínico, por ello el examen físico es primordial para la observación del fenotipo distintivo y la búsqueda intencionada de las manifestaciones clínicas principales. La facies típica del SHS es característica, lo que permite establecer el diagnóstico con la revisión clínica. Se utilizan como criterios diagnósticos los 7 datos clínicos descritos por François en 1958 (Kirzioğlu et al. 2009; Bénateau et al. 2015). La frecuencia de cada uno de ellos se esquematiza en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios diagnósticos en el síndrome de Hallermann-Streiff (Cohen 1991).

Datos clínicos	Frecuencia (%)
Discefalia y facies distintiva	98-99
Hipotricosis	80-82
Atrofia de piel, especialmente en nariz y centro de la cara	68-70
Cataratas congénitas	81-90
Microftalmia bilateral	78-83
Dentición anormal	80-85
Talla baja proporcionada	45-68

Tratamiento y manejo de los pacientes con síndrome de Hallermann-Streiff

La atención médica está dirigida a corregir las malformaciones que cada individuo con SHS presente (Cohen 1991). El manejo integral de los pacientes requiere valoraciones complementarias como la oftalmológica, dermatológica, dental, y por cirugía maxilofacial y reconstructiva, entre otras. El tratamiento se enfoca a la reparación quirúrgica de las alteraciones craneofaciales, oftálmicas y dentales, con el fin de mejorar la calidad de vida de los pacientes ya que no existe un tratamiento definitivo para esta condición (David et al. 1999).

Bases genéticas del Síndrome de Hallermann-Streiff

La causa y las bases genéticas moleculares del SHS aún se desconocen, por lo tanto la herencia de esta condición también es incierta. La mayoría de los casos clásicos del SHS ocurren sin distinción de género y de forma esporádica (Cohen 1991).

Se han reportado casos familiares con SHS que presentan diferentes patrones de herencia: autosómico dominante y autosómico recesivo. La herencia autosómica recesiva es sugerida en los casos reportados por Dennis y colaboradores en 1995, y por Bueno- Sánchez en 1966.

Denis y colaboradores describieron una familia en la que un neonato varón murió en la etapa perinatal y un feto femenino murió a las 29 semanas de gestación. Ambos tenían un padecimiento semejante al SHS: los huesos largos eran delgados con algunas fracturas, el cráneo estaba subdesarrollado y el rostro era característico de SHS. Sólo en el varón se identificó catarata bilateral. Se consideró la condición como una forma severa y letal de SHS (Dennis et al. 1995).

Bueno-Sánchez reportó el caso de SHS en dos de tres hermanos de un matrimonio consanguíneo, defendiendo la teoría de una transmisión autosómica recesiva (Bueno-Sanchez 1996).

La herencia autosómica dominante se describió por Guyard y colaboradores en 1962, y por Koliopoulos y Palimeris en 1975 (Cohen 1991).

Guyard reportó el caso de un padre y su hija con SHS, sin embargo, los padres eran consanguíneos, por lo que no se puede descartar pseudodominancia (Guyard et. al 1962).

Koliopoulos y Palimeris reportaron un caso familiar de SHS con 5 integrantes afectados en 3 generaciones. Sin embargo, el diagnóstico de este caso fue puesto en duda en una revisión del síndrome y se desconoce si los integrantes de esta familia verdaderamente presentaron SHS por lo que la herencia autosómica dominante no se ha confirmado en esta enfermedad (Cohen 1991).

La observación tan poco frecuente de la herencia dominante con la transmisión padre a hijo en los casos familiares con SHS y el reporte de hermanos afectados podría sugerir que el patrón de herencia es autosómico recesivo.

Otra posibilidad es que el SHS tenga un patrón autosómico dominante con presentación *de novo* en la mayoría de los casos, con una frecuencia incrementada de mosaicismo geminal y una marcada alteración en la función reproductiva (Numabe et al. 2011).

En la Tabla 3 se resumen los casos familiares principales.

Tabla 3. Patrones de herencia descritos en casos familiares del síndrome de Hallermann-Streiff.

Año de publicación	Autor(es)	Número de Afectados	Herencia	Observaciones
1961	Van Balen	2 gemelos monocigóticos	¿?	Gemelos concordantes
1962	Guyard et al.	Padre e hija	¿?	Los padres consanguíneos, no se descarta pseudodominancia.
1966	Bueno-Sanchez	2 de tres hermanos	Autosómico recesivo	Consanguinidad
1975	Koliopoulos y Palimeris	5 casos en 3 generaciones	Autosómico dominante	Transmisión varón a varón.
1995	Dennis	2 hermanos	Autosómico recesivo	-----

El Dr. Michael Cohen menciona que no se puede aceptar ningún caso familiar del SHS como verdadero porque en los artículos en los que se publicaron no se describen las características clínicas detalladas de los pacientes y no se puede corroborar que el diagnóstico haya sido el de SHS, además de que los casos que han sido verificados tienen sólo un individuo afectado por familia (Cohen 1991).

Aunque la herencia o presentación del SHS es principalmente esporádica, se ha considerado que el SHS pueda tener una causa monogénica, es decir que una sola variante patogénica pueda ocasionar todas las manifestaciones de este padecimiento, lo anterior surge de la siguiente evidencia:

- 1) los reportes mencionados de pacientes con probable patrón de herencia autosómica recesiva y dominante,
- 2) la concordancia en gemelos monocigóticos (Van Balen 1961) y
- 3) el fenotipo se sobrepone con otros desórdenes congénitos monogénicos como la displasia óculodentodigital y el síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (Kortüm et al. 2011; Cohen 1991), lo que nos lleva a suponer que quizá el SHS es causado por un gen relacionado con las vías de señalización de los genes causantes de estas dos enfermedades (Kirzioğlu et al. 2009).

También es importante mencionar que existen varios puntos a discusión en relación a la posibilidad de una causa monogénica en el SHS como que mujeres afectadas con el síndrome concibieron hijos sanos (Numabe et al. 2011), y el reporte de gemelos monocigóticos discordantes (Schondel 1943).

Genes analizados como causantes de SHS

***GJA1* (MIM *121014; 6q22.31).** En la clasificación de las DE 2015, el SHS se encuentra en el grupo 19 con un patrón de herencia autosómico recesivo (Bonafe et al. 2015). En esta publicación se menciona el reporte de un solo caso de SHS con una mutación en el gen *GJA1*. Las mutaciones en este gen son la causa de la displasia oculodentodigital (ODDD, MIM #164200), padecimiento autosómico dominante caracterizado por malformaciones en ojos, dientes y dedos que tiene manifestaciones clínicas muy similares al SHS. El paciente que se reportó con esta mutación presentó datos clínicos compartidos entre el SHS y la displasia oculodentodigital (Pizzuti et al. 2004), por lo que es no se descarta que el verdadero diagnóstico de éste paciente haya sido displasia oculodentodigital. Se realizó secuenciación Sanger del gen *GJA1* a una paciente con SHS y no se reportaron variantes patogénicas por lo que se requiere analizar molecularmente a más pacientes para confirmar o descartar que *GJA1* esté asociado con la etiología. (Muthugaduru et al. 2013).

***LMNA* (MIM *150330, 1q22), *ZMPSTE24* (MIM *606480, 1p34.2), e *ICMT* (MIM *605851, 1p36.31).** Estos genes están asociados con la causa de las laminopatías, enfermedades con características clínicas muy similares al SHS. Las mutaciones en estos genes ocasionan progeria Hutchinson-Gilford y la displasia mandibuloacral (Kortüm et al. 2011). El síndrome de progeria Hutchinson-Gilford (HGPS; MIM #176670) es un padecimiento con patrón de herencia autosómico dominante y recesivo, caracterizado por talla baja, peso bajo, pérdida temprana de pelo corporal, lipodistrofia y fenotipo facial senil. Es causado por mutaciones en el gen *LMNA* que codifica para las proteínas nucleares laminares, lámina A y C. La displasia mandibuloacral se clasifica en tipo A y tipo B. El tipo A (MADA; MIM #248370), es una enfermedad con herencia autosómica recesiva y se caracteriza por retraso del crecimiento, anomalías craneofaciales con hipoplasia mandibular, anomalías esqueléticas con osteólisis progresiva de las falanges y clavículas, cambios pigmentarios de la piel y lipodistrofia acral con tejido graso normal de cuello y tronco. También se origina por mutaciones en *LMNA* (Novelli et al. 2002; De Sandre-Giovannoli et al. 2003; Eriksson et al. 2003).

La displasia mandibuloacral tipo B (MADB; MIM #608612), al igual que la tipo A, tiene un patrón de herencia autosómico recesivo y presenta manifestaciones clínicas similares. Sin embargo, es causada por mutaciones en el gen *ZMPSTE24* (Ahmad et al. 2010), el cual codifica para una metaloproteinasa de zinc que se requiere para el procesamiento postraduccional de la molécula precursora de la lámina A, denominada prelámina A (Cunningham et al. 2010; Ben Yaou et al. 2011). El gen *ICMT* también está involucrado en el procesamiento de la proteína prelámina A, por lo que se sospecha que podría estar implicado en la patología de la displasia mandibuloacral. Sin embargo, no se han asociado mutaciones en este gen con enfermedades humanas (Kortüm et al. 2011).

Kortüm y colaboradores, en 2011, secuenciaron las regiones codificantes y las regiones intrónicas adyacentes de estos tres genes en 8 pacientes con SHS, con el objetivo de averiguar si este síndrome podría considerarse como otra laminopatía.

Encontraron en el paciente 1, la variante intrónica c.1158–44C>T en estado homocigoto, en el gen *LMNA*. El análisis de predicción *in silico* reveló que esta variante podía crear un nuevo sitio donador del splicing. Sin embargo, el análisis del RNA no descubrió algún transcrito anormal de *LMNA* del paciente en comparación con 2 individuos sanos.

En el paciente 2 identificaron en estado heterocigoto la variante de sentido equivocado c.1930C>T (p.R644C) en el exón 11 de *LMNA*, la cual ya se había descrito en pacientes con un amplio espectro de fenotipos como lipodistrofia, resistencia a la insulina, neuropatía motora, cardiomiopatía dilatada, hipertrofia ventricular izquierda, esteatosis hepática y progeria atípica.

Todos los pacientes con la variante c.1930C>T (p.R644C) han cursado con características de laminopatías y muestran complicaciones adicionales como glomeruloesclerosis renal focal y segmentaria, retraso en el crecimiento, micrognatia, sordera neurosensorial y contracturas con pie equinovaro. Pero el fenotipo en dicho paciente no se presentó como una laminopatía clásica, ya que tuvo catarata congénita bilateral, microftalmia, talla baja, nariz pequeña y delgada y micrognata, datos clínicos clásicos del SHS.

La variante p.R644C tuvo una frecuencia en la población danesa del 0.8, y aunque la variante era probablemente patogénica, los autores deliberaron que debe haber una segunda mutación implicada en pacientes con esta alteración.

Consideraron que probablemente ésta variante contribuyó al fenotipo del paciente, pero descartaron a *LMNA* como el gen principal en la causa del SHS (Kortüm et al. 2011).

Los autores identificaron 2 variantes benignas en *ZMPSTE24* y una duplicación benigna, de 24pb en la región 5' no traducida del gen *ICMT* en el paciente 1.

Con lo anterior, concluyeron que el SHS no pertenece al grupo de las laminopatías.

Pese a los esfuerzos realizados en estos estudios, la causa molecular del SHS sigue sin conocerse y, por lo tanto, tampoco se ha podido definir un tipo de herencia para esta enfermedad.

Alteraciones cromosómicas descritas en pacientes con síndrome de Hallermann-Streiff

Se ha descrito un complemento cromosómico normal en la mayoría de los estudios citogenéticos de los pacientes con SHS (Barrucand et al.1978). Sin embargo existen reportes de individuos afectados con alteraciones cromosómicas. Carones en 1961 reportó elongación de uno de los brazos de un cromosoma 10 en un paciente con SHS (Cohen 1991).

Jalbert y colaboradores describieron, en 1968, una deleción de 4p en un paciente con SHS. Fryns y colaboradores describieron, en 1993, a una niña con características clínicas compatibles con el SHS que presentó monosomía parcial 4q y trisomía parcial 14q (Kortüm et al. 2011).

Hasta ahora no se ha encontrado relación entre estas alteraciones cromosómicas y el desarrollo de la enfermedad. Basándonos en estas observaciones no se puede apoyar algún *locus* para el gen causante del SHS.

Análisis genómico para genes candidatos de enfermedades monogénicas

Para el descubrimiento de genes candidatos se han empleado diversos métodos, en el caso de las enfermedades monogénicas, el análisis de ligamiento ha sido especialmente útil para mapear la región que contiene el gen mutado (Lander et al. 1986; Lathrop et al. 1984; Barrett et al. 2011; Teare 2011).

Ésta técnica, sin embargo, requiere de la presencia de múltiples individuos afectados, distribuidos en varias generaciones y es poco útil cuando se trata de casos aislados o el número de afectados dentro de una familia es insuficiente.

El desarrollo de la secuenciación de segunda generación ha cambiado este panorama y ha hecho posible la búsqueda de mutaciones responsables de enfermedades mendelianas en familias con pocos miembros afectados, y en casos aislados (Iqbal et al. 2015; Rauch et al. 2015; Chong et al. 2015; Do et al. 2015; Fitzgerald et al. 2014).

Por estas razones, se considera que la tecnología de secuenciación de segunda generación, específicamente la secuenciación del exoma, podría aplicarse para realizar la búsqueda del gen candidato del SHS.

Secuenciación de segunda generación: secuenciación del exoma

La secuenciación del exoma es una técnica de biología molecular que determina el orden de las bases A, G, C y T de las regiones codificantes del DNA, es decir, de todo el exoma de forma simultánea. Esta herramienta permite el análisis de todos los genes que pueden ser responsables de una enfermedad en un solo experimento, a diferencia de la secuenciación de tipo Sanger en la que sólo se analizan uno o varios exones de un gen por vez (Su et al. 2011).

De forma general, la técnica de secuenciación del exoma, consiste en crear una biblioteca de fragmentos por medio de un procedimiento llamado **tagmentación**, en el cual el DNA es cortado y de forma simultánea se le agregan adaptadores que son secuencias de DNA conocidas.

A continuación, en el procedimiento del **enriquecimiento** se capturan los fragmentos del genoma que corresponden a los exones mediante la hibridación con sondas específicas para dichas regiones y se amplifican estas regiones exónicas; una vez capturados todos los exones se procede a secuenciarlos.

La secuencia del DNA obtenida se compara con el genoma de referencia para obtener las variantes que sean distintas mediante el **alineamiento**.

Posteriormente, se realiza el filtrado de dichas variantes con la finalidad de disminuir el número de ellas y seleccionar aquellas que se encuentren presentes sólo en el exoma del individuo afectado. De esta forma, se puede determinar la presencia de variantes patogénicas causantes de la enfermedad en estudio (Figura 5) (Mardis 2008).

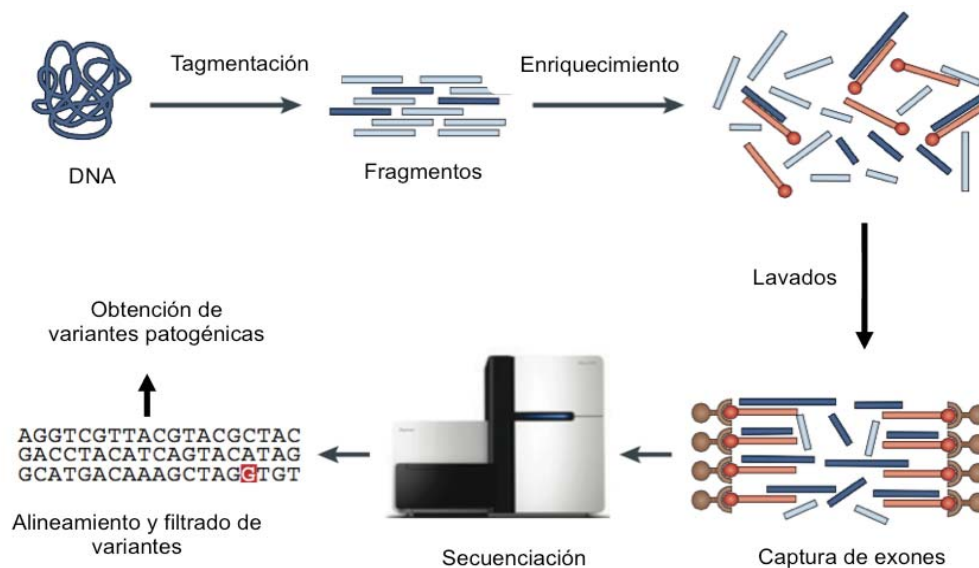


Figura 5. Técnica de secuenciación del exoma. Se muestran los diferentes procedimientos para obtener las posibles variantes patogénicas. Imagen modificada de Bamshad 2011.

La secuenciación del exoma ha jugado un papel muy importante en los últimos años en la identificación de variantes patogénicas de numerosas enfermedades monogénicas como el síndrome de Freeman-Sheldon (DA2A; MIM #193700), feocromocitoma familiar (MIM #171300) y síndrome de Kabuki (KABUK1; MIM#147920) (Marian 2012; Ng et al. 2010; Comino-Méndez et al. 2011; Ng et al. 2010).

Hasta el año 2014, se encontraron 25 publicaciones que reportaron nuevos genes candidatos para las DE, los cuales se descubrieron con la tecnología de secuenciación de segunda generación (Lazarus et al. 2014). Algunos de estos descubrimientos han contribuido a la realización de la Nomenclatura y clasificación de desórdenes genéticos esqueléticos 2015, documento presentado anteriormente (Bonafe et al. 2015b). La aplicación de secuenciación del exoma ha permitido el descubrimiento de los genes responsables de alteraciones óseas como el síndrome de Nager (AFD1; MIM #154400) (Bernier et al. 2012), síndrome de Robinow (DRS2; MIM #616331) (White et al. 2015), disostosis acrofacial tipo Cincinnati (AFDCIN; MIM #616462) (Weaver et al. 2015) y la disostosis mandibulofacial con alopecia (MFDA; MIM #616367) (Gordon et al. 2015), entre otros.

Con la información previa, se considera necesario un mayor análisis para establecer la causa del SHS. Se estima que el 85% de las mutaciones causantes de enfermedades se localizan en regiones codificantes (Rabbani et al. 2012). En consecuencia, la secuenciación del exoma podría identificar las variantes causales del SHS, lo cual sería importante para poder conocer el mecanismo molecular que produce la enfermedad, las vías celulares implicadas y la herencia. Esto contribuiría al conocimiento universal de la patología en estudio, daría oportunidad de un manejo integral de los pacientes afectados y se podría brindar asesoramiento genético familiar con bases moleculares.

2. Planteamiento del problema

El SHS es un padecimiento congénito e infrecuente, de etiología desconocida. Para establecer las características moleculares de este síndrome se requiere identificar el gen cuyas variantes patogénicas dan origen a las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. En el HIMFG se atiende a pacientes no relacionados entre sí, con diagnóstico de SHS. El análisis genético del exoma de estos pacientes, así como el estudio de la distribución de las distintas variantes a lo largo del gen o genes candidatos, junto con la predicción del efecto que tienen estas variantes en el fenotipo, brindará un mayor conocimiento sobre el desarrollo de este padecimiento.

3. Pregunta de Investigación

Este proyecto pretende contestar la pregunta: ¿Cuáles serán las posibles variantes patogénicas identificadas por secuenciación del exoma en pacientes con diagnóstico clínico de SHS?

4. Hipótesis

Se identificarán variantes genéticas en el exoma de los pacientes con SHS que podrán estar implicadas en la etiología de la enfermedad.

5. Justificación

La identificación de variantes patogénicas en un gen responsable del SHS permitirá comprender mejor las bases moleculares de esta enfermedad, así como, la vía celular implicada, el papel de ese gen en el desarrollo esquelético, y el patrón de herencia de esta enfermedad. Todo esto contribuirá al conocimiento universal y, eventualmente, a un manejo integral adecuado de los individuos afectados con este síndrome.

6. Objetivos

Objetivo general

Identificar, por secuenciación del exoma, las posibles variantes genéticas en pacientes con SHS que puedan explicar la etiología de esta enfermedad.

Objetivos específicos

- Identificar a pacientes con diagnóstico clínico del SHS.
- Realizar el análisis del DNA de los pacientes con SHS por medio de la secuenciación del exoma.
- Analizar las variantes encontradas, en el contexto de la vía implicada y de su efecto en la proteína.
- Establecer la relación entre los hallazgos moleculares y los datos clínicos de los pacientes.

7. Materiales y métodos

Este proyecto fue aprobado por los Comités de Investigación, ética y bioseguridad, con número de registro HIM 2017-018.

Diseño del estudio

- Tipo de diseño: observacional.
- Tipo de análisis: descriptivo.
- Método de observación: transversal.

Lugar

- Departamento de Genética.
- Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática (LGGB), HIMFG.

Periodo de realización

- Dos años, de marzo de 2016 a febrero 2018.

Población objetivo

- Individuos afectados con el síndrome y familiares de primer grado.
- Identificamos tres pacientes no relacionados entre sí con diagnóstico de SHS. Incluimos en el estudio a ambos padres de cada paciente. En total fueron 3 tríos incluidos en este protocolo.

Tamaño de muestra y tipo de muestreo

- El número de muestras a estudiar estuvo determinado por la cantidad de pacientes identificados y por los recursos disponibles. El muestreo fue no probabilístico, con registro consecutivo.

Criterios de selección

- **Criterios de inclusión.** Individuos afectados de SHS y familiares de primer grado. *Afectados:* individuos de cualquier género, de cualquier edad, que fueran o hubieran sido pacientes del HIMFG y cumplieran con los 7 criterios clínicos principales para el diagnóstico del SHS propuestos por François en 1958 (Cohen 1991). *Familiares de primer grado:* padres de los individuos afectados.

Seleccionamos a los padres como familiares de primer grado por las siguientes razones:

- En los 3 casos identificados, el SHS se presentó por primera vez en la familia (casos esporádicos). Ante esta situación sospechamos una herencia autosómica recesiva o una herencia autosómica dominante con presentación *de novo*. Obtuvimos muestra de los padres para conocer si alguno de los dos era portador de la variante patogénica (asumiendo una herencia autosómica recesiva) y para filtrar las variantes partiendo de la premisa de que como los padres son individuos sanos, aquellas variantes presentes en los individuos afectados y en los padres sanos no podrían ser las variantes patogénicas que dieron lugar al SHS (asumiendo una herencia autosómica dominante con presentación *de novo*).
- Los hermanos menores de edad del individuo afectado que no tuvieron el síndrome no se incluyeron ya que por cuestiones éticas preferimos contar con el consentimiento de participantes adultos.
- Los 2 pacientes con SHS que son adultos no tienen descendencia.

- **Criterios de exclusión**
 - Pacientes con antecedentes de exposición a agentes teratógenos.
 - Contraindicación para toma de muestra.

- **Criterios de eliminación**
 - Aquellos individuos que manifestaran su decisión de retirarse del estudio.
 - Que la calidad del DNA genómico fuera inadecuada para el análisis.

8. Variables y definiciones

Variable independiente: Síndrome Hallermann-Streiff

- Definición conceptual. Padecimiento congénito caracterizado por malformaciones en tejido óseo y tejido blando de la región craneofacial.
- Definición operacional. Padecimiento congénito en el que están presentes las 7 características clínicas principales antes mencionadas.
- Escala de medición. Cualitativa, dicotómica. Presencia/Ausencia del síndrome.
- Unidad de medición: Criterios clínicos propuestos por François en 1958 (Cohen 1991).

Variable dependiente: Variante patogénica

- Definición conceptual. Cambio en la secuencia del DNA que por sí solo explica el desarrollo de una enfermedad.
- Definición operacional. Cambio en la secuencia del DNA que por sí solo explica el desarrollo de una enfermedad, en este caso, el síndrome de SHS.
- Escala de medición. Cualitativa dicotómica: Presencia/Ausencia de la variante patogénica.
- Unidad de medición. Secuenciación del exoma y análisis bioinformático. Nomenclatura de la Sociedad de las Variantes del Genoma Humano (Human Genome Variation Society), programas de predicción del efecto de las variantes (SIFT y PolyPhen, MutationTaster).

9. Desarrollo general del estudio

Las actividades realizadas en este proyecto incluyeron desde la identificación supervisada de pacientes para su inclusión en el estudio hasta el análisis bioinformático de los resultados.

Identificación e inclusión de los individuos participantes en el estudio

- Se identificaron, en el archivo clínico del HIMFG, los números de registros de los pacientes con diagnóstico de SHS.
- Se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes identificados y se tomaron los datos para su localización, como teléfono y domicilio. Dos pacientes habían sido dados de alta del HIMFG por mayoría de edad, por lo que fue necesario acudir a su domicilio; lo anterior con el conocimiento y autorización de la institución. La tercera paciente fue evaluada en la consulta del Departamento de Genética.
- Una vez localizados los pacientes, se les realizó una historia clínica, árbol genealógico, y una evaluación física con la finalidad de corroborar que cumplieran con los datos clínicos de los criterios de selección. Se invitó a participar al estudio a los pacientes y a sus dos padres; se les proporcionó la carta de consentimiento y/o asentimiento informado (Anexos 1 y 2), que les fue expedida, y se solicitó la firma de dicho documento. Se realizó toma de fotografías clínicas con previa firma del consentimiento (Anexo 3). Se realizó toma de muestra para obtener 1 o 2 ml de sangre periférica de los pacientes y sus padres. En total fueron 9 individuos participantes en el estudio contando a los afectados y a los familiares de primer grado es decir, tres tríos.

Extracción del DNA

- Las 9 muestras de sangre se recolectaron en tubos con anticoagulante (EDTA) y se almacenaron a 4°C hasta el momento de ser procesadas para la extracción del DNA.
- La extracción del DNA se hizo mediante el método de columnas con el paquete comercial Quick-DNA[®] Universal Kit (Zymo Research, Irvine CA) (Anexo 4).
- Una vez extraído, el DNA de los pacientes fue resguardado en el Laboratorio de Genómica Genética y Bioinformática del HIMFG, a -20°C hasta que se concluyeron todos los estudios necesarios de la secuenciación del exoma.

Cuantificación del DNA, verificación de calidad del DNA y diluciones

- Para cuantificar el DNA de cadena doble se utilizó el fluorómetro Qubit 3.0, (Thermo Fisher Scientific, Waltham).
- Con el fin de realizar un control de calidad de la extracción del DNA, se hizo un gel de agarosa al 1% y se cargaron 4 µl de DNA de cada individuo participante. Este procedimiento se realizó para observar la integridad del DNA.
- Una vez que se comprobó la integridad del DNA, se realizaron diluciones con Tris HCl a 10 mM con pH de 8.5, para llevar la concentración final del DNA a 5 ng/µl que es la concentración deseada para continuar con la generación de las librerías.

Secuenciación del exoma

- Para secuenciación del exoma, se realizaron los siguientes procedimientos: 1) generación de la librería, lo cual comprendió la tagmentación y el enriquecimiento; y 2) secuenciación del exoma propiamente dicho. Para la generación de la librería se utilizó el kit y el manual de procedimientos Nextera Rapid Capture Exome (Illumina, San Diego CA).

- *Tagmentación.* Con el DNA purificado se generó la librería para la secuenciación del exoma. En este procedimiento se realizó la fragmentación del DNA de los 9 individuos con la finalidad de obtener secuencias de DNA de aproximadamente 300 pares de bases. En este paso también se añadieron los adaptadores en los extremos de cada fragmento. Este proceso se realizó de forma simultánea por medio de una enzima transposasa que tiene la capacidad de cortar y pegar fragmentos de DNA. (Anexo 4).
- *Enriquecimiento.* Este proceso consistió en separar las secuencias correspondientes a las regiones exónicas del DNA total, ya que en la secuenciación del exoma sólo interesan las secuencias codificantes. Durante este paso se hicieron varios lavados después de la captura de exones, para limpiar el DNA exónico de las otras secuencias no deseadas (Anexo 4).
- *Validación y cuantificación de la librería.* Antes de la secuenciación del exoma se evaluó el tamaño de los fragmentos de la librería en un gel de agarosa al 4%. La concentración de la librería, para posteriormente llevar a cabo la secuenciación fue de 1.5 pM.
- *Secuenciación del exoma.* La secuenciación propiamente dicha se realizó mediante la técnica de secuenciación por síntesis de puentes en el instrumento NextSeq500 (Illumina[®], San Diego). Se utilizó una celda de flujo de alto rendimiento, con la capacidad para generar secuencias de extremos pareados. La secuenciación se hizo de manera multiplex: se procesaron las 9 muestras en un solo experimento, usando códigos de barras (índices) para distinguir cada muestra.
- Finalmente, se realizó el análisis bioinformático, que incluyó la evaluación global de calidad del experimento, el alineamiento, el llamado de variantes, el análisis y la priorización de las variantes. En la Figura 6 se esquematizan todas las etapas del estudio de forma secuencial.

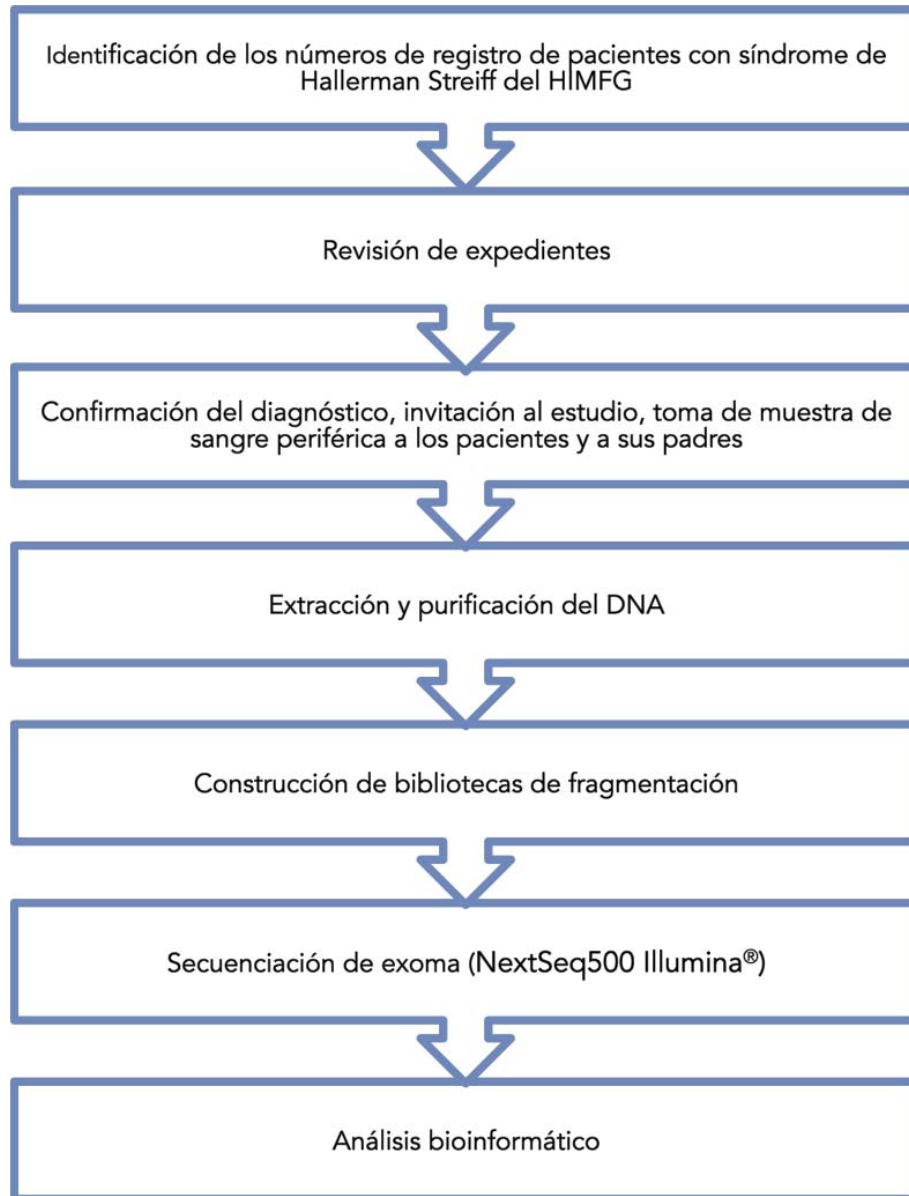


Figura 6. Desarrollo general del estudio. Se muestran las etapas realizadas en el proyecto.

Análisis bioinformático

Evaluación global del experimento

- Una vez que el proceso de secuenciación terminó, el equipo generó 8 archivos en formato FASTQ por cada muestra de DNA. Dicho formato incluyó estas secuencias en formato FASTA y valores de calidad para cada una de las posiciones de la secuencia. Para comenzar el análisis de los datos, se revisaron estos archivos en la plataforma de Illumina (Base Space, Sequence Hub) y se obtuvieron gráficas de calidad y de la densidad de los clusters, con la finalidad de evaluar la calidad del procedimiento. Posteriormente se eliminaron las secuencias de los índices para continuar con el alineamiento.

Alineamiento y llamado de variantes

- Este procedimiento consistió en alinear los fragmentos de DNA secuenciados contra el genoma humano de referencia para identificar las diferencias y obtener las variantes génicas de las 9 muestras. Para ello se utilizó la versión del genoma GRCh37.p13 (hg19) como modelo y el programa Issac Enrichment (Illumina) que incluye los programas *Burrows-Wheeler Aligner* (BWA Enrichment v2.1) para el alineamiento propiamente dicho y *Genome Analysis Toolkit* (GATK v3.1, Broad Institute) para el llamado de variantes. Al término de este procedimiento, se generó un archivo con la lista de variantes en formato *vcf* (*variant call file*) por cada individuo. Además se obtuvieron los datos de cobertura y profundidad globales, y en cada muestra.

Análisis de las variantes.

- Las variantes obtenidas fueron analizadas con el software Base Space Variant Studio (versión 3.0; Illumina). Éste procedimiento se realizó sólo con las variantes de los tres individuos afectados. En este proceso las variantes fueron sometidas a diferentes filtros para reducir el número de ellas.

Los filtros que se aplicaron fueron los siguientes: 1) valor de calidad mayor o igual 30 (Q30), profundidad mayor a 9, frecuencia del alelo alternativo superior a 19%; 2) que la variante tuviera alguna consecuencia (variantes causantes de error en splicing, sin sentido, de sentido equivocado, ganancia o pérdida de codón de paro, corrimiento del marco de lectura e indels); 3) filtro de frecuencia en la población, se retuvieron sólo aquellas variantes que tuvieron una frecuencia <1% ó que no estuvieron reportadas en las bases de datos *Single Nucleotide Polymorphism Database* (dbSNP, NCBI), *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) y el Proyecto de los 1000 Genomas; 4) filtro de segregación familiar, se compararon las variantes de los individuos afectados con las de sus familiares sanos.

De acuerdo con los árboles genealógicos de los 3 pacientes, se asumieron dos posibles patrones de herencia para evaluar la segregación de las variantes, el modelo autosómico recesivo y el modelo *de novo*.

- Una vez que se obtuvieron las variantes candidatas para los 3 pacientes en ambos modelos, el recesivo y el *de novo*, se utilizó una base de datos del Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática (LGGB) del HIMFG, formada por 123 genotipos obtenidos por secuenciación de segunda generación, para aplicar un filtro adicional comparando las variantes presentes en los 3 tríos con las de otros individuos de la población mexicana. La base de datos reúne exomas de pacientes con enfermedades distintas al síndrome de SHS como inmunodeficiencias, así como también exomas de familiares sanos. Este procedimiento permitió reducir el número de variantes candidatas. Posteriormente, de forma manual, se corroboró que las variantes restantes segregaran con el patrón de herencia autosómico recesivo o *de novo*. En el primero se asumió que los padres debían presentar la posible variante patogénica de forma heterocigota, es decir, que fueran portadores sanos de la variante, y que el paciente tuviera la variante patogénica en los dos alelos, es decir de forma homocigota.

También se consideró la posibilidad de que el paciente fuera heterocigoto compuesto, situación en la que los padres hubiesen tenido una mutación distinta en un mismo gen de forma heterocigota y que el afectado tuviera las dos mutaciones heredadas de ambos padres. En el modelo *de novo*, se evaluó que los padres no presentaran la variante patogénica, que ésta hubiera aparecido por primera vez en el paciente y que la tuviera presente de forma heterocigota. En este paso también se buscó intencionadamente la presencia de variantes en los genes que se han reportado como posibles causantes del SHS (*GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24*, *ICTM*).

Priorización de genes

En esta fase se seleccionaron sólo los genes que se consideró tuvieran alguna relación funcional con la causa del SHS. Para ello se utilizó la herramienta bioinformática Exomiser versión 9.0 (hiPHIVE: human/interactome-PHENotypic Interpretation of Variants in Exomes) (Smedley et al. 2015). Esta herramienta priorizó los genes utilizando un análisis de interacción de proteínas; evaluó la relevancia clínica de las variantes por medio de la comparación entre el fenotipo de los 3 pacientes con fenotipos similares en humanos, ratón y pez cebra; tomó en cuenta el efecto de la variante en la proteína y la frecuencia en bases de datos. Esta herramienta ordenó las variantes jerárquicamente de acuerdo con un valor que le asignó a cada variante a partir de los tres aspectos mencionados. De esta manera, los genes que estuviesen hasta arriba, serían los que tendrían mayor importancia como candidatos a la causa del SHS. Se realizó este análisis tanto asumiendo una herencia recesiva, como una presentación *de novo*. Como archivos de entrada se utilizaron los *vcf* de cada familia, los archivos *ped* de cada trío (archivos de pedigrí que indican la relación entre los miembros de la familia, el género de cada integrante y quién está afectado) y los términos fenotípicos obtenidos de *Human Phenotype Ontology* (HPO; www.human-phenotype-ontology.org.) siguientes: anomalía de las fontanelas o suturas craneales (HP:000023), anomalía de las fosas nasales (HP:0005288), micrognatia (HP:0000347), talla baja (HP:0004322),

hipotricosis (HP:0001006), microftalmia (HP:0000568), catarata (HP:0000518), abombamiento frontal (HP:0002007), agenesia dental (HP:0001592), densidad ósea reducida (HP:0004349), puente nasal convexo (HP:0000444), escoliosis (HP:0008065). Como control de calidad final, sólo se retuvieron los genes que tuvieran información del genotipo en al menos 70% de los individuos de la base de datos del LGGB.

Comparación de las variantes finales en los 3 pacientes

Por último, se compararon las variantes restantes de un trío con las de los otros dos tríos. Para ello asumimos 3 enfoques:

1. Se revisó si existían variantes que estuvieran presentes en los tres individuos afectados, para retenerlas como variantes candidatas. Este enfoque resultó de la suposición de que los tres pacientes presentaran el mismo gen afectado.
2. Otra posibilidad fue que sólo dos pacientes compartieran variantes en el mismo gen y el otro tuviera como variante patogénica una que se presentara en un gen distinto. Se compararon las variantes entre los pacientes 3 y 2, posteriormente, entre los pacientes 1 y 2 y finalmente entre los pacientes 1 y 3.
3. La última posibilidad fue que se encontrara una variante patogénica en genes distintos en los 3 pacientes; es decir que 3 genes diferentes fueran los responsables de la causa del SHS. Por lo que se analizaron las variantes resultantes en cada individuo afectado con la finalidad de tener sólo una variante probablemente patogénica.

En la Figura 7 se muestra el algoritmo del análisis bioinformático realizado.

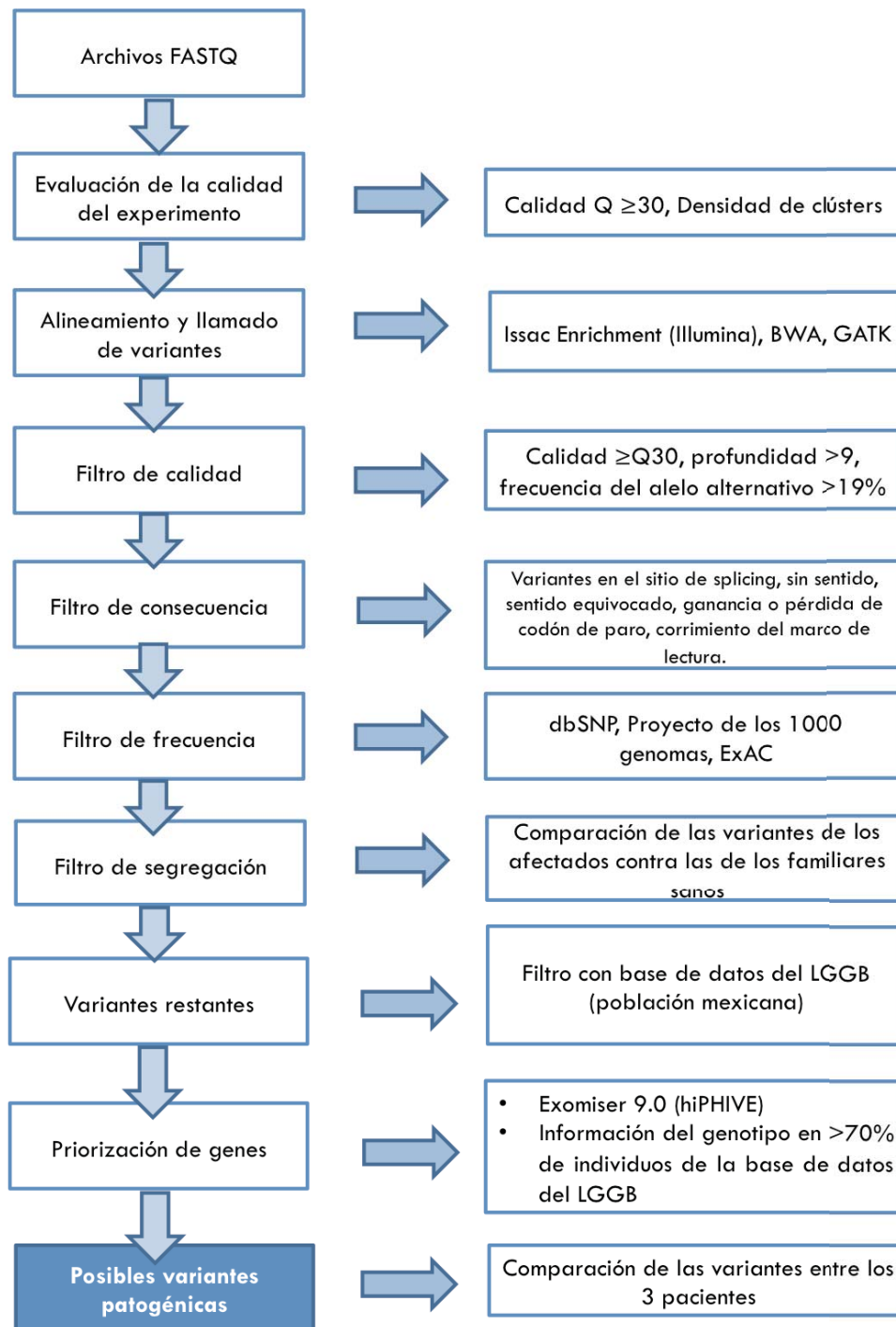


Figura 7. Secuencia del análisis bioinformático: la evaluación de calidad del experimento, la aplicación de filtros con *Variant Studio* y la priorización de genes.

10. Limitaciones del estudio

La secuenciación de segunda generación permite secuenciar, de manera rápida y accesible, genomas o regiones subgenómicas como el exoma. Sin embargo, hay regiones del genoma que por su naturaleza son todavía inaccesibles, tanto para este tipo de secuenciación como para la secuenciación Sanger y para la secuenciación de segunda generación. Estas regiones incluyen, sobre todo, aquellas que tienen una baja complejidad o que contienen secuencias repetidas o que pertenecen a familias de secuencias con elementos muy similares. Esto significa que si la alteración genética reside en alguna de esas regiones, no se identificará la alteración. Cuando se lleva a cabo secuenciación del exoma, es posible hallar las alteraciones que se presentan en regiones codificadoras, pero no aquéllas que están presentes en regiones reguladoras o en secuencias intergénicas, o que constituyen alteraciones estructurales con puntos límites fuera de las regiones exónicas.

11. Financiamiento

Este protocolo formó parte del proyecto mayor: “Identificación por secuenciación de segunda generación de genes responsables de enfermedades monogénicas”, con número de registro HIM 2015-072, por lo que contó con recursos del Departamento de Genética y del Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática. Este protocolo también fue sometido a la convocatoria de fondos federales 2016, y fue aprobado con número de registro HIM 2017-018.

Se corroboró catarata congénita de ojo izquierdo, microftalmia bilateral, y ausencia congénita de piezas dentales. Presentó edad ósea retrasada y, desde la edad de cinco años, se observó una estatura por debajo de 2 desviaciones estándar de la normalidad sin acortamiento de extremidades. Se concluyó diagnóstico clínico del SHS con expresión leve, pues aunque cuenta con los 7 criterios clínicos principales, el fenotipo no es tan grave como el descrito en otros pacientes con síndrome SHS.

En la exploración física se documentó: talla de 1.68 m dentro de la normalidad para su edad y acorde con la talla blanco familiar; peso de 70kg, IMC de 24.8. Discefalia condicionada por abombamiento frontal y braquicefalia, frente muy amplia, microftalmia, estrabismo, nariz convexa, atrofia de piel de la nariz y apiñamiento dental (Figura 9).



Figura 9. Fotografías clínicas del paciente 1. Se muestra abombamiento frontal, microftalmia de predominio izquierdo, punta nasal delgada, nariz convexa, apiñamiento dental y micrognatia.

Paciente 2

Femenino de 16 años, originaria y residente del Estado de México. Madre y padre sanos, hermana de 7 años, sana. Sin otro familiar afectado por esta entidad (Figura 10). Conocida en el HIMFG a la edad de 28 días por síndrome dismórfico. La madre negó exposición a teratógenos durante el embarazo. Desde el mes de vida se realizó el diagnóstico de SHS clásico al cumplir con los 7 criterios principales. Presentó retraso en el desarrollo psicomotor evidenciado por tener hitos del desarrollo anormales como el sostén cefálico hasta los 12 meses de vida, sedestación a los 18 meses, gateo a los dos años y deambulación a los tres años de vida.

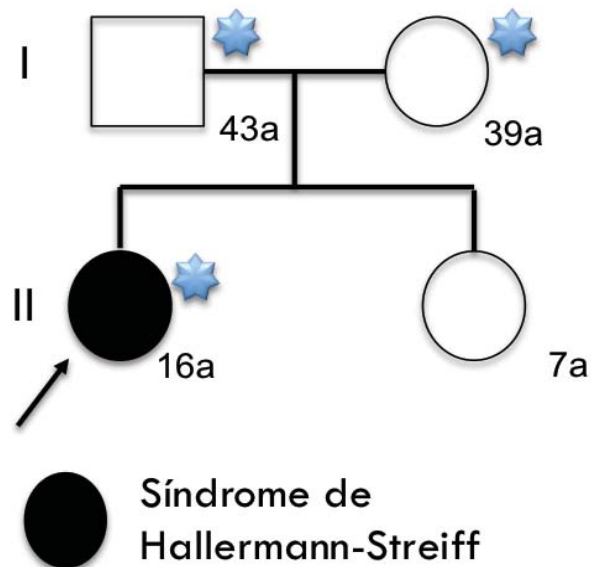


Figura 10. Árbol genealógico de la paciente 2, la estrella señala los individuos que fueron estudiados por secuenciación del exoma.

Se realizó extracción de catarata congénita bilateral y se documentó microftalmia bilateral, atrofia de la piel de la nariz y desviación septal derecha, además de ausencia de varios gérmenes dentarios e hipoplasia de esmalte. Presentó escoliosis severa que ha requerido múltiples correcciones quirúrgicas. Presenta talla baja proporcionada desde la infancia y ha requerido de educación especial. La paciente presenta un fenotipo grave del SHS al presentar compromiso intelectual y esquelético más severo.

Exploración física actual: talla baja proporcionada de 1.23 m, peso de 24.5 kg, IMC:16.33. Cabello escaso, discefalia condicionada por braquicefalia, frente amplia, microftalmia bilateral, atrofia de piel de la nariz, con desviación septal, apiñamiento dental y ausencia de varias piezas dentales, *pectus carinatum*, escoliosis grave (Figura 11).



Figura 11. Fotografías clínicas de la paciente 2. A) B) Aspecto facial característico, manifestado por hipotricosis, microftalmia, nariz convexa y adelgazada en la punta, y micrognatia. C) Apiñamiento dental y ausencia de piezas dentales. D) Manos de la paciente. E), F) Se muestra la talla baja, *pectus carinatum* y xifoescoliosis de la paciente.

Paciente 3

Masculino de 31 años, originario y residente de Veracruz. Padres y dos hermanos sanos, sin otro familiar afectado por esta entidad (Figura 12). Conocido en esta institución a la edad de 6 meses, la madre negó exposición a teratógenos durante el embarazo. Desde el nacimiento la madre notó opacidad en ambos ojos y se realizó el diagnóstico de SHS clásico a la edad de seis meses al cumplir con los 7 criterios clínicos principales.

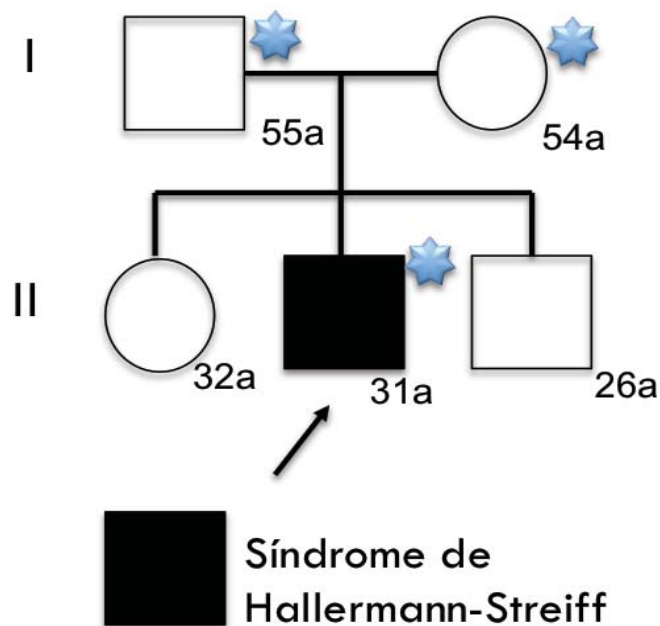


Figura 12. Árbol genealógico del paciente 3, la estrella señala los individuos que fueron estudiados por secuenciación del exoma.

Se realizó extracción de catarata congénita bilateral. Presenta talla baja proporcionada desde la infancia y ausencia de múltiples piezas dentales.

Exploración física actual: talla baja proporcionada de 159.2cm, peso de 72.6 kg, IMC de 29.04, hipotricosis generalizada, discefalia caracterizada por braquicefalia y abombamiento frontal, microftalmia bilateral, esclera azul de ojo izquierdo, atrofia de la piel de la nariz, agenesia de piezas dentales (Figura 13).



Figura 13. Fotografías clínicas del paciente 3. A), B) C) Se observa el fenotipo característico del síndrome que incluye hipotricosis, abombamiento frontal, microftalmia y opacidad corneal, nariz convexa y microftalmia. D) Ausencia de piezas dentales. E) Se observa la ausencia de alteraciones esqueléticas severas en éste paciente.

Los tres individuos afectados fueron los primeros en su familia en presentar el SHS y ninguno de ellos tuvo otros familiares afectados. Por este motivo los patrones de herencia a considerar son 1) autosómico dominante con presentación *de novo* o 2) autosómico recesivo con padres portadores.

Es importante destacar dentro de los resultados clínicos obtenidos que se encontró una diferencia importante entre el fenotipo del paciente 1 que es leve, el de la paciente 2 que es grave, y el del paciente 3 que es intermedio. El paciente 1, como se mencionó previamente, tiene un fenotipo leve en comparación con los otros dos. Además la paciente 2 está más afectada que el paciente 3 puesto que presenta deficiencia intelectual y escoliosis grave. Esta información clínica podría ser útil para el análisis de las variantes, puesto que podría tenerse un escenario donde el individuo 1 tuviera como causa una variante en un gen distinto al de los otros dos pacientes, o que cada paciente tuviera una variante candidata distinta en genes diferentes, situación que podría explicarse si hubiera heterogeneidad genética en el SHS. En la Tabla 4 se comparan los datos clínicos entre los 3 individuos afectados.

Tabla 4. Datos clínicos de los 3 sujetos afectados.

Datos clínicos	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Edad	33a	16a	31a
Género	M	F	M
Deficiencia intelectual	-	++	-
Aspecto facial característico del síndrome	+	+++	++
Talla baja proporcionada	+i	+++	++
Discefalia	+	++	++
Microftalmia bilateral	++	++	++
Catarata congénita	+u	+b	+b
Atrofia de piel (nariz)	+	++	++
Nariz adelgazada hacia la punta	++	+++	+
Nariz convexa	++	++	+++
Dentición anormal	+ap	+ag	+ag
Paladar arqueado	+	+++	++
Micrognatia	+	+++	++
Hipotricosis	+i	++	++
Escoliosis	-	+++	-
Gravedad de fenotipo	+	+++	++

+: leve; ++: moderado; +++:severo; a: años; ag: agenesia de piezas dentales; ap:apiñamiento dental; b: bilateral; F: femenino; i: infancia; M: masculino; u: unilateral.

Resultados de la secuenciación del exoma

Calidad

En nuestro experimento se encontró que el porcentaje de pares de bases secuenciadas que tuvo una calidad mayor a Q30 fue de 75.5%, lo que asegura que el experimento haya tenido una calidad adecuada (Figura 14).

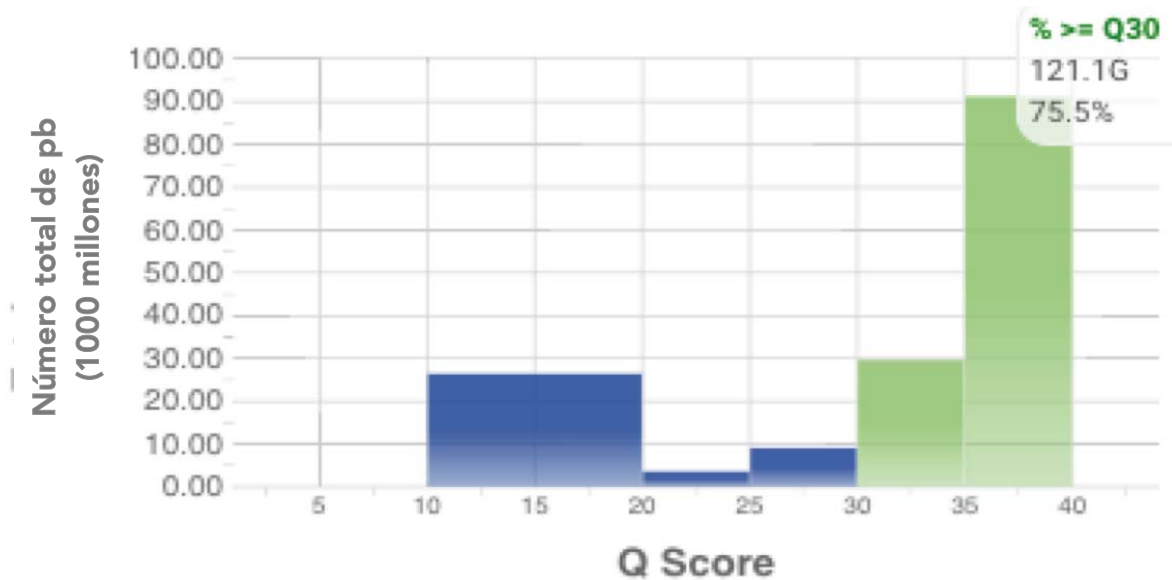


Figura 14. Gráfica de Q score promedio de la corrida de secuenciación del exoma. El eje vertical corresponde al número total de pares de bases (en Gigabases), y el eje horizontal corresponde a los valores de Q. Las barras en verde indican un Q score igual o mayor a 30.

Densidad

La densidad de los grupos (*clusters*) para cada uno de los cuatro carriles de la celda de flujo donde se realizó la reacción de secuenciación fue de aproximadamente entre 175 mil y 260 mil/mm². (Figura 15 A, B)

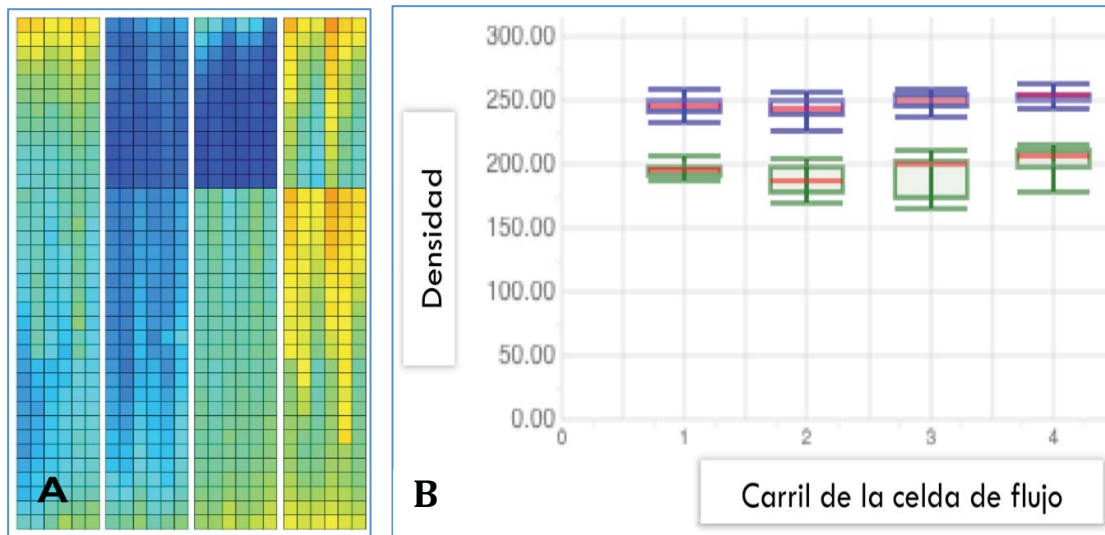


Figura 15. A) Esquema de la celda de flujo con los 4 carriles, sitio en donde se realizó la secuenciación del exoma. B) Densidad de los clusters, en azul se muestra la densidad antes de utilizar el filtro de calidad y en verde, después de aplicar dicho filtro. La densidad recomendada por el fabricante, para el diseño experimental que se empleó, es de 170 mil a 210 mil clusters/mm²

Profundidad (cobertura)

La profundidad promedio de las 9 muestras fue de 115.5X y la proporción del exoma que superó una cobertura mayor a 20X fue de 92.22 %. En la tabla 5 se muestran la profundidad y los valores de cobertura obtenidas en cada muestra por separado. En la Figura 16 se observa la distribución de la profundidad de las 9 muestras y en la Figura 17 la uniformidad de la cobertura entre las 9 muestras de DNA secuenciadas.

Tabla 5. Valores de profundidad o cobertura de las 9 muestras.

Muestra	Cobertura media	Proporción del exoma con cobertura $\geq 1X$	Proporción del exoma con cobertura $\geq 10X$	Proporción del exoma con cobertura $\geq 20X$	Proporción del exoma con cobertura $\geq 50X$
Paciente 1	138.4	99.59%	97.54%	94.82%	83.81%
Padre 1	111.5	99.53%	97.02%	93.36%	77.62%
Madre 1	135.2	99.47%	97.34%	94.66%	83.54%
Paciente 2	104.6	99.33%	95.98%	91.46%	73.48%
Padre 2	113.4	99.50%	96.66%	92.67%	76.79%
Madre 2	98.1	99.23%	95.22%	89.75%	69.06%
Paciente 3	93.2	99.40%	95.65%	90.34%	69.70%
Padre 3	115.1	99.54%	96.96%	93.34%	78.28%
Madre 3	130.9	99.48%	97.01%	94.15%	82.27%

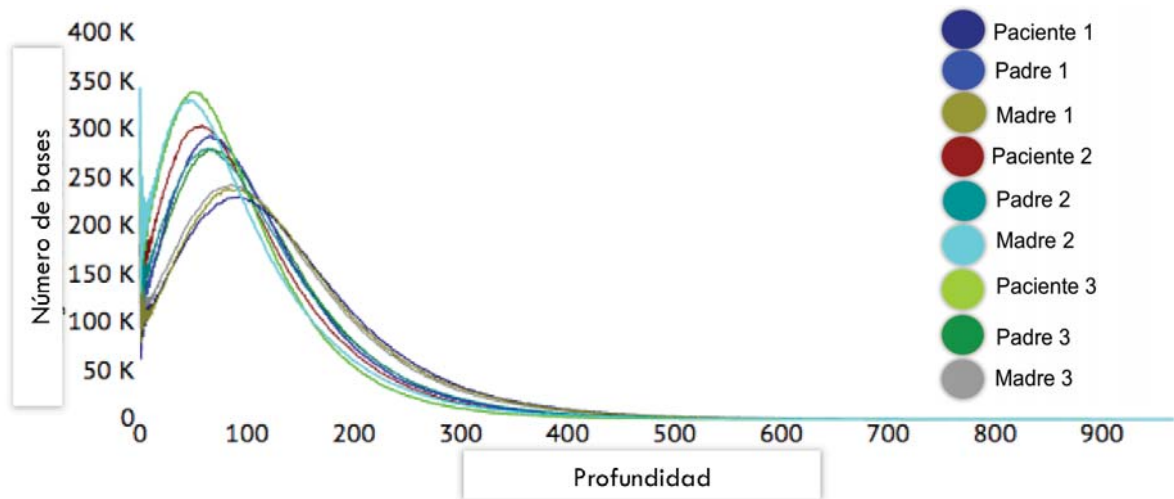


Figura 16. Gráfica de profundidad. Se ilustra la distribución de la profundidad obtenida en cada muestra, graficada con diferente color. El promedio fue de 115.5X.

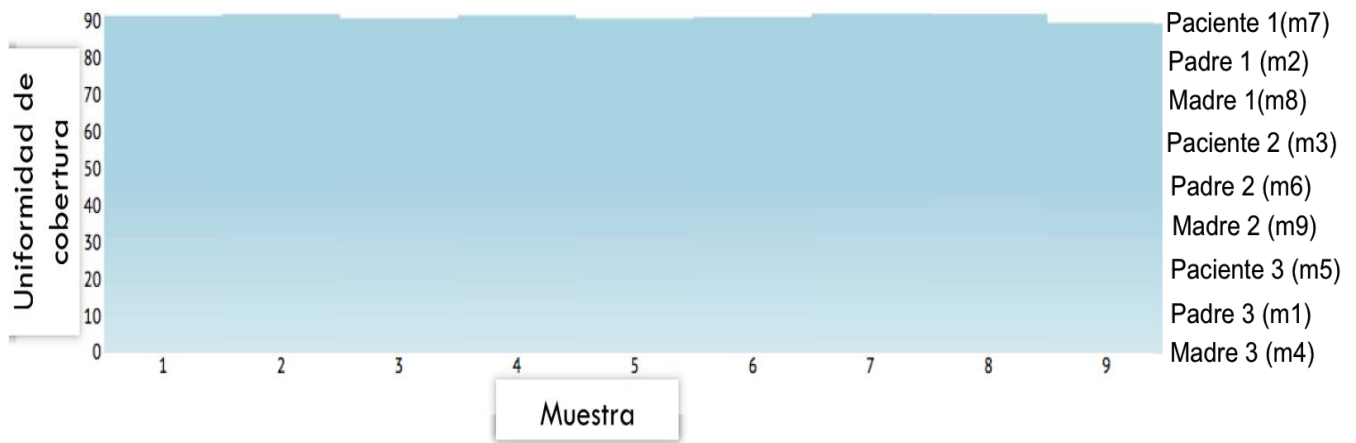


Figura 17. Gráfica de barras de la cobertura. Se ilustra la uniformidad de la cobertura en cada muestra (m). El promedio de la cobertura en las 9 muestras fue de 92.22 %

Resultados moleculares del paciente 1

Alineamiento de la familia 1

Los resultados en la familia 1 mostraron que el promedio de los fragmentos secuenciados fue de 114 598 097 en las tres muestras. El tamaño promedio de éstos fragmentos fue de 165pb. El total de fragmentos alineados en las tres muestras fue de aproximadamente 95 159 064 con un porcentaje promedio de 91.64%. El porcentaje de bases que tuvieron una calidad $\geq Q30$ fue de 76.24% como promedio en los tres individuos. La cobertura promedio en las tres muestras fue de 128.36X. En la Tabla 6 se muestra el promedio de dichos parámetros en las tres muestras de la familia 1.

Tabla 6. Resumen del alineamiento de la familia 1.

Total de fragmentos secuenciados	114 598 097
Tamaño de los fragmentos	165pb
Total de fragmentos alineados	95 159 064
Porcentaje de fragmentos alineados	91.64%
Porcentaje de bases $\geq Q30$	76.24%
Cobertura	128.36X

Variantes resultantes del paciente 1

Después de aplicar los filtros de calidad, consecuencia y frecuencia en bases de datos con el software Base Space Variant Studio (versión 3.0; Illumina), se obtuvieron 128 variantes en 46 genes cuando asumimos una herencia autosómica recesiva y 149 variantes en 143 genes cuando asumimos una presentación *de novo* (Filtros 0-4, Tabla 7).

Posteriormente, luego de haber comparado las variantes restantes con 123 exomas de la base de datos del LGGB, quedaron con una herencia autosómica recesiva, 24 variantes en 16 genes. De éstas, 16 variantes se encontraron en 8 genes para las cuales el paciente fue heterocigoto compuesto y las 8 variantes restantes se identificaron en el paciente en estado homocigoto. Se obtuvieron 87 variantes candidatas en 86 genes que fueron compatibles con una presentación *de novo* (Filtro 5, Tabla 7). No se hallaron variantes en los genes *GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24* e *ICTM* con herencia autosómica recesiva ni presentación *de novo*.

Al final de la priorización de variantes con Exomiser (versión 9.0, hiPHIVE) y de aplicar el último control de calidad, en el que sólo se retuvieron las posiciones genotificadas en más del 70% de los individuos de la base de datos del LGGB, los resultados mostraron en el modelo autosómico recesivo 6 variantes en 3 genes (*PKD1*, *PNPLA3*, *FBXO10*,) para las cuales el paciente resultó ser heterocigoto compuesto. Además se encontró 1 variante adicional para la cual el paciente fue homocigoto (gen *ZNF541*). Cuando se asumió una presentación *de novo* quedaron al final de todo el análisis 7 variantes en 7 genes distintos (*CAPN6*, *RAB5C*, *FAT3*, *ZNF423*, *GPANK1*, *FUT4*, *OR5C1*) todas ellas en estado heterocigoto (Filtro 6, Tabla 7).

En la Tabla 7 se muestra el proceso de filtrado de variantes. En las tablas 8 y 9 se enumeran jerárquicamente las variantes finales con patrón de herencia autosómico recesivo y presentación *de novo*, respectivamente.

Tabla 7. Filtrado de variantes en el paciente 1.

Número de filtro	Descripción del filtro o estrategia	Número de variantes	Número de genes
0	Variantes iniciales, resultantes del alineamiento.	97697	20487
1	Calidad \geq Q30, profundidad mayor a 9, frecuencia del alelo alternativo $>$ 19%.	25071	14786
2	Consecuencia. Variantes causantes de error en el sitio de splicing, sin sentido, de sentido equivocado, ganancia o pérdida de codón de paro, corrimiento del marco de lectura, indels.	10470	9532
3	Frecuencia en la población $<$ 1%, variantes que no estuvieron reportadas en las bases de datos (dbSNP, ExAC Proyecto de los 1000 Genomas).	681	568
4	Segregación familiar. <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	128 149	46 143
5	Base de datos de población mexicana (LGBB, HIMFG) <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	24 87	16 86
6	Exomiser versión 9.0 (hiPHIVE) y filtro de calidad final. <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	7 7	4 7

Tabla 8. Variantes finales del paciente 1, en el modelo autosómico recesivo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Tester	Frec. Máx.	Score Exomiser
chr16	<i>PKD1</i>	c.10316G>A: p.Arg3439Gln	Variante de sentido equivocado	0.275	0.035	-	0.0649	0.038045
chr16	<i>PKD1</i>	c.2102C>A: p.Thr701Asn	Variante de sentido equivocado	0.095	0.219	-	0	0.038045
chr22	<i>PNPLA3</i>	c.302G>A: p.Cys101Tyr	Variante de sentido equivocado	1	0	-	0.0133	0.023476
chr22	<i>PNPLA3</i>	c.1053_1054insGGTAG: p.Ser352Glyfs*5	Corrimiento del marco de lectura y pérdida del codón de paro	-	-	-	0	0.023476
chr9	<i>FBXO10</i>	c.434G>T: p.Gly145Val	Variante de sentido equivocado	0.267	0.022	1	0.2040	0.013925
chr9	<i>FBXO10</i>	c.398G>A: p.Arg133Gln	Variante de sentido equivocado	0.002	0.362	1	0.0238	0.013925
chr19	<i>ZNF541</i>	c.2079C>G: p.Phe693Leu	Variante de sentido equivocado	0.241	0.104	-	0.2087	0.001447

Tabla 9. Variantes finales del paciente 1 al asumir presentación de *novo*.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Tester	Frec. Max.	Score Exomiser
chrX	CAPN6	c.1160A>G: p.Tyr387Cys	Variante de sentido equivocado	0.001	0.997	1	0	0.749738
chr17	RAB5C	c.190T>G: p.Cys64Gly	Variante de sentido equivocado	0.045	0.975	1	0	0.749387
chr11	FAT3	c.22T>C:p.Cys8Arg	Variante de sentido equivocado	0.015	0.001	0.999793	0	0.748865
chr16	ZNF423	c.1314del: p.Pro438Profs*24	Corrimiento del marco de lectura y ganancia de codón de paro prematuro	-	-	-	0	0.653485
chr6	GPANK1	c.544C>G: p.Gln182Glu	Variante de sentido equivocado	0.302	0.07	0.934298	0	0.620009
chr11	FUT4	c.1560C>A: p.Ser520Arg	Variante de sentido equivocado	0.077	0.544	-	0	0.602489
chr9	OR5C1	c.413C>A: p.Thr138Lys	Variante de sentido equivocado	0.001	0.348	-	0	0.016087

Resultados moleculares de la paciente 2

Alineamiento de la familia 2

Los resultados en la familia 2 mostraron que el promedio de los fragmentos secuenciados fue de 98 531 934 en las tres muestras. El tamaño promedio de éstos fragmentos fue de 157pb. El total de fragmentos alineados en las tres muestras fue de aproximadamente 80 659 066 con un porcentaje promedio de 92.17%. El porcentaje de bases que tuvieron una calidad \geq Q30 fue de 77.27% como promedio en los tres individuos. La cobertura promedio en las tres muestras fue de 105.5X. En la Tabla 10 se muestra el promedio de dichos parámetros en las tres muestras de la familia 2.

Tabla 10. Resumen del alineamiento de la familia 2.

Total de fragmentos secuenciados	98 531 934
Tamaño de los fragmentos	157pb
Total de fragmentos alineados	80 659 066
Porcentaje de fragmentos alineados	92.17%
Porcentaje de bases \geq Q30	77.27%
Cobertura	105.5X

Variantes resultantes de la paciente 2

Después de aplicar los filtros de calidad, consecuencia y frecuencia en bases de datos con ayuda del software Base Space Variant Studio (versión 2.3; Illumina), se obtuvieron 86 variantes en 27 genes cuando se asumió una herencia autosómica recesiva y 225 variantes en 220 genes cuando se asumió presentación *de novo* (Filtros 0-4, Tabla 11).

Luego de haber comparado las variantes restantes con 123 exomas de la base de datos del LGGB, quedaron con una herencia autosómica recesiva 20 variantes en 11 genes. De éstas, 17 variantes se encontraron en 4 genes para las cuales el paciente fue heterocigoto compuesto, y las 3 variantes restantes se identificaron en el paciente en un estado homocigoto. Se obtuvieron 184 variantes candidatas en 184 genes distintos que fueron compatibles con una presentación *de novo* (Filtro 5, Tabla 11). No se hallaron variantes en los genes *GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24* e *ICTM*; previamente implicados con la posible causa del SHS.

Al final de la priorización de variantes con Exomiser (versión 9.0, hiPHIVE) y de aplicar último control de calidad, en el que sólo se retuvieron las posiciones en las que hubiera genotipo en más del 70 % de los individuos de la base de datos del LGGB, los resultados mostraron en el modelo autosómico recesivo 10 variantes en 5 genes (*ADGRV1*, *PCDH15*, *MUC16*, *NAALADL2*, *TMEM63A*) para las cuales el paciente resultó ser heterocigoto compuesto. Además se encontraron 3 variantes adicionales para las cuales el paciente fue homocigoto (genes *RAB38*, *DNAJC30*, *CROCC*). Cuando se asumió una presentación *de novo*, quedaron al final del proceso 53 variantes en 53 genes distintos (Filtro 6, Tabla 11).

En la Tabla 11 se muestra el proceso de filtrado de variantes. En las tablas 12 y 13 se enumeran jerárquicamente las variantes finales con patrón de herencia autosómico recesivo y presentación *de novo*, respectivamente.

Tabla 11. Filtrado de variantes en la paciente 2.

Número de filtro	Descripción del filtro o estrategia	Número de variantes	Número de genes
0	Variantes iniciales, resultantes del alineamiento.	90611	20136
1	Calidad \geq Q30, profundidad mayor a 9, frecuencia del alelo alternativo $>$ 19%.	22680	13749
2	Consecuencia. Variantes causantes de error en el sitio de splicing, sin sentido, de sentido equivocado, ganancia o pérdida de codón de paro, corrimiento del marco de lectura, indels.	9446	8243
3	Frecuencia en la población $<$ 1%, variantes que no estuvieron reportadas en las bases de datos (dbSNP, ExAc, Proyecto de los 1000 Genomas).	701	588
4	Segregación familiar. <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	86 225	27 220
5	Base de datos de población mexicana (LGBB, HIMFG). <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	20 184	11 184
6	Exomiser versión 9.0 (hiPHIVE) y filtro de calidad final. <ul style="list-style-type: none"> • Herencia autosómica recesiva. • Presentación <i>de novo</i>. 	13 53	8 53

Tabla 12. Variantes finales de la paciente 2 en el modelo autosómico recesivo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Máx.	Score Exomiser
chr11	RAB38	c.356C>T:p.Pro119Leu	Variante de sentido equivocado	0.007	0.379	1	0.0086	0.7469
chr5	ADGRV1	c.15737G>T:p.Arg5246Lu	Variante de sentido equivocado	0.082	0.346	0.99231	0.1039	0.7245
chr5	ADGRV1	c.18568C>A:p.Pro6190Thr	Variante de sentido equivocado	0.028	0.027	.	0	0.7245
chr10	PCDH15	c.5114C>T:p.Pro1705Leu	Variante de sentido equivocado	0.001	0.169	.	0	0.6356
chr10	PCDH15	c.1440G>A:p.=	Variante en el sitio del splicing	.	.	.	0.1239	0.6356
chr19	MUC16	c.38670+1G>T:p.?	Variante en el sitio donador del splicing	.	.	.	0	0.5630
chr19	MUC16	c.7946C>T:p.Ala2649Val	Variante de sentido equivocado	0	0.866	.	0.4773	0.5630
chr3	NAALADL2	c.1897-3C>T:p.?	Variante en la región de splicing	.	.	.	0.3597	0.5234
chr3	NAALADL2	c.2212G>A:p.Glu738Lys	Variante de sentido equivocado	0.054	0.003	.	0.2386	0.5234
chr1	TMEM63A	c.946G>T:p.Glu316*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.1378
chr1	TMEM63A	c.523C>T:p.Pro175Ser	Variante de sentido equivocado	0.434	0.949	0.99999	0.0034	0.1378
chr7	DNAJC30	c.53T>C:p.Leu18Pro	Variante de sentido equivocado	0.046	0.063	.	0.1836	0.0084
chr1	CROCC	c.1723G>A:p.Asp575Asn	Variante de sentido equivocado	0.387	0.736	.	0.0532	0.0013

Tabla 13. Variantes finales de la paciente 2 al asumir presentación de *novo*.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Fec. Max.	Score Exomiser
chr22	HIRA	c.2380G>T:p.Ala794Ser	Variante de sentido equivocado	0.032	0.996	1	0	0.9539
chr4	NELFA	c.634G>C:p.Gly212Arg	Variante de sentido equivocado	0.004	0.999	1	0	0.9477
chr6	ARID1B	c.4405A>G:p.Arg1469Gly	Variante de sentido equivocado	0.001	0.024	0.999975	0	0.9470
chr5	PDE4D	c.1216A>G:p.Ile406Val	Variante de sentido equivocado	0.016	0.678	0.999997	0	0.9365
chr12	CHST11	c.219C>A:p.His73Gln	Variante de sentido equivocado	0.302	0.967	0.999998	0	0.84723
chr18	NEDD4L	c.877C>A:p.Pro293Thr	Variante de sentido equivocado	0.147	0.402	1	0	0.7650
chr10	TCF7L2	c.1528C>A:p.Pro510Thr	Variante de sentido equivocado	0.004	0.997	1	0	0.7633
chr2	COL6A3	c.79G>T:p.Val27Phe	Variante de sentido equivocado	0.003	0.993	.	0	0.7529
chr2	ODC1	c.1011G>T:p.Lys337Asn	Variante de sentido equivocado	0.325	0.037	0.999682	0	0.7510
chr11	GANAB	c.1073G>T:p.Gly358Val	Variante de sentido equivocado	0.012	0.897	1	0	0.7500
chr17	RAP1GAP2	c.1577G>A:p.Ser526Asn	Variante de sentido equivocado	0.005	0.576	0.999999	0	0.7495
chr1	OBSCN	c.5101G>T:p.Gly1701Trp	Variante de sentido equivocado	0.001	.	1	0	0.7494
chr15	CILP	c.3029G>T:p.Cys1010Phe	Variante de sentido equivocado	0	0.998	1	0	0.7490
chr22	ZNRF3	c.749C>A:p.Ser250Tyr	Variante de sentido equivocado	0.001	0.943	1	0	0.7490
chr12	GALNT9	c.500T>C:p.Leu167Pro	Variante de sentido equivocado	0.007	0.049	1	0	0.7490
chr8	MBOAT4	c.1270C>A:p.Leu424Ile	Variante de sentido equivocado	0.015	0.089	1	0	0.7489
chr17	KIF1C	c.692A>C:p.Asp231Ala	Variante de sentido equivocado	0.019	0.983	0.999999	0	0.7489

Continuación Tabla 13. Variantes finales de la paciente 2 al asumir presentación de *novus*.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Max.	Score Exomiser
chr7	ZSCAN21	c.1088T>A:p.Val363Asp	Variante de sentido equivocado	0	0.08	1	0	0.7489
chr14	BRF1	c.284G>T:p.Arg95Met	Variante de sentido equivocado	0.003	0.844	0.994353	0	0.7457
chr5	ADGRV1	c.18568C>A:p.Pro6190Thr	Variante de sentido equivocado	0.028	0.027	.	0	0.7193
chr1	RYR2	c.10455C>A:p.Asp3485Glu	Variante de sentido equivocado	.	0.127	0.951391	0	0.6645
chr19	PKN1	c.468C>A:p.Ser156Arg	Variante de sentido equivocado	0.079	0.431	0.948309	0	0.6549
chr9	PNPLA7	c.1199T>A:p.Leu400*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.6549
chr20	ZNF133	c.1484del:p.Lys495Serfs*9	Corrimiento del marco de lectura y ganancia de codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.6539
chr1	NR1I3	c.400C>T:p.Gln134*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.6536
chr19	PPP6R1	c.420del:p.Pro140Profs*8	Corrimiento del marco de lectura y ganancia de codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.6534
chr16	GRIN2A	c.3379G>T:p.Gly1127Cys	Variante de sentido equivocado	0.06	0.726	.	0	0.6366
chr19	MUC16	c.38670+1G>T:p.?	Variante en el sitio donador de splicing	.	.	.	0	0.5435
chr3	NME6	c.560G>T:p.Gly187Val	Variante de sentido equivocado	0.196	0.032	.	0	0.3353
chr1	TMEM63A	c.946G>T:p.Glu316*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.1129
chr9	IPPK	c.10G>T:p.Val4Leu	Variante de sentido equivocado	.	.	.	0	0.0704
chr7	RAC1	c.530C>A:p.Ser177*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.0294
chr9	C9orf153	c.116A>C:p.Lys39Thr	Variante de sentido equivocado	0	0.993	.	0	0.0162
chr22	HIC2	c.44G>T:p.Gly15Val	Variante de sentido equivocado	0	0.497	0.99999	0	0.016

Continuación Tabla 13. Variantes finales de la paciente 2 al asumir presentación de *novo*.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Max.%	Score Exomiser
chr17	VTN	c.1361T>A:p.Val1454Glu	Variante de sentido equivocado	0	0.999	1	0	0.0162333
chr10	WDFY4	c.9536G>A:p.Cys3179Tyr	Variante de sentido equivocado	0.002	0.974	1	0	0.0162333
chr16	ZNF500	c.577A>G:p.Arg193Gly	Variante de sentido equivocado	0	0.994	.	0	0.0162333
chr19	ZNF835	c.830C>A:p.Pro277His	Variante de sentido equivocado	0	0.998	.	0	0.0162333
chr14	ZFHX2	c.971G>A:p.Gly324Asp	Variante de sentido equivocado	0.004	.	.	0	0.0156570
chr19	CEACAM20	c.716T>C:p.Leu239Pro	Variante de sentido equivocado	.	0.99	.	0.003	0.0147714
chr1	DENND4B	c.2204G>C:p.Ser735Thr	Variante de sentido equivocado	0.427	0.508	0.98129	0	0.0137057
chr8	TMEM249	c.388G>T:p.Val130Leu	Variante de sentido equivocado	0.023	0.705	.	0	0.0131831
chr14	NYNRIN	c.2346C>A:p.Asn782Lys	Variante de sentido equivocado	0.031	0.009	.	0	0.0122607
chr7	ATXN7L1	c.2194C>A:p.Gln732Lys	Variante de sentido equivocado	0.038	0.013	0.82016	0.008	0.0113926
chr17	KIAA0100	c.1777T>C:p.Ser593Pro	Variante de sentido equivocado	0.044	0.357	0.95398	0	0.0108959
chr2	NYAP2	c.1357del:p.Arg453Glyfs*40	Corrimiento del marco de lectura y ganancia de codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.0103178
chr10	BTBD16	c.367C>A:p.Leu123Met	Variante de sentido equivocado	0.08	0.075	.	0	0.0078526
chr18	ENOSF1	c.130_147dup:p.?	Variante en el sitio aceptor del splicing	.	.	.	0	0.006543
chr17	TMEM101	c.465G>T:p.=	Variante en el sitio del splicing	.	.	.	0	0.006543
chr1	PEAR1	c.1148T>A:p.Leu383Gln	Variante de sentido equivocado	0.823	0.18	.	0	0.001597
chr7	ZNF775	c.1577C>T:p.Ala526Val	Variante de sentido equivocado	0.256	0.036	.	0	0.0015695
chr16	PDI/IA2	c.-433C>A:p.=	Variante en el extremo 5'UTR	.	.	.	0	0.00030
chr2	ANKRD53	c.1310A>T:p.His437Leu	Variante de sentido equivocado	0.545	0.004	.	0	0.00011

Resultados moleculares del paciente 3

Alineamiento de la familia 3

Los resultados en la familia 3 mostraron que el promedio de los fragmentos secuenciados fue de 100 432 109 en las tres muestras. El tamaño promedio de éstos fragmentos fue de 158pb. El total de fragmentos alineados en las tres muestras fue de aproximadamente 84 157 770 con un porcentaje promedio de 91.80%. El porcentaje de bases que tuvieron una calidad $\geq Q30$ fue de 76.52% como promedio en los tres individuos. La cobertura promedio en las tres muestras fue de 113.06X. En la Tabla 14 se muestra el promedio de dichos parámetros en las tres muestras de la familia 3.

Tabla 14. Resumen del alineamiento de la familia 3.

Total de fragmentos secuenciados	100 432 109
Tamaño de los fragmentos	158pb
Total de fragmentos alineados	84 157 770
Porcentaje de fragmentos alineados	91.80%
Porcentaje de bases $\geq Q30$	76.52%
Cobertura	113.06X

Variantes resultantes del paciente 3

Después de aplicar los filtros de calidad, consecuencia y frecuencia en bases de datos con ayuda del software Base Space Variant Studio (versión 2.3; Illumina), se obtuvieron 125 variantes en 40 genes cuando se asumió una herencia autosómica recesiva y 247 variantes en 236 genes cuando se asumió una presentación *de novo* (Filtros 0-4, Tabla 15).

Posteriormente, luego de haber comparado las variantes restantes con 123 exomas de la base de datos del LGGB, quedaron con una herencia autosómica recesiva 37 variantes en 20 genes. De éstas, 33 variantes se encontraron en 16 genes para las cuales el paciente fue heterocigoto compuesto y las 4 variantes restantes se identificaron en el paciente en un estado homocigoto. Se obtuvieron 206 variantes candidatas en 200 genes distintos que fueron compatibles con una presentación *de novo* (Filtro 5, Tabla 15). No se hallaron variantes en los genes *GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24* e *ICTM*, cuando se asumió una herencia autosómico recesiva ni al asumir presentación *de novo*.

Al final de la priorización de variantes con Exomiser (versión 9.0, hiPHIVE) y de aplicar último control de calidad, en el que se retuvieron las variantes genotificadas en más del 70% de los individuos de la base de datos del LGGB, los resultados finales mostraron en el modelo autosómico recesivo 2 variantes en 1 gen (*MYBL2*) para las cuales el paciente resultó ser heterocigoto compuesto. Cuando se asumió presentación *de novo*, se encontraron 77 variantes finales en 76 genes distintos (Filtro 6, Tabla 15).

En la Tabla 15 se muestra el proceso de filtrado de variantes. En las tablas 16 y 17 se enumeran jerárquicamente las variantes finales con patrón de herencia autosómico recesivo y presentación *de novo*, respectivamente.

Tabla 15. Filtrado de variantes en el paciente 3.

Filtro	Descripción del filtro	Número de variantes	Número de genes
0	Variantes iniciales, resultantes del alineamiento.	91397	20227
1	Calidad \geq Q30, profundidad mayor a 9, frecuencia del alelo alternativo $>$ 19%.	23215	12634
2	Consecuencia. Variantes causantes de error en el sitio de splicing, sin sentido, de sentido equivocado, ganancia o pérdida de codón de paro, corrimiento del marco de lectura, indels.	9741	8786
3	Frecuencia en la población $<$ 1%, variantes que no estuvieron reportadas en las bases de datos (dbSNP, ExAc, Proyecto de los 1000 Genomas).	783	657
4	Segregación familiar.		
	• Herencia autosómica recesiva.	125	40
	• Presentación <i>de novo</i> .	247	236
5	Base de datos de población mexicana (LGBB, HIMFG)		
	• Herencia autosómica recesiva.	37	20
	• Presentación <i>de novo</i> .	206	200
6	Exomiser versión 9.0 (hiPHIVE) y filtro de calidad final.		
	• Herencia autosómica recesiva.	2	1
	• Presentación <i>de novo</i> .	77	76

Tabla 16. Variantes finales del paciente 3 en el modelo autosómico recesivo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Max.	Score Exomiser
chr20	MYBL2	c.821C>T;p.Pro274Leu	Variante de sentido equivocado	0.649	0.507	0.997416	0.1834	0.6853877
chr20	MYBL2	c.1542C>A;p.Asn514Lys	Variante de sentido equivocado	0.039	0.894	0.819813	0	0.6853877

Tabla 17. Variantes finales del paciente 3 al asumir presentación de novo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Max.	Score Exomiser
chrX	ATP7A	c.1229T>C:p.Val1410Ala	Variante de sentido equivocado	0.001	0.996	1	0	0.948810
chrX	BCOR	c.216G>T:p.Met72Ile	Variante de sentido equivocado	0.069	0.974	0.995814	0	0.947875
chr2	OBSL1	c.676G>T:p.Ala226Ser	Variante de sentido equivocado	0.134	0.999	0.999787	0	0.911453
chr12	KMT2D	c.169G>T:p.Asp57Tyr	Variante de sentido equivocado	0.009	0.598	.	0	0.900816
chr1	MEAF6	c.467G>T:p.Arg156Met	Variante de sentido equivocado	0.014	0.983	1	0	0.783811
chr22	XRCC6	c.338C>A:p.Ala113Glu	Variante de sentido equivocado	0.001	1	1	0	0.771130
chr11	FGF3	c.438G>T:p.Gln146His	Variante de sentido equivocado	0.119	0.873	.	0	0.763359
chr1	PTPN7	c.1109G>T:p.Gly370Val	Variante de sentido equivocado	0.02	1	1	0	0.761458
chr11	COPB1	c.636C>G:p.Cys212Trp	Variante de sentido equivocado	0.184	0.977	1	0	0.759615
chr2	ALS2	c.639C>A:p.Ser213Arg	Variante de sentido equivocado	0.001	0.998	0.999999	0	0.756962
chr17	MRC2	c.4181A>T:p.Lys1394Met	Variante de sentido equivocado	0	1	0.999999	0	0.752887
chr2	ADRA2B	c.406G>C:p.Val136Leu	Variante de sentido equivocado	.	0.954	1	0	0.749393
chr9	TMEM245	c.2243G>T:p.Gly748Val	Variante de sentido equivocado	0.004	1	1	0	0.749363
chr11	POU2AF1	c.377C>T:p.Pro126Leu	Variante de sentido equivocado	0.004	0.999	1	0	0.749196
chrX	BMX	c.1821C>A:p.Ser607Arg	Variante de sentido equivocado	0.001	0.977	0.692662	0	0.749153
chr1	GSTM5	c.11C>A:p.Thr4Asn	Variante de sentido equivocado	0.008	0.739	0.9998	0	0.749120
chr9	RUSC2	c.3203C>A:p.Pro1068Gln	Variante de sentido equivocado	0.001	0.999	0.999999	0	0.749074
chr12	CIT	c.766G>A:p.Glu256Lys	Variante de sentido equivocado	0	0.987	1	0	0.748962
chr7	DPP6	c.923C>A:p.Pro308Gln	Variante de sentido equivocado	0.003	0.993	0.999997	0	0.748936
chrX	MAGEA4	c.671A>G:p.Glu224Gly	Variante de sentido equivocado	0.001	0.999	.	0	0.747225
chr17	PIK3R5	c.2020G>T:p.Val674Phe	Variante de sentido equivocado	0.006	0.714	0.623511	0	0.746575
chrX	ZNF185	c.123T>A:p.Asp41Glu	Variante de sentido equivocado	0.008	0.036	.	0	0.740268
chrX	WNK3	c.2015T>C:p.Val672Ala	Variante de sentido equivocado	0.006	0.049	.	0	0.7385285
chr16	CHST6	c.238C>G:p.Leu80Val	Variante de sentido equivocado	0.013	0.714	.	0	0.7260362
chr22	CYP2D6	c.1069A>G:p.Thr357Ala	Variante de sentido equivocado	0.014	0.309	.	0	0.7248480
chr1	NMNAT1	c.836C>A:p.Thr279Lys	Variante de sentido equivocado	0.016	0	.	0	0.7204806

Continuación Tabla 17. Variantes finales del paciente 3 al asumir presentación de novo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec Max.	Score Exomiser
chrX	CSTF2	c.679C>A:p.Gln227Lys	Variante de sentido equivocado	0.025	0.045	0.5618	0	0.7072
chr20	MYBL2	c.1542C>A:p.Asn514Lys	Variante de sentido equivocado	0.039	0.894	0.8198	0	0.6761
chr22	LZTR1	c.1494C>A:p.=	Variante en sitio de splicing	.	.	.	0	0.6579
chr19	MYH14	c.4885del: p.Glu1629Serfs*26	Corrimiento del marco de lectura con ganancia de codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.6565
chr5	SLC4A9	c.365C>A:p.Pro122Gln	Variante de sentido equivocado	0.071	0.029	.	0	0.6084
chr17	KRT16	c.229_231del:p.Ser77del	Deleción en el marco de lectura	.	.	.	0.001	0.5539
chr12	DHX37	c.888-3del:p.?	Variante en sitio de splicing	.	.	.	0	0.5435
chr1	EXTL1	c.1310A>G:p.Gln437Arg	Variante de sentido equivocado	0.602	0.038	0.8625	0	0.4584
chr16	CRISPLD2	c.402G>T:p.Glu134Asp	Variante de sentido equivocado	0	0.999	0.9999	0	0.4259
chr14	DEGS2	c.125G>C:p.Arg42Pro	Variante de sentido equivocado	0.184	0.153	.	0	0.3553
chrX	HCFC1	c.5526G>T:p.Leu1842Phe	Variante de sentido equivocado	0.199	0.001	.	0	0.3387
chr10	WASHC2A	c.133C>A:p.Gln45Lys	Variante de sentido equivocado	0.239	0.232	.	0	0.2770
chr16	SETD6	c.1020del: p.Glu340Glufs*4	Corrimiento del marco de lectura con ganancia de codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.2373
chrX	NYX	c.1073C>A:p.Thr358Asn	Variante de sentido equivocado	0.271	0.016	.	0	0.1992
chr1	OBSCN	c.6629C>G:p.Thr2210Arg	Variante de sentido equivocado	0.319	0.506	0.7259	0	0.1944
chr5	TENM2	c.241C>A:p.Leu81Ile	Variante de sentido equivocado	0.02	0.982	0.9910	0	0.1648
chr16	CRAMP1	c.226C>A:p.Pro76Thr	Variante de sentido equivocado	0.036	0.003	.	0	0.1629
chr12	CD27	c.265T>C:p.Ser89Pro	Variante de sentido equivocado	0.368	0.686	.	0	0.1434
chr16	GDPD3	c.88C>A:p.His30Asn	Variante de sentido equivocado	0.036	0.996	0.9998	0	0.0470
chr19	DPP9	c.2331G>T:p.Lys777Asn	Variante de sentido equivocado	0.003	0.978	1	0	0.0162
chr10	RNLS	c.679G>T:p.Asp227Tyr	Variante de sentido equivocado	0	1	1	0	0.0162
chr15	SERINC4	c.335T>A:p.Val112Glu	Variante de sentido equivocado	0.04	.	1	0	0.0162
chr1	TDRD10	c.560C>A:p.Ala187Glu	Variante de sentido equivocado	0	0.882	.	0	0.0162
chr19	TMEM205	c.533G>T:p.Cys178Phe	Variante de sentido equivocado	0.186	0.146	1	0	0.0162
chr1	UBE2Q1	c.731G>T:p.Gly244Val	Variante de sentido equivocado	0.001	0.814	1	0	0.0162
chr1	VPS13D	c.1107C>A:p.Asp369Glu	Variante de sentido equivocado	.	0.001	.	0	0.0162

Continuación Tabla 17. Variantes finales del paciente 3 al asumir presentación de novo.

Cromosoma	Gen	cDNA:Prot	Consecuencia	SIFT	PolyPhen	Mutation Taster	Frec. Max.	Score Exomiser
chr14	RPS6KL1	c.482T>A:p.Leu161Gln	Variante de sentido equivocado	0.002	0.999	0.999995	0	0.016232
4	CPNE7	c.355C>A:p.Gln119Lys	Variante de sentido equivocado	0.063	0.931	0.999988	0	0.016231
chr12	TMEM132C	c.1106C>A:p.Pro369His	Variante de sentido equivocado	0.003	0.446	.	0	0.015799
chr16	TMEM186	c.575G>T:p.Arg192Leu	Variante de sentido equivocado	0.006	0.943	0.593049	0	0.015376
chr19	CADM4	c.509G>T:p.Ser170Ile	Variante de sentido equivocado	0.054	0.609	0.992278	0	0.015138
chr20	BCAS1	c.1442T>A:p.Ile481Asn	Variante de sentido equivocado	0.009	0.203	.	0	0.014964
chr7	FAM71F1	c.156C>A:p.Asp52Glu	Variante de sentido equivocado	0.112	0.991	0.557051	0	0.014964
chr19	ANGPTL8	c.56C>A:p.Ala19Asp	Variante de sentido equivocado	0.012	0.319	.	0	0.014564
chrX	ARMCX5	c.334C>A:p.Pro112Thr	Variante de sentido equivocado	0.013	0.023	.	0	0.014432
chr20	C20orf202	c.169C>A:p.Leu57Ile	Variante de sentido equivocado	0.023	0.513	.	0	0.013183
chr20	ZNF343	c.949A>T:p.Lys317*	Codón de paro prematuro	.	.	.	0	0.010317
chr8	CSMD1	c.2049G>T:p.Arg683Ser	Variante de sentido equivocado	0.074	0.272	.	0	0.008293
chr6	ALDH5A1	c.68G>T:p.Arg23Leu	Variante de sentido equivocado	0.65	0.007	.	0	0.007576
chr9	STPG3	c.239C>T:p.Pro80Leu	Variante de sentido equivocado	0.094	0.073	.	0	0.006911
chr1	CRYBG2	c.3645-1G>T:p.?	Variante en el sitio aceptor del splicing	.	.	.	0	0.006543
chr19	GZMM	c.613-1G>T:p.?	Variante en el sitio aceptor del splicing	.	.	.	0	0.006543
chr17	TEX2	c.3262-1G>T:p.?	Variante en el sitio aceptor del splicing	.	.	.	0	0.006543
chr20	PPP1R16B	c.1510A>G:p.Ser504Gly	Variante de sentido equivocado	0.144	0	.	0	0.004377
chr6	GLP1R	c.407C>A:p.Ser136Tyr	Variante de sentido equivocado	1	0.058	.	0	0.0005
chr1	KPRP	c.1561C>T:p.His521Tyr	Variante de sentido equivocado	.	0.003	.	0.0008	0.00031
chr16	ZNF48	c.837T>A:p.Asp279Glu	Variante de sentido equivocado	.	0.194	.	0	0.00001
chr7	TMEM270	c.254A>G:p.Gln85Arg	Variante de sentido equivocado	0.835	0.086	.	0	0.000007
chr19	C19orf47	c.124A>G:p.Thr42Ala	Variante de sentido equivocado	0.972	0	.	0	0.000002
chr9	TPRN	c.41C>T:p.Ala14Val	Variante de sentido equivocado	1	.	.	0	0.000001

Comparación de las variantes finales entre los 3 pacientes

Con un patrón de herencia autosómico recesivo no se obtuvieron variantes o genes candidatos compartidos por los 3 individuos afectados. Tampoco hubo variantes o genes compartidos por al menos 2 pacientes. Se encontraron variantes candidatas diferentes para cada paciente. Una situación similar ocurrió al asumir presentación *de novo*. En la Figura 18 se muestran los genes obtenidos después de la priorización con Exomiser. En el caso de los pacientes 2 y 3, sólo se incluyen los 10 primeros genes de las tablas 13 y 17, resultantes de la priorización con Exomiser.

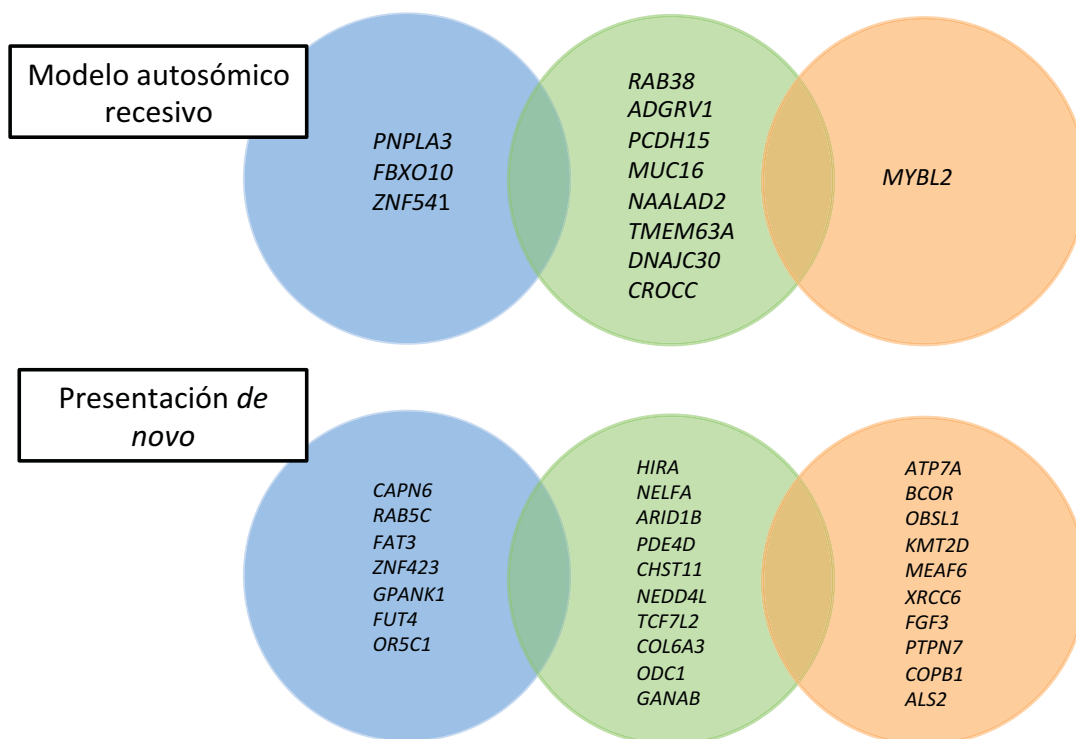


Figura 18. Variantes obtenidas en los 3 pacientes con el modelo autosómico recesivo y presentación *de novo*. El círculo azul contiene las variantes del paciente 1, el círculo verde contiene las variantes de la paciente 2 y el círculo naranja contiene las variantes del paciente 3.

13. Discusión

La causa del síndrome de Hallermann-Streiff (SHS) es desconocida. Si bien se han descrito algunos casos familiares, todos los casos clásicos con diagnóstico confirmado de esta entidad se han presentado esporádicamente sin predilección de género (Cohen 1991). Hay puntos a favor y en contra de que el SHS tenga herencia mendeliana.

A favor están los reportes mencionados de pacientes con probable patrón de herencia autosómica recesiva y dominante, la concordancia en gemelos monocigóticos (Van Balen 1961) y el hecho de que el fenotipo del SHS se sobrepone con otros desórdenes congénitos mendelianos como la displasia óculodentodigital y el síndrome de Progeria Hutchinson-Gilford (Kortüm et al. 2011; Cohen 1991), lo que nos lleva a suponer que quizá el SHS es causado por un gen relacionado con las vías de señalización de los genes causantes de estas dos enfermedades (Kirzioğlu et al. 2009).

La evidencia que podría hacer menos probable una herencia mendeliana, es el hecho de que todos los casos confirmados de SHS han sido esporádicos (Cohen 1991), que el trastorno ha sido concordante y discordante en gemelos monocigóticos (Schondel 1943), y que hay reporte de mujeres afectadas que concibieron hijos sanos (Numabe et al. 2011).

Aunque la presentación del SHS es principalmente esporádica, se ha considerado que el SHS pueda tener una causa monogénica. Para el estudio de esta enfermedad se necesita iniciar con una hipótesis que pueda comprobarse o refutarse, en éste último caso, la información obtenida será útil al conocimiento universal. En este trabajo se asumió una probable causa monogénica del SHS y se describen las posibles variantes patogénicas identificadas por secuenciación del exoma de 3 tríos conformados por 3 individuos no relacionados con diagnóstico clínico de SHS y padres sanos, asumiendo un patrón de herencia autosómico recesivo y presentación *de novo*.

Discusión de los hallazgos clínicos en los 3 pacientes con SHS

Los tres individuos afectados tuvieron una presentación esporádica del SHS, este hallazgo fue consistente con la mayoría de los casos reportados en la literatura (Numabe et al. 2011). Los tres individuos afectados tuvieron hermanos sanos, lo que haría menos probable una herencia autosómica recesiva en el SHS manifestado en estos pacientes. Los tres pacientes tuvieron los 7 principales datos clínicos del síndrome descritos desde 1958 (François 1958). Sin embargo, hubo diferencias específicas entre los ellos.

El paciente 1 manifestó un fenotipo leve en comparación con los pacientes 2 y 3, caracterizado por talla baja durante la infancia que se compensó en la adolescencia al llegar a valores normales con respecto a la talla familiar. Además presentó hipotricosis en la niñez, según lo descrito en su expediente, pero en la etapa adulta esta manifestación se tornó poco evidente. Presentó también catarata congénita unilateral izquierda, a diferencia de los pacientes 2 y 3 que presentaron catarata congénita bilateral. Dentro de las alteraciones dentales, el paciente 1 sólo presentó apiñamiento dental, a diferencia de los pacientes 2 y 3 que presentaron ausencia de varias piezas dentales.

La paciente 2 presentó un aspecto facial característico más notable que en el paciente 1, con mayor similitud a la facies del paciente 3. La talla de la paciente 2 tuvo una mayor alteración, a diferencia de los pacientes 1 y 2. También manifestó malformaciones esqueléticas adicionales como escoliosis severa y *pectus carinatum* que no se observaron en los otros dos pacientes. La paciente 2 presentó retraso en el desarrollo psicomotor y ha requerido de educación especial; los otros dos pacientes no tuvieron ninguna alteración intelectual. Con esta información es posible concluir que la paciente 2 tuvo el fenotipo más severo .

El paciente 3 tuvo un fenotipo similar a la paciente 2, manifestó las características clínicas principales del síndrome pero no se evidenciaron alteraciones esqueléticas ni compromiso intelectual. La talla tampoco fue severamente afectada. El paciente 3 tuvo un fenotipo intermedio entre el paciente 1 y la paciente 2.

Todas las manifestaciones de los 3 pacientes ya han sido descritas en la literatura; no se encontraron datos clínicos nuevos. A diferencia de otros reportes de pacientes con SHS, los pacientes estudiados no presentaron alteraciones esqueléticas como sindactilia o hipoplasia de clavícula y costillas. Las malformaciones genitourinarias, cardíacas y neurológicas previamente descritas en otros casos del SHS, no se evidenciaron en éstos 3 pacientes.

Discusión de los hallazgos moleculares en los pacientes con SHS

El análisis molecular por medio de la secuenciación del exoma en los 3 individuos y en sus padres permitió evaluar las posibles variantes patogénicas al asumir dos patrones de herencia, autosómico recesivo y presentación *de novo*, basados en la presentación esporádica de los 3 pacientes.

Variantes identificadas en el modelo autosómico recesivo

Dentro del modelo autosómico recesivo, no se obtuvieron variantes o genes candidatos que estuvieran presentes en los 3 individuos afectados; ni variantes o genes que fueran compartidos en al menos 2 pacientes. Se encontraron variantes candidatas diferentes para cada paciente.

Variantes identificadas en el paciente 1. En el paciente 1, se obtuvieron 7 posibles variantes patogénicas en los genes *PKD1*, *PNPLA3*, *FBXO10* y *ZNF541* (Tabla 8).

Al realizar un análisis detallado de cada variante, se observó que la variante en estado heterocigoto c.2102C>A (p.Thr701Asn) en *PKD1* también se encontró en 5 personas más de la base de datos del LGGB. Debido a que esto representaría un exceso de heterocigotos en la población e implicaría una proporción elevada de portadores del SHS, lo cual es incompatible con la incidencia de la enfermedad, lo más probable es que ésta variante sea un polimorfismo sin efecto en el fenotipo estudiado. Si se elimina esta variante, queda únicamente otra en *PKD1*, lo que es incompatible con un modelo autosómico recesivo. Con esto descartamos que el gen *PKD1* esté relacionado con la causa del SHS.

Las dos variantes del gen *FBXO10*, c.434G>T (p.Gly145Val) y c.398G>A (p.Arg133Gln), ya se han reportado previamente en dbSNP (rs201749348, rs752526134) con una frecuencia máxima de 0.2041 y 0.0238 respectivamente. Al realizar el cálculo de las frecuencias génicas esperadas para una incidencia aproximada de menos de 1 en 10 000, se tiene que las frecuencias alélicas de estas variantes son muy altas y con estas frecuencias, habría una incidencia más elevada de SHS. Por esta razón, pueden descartarse estas variantes y el gen que las contiene.

La variante en estado homocigoto presente en *ZNF541*, c.2079C>G (p.Phe693Leu), se ha reportado en la base de datos de dbSNP (rs776910248) con una frecuencia máxima de 0.2087. Siguiendo el razonamiento de los párrafos anteriores, esta frecuencia alélica es mayor a la esperada, por lo que esta variante también se descartó.

Se hallaron 2 variantes en el gen *PNPLA3*, c.302G>A (p.Cys101Tyr) y c.1053_1054insGGTAG (p.Ser352Glyfs*5). La primera no ha sido reportada previamente y la segunda se encuentra en dbSNP (rs747155219) en una frecuencia máxima del 0.0133. La consecuencia de la variante c.302G>A (p.Cys101Tyr) es una mutación de sentido equivocado; SIFT y PolyPhen predicen un efecto benigno en la proteína. La consecuencia de la variante c.1053_1054insGGTAG (p.Ser352Glyfs*5) es el corrimiento del marco de lectura con pérdida del codón de paro, por lo que se considera que podría ser deletérea. Al analizar la red de interacción de proteínas de la base de datos STRING mostró que *PNPLA3* interactúa con *DHCR7* (dehidrocolesterol 7 reductasa; enzima de la biosíntesis de esteroides que convierte el 7-dehidrocolesterol en colesterol). El gen que codifica a ésta última proteína, está asociado con el síndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS; MIM #27044), un padecimiento con malformaciones congénitas múltiples y deficiencia intelectual que se hereda con patrón autosómico recesivo. Exomiser encontró similitud fenotípica entre el SLOS con el fenotipo del SHS.

Las características fenotípicas del SLOS similares al SHS fueron talla baja, alteraciones craneofaciales (microcefalia, estrechamiento bitemporal, micrognatia), alteraciones oftálmicas (catarata, estrabismo), alteraciones nasales (nariz antevertida, puente nasal aplanado y ancho) y apiñamiento dental. Sin embargo, la frecuencia de la variante c.1053_1054insGGTAG (p.Ser352Glyfs*5) es alta si consideramos una incidencia del SHS de máximo 1 en 10 mil individuos afectados, por lo que aunque esta variante parecía atractiva, no se considera que pueda relacionarse con la causa del SHS.

Variantes identificadas en la paciente 2. Siguiendo con el modelo autosómico recesivo, en la paciente 2 se identificaron 13 posibles variantes patogénicas en los genes *ADGRV1*, *PCDH15*, *MUC16*, *NAALADL2*, *TMEM63A*, *RAB38*, *DNAJC30*, *CROCC* (Tabla 12). Al realizar la evaluación de las frecuencias alélicas de estas variantes, se eliminaron las pertenecientes a los genes *ADGRV1*, *PCDH15*, *MUC16*, *NAALADL2*, *DNAJC30* y *CROCC*, ya que tuvieron una alta frecuencia en las bases de datos.

Las variantes del gen *TMEM63A* fueron c.946G>T (p.Glu316*) y c.523C>T (p.Pro175Ser). La primera es una variante con codón de paro prematuro y la segunda es de sentido equivocado. Para la primera no hubo datos de predicción del efecto en la proteína, y la segunda es deletérea según PolyPhen y Mutation Taster, y tolerada según SIFT. Esta segunda variante ha sido reportada previamente en dbSNP (rs1019154055) con una frecuencia máxima de 0.0034. Exomiser encontró una similitud fenotípica con un modelo murino en este gen y algunos datos clínicos del SHS. Los términos fenotípicos similares fueron polisindactilia y fusión de arcos vertebrales, características que, sin embargo, no son las principales en el SHS. El score obtenido de Exomiser fue muy bajo, por lo que es poco probable que este gen sea la causa del SHS.

En el gen *RAB38* se identificó la variante c.356C>T (p.Pro119Leu) en estado homocigoto; esta variante ya se ha reportado en dbSNP (rs762740402) con una frecuencia máxima de 0.0086 en la población. Se trata de una variante de sentido equivocado con efecto benigno en la proteína según PolyPhen, deletéreo de acuerdo con SIFT, y dañino por Mutation Taster. El análisis de interacción de proteínas mostró una interacción entre *RAB38* y HELLS. El gen que codifica esta última proteína es el responsable del síndrome de inmunodeficiencia-inestabilidad centromérica y anomalías faciales 4 (ICF4; MIM #616911); padecimiento autosómico recesivo caracterizado por infecciones recurrentes en la infancia y rasgos faciales dismórficos. Exomiser descubrió datos fenotípicos similares del ICF4 al fenotipo del SHS como micrognatia, talla baja y deficiencia intelectual. Aunque la variante en *RAB38* no se encontró en ningún otro individuo de la base de datos del LGGB, y aparentemente la frecuencia de esta variante no es muy grande, la incidencia del SHS que se tendría con la frecuencia alélica de 0.0086, sería de 2.9 afectados en 10 mil individuos, cifra que es elevada si consideramos que el SHS es menos frecuente. Por esta razón, no podemos postular este gen para asociarlo con la etiología del SHS.

Variantes identificadas en el paciente 3. En el paciente 3 se identificaron las variantes c.821C>T (p.Pro274Leu) y c.1542C>A p.(Asn514Lys) en el gen *MYBL2* en el modelo autosómico recesivo (Tabla 15). Ambas variantes son de sentido equivocado. Sólo la primera variante se ha reportado previamente en dbSNP (rs148341654) con una frecuencia máxima de 0.1834. De acuerdo a la frecuencia de esta variante, la incidencia del SHS sería mayor a 1 en 10 000, por lo que no se considera que esta variante esté relacionada con la causa del SHS. Para el paciente 3 no se encontraron variantes o genes candidatos asociados a la causa del SHS.

Las situaciones que podrían explicar el hecho de que en el modelo autosómico recesivo no se encontraron variantes o genes compartidos entre los tres pacientes podrían ser las siguientes: 1) que el modelo sea erróneo, 2) que la región sea difícil de secuenciar, 3) que la variante en cuestión se haya filtrado (falso negativo), 4) que no sea una variante pequeña dentro de un exón y 5) la existencia de heterogeneidad genética en el SHS.

Se consideró que hubiera ocurrido este último escenario, sin embargo, los genes que quedaron después del proceso de filtrado y priorización en el modelo autosómico recesivo, tuvieron una frecuencia elevada en bases de datos, contra lo esperado para una enfermedad rara, por lo que se descartaron como posibles causantes del SHS.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el SHS no tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. En la literatura existen pocos casos descritos de hermanos afectados con SHS (Numabe et al. 2011). El Dr. Michael Cohen, en una revisión completa del síndrome, argumentó al respecto que dos hermanos afectados reportados por Hall y colaboradores en 1974, en realidad presentaban un síndrome fenotípicamente similar al SHS, el síndrome Pseudoprogeria-Hallermann-Streiff, entidad en la que los afectados además de presentar datos clínicos característicos del SHS, cursan con cuadriplejía espástica (Hall et al. 1974). Berbich y colaboradores, en 1977, describieron consanguinidad en una familia con SHS. Sin embargo, en ésta familia integrada por 8 hermanos, sólo uno estuvo afectado (Berbich et al. 1977). François, en 1982, citó otras situaciones de consanguinidad pero los casos que se han podido verificar tienen un solo individuo afectado por familia (François 1982).

Esta tesis concuerda con la postura del Dr. Cohen. En los árboles genealógicos de los 3 individuos que se estudiaron, se puede observar que todos tienen hermanos y ninguno de ellos está afectado. Además, los resultados moleculares de la secuenciación del exoma, asumiendo un modelo autosómico recesivo, no mostraron ningún gen o variante relevante que pudiera asociarse con la causa del SHS en alguno de los tres pacientes.

Variantes identificadas al asumir presentación *de novo*

De forma similar a lo que resultó en el modelo autosómico recesivo, al asumir presentación *de novo*, no se encontraron variantes o genes compartidos por los 3 pacientes; ni variantes o genes que fueran compartidos por dos de los 3 pacientes. Se hallaron variantes candidatas diferentes para cada paciente.

Variantes identificadas en el paciente 1. En el paciente 1, se obtuvieron 7 posibles variantes patogénicas en estado heterocigoto en los genes *CAPN6*, *RAB5C*, *FAT3*, *ZNF423*, *GPANK1*, *FUT4*, *OR5C1* (Tabla 9). Todas las variantes fueron de sentido equivocado, a excepción de la que se encontró en el gen *ZNF423*, que fue una variante con corrimiento en el marco de lectura. Ninguna de las 7 variantes se ha reportado previamente en las bases de datos. Se describirán brevemente cada una de ellas.

La variante en *CAPN6*, c.1160A>G (p.Tyr387Cys), se catalogó como probablemente deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. *CAPN6* se encuentra en Xq23, tiene 13 exones y codifica para la proteína Calpaina 6. Las calpaínas son una familia ubicua y bien conservada de proteasas de cisteína dependientes de calcio. Las proteínas de calpaína forman heterodímeros que consisten de una subunidad pequeña no variable y una subunidad grande variable. Las calpaínas han sido implicadas en procesos neurodegenerativos, ya que su activación puede ser desencadenada por la presencia de calcio y el estrés oxidativo. La proteína codificada por este gen está altamente expresada en la placenta. Una enfermedad asociada con *CAPN6* es la distrofia corneal posterior polimorfa 1 (MIM #122000) (Tonami et al. 2011). Éste último dato podría ser relevante, ya que éste gen podría participar en vías el desarrollo embriológico del ojo y no se descartaría la posibilidad de asociarlo con el SHS. Por otro lado, este gen se encuentra en el cromosoma X, y aunque no esperaríamos que el SHS tuviera una herencia ligada al X al no haber predilección por el sexo en esta entidad, no puede descartarse una mutación *de novo* en este gen.

La variante en *RAB5C*, c.190T>G (p.Cys64Gly), también se catalogó como probablemente deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *RAB5C* se encuentra en 17q21.2, tiene 9 exones y codifica para una proteína miembro de la familia RAB, grupo proteico que forma parte de la superfamilia de oncogenes RAS. Los miembros de la familia de proteínas RAB son pequeñas GTPasas que se cree que aseguran la fidelidad en el proceso de acoplamiento y fusión de vesículas con su aceptor correcto (Lo et al. 2012). Aunque este gen no se ha relacionado con ninguna enfermedad, no podemos descartar que participe en procesos embriológicos o de organogénesis hasta ahora desconocidos, que puedan asociarse con la causa del SHS.

La variante en *FAT3*, c.22T>C (p.Cys8Arg), se clasificó como benigna por PolyPhen y posiblemente deletérea por SIFT y Mutation Taster. *FAT3* se encuentra en 11q14.3, tiene 33 exones y codifica para la proteína protocadherina FAT-3, miembro de la familia de las cadherinas. Entre sus funciones está la de unión de iones de calcio. Se ha detectado mRNA de *FAT3* en células madre embrionarias, neuroectodermo primitivo, cerebro fetal, tejido neuronal en adultos y en próstata (Katoh et al. 2006). En el pez cebra también se ha reportado que *Fat3*, participa en la morfogénesis de condrocitos para formar el primordio esquelético craneofacial (Le Pabic et al. 2014). El hecho de que las estructuras afectadas del SHS como piel, pelo, dientes y ojo sean órganos derivados del ectodermo, y la participación de *FAT3* en el desarrollo de las estructuras craneofaciales hacen de *FAT3* un gen de interés en relación a la posible causa del SHS.

Se esperaría que la variante en *ZNF423*, c.1314del (p.Pro438Profs*24), por ser una mutación con corrimiento en el marco de lectura, tuviera un efecto más severo que las de sentido equivocado. El gen *ZNF423* se localiza en 16q12.1, tiene 17 exones y codifica para la proteína dedo de zinc 423. Dentro de sus funciones está la de unirse al DNA como un factor de transcripción y se piensa que tiene un papel importante en la señalización de las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs), las cuales están implicadas en la formación del hueso, cartílago y tejido conectivo (Hata et al. 2000).

Se ha asociado a este gen con la causa de la Nefronoptosis 14 (MIM #256100), enfermedad renal quística con herencia autosómica recesiva que conduce a falla renal en la infancia o adolescencia; y al síndrome de Joubert 19 (MIM #213300), entidad autosómica recesiva caracterizada por hipoplasia del vermis cerebelar, retraso en el desarrollo, alteraciones en el patrón respiratorio, distrofia de retina y alteraciones renales (Chaki et al. 2012). Esta variante parece relevante por tener un posible efecto más severo en la proteína, porque la proteína implicada participa en una de las vías más importantes para el desarrollo esquelético y porque en el síndrome de Joubert se presentan alteraciones oftálmicas como en el SHS.

La variante en el gen *GPANK1*, c.544C>G (p.Gln182Glu), fue clasificada como benigna por PolyPhen, tolerada según SIFT y dañina según Mutation Taster. Éste gen se localiza en 6p21.33, en un grupo de genes asociados con HLA-B, el cual está incluido en la región del complejo mayor de histocompatibilidad III. Tiene 5 exones y codifica para una proteína con un rol importante en la inmunidad (Spies et al. 1989). Éste gen no se ha relacionado con la causa de otras enfermedades y no se encontró que tuviese relación con vías importantes de la organogénesis, en el desarrollo óseo o con genes involucrados en la formación de las estructuras del ojo, por lo que es probable que no esté asociado con la causa del SHS.

La variante en el gen *FUT4*, c.1560C>A (p.Ser520Arg) sólo fue clasificada por PolyPhen y SIFT como deletérea y tolerada, respectivamente. *FUT4* se localiza en 11q21, sólo tienen un exón y codifica para la proteína fucosiltransferasa 4, cuya función es transferir fucosa a polisacáridos de N-acetil-lactosamina para generar estructuras fucosiladas de los carbohidratos. Ésta proteína se expresa durante la embriogénesis en tejidos como hígado, músculo, riñón, piel e intestino delgado (Cailleau-Thomas et al. 2000). No se descarta que éste gen se asocie con la causa del SHS ya que podría participar en la formación de las estructuras de la piel y estructuras craneofaciales.

Por último, la variante en *OR5C1*, c.413C>A (p.Thr138Lys), se clasificó como benigna según PolyPhen y deletérea según SIFT. Éste gen se localiza en 9q33.2, sólo tiene un exón y codifica para el miembro 1 de la familia 5, subfamilia C, de los receptores proteicos olfatorios. Ésta proteína está acoplada a proteína G e interactúa con las moléculas del olfato en la nariz para iniciar una respuesta neuronal que desencadena la percepción del olor (Zozulya et al. 2018). La función de ésta proteína sugiere que el gen que la codifica no está relacionado con el SHS, al no participar en procesos embriológicos.

Por lo anterior, en el paciente 1, las variantes más interesantes fueron las que se encontraron en los genes *FAT3*, *ZNF423* y *FUT4*. El resto de las variantes no se pueden excluir definitivamente ya que tienen un efecto en la proteína y son variantes no reportadas previamente.

Variantes identificadas en la paciente 2. En la paciente 2, se identificaron 53 posibles variantes patogénicas en 53 genes. Se ha descrito en la literatura que cuando se realiza la priorización con Exomiser, en aproximadamente el 80-90% de los casos, el gen causante de la entidad en cuestión queda en las primeras 10 posiciones (Smedley et al. 2015), por lo que se discutirán sólo las variantes localizadas en los primeros diez genes encontrados en la paciente 2, que son: *HIRA*, *NELFA*, *ARID1B*, *PDE4D*, *CHST11*, *NEDD4L*, *TCF7L2*, *COL6A3*, *ODC1*, *GANAB* (Tabla 13). Todas las variantes son de sentido equivocado y se encuentran en estado heterocigoto.

La variante en *HIRA*, c.2380G>T (p.Ala794Ser), se clasificó como deletérea según PolyPhen y SIFT y posiblemente patogénica según Mutation Taster. El gen *HIRA* se encuentra en 22q11.21, tiene 25 exones y codifica para una chaperona de histonas que determina la localización de la histona H3.3 a los nucleosomas. *HIRA* se expresa en el desarrollo de la placa y el tubo neural, la cresta neural, el tejido mesenquimatoso de la cabeza y las estructuras del arco branquial.

A partir de éstos hallazgos, se sugirió que HIRA puede tener participación en el síndrome de haploinsuficiencia causado por la delección cromosómica de 22q11, el síndrome Velocardiofacial (VCF; MIM #192430). Este síndrome se caracteriza por dismorfias faciales, defectos cardiacos, alteraciones del paladar, retraso en el desarrollo y alteraciones inmunológicas (Roberts et al. 1997). No se descarta que este gen se pueda asociar con la causa del SHS porque existen similitudes fenotípicas entre ambos síndromes, como talla baja y micrognatia. Aunque no son las mismas alteraciones, también comparten manifestaciones oftálmicas, anomalías en la nariz y alteraciones inmunológicas.

En el gen *NELFA* (*WHSC2*) se identificó la variante c.634G>C (p.Gly212Arg), la cual tuvo una predicción de efecto deletéreo por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *NELFA* se localiza en 4p16.3, tiene 12 exones y codifica para el miembro A del complejo proteico del factor de elongación negativo, cuya función es regular negativamente la elongación de la transcripción por la RNA polimerasa II. Este gen se encuentra dentro de la región crítica del síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHS; MIM #194190), y se piensa que tiene una participación importante en el fenotipo de esta entidad (Wright et al. 1999). Este síndrome se debe a la microdelección, en un alelo, del brazo corto del cromosoma 4. El SHS comparte datos clínicos con el WHS como la talla baja, malformaciones del cráneo, alteraciones oftálmicas, micrognatia e hipodontia. Otro aspecto interesante es que encontramos interacción entre *NELFA* y *ERCC6*; el gen que codifica a esta última proteína se asocia con la causa del síndrome de Cockayne tipo B (CSB; MIM #133540). El CSB también comparte datos fenotípicos con el SHS como talla baja, alteraciones craneales, catarata, microftalmia, microcórnea, nariz adelgazada en la punta, alteraciones dentales, atrofia de piel, cabello escaso y delgado. Esto permite pensar que esta variante pudiera estar asociada con el SHS.

La variante en *ARID1B*, c.4405A>G (p.Arg1469Gly) tuvo una predicción de efecto benigno según PolyPhen y deletéreo según SIFT y Mutation Taster. El gen *ARID1B* se encuentra en 6q25.3, tiene 24 exones y codifica para una proteína que contiene un dominio de interacción con regiones ricas en AT del DNA. La proteína codificada es un componente del complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF y puede desempeñar un papel en la activación del ciclo celular. Una enfermedad relacionada con éste gen es el síndrome de Coffin-Siris 1 (CSS; MIM #135900); un síndrome de malformaciones múltiples con herencia autosómica dominante caracterizado por deficiencia intelectual, hipertriosis, cabello escaso en cuero cabelludo y ausencia o hipoplasia del quinto dedo de manos y pies. Se considera que éste gen podría asociarse con la causa del SHS porque el CSS comparte manifestaciones fenotípicas similares al SHS como talla baja, alteraciones oftálmicas y dentición retrasada.

La variante en el gen *PDE4D*, c.1216A>G (p.Ile406Val), fue clasificada como deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *PDE4D* se encuentra en 5q11.2-q12.1, está formado por 36 exones y codifica para la proteína fosfodiesterasa 4D, la cual degrada y activa el AMPc que a su vez actúa como una molécula de trasducción de señales en múltiples células. Éste gen está relacionado con la causa de la Acrodisostosis 2 con o sin resistencia hormonal (ACRDYS2; MIM #6114613), un tipo de displasia esquelética con herencia autosómica dominante caracterizada por braquidactilia, disostosis facial y estenosis espinal (Michot et al. 2012). No se descarta que éste gen pueda asociarse a la causa del SHS ya que el ACRDYS2 comparte datos fenotípicos con el SHS como la talla baja y alteraciones esqueléticas craneofaciales.

La variante identificada en *CHST11*, c.219C>A (p.His73Gln), tuvo una predicción de efecto deletéreo según PolyPhen y Mutation Taster, y tolerado por SIFT. El gen *CHST11* se encuentra en 12q23.3, está formado por 7 exones y codifica para la proteína carbohidrato sulfotransferasa 11, que se localiza en la membrana de Golgi y tiene por función catalizar la transferencia de sulfato a la posición 4 del residuo N-acetilgalactosamina de condroitín (Schmidt et al. 2004).

El condroitín sulfato constituye el proteoglicano predominante en el cartílago que se distribuye en la superficie de las células y en la matriz extracelular. Esto podría ser relevante en el contexto del SHS porque esta proteína podría estar implicada en el desarrollo del cartílago de la región craneofacial.

La variante identificada en *NEDD4L*, c.877C>A (p.Pro293Thr), tuvo una predicción de consecuencia benigna según PolyPhen, tolerada según SIFT, y deletérea según Mutation Tester. *NEDD4L* se localiza en 18q21.31, está formado por 38 exones y codifica para un miembro de la familia NEDD4 ubiquitin ligasas, cuya función es marcar con ubiquitina a proteínas para su degradación lisosomal. Juega un papel crítico en el transporte de sodio epitelial mediante la regulación de la expresión de la superficie celular del canal de sodio epitelial, ENaC (Broix et al. 2016). Los polimorfismos de un solo nucleótido en este gen están asociados con la hipertensión esencial.

Este gen se ha asociado con la causa de la heterotopia periventricular nodular 7 (PVNH7; MIM#617201), entidad autosómica dominante caracterizada por migración neuronal anormal durante el desarrollo cerebral, deficiencia intelectual y convulsiones (Broix et al. 2016). Exomiser encontró similitud fenotípica entre PVNH7 y SHS en datos clínicos como micrognatia, alteraciones oculares (estrabismo y atrofia óptica) e hipodontia. No se descarta la asociación de éste gen con el SHS.

La variante identificada en *TCF7L2*, c.1528C>A: (p.Pro510Thr), tiene un efecto deletéreo según PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *TCF7L2* se localiza en 10q25.2-q25.3, tiene 19 exones y codifica para el factor de transcripción 7 like-2, que participa de forma importante en la vía de señalización de Wnt/beta catenina, la cual constituye un mecanismo esencial en la regulación del remodelado óseo y ejerce un control sobre el osteoblasto, favoreciendo su proliferación, diferenciación o apoptosis (Escobar-Gómez et al. 2009). Las enfermedades asociadas con este gen incluyen diabetes mellitus no insulino dependiente (MIM #125853), cáncer colorectal, y el síndrome de Pitt-Hopkins (PTHS; MIM #610954).

El PTHS es un padecimiento con herencia autosómica dominante, caracterizado por deficiencia intelectual, hiperventilación intermitente seguida de apnea y características faciales distintivas (Amiel et al. 2007). Interesantemente, se encontraron manifestaciones del PTHS que aunque no son idénticas a las del SHS, afectan regiones corporales similares. Los datos clínicos semejantes son las alteraciones craneales (microcefalia, estrechamiento bitemporal, cara cuadrada, pómulos prominentes), alteraciones oftálmicas (ojos hundidos, estrabismo, miopía, astigmatismo, fisuras palpebrales ascendentes), alteraciones nasales (puente nasal ancho, narinas antevertidas, nariz convexa), y dientes espaciados. Éstas similitudes y el hecho de que éste gen participa en una de las vías más importantes para la modelación ósea, sugieren que éste gen podría ser un buen candidato para el SHS.

La variante identificada en *COL6A3*, c.79G>T(p.Val27Phe), fue clasificada como deletérea por PolyPhen y SIFT. *COL6A3* se encuentra en 2q37.3, tiene 50 exones y codifica para la cadena alfa-3 de la molécula del colágeno tipo VI, que forma parte del tejido conectivo. Las enfermedades asociadas con este gen son la miopatía de Bethlem 1 (BTHLM1; MIM #158810), padecimiento con herencia autosómica dominante y recesiva caracterizada por tortícolis congénita, contracturas de codos y tobillos y debilidad muscular; la distonía 27 (DYT27; MIM #616411), una enfermedad con herencia autosómica recesiva caracterizada por distonía aislada en región craneocervical y de miembros superiores; y la distrofia muscular congénita de Ulrich 1 (UCMD1; MIM #254090), entidad de herencia autosómica dominante y recesiva caracterizada por debilidad muscular, hipermobilidad de articulaciones distales y contractura de articulaciones proximales con inteligencia normal (N. L. Baker et al. 2004) (N. L. Baker et al. 2007) (Zech et al. 2015). Las manifestaciones clínicas del SHS incluyen alteraciones esqueléticas de la región craneofacial; el gen *COL6A3*, al estar involucrado en padecimientos del tejido conectivo, pudiera relacionarse con el SHS.

La variante en *ODC1*, c.1011G>T (p.Lys337Asn), tuvo una predicción de efecto benigno según PolyPhen, tolerado según SIFT y deletéreo según Mutation Taster.

El gen *ODC1* se encuentra en 2p25.1, tiene 13 exones y codifica para la ornitina descarboxilasa 1, enzima que cataliza el primer paso limitante de la biosíntesis de poliamina que convierte la ornitina en putrescina; ésta última es precursor de las poliaminas, la espermidina y la espermina. Las poliaminas son esenciales para la proliferación celular y están implicadas en los procesos celulares, que van desde la replicación del DNA hasta la apoptosis. Variantes de un solo nucleótido en este gen se han asociado con un riesgo reducido para el adenoma de colon (Martinez et al. 2003). Éste gen no parece tener funciones relevantes relacionadas con el desarrollo embrionario del ojo o hueso, por lo que no parece ser un candidato importante.

La variante en *GANAB*, c.1073G>T (p.Gly358Val), fue clasificada como deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *GANAB* se encuentra en 11q12.3, tiene 26 exones y codifica para la subunidad alfa de la glucosidasa II, ésta enzima es heterodimérica y desempeña una función importante en el plegamiento de proteínas, así como en la escisión de residuos de glucosa de glicoproteínas inmaduras en el retículo endoplásmico. Una enfermedad relacionada con este gen es la enfermedad renal poliquística 3 (APKD3; MIM#60066), una entidad con herencia autosómica dominante caracterizada por quistes renales y hepáticos que pueden conducir a disfunción orgánica (Porath et al. 2016). Estas características no parecen estar relacionadas con el SHS.

Para la paciente 2, los genes más relevantes, en el contexto del SHS, fueron *HIRA*, *NELFA*, *ARID1B*, *PDE4D*, *CHST11*, *NEDD4L*, *TCF7L2* y *COL6A3*. Sin embargo, no se pueden excluir definitivamente el resto de los genes, ya que las variantes encontradas en éstos tienen un efecto en la proteína y son variantes no reportadas previamente.

Variantes identificadas en el paciente 3. En el paciente 3, se obtuvieron 77 posibles variantes patogénicas en 76 genes. Al igual que en la paciente 2, se discutirán sólo los diez genes con el score más alto, de acuerdo con la priorización de Exomiser: *ATP7A*, *BCOR*, *OBSL1*, *KMT2D*, *MEAF6*, *XRCC6*, *FGF3*, *PTPN7*, *COPB1*, *ALS2* (Tabla 16). Todas las variantes son de sentido equivocado y se encuentran en estado heterocigoto.

La variante en *ATP7A*, c.1229T>C (p.Val410Ala), es deletérea según PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *ATP7A* se encuentra en Xq21.1, tiene 23 exones y codifica para la ATPasa transportadora de cobre alfa, que se encuentra en el aparato de Golgi, donde suministra cobre a las enzimas dependientes de éste ión. Se traslada a la membrana plasmática en condiciones de cobre extracelular elevado y participa en la expulsión de cobre de las células. Se ha descrito que *Atp7a* se expresa durante el desarrollo embrionario del ratón (Kuo et al. 1997). Éste gen está relacionado con la enfermedad de Menkes (MK; MIM #309400), una enfermedad ligada al X caracterizada por deficiencia de cobre; la atrofia muscular espinal distal ligada al X (SMAX3; MIM #300489), padecimiento caracterizado por hipotonía generalizada y debilidad distal; y el síndrome del cuerno occipital (OHS; MIM #304150), padecimiento caracterizado por hiperlaxitud, hernias, divertículos vesicales, y múltiples anomalías esqueléticas. Exomiser identificó similitud fenotípica entre el OHS y el SHS ya que el primero se manifiesta con una frente amplia, nariz curvada, alteraciones esqueléticas como *pectus excavatum*, *pectus carinatum*, costillas cortas y xifosis; piel suave, y alteraciones en el pelo, como ocurre con el SHS. Por otro lado, aunque no hay razones para pensar que el SHS tenga herencia ligada al X, porque no hay predilección por el sexo en esta entidad, no puede descartarse una mutación *de novo* en este gen.

La variante identificada en *BCOR*, c.216G>T (p.Met72Ile), tiene efecto deletéreo según PolyPhen y Mutation Taster, y tolerado según SIFT. *BCOR* se encuentra en Xp11.4, está formado por 18 exones y codifica para un correpresor transcripcional que inhibe la expresión génica al interactuar con *BCL6* y *MLLT3*.

Esta represión está mediada por actividades de histona deacetilasa. La proteína BCOR está involucrada en la represión de TFAP2A, alterando la unión de BCL6 y KDM2B a las regiones promotoras de TFAP2A. A través de ésta represión, BCOR actúa como un regulador negativo de la capacidad osteodentinogénica en las células madre adultas (Huynh et al. 2000). Una enfermedad relacionada con *BCOR* es la microftalmia síndrónica tipo 2 o síndrome óculofaciocardiodental (MCOPS2; MIM #300166), condición ligada al X que se caracteriza por alteraciones oftálmicas como microcórnea, catarata congénita, microftalmia, blefarofimosis, ptosis, sinequia de iris, estrabismo y pérdida de visión; alteraciones en la forma de la nariz como punta nasal ancha, punta nasal bífida, cartílago nasal septado; y alteraciones dentales como dentición permanente, oligodontia, apiñamiento dental y dientes supernumerarios (Horn et al. 2005). Estas manifestaciones clínicas son muy semejantes a las del SHS por lo que éste gen es un buen candidato para asociarlo a su causa ya que aunque se localiza en el cromosoma X, no se puede descartar una mutación *de novo* como la causa del SHS en este paciente.

La variante en *OBSL1*, c.676G>T (p.Ala226Ser), se clasificó como deletérea por PolyPhen y Mutation Taster, y como tolerada por SIFT. *OBSL1* se encuentra en 2q35, está formado por 23 exones y codifica para la proteína similar a la obscurina 1, la cual es un componente principal del complejo 3M, un complejo requerido para regular la dinámica de los microtúbulos y la integridad del genoma. También actúa como regulador de la ubiquitina-ligasa Cul7-RING, desempeñando un papel crítico en la vía de ubiquitina ligasa que regula la morfogénesis del aparato de Golgi y el patrón de dendritas en el cerebro (Geisler et al. 2007). Se ha atribuido a este gen la causa del síndrome 3M (3M2; MIM #612921), un padecimiento con herencia autosómica recesiva caracterizado por un fenotipo facial distintivo, retraso en el crecimiento prenatal y postnatal, y desarrollo intelectual normal (Hanson et al. 2009).

Además de estas características, el síndrome 3M presenta talla baja, abombamiento frontal y dolicocefalia, puente nasal aplanado, narinas antevertidas, *pectus excavatum* e hipoplasia de costillas; datos fenotípicos similares al SHS.

La variante c.169G>T (p.Asp57Tyr), fue encontrada en el gen *KMT2D*, también llamado *MLL2*. Ésta variante fue clasificada como deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen se encuentra en 12q13.12, tiene 56 exones y codifica para la proteína lisina metiltransferasa 2D, KMT2D. Como su nombre lo indica, metila la lisina 4 de la histona H3 (H3K4me). Esta marca representa una etiqueta específica para la activación transcripcional epigenética. Un dato relevante es que esta proteína participa en el ensamblaje del complejo beta-catenina-TCF (Lee et al. 2013). Alteraciones en este gen son la causa molecular del síndrome de Kabuki 1 (KMS; MIM #147920), una enfermedad con herencia autosómica dominante caracterizada por deficiencia intelectual y dismorfias adicionales como talla baja, microcefalia, ptosis, fisuras palpebrales largas, eversión del tercio lateral del párpado inferior, cejas anchas y arqueadas, punta nasal deprimida, columela nasal corta, malformación de pabellones auriculares, paladar hendido, malformaciones cardiovasculares, genitourinarias y esqueléticas como escoliosis, alteraciones vertebrales y acortamiento del quinto dedo de las manos (Ng et al. 2010). Aunque los datos fenotípicos del KMS difieren de los del SHS, se considera relevante este gen para asociarlo como causa del SHS por su participación en la vía canónica de WNT/beta-catenina-TCF.

La variante en *MEAF6*, c.467G>T p.(Arg156Met), tuvo una predicción de consecuencia deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen se encuentra en 1p34.3, tiene 10 exones y codifica para MEAF6, un componente del complejo de acetiltransferasas de histonas NuA4, el cual participa en la activación transcripcional de genes acetilados en las histonas H2 y H4 (Doyon et al. 2004). No se encontraron enfermedades relevantes relacionadas con éste gen y con el SHS.

La proteína, aunque regula la activación transcripcional de los genes, no tiene una participación importante conocida en las vías canónicas del desarrollo embriológico, oftálmico o esquelético, por lo que no consideramos a este gen como candidato para relacionarlo como la causa del SHS.

La variante encontrada en el gen *XRCC6*, c.338C>A (p.Ala113Glu), fue clasificada como deletérea por SIFT, PolyPhen y Mutation Taster. *XRCC6* se encuentra en 22q13.2, tiene 13 exones y codifica para una helicasa dependiente de ATP, KU70, que tiene una función destacada en las translocaciones cromosómicas y en la reparación del DNA de extremos no homólogos. Este gen se ha asociado con el desarrollo de lupus eritematoso sistémico, pero no se ha asociado con enfermedades mendelianas (Reeves et al. 1989). Esta información sugiere que el gen *XRCC6* es un candidato débil para el SHS.

La variante en el gen *FGF3*, c.438G>T (p.Gln146His), tiene un efecto deletéreo según PolyPhen, y tolerado según SIFT. *FGF3* se encuentra en 11q13.3, tiene 3 exones y codifica para el factor de crecimiento de fibroblastos 3, FGF3. Los miembros de la familia FGF poseen amplias actividades mitogénicas y de sobrevivencia celular; están involucrados en una variedad de procesos biológicos que incluyen desarrollo embrionario, crecimiento celular, morfogénesis, reparación de tejidos, crecimiento tumoral e invasión. Los estudios de estas proteínas en ratón y pollo sugieren que éstos participan en la formación del oído interno (Alsmadi et al. 2009). Una enfermedad relacionada con este gen es la sordera congénita con agenesia del oído interno, microtia y microdontia (LAMM; MIM #610706), una entidad de herencia autosómica recesiva que comparte algunas manifestaciones clínicas con el SHS, como micrognatia, microdontia, y nariz con alas nasales no desarrolladas. Se considera a este gen como un candidato del SHS por la función de la proteína FGF3, y la similitud fenotípica del LAMM con el SHS.

La variante encontrada en *PTPN7*, c.1109G>T (p.Gly370Val), fue clasificada como deletérea por PolyPhen, SIFT y Mutation Taster. El gen *PTPN7* se encuentra en 1q32.1, tiene 12 exones y codifica para un miembro de las proteínas tirosina fosfatasas (PTP). Dentro de sus funciones relevantes están la regulación del desarrollo de los linfocitos T y B, y la transducción de señales. Entre las vías relacionadas con esta proteína está la vía de señalización MAPK. Se ha descrito que el mRNA de *PTPN7* se expresa predominantemente en células hematopoyéticas (Adachi et al. 1992), por lo que no parece ser un candidato fuerte para el SHS.

La variante en *COPB1*, c.636C>G (p.Cys212Trp), tuvo un efecto deletéreo por PolyPhen y Mutation Taster, y de tolerado por SIFT. *COPB1* se encuentra en 11p15.2, tiene 22 exones y codifica para la subunidad beta del complejo coatómero. El coatómero es una proteína citosólica que reviste las vesículas de secreción constitutiva que proceden del aparato de Golgi o del retículo endoplásmico rugoso. También participa en la autofagia, específicamente regulando la función del endosoma temprano (Duden et al. 1991). La función de la proteína no parece tener relación con el desarrollo embriológico, ocular o esquelético, y, por ende, con el SHS.

La variante identificada en *ALS2*, c.639C>A: (p.Ser213Arg), tuvo una predicción de efecto deletéreo por PolyPhen, Mutation Taster y SIFT. El gen *ALS2* se encuentra en 2q33.1, tiene 38 exones y codifica para la proteína llamada alsina (*ALS2*), cuya función es actuar como un regulador GTPasa. Controla la sobrevivencia y crecimiento de las neuronas motoras (Hadano et al. 2006). Las enfermedades relacionadas con este gen son esclerosis lateral amiotrófica juvenil 2 (*ALSJ*; MIM #205100), entidad de herencia autosómica recesiva; esclerosis primaria lateral juvenil (*PLS*; MIM #606353), padecimiento con patrón de herencia autosómico recesivo; y parálisis espástica de inicio infantil (*IAHSP*; MIM #607225), también con herencia autosómica recesiva. De acuerdo a la función de *ALS2*, esta proteína no está involucrada en vías de señalización relevantes para el SHS por lo que no se considera que pudiera existir una relación causal.

Para el paciente 3, las variantes más interesantes para poder asociarlas con el SHS son las presentes en los genes *ATP7A*, *BCOR*, *OBSL1*, *KMT2D*, y *FGF3*. Sin embargo, no se pueden excluir definitivamente el resto de los genes, ya que las variantes encontradas en éstos tienen un efecto en la proteína y no se han reportado previamente.

Se identificaron variantes posiblemente patogénicas distintas en los tres pacientes cuando se asume una presentación *de novo*. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos con el modelo autosómico recesivo, ninguna de estas variantes se ha reportado en la literatura, todas fueron variantes nuevas, sin datos de frecuencia en las bases de datos.

Aunque es poco probable que tres individuos seleccionados al azar con la misma entidad clínica, hubieran tenido como causa genética 3 diferentes genes, el hecho de que los 3 pacientes tengan un fenotipo ligeramente distinto, podría deberse a heterogeneidad genética o de *locus* en el SHS. Sin embargo, la expresividad variable de la enfermedad también podría explicar esta situación.

Asumiendo que sí exista heterogeneidad genética en el SHS, se hizo un análisis de redes moleculares entre las proteínas codificadas por los genes candidatos de los 3 pacientes, con el objetivo de averiguar si dichas proteínas participan en una vía en común.

Se incluyeron las proteínas CAPN6, RAB5C, FAT3, ZNF423, GPANK1, FUT4 y OR5C1 del paciente 1; HIRA, NELFA, ARID1B, PDE4D, CHST11, NEDD4L, TCF7L2, COL6A3, ODC1 y GANAB de la paciente 2; y ATP7A, BCOR, OBSL1, KMT2D (MLL2), MEAF6, XRCC6, FGF3, PTPN7, COPB1 y ALS2 del paciente 3.

Interesantemente, se observó que FUT4, FAT3, TCF7L2, BCOR y MLL2 son un grupo de proteínas con relación funcional entre ellas (Figura 19). Aunque son genes distintos, *FUT4* y *FAT3* se expresan durante la embriogénesis, *TCF7L2* y *KMT2D* (*MLL2*) participan en la vía canónica Wnt/beta-catenina y, *BCOR* está relacionado con microftalmia.

Este hallazgo sugiere que los genes candidatos *FUT4* y *FAT3* del paciente 1, el gen *TCF7L2* de la paciente 2 y los genes *BCOR* y *KMT2D* (*MLL2*) del paciente 3, podrían estar relacionados con la causa molecular del SHS.

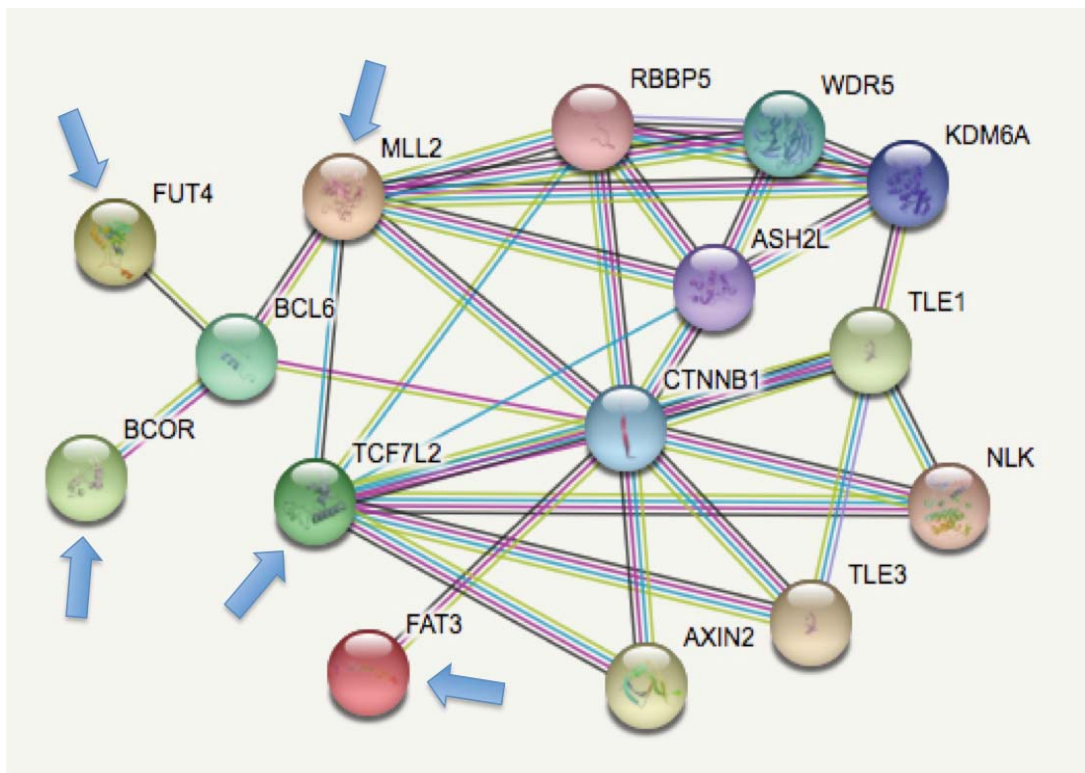


Figura 19. Red de interacción de proteínas STRING. Las flechas señalan que las las proteínas FUT4, FAT3, TCF7L2, BCOR y MLL2 tienen relación funcional entre ellas por lo que pudieran estar asociadas con el SHS.

Aún después de aplicar los filtros a las variantes halladas en los 3 tríos, y después de priorizar los genes afectados, quedó un número relativamente alto de posibles variantes patogénicas, principalmente en los pacientes 2 y 3. Todas estas variantes tienen un efecto relevante en la proteína y no se han reportado en las bases de datos.

Para reducir el número de genes candidatos sería necesario estudiar más pacientes con SHS, podría ser útil profundizar en las características de los genes *FUT4*, *FAT3*, *TCF7L2*, *BCOR* y *KMT2D (MLL2)*, y determinar si es posible asociarlos con el SHS.

En este trabajo únicamente se analizaron variantes puntuales e indels pequeñas dentro de regiones codificantes. Cabe la posibilidad de que las alteraciones moleculares asociadas con el SHS no sean variantes de este tipo, por lo que es necesario estudiar variantes estructurales, variantes sinónimas, variantes intrónicas o variantes en el número de copias (CNVs) que pudieran estar relacionadas con el SHS.

Debe considerarse que la alteración molecular pueda estar fuera del exoma, en cuyo caso tendría que buscarse mediante la secuenciación del genoma completo.

La descripción en la literatura de gemelos discordantes con SHS (Schondel 1943) y el hecho de que las manifestaciones principales de este síndrome están muy localizadas en los tejidos óseo y blando de la región craneofacial, sugieren que la causa del SHS puede deberse a una mutación somática. En este sentido, podría ser útil aislar DNA de un tejido afectado y de otro no afectado, para secuenciar el exoma en ambos. Un ejemplo de enfermedad monogénica causada por mutación somática es el síndrome de Proteus. La secuenciación del exoma descubrió que una mutación en mosaico del gen *AKT1* es la responsable de esta enfermedad (Lindhurst et al. 2011).

En contraste con lo anterior, las enfermedades causadas por mutaciones con mosaicismo somático, suelen tener características clínicas como asimetrías hemicorporales, mosaicismo pigmentario y malformaciones vasculares que se alternan con tejido normal. El SHS no tiene este tipo de manifestaciones, por lo que es poco probable que se trate de una enfermedad causada por este mecanismo.

Otra hipótesis es que el SHS tenga una herencia no tradicional con una frecuencia incrementada de mosaicismo geminal y una marcada alteración en la función reproductiva.

14. Conclusiones

- En este trabajo se describen las posibles variantes patogénicas identificadas por secuenciación del exoma de tres individuos no relacionados con diagnóstico clínico de SHS y sus padres sanos.
- Se encontraron variantes candidatas diferentes para cada paciente en el modelo autosómico recesivo y en la presentación *de novo*.
- Las variantes encontradas en el modelo recesivo tuvieron una frecuencia elevada con relación a la incidencia de esta enfermedad, por lo que se descartaron como posibles causantes del SHS.
- Asumiendo una presentación *de novo*, se identificaron varios genes que pudieran ser de interés (*FUT4*, *FAT3*, *TCF7L2*, *BCOR* y *MLL2*) para continuar el estudio y determinar si es posible asociarlos con el SHS. Una posibilidad es estudiar estos genes en otros pacientes con SHS.
- No se identificaron variantes en los genes candidatos *GJA1*, *LMNA*, *ZMPSTE24* e *ICMT*; previamente analizados como causantes del SHS, ni cuando aplicamos un modelo autosómico recesivo, ni al asumir presentación *de novo*. Esto permite concluir que las enfermedades mencionadas no son alélicas del SHS.
- Cabe la posibilidad de que la causa del SHS corresponda a algún tipo de alteración no analizada en este trabajo, como variantes sinónimas, variantes estructurales, variantes intrónicas o variantes en el número de copias (CNVs), que pudieran estar relacionadas con la causa del SHS.
- Debe considerarse que la alteración molecular pueda estar fuera del exoma, en cuyo caso tendría que buscarse mediante la secuenciación del genoma completo.

- La descripción en la literatura de gemelos discordantes con SHS sugiere que la causa del SHS puede deberse a una mutación somática. Sin embargo, el SHS no presenta características clínicas usuales de las enfermedades ocasionadas por mosaicismo somático como asimetrías hemicorporales, mosaicismo pigmentario y malformaciones vasculares, por lo que es poco probable que el SHS sea causado por este mecanismo molecular.
- Otra hipótesis es que el SHS tenga una herencia no tradicional con una frecuencia incrementada de mosaicismo geminal y una marcada alteración en la función reproductiva.
- En la actualidad no existen reportes en la literatura de pacientes con síndrome de Hallermann-Streiff a los que se haya realizado análisis molecular mediante la técnica de secuenciación del exoma. Los hallazgos de este trabajo amplían la información hasta ahora conocida sobre la causa genética de este síndrome al apoyar la teoría de que la herencia autosómica recesiva en el SHS es improbable, y confirma que las enfermedades cuyo fenotipo es similar al SHS, como las laminopatías y la displasia óculodentodigital no son alélicas de este padecimiento.

15. Referencias

Artículos

- Aubry M. 1893. Variété singulière d'alopecie congénitale: alopecie suturale. *Annales De Dermatologie Et De Syphiligraphie* (4): 899-900.
- Adachi M, Sekiya M, Arimura Y, Takekawa M, Itoh F, Hinoda Y, et al. 1992. "Protein-Tyrosine Phosphatase Expression in Pre-B Cell NALM-6." *Cancer Research* 52(3): 737-40.
- Ahmad Z, Zackai E, Medne L, Garg A. 2010. "Early Onset Mandibuloacral Dysplasia due to Compound Heterozygous Mutations in ZMPSTE24." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 152A(11): 2703-10.
- Alsmadi O, Meyer BF, Alkuraya F, Wakil S, Alkayal F, Al-Saud H, et al. 2009. "Syndromic Congenital Sensorineural Deafness, Microtia and Microdontia Resulting from a Novel Homoallelic Mutation in Fibroblast Growth Factor 3 (FGF3)." *European Journal of Human Genetics* 17(1): 14-21.
- Amiel J, Rio M, Pontual L, Redon R, Malan V, Boddaert N, et al. 2007. "Mutations in TCF4, Encoding a Class I Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Are Responsible for Pitt-Hopkins Syndrome, a Severe Epileptic Encephalopathy Associated with Autonomic Dysfunction." *The American Journal of Human Genetics* 80(5): 988-93.
- Baker NL, Mörgelin M, Peat R, Goemans N, North KN, Bateman JF, et al. 2004. "Dominant Collagen VI Mutations Are a Common Cause of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy." *Human Molecular Genetics* 14(2): 279-93.
- Baker NL, Mörgelin M, Pace RA, Peat RA, Adams NE, Gardner RJM, et al. 2007. "Molecular Consequences of Dominant Bethlehem Myopathy Collagen VI Mutations." *Annals of Neurology* 62(4): 390-405.
- Barrett JH, Teare MD. 2011. "Linkage Analysis." *Methods in Molecular Biology* 760: 19-33.
- Barrucand D, Benradi C, Schmitt J. 1978. "Syndrome de François". A propos de deux cas. *Revue d'Otoneuro Ophthalmologie* 50(3):305-26.
- Bénateau H, Rocha CSM, Rocha FDS, Veysiére A. 2015. "Treatment of the Nasal Abnormalities of Hallermann-Streiff Syndrome by Lipofilling." *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 44(10): 1246-49.

- Ben-Yaou R, Navarro C, Quijano-Roy S, Bertrand AT, Massart C, De Sandre-Giovannoli A, et al. 2011. "Type B Mandibuloacral Dysplasia with Congenital Myopathy due to Homozygous ZMPSTE24 Missense Mutation." *European Journal of Human Genetics* 19(6): 647–54.
- Berbich A, Benradi F, Sekkat A. 1977. "Syndrome de Francois". *Archives of Ophthalmology (Paris)* 37(11): 723-730.
- Bernier FP, Caluseriu O, Ng S, Schwartzenruber J, Buckingham KJ, Innes AM, et al. 2012. "Haploinsufficiency of SF3B4, a Component of the Pre-mRNA Spliceosomal Complex, Causes Nager Syndrome." *American Journal of Human Genetics* (90): 925–33.
- Blodi FC. 1957. "Development anomalies of the skull affecting the eye. and vertebral column." *Archives of ophthalmology* 57(4): 593-610.
- Bonafe L, Cormier-Daire V, Hall C, Lachman R, Mortier G, Mundlos S, et al. 2015. "Nosology and Classification of Genetic Skeletal Disorders: 2015 Revision." *American Journal of Medical Genetics. Part A* 167A(12): 2869–92.
- Broix L, Jagline H, Ivanova E, Schmucker S, Drouot N, Clayton-Smith J, et al. 2016. "Mutations in the HECT Domain of NEDD4L Lead to AKT–mTOR Pathway Deregulation and Cause Periventricular Nodular Heterotopia." *Nature Genetics* 48(11): 1349–58.
- Bueno-Sanchez M. 1966. "Síndrome de Hallermann-Streiff-Francois. A proposito de una presentacion familiar". *Boletin de la Sociedad Vasco-Navarra de Pediatria* 1: 21-35.
- Cailleau-Thomas A, Coullin P, Candelier JJ, Balanzino L, Mennesson B, Oriol R, et al. 2000. "FUT4 and FUT9 Genes Are Expressed Early in Human Embryogenesis." *Glycobiology* 10(8): 789–802.
- Carles-Mermet B. 1979. "Dyscephalie a tete d'oiseau (signes oculaires et etiologie). A propos de 4 observations et revue de la literature". *Thesis, Lyon*.
- Chaki M, Airik R, Ghosh AK, Giles RH, Chen R, Slaats GG, et al. 2012. "Exome Capture Reveals ZNF423 and CEP164 Mutations, Linking Renal Ciliopathies to DNA Damage Response Signaling." *Cell* 150(3): 533–48.
- Chandra RK, Joglekar S, Antonio Z. 1978. "Deficiency of humoral immunity and hypoparathyroidism associated with the Hallermann-Streiff síndrome". *Journal of Pediatrics* 93 (5): 892-893.
- Chen C, Peng J, Jia X, Liu Z, Zhao P. 2017. "Hallermann-Streiff Syndrome with Bilateral Microphthalmia, Pupillary Membranes and Cataract Absorption." *International Journal of Ophthalmology*: 1016–18.

- Cho WK, Park JW, Park MR. 2011. "Surgical Correction of Hallermann-Streiff Syndrome: A Case Report of Esotropia, Entropion, and Blepharoptosis." *Korean Journal of Ophthalmology* 25(2): 142–45.
- Chong JX, McMillin MJ, Shively KM, Beck AE, Marvin CT, Armenteros JR, et al. 2015. "De Novo Mutations in NALCN Cause a Syndrome Characterized by Congenital Contractures of the Limbs and Face, Hypotonia, and Developmental Delay." *American Journal of Human Genetics* 96(3): 462–73.
- Cohen MM. 1991. "Hallermann-Streiff Syndrome: A Review." *American Journal of Medical Genetics* 41(4): 488–99.
- Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, et al. 2011. "Exome Sequencing Identifies MAX Mutations as a Cause of Hereditary Pheochromocytoma." *Nature Genetics* 43(7): 663–67.
- Crevits L, Thiery E, Van-der-Eechem H. 1977. "Oculomandibular dyscephaly" (Hallermann-Streiff-FranCois syndrome) associated with epilepsy. *Journal of Neurology* 215(3): 225-230.
- Cunningham VJ, D'Apice MR, Licata N, Novelli G, Cundy T. 2010. "Skeletal Phenotype of Mandibuloacral Dysplasia Associated with Mutations in ZMPSTE24." *Bone* 47(3): 591–97.
- David LR, Finlon M, Genecov D, Argenta LC. 1999. "Hallermann-Streiff Syndrome: Experience with 15 Patients and Review of the Literature." *The Journal of Craniofacial Surgery* 10(2): 160–68.
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. 2003. "Lamin a Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria." *Science* 300 (5628): 2055.
- Dennis NR, Fairhurst J, Moore IE. 1995. "Lethal Syndrome of Slender Bones, Intrauterine Fractures, Characteristic Facial Appearance, and Cataracts, Resembling Hallermann-Streiff Syndrome in Two Sibs." *American Journal of Medical Genetics* 59(4): 517–20.
- Dinwiddie R, Gewitz M, Taylor JFX. 1978. "Cardiac defects in the provides an important baseline for any contemplated Hallermann-Streiff síndrome". *The Journal of Pediatrics* 92(1): 77-8.
- Do R, Stitzel NO, Won HH, Jorgensen AB, Duga S, Angelica Merlini P, et al. 2015. "Exome Sequencing Identifies Rare LDLR and APOA5 Alleles Conferring Risk for Myocardial Infarction." *Nature* 518(7537): 102–6.

- Doyon Y, Selleck W, Lane WS, Tan S, Côté J. 2004. "Structural and Functional Conservation of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex from Yeast to Humans." *Molecular and Cellular Biology* 24(5): 1884–96.
- Duden R, Griffiths G, Frank R, Argos P, Kreis TE. 1991. "Beta-COP, a 110 Kd Protein Associated with Non-Clathrin-Coated Vesicles and the Golgi Complex, Shows Homology to Beta-Adaptin." *Cell* 64(3): 649–65.
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. 2003. "Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Nature* 423(6937): 293–98.
- Escobar-Gómez F, Jódar E, Hawkins F. 2009. "Receptor Wnt: Fisiología, Fisiopatología Y Potenciales Nuevas Dianas Terapéuticas." *Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas* 18(2): 39–44.
- Falls HF, Schull WJ. 1960. "Hallermann-Streiff syndrome: A dysceph- aly with congenital cataracts and hypotrichosis". *Archives of Ophthalmology* 63:409-420.
- Fitzgerald TW, Gerety SS, Jones WD, Van-Kogelenberg M, King DA, McRae J, et al. 2014. "Large-Scale Discovery of Novel Genetic Causes of Developmental Disorders." *Nature* 519(7542): 223–28.
- François J. 1982. "François dyscephalic syndrome". *Birth Defects* 18(6): 595-619.
- François MJ. 1958. "A new syndrome: Dyscephalia with bird face and tissue dental anomalies, nanism, hypotrichosis, cutaneous atrophy, microphthalmia and congenital cataract". *Archives of Ophthalmology* 60: 842-862.
- Geisler SB, Robinson D, Hauringa M, Raeker MO, Borisov AB, Westfall MV, et al. 2007. "Obscurin-like 1, OBSL1, Is a Novel Cytoskeletal Protein Related to Obscurin." *Genomics* 89(4): 521–31.
- Gordon CT, Weaver KN, Zechi-Ceide RM, Madsen EC, Tavares ALP, Oufadem M, et al. 2015. "Mutations in the Endothelin Receptor Type a Cause Mandibulofacial Dysostosis with Alopecia." *American Journal of Human Genetics* 96(4): 519–531.
- Guyard M, Perdriel G, Ceruti F. 1962. "Sur deux cas de syndrome dyscephalique a tete d'oiseau". *Bulletin Des Societes D'Ophthalmologie De France* 62: 443-447.
- Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, et al. 2006. "Mice Deficient in the Rab5 Guanine Nucleotide Exchange Factor ALS2/alsin Exhibit Age-Dependent Neurological Deficits and Altered Endosome Trafficking." *Human Molecular Genetics* 15(2): 233–50.
- Hall BD, Berg BD, Rudolph RS, Epstein CJ. 1974. "Pseudoprogerid Hallermann-Streiff (PHS) syndrome". *Birth Defects* 10(7): 137.

- Hallermann W. 1948. "Vogelgesicht und Cataracta congenita". *Klin Monatsbl Augenheilkd* 113: 315-318.
- Hanson D, Murray PG, Sud A, Temtamy SA, Aglan M, Superti-Furga A, et al. 2009. "The Primordial Growth Disorder 3-M Syndrome Connects Ubiquitination to the Cytoskeletal Adaptor OBSL1." *The American Journal of Human Genetics* 84(6): 801–6.
- Hata A, Seoane J, Lagna G, Montalvo E, Hemmati-Brivanlou A, Massague J. 2000. "OAZ Uses Distinct DNA- and Protein-Binding Zinc Fingers in Separate BMP-Smad and Olf Signaling Pathways." *Cell* 100(2): 229–40.
- Higurashi M, Oda M, Iijima K, Iijima S, Takeshita T, Watanabe N, et al. 1990. "Livebirth Prevalence and Follow-up of Malformation Syndromes in 27,472 Newborns." *Brain & development* 12(6): 770–73.
- Horn D, Chyrek M, Kleier S, Lüttgen S, Bolz H, Hinkel G-K, et al. 2005. "Novel Mutations in BCOR in Three Patients with Oculo-Facio-Cardio-Dental Syndrome, but None in Lenz Microphthalmia Syndrome." *European Journal of Human Genetics* 13(5): 563–69.
- Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ. 2000. "BCoR, a Novel Corepressor Involved in BCL-6 Repression." *Genes & development* 14(14): 1810–23.
- Iqbal Z, Willemsen MH, Papon M-A, Musante L, Benevento M, Hu H, et al. 2015. "Homozygous SLC6A17 Mutations Cause Autosomal-Recessive Intellectual Disability with Progressive Tremor, Speech Impairment, and Behavioral Problems." *The American Journal of Human Genetics* 96(3): 386–96.
- Katoh Y, Katoh M. 2006. "Comparative Integromics on FAT1, FAT2, FAT3 and FAT4." *International Journal of Molecular Medicine* 18(3): 523–28.
- Kirzioğlu Z, Ceyhan D. 2009. "Hallermann-Streiff Syndrome: A Case Report from Turkey." *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal* 14(5): E236-238.
- Koliopoulos J, Palimeris G. 1975. "Atypical Hallermann-Streiff- Franqois syndrome in three successive generations". *Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus* (12):235-239.
- Kortüm F, Chyrek M, Fuchs S, Albrecht B, Gillessen-Kaesbach G, Mütze U, et al. 2011. "Hallermann-Streiff Syndrome: No Evidence for a Link to Laminopathies." *Molecular Syndromology* (2): 27–34.
- Kuo YM, Gitschier J, Packman S. 1997. "Developmental Expression of the Mouse Mottled and Toxic Milk Genes Suggests Distinct Functions for the Menkes and Wilson Disease Copper Transporters." *Human Molecular Genetics* 6(7): 1043–49.

- Lander ES, Botstein D. 1986. "Strategies for Studying Heterogeneous Genetic Traits in Humans by Using a Linkage Map of Restriction Fragment Length Polymorphisms." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83(19): 7353–57.
- Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J. 1984. "Strategies for Multilocus Linkage Analysis in Humans." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(11): 3443–46.
- Lazarus S, Zankl A, Duncan EL. 2014. "Next-Generation Sequencing: A Frameshift in Skeletal Dysplasia Gene Discovery." *Osteoporosis International* 25(2): 407–22.
- Le Pabic P, Ng C, Schilling TF. 2014. "Fat-Dachsous Signaling Coordinates Cartilage Differentiation and Polarity during Craniofacial Development." *PLoS Genetics* 10(10).
- Lee JE, Wang C, Xu S, Cho YW, Wang L, Feng X, et al. 2013. "H3K4 Mono- and Di-Methyltransferase MLL4 Is Required for Enhancer Activation during Cell Differentiation." *eLife* 2: e01503.
- Lindhurst MJ, Sapp JC, Teer JK, Johnston JJ, Finn EM, Peters K, et al. 2011. "A Mosaic Activating Mutation in AKT1 Associated with the Proteus Syndrome." *The New England Journal of Medicine* 365: 611–19.
- Lo JCY, Jamsai D, O'Connor AE, Borg C, Clark BJ, Whisstock JC, et al. 2012. "RAB-Like 2 Has an Essential Role in Male Fertility, Sperm Intra-Flagellar Transport, and Tail Assembly" ed. Susan K. Dutcher. *PLoS Genetics* 8(10): e1002969.
- Mardis ER. 2008. "Next-Generation DNA Sequencing Methods." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9(1): 387–402.
- Marian AJ. 2012. "Molecular Genetic Studies of Complex Phenotypes." *Translational Research* 159(2): 64–79.
- Martinez ME, O'Brien TG, Fultz KE, Babbar N, Yerushalmi H, Qu N, et al. 2003. "Pronounced Reduction in Adenoma Recurrence Associated with Aspirin Use and a Polymorphism in the Ornithine Decarboxylase Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(13): 7859–64.
- Michot C, Le Goff C, Goldenberg A, Abhyankar A, Klein C, Kinning E, et al. 2012. "Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations as Another Cause of Acrodysostosis." *The American Journal of Human Genetics* 90(4): 740–45.

- Muthugaduru DJ, Sahu C, Ali MJ, Dalal A, Jalali S. 2013. "Report on Ocular Biometry of Microphthalmos, Retinal Dystrophy, Flash Electroretinography, Ocular Coherence Tomography, Genetic Analysis and the Surgical Challenge of Entropion Correction in a Rare Case of Hallermann-Streiff-Francois Syndrome." *Documenta Ophthalmologica*: 127(2): 147-153.
- Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, et al. 2010. "Exome Sequencing Identifies MLL2 Mutations as a Cause of Kabuki Syndrome." *Nature Genetics* 42(9): 790–93.
- Ng SB, Buckingham KJ, Lee C, Bigham AW, Tabor HK, Dent KM, et al. 2010. "Exome Sequencing Identifies the Cause of a Mendelian Disorder." *Nature Genetics* 42(1): 30–35.
- Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, et al. 2002. "Mandibuloacral Dysplasia Is Caused by a Mutation in LMNA-Encoding Lamin A/C." *American Journal of Human Genetics* 71(2): 426–31.
- Numabe H, Sawai H, Yamagata Z, Muto K, Kosaki R, Yuki K, et al. 2011. "Reproductive Success in Patients with Hallermann-Streiff Syndrome." *American Journal of Medical Genetics, Part A* 155(9): 2311–13.
- Pasyanthi B, Mendonca T, Sachdeva V, Kekunnaya R. 2016. "Ophthalmologic Manifestations of Hallermann–Streiff–Francois Syndrome: Report of Four Cases." *Eye* 30(9): 1268–71.
- Pizzuti A, Flex E, Mingarelli R, Salpietro C, Zelante L, Dallapiccola B. 2004. "A Homozygous GJA1 Gene Mutation Causes a Hallermann-Streiff/ODDD Spectrum Phenotype." *Human Mutation* 23(3): 286
- Ponte F. 1962. "Further contributions to the study of the syndrome of Hallermann and Streiff". *Ophthalmologica* (143):399-408.
- Porath B, Gainullin VG, Cornec-Le Gall E, Dillinger EK, Heyer CM, Hopp K, et al. 2016. "Mutations in GANAB , Encoding the Glucosidase II α Subunit, Cause Autosomal-Dominant Polycystic Kidney and Liver Disease." *The American Journal of Human Genetics* 98(6): 1193–1207.
- Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. 2012. "Next-Generation Sequencing: Impact of Exome Sequencing in Characterizing Mendelian Disorders." *Journal of Human Genetics* 57(10): 621–32.
- Rauch F, Fahiminiya S, Majewski J, Carrot-Zhang J, Boudko S, Glorieux F, et al. 2015. "Cole-Carpenter Syndrome Is Caused by a Heterozygous Missense Mutation in P4HB." *The American Journal of Human Genetics* 96(3): 425–31.

- Reeves WH, Stoeber ZM. 1989. "Molecular Cloning of cDNA Encoding the p70 (Ku) Lupus Autoantigen." *The Journal of biological chemistry* 264(9): 5047–52.
- Roberts C, Daw SC, Halford S, Scambler PJ. 1997. "Cloning and Developmental Expression Analysis of Chick Hira (Chira), a Candidate Gene for DiGeorge Syndrome." *Human molecular genetics* 6(2): 237–45.
- Schmidt HH, Dyomin VG, Palanisamy N, Itoyama T, Nanjangud G, Pirc-Danoewinata H, et al. 2004. "Deregulation of the Carbohydrate (Chondroitin 4) Sulfotransferase 11 (CHST11) Gene in a B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia with a t(12;14)(q23;q32)." *Oncogene* 23(41): 6991–96.
- Schondel A. 1943. "Two cases of progeria complicated by microphthalmus". *Acta Paediatrica* 30(3): 286-304.
- Sclaroff A, Eppley BL. 1987. "Evaluation and surgical correction of the facial skeletal deformity in Hallermann-Streiff syndrome". *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 16(6): 738-744.
- Singh AL, Chandak M, Jain D, Mogre R, Adarsh C, Singh L. 2015. "Hallermann–Streiff Syndrome with Cutaneous Manifestations." *International Journal of Dermatology* 54(9): 1068–70.
- Smedley D, Jacobsen JOB, Jäger M, Köhler S, Holtgrewe M, Schubach M, et al. 2015. "Next-Generation Diagnostics and Disease-Gene Discovery with the Exomiser." *Nature Protocols* 10(12): 2004–15.
- Smedley D, Robinson PN. 2015. "Phenotype-Driven Strategies for Exome Prioritization of Human Mendelian Disease Genes." *Genome Medicine* 7(1): 1–11.
- Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. 1989. "A New Cluster of Genes within the Human Major Histocompatibility Complex." *Science* 243(4888): 214–17.
- Steele RW, Bass JW. 1970. "Hallermann-Streiff syndrome: Clinical and prognostic considerations". *American Journal of Diseases of Children* 120(5): 462-465.
- Streiff EB. 1950. "Dysmorphie mandibulo-faciale (tete d'oiseau) et alteration oculaires". *Ophthalmologica* 120:79-83.
- Su, Zhenqiang et al. 2011. "Next-Generation Sequencing and Its Applications in Molecular Diagnostics." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 11(3): 333–43.
- Suzuki Y, Fuji T, Fukuyama Y. 1970. "Hallermann-Streiff syndrome". *Developmental Medicine and Child Neurology* 12(4): 496-506.
- Teare MD. 2011. "Approaches to Genetic Linkage Analysis." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 713: 55–67.

- Tonami, K. et al. 2011. "Calpain-6, a Microtubule-Stabilizing Protein, Regulates Rac1 Activity and Cell Motility through Interaction with GEF-H1." *Journal of Cell Science* 124(Pt 8): 1214–23.
- Van-Balen ATM. 1961. "Dyscephaly with microphthalmos, cataract and hypoplasia of the mandible". *Ophthalmologica* 141: 53-63.
- Weaver KN, Watt KEN, Hufnagel RB, Navajas Acedo J, Linscott LL, Sund KL, et al. 2015. "Acrofacial Dysostosis, Cincinnati Type, a Mandibulofacial Dysostosis Syndrome with Limb Anomalies, Is Caused by POLR1A Dysfunction." *American Journal of Human Genetics* (96): 765–74.
- White J, Mazzeu JF, Hoischen A, Jhangiani SN, Gambin T, Alcino MC, et al. 2015. "DVL1 Frameshift Mutations Clustering in the Penultimate Exon Cause Autosomal-Dominant Robinow Syndrome." *American Journal of Human Genetics* 96(4): 612–22.
- Wright TJ, Costa JL, Naranjo C, Francis-West P, Altherr MR. 1999. "Comparative Analysis of a Novel Gene from the Wolf–Hirschhorn/Pitt–Rogers–Danks Syndrome Critical Region." *Genomics* 59(2): 203–12.
- Zech M, Lam DD, Francescatto L, Schormair B, Salminen AV, Jochim A, et al. 2015. "Recessive Mutations in the $\alpha 3$ (VI) Collagen Gene COL6A3 Cause Early-Onset Isolated Dystonia." *The American Journal of Human Genetics* 96(6): 883–93.
- Zozulya S, Echeverri E, Nguyen T. 2001. "The Human Olfactory Receptor Repertoire." *Genome Biology* 2(6): 1–12.

Búsquedas en línea

BaseSpace: <https://basespace.illumina.com/>

dbSNP: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

ExAC: <http://exac.broadinstitute.org/a>

Exomiser: <https://github.com/>

HPO: <http://compbio.charite.de/hpweb/showterm?id=HP:0000118>

OMIM: <http://www.omim.org/>

STRING: <https://string-db.org/>

16. Anexos

Anexo 1. Carta de consentimiento informado



Carta de consentimiento informado

Proyecto de investigación:

Descubrimiento, por Secuenciación de Segunda Generación, de Variantes Asociadas a Displasias Esqueléticas de Causa Genética Desconocida.

Estimada madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba. Usted debe saber que la participación en esta investigación es totalmente voluntaria, de manera que usted puede decidir no participar en el estudio y en este caso no perderá ninguna prestación a la que tiene derecho.

Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación busca determinar la causa genética de la enfermedad que tiene su hijo(a). Esta información contribuirá a comprender el origen de la enfermedad. En algunos casos se estudiarán todos los genes, y en otros todo el material genético, con objeto de hallar la alteración genética.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio requerimos una muestra de sangre mediante el siguiente procedimiento:

- Bajo condiciones higiénicas óptimas se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena, preferentemente en el antebrazo.
- Para toma de muestra sanguínea se tomarán 1-3 ml de sangre, aproximadamente.
- La muestra será almacenada a -20°C hasta el momento de extraer el material genético.

RIESGOS Y MOLESTIAS

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son: molestia leve en el sitio donde se toma la muestra, formación de moretones, hemorragia o infección.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimientos sobre la enfermedad y el funcionamiento de los genes, que podría ayudar a otras familias que presenten problemas similares en un futuro.

HALLAZGOS NO PREVISTOS

El propósito de este estudio es buscar genes, y variantes de los mismos, que pudieran estar asociados con enfermedades óseas. El procedimiento que se sigue involucra la revisión de todos los



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Computador: 5228-9917 ext. 4409
www.himfg.edu.mx



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
LABORATORIO DE GENÓMICA,
GENÉTICA Y BIOINFORMÁTICA



genes, en busca de aquéllos que pudieran tener alguna variación asociada con la enfermedad. Sin embargo, al revisar todos los genes, es posible que se descubran algunos que contengan variantes que estén asociadas con otras enfermedades. A estos hallazgos no buscados, que no tienen que ver con el padecimiento que se estudia, se les llama hallazgos secundarios, inesperados, imprevistos o incidentales. Si así lo desea, puede recibir información sobre estos hallazgos, de acuerdo con la legislación vigente y con las normas internacionales aceptadas en este contexto.

COSTOS

Las pruebas realizadas en la muestra sanguínea, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico en relación al estudio de investigación, no tendrán ningún costo. Los gastos adicionales generados por esta investigación serán absorbidos por la Institución.

MANEJO Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

La muestra será resguardada en congeladores o refrigeradores bajo llave, en el Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática; y la persona responsable del manejo de la muestra será el Dr. Jesús Aguirre Hernández, titular de este proyecto y jefe del laboratorio mencionado.

DUDAS Y ACLARACIONES

Usted podrá recibir respuesta a sus preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del paciente. Si este fuera el caso, deberá comunicarse con los médicos responsables de la investigación: Dr. Jesús Aguirre Hernández al Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática 52 28 99 17 ext. 4409 y/o a la Dirección de Investigación del HIMFG, ext. 2361.

Usted tiene la libertad de retirar este consentimiento en cualquier momento, y dejar de participar en este estudio sin que esto afecte los cuidados y el tratamiento que la Institución otorga. En caso de que usted se retire del estudio, la muestra será destruida, lo mismo que los datos que se hubieran generado a partir de la misma.

La muestra de sangre, y el material que se obtenga de la misma, no serán utilizados para ningún otro estudio, ni con ningún fin distinto del expresado en esta carta.

La identidad de los participantes será confidencial, y la información relacionada será manejada de acuerdo con las políticas de privacidad vigentes.



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Commutador: 5228-9917 ext. 4409
www.himfg.edu.mx



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
LABORATORIO DE GENÓMICA,
GENÉTICA Y BIOINFORMÁTICA



Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarlo si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas.

La información fue explicada por: _____

Señale las respuestas en el siguiente cuadro.

1	He leído, o se me ha explicado, la naturaleza del estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlo y de hacer preguntas.	SI	
2	Otorgo mi consentimiento para la participación de mi hijo(a) en el estudio.	SI	
3	Deseo que se me informe sobre los resultados incidentales.	SI	NO

Ciudad de México a _____ de _____ de _____

Nombre del paciente _____

Nombre y firma de la Madre:

Nombre y firma del Padre:

Nombre y firma de testigo 1:

Parentesco con el paciente: _____

Nombre y firma de testigo 2:

Parentesco con el paciente: _____



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Comutador: 5228-9917 ext. 4409
www.himfg.edu.mx

Anexo 2. Carta de asentimiento informado



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

LABORATORIO DE GENÓMICA,
GENÉTICA Y BIOINFORMÁTICA



Carta de asentimiento informado

Estimado paciente:

Te invitamos a participar en el proyecto de investigación:

Descubrimiento, por Secuenciación de Segunda Generación, de Variantes Asociadas a Displasias Esqueléticas de Causa Genética Desconocida.

Debes saber que la participación en esta investigación es totalmente voluntaria, de manera que puedes decidir no participar en el estudio y en este caso no perderás ninguna prestación a la que tienes derecho. De igual manera, si más adelante decides retirarte del estudio, seguirás recibiendo de la Institución la atención a la que tienes derecho, y la muestra que hayas proporcionado será destruida, lo mismo que los datos que se hubieran obtenido de la misma. Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial, eso significa que nadie se enterará de ti ni del motivo por el que tú vienes a consulta, ni del tratamiento que se te brindará en HIMFG. Todo lo anterior es con fines de investigación.

La presente investigación quiere buscar errores en la información hereditaria que pueda explicar la enfermedad que presentas. Esta información nos ayudará a entender mejor las funciones del cuerpo humano y cómo aparecen algunas enfermedades. La muestra de sangre que proporciones, así como el material que se obtenga de ella, no será utilizada para ningún otro fin. La muestra será resguardada bajo llave en el Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática, bajo la responsabilidad del Dr. Jesús Aguirre Hernández, quien es el titular de este proyecto, y jefe del laboratorio mencionado.

El procedimiento para buscar alteraciones genéticas responsables de la enfermedad que tienes consiste en revisar todos los genes. En este proceso, es posible que se encuentren alteraciones en genes que no tienen relación con ese padecimiento, pero sí con otros distintos. Estos son los llamados hallazgos incidentales o no previstos y puedes optar porque se te informe de los mismos, de acuerdo con los lineamientos que rigen estos estudios y conforme a las normas internacionalmente aceptadas.

Para este estudio necesitamos tomarte una muestra de sangre. Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio donde se toma la muestra, formación de moretones, sangrado, infección.

Este estudio nos ayudará a tener más información sobre la enfermedad y en el futuro podría ayudar a otras personas que pudieran tener lo mismo que tú.

Las pruebas realizadas y cualquier consulta que tengas con el médico en relación al estudio de investigación no tendrán ningún costo. Tienes la garantía de recibir respuesta a tus preguntas acerca de cualquier asunto relacionado con la investigación. Si este fuera el caso, deberás



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Conmutador: 5228-9917 ext. 4409
www.himfg.edu.mx



HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
LABORATORIO DE GENÓMICA,
GENÉTICA Y BIOINFORMÁTICA



comunicarte con los médicos responsables de la investigación los médicos responsables de la investigación: Dr. Jesús Aguirre Hernández al Laboratorio de Genómica, Genética y Bioinformática 52 28 99 17 ext. 4409 y/o a la Dirección de Investigación del HIMFG, ext. 2361.

Por este medio otorgo mi asentimiento para participar en el estudio.

La información fue explicada por: _____

Señale las respuestas en el siguiente cuadro.

1	He leído, o se me ha explicado, la naturaleza del estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlo y de hacer preguntas.	SI	
2	Otorgo mi asentimiento para la participación en el estudio.	SI	
3	Deseo que se me informe sobre los resultados incidentales.	SI	NO

Ciudad de México a _____ de _____ de _____

Nombre y firma del participante en el estudio

Nombre y firma de la Madre


Nombre y firma del Padre



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD AFILIADO A LA UNAM

Dr. Márquez 162, Col. Doctores. Del. Cuauhtémoc, C.P. 06720 México D.F.
Comutador: 5228-9917 ext. 4409
www.himfg.edu.mx

Anexo 3. Carta consentimiento informado para toma de fotografías clínicas



HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO
FEDERICO GOMEZ
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
DR. MÁRQUEZ NO. 162 COL. DOCTORES,
DELEGACIÓN GUAUHTÉMOC, C.P. 06720 MÉXICO, D.F.
INSTITUCIÓN DE SERVICIO MÉDICO, ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
AFILIADO A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

5228-9917

México, D.F. a ____ de ____ de 20__

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente deseo manifestar que estoy de acuerdo con la invitación que me ha/han hecho el Doctor/Doctores _____ del Departamento de Genética de Hospital Infantil de México Federico Gómez para que sean publicadas y/o presentadas en congresos científicos nacionales e internacionales las características clínicas de mi caso y/o el de mi hijo, en forma escrita o en fotografías.

Se me ha explicado que ello obedece al interés científico de compartir conocimiento con la comunidad médica y científica internacional que pudiese en un futuro redundar en un mejor conocimiento y entendimiento de la enfermedad de que se trate además del que actualmente se tiene. Se me ha explicado que de realizarse dicha publicación o presentación en congreso, esta será un medio científico, reconocido nacional e internacionalmente, que se tomarán todas las medidas necesarias para preservar la confidencialidad del caso y todo aquello que pudiese permitir la identificación de la persona de quien se trate, incluyendo la modificación de las fotografías clínicas para preservar el anonimato.

Por lo anterior establezco aquí que he tomado esta decisión libremente y que se me ha explicado que no es obligatorio el participar y que no percibiré por ello ningún beneficio en especie o económico de ninguna naturaleza y de la misma manera que de negarme a participar ello no influiría en el trato y prestaciones que recibo por parte del Hospital Infantil de México Federico Gómez, obedeciendo a los derechos que como paciente tengo y al respeto a mi toma de decisiones y de mi dignidad.

Por lo anterior firmo este documento de conformidad y recibo una copia del documento.

Nombre y firma _____

Paciente/tutor
Parentesco con el paciente _____

Testigo 1 _____ Testigo 2 _____

Anexo 4. Técnicas experimentales

Técnica de extracción de DNA

Realizamos la extracción de 9 muestras de DNA correspondientes a los 9 individuos con el siguiente procedimiento:

- Se utilizó el kit de extracción Quick-DNA[®] Universal Kit (Zymo Research, Irvine). Se resuspendió 200 µl de cada muestra de sangre en 200 µl de solución de lisis.
- Se mezclaron 20 µl de proteinasa K y se incubó a 55 °C por 10 minutos.
- Posteriormente se agregaron 420 µl de amortiguador de unión de DNA genómico y se transfirió toda la solución a la columna de purificación con un tubo de recolección. Se centrifugó un minuto a 12 000 x g. Se desechó lo obtenido en el tubo de recolección.
- Se agregaron 400 µl de amortiguador de pre-lavado de DNA a la columna y se centrifugó a 12,000 g por un minuto. Al finalizar se desechó el contenido del tubo colector.
- Se añadieron 700 µl de amortiguador de lavado de DNA genómico a la columna y se centrifugó un minuto a 12,000 x g, nuevamente se desechó el contenido del tubo colector. Se agregaron 200 µl de amortiguador de lavado de DNA genómico a la columna, se centrifugó un minuto a 12,000 g y se desechó el tubo de colección.
- Se transfirió la columna a un tubo para microcentrifuga limpio y se agregaron 50 µl de buffer de elución de DNA a la columna, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12 000 x g por un minuto para eluir el DNA.
- Realizamos un control de calidad de la extracción del DNA con un gel de agarosa al 1% en el que se colocaron 4µL DNA de cada individuo participante.

Técnica de cuantificación del DNA

- La cuantificación se realizó con el equipo fluorimétrico Qubit v 3.0.
- Se preparó solución de trabajo diluyendo 1:200 intercalante de DNA con amortiguador.
- Para cuantificar el DNA se utilizaron 2 µl de DNA y se agregaron 198 µl de solución de trabajo.
- Para los estándares de concentración se mezclaron 10 µl de estándar en 190 µl de amortiguador.
- La solución se leyó en el Qubit.

Técnica de Tagmentación del DNA genómico

Durante la tagmentación se cortó el DNA con una transposasa que, además de cortar, agregó adaptadores a los extremos de cada segmento. Se diluyó el DNA en 10 μL de Tris-HCl 10 mM pH 8.5, obteniéndose una concentración de 5 ng/ μL . En seguida, se agregaron, en el orden en que se anotan, 10 μL de DNA, 25 μL de buffer de tagmentación y 15 μL de enzima de tagmentación. Se agitó con vortex por 1 minuto y se centrifugó durante 1 minuto a 280 x g. Se incubó 10 minutos a 58 °C y posteriormente se añadieron 15 μL de buffer de paro de la tagmentación; se agitó con vortex y se centrifugó 1 minuto a 280 x g, para después incubar a temperatura ambiente durante 4 minutos.

Limpieza del DNA tagmentado

Se añadieron 65 μL de perlas magnéticas de purificación a cada muestra; se agitó vigorosamente durante un minuto, y se incubó 8 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 280 x g por un minuto y se colocó sobre una gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente (5 minutos). Después se removió y se desechó todo el sobrenadante. La pastilla se lavó 2 veces con 200 μL de etanol fresco al 80%; se incubó sobre la gradilla magnética durante 30 segundos y después se descartó el sobrenadante. Usando una pipeta de 20 μL se removieron los remanentes de etanol al 80%. La muestra se dejó secar al aire por 10 minutos sobre la gradilla magnética. Al término de la incubación se removió la placa de la gradilla magnética y se añadieron 22.5 μL de buffer de resuspensión (RSB); se agitó un minuto y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugó a 280 x g por 1 minuto y se colocó la placa sobre la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente (2-5 minutos). Se transfirieron 20 μL de sobrenadante a un pozo limpio de la placa para PCR.

Amplificación del producto de la tagmentación

Se agregaron 5 μL del índice i7a, y la misma cantidad del índice i5. Las tapas de los tubos con los índices fueron reemplazadas por tapas nuevas. Se añadieron 20 μL de mezcla de amplificación de librería, se agitó por 1 minuto y se centrifugó a 100 x g por 10 segundos. La mezcla se colocó en un termociclador con el siguiente programa: 72 °C por 3 minutos, 98 °C, durante 30 segundos, y 10 ciclos de 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 30 segundos, para finalizar con un ciclo de 72 °C por 5 minutos. Después se dejó incubar a 10 °C hasta el siguiente paso.

Limpieza del DNA amplificado

Se centrifugó la muestra a 280 x g durante 1 minuto, se transfirieron 50 µL de sobrenadante a una placa para PCR limpia y se agregaron 90 µL de perlas magnéticas de purificación. Se agitó vigorosamente por 1 minuto, y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos; se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Posteriormente se colocó la placa en la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente (2-5 minutos), y se procedió a desechar todo el sobrenadante. La muestra se lavó 2 veces con 200 µL de etanol fresco al 80%, se incubó 30 segundos sobre la gradilla magnética y se desechó el sobrenadante. Se removieron los residuos de etanol con una micropipeta de 20 µL y se dejó secar al aire por 10 minutos. Se agregaron 27 µL de RSB, se agitó durante un minuto, se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos y se centrifugó a 100 x g por 10 segundos. Se transfirió la placa a la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente y se transfirieron 25 µL del sobrenadante a un tubo Eppendorff de 0.5 mL.

Hibridación con las sondas de captura

Se cuantificó la muestra y se mezclaron , en un solo tubo, 500 ng de cada muestra, 50 µL de buffer de enriquecimiento de hibridación, y 10 µL de oligos para exoma (CEX). Se agitó por 1 minuto, se centrifugó a 280 x g durante 1 minuto y se colocó el tubo en el termociclador para correr el programa NRC HYB (95 °C 10 minutos, 18 ciclos de 1 minuto cada uno, iniciando a 94 °C y bajando la temperatura 2 °C por ciclo. Al final se dejó incubando a 58 °C durante 2 horas).

Captura de las sondas hibridadas

Se centrifugó a 280 x g durante 1 minuto, se transfirió todo el volumen de reacción (100 µL) a un pozo de la placa para PCR. Se agregaron 250 µL de perlas magnéticas con estreptavidina, se agitó vigorosamente por 5 minutos, se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos, y se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Se colocó la placa en la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente, y se desechó todo el sobrenadante. Se retiró la placa de la gradilla magnética y se realizó el primer lavado. Se añadieron 200 µL de solución de lavado de enriquecimiento. Se agitó por 4 minutos y se resuspendió con micropipeta. Se colocó la placa en el sistema de incubación (SciGen), con una placa Midi (Illumina), precalentado a 50 °C, y se incubó durante 30 minutos. Inmediatamente después de finalizar el tiempo de incubación, se transfirió la placa a la gradilla magnética y se esperó a que el líquido estuviera transparente; se removió y se desechó todo el sobrenadante. Se retiró la placa de la gradilla y se repitió este lavado una segunda vez.

Para la primera elución se mezclaron, en un tubo para microcentrífuga, 28.5 μL de buffer de elución y 1.5 μL de NaOH 2N. Se añadieron 23 μL de la mezcla de elución, se agitó por 2 minutos, se incubó a temperatura ambiente 2 minutos, se centrifugó a 280 g por 1 minuto. Se transfirió la placa a la gradilla magnética hasta ver el líquido transparente y se transfirieron 21 μL del sobrenadante a otro pozo limpio de la placa. Después se añadieron 4 μL del buffer de elución 2, se agitó por 1 minuto y se centrifugó a 100 x g por 10 segundos.

Segunda hibridación

Se agregaron, en un tubo para PCR, 15 μL de RSB (buffer de resuspensión), 50 μL EHB (buffer de enriquecimiento de hibridación) y 10 μL de CEX. Se agitó vigorosamente por 1 minuto, se centrifugó a 100 x g por 10 segundos y se colocó el tubo en un termociclador, incubando a 95°C durante 10 minutos, seguido de 18 ciclos de 1 minuto cada uno, iniciando a 94°C y bajando la temperatura 2°C por ciclo. Al finalizar se dejó incubando la reacción a 58°C por 19 horas.

Segunda captura

Se centrifugó a 280 x g durante un minuto, se transfirió todo el volumen (100 μL) al pozo correspondiente de la placa para PCR. Se agregaron 250 μL de perlas magnéticas con estreptavidina, se agitó vigorosamente por 5 minutos, se incubó a temperatura ambiente por 25 minutos y se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Se colocó la placa en la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente, y se desechó todo el sobrenadante. Se retiró la placa de la gradilla magnética. Se añadieron 200 μL de solución de lavado de enriquecimiento. Se agitó por 4 minutos y se resuspendió con micropipeta. Se colocó la placa en el sistema de incubación (SciGene), con un adaptador Midi (Illumina), previamente calentado a 50°C, y se incubó durante 30 minutos. Finalizado el tiempo, se transfirió la placa a la gradilla magnética y se esperó a que el líquido estuviera transparente; se removió y se desechó todo el sobrenadante. Se retiró la placa de la gradilla y se repitió este lavado una segunda ocasión. Para la elución se mezclaron, en un tubo para microcentrífuga, 28.5 μL de buffer de elución y 1.5 μL de NaOH 2N, agitándose con vortex. Después se añadieron 23 μL de mezcla de preelución, se agitó por 2 minutos y se incubó a temperatura ambiente 2 minutos. Se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Se colocó en la gradilla magnética hasta que el líquido quedó transparente y se transfirieron 21 μL del sobrenadante a otro pozo limpio de la placa. Se añadieron 4 μL de buffer de elución 2, se agitó por 1 minuto y se centrifugó 100 x g por 10 segundos.

Lavado de los productos de la segunda captura (librería)

Se agregaron 45 μL de perlas magnéticas de purificación, se agitó por 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente 10 minutos. Se centrifugó a 100 x g por 10 segundos. Posteriormente se colocó la placa en la gradilla magnética hasta ver el líquido transparente y se descartó todo el sobrenadante. Se lavó 2 veces con 200 μL de etanol al 80% recién preparado, se incubó en la gradilla magnética 30 segundos y se removieron los residuos de etanol. Se dejó secar por 10 minutos. Se retiró de la gradilla magnética y se agregaron 27.5 μL de RSB; se agitó durante 1 minuto y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Se colocó en la gradilla magnética hasta ver el líquido transparente y se transfirieron 25 μL del sobrenadante a otro pozo limpio de la placa.

Amplificación de la librería enriquecida

Se agregaron 5 μL de mezcla de iniciadores para PCR y 20 μL de mezcla de enriquecimiento de amplificación; se agitó la mezcla durante un minuto. Se centrifugó a 100 x g por 10 segundos. Se llevó el tubo con la mezcla a un termociclador con un programa consistente en incubación a 98°C durante 30 segundos, seguida de 12 ciclos a 98°C 10 segundos, 60°C por 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos, para finalizar con una incubación a 72°C durante 5 minutos, seguida de otra a 10°C hasta sacar el tubo del termociclador.

Limpieza de la amplificación de la librería enriquecida

Se centrifugó a 100 x g por 10 segundos y se mezclaron los 50 μL de la librería enriquecida con 90 μL de perlas magnéticas de purificación (SPB); se agitaron por 1 minuto, para después incubar a temperatura ambiente por 10 minutos. Se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Posteriormente se colocó la placa en la gradilla magnética hasta ver el líquido transparente y se descartó todo el sobrenadante. Se lavó 2 veces agregando 200 μL de etanol al 80% recién preparado, dejando incubar sobre la gradilla magnética durante 30 segundos para después quitar los residuos de etanol, antes de dejar secar por 10 minutos. Se retiró la placa de la gradilla magnética y se agregaron 32 μL de RSB, se agitó durante un minuto y se incubó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó a 280 x g por 1 minuto. Se colocó sobre la gradilla magnética hasta ver el líquido transparente y se transfirieron 30 μL del sobrenadante a un pozo limpio de la placa.

Validación y cuantificación de la librería

Se llevó a cabo con un gel de agarosa al 4% para determinar la distribución de tamaños de los fragmentos de la librería. Ésta se cuantificó por triplicado utilizando el Qubit 3.0 anteriormente descrito. Después de la cuantificación, se diluyó a una concentración de 4 nM.

Preparación del cartucho de reactivos

El cartucho de reactivos se retiró del congelador (-20°C) y se transfirió a un refrigerador a 8°C durante la noche. Antes de utilizarlo se dejó a temperatura ambiente y, previo a su introducción en el secuenciador, se colocó la muestra en el pozo número 10. Se usó el secuenciador NextSeq 500 de Illumina (figura 1a), que utiliza un sistema de secuenciación por síntesis de puentes (figura 1b). La reacción se lleva a cabo en la superficie de la celda de flujo. Cada terminador contiene una marca fluorescente que es detectada por alguna de las 6 cámaras del secuenciador.