



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

***“Determinación de variantes genéticas en el gen
Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte
epidemiológico de microcefalia”***

T E S I S

Que para obtener el título de:
Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

Jiménez Gil Karina

Asesor:

Dra. Monroy Muñoz Irma Eloísa

Asesora Interna:

Dra. Domínguez Rojas Maritere

Ó ÿ æ ç ð } Á & ã Æ Ò ã [Ê ã ^ Á .. ç ã
2020



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.

*Este trabajo se realizó en el Departamento de Genética y Genómica Humana,
del Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes (INPer)
bajo la tutoría de la Dra. Irma Eloísa Monroy Muñoz.*



“En algún lugar, algo increíble está esperando a ser descubierto”.

- Carl Sagan -



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de variantes genéticas en el gen Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia

Que presenta la pasante: **Karina Jiménez Gil**
Con número de cuenta: **312240709** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de variantes genéticas en el gen Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia

Que presenta la pasante: **Karina Jiménez Gil**

Con número de cuenta: **312240709** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	
VOCAL	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Maritere Domínguez Rojas</u>	
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</u>	
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de variantes genéticas en el gen Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia

Que presenta la pasante: **Karina Jiménez Gil**

Con número de cuenta: **312240709** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	_____
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

V



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Determinación de variantes genéticas en el gen Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia

Que presenta la pasante: **Karina Jiménez Gil**

Con número de cuenta: **312240709** para obtener el título de: **Licenciada en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	_____
VOCAL	Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles	_____
SECRETARIO	Dra. Maritere Domínguez Rojas	_____
1er. SUPLENTE	M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón	
2do. SUPLENTE	L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Determinación de variantes genéticas en el gen Sonic Hedgehog (SHH) en pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia

Que presenta la pasante: Karina Jiménez Gil

Con número de cuenta: 312240709 para obtener el título de: Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 02 de Septiembre de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez</u>	_____
VOCAL	<u>Q.F.B. Nydia Berenice González Angeles</u>	_____
SECRETARIO	<u>Dra. Maritère Domínguez Rojas</u>	_____
1er. SUPLENTE	<u>M. en C. María Llasbeth Hernández Calderón</u>	_____
2do. SUPLENTE	<u>L.B.D. Larisa Andrea González Salcedo</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por guiarme a lo largo de mi carrera y permitirme concluir con mi objetivo.

A mi asesora, la Dra Irma Eloísa Monroy Muñoz quien con sus conocimientos, apoyo y confianza me guió a través de cada una de las etapas de este proyecto. Muchas gracias por ser una excelente profesional y persona.

Al Dr Javier Durán por ayudarme y guiarme cuando necesitaba sus consejos.

También quiero agradecer a INPer por brindarme todos los recursos y herramientas que fueron necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación.

A la UNAM, a mi facultad y todos esos buenos profesores que ayudaron en mi formación académica.

Por último, quiero agradecer a mi familia por haber sido mi apoyo a lo largo de toda mi carrera universitaria y a lo largo de mi vida. En especial, quiero hacer mención de mis padres, que siempre estuvieron ahí para darme palabras de apoyo y brindarme todo lo necesario para lograr mis metas.

Muchas gracias a todos.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, que, con su esfuerzo y sacrificio, me han brindado en todo momento apoyo, confianza y comprensión.

ÍNDICE GENERAL

A. ABREVIATURAS.....	1
B. ÍNDICE DE FIGURAS	5
C. ÍNDICE DE TABLAS.....	7
D. RESUMEN.....	8
E. ABSTRACT.....	9
F. INTRODUCCIÓN.....	10
G. MARCO TEÓRICO	
1. Enfermedad Genética	
1.1 Definición de microcefalia.....	11
1.2 Síntomas.....	11
1.3 Diagnóstico.....	12
1.4 Clasificación.....	13
1.5 Etiología.....	13
1.5.1 Etiología infecciosa.....	15
1.5.2 Etiología genética.....	17
2. Gen Sonic Hedgehog	
2.1 Descripción de <i>SHH</i>	19
2.2 Proteína SHH.....	20
2.3 Familia Hedgehog.....	22
2.4 Síntesis, procesamiento y difusión de Hedgehog.....	23
2.5 Recepción y transducción de la señal.....	24
2.6 <i>SHH</i> en el desarrollo embrionario.....	26
H. JUSTIFICACIÓN.....	27
I. HIPÓTESIS.....	28
J. OBJETIVOS.....	29
K. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO.....	29
L. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30

M. RESULTADOS	49
N. DISCUSIÓN.....	60
O. CONCLUSIONES.....	69
P. PROSPECTIVAS.....	70
Q. REFERENCIAS.....	71

A. ABREVIATURAS

<i>ARX</i>	Gen homeobox relacionado aristaless
<i>ASNS</i>	Gen asparagina sintetasa (glutamina hidrolizante)
<i>ATRX</i>	Gen remodelador de la cromatina
Blast	Herramienta básica de búsqueda de alineación local
Blastn	Nucleótido estándar BLAST
CDC	Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (Siglas en inglés de Center for Disease Control and Prevention)
CEA	Cresta ectodérmica apical
CK1	Caseína-quinasa 1
CMV	Citomegalovirus
COPB 2	Complejo de proteínas Coatomer, subunidad Beta 2
dbSNP	Base de datos de Polimorfismos de un Solo Nucleótido (Siglas en inglés de Database of Single Nucleotide Polymorphism)
<i>DHH</i>	Desert hedgehog
Disp	Proteína Dispatched
DIP	Polimorfismo de eliminación / inserción
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Siglas en inglés de Deoxyribonucleic acid)
ESE	Potenciador de Empalme Exónico (Siglas en inglés de Exonic splicing enhancer)
ESS	Silenciador de Empalme Exónico (Siglas en inglés de Exonic splicing silencer)
FGF4	Factor de crecimiento de fibroblastos 4

Formin IV	Formina 1, isoforma 4
GC	Guanina-Citosina
GHR	Referencia de inicio de genética (Siglas en inglés de Genetics Home Reference)
<i>GLI (1,2 y 3)</i>	Oncogen asociado a glioma (proteína de dedo de zinc, homólogos 1, 2 y 3)
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G (Siglas en inglés de G protein-coupled receptor)
GSK-3b	Glucógeno sintasa quinasa beta 3
Hh	Hedgehog
HNS	Hipoacusia neurosensorial
HPE	Holoprosencefalia
HRM	Análisis de Desnaturalización de Alta Resolución (Siglas en inglés de High Resolution Melting)
<i>IHH</i>	Indian hedgehog
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma (Siglas en inglés de Internal Ribosome Entry Site)
ISE	Potenciador de Empalme Intrónico (Siglas en inglés de Intronic splicing enhancer)
ISS	Silenciador de Empalme Intrónico (Siglas en inglés de Intronic splicing silencer)
MC	Malformaciones congénitas
<i>MCPH1-2-3</i>	Microcefalia primaria autosómica recesiva (1-3)
MIHF	Variante de fusión interhemisférica media (Siglas en inglés de Medium interhemispheric fusión variant)
miRNA	micro RNA

MLPA	Amplificación de sondas múltiples dependiente de ligasa (Siglas en inglés de Multiplex ligation-dependent probe amplification)
mRNA	RNA mensajero
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Siglas en inglés de National Center for Biotechnology Information)
NDE1	Proteína de distribución nuclear Nude, homólogo 1
NGN2	Neurogenina 2
nsSNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido no sinónimos
OLIG2	Factor de transcripción de oligodendrocitos 2
OMIM	Herencia Mendeliana en el Hombre (Siglas en inglés de Online Mendelian Inheritance in Man)
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>PAX3</i>	Gen caja emparejada 3
<i>PAX7</i>	Gen caja emparejada 7
PC	Perímetro cefálico
<i>PCDH12</i>	Gen protocadherina 12
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa (Siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction)
PKA	Proteína quinasa A
PQBP1	Proteína de unión a poliglutamina 1
<i>PTCH1</i>	Gen homólogo parcheado de proteína 1
RBP	Proteínas de unión con RNA (Siglas en inglés de RNA-binding-proteins)
RE	Retículo endoplásmico
RM	Retardo mental
RNA	Ácido ribonucleico (Siglas en inglés de Ribonucleic acid)

RPM	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
<i>SHH</i>	Sonic hedgehog
Ski	Skinny Hedgehog
<i>SMO</i>	Gen Parcheado suavizado
SNP	Polimorfismo de un solo nucleótido (Siglas en inglés de Single Nucleotide Polymorphism)
SNV	Variante de un solo nucleótido (Siglas en inglés de Single Nucleotide Variant)
STR	Repeticiones cortas en tándem (Siglas en inglés de Short Tandem Repeat)
<i>SUFU</i>	Gen Supresor de homólogo fusionado de la señalización hedgehog
<i>TASP1</i>	Gen Treonina Aspartasa 1
TBE	Buffer de Tris, Borato y EDTA
TWHH	Proteína hedgehog Tiggy-winkle
uORF	Marco de lectura abierto río arriba (Siglas en inglés de upper Open Reading Frame)
3'-UTR	Región no traducida en el extremo 3' (Siglas en inglés de 3'-Untranslated Region)
5'-UTR	Región no traducida en el extremo 5' (Siglas en inglés de 5'-Untranslated Region)
VHS	Virus del Herpes Simple
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
ZIKV	Virus del Zika
ZPA	Zona de actividad polarizante

B. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bebé con cabeza de tamaño normal y un bebé con microcefalia, y microcefalia grave.....	11
Figura 2. Sistema ventricular en los tipos de Holoprosencefalia.....	18
Figura 3. Localización cromosómica de <i>SHH</i> en el cromosoma 7.....	20
Figura 4. Secuencia genómica de referencia de <i>SHH</i>	20
Figura 5. Modificación de las partes C- terminal y N- terminal de la proteína Sonic hedgehog.....	21
Figura 6. Familia de proteínas Hedgehog.....	22
Figura 7. Procesamiento de las proteínas SHH.....	24
Figura 8. Transducción de señales de <i>SHH</i> en vertebrados.....	25
Figura 9. Esquema de expresión (gradiente de concentración) de Shh en la ZPA.....	27
Figura 10. Programa de PCR punto final utilizado en la estandarización y amplificación de la región exónica de <i>SHH</i>	38
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TBE.....	39
Figura 12. Programa de amplificación y posterior desnaturalización para la técnica de HRM.....	41
Figura 13. Pico de desnaturalización de la técnica HRM para el exón 2	42
Figura 14. Curva diferencial de desnaturalización de la técnica HRM para el exón 2.....	43
Figura 15. Gráfico de temperaturas e incubación empleado para la purificación por ExoSAP-IT®.....	44
Figura 16. Esquema de amplificación empleado para la PCR de secuencia.....	45

Figura 17. Representación gráfica de la reacción de secuenciación y obtención de resultados (electroferograma).....	47
Figura 18. Electroferograma de la variante heterocigota hallada en el exón 1 del gen <i>SHH</i>	53
Figura 19. Alineamiento en BLASTn de la variante NG_007504.2:g.5027G>A	53
Figura 20. Electroferograma de la variante encontrada en el exón 1 del gen <i>SHH</i>	54
Figura 21. Electroferograma de la variante homocigota encontrada en el exón 2 del gen <i>SHH</i>	54
Figura 22. Alineamiento en BLASTn de la variante homocigota encontrada en el exón 2 del gen <i>SHH</i>	55
Figura 23. Predicción de PolyPhen para la variante NG_007504.2:g.5265 dup.....	56
Figura 24. Visualización en 3D de la proteína afectada en la predicción de PolyPhen de la variante NG_007504.2:g.5265 dup.....	56
Figura 25. Predicción de PolyPhen para la variante NG_007504.2:g.5174 T>C.....	57
Figura 26. Alteración en el splicing por La variante NG_007504.2:g.5119_5119dup.....	58
Figura 27. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante (VEP) de Ensembl pertenecientes al rs938130628.....	58
Figura 28. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante (VEP) de Ensembl pertenecientes al rs9333594.....	59
Figura 29. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante (VEP) de Ensembl pertenecientes al rs1233554.....	59

C. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medida de la circunferencia de la cabeza para niñas dependiendo la edad.....	12
Tabla 2. Medida de la circunferencia de la cabeza para niños dependiendo la edad.....	13
Tabla No 3. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 1.....	34
Tabla No 4. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 2.....	34
Tabla No 5. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 2. Reacción de PCR.....	34
Tabla No 6. Diseño de iniciadores empleados para el gen <i>SHH</i>	35
Tabla No 7. Composición de la reacción de PCR punto final para el exón 1.....	36
Tabla No 8. Composición de la reacción de PCR para el exón 2.....	36
Tabla No 9. Composición de la reacción de PCR punto final para el exón 3.....	37
Tabla No 10. Composición de la reacción de ExoSAP-IT™.....	44
Tabla No 11. Composición de la reacción de secuenciación utilizada.....	45
Tabla 12. Variantes encontradas en el exón 1 y 2 de <i>SHH</i> que provocan un cambio de aminoácido (missense o mutación con cambio de sentido).....	50
Tabla 13. Variantes sinónimas encontradas en el exón 1 y 2 de <i>SHH</i>	51
Tabla 14. Total de variantes encontradas en <i>SHH</i> y su estado en dbSNP (NCBI).....	52
Tabla 15. Análisis <i>in silico</i> de las variantes intrónicas en la herramienta bioinformática <i>Human Splicing Finder</i>	57

D. RESUMEN

La microcefalia es una malformación neonatal caracterizada por una cabeza de tamaño inferior a la de otros niños de la misma edad y sexo, pudiendo variar de leve a grave. Se estima que se trata de microcefalia moderada cuando el perímetro cefálico (PC) se halla en -2 desviaciones estándar (SD) por debajo de la media para edad y sexo y, microcefalia grave cuando el PC se encuentra en -3 SD por debajo de la media.

La microcefalia es el resultado de un disturbio de la neurogénesis o de la muerte de progenitores neuronales, no obstante, sus causas genéticas son muy heterogéneas, pues se encuentra descrita en cientos de síndromes. La tasa de prevalencia en México es de 0.34 % por cada 10,000 nacimientos.

En el presente trabajo se emplearon muestras de pacientes con diagnóstico de microcefalia, que formaron parte de un estudio de la Dirección General de Epidemiología realizado entre febrero de 2017 a febrero de 2018, que buscaba la asociación del virus Zika con dicha enfermedad y que después de analizarse se descartó que este agente viral, fuera el causante de ésta patología. También se les realizó la prueba de TORCH, resultando también negativa y descartando así, los principales y más conocidos agentes microbiológicos responsables de microcefalia.

Se realizó la identificación de las variantes genéticas en las regiones exónicas de *SHH* mediante la técnica de secuenciación capilar de Sanger y High Resolution Melting, con el propósito de establecer mediante análisis bioinformático si éstas pudieran asociarse en un futuro a la presencia de esta enfermedad. Se encontraron un total de 11 diferentes variantes de las cuales 6 son de tipo sinónimo, sin embargo, solo una modifica elementos reguladores como el *splicing*. Las 5 variantes restantes provocaron un cambio de aminoácidos y son reportadas como probablemente dañinas para la proteína según lo reportado por la base de datos PolyPhen. Solo 3 variantes se encuentran reportadas como polimorfismos, y solo dos se asocian con la Holoprosencefalia, por lo que podría asumirse que la microcefalia diagnosticada es a causa de ésta, no obstante, se tendrían que hacer otros análisis para poder determinar con seguridad esta aseveración.

E. ABSTRACT

Microcephaly is a neonatal malformation characterized by a head that is much smaller than that of other children of the same age and sex and may vary from mild to severe. Moderate microcephaly is estimated when the cephalic perimeter (PC) is at -2 standard deviations below the mean for age and sex and severe microcephaly when the PC is at -3 standard deviations below the mean.

Microcephaly is the result of a neurogenesis disturbance or the death of neuronal progenitors, however, its genetic causes are very heterogeneous, because it is described in hundreds of syndromes. The prevalence rate in Mexico is 0.34% per 10,000 births.

In the present work samples of patients with microcephaly diagnosis were used, which were part of a study by the General Directorate of Epidemiology carried out between February 2017 and February 2018, that sought the association of the Zika virus with the disease and that after analysis it was ruled out that this viral agent was the cause of this pathology. They were also tested for TORCH, which was also negative and ruled out the main and best known microbiological agents responsible for microcephaly.

The identification of genetic variants in the exonic regions of SHH was carried out using the capillary sequencing technique of Sanger and High-Resolution Melting, with the purpose of establishing, by means of bioinformatic analysis, whether these could be associated in the future with the presence of this disease.

A total of 11 different variants were found, of which 6 are synonymous, however, only one modifies regulatory elements such as splicing. The remaining 5 variants caused a change in amino acids and are reported as probably harmful to the protein as reported by the PolyPhen database. Only 3 variants are reported as polymorphisms, and only two are associated with Holoprosencephaly, so it could be assumed that the diagnosed microcephaly is caused by it, however, further analysis would have to be carried out in order to be able to determine this assertion with certainty.

F. INTRODUCCIÓN

La microcefalia es una afección en la que el tamaño de la cabeza es significativamente más pequeño de lo normal para la edad y el sexo de la persona. A menudo, la microcefalia se produce cuando el cerebro no crece a un ritmo normal, siendo el tamaño del cerebro el que determina el crecimiento del cráneo. Sin embargo, la microcefalia es en esencia un hallazgo en el examen físico en lugar de un diagnóstico específico.

Las causas genéticas de microcefalia son muy heterogéneas, se encuentra descrita en cientos de síndromes, entre ellos se encuentran malformaciones cerebrales como la holoprosencefalia, la esquizefalia y la lisencefalia de Miller-Dieker, presumiblemente porque la anomalía cerebral bloquea la proliferación o maduración normal y el crecimiento de los elementos neuronales (Mochida y Walsh, 2001).

Algunos de los genes que causan microcefalia congénita son propensos a controlar aspectos cruciales del desarrollo neural, tal es el caso de *SHH* que es un gen denominado morfógeno y tiene un rol central en el desarrollo de diversas estructuras y órganos durante el periodo embrionario, fetal y post-natal. Se ha demostrado que actúa como molécula señalizadora en múltiples estructuras embrionarias, como en la notocorda y placa del piso y el cierre del tubo neural, regulando la formación del sistema nervioso central y formación de ejes corporales, etc. Para el normal desarrollo de estas estructuras, es necesario que se exprese en diferentes etapas de la ontogenia, como también en distintos grupos celulares (Conei, *et al.*, 2018).

En el siguiente estudio se evaluará la región exónica de *SHH* por medio de técnicas como secuenciación de Sanger y HRM, para búsqueda de variantes genéticas en muestras de DNA de pacientes con diagnóstico de microcefalia, puesto que la finalidad es establecer una posible relación futura de las variantes encontradas con esta anomalía cerebral, una vez que ya se descartó la etiología infecciosa.

G. MARCO TEÓRICO

1. Enfermedad Genética

1.1 Definición de Microcefalia

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), la microcefalia es una malformación neonatal caracterizada por una cabeza de tamaño muy inferior a la de otros niños de la misma edad y sexo. Cuando se acompaña de un escaso crecimiento del cerebro, los niños pueden presentar problemas de desarrollo discapacitantes. La microcefalia puede variar de leve a grave. (Ver figura 1)

A su vez, Arroyo en su artículo publicado en 2018 la define cuando el perímetro cefálico se halla en -2 SD (desviaciones estándar) por debajo de la media para edad y sexo y, microcefalia grave cuando el PC se encuentra en -3 SD por debajo de la media.

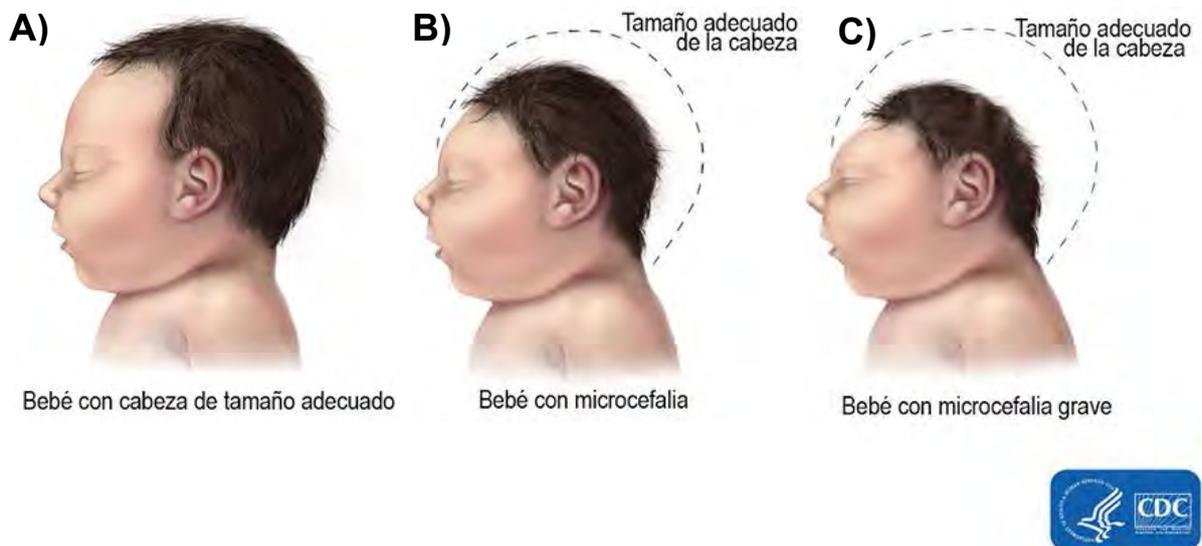


Figura 1. Bebé con cabeza de tamaño normal (A). Bebé con microcefalia (B). Bebé con microcefalia grave (C). Se muestra una disminución considerable de tamaño cefálico. (Figura tomada y modificada del URL 1).

1.2 Síntomas

Si bien la microcefalia es un signo clínico, no un diagnóstico, existen casos de personas que no presentan ningún otro síntoma o signo salvo este. Sin embargo, las siguientes son las características más comunes que se presentan acompañando a la microcefalia. Cada niño puede manifestar una amplia variedad de síntomas, entre los que se encuentran:

- Apariencia de la cabeza del bebé muy pequeña
- Llanto agudo
- Mala alimentación
- Convulsiones
- Mayor movimiento en los brazos y las piernas (espasticidad)
- Discapacidad intelectual (URL 2)

1.3 Diagnóstico

En ocasiones, se puede llegar a un diagnóstico prenatal mediante una ecografía del feto. La probabilidad de un diagnóstico exitoso es mayor cuando la ecografía se hace al final del segundo trimestre (alrededor de la semana 28) o en el tercer trimestre de gestación. A menudo se diagnostica al nacer o más adelante (URL 3).

El perímetro craneal debe ser determinado en las primeras 24 horas de vida y comparado con los patrones de crecimiento de la OMS (Tabla 1 y 2). Al interpretar los resultados de la medición hay que tener en cuenta la edad gestacional del niño, su peso y su talla. Los casos sospechosos deben ser revisados por un pediatra y someterse a pruebas radiológicas cerebrales y mediciones mensuales del perímetro craneal durante la primera infancia, comparando los resultados con los patrones de crecimiento normales. El médico también debe realizar pruebas para descartar causas conocidas de microcefalia (URL 3). A continuación, se muestran tablas de las medidas de las circunferencias de cabeza para niñas y niños según la OMS.

Tabla 1. Medida de la circunferencia de la cabeza para niñas dependiendo la edad.

Circunferencia de la cabeza para la edad. NIÑAS				ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD				
Año: Mes	Meses	-3 SD	-2 SD	-1 SD	Media	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	30.3	31.5	32.7	33.9	35.1	36.2	37.4
0: 1	1	33.0	34.2	35.4	36.5	37.7	38.9	40.1
0: 2	2	34.6	35.8	37.0	38.3	39.5	40.7	41.9
0: 3	3	35.8	37.1	38.3	39.5	40.8	42.0	43.3
0: 4	4	36.8	38.1	39.3	40.6	41.8	43.1	44.4
0: 5	5	37.6	38.9	40.2	41.5	42.7	44.0	45.3
0: 6	6	38.3	39.6	40.9	42.2	43.5	44.8	46.1
0: 7	7	38.9	40.2	41.5	42.8	44.1	45.5	46.8
0: 8	8	39.4	40.7	42.0	43.4	44.7	46.0	47.4
0: 9	9	39.8	41.2	42.5	43.8	45.2	46.5	47.8
0:10	10	40.2	41.5	42.9	44.2	45.6	46.9	48.3
0:11	11	40.5	41.9	43.2	44.6	45.9	47.3	48.6
1: 0	12	40.8	42.2	43.5	44.9	46.3	47.6	49.0

Esta tabla muestra datos para niñas de hasta 12 meses de edad e incluye hasta +/- 3 SD, las unidades de medida se encuentran en centímetros. (Tomada y adaptada del URL 4).

Tabla 2. Medida de la circunferencia de la cabeza para niños dependiendo la edad.

Circunferencia de la cabeza para la edad. NIÑOS				ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD				
Año: Mes	Meses	-3 SD	-2 SD	-1 SD	Media	1 SD	2 SD	3 SD
0: 0	0	30.7	31.9	33.2	34.5	35.7	37.0	38.3
0: 1	1	33.8	34.9	36.1	37.3	38.4	39.6	40.8
0: 2	2	35.6	36.8	38.0	39.1	40.3	41.5	42.6
0: 3	3	37.0	38.1	39.3	40.5	41.7	42.9	44.1
0: 4	4	38.0	39.2	40.4	41.6	42.8	44.0	45.2
0: 5	5	38.9	40.1	41.4	42.6	43.8	45.0	46.2
0: 6	6	39.7	40.9	42.1	43.3	44.6	45.8	47.0
0: 7	7	40.3	41.5	42.7	44.0	45.2	46.4	47.7
0: 8	8	40.8	42.0	43.3	44.5	45.8	47.0	48.3
0: 9	9	41.2	42.5	43.7	45.0	46.3	47.5	48.8
0:10	10	41.6	42.9	44.1	45.4	46.7	47.9	49.2
0:11	11	41.9	43.2	44.5	45.8	47.0	48.3	49.6
1: 0	12	42.2	43.5	44.8	46.1	47.4	48.6	49.9

Esta tabla muestra datos para niños de hasta 12 meses de edad e incluye hasta +/- 3 SD, las unidades de medida se encuentran en centímetros. (Tomada y adaptada del URL 5).

1.4 Clasificación

La microcefalia puede ser congénita cuando está presente en el período prenatal o al nacer (denominada también primaria) o adquirida (secundaria) cuando el perímetro cefálico al nacer está dentro del rango normal y posteriormente cae debajo del rango normal debido a una desaceleración del crecimiento cerebral. Ambas categorías pueden deberse a factores genéticos o no genéticos. Sin embargo, los factores genéticos son más frecuentemente responsables de la microcefalia congénita, mientras que los factores no genéticos a menudo causan microcefalia postnatal (Arroyo, 2018).

1.5 Etiología

La etiología de la microcefalia se puede dividir ampliamente en causas ambientales y genéticas. Las causas genéticas de microcefalia son muy heterogéneas. Cientos de síndromes descritos incluyen a la microcefalia como parte de su espectro fenotípico. A continuación se mencionan algunas de las causas (en general) conocidas:

1. Causas genéticas

Aberraciones cromosómicas numéricas, anillos (cromosoma 13), síndromes de microdelección y/o duplicación, trisomía 13, 18, 21, etc.

Trisomía parcial 2q31.2-37.3 y monosomía 9p24.3

Síndromes asociados

- Microcefalia autosómica recesiva (MCPH1-23)
- Síndrome de Nijmegen breakage
- Microcefalia autosómica dominante
- Microcefalia ligada al cromosoma X
- Síndrome de Cornelia de Lange
- Síndrome de Rubinstein-Taybi
- Síndrome de Rett (congénito)
- Síndrome de Mowat-Wilson
- Síndrome de Smith-Lemli-Opitz
- Mutación del gen ATRX
- Mutación del gen ARX
- Mutación en PQBP1
- Mutación del gen ASNS
- Delección TASP1
- Mutación del gen PCDH12 protocaderina
- Mutación NDE1
- Mutación COPB2
- Síndrome de Angelman

1.1. Causas metabólicas (de etiología genética)

Trastornos de la biosíntesis de colesterol
Mitocondriopatía (ej.: deficiencia de piruvato dehidrogenasa)
Trastornos congénitos de la glicosilación
Déficit de 3-fosfoglicerato deshidrogenasa (déficit de serina)

2. Factores exógenos

Infección intraútero: toxoplasmosis, rubéola, citomegalovirus, herpes simple, virus varicela zóster, sífilis, VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), virus Zika, virus de la coriomeningitis linfocítica.

Teratógenos: alcohol, cocaína, drogas antiepilépticas, intoxicación por plomo/mercurio, radiación

Enfermedad materna: hiperfenilalaninemia, anorexia nerviosa materna, diabetes

Insuficiencia placentaria extrema

Cardiopatía congénita (Arroyo, 2018)

1.5.1 Etiología infecciosa

Existen enfermedades virales y parasitarias que pueden transmitirse al feto y causar microcefalia y que, asociadas a otras características, constituyen un síndrome diferente para cada infección. También pueden ser causales las infecciones perinatales por bacterias como *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia*, *Streptococo* grupo B, *Listeria monocytogenes* o *Neisseria gonorrhoeae*. Las principales infecciones congénitas que causan microcefalia son citomegalovirus, virus Zika, virus del herpes simple (VHS), virus de la rubéola, y toxoplasma gondii (Arroyo, 2018).

ZIKA

El virus del Zika (ZIKV) es un arbovirus del género flavivirus, muy cercano filogenéticamente a otros virus como los del dengue, la fiebre amarilla, la encefalitis japonesa y de la fiebre del Nilo Occidental. Es un virus de RNA (ácido ribonucleico) transmitido por mosquitos, principalmente del género *Aedes*, que se aisló por primera vez en 1947 de un mono Rhesus durante un estudio sobre la transmisión de la fiebre amarilla selvática en los bosques de Zika, Uganda (Botell y Bermúdez, 2016).

Los hallazgos de ácido ribonucleico de zikv en el líquido amniótico y en el tejido cerebral de fetos y lactantes con microcefalia, así como las altas tasas de microcefalia entre los infantes nacidos de madres con antecedente confirmado de infección aguda por Zika, proveen evidencia fuerte de la relación entre microcefalia e infección materna por el virus del Zika (Lyle, *et al.*, 2016).

Hasta mayo de 2017 se reportaron casos confirmados de malformaciones congénitas en 26 países y territorios del continente americano y en febrero de 2017, la secretaría de salud informó sobre el primer caso de microcefalia asociado a Zika en una recién nacida en México, en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) “Isidro Espinosa de los Reyes” ; debido a esta asociación de riesgo, la OMS y los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) han publicado guías para el manejo de mujeres embarazadas con exposición potencial al virus del Zika (León, *et al.*, 2017).

CMV

El citomegalovirus (CMV) es un virus de DNA, de la familia *Herpesviridae* y específico del ser humano. Es el principal agente causal de infección congénita y la primera causa de hipoacusia neurosensorial (HNS) no genética y de retardo mental (RM) adquirido en la infancia. La infección materna por CMV puede producir efectos profundos en el feto, que incluyen pérdida auditiva neurosensorial, coriorretinitis y efectos neurológicos, como microcefalia, discapacidad intelectual y parálisis cerebral. Para las infecciones primarias con CMV, el riesgo de efectos fetales adversos es más alto durante el primer trimestre, pero el riesgo persiste en el segundo y tercer trimestre, con algunos resultados fetales adversos.

La transmisión se produce vía transplacentaria, en el canal del parto o por la leche materna y posteriormente por transfusiones sanguíneas; la transferencia transplacentaria es la que produce mayor compromiso multisistémico (Cofre, *et al.*, 2016).

TORCH

Las infecciones neonatales se adquieren comúnmente por la vía intrauterina o durante el parto. El acrónimo TORCH fue designado para un grupo de infecciones comunes, y se utiliza de forma universal para caracterizar el cuadro clínico que presenta el feto o el recién nacido compatible con una infección congénita que incluye rash, hepatoesplenomegalia, hidrocefalia o microcefalia, alteraciones cardiovasculares, auditivas y oculares. Cada letra representa la inicial de una patología: la T corresponde a la toxoplasmosis; la O a otras, como la sífilis y el VIH; la R a la rubéola; la C al citomegalovirus y la H al herpes simple.

La infección materna se puede transmitir al producto a través de la vía hematógica, vía canal del parto, a través de la leche materna y por la vía ascendente, esta última ocurre cuando el microorganismo infecta el tracto genital materno y asciende hasta la cavidad intrauterina, ya que provoca corioamnionitis, rotura prematura de membranas e infección del feto (Frutos, *et al.*, 2018).

1.5.2 Etiología genética

Etiología genética no sindrómica

La malformación más común del prosencéfalo en humanos es la holoprosencefalia (HPE), caracterizada por ausencia en la división del prosencéfalo. Dicha alteración es una anomalía congénita que incluye un espectro amplio de malformaciones cerebrales ó faciales, que resultan del fallo en la división del prosencéfalo (Cervantes, *et al.*, 2019).

Ésta es una anomalía estructural del cerebro que se presenta durante la etapa embrionaria originada alrededor de los días 18 y 28 de gestación, cuando el prosencéfalo no se puede dividir parcial o completamente en diencefalo y telencefalo por lo que al final del desarrollo cerebral, pueden quedar afectados los hemisferios cerebrales, así como los tractos olfatorios y ópticos (Bertolacini, Richieri y Ribeiro, 2009).

La HPE presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, su forma más severa, que usualmente es incompatible con la vida postnatal, presenta un defecto cerebral importante, junto con anomalías faciales muy evidentes, incluyendo ciclopía, la presencia de una estructura nasal primitiva y hendidura facial media, y de otros órganos, como cardiopatías congénitas, polidactilia, sindactilia, bazo e hígado.

En contraste, en los casos más leves, se presentan solo defectos faciales menores, incluyendo hipotelorismo, incisivo central único y microcefalia.

La Holoprosencefalia se clasifica en cuatro tipos según la naturaleza de las malformaciones cerebrales que se observan en la neuroimagen y / o el examen patológico, con fenotipos craneofaciales típicamente reconocibles: alobar, semilobar, lobar y variante de fusión media interhemisférica (Raam, Solomon y Muenke, 2011). (Ver figura 2)

- a) Holoprosencefalia alobar: Es la forma más severa que se caracteriza por un defecto completo en la prosencefalización. Como resultado, los 2 hemisferios se encuentran fusionados, existiendo un único ventrículo de localización central, ausencia de cuerpo calloso y de la hoz cerebral. El cerebro suele ser más pequeño de lo normal, y los tálamos suelen estar fusionados. Con frecuencia se asocia a anomalías cromosómicas.
- b) Holoprosencefalia semilobar: Se caracteriza por una interrupción de la prosencefalización, persistiendo fusión de los hemisferios a nivel anterior, mientras que posteriormente los hemisferios se encuentran parcialmente separados.
- c) Holoprosencefalia lobar: Su diagnóstico suele ser más tardío. Las formas leves se presentan con microcefalia, microftalmia, hipotelorismo, hipoplasia mediofacial y labio leporino.
- d) Variante de fusión interhemisférica media (MIHF): En la que los lóbulos frontales y parietales posteriores no se separan, con una falta variable de escisión de los ganglios basales y el tálamo y la ausencia del cuerpo calloso, pero la presencia del genu y esplenio del cuerpo calloso (Monteagudo, 2020).

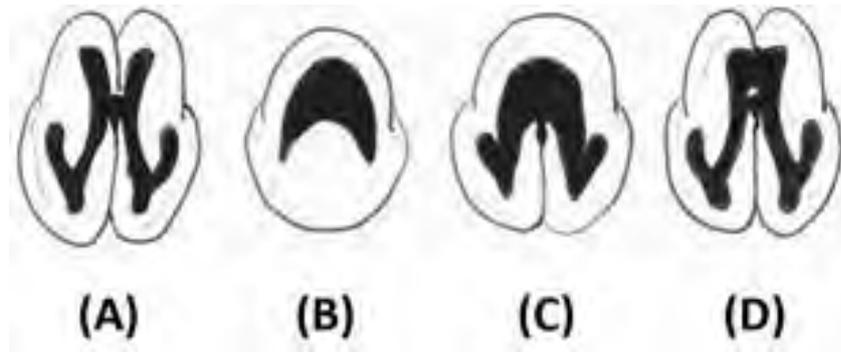


Figura 2. Sistema ventricular en los tipos de Holoprosencefalia. (A) Cerebro normal: Los ápices de los ventrículos frontales, temporales y occipitales están bien definidos. (B) Holoprosencefalia lobar: los cuernos de los ventrículos frontales están unidos pero sus ápices pueden ser definidos, el resto está normal. (C) Holoprosencefalia semilobar: los cuernos de los ventrículos frontales están unidos y sus ápices no pueden ser definidos, el resto está normal. (D) Alobar holoprosencefalia: los ventrículos no pueden ser definidos. (Figura tomada del URL 6).

Genética Molecular de HPE no sindrómico

El gen Sonic Hedgehog humano (*SHH*), uno de los tres genes homólogos de *Drosophila melanogaster* (la mosca de la fruta), fue el primer gen asociado a HPE que se identificó. Las deleciones heterocigotas y las variantes sin sentido y de desplazamiento de marco en *SHH* predicen un mecanismo de pérdida de función.

El gen *SHH* codifica para una proteína secretada, Sonic Hedgehog, involucrada en el establecimiento de destinos celulares en varios puntos durante el desarrollo. Se expresa en el nodo de Hensen, la placa del piso del tubo neural, el endodermo intestinal temprano, la parte posterior de las yemas de las extremidades y en todo el notocordio. Se ha implicado como la señal inductiva clave en el diseño del tubo neural ventral, el eje de la extremidad anterior-posterior y los somitas ventrales. A medida que avanza la comprensión de la compleja patogénesis molecular de HPE, ahora se entiende que muchos genes asociados con HPE están involucrados en la señalización de Hedgehog. El HPE no sindrómico puede heredarse de manera autosómica dominante o puede ser el resultado de una anomalía cromosómica heredada o de novo (Tekendo, *et al.*, 2020).

2. GEN SONIC HEDGEHOG

2.1 DESCRIPCIÓN DE SHH

SHH fue inicialmente descrito en 1978 por Wieschaus Volhard como un gen de polaridad durante la segmentación del cuerpo del embrión de *D. melanogaster*. Su nombre (Sonic hedgehog) se debe a que, al ser inhibido en moscas mutantes, las larvas desarrollaron una serie de espinas en todo el cuerpo que les confirieron un aspecto de erizo (hedgehog, por su traducción en inglés) y en referencia al personaje de videojuegos de Sega Genesis® (Arias, *et al.*, 2016).

El gen *SHH* está localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 7, en la región 36.3 (7q36.3) (ver figura 3).

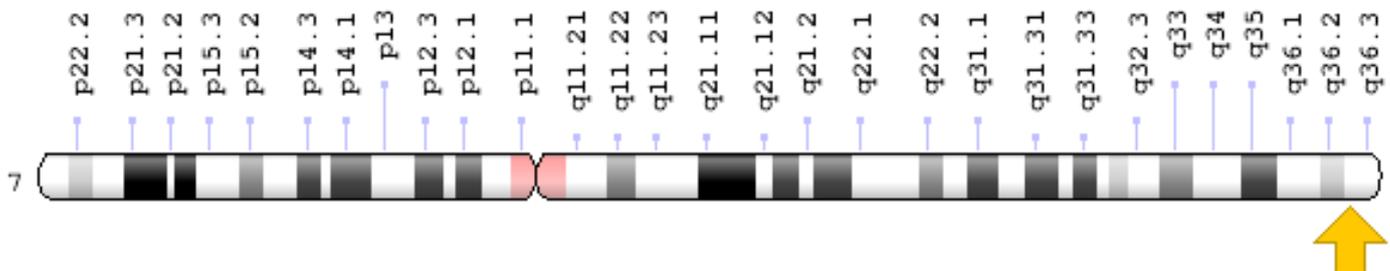


Figura 3. Localización cromosómica de SHH en el cromosoma 7. Se muestra un esquema del patrón de bandeo del cromosoma 7, con una flecha amarilla se señala la región 36.3. (Figura tomada del GHR, URL 7).

Se encuentra localizado entre las pares de bases 155,799,980 a 155,812,463 del cromosoma 7. Posee tres exones y dos intrones. (Ver figura 4). El exón 1 tiene una longitud de 641 nt (nucleótidos), el exón 2, 262 nt y el exón 3, 3747 nt.

NCBI Reference Sequence: NG_007504.2

[GenBank](#) [FASTA](#)

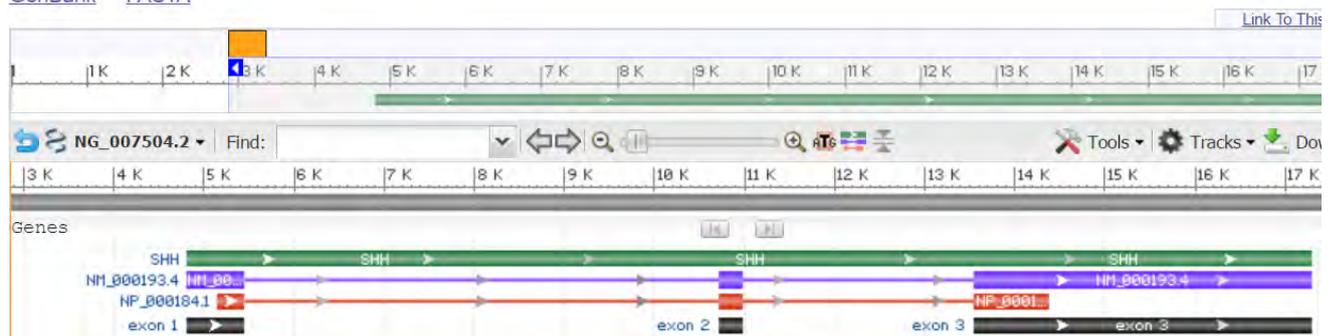


Figura 4. Secuencia genómica de referencia. Se muestra un gráfico que representa la longitud del gen *SHH* en la especie *Homo sapiens*, y los tres exones e intrones que posee. (Figura tomada de NCBI, URL 8).

2.2 PROTEÍNA SHH

Las proteínas Shh son secretadas por las células, como las de Purkinje en el cerebelo, y actúan tanto de modo paracrino como autocrino en las células diana. La parte C-terminal de la proteína Hedgehog muestra una autoproteólisis y una actividad de colesterol transferasa. Ambas actividades dan como resultado la escisión de la proteína de longitud completa en dos partes (ShhN y ShhC) seguida de la unión covalente de un resto de colesterol al extremo C-terminal del ShhN recién generado. Ambas actividades se producen en el RE (retículo endoplásmico).

Una vez escindido, ShhC se degrada en el RE (Pal y Mukhopadhyay, 2015) Ver figura 5.

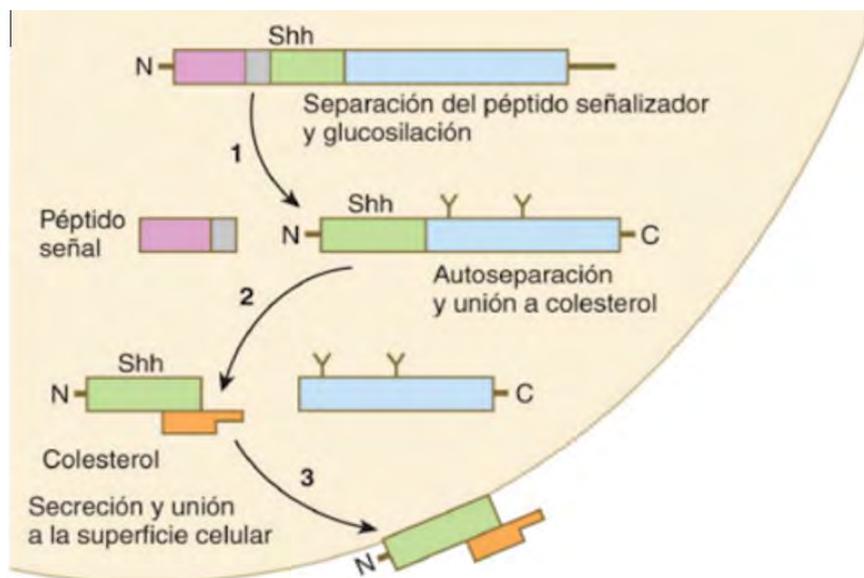


Figura 5. Modificación de las partes C- terminal y N- terminal de la proteína Sonic Hedgehog. (Carlson, B., 2014)

El producto N de la proteína con doble lipidación (ShhNp) es un morfógeno que es esencial para una variedad de eventos de patrones durante el desarrollo. Induce el destino de las células ventrales en el tubo neural y los somitas (Pepinsky, *et al.*, 2000).

Participa en el diseño del eje anterior-posterior del brote de la extremidad en desarrollo. Esencial para la orientación del axón y se une al receptor *PTCH1* (Homólogo parcheado de proteína 1), que funciona en asociación con *SMO* (Gen parcheado suavizado), permitiendo que la vía de señalización intracelular active proteínas Gli capaces de actuar como factores de transcripción, translocar al núcleo

celular y estimular la transcripción de genes diana a Shh. En ausencia de *SHH*, *PTCH1* reprime la actividad de señalización constitutiva de *SMO* (Pepinsky, et al., 2000).

2.3 Familia Hedgehog

Los mamíferos presentan tres genes de la familia Hedgehog (Ver figura 6) que reciben el nombre de: *Sonic hedgehog (SHH)*, *Indian hedgehog (IHH)* y *Desert hedgehog (DHH)*. Son homólogos del gen *Hedgehog (HH)* de *D. melanogaster* que fue el primer miembro de la familia en ser identificado (Lasierra, 2009).

DHH juega un papel en la regulación de la espermatogénesis, mientras IHH tiene una función principalmente en el desarrollo óseo donde regula la proliferación y la diferenciación de los condrocitos. Entre los tres ligandos *HH*, *SHH* cuenta con las funciones más generalizadas y se considera un modelo de morfógeno. Los morfógenos son moléculas secretadas que difunden y forman un gradiente de concentración en el embrión al cual responden las células del mismo generando distintos tipos celulares en función de la cantidad de ligando al que están expuestas (Vuolo, 2015).

La familia de proteínas Hh desempeña funciones esenciales principalmente durante el desarrollo embrionario, pero también en el mantenimiento y regulación de algunas células madre en el organismo adulto y en el desarrollo de muchos tumores humanos. Son moléculas de señalización intercelular que tienen la capacidad de señalar a larga distancia (múltiples diámetros celulares) y de una manera dependiente de concentración. Las proteínas Hh se sintetizan en forma de un precursor que requiere de un importante procesamiento post-traducciona para generar el ligando activo. Este

procesamiento incluye su digestión autocatalítica y una doble modificación lipídica (Lasierra, 2009).

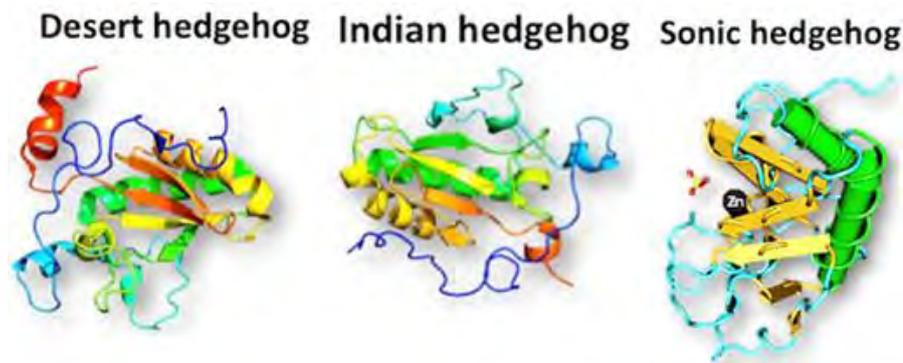


Figura 6. Familia de proteínas Hedgehog. (Figura tomada del URL 9).

2.4 Síntesis, procesamiento y difusión de hedgehog

Shh es sintetizado como un precursor inactivo (la molécula completa pesa unos 45 kDa), que es escindido de forma autocatalítica para formar dos fragmentos proteicos: uno amino-terminal de 20 kDa (N-Shh) y otro carboxi-terminal de 25 kDa. En vertebrados e invertebrados todas las actividades de señalización vienen mediadas por el fragmento N-Shh, mientras de momento no se ha encontrado ninguna función conocida para fragmento carboxi-terminal. Durante la escisión el fragmento amino-terminal es modificado por la adición covalente de una molécula de colesterol. Además, el fragmento N-Shh adquiere otra molécula lipídica, el ácido palmítico, que se une covalentemente a su extremo amino-terminal (Ver figura 5). Esta última reacción está catalizada por una enzima O-aciltransferasa codificada por el gen *Skinny hedgehog* (*Ski*) (Vuolo ,2015).

La adición de estos dos residuos lipídicos permiten la unión de la mayor parte de N-Shh a la membrana celular pero permite la difusión de pequeñas cantidades, por lo tanto es un mecanismo fundamental para la correcta difusión, localización, secreción y la generación del gradiente de Shh (Ryan y Chiang, 2012).

La importancia del colesterol en la señalización por Hh se pone de manifiesto por el hecho de que algunos síndromes humanos con fenotipo de falta de función de Shh (holoprosencefalia) son causados por mutaciones en las enzimas que sintetizan el colesterol. Además, se sabe desde hace tiempo que la interferencia farmacológica

con la síntesis del colesterol tiene efecto teratológico siendo los fenotipos resultantes coincidentes con los de falta de función de Shh (Lasierra, 2009) (Ver figura 7).

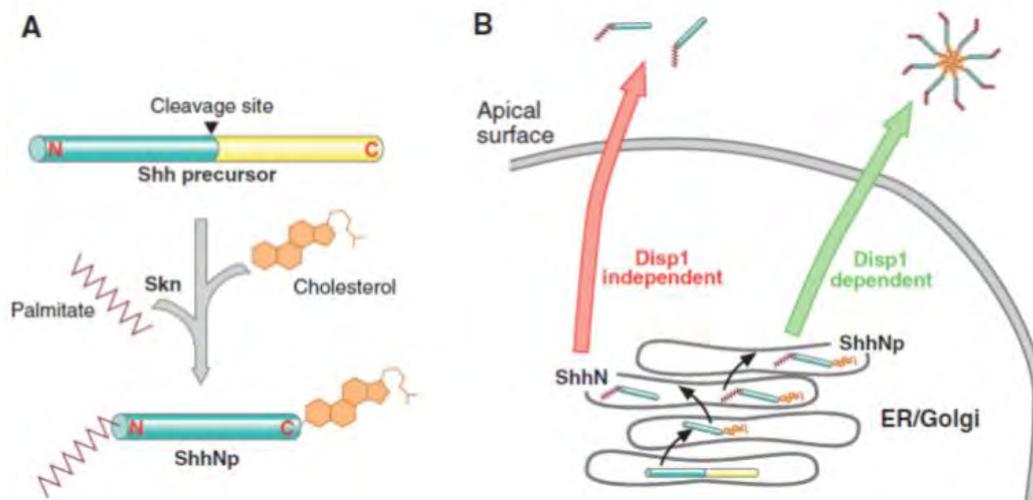


Figura 7. Procesamiento de las proteínas Shh. Primero se sintetiza un precursor de 45 kDa que sufre una autocatálisis dependiente del fragmento C-terminal para generar el péptido activo que es el fragmento N-terminal de 20 kDa al que se le añaden colesterol y ácido palmítico. La secreción de la molécula modificada con el colesterol requiere de las proteínas *Dispatched* (*Disp*) que son transportadores de vesículas exocíticas específicas para Hh, de la señal peptídica *Scube2* y de la actividad enzimática *Sheddasa*. (Figura tomada del URL 10).

2.5 Recepción y transducción de la señal

La vía de señalización Hh (Ver figura 8) es compleja, se han identificado los tres genes Hedgehog *SHH*, *IHH* y *DHH*, dos genes Patched (*PTCH1* y *PTCH2*) y 3 genes *Gli* (*GLI 1*, *GLI 2* y *GLI 3*). El homólogo humano del gen Patched es *PTCH1*, está localizado en la región 9q22.3, y es un receptor que presenta 12 dominios transmembrana y se une a cualquiera de los tres ligandos Hh. Igualmente actúa como un gen supresor tumoral de esta vía, siendo también uno de los genes diana regulados por *Gli 1* (Garcia, Dominguez y Mir, 2016).

Prácticamente la totalidad de las células eucariotas poseen en la membrana celular un cilio primario cuya función consiste en sensor estímulos mecánicos y químicos y controlar la diferenciación celular. En él se encuentra el receptor *PTCH1*, que en ausencia de ligando Hh actúa inhibiendo y restringiendo su entrada en el cilio de Smoothened (*SMO*), un receptor con 7 dominios transmembrana, del tipo GPCR

(receptor acoplado a proteínas G), esencial para la activación de la vía Shh localizado en el cromosoma 7p32.3, cuando no está unido a PTCH1 (Sánchez, 2017).

Como resultado, varias quinasas tales como PKA, GSK-3 β , CK1 fosforilan el complejo Sufu-Gli 1, 2, 3 en la formación de formas inactivas Gli 2, 3-R. Gli-3R viaja al núcleo e inhibe la señalización *downstream* de los genes diana Hh. En el estado activado, el ligando Hh maduro se une a *PTCH1* inhibiendo así su unión a Smo. Smo a su vez se transloca al cilio primario e inhibe las quinasas (PKA, GSK-3 β , CK1). El complejo *Gli* 1, 2, 3 permanece en forma activa (Gli 1, 2, 3-A), que luego ingresa al núcleo y activa la transcripción de los genes diana *Hh* (Khatra, Bose y Sinha, 2017).

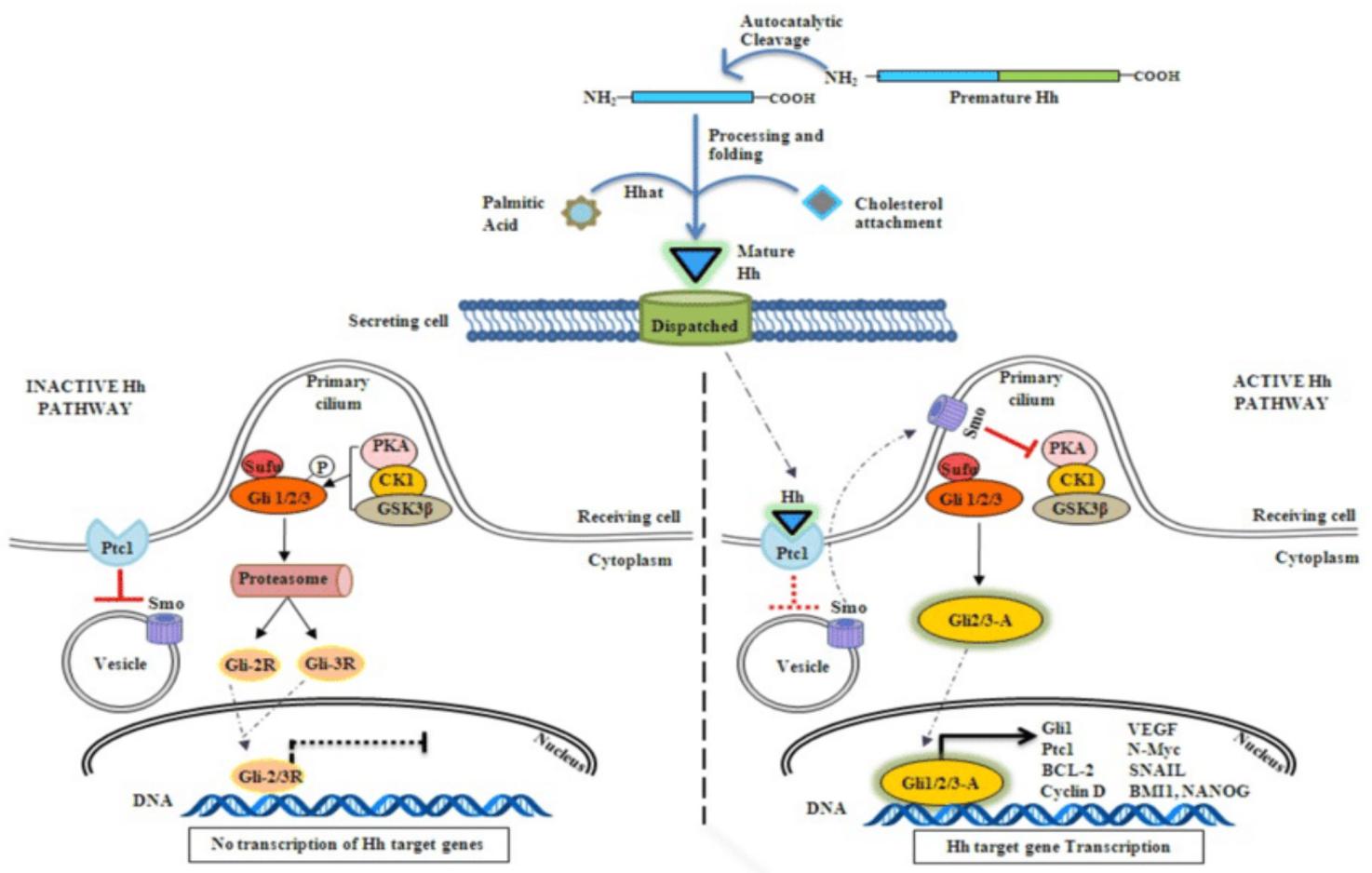


Figura 8. Transducción de señales de SHH en vertebrados. El sistema de transducción de la señal de Hh inicia con la unión de Hh a Ptc1. En ausencia de Hh, Ptc1 inhibe la actividad de Smo (por tanto, la función de Ptc1 es impedir que Smo funcione). En el caso contrario, cuando Hh se une a Ptc1, éste no puede inhibir a Smo, por lo que la acumulación de este último en el cilio primario conduce a la activación de Gli que entra al núcleo en donde actúa como un activador transcripcional de los mismos genes diana específicos de Hh que eran reprimidos. (Figura tomada del URL 11)

2.6 SHH en el desarrollo embrionario

En la tercera semana de desarrollo de los seres humanos, células del ectodermo migran por la fosita primitiva y se proyectan en sentido caudo-cefálico en dirección a la placa precordial, constituyendo la notocorda. Las células de esta estructura embrionaria producen *SHH* para contribuir con la organización de la placa neural en la medida que suprime la expresión de los genes *PAX3* y *PAX7* en la mitad ventral del tubo neural. A este proceso se le conoce como neurulación. Por tanto, *SHH* cuenta con un amplio repertorio morfogénico al generar el gradiente de concentración que proporciona la especificidad de la identidad neuronal en el neuroectodermo durante la embriogénesis (Arias, *et al.*, 2016).

De igual forma, la vía de señalización de *SHH* en el sistema nervioso central, regula la proliferación (ciclo mitótico) y la supervivencia (apoptosis) de las células en los individuos adultos; por ejemplo, en la médula espinal la expresión de *SHH* induce la diferenciación de las células ventrales del tubo neural en dos linajes de células diferentes a partir de la misma célula progenitora, neuronas motoras y células gliales reconocidas como oligodendrocitos, a través de la activación y represión de *Twhh*, *Ngn2* y *Olig2* respectivamente (Sánchez, 2017).

El desarrollo de las extremidades (aletas, alas, patas, brazos y piernas) de los vertebrados a partir de la cresta ectodérmica apical (CEA) se encuentra regulada por la expresión de *Shh* a través de la zona de actividad polarizante (ZPA), la cual se constituye un pequeño agrupamiento de células mesodérmicas situado en el borde posterior de la extremidad en desarrollo, es decir un centro de señalización morfogénica. La función de la ZPA corresponde la síntesis de *SHH* para establecer el patrón morfogenético anteroposterior y dorsoventral de la extremidad en conjunto con la expresión de *Fgf4* y *Formin IV*. Las células de CEA sufren apoptosis mientras que las de ZPA (en donde se secreta *SHH*) se diferencian en las células progenitoras que van a dar origen a los tejidos conectivos de la dermis, al tejido óseo y al músculo estriado esquelético (Arias,*et al.*, 2016) (Ver figura 9).

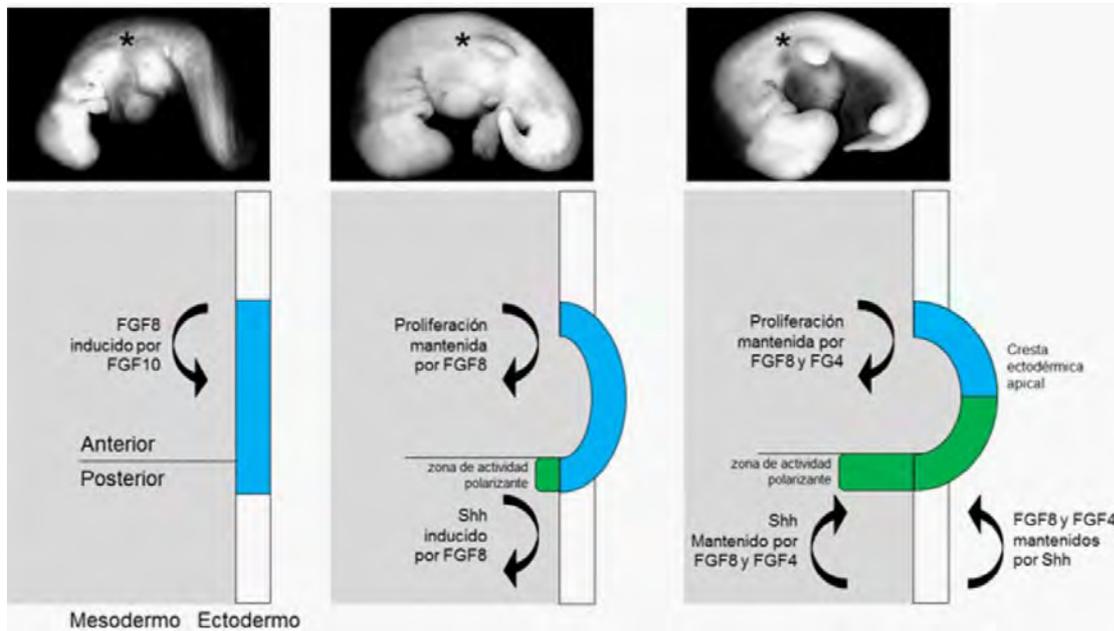


Figura 9. Esquema de expresión (gradiente de concentración) de *SHH* en la zona de actividad polarizante durante la formación de los esbozos de las extremidades. (Figura tomada del URL 12).

H. JUSTIFICACIÓN

Las malformaciones congénitas (MC), son alteraciones estructurales y funcionales que ocurren durante la vida intrauterina y pueden identificarse en la etapa prenatal, al nacimiento. Estas alteraciones influyen de forma importante en la morbilidad y mortalidad infantil. La Organización Mundial de la Salud estima que, a nivel internacional, ocurren 210,358 muertes por MC durante los primeros 28 días de vida.

En México, el porcentaje de las MC en la mortalidad infantil (menores de un año) fue del 25.5% (6,719 defunciones) en 2014.

Dentro de estas malformaciones, se encuentra la microcefalia que es el resultado de un disturbio de la neurogénesis o de la muerte de progenitores neuronales, no obstante, sus causas genéticas son muy heterogéneas. Cientos de síndromes descritos tienen microcefalia. La tasa de prevalencia en México es de 0.34 % por cada 10,000 nacimientos.

SHH es el gen principal implicado en HPE y posee un papel importante en el desarrollo temprano del cerebro anterior y del sistema nervioso central. La microcefalia es una de las distintas manifestaciones clínicas que presenta la HPE, siendo una malformación neonatal caracterizada por una cabeza de tamaño muy inferior. Se han identificado mutaciones heterocigotas a lo largo de este gen en pacientes con HPE, que incluyen mutaciones de cambio de sentido, sin sentido, deleciones, inserciones y mutaciones de cambio de marco de lectura y hasta el momento se sigue analizando el significado funcional de éstas a lo largo de la región codificante y no codificante de *SHH*.

Debido a lo anterior, en el presente proyecto se plantea realizar el análisis mediante secuenciación capilar de toda la región exónica de *SHH* en busca de variantes genéticas en una serie de pacientes con reporte epidemiológico de microcefalia, emitido por la Dirección General de Epidemiología, entre febrero de 2017 a febrero de 2018 y en los cuales se han descartado las principales causas infecciosas. Asimismo, se pretende determinar mediante análisis bioinformático, el posible efecto de las variantes genéticas encontradas sobre la estructura y función de la proteína que codifica dicho gen.

I. HIPÓTESIS

Dado que se sabe que *SHH* es responsable de alteraciones en el correcto desarrollo del sistema nervioso debido a que posee un papel importante en el desarrollo embrionario del encéfalo, sí se analiza la región exónica de dicho gen, y se hallan variantes que se encuentren o no reportadas en la literatura, entonces éstas podrían asociarse a la microcefalia.

J. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar las variantes genéticas de *SHH* mediante la técnica de secuenciación de Sanger y HRM, en muestras de DNA de pacientes con diagnóstico de microcefalia, con el propósito de establecer si éstas se pueden relacionar en un futuro con la presencia de esta enfermedad.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estandarizar las condiciones óptimas de amplificación mediante la técnica de PCR punto final para cada uno de los exones del gen *SHH*, para que dichos productos sirvan en la obtención de secuencias genéticas de las muestras utilizadas y su análisis correspondiente.
- Aplicar la técnica de High Resolution Melting (HRM) por medio de un termociclador de PCR en Tiempo Real, con la finalidad de utilizarla para identificar variantes en las secuencias amplificadas.
- Determinar mediante análisis bioinformático, el posible efecto de las variantes genéticas encontradas en los tres exones sobre la estructura y función de la proteína que codifica el gen *SHH*.

K. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

1.1 Sujeto de estudio

El estudio constó de 63 muestras de sangre periférica de pacientes provenientes de diferentes hospitales localizados en los distintos estados de la república con un diagnóstico prenatal y postnatal (al momento del nacimiento) de microcefalia. Éstas se encontraban coaguladas y con un tiempo de almacenamiento largo, y bajo condiciones desconocidas.

1.2 Criterios de inclusión.

- A. Muestras con diagnóstico de microcefalia y resultado negativo a Zika y TORCH.
- B. Diagnóstico de microcefalia y resultado negativo a anomalías cromosómicas: Las muestras se analizaron con los kits de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification) 070 y 182. Dicho estudio sirve para el diagnóstico perinatal de las principales aneuploidías cromosómicas, por lo cual se descartó que estas anomalías y otros desbalances cromosómicos como ganancias o pérdidas de regiones subteloméricas o pericentroméricas (respectivamente) fueran responsables de esta enfermedad.

1.3 Criterios de exclusión

- A. Muestras con diagnóstico de microcefalia y resultados positivos a infección por el virus del Zika, al perfil de TORCH y/o anomalías cromosómicas en el MLPA.

L. MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Extracción del DNA de sangre periférica*

A) El material genético de sangre periférica se extrajo utilizando el Kit QIAmp® DNA Mini and blood Mini Handbook de QIAGEN. Este es un kit útil para la purificación de DNA de sangre completa, plasma, suero, capa leucocitaria, linfocitos, manchas de sangre seca (URL 13).

B) Las muestras fueron centrifugadas a 4000 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos, después se transfirió la capa leucocitaria resultante a un tubo Eppendorf ® de 1.5 mL con una pipeta Pasteur procurando tomar la menor cantidad de eritrocitos.

C) Se agregó 1 mL de solución de lisis de eritrocitos a la muestra y se agitó con vórtex, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos (agitando constantemente) y después se centrifugó a 14000 RPM durante 10 minutos.

D) Con una micropipeta se retiró el sobrenadante, y se repitió lo realizado en el paso C hasta obtener un botón limpio, es decir, hasta lisar y eliminar la mayor cantidad de glóbulos rojos.

E) El botón leucocitario se agitó vigorosamente con ayuda del vortex hasta disgregarlo completamente y después se agregó Buffer AL. Después se adicionó 20 uL de proteinasa K y se incubó 55°C en agitación constante en el Eppendorf ThermoMixer® durante toda la noche.

F) Al día siguiente se añadió 600 uL de etanol 100 % y se agitó, esto se realizó con la finalidad de bajar el pH, mover el punto isoeléctrico y permitir que el DNA se quede pegado a la columna que posteriormente se utilizó. En dicha columna se hizo pasar 600 uL de la muestra y se colocó en un tubo colector.

G) Se centrifugó la columna a 14000 RPM durante 5 minutos y al terminar se descartó el líquido del tubo colector y se añadió el resto de la muestra a la columna, se centrifugó a 14000 RPM y nuevamente se descartó el líquido del tubo colector.

H) Se agregó 600 uL de Buffer AW1 a la columna y se centrifugó a 14000 RPM por 5 minutos y se descartó el líquido.

I) Se agregó 600 uL de Buffer AW2 a la columna y se centrifugó a 14000 RPM por 5 minutos y una vez más se descartó el líquido.

J) Se cambió la columna a un tubo colector limpio y se centrifugó nuevamente a 14000 RPM durante 5 minutos, a fin de secar la columna.

K) Se agregó a la columna 60 uL de Buffer AE, tratando que el líquido cayera completamente en el centro de la columna y sin tocar la columna con la pipeta. Ésta se incubó a 55°C durante 2 horas en el Eppendorf ThermoMixer® y se centrifugó a 14000 RPM durante 5 minutos. El tubo que contenía el DNA se tapó perfectamente y se almacenó a -20°C en caso de no ser procesada la muestra en el momento.

2. *Cuantificación de DNA*

Para la cuantificación se preparó la muestra de DNA, colocando los tubos en el Eppendorf ThermoMixer® durante 10 o 15 min a 55 °C, y después se vortexeó y se centrifugó en una microcentrífuga con la finalidad de una mejor rehidratación y homogeneización del material genético.

Preparada la muestra, se cuantificó por duplicado con ayuda del equipo NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer de Thermo Scientific™, calibrando previamente y también por duplicado con 2 microlitros de buffer de rehidratación. Asimismo, se resguardaron los datos obtenidos como la menor concentración y las respectivas relaciones 260/280 y 260/230.

3. *Purificación del DNA con Acetato de amonio*

La pureza del DNA está indicada por el índice o relación OD260/OD280 y OD260/OD230. El OD260/OD280 debe estar entre 1.8 y 2.0 y la relación

OD260/OD230 debe ser mayor a 1.5. En aquellas muestras en las que no se logró obtener DNA con valores de pureza aceptables se efectuó la siguiente purificación:

- 1) Se agregó al DNA genómico, 0.5 volúmenes de NH₄OAc 7.5 M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto (a una temperatura de -20°C).
- 2) Se agitó vigorosamente con el vortex y se incubó a -20°C durante 1 hr.
- 3) Se centrifugó a 14,000 RPM a temperatura ambiente durante 20 min. Transcurrido el tiempo, se removió el sobrenadante, y se lavó el pellet con etanol al 80%.
- 4) Después se centrifugó nuevamente a 14,000 RPM a temperatura ambiente durante 5 min.
- 5) Se removió el etanol al 80% y nuevamente se realizó el lavado con etanol.
- 6) Por último se resuspendió el pellet en buffer AE.

4. *Elaboración de diluciones*

Una vez cuantificadas todas las muestras, se efectuaron diluciones para obtener una concentración de 30 ng/μL. Dicha concentración se utilizó posteriormente para el análisis subsecuente.

El cálculo fue el siguiente:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 * V_2}{C_1}$$

Donde:

V₁ = Volumen del DNA (μL)

C₁ = Concentración del DNA (ng/μL)

V₂ = Volumen total de la dilución (50 μL)

C₂ = Concentración de DNA deseada (30 ng/μL)

5. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

El MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) es un método reciente, basado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de cuantificación relativa del número de copias normales y anormales de ácido desoxirribonucleico (DNA) de hasta 60 secuencias genómicas diferentes (Estrada, et al., 2012).

Para el MLPA se utilizó la mezcla de sondas SALSA MLPA 070 (Regiones subteloméricas) Y 182 (Regiones pericentroméricas)

En el día 1 se realizó la desnaturalización del DNA, una vez que la reacción alcanzó una temperatura de 25 °C se adicionó a la reacción de hibridación los reactivos y la cantidad correspondiente que se muestran en la tabla No 3.

Tabla No 3. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 1

Reactivo y concentración	Volumen (µL)
DNA (30 ng/µL)	5
Buffer MLPA (Tapa amarilla)	1.5
Sondas (Tapa negra)	1.5

En el día 2, se llevó a cabo la ligación, agregando los reactivos (Ver tabla No. 4) de ligación al momento que la temperatura de la reacción se mantiene a 55°C.

Tabla No 4. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 2

Reactivo	Volumen (µL)
dH ₂ O	25
Buffer A	3
Buffer B	3
Ligasa-65	1

Continuando con la reacción del día 2, después de ser inactivada la ligasa, se amplificaron los fragmentos unidos por la ligasa, por medio de una PCR punto final.

Los reactivos que a continuación se presentan en la tabla No.5 se adicionaron a una temperatura de 20 °C.

Tabla No 5. Reactivos y volúmenes utilizados en el MLPA. Día 2. Reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (µL)
dH ₂ O	7.5
SALSA* PCR (Primer-Mix)	2
Salsa* (Polimerasa)	0.5

*Mezcla de reactivos. El nombre es designado por el proveedor.

Los fragmentos amplificados se encontraban marcados con fluorescencia los cuales fueron separados por medio de una electroforesis capilar, utilizando el secuenciador 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems, empleando POP7 de Applied Biosystems como polímero. Este equipo separa los fragmentos por tamaños, de menor a mayor y con ayuda del marcador de peso molecular Gene Scan 500 (con el fluoróforo LIZ) se determinan los pesos moleculares de cada fragmento amplificado. El análisis de los fragmentos se realizó con el software Coffalyser de MRC Holland. Este programa asigna un nombre a cada fragmento dependiendo del tamaño y de la sonda utilizada, realiza una comparación con muestras control, el aumento o disminución de la cantidad de número de copias con respecto al control y arroja una predicción de ganancia o pérdida de material genético.

6. Diseño y características de los primers

Como se mencionó anteriormente, *SHH* posee tres exones de diferente longitud y los primers que se emplearon para amplificar el gen se diseñaron para abarcar por completo cada exón y parte de la región intrónica. Para ello se empleó el software Primer Select de DNASTAR en donde se consideraron condiciones generales del diseño de primers como longitud del cebador, temperatura de alineamiento, contenido guanina y citosina y que ambos sentidos: forward y reverse tuvieran la misma T_m o

una parecida. Asimismo, se evaluó su especificidad mediante la plataforma de Primer Blast del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los diseños específicos para cada región se pueden observar en la tabla 6.

Tabla No 6. Diseño de iniciadores empleados para el gen *SHH*

Región	Secuencia de Primer Forward (F) Reverse (R)		Longitud	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Tm experimental (° C)
Exón 1	F	5'- TCTCCAGGCTTGCTACCATTT -3'	21 nt	678	51.2
	R	5'- CCTGGAAAGCCACACATTC -3'	19 nt		
Exón 2	F	5'- AGGCTAACGTGTCCGTCGGT -3'	20 nt	495	54.4
	R	5'- CCTCAAAGGTAGGGGTGATTT -3'	21 nt		
Exón 3	F	5'- CTCCCTCTCGGAACTCAATG -3'	20 nt	987	57
	R	5'- ACTCAGTCTGGTTCGTGCGCCTT -3'	23 nt		

7. Estandarización de la amplificación de la región exónica de *SHH*

Las condiciones de amplificación para el exón 1 y 3 se estandarizaron empleando la enzima HotStarTaq DNA Polymerase Master Mix de QIAGEN, la cual requiere de un paso inicial de activación por calor (95°C durante 15 min).

El Master Mix incluye la enzima, los dNTPs (dideoxinucleótidos trifosfatados), Buffer de reacción y MgCl₂ (Cloruro de Magnesio), además se agregaron otros compuestos como H₂O grado biología molecular, primers forward y reverse, ambos a una concentración de 10 pmol/uL y DNA control.

Es importante mencionar que el DNA utilizado fue un templado control, el cual ya se había probado su amplificación con esta enzima, y además ya se había analizado y comprobado que no tenía alguna alteración en la secuencia de *SHH*. A continuación, se muestran tablas que indican la composición de cada reacción dependiendo el exón utilizado:

Tabla No 7. Composición de la reacción de PCR punto final para el exón 1.

Reactivo y concentración	Volumen (μL)
HotStarTaq DNA Polymerase	12.5
Primer Forward (10 pmol/ μL)	2.5
Primer Reverse (10 pmol/ μL)	2.5
DNA (30 ng/ μL)	3
H ₂ O	4.5

Tabla No 8. Composición de la reacción de PCR para el exón 2.

Reactivo y concentración	Volumen (μL)
Máster Mix de Bio-Rad	5
Primer forward (10 pmol/ μL)	0.5
Primer Reverse (10 pmol/ μL)	0.5
H ₂ O	3
DNA (30 ng/ μL)	1

Para el exón 2 se utilizó un master mix (mezcla) de Bio-Rad para PCR en tiempo real que contiene un intercalante de bases fluorescente: SYBR[®] Green, el cual satura la doble cadena durante la amplificación del fragmento por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), y más tarde los fragmentos amplificados se analizaron mediante la técnica de Desnaturalización de Alta Resolución (HRM, por sus siglas en inglés “High Resolution Melting”).

Tabla No 9. Composición de la reacción de PCR punto final para el exón 3.

Reactivo y concentración	Volumen (μL)
HotStarTaq DNA Polymerase	5
Primer Forward (10 pmol/ μL)	1
Primer Reverse (10 pmol/ μL)	0.5
DNA (400 ng/ μL)	3
H ₂ O	5
DMSO	0.5
7-deaza (2.5 mM)	0.5

El exón 3, al ser un fragmento grande de 987 bp y tener mayor porcentaje de guanina y citosina, fue necesario el uso de otras sustancias que permitieran la amplificación por punto final, las cuales fueron dimetil sulfóxido (DMSO) y 7-Deaza-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate (7-Deaza).

El 7-Deaza-2'-deoxy-guanosine-5'-triphosphate es un análogo del nucleótido guanina que es un sustrato candidato para la telomerasa procesiva. El uso de este análogo mejora los rendimientos de la PCR. Este compuesto también facilita la secuenciación de regiones ricas en GC, especialmente si la cantidad de plantilla es baja y / o la calidad del DNA no es buena. También se utiliza en los métodos de secuenciación de terminación de cadena de didesoxi, en lugar de dGTP para superar los problemas de compresión en la electroforesis en gel cuando se secuencian tramos de DNA ricos en GC (URL 14).

DMSO es un disolvente aprótico polar utilizado en el área de biología molecular en reacciones de PCR, amplificación de bibliotecas de cDNA (DNA complementario), secuenciación de DNA, tampones de carga de columna para selección de poli (A) + RNA, etc. (URL 15).

Una vez preparada esta reacción, la amplificación se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient de Eppendorf®, y para seguir con la estandarización se realizó una rampa de diferentes temperaturas, para establecer la T_m experimental, de cada exón. También se consideró el tamaño del fragmento para escoger el número de ciclos que componían la PCR.

Ahora bien, como es sabido, la PCR es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión (Tamay de Dios, Ibarra y Velasquillo, 2013).

A continuación, se muestra la figura 10 que corresponde a un gráfico que representa las condiciones y los pasos de la reacción de PCR tiempo final.

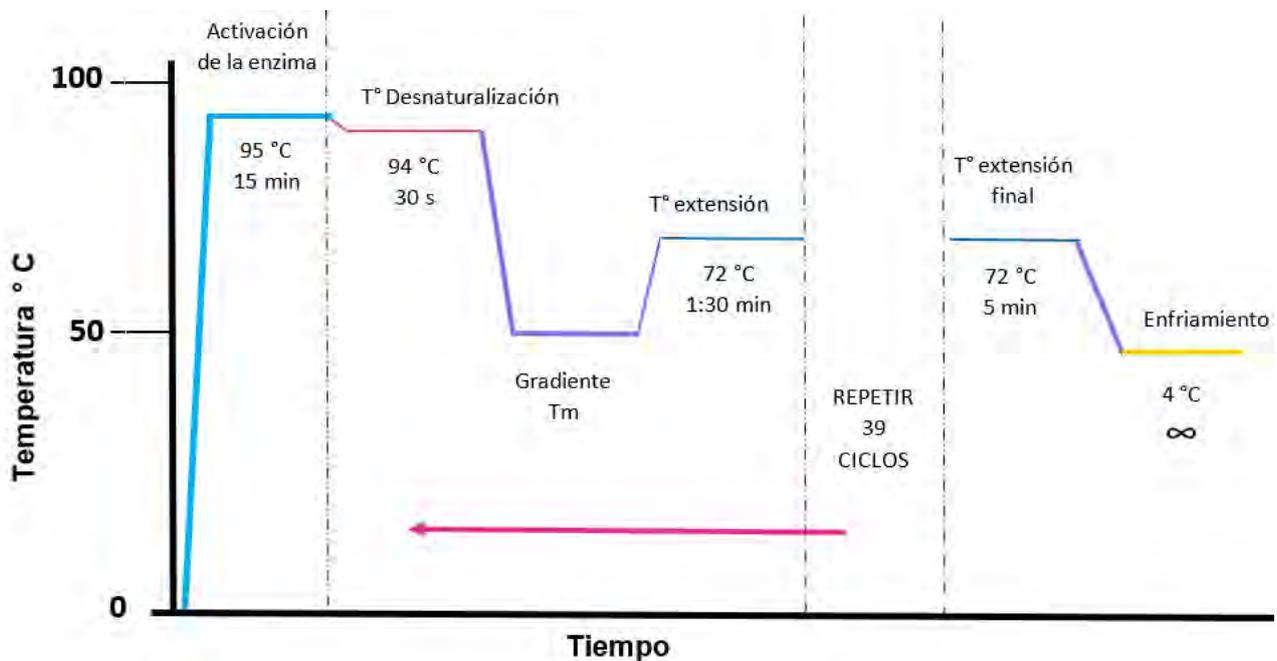


Figura 10. Programa de PCR punto final utilizado en la estandarización y amplificación de la región exónica de SHH.

8. Electroforesis de los productos de PCR obtenidos

La electroforesis del DNA de los fragmentos amplificados se realizó en geles de agarosa al 1.5 % de concentración. Se utilizó el fotoiluminador Fotophoresis I para analizar los productos obtenidos, es decir para visualizar que las amplificaciones si se llevaron a cabo, o el tamaño del fragmento obtenido, y que no hubiera bandas de productos inespecíficos.

A continuación, se presenta la figura 11 que corresponde a los geles de agarosa obtenidos de la estandarización de cada exón.

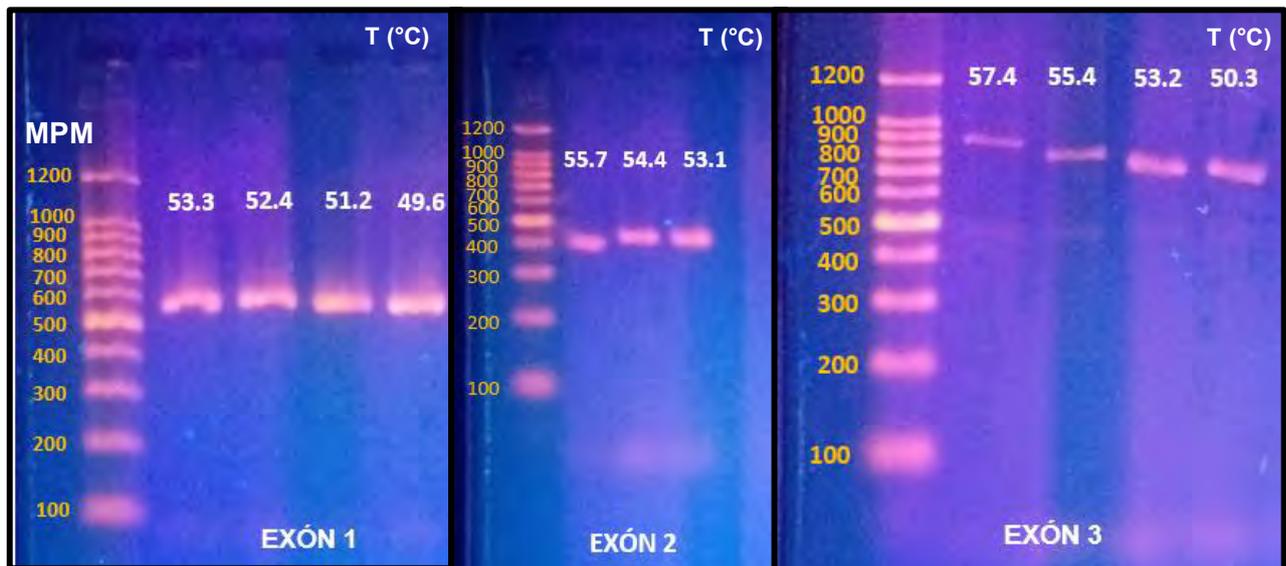


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % con buffer TBE 1X, teñido con GelRed y sometido a un voltaje de 80-90 V. Se observa un gradiente de temperaturas, con la finalidad de escoger la temperatura óptima para la amplificación (se utilizó un DNA stock para realizar la estandarización). Asimismo, se logran visualizar amplificaciones específicas para los exones 1 y 2, obteniendo fragmentos de 600 pb aproximadamente para el exón 1 y de 500 pb para el exón 2. En el caso del exón 3, se obtienen amplificaciones de 900 pb aprox. además, se alcanza a notar una banda muy tenue de aproximadamente 500 pb, no obstante, dicha banda no interfiere en la secuenciación.

9. High Resolution Melting (HRM)

La técnica de Desnaturalización de Alta Resolución (HRM, por sus siglas en inglés “High Resolution Melting”) es un análisis post-PCR que permite no solo detectar la presencia de una secuencia de DNA, si no también identificar variaciones de la secuencia amplificada, lo cual permite genotipificarla directamente. El análisis de HRM mide los cambios en la fusión de un dúplex de DNA y puede discriminar de acuerdo con el contenido de GC, la longitud o complementariedad de las hebras de DNA. Incluso se pueden identificar cambios en una sola base tal como en los SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) (URL 16). Esta técnica se basa en el análisis de las curvas de desnaturalización de productos de PCR, mediante el uso de equipos de PCR en tiempo real y fluoróforos mejorados que se intercalan y saturan el DNA de doble cadena

El exón 2, fue el único que fue analizado por esta técnica, la cual consistió en la preparación de una mezcla de reacción que constó de DNA, Kit Precision Melt

SuperMix™ de Bio-Rad, los primers forward y reverse y el H₂O grado biología molecular (Ver tabla 4). Para comenzar con la estandarización se realizó una rampa de temperaturas para encontrar la temperatura de alineamiento (T_m) óptima, utilizando el programa de amplificación y posterior desnaturalización sugerido por el proveedor (Ver figura 12).

Se realizó la amplificación por PCR en el Thermociclador: Mastercycler gradient de Eppendorf y fue una reacción que duró aproximadamente 2 horas.

Para evaluar la especificidad de los iniciadores se analizaron los picos de desnaturalización (Ver figura 13) resultantes de la desnaturalización o *melting* que se llevó a cabo en el equipo de PCR en tiempo real CFX 96 Touch™, Bio-Rad, reacción que duró aproximadamente 1 hora.

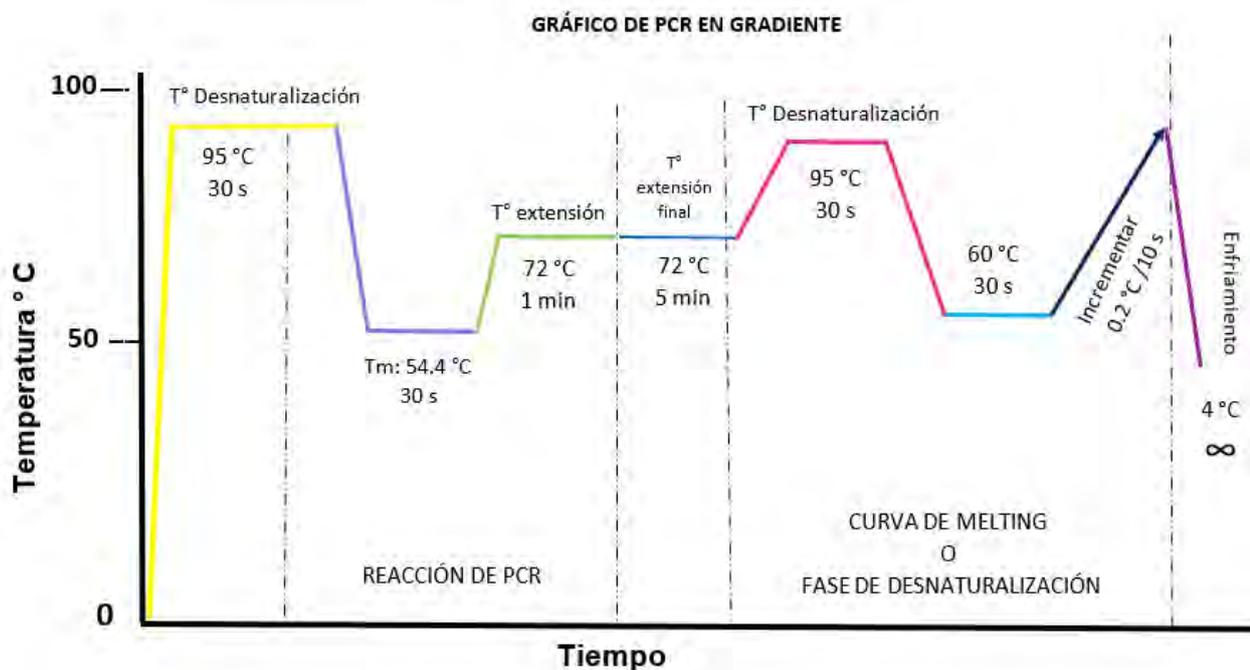


Figura 12. Programa de amplificación y posterior desnaturalización para la técnica de HRM. Primero se realizó la reacción de PCR, y posteriormente se elevó la temperatura a 95 °C durante 30 segundos y después descendió a 60 °C, la temperatura se incrementó de forma gradual a partir de este punto, incrementando 0,2 °C cada 10 segundos y midiendo la fluorescencia cada uno de estos incrementos.

De preferencia debe observarse un solo pico en la curva de desnaturalización, aunque existe la posibilidad de que se observe más de un pico a pesar de que la reacción sea específica debido a las estructuras secundarias formadas por los iniciadores.

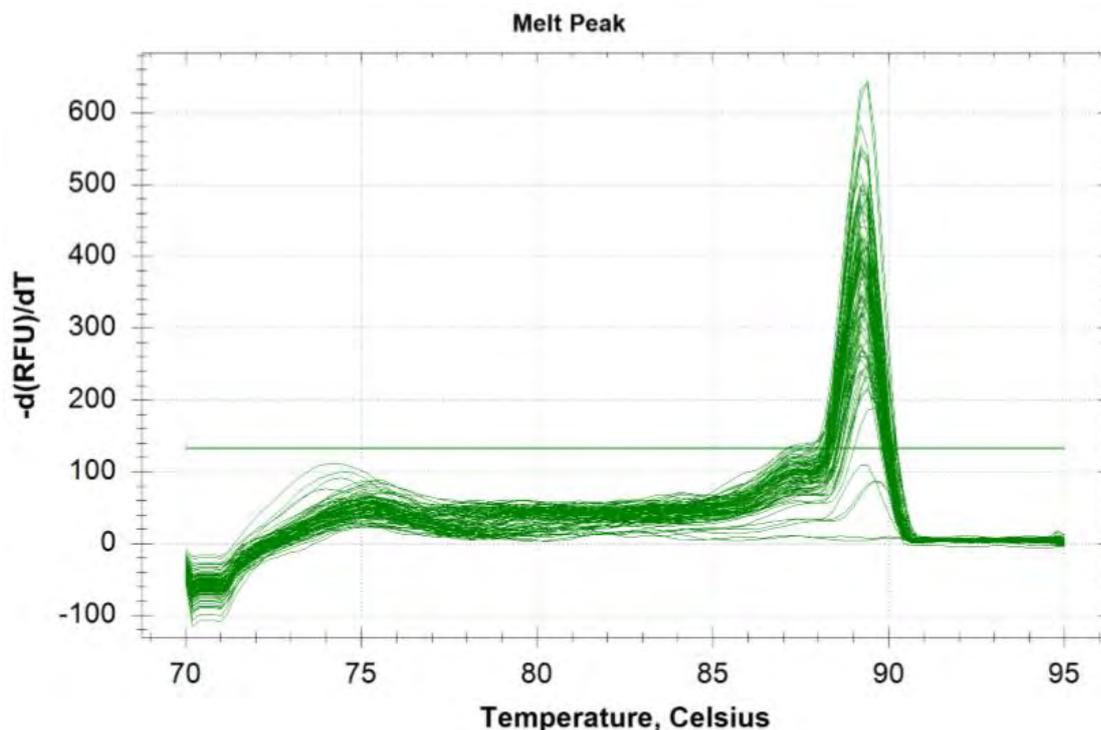


Figura 13. Curva de desnaturalización. El programa permite obtener además de la curva de desnaturalización una gráfica que representa el diferencial de las unidades relativas de fluorescencia sobre el diferencial de tiempo en el eje de las ordenadas (y) y la temperatura en °C en el eje de las abscisas (x), lo que permite detectar un “cambio brusco” en la fluorescencia de cada muestra, que se representa como un pico único de desnaturalización.

Los datos obtenidos de las curvas de desnaturalización se analizaron con el software Precision Melt Analysis™ v1.3 de Bio-Rad, con el cual se obtuvo distintos clústeres o patrones diferentes de secuencias (Figura 14). Después se secuenció las muestras más representativas de cada clúster.

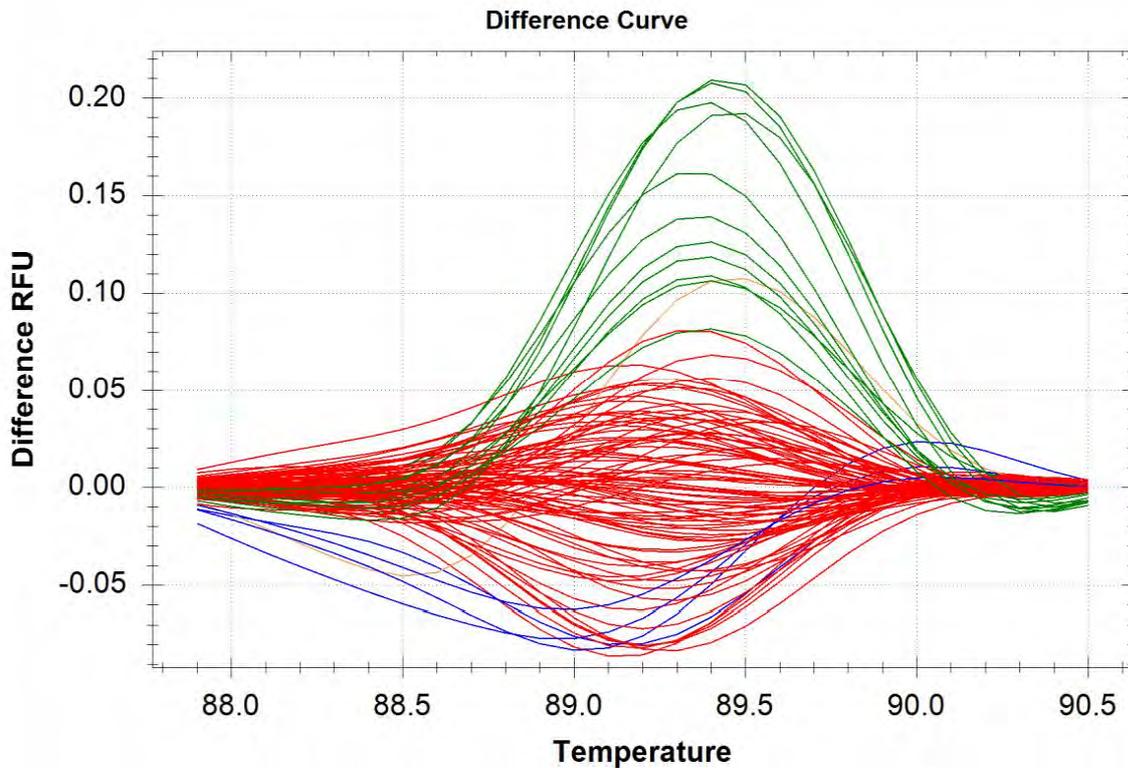


Figura 14. Curva diferencial de desnaturalización. Este gráfico muestra la diferencia en fluorescencia entre un pozo y la fluorescencia de una curva de referencia. La curva de referencia se deriva de la fluorescencia promedio de todas las curvas dentro de un grupo de referencia seleccionado. Sirve para una fácil identificación visual de los clústeres debido a que los agrupa en diferentes colores. En la figura se observa un total de 4 clústeres (rojo, azul, verde y naranja).

10. Purificación con Exonucleasa

Para efectuar la reacción de secuenciación, se purificaron los fragmentos obtenidos en la PCR punto final y los de la placa de melting, por medio del reactivo de limpieza de productos de PCR ExoSAP-IT™. Esta es una enzima exonucleasa que hidroliza el exceso de cebadores, enzimas y nucleótidos no incorporados enzimáticamente, es decir cualquier fragmento de DNA monocatenario.

A continuación, se presenta la tabla 10 con los reactivos y volúmenes específicos de la reacción.

Tabla No 10. Composición de la reacción de ExoSAP-IT™.

Reactivo	Volúmenes (µL)
ExoSAP-IT	1
H ₂ O	4
Producto de PCR	2

La reacción se efectuó en dos pasos (Ver figura 15): La primera incubación digiere el cebador en exceso y desfosforila los nucleótidos y se llevó a cabo a 37 °C durante 15 min. y la segunda incubación a 80°C, 15 min. inactiva a la Exonucleasa.

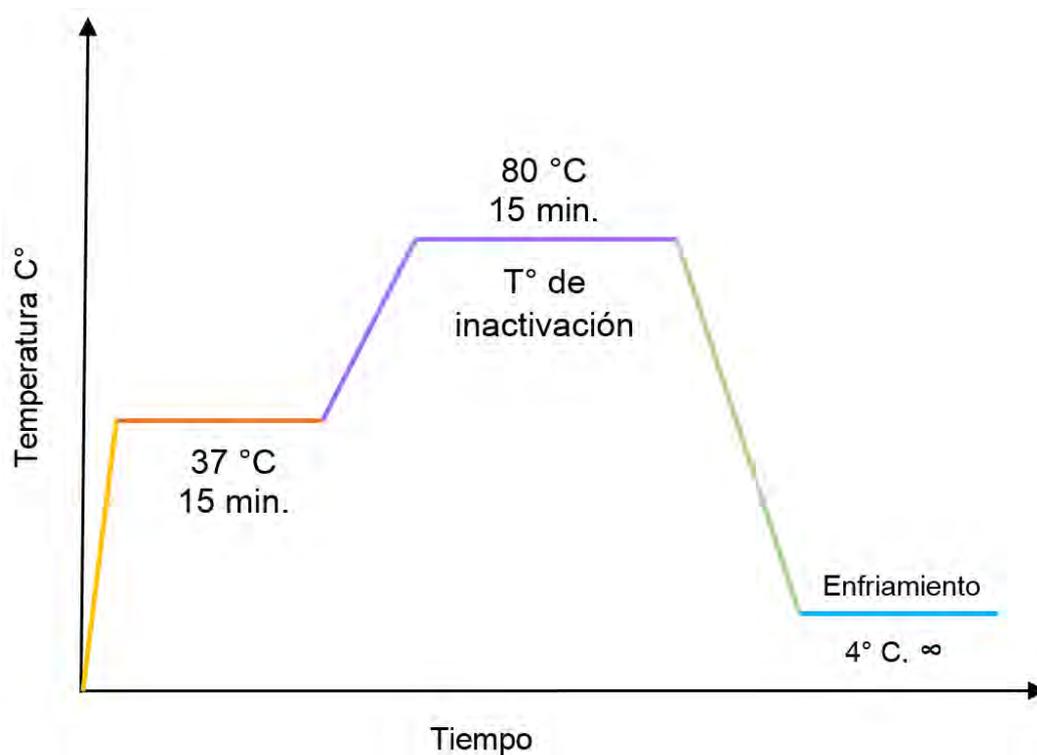


Figura 15. Gráfico de temperaturas e incubación empleado para la purificación por ExoSAP-IT®

11. PCR de Secuencia

Una vez purificado el producto de PCR, se realizó la reacción de secuenciación (Ver figura 16), para la cual se empleó el kit BigDye® v3.1 Terminator Sequencing Cycle (Applied Biosystems). Dicho kit posee el Sequencing Buffer 5X, y del BigDye®, aunque la reacción también consta de H₂O grado biología molecular y primers (dependiendo el sentido en el cual se quiere secuenciar).

A continuación, se presenta la tabla 11 con los reactivos y volúmenes específicos de la reacción:

Tabla No 11. Composición de la reacción de secuenciación.

Reactivos y concentración	Volumen (µL)
Producto de ExoSAP-IT	7
H ₂ O	7
Sequencing Buffer 5X	3
Primer (Forward o Reverse) (3.2 mM)	1
BigDye®	2

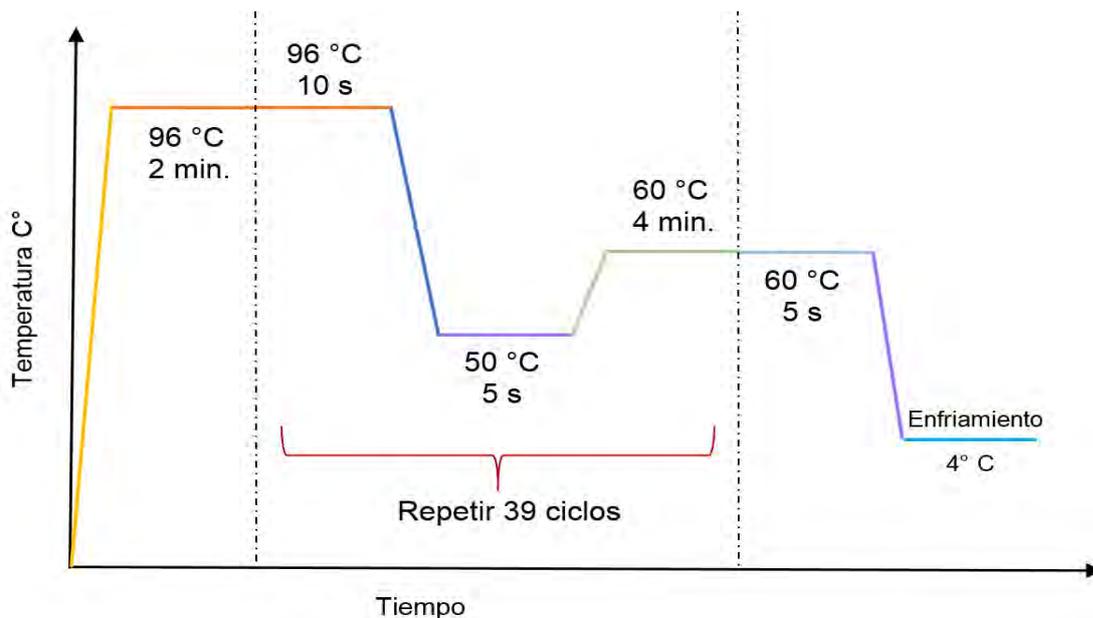


Figura 16. Esquema de amplificación empleado para la PCR de secuencia.

12. *Purificación con columnas del kit Dye Ex 2.0*

Las reacciones de secuenciación se purificaron empleando el kit Dye Ex 2.0 Spin kit de Qiagen. Este kit se compone de columnas con material de filtración en gel, en el que quedan retenidos los nucleótidos terminadores que no se incorporaron en la PR de secuencia.

Las columnas se centrifugaron a 2500 RPM durante 2:30 min con el fin de quitar el buffer en las que se encuentran hidratadas, después con una micropipeta se pasó el contenido del tubo de la reacción de PCR de secuencia, con cuidado de no perforar la columna, y de pasar el líquido lentamente por el centro de ésta.

Después se repitió la centrifugación, con el mismo tiempo y revoluciones utilizadas anteriormente, con el propósito de pasar la muestra por la columna y efectuar la purificación.

Los productos filtrados fueron secados, colocándolos en el ThermoMixer®, a una temperatura de 85° C durante 15-20 min.

13. *Secuenciación*

A los productos de secuenciación se les agregó 15 uL de formamida, con el propósito de evitar la evaporación durante su análisis en el secuenciador, y de preservar la muestra en la placa en caso de necesitarlos después.

Finalmente se corrieron en el secuenciador capilar ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems (Ver figura 17).

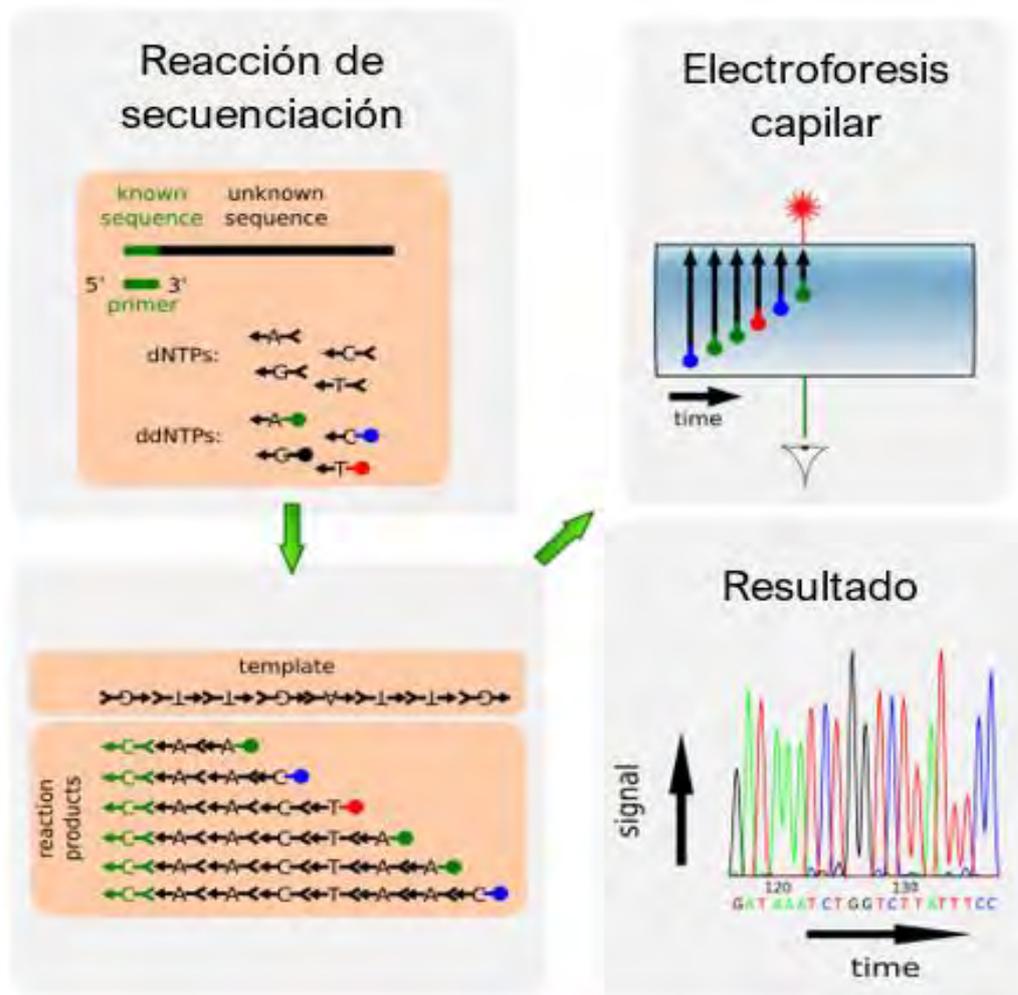


Figura 17. Representación gráfica de la reacción de secuenciación y obtención de resultados (electroferograma). (Figura recuperada del URL 17).

14. Análisis Bioinformático

Las ambigüedades presentes en las secuencias obtenidas con los primers Forward y Reverse se resolvieron con la finalidad de obtener una secuencia consenso para cada región en estudio empleando el software BioEdit v.7.2. Después dichas secuencias consenso se alinearon contra todas las secuencias presentes en la base de datos del NCBI utilizando la plataforma de Nucleotide Blast (nBlast).

Posteriormente, las secuencias en las que se encontraron alguna variante (cambio de base, delección, inserción etc) con respecto a la secuencia genómica de referencia de *SHH* de la especie *Homo sapiens*, se ingresaron a herramientas bioinformáticas como

Mutalyzer Human Variation del NCBI, para observar la nomenclatura correcta y para predecir si la variante genética era capaz de generar un cambio a nivel de la secuencia de aminoácidos en la proteína.

Asimismo, cada variante que sí generó un cambio, se analizó con el programa bioinformático PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) que predice el efecto de una variante sobre una proteína, ésta herramienta asigna un score o puntuación entre 0.0 y 1.0 a cada variante, y las que presentan un score igual o menor a 0.45 se consideran benignas, las variantes que presentan un score mayor a 0.45 y menor a 0.85 son consideradas como posiblemente patogénicas y por último las variantes que poseen un score mayor o igual a 0.85 se consideran probablemente dañinas.

Panther a su vez, estima la probabilidad de que un SNP codificador no sinónimo particular, cause un impacto funcional en la proteína; ya que calcula el período de tiempo (en millones de años) que un aminoácido dado se ha conservado en el linaje que conduce a la proteína de interés. Cuanto más largo sea el tiempo de conservación, mayor será la probabilidad de impacto funcional.

También, se utilizó SIFT, que predice si una sustitución de aminoácidos afecta la función de la proteína en función de la homología de secuencia y las propiedades físicas de los aminoácidos.

Por el contrario, las variantes que no provocan un cambio de producto proteico, se analizó con el programa Human Splicing Finder 3.0 para determinar si no causan un efecto en zonas reguladoras.

Para los polimorfismos que se encuentran reportados, se analizaron en la base de datos Ensembl, con la herramienta Variant Effect Predictor (VEP) que ayuda para predecir las consecuencias funcionales de variantes conocidas.

M. RESULTADOS

Se estudiaron 63 muestras de pacientes con diagnóstico de microcefalia no infecciosa con cariotipo normal, y con resultados negativos a anomalías cromosómicas en el MLPA (mix de regiones subteloméricas y mix de regiones pericentroméricas). La cifra total de muestras estudiadas dependió de la cantidad de muestras otorgadas por la Dirección General de Epidemiología.

Para el caso del exón 1 se contó con una n de 40, y para el exón 2, un total de 63 muestras de DNA. La diferencia del número total de muestras analizadas entre los dos exones se debió a la cantidad, concentración y pureza del material genético con el que se contaba de cada muestra.

En dicha población de estudio se encontraron un total de 11 diferentes variantes dentro del gen *SHH* (ver tabla 12 y 13), de las cuales 5 resultaron en un cambio de aminoácidos, por lo cual se analizaron con el programa bioinformático PolyPhen-2 para observarse el efecto de las variantes sobre la proteína que codifica este gen.

En la tabla 12 se resumen las variantes no sinónimas encontradas. Asimismo, se muestra su descripción y significado molecular predecido en Mutalyzer y PolyPhen-2 así como también la predicción que arroja SIFT y Panther en el caso de las variantes que provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos.

Las 6 variantes restantes no provocaron cambio en la secuencia de aminoácidos debido a que se produjeron en la región intrónica (Tabla 13), no obstante, se analizaron con la herramienta Human Splicing Finder 3.0 (<http://www.umd.be/HSF/>) para predecir si éstas afectan los sitios de splicing.

Tabla 12. Variantes encontradas en el exón 1 y 2 de SHH que provocan un cambio de aminoácido (missense mutation o mutación con cambio de sentido.

EXÓN 1					
No de muestra	Variante	Mutalyzer	PolyPhen-2	SIFT	Panther
2	NG_007504.2:g.5265 dup	Se genera un cambio de una Leu por Ala en la posición 39. Y 25 codones después aparece un codón de paro prematuro,	Mutación probablemente dañina (score de 0.999)	Se predice que la sustitución AFECTA LA FUNCION DE LA PROTEINA con un puntaje de 0.00.	Probablemente dañino. PSEP: 1036 Ma
71	NG_007504.2:g.5174 T>C	Se genera un cambio de una Leu por Pro en la posición 8.	Mutación benigna (score de 0.303)	Se predice que la sustitución AFECTA LA FUNCION DE LA PROTEINA con un puntaje de 0.02.	Probablemente dañino. PSEP: 455 Ma
137	NG_007504.2:g.5362 G>C	Se genera un cambio de una Glu por Gln en la posición 71	Mutación probablemente dañina (score de 0.999)	Se predice que la sustitución se TOLERARÁ con un puntaje de 0.10.	Probablemente dañino. PSEP: 750 Ma
EXÓN 2					
10	NG_007504.2: g.10901 C>T	Se genera un cambio de una Ala por Val en la posición 162.	Probablemente dañino (score de 1.000)	Se predice que la sustitución AFECTA LA FUNCION DE LA PROTEINA con un puntaje de 0.00.	Probablemente dañino. PSEP: 1036 Ma
104	NG_007504.2: g.10729A>C	Se genera un cambio de una Lys por Gln en la posición 105.	Probablemente dañino (score de 0.994)	Se predice que la sustitución AFECTA LA FUNCION DE LA PROTEINA con un puntaje de 0.01.	Posiblemente dañino. PSEP: 362 Ma

PSEP: Preservación evolutiva específica de posición

Ma: Millones de años

Tabla 13. Variantes sinónimas encontradas en el exón 1 y 2 de SHH.

EXÓN 1		
No de muestra	Variante	Descripción
100	NG_007504.2:g.4876 dup	Se duplica una G en la región no codificante
104	NG_007504.2:g.5119_5119dup	Se duplica una G en la región no codificante.
115	NG_007504.2:g.5027G>A	Se encuentra un cambio de una G por una A en la región intrónica.
137	NG_007504.2:g.4979A>G	Hay un cambio de una A por una G en la región intrónica.
	NG_007504.2:g.4977 C>G	Se encuentra un cambio de una C por una en la región intrónica.
142	NG_007504.2:g.5027G>A	Existe un cambio de una G por una A en la región no codificante.
EXÓN 2		
1, 2, 4, 5, 7,8,10,11,15,16,35,92, 131, 135, y 140	NG_007504.2: g.10729A>C	Se encuentra un cambio de una T por una G, en una zona que no pertenece al CDS.

Estas variantes también se analizaron en Mutalyzer, encontrando que no provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos debido a que se localizan en regiones no codificantes. (Los datos no se muestran). Se puede observar que la variante NG_007504.2: g.10729A>C se halló en el exón 2 en varias muestras analizadas.

Cada variante, al ser de un sólo nucleótido se buscó en la base de datos dbSNP, para saber si ya se encontraba reportada. Los resultados se muestran en la tabla que a continuación se presenta (Ver tabla 14).

Tabla 14. Total de variantes encontradas en SHH y su estado en dbSNP (NCBI).

Gen	Variante	ID dbSNP
SHH	EXÓN 1	
	NG_007504.2:g.5265 dup	No reportada
	NG_007504.2:g.5174 T>C	rs938130628
	NG_007504.2:g.4876 dup	No reportada
	NG_007504.2:g.5119_5119 dup	No reportada
	NG_007504.2:g.5027 G>A	rs9333594
	NG_007504.2:g.4979 A>G	No reportada
	NG_007504.2:g.4977 C>G	No reportada
	NG_007504.2:g.5362 G>C	No reportada
	EXÓN 2	
	NG_007504.2:g.11089 T>G	rs1233554
	NG_007504.2: g.10901 C>T	No reportada
	NG_007504.2: g.10729 A>C	No reportada

Se puede observar que la mayoría de las variantes encontradas en este estudio no se encuentran reportadas en la base de datos dbSNP del NCBI, además de que la mayoría fueron halladas en el exón 1.

A continuación, se muestran las representaciones gráficas de algunas de las variantes encontradas en la secuenciación, y el posterior alineamiento de la secuencia obtenida y la secuencia de referencia en nucleotide BLAST (Figuras 18 a 22).

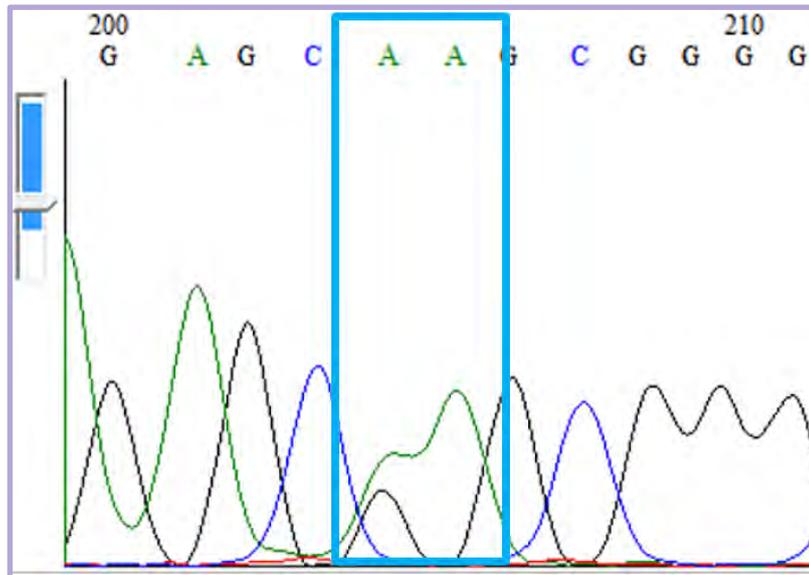


Figura 18. Electroferograma de la variante heterocigota hallada en el exón 1 del gen *SHH*. En el recuadro azul se observan dos diferentes picos pertenecientes a una adenina y una guanina en una sola posición: NG_007504.2:g.5027G>A.

Homo sapiens sonic hedgehog signaling molecule (*SHH*), RefSeqGene on chromosome 7
 Sequence ID: [NG_007504.2](#) Length: 19290 Number of Matches: 1

Range 1: 4911 to 5231 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
575 bits(637)	7e-160	320/321(99%)	0/321(0%)	Plus/Plus
Query 3	G C A G C C T G C C A T T C C A G C C C C T G T C T G G G T G G G G A G C G G T G G A G A G T C C C C C G C A G C C G C	62		
Sbjct 4911	G C A G C C T G C C A T T C C A G C C C C T G T C T G G G T G G G G A G C G G T G G A G A G T C C C C C G C A G C C G C	4970		
Query 63	G G C G G G C A A G T T A T A T A G G A A G A G A A A G A G C G A G G C A G C C A g c g a g g g a g a g a g t a a g c	122		
Sbjct 4971	G G C G G G C A A G T T A T A T A G G A A G A G A A A G A G C G A G G C A G C C A G C G A G G G A G A G A G t G A G C	5030		

Figura 19. Alineamiento en BLASTn. En el recuadro se visualiza el cambio de bases que se muestra en el electroferograma de la figura 18. Cuando no existe una línea vertical entre ambas secuencias, significa una sustitución de bases.

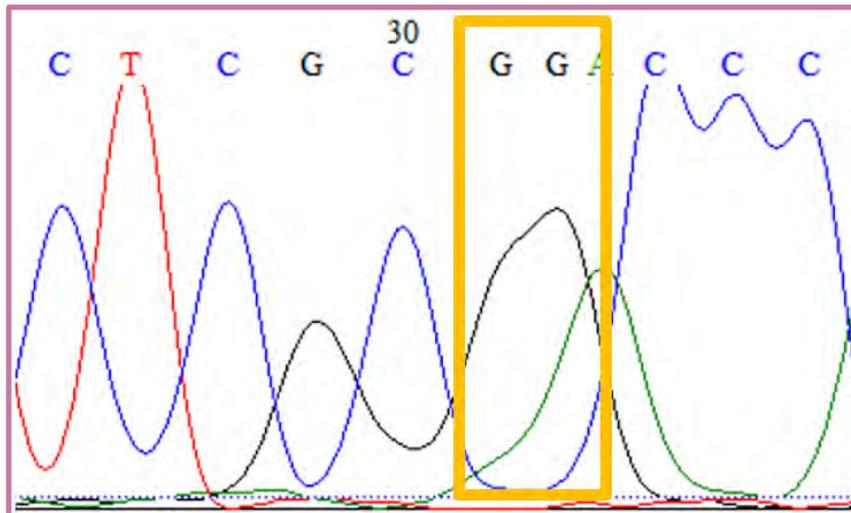


Figura 20. Electroferograma de la variante encontrada en el exón 1 del gen *SHH*. En el recuadro amarillo se observa un pico del doble de ancho perteneciente a una guanina, en el cual gracias al programa *Name Checker* de *Mutalyzer*, se logra identificar que se trata de una duplicación de esta base: NG_007504.2:g.4876 dup.

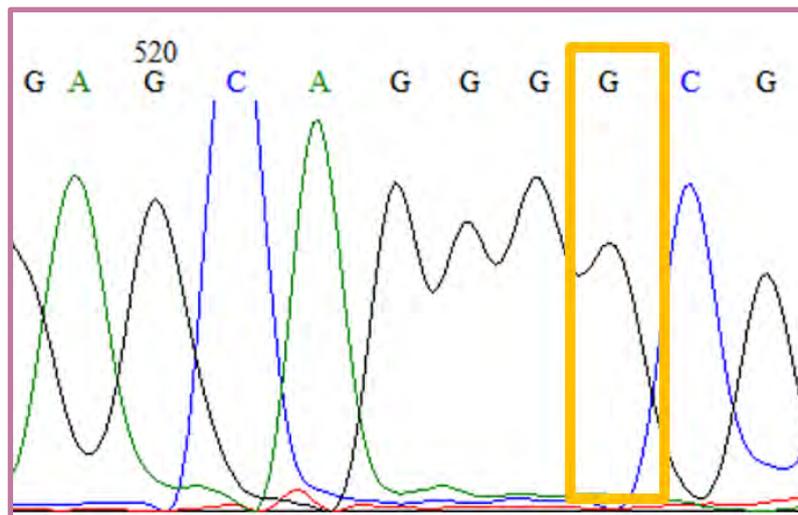


Figura 21. Electroferograma de la variante homocigota encontrada en el exón 2 del gen *SHH*. En el recuadro amarillo se observa un pico perteneciente a una guanina, no obstante, al alinearlo en BLASTn indica que debería estar una timina en esa posición.

Homo sapiens sonic hedgehog signaling molecule (SHH), RefSeqGene on chromosome 7
Sequence ID: [NG_007504.2](#) Length: 19290 Number of Matches: 1

Range 1: 10720 to 11125 [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match & Previous

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
728 bits(807)	0.0	405/406(99%)	0/406(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGTAAGGACAAGTTGAACGCTTTGGCCATCTCGGTGATGAACCAGTGGCCAGGAGTGAAA	60		
Sbjct 10720	TGTAAGGACAAGTTGAACGCTTTGGCCATCTCGGTGATGAACCAGTGGCCAGGAGTGAAA	10779		
Query 61	CTGCGGGTGACCGAGGGCTGGGACGAAGATGGCCACCACTCAGAGGAGTCTCTGCACTAC	120		
Sbjct 10780	CTGCGGGTGACCGAGGGCTGGGACGAAGATGGCCACCACTCAGAGGAGTCTCTGCACTAC	10839		
Query 121	GAGGGCCGCGCAGTGGACATCACCACGTCTGACCGCGACCGCAGCAAGTACGGCATGCTG	180		
Sbjct 10840	GAGGGCCGCGCAGTGGACATCACCACGTCTGACCGCGACCGCAGCAAGTACGGCATGCTG	10899		
Query 181	GCCCCCTGGCGGTGGAGGCCGGCTTCGACTGGGTGTACTACGAGTCCAAGGCACATATC	240		
Sbjct 10900	GCCCCCTGGCGGTGGAGGCCGGCTTCGACTGGGTGTACTACGAGTCCAAGGCACATATC	10959		
Query 241	CACTGCTCGGTGAAAGCAGGTAAGCTGGCCCTGGCCCCCGGATCCGACCCAAGGAAGGC	300		
Sbjct 10960	CACTGCTCGGTGAAAGCAGGTAAGCTGGCCCTGGCCCCCGGATCCGACCCAAGGAAGGC	11019		
Query 301	CATTGGCGCACCTCGGCTTGATTCAAGAGAAAAAGAAACCTGGGGGGAGGCTGAGGGCCA	360		
Sbjct 11020	CATTGGCGCACCTCGGCTTGATTCAAGAGAAAAAGAAACCTGGGGGGAGGCTGAGGGCCA	11079		
Query 361	GGAGCAGG GG GCTGGGCGATGACTGCGTTTCCGCGGTGGAACCTG	406		
Sbjct 11080	GGAGCAGG TC GCTGGGCGATGACTGCGTTTCCGCGGTGGAACCTG	11125		

Figura 22. Alineamiento en BLASTn. En el recuadro rojo se visualiza el cambio de bases que se muestra en el electroferograma de la figura X: NG_007504.2:g.11089T>G. Cabe señalar que esta variante se encontró en varias muestras analizadas.

VARIANTES CON CAMBIO DE AMINOÁCIDO

Como se mencionó anteriormente, se utilizó también Polyphen-2 en las variantes encontradas y que al analizarse con el software Mutalyzer, revelaron que provocan el cambio de un aminoácido por otro.

En el caso de la mutación NG_007504.2:g.5265 dup, se genera un cambio de una leucina por una alanina, debido a la duplicación de una guanina en la posición 39 de la proteína que codifica SHH. Según la predicción, está mutación es probablemente dañina.

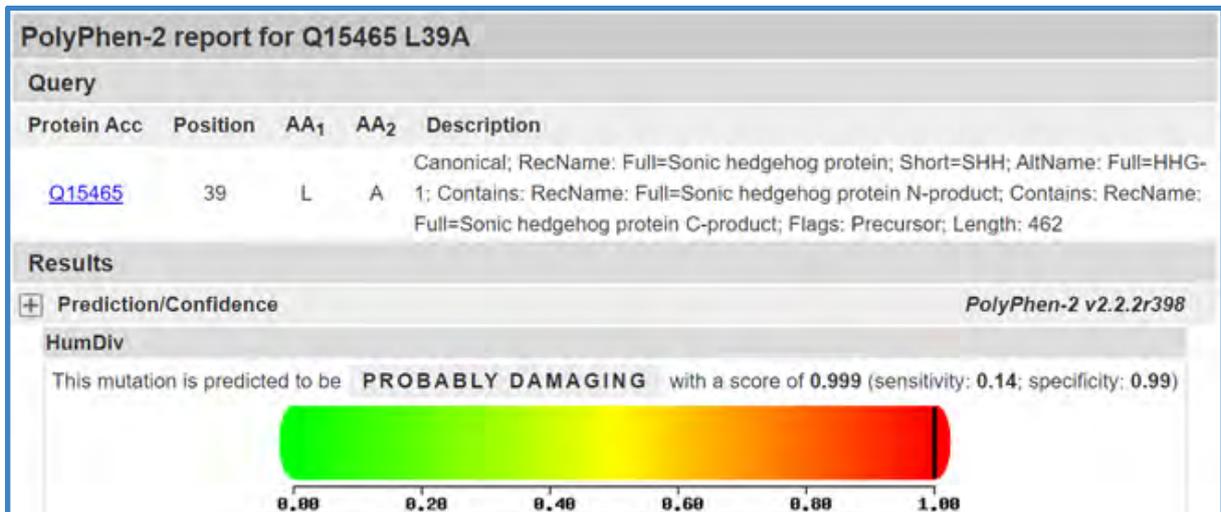


Figura 23. Predicción de PolyPhen para la variante NG_007504.2:g.5265 dup. Se observa que la mutación es probablemente dañina, con un puntaje de 0.999.

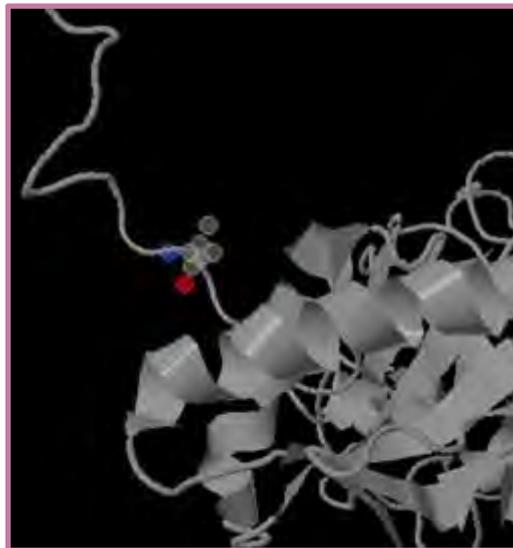


Figura 24. Visualización en 3D de la proteína afectada en la predicción de PolyPhen de la variante NG_007504.2:g.5265 dup.

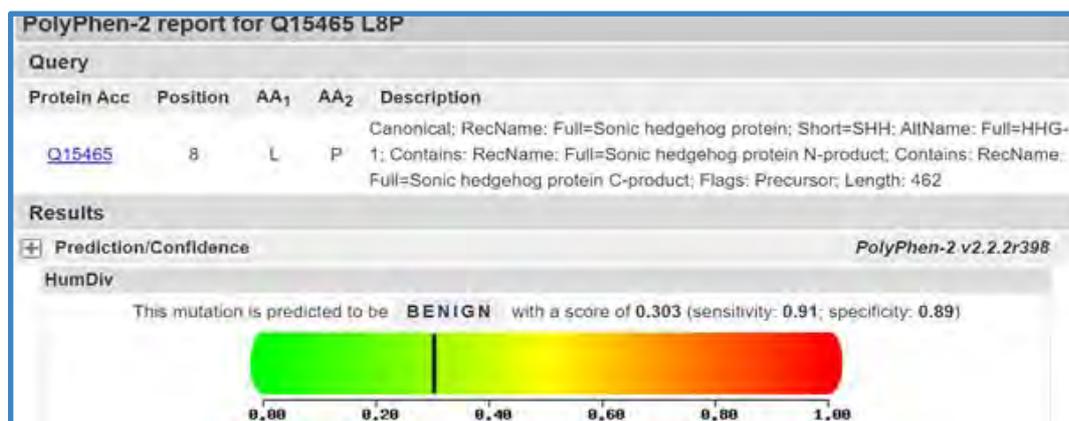


Figura 25. Predicción de PolyPhen para la variante NG_007504.2:g.5174 T>C. Se observa que la mutación es benigna, con un puntaje de 0.303.

VARIANTES SINÓNIMAS

Tabla 15. Análisis *in silico* de las variantes intrónicas en la herramienta bioinformática *Human Splicing Finder*.

No DE MUESTRA	VARIANTE	ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> EN HSF
100	NG_007504.2: g.4876 dup	La mutación ocurre en las posiciones intrónicas profundas. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i>)
104	NG_007504.2: g.5119_5119dup	La variante crea una activación de un sitio aceptor críptico intrónico. Posible alteración del <i>splicing</i> . También existe una alteración (rompimiento) de un sitio intrónico de ESS (Silenciador de <i>Splicing</i> exónico), no obstante, probablemente no haya impacto en el <i>splicing</i> .
115	NG_007504.2: g.5027G>A	Existe un rompimiento de un sitio intrónico de ESS, probablemente no haya impacto en el <i>splicing</i> .
137	NG_007504.2: g.4977 C>G	Esta variante probablemente no tenga impacto en las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i>)
	NG_007504.2: g.4979A>G	Existe un rompimiento de un sitio intrónico de ESS, probablemente no haya impacto en el <i>splicing</i> .
142	NG_007504.2: g.5027G>A	Existe un rompimiento de un sitio intrónico de ESS, probablemente no haya impacto en el <i>splicing</i>
1, 2, 4, 5, 7,8,10,11,1516,35,92, 131, 135, y 140	NG_007504.2: g.11089T>G	La mutación ocurre en las posiciones intrónicas profundas. No afecta las zonas de <i>splicing</i> (puntos naturales de corte ni <i>branch points</i>)

En la tabla se distingue que solo en la variante NG_007504.2: g.5119_5119dup existe la posibilidad de alterar el *splicing*, debido a que se crea una activación de un sitio aceptor críptico intrónico. Todas las demás variantes no provocan un impacto en zonas de *splicing*, según esta base de datos.

Human Splicing Finder es una herramienta que está destinada a ayudar a estudiar el *splicing* previo al mRNA, a continuación, se presenta una figura que muestra el resultado que arroja esta base de datos.

Predicted signal	Prediction algorithm	cDNA Position	Interpretation
New Acceptor Site	1 - HSF Matrices		Activation of an intronic cryptic acceptor site. Potential alteration of splicing.
ESS Site broken	1 - Sironi et al - Motif 1		Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing.
	2 - ESR Sequences from Goren et al		

Figura 26. Alteración en el *splicing* por la variante NG_007504.2: g.5119_5119dup. Crea una activación de un sitio aceptor críptico intrónico y por lo tanto, hay un posible alteración del *splicing*. También existe una alteración (rompimiento) de un sitio intrónico de ESS (Silenciador de *Splicing* exónico), no obstante, probablemente no haya impacto en el *splicing*.

Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP)

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la búsqueda de los SNP encontrados en la base de datos Ensembl:

Categoría	Contar
Variantes procesadas	1
Variantes filtradas	0 0
Novela / variantes existentes	0 (0.0) / 1 (100.0)
Genes superpuestos	2
Transcripciones superpuestas	11
Características reguladoras superpuestas	1

Consecuencias (todas)

- upstream_gene_variant: 75%
- missense_variant: 17%
- regulatory_region_variant: 8%

Consecuencias de codificación

- missense_variant: 100%

Vista previa de resultados

🔍 Navegación (por variante)

Página: 1 de 1 | Mostrar: 1 Todas las variantes

🔍 Filtros

Variante cargada es definido Añadir

📄 Descargar

Todos: [BioMart: varian](#)

Mostrar / ocultar columnas (15 ocultas)

Variante cargada	Ubicación	Consecuencia	Impacto	Símbolo	Gene	Tipo de característica	Característica	Biotipo	Exón
rs938130628	Z:155812100-155812100	missense_variant	MODERAR	SHH	ENSG00000164690	Transcripción	ENST00000297261.7	codificación de proteínas	1/3
rs938130628	Z:155812100-	upstream_gene_variant	MODIFICADOR	SHH	ENSG00000164690	Transcripción	ENST00000430104.5	codificación de proteínas	-

Figura 27. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante (VEP) de Ensembl pertenecientes al rs938130628. Se muestra el resumen estadístico, las gráficas de consecuencias y la tabla de resultados que incluyen varias columnas de información acerca de la variante analizada.

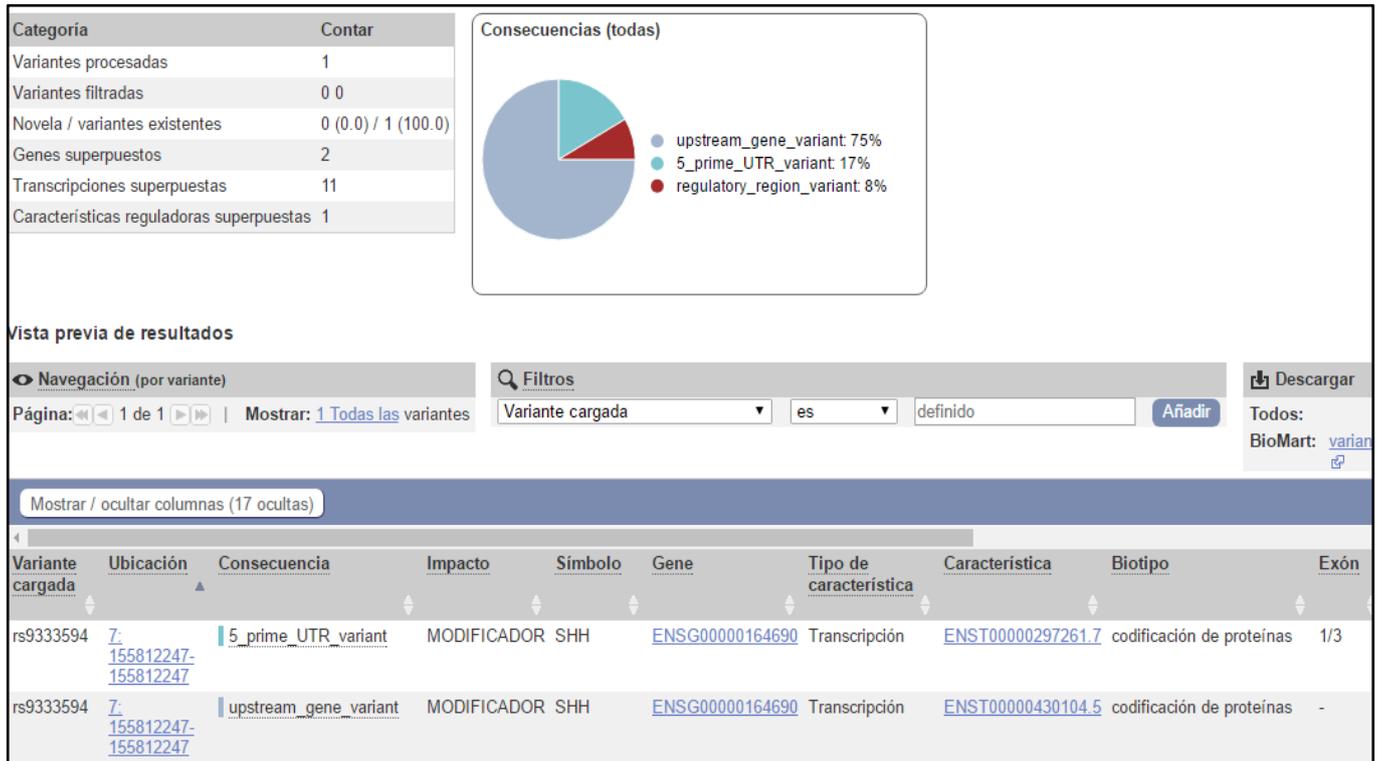


Figura 28. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante VEP de Ensembl pertenecientes al rs9333594.

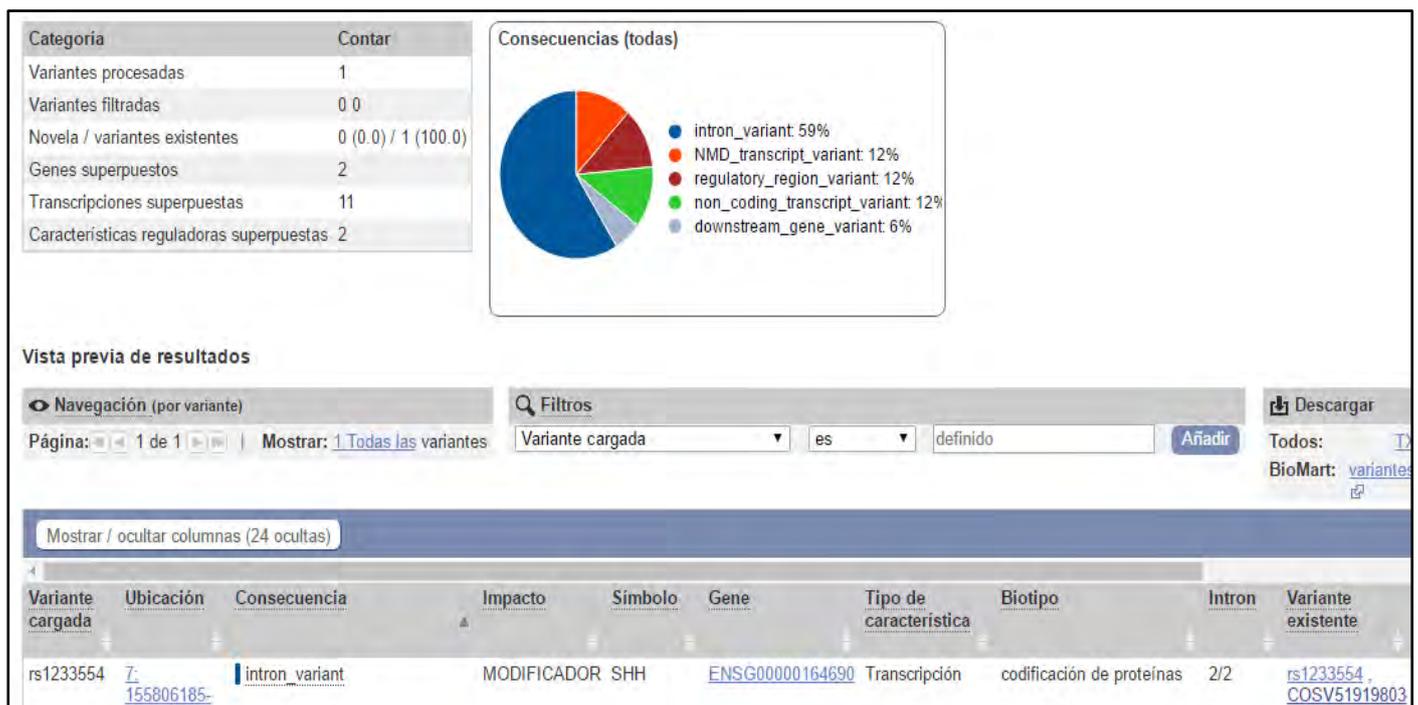


Figura 29. Resultados de la herramienta predictor del efecto variante VEP de Ensembl pertenecientes al rs1233554.

N. DISCUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, la microcefalia es un signo clínico que se encuentra descrito en cientos de síndromes genéticos por lo que su etiología no corresponde a la alteración de un solo gen en particular.

En este estudio, se eligió analizar a *Sonic Hedgehog* debido a su papel importante como gen morfogénico. Los morfógenos son moléculas de naturaleza orgánica que es producida y secretada por un grupo de células embrionarias y que pueden difundir y actuar a distancia sobre otras células como señales posicionales que controlan el destino celular en el embrión, es decir, regula la expresión diferencial de genes de una manera dependiente de la concentración (Rojas, Signore y Mejias, 2014).

Debido a lo anterior, *Sonic* es determinante en el correcto desarrollo del sistema nervioso central, siendo lógico que alteraciones en su secuencia provoquen desórdenes neurológicos de suma importancia clínica.

De las 11 variantes que se encontraron en los exones 1 y 2 de *SHH* (ver tabla 12 y 13), 5 resultaron en un cambio de aminoácidos, es decir son variantes no sinónimas debido a que los cambios en las bases dan lugar a un nuevo aminoácido, generando cambios estructurales o funcionales en la secuencia de la proteína.

Como se mencionó en la metodología, cada variante que originó un cambio en la secuencia proteica se analizó con la base de datos PolyPhen-2 la cual arroja resultados prediciendo el posible impacto de estos cambios. La mayor parte de la variación genética humana está representada por SNPs (polimorfismos de un sólo nucleótido) y se cree que muchos de ellos causan diferencias fenotípicas entre los individuos humanos. Esta base de datos se centra específicamente en SNPs no sinónimos (nsSNPs) (URL 18)

PolyPhen-2 asigna un score o puntuación entre 0.0 y 1, si el score ≤ 0.45 la variante se considera benigna, > 0.45 y > 0.85 posiblemente dañina y ≤ 0.85 probablemente dañina, y en cuatro de estas variantes se predijo que la sustitución de aminoácidos provoca una mutación probablemente dañina con scores que tienen un puntaje desde 0.994 a 1.00, lo que significa que probablemente el cambio que genera en el producto proteico de *SHH* afecte directamente en su función o estructura.

La variante NG_007504.2:g.5174 T>C se encuentra reportada en dbSNP (base de datos de polimorfismo de nucleótido único) que es un recurso en línea único que contiene todas las variaciones genéticas identificadas, aunque el nombre de la base de datos implica una colección de una sola clase de polimorfismos (SNP), de hecho contiene un rango de variación molecular: pequeños polimorfismos de inserción y eliminación cortos (indels / DIP), repeticiones en tándem cortas (STR), secuencias heterocigotas no caracterizadas y variantes con nombre. (Sherry, 2001) Además, esta variante provoca un cambio de una Leucina por una Prolina en la posición número 8 (Leu8Pro) y al analizarla con SIFT, herramienta que analiza en aminoácido en cuestión de acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, predice que la sustitución no se tolerará con un puntaje de 0.02. Siendo lo contrario en PolyPhen, el cual predice que se trata de una mutación benigna con un score de 0.303. Al analizar químicamente a los aminoácidos, se observa que la Leucina es no polar, de cadena ramificada y tiene como grupo sustituyente en su cadena R a un grupo isobutilo o 2-metilpropilo lo que confiere un carácter hidrofóbico y no polar, mientras que la Prolina posee como grupo R un anillo de pirrolidina o tetrahidropirrol, clasificado como polar sin carga, estas diferencias podrían hacer que el intercambio de estos dos residuos dificulten la conservación de la función proteica.

Igualmente se examinó con la herramienta bioinformática Panther que estima la probabilidad de que un SNP codificador no sinónimo cause un impacto funcional en la proteína pues calcula el período de tiempo en Ma (millones de años) que un aminoácido dado se ha conservado en el linaje que conduce a la proteína de interés. Cuanto más largo sea el tiempo de conservación, mayor será la probabilidad de impacto funcional. Para la sustitución Leu8Pro indica un tiempo de preservación de 455 Ma, significando que este cambio es probablemente dañino, ya que los umbrales se definen como: "probablemente dañino" (tiempo > 450 Ma), "posiblemente dañino" (450 Ma > tiempo > 200 Ma) y "probablemente benigno" (tiempo < 200 Ma).

Dicha variante se encuentra descrita con el número de identificación rs938130628, y aparece como una variante de un solo nucleótido (SNV) sin sentido, con una frecuencia de 1/125568 y sin significancia clínica reportada en ClinVar (recurso que agrega información sobre la variación genómica y su relación con la salud humana y que se encuentra en NCBI). Cada variante recibe una clasificación clínica mediante

un sistema de 5 categorías: patogénico, probablemente patogénico, significado incierto, probablemente benigna y benigna. Además, la clasificación clínica va acompañada de una referencia al nivel de confianza de dicha clasificación, expresado mediante un código de estrellas (Sánchez y De la Hoya, 2016).

No obstante este polimorfismo se buscó en otra base de datos: Ensembl, en donde los resultados encontrados fueron que esta variante modifica la región 5' (upstream) del gen en un 75%, tiene un impacto moderador de variante sin sentido en un 17 % y modifica en un 8 % las regiones reguladoras génicas. Así mismo Ensembl también proporciona resultados sobre fenotipos asociados a las variantes procesadas, obteniendo para este caso en particular 20 diferentes fenotipos, entre los que se encuentran: Esquizencefalia, Microftalmia colobomatosa, Polidactilia de un pulgar, Holoprosencefalia tipo 3, Holoprosencefalia alobar, Holoprosencefalia por microforma, Holoprosencefalia semilobar, Holoprosencefalia septopreóptica. Como se mencionó en el marco teórico, la Microcefalia, se encuentra descrita como signo clínico en algunos tipos de Holoprosencefalia. Roessler y Muenke en su artículo publicado en 2010, mencionan que la Holoprosencefalia es la malformación más común del cerebro, cara y cabeza en humanos y que se acompaña de anomalías faciales como Ciclopía, Cebocefalia, Microcefalia, Microftalmia, Labio leporino entre otras. Así, esta variante encontrada podría estar asociada con el desarrollo de microcefalia como consecuencia de algún tipo de Holoprosencefalia y que, a su vez, se deriva del cambio de aminoácido que provoca en la secuencia de la proteína SHH. No obstante, se tendrían que hacer otros análisis para poder determinar con seguridad esta aseveración.

Las otras 2 variantes con cambio de sentido encontradas en el exón 1 no están reportadas en la literatura, no obstante, PolyPhen arroja que ambas son mutaciones probablemente dañinas con un score de 0.999. El caso de NG_007504.2:g.5265 dup genera el cambio Leu39Ala y 25 codones después causa un codón de paro anticipado. Este tipo de variantes (INDEL) suelen provocar corrimientos en el marco de lectura, lo que altera la secuencia de aminoácidos a partir del lugar donde ocurre la inserción o delección, por lo que es muy posible que se altere la estructura y función proteica, siendo lógico que SIFT indique que la sustitución afecta la función de la

proteína con un puntaje de 0.00; a su vez, Panther indica que es un cambio probablemente dañino con un tiempo de preservación de 1036 Ma.

Asimismo, también se analizaron las propiedades de estas moléculas, encontrando que ambas pertenecen al mismo grupo de aminoácidos no polares o hidrófobos alifáticos, siendo para el caso de la Alanina el aminoácido menos hidrófobo de los no polares, cuenta un grupo R pequeño, un hidrocarburo alifático (CH₃), por lo que ambos son muy similares en cuanto a estructura, difiriendo ligeramente en su tamaño. En 2015, Monroy Muñoz y colaboradores hallaron una sustitución similar en la proteína TBX20, en la que el cambio de una Leucina por una Alanina parecía reducir la superficie hidrofóbica de la proteína. Ellos encontraron que un análisis de mutagénesis dirigido al sitio donde residuos hidrofóbicos voluminosos como la leucina fueron sustituidos por residuos más pequeños como Alanina demostró que dichos reemplazos desestabilizan la proteína no sólo porque hay una reducción en la estabilización hidrofóbica sino también porque hay un costo energético asociado con la creación de una cavidad en la proteína plegada, resultando que cuando se crea una cavidad grande, el reemplazo es más desestabilizador. Pese a que no se trata de la misma proteína, se podrían tomar en cuenta estos hallazgos para estudiar más profundamente el impacto que genera el mismo cambio de aminoácidos en la proteína SHH.

Por otra parte, no hay que olvidar que 25 codones después de donde se da el cambio de aminoácidos existe el surgimiento de un codón de paro prematuro por lo que no se descarta que el impacto predicho por las herramientas bioinformáticas se pueda deber también a la detención de la lectura del mRNA por parte de los ribosomas, lo que se traduce en una proteína de menor tamaño y probablemente poco funcional. Keeling y Bedwell en 2011 mencionan que las mutaciones sin sentido o nonsense están presentes en un 10-15% de los pacientes con distintas enfermedades genéticas y además que los mRNAs que contienen estos codones de paro prematuro son en sí mismos frecuentemente más inestables y degradados por el mecanismo de decaimiento del mRNA (NMD). Todo esto, tiene como consecuencia una reducción importante en la producción de proteína funcional de forma patogénica.

La variante NG_007504.2:g.5362 G>C provoca el cambio Glu71Gln; el Ácido Glutámico es de naturaleza polar y pertenece al grupo de los llamados aminoácidos

ácidos, o con carga negativa a pH fisiológico, debido a que presenta un segundo grupo carboxilo en su cadena secundaria, por su parte la Glutamina es una cadena lateral de una amida del Ácido Glutámico, formada mediante el reemplazo del hidroxilo del Ácido Glutámico con un grupo funcional amina, lo que le confiere la naturaleza de polar sin carga, pese a estas diferencias, SIFT predice que la sustitución es tolerada con un puntaje de 0.10 y Panther pronostica que el cambio es probablemente dañino debido a que el tiempo de preservación del aminoácido original es de 750 millones de años. Es de importancia señalar que en la muestra en la que se encontró esta variante, también fueron halladas otras dos mutaciones de tipo sinónimo, y es posible que esto se deba a que las mutaciones pueden generar potencialmente otras mutaciones, esto ocurre indirectamente por una mutación en un gen involucrado en la replicación o reparación del DNA, causando mutaciones en otros loci, o directamente por la influencia de una mutación segregativa en la estructura del DNA vecino. En el genoma humano se ha visto que la presencia de una mutación induce que aumente 6 veces la tasa de mutaciones puntuales (Hodgkinson y Eyre-Walker, 2011).

En el exón 2, se encontraron las sustituciones de aminoácidos: Ala162Val y Lys105Gln y son catalogadas como probablemente dañinas con scores de 1.000 y de 0.994, respectivamente, asimismo se predice que ambas afectan a la función de la proteína con puntajes de 0.00. y 0.01. Como ya se mencionó anteriormente, la Alanina es un aminoácido no polar o hidrófobo (el menor de éstos) alifáticos y cuenta un grupo R pequeño, un hidrocarburo alifático (CH_3), la Valina comparte las mismas características, solo difiere en que consta de un grupo propilo ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_3$) en lugar del metil de la Alanina. Asimismo, Panther señala que tiempo de preservación de la Alanina en la proteína SHH es de 1036 Ma, por lo que el cambio por la Valina es catalogado como probablemente dañino, concordando con las predicciones realizadas por PolyPhen y SIFT.

En el cambio Lys105Gln, la Lisina es de carácter hidrófilo, y actúa químicamente como una base, ya que su cadena lateral contiene un grupo amino protonable que a menudo participa en la formación de puentes de hidrógeno o en enlaces de tipo iónico en las cadenas de proteína, por el contrario, la Glutamina como ya se mencionó es de naturaleza polar, sin carga debido a que es una cadena lateral de una amida del

Ácido Glutámico. El tiempo de preservación de la Lisina en esa posición dentro de la proteína es de 362 Ma por lo que el cambio por la Glutamina es posiblemente dañino, además de que las diferencias en carga, polaridad e incluso estructura podrían ser responsables de la afectación predicha en la función proteica.

Ahora bien, los resultados observados en la tabla 13, muestran que se encontraron 6 variantes de tipo sinónimo, es decir, variantes en las que el cambio de nucleótido no genera una alteración en la secuencia de aminoácidos original que conforman a la proteína. Anteriormente se consideraba que este tipo de mutaciones eran biológicamente silenciosas, sin embargo, actualmente se conoce que pueden afectar la función de la proteína traducida a través de diversos mecanismos celulares. (Hunt, 2014)

Las mutaciones sinónimas pueden afectar la conformación y la función de las proteínas al afectar el procesamiento y la regulación postranscripcionales del RNA, alterar la estructura local y global del mRNA así como su estabilidad e influir en la cinética de la traducción. Estimaciones sugieren que del 5 al 10% de los genes humanos contienen al menos una región donde las mutaciones sinónimas podrían ser dañinas. (Sauna y Kimchi, 2011)

Las sustituciones de nucleótidos sinónimas pueden perturbar un sitio de empalme existente o, con menos frecuencia, introducir uno. Cualquiera de los resultados genera aberrantes mRNA que son inestables o codifican isoformas o productos proteicos defectuosos. Variantes sinónimas incluidas en enhancers y silenciadores tanto exónicos (ESE y ESS) como intrónicos (ISE y ISS) pueden modificar la estructura primaria de la proteína debido a que los primeros fomentan la inclusión del exón en el mRNA maduro mediante el reclutamiento de la maquinaria de splicing, mientras que los silenciadores impiden su inclusión mediante diferentes mecanismos. (García, 2014)

En el presente estudio se analizaron este tipo de variantes, en la herramienta bioinformática Human Splice Finder, la cual ayuda en el estudio del *splicing* previo al mRNA, encontrándose que las variantes NG_007504.2:g.5027G>A, NG_007504.2:g.4979A>G y NG_007504.2: g.5027G>A provocan un rompimiento de un sitio intrónico de ESS, no obstante probablemente no exista un impacto en el *splicing*. Por

el contrario, la variante NG_007504.2: g.5119_5119dup genera dos efectos: el primero es que crea una activación de un sitio aceptor críptico intrónico que muy posiblemente provoque una alteración del *splicing*, y el segundo es una alteración (rompimiento) de un sitio intrónico de ESS (Silenciador de *Splicing* exónico), sin impacto en el *splicing*.

Ramírez y colaboradores en el 2013 señalan entre el 70-98% de los genes humanos que contienen varios exones, sufren corte y empalme, por lo que las variables genéticas que producen defectos en el *splicing* se encuentran demostradas como causa de múltiples enfermedades.

Dentro de este grupo de variantes sinónimas, se encontraron dos polimorfismos más reportados en dbSNP. La variante NG_007504.2:g.5027 G>A tiene el número de identificación rs9333594 y como SNV, con una frecuencia de 9294/125568 y de significancia clínica benigna reportada en ClinVar. Aunado a lo anterior, este polimorfismo genera como consecuencia molecular una variante 5'UTR. El 5'UTR es la secuencia de RNA inmediatamente río arriba del RNA codificante y generalmente no se traduce (aunque existen algunas excepciones, en las que parte de la 5'UTR se traduce). Variantes genéticas que modifican elementos reguladores como lo son: la secuencia de consenso de Kozak (que contiene el codón de iniciación de la traducción), sitios CpG, uORF, IRES, sitios de unión de RBP, y estructuras secundarias, como los bucles de horquilla, (importantes en la regulación de la traducción debido a que a menudo ocurren dentro de la 5'UTR) pueden tener un impacto importante en la producción general de la proteína al afectar la transcripción, estabilidad y traducción del RNA. (Steri, *et. al.*, 2018)

Por su parte el 3'UTR se encuentra río abajo de la secuencia de codificación, y está involucrado en procesos reguladores, que incluyen estabilidad de RNA, traducción y localización de mRNA. Se caracteriza por sitios de unión para RBP y miRNA, y, por lo tanto, cualquier variación en la longitud y secuencia de 3'UTR puede cambiar la unión de miRNA y RBP, lo que lleva a un cambio en la expresión génica. (Steri, *et al.*, 2018).

No obstante, para obtener más información sobre este polimorfismo, se buscó también en Ensembl, en donde los resultados encontrados fueron que esta variante de

secuencia es ubicada en la región 5' del gen en un 75 %, modifica en un 8 % las regiones reguladoras génicas y concordando con dbSNP es una variante de la región 5' UTR que en un 17 % no cuenta con una asociación con algún fenotipo o enfermedad reportado en esta base de datos, evidenciando y coincidiendo su clasificación como variante benigna.

El último polimorfismo perteneciente a la variante NG_007504.2:g.11089 T>G es rs1233554. Como se muestra en la tabla 13, esta variante es la única que se encontró en la mayoría de las muestras analizadas y sólo se informa por parte de dbSNP que es una SNV, con una frecuencia de 26323/125568 y de significancia clínica no reportada en ClinVar.

Es necesario recordar que esta variante se encontró en el exón 2, que como se mencionó en la metodología, se realizó por la técnica de HRM. Pese a que éste es un método potente y homogéneo para detectar una amplia gama de mutaciones en cualquier posición dentro del amplicón, con ventajas únicas sobre los métodos convencionales, la sensibilidad y la especificidad de HRM dependen exquisitamente de la temperatura de fusión de cada muestra individual, la variación en la concentración de sal o tampón en las reacciones de PCR junto con la calidad del DNA ya que puede generar perfiles de fusión heterogéneos (Garritano, et al., 2009). El software Precision Melt Analysis™ que utiliza esta técnica formuló 4 clústeres o grupos en los que se clasificaron las 63 muestras utilizadas en el exón 2, y se secuenciaron por electroforesis capilar las muestras con mayor valor de porcentaje de confianza (>90 %), encontrando que en los 4 clústeres se encuentra presente el polimorfismo lo que significa que se encuentra en la mayoría de las muestras. Este hallazgo denota, que lo propuesto por Garritano y colaboradores en su artículo, es de gran importancia, pues los diferentes perfiles arrojados por HRM en este caso, podrían estar asociados en mayor medida, a la diferencia en la concentración en las muestras, calidad del material genético, presencia de otras sustancias derivadas de la purificación, o inclusive a la longitud del tamaño del amplicón, puesto que también es mencionado que esta técnica posee mayor sensibilidad y especificidad para amplicones de longitud menor a 400 pares de bases.

Al igual que los otros dos polimorfismos encontrados, también se buscó en Ensembl para obtener mayor información, encontrando que se trata de una variante de

transcripción que ocurre dentro de un intrón y con impacto modificador en un 59 %, es una variante de transcripción no codificante en un 12%, es una variante ubicada en la región 3' del gen en un 6% y una variante de transcripción que es el objetivo de NMD. Según la literatura, NMD es un mecanismo de control de calidad de mRNA postranscripcional responsable de la eliminación de los mRNA que contienen codones de terminación prematura debido a mutaciones, que si se deja intacto, conduciría a la producción de proteínas truncadas (está íntimamente relacionado con la terminación de la traducción) con efectos perjudiciales predichos para el organismo. Desde una perspectiva médica, esto sugiere que la vía NMD tiene un papel importante en la modulación del resultado fenotípico de los trastornos genéticos (Hug, Longman y Cáceres, 2016)

A propósito de lo anterior, este polimorfismo se encuentra asociado por la misma base de datos a 20 diferentes fenotipos, entre los que se encuentran: Esquizencefalia Adquirida, Holoprosencefalia Alobar y Semilobar, Microftalmia Colobomatosa, HPE3, Holoprosencefalia por Microforma, Variante Interhemisférica de la Línea Media de la Holoprosencefalia y Sindactilia tipo 4 por mencionar algunos; por lo que, al igual que el anterior polimorfismo se podría asociar el diagnóstico de Microcefalia como consecuencia de algún tipo de Holoprosencefalia, derivada de alguna de las consecuencias que se mencionaron anteriormente. Sin embargo, se tendrán que realizar análisis más exhaustivos para este tipo de variantes e incluso de funcionalidad proteica.

Por último, cabe mencionar que el exón 3 no se alcanzó secuenciar, debido a que posee un gran tamaño: 987 pares de bases y un alto contenido de GC: 56.5 % y requería de condiciones especiales para su estudio (reactivos específicos para este tipo de fragmentos), que por motivos de tiempo no se pudieron completar para la realización de este trabajo.

O. CONCLUSIONES

- ❖ Se logró estandarizar las condiciones óptimas de amplificación para los exones 1 y 2 del gen *SHH*.
- ❖ Se identificaron 5 variantes en los exones 1 y 2 que provocan una modificación en la secuencia de aminoácidos de la proteína SHH, de las cuales solo 1 se encuentra reportada como un SNP. Las 4 restantes son variantes no reportadas.
- ❖ Asimismo, el polimorfismo rs938130628 se encuentra asociado por Ensembl con la Holoprosencefalia, pudiendo ser ésta la causa de la microcefalia diagnosticada en esa muestra, no obstante, se deben realizar otros análisis para comprobar esto.
- ❖ Las 4 variantes no sinónimas restantes se clasifican como probablemente dañinas por las bases bioinformáticas utilizadas, no obstante, como aún no han sido reportadas, tampoco su asociación con la Microcefalia.
- ❖ Se identificaron 6 variantes sinónimas, de las cuales 2 están reportadas con SNP, solo uno de estos polimorfismos: rs1233554 se encuentra asociado con la Holoprosencefalia, pudiendo en un futuro, comprobar que ésta es la causa de la Microcefalia diagnosticada.
- ❖ Una de estas variantes crea una activación de un sitio aceptor crítico intrónico, provocando una alteración del *splicing*, la cual puede afectar la conformación y función de la proteína.

P. PROSPECTIVAS

- ❖ Realizar la estandarización de la secuenciación del exón 3 esperando encontrar más variantes genéticas que pudieran relacionarse a la microcefalia, al ser una región exónica de mayor tamaño.
- ❖ Realizar estudios bioinformáticos más exhaustivos para poder comprender mejor el papel de las variantes sinónimas.
- ❖ Aumentar la n de estudio, y analizar otros posibles genes candidatos a la asociación con esta enfermedad genética.

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS CONSULTADOS

1. Arias David, Astudillo Marvin, Rayo Jorge, Rodríguez Diana, Vallejo Diana y Moreno Freddy. (2016). *Overview of molecular signaling during embryonic development: The case of Sonic Hedgehog*. *Salutem Scientia Spiritus*. 2. 2463-1426.
2. Arroyo, H. (2018). *Microcefalia*. *Medicina*; Vol. 78 (Supl. II): Hospital de Pediatría.
3. Bertolacini Claudia, Richieri Costa A y Ribeiro Bicudo Lucilene. (2009). *Sonic hedgehog (SHH) mutation in patients within the spectrum of holoprosencephaly*. *Brain & development*. (2009) Mar;32(3):217-22. doi: 10.1016/j.braindev.2009.02.014. Epub 2009 Apr 26.
4. Botell, M. y Bermúdez, M. (2016). *Zika virus infection, pregnancy and microcephaly*. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*. 2016;42(1)
5. Cervantes-Flores, Hugo Alberto, Bencomo-Loeppky, Samuel, García-Rizk, Jorge Arturo, Levario-Carrillo, Margarita, Reza-López, Sandra Alicia, Loya-Loya, Martha Elena, Sanín, Luz Helena, Fierro-Murga, Ricardo, y Chávez-Corral, Dora Virginia. (2019). *Holoprosencefalia Semilobar y Malformaciones Asociadas: Reporte de Caso y Algunas Consideraciones*. *International Journal of Morphology*, 37(1), 123-127.
6. Cofre, Fernanda, Delpiano, Luis, Labraña, Yenis, Reyes, Alejandra, Sandoval, Alejandra, & Izquierdo, Giannina. (2016). *Síndrome de TORCH: enfoque racional del diagnóstico y tratamiento pre y post natal. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Neonatales Sociedad Chilena de Infectología, 2016*. *Revista chilena de infectología*, 33(2), 191-216. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000200010>
7. Conei, D. , Saint-pierre, G.; Fierro, R.; Del sol, M. & Rojas, R. M. (2018). *Inmunolocalización de Sonic hedgehog en el desarrollo embrio-fetal de ratones (Mus musculus)*. *Int. J. Morphol.*, 36(2):693-698.
8. Estrada-Juárez, Higinio, Fernández-Hernández, Liliana, Rivera-Pedroza, Carlos, y Grether-González, Patricia. (2012). *MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples) en el diagnóstico perinatal rápido de las principales aneuploidías*. *Perinatología y reproducción humana*, 26(3), 172-179.
9. Frutos, Isabel, Lastra Pérez, Liana, Vilches Lescaille, Deysi, Osorio Illas, Lisis, Ramos López, Meysi, y Rodríguez Ahuar, Nasibis. (2018). *Manifestaciones clínicas asociadas al síndrome de TORCH*. *Revista Cubana de Oftalmología*, 31(1), 132-144.
10. García, C. (2014). *Alteraciones de splicing en genes supresores de tumores como mecanismo etiopatológico en cáncer de mama y ovario hereditario en pacientes de Castilla y León*. *Nat Genet* 39(3): 352-358.

11. García, M., Domínguez-Cruz, J. y Conejo-Mir, J. (2016). *Carcinoma basocelular: biología molecular y nuevas dianas terapéuticas*. Medicina Cutánea Ibero Latino Americana. 44 (2): 89-99
12. Garritano, S., Gemignani, F., Voegelé, C., Nguyen-Dumont, T., Le Calvez-Kelm, F., De Silva, D., Lesueur, F., Landi, S., & Tavtigian, S. V. (2009). *Determining the effectiveness of High Resolution Melting analysis for SNP genotyping and mutation scanning at the TP53 locus*. BMC genetics, 10, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-5>
13. Hodgkinson, A., Eyre-Walker, A. *Variación en la tasa de mutación en genomas de mamíferos*. *Nat Rev Genet* 12, 756–766 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrg3098>
14. Hug, N., Longman, D. y Cáceres, JF (2016). *Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway*. Investigación de ácidos nucleicos ,44 (4), 1483–1495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw010>
15. Hunt, R. C., Simhadri, V. L., Iandoli, M., Sauna, Z. E., & Kimchi-Sarfaty, C. (2014). *Exposing synonymous mutations*. *Trends in Genetics*, 30(7), 308–321. doi:10.1016/j.tig.2014.04.006
16. Khatra, Harleen & Bose, Chandra & Sinha, Surajit. (2017). *Discovery of Hedgehog Antagonists for Cancer Therapy*. *Current Medicinal Chemistry*. 24:2033. 1-1. doi: 10.2174/0929867324666170316115500.
17. Lasierra, M.Á. (2009). *La vía de Hedgehog: embriogénesis y enfermedad*.
18. León-Mayorga Y, Baldassarri-Ortego LF, Nellen-Hummel H, Halabe-Cherem J. (2017). *Zika: un problema de salud pública*. *Aten Fam*; 24(3):131-134.
19. Lyle R. Petersen, Denise J. Jamieson, Ann M. Powers y Margaret A. Honein. (2016). *Zika Virus*. *The new england journal of medicine*. *N Engl J Med* 2016;374:1552-63. DOI: 10.1056/NEJMra1602113
20. Mochida, Ganeshwaran H. y Walsh, Christopher A. (2001). *Molecular genetics of human microcephaly*. *Curr Opin Neurol* 14:151-156. Lippincott Williams & Wilkins
21. Monroy-Muñoz, I. E., Pérez-Hernández, N., Rodríguez-Pérez, J. M., Muñoz-Medina, J. E., Angeles-Martínez, J., García-Trejo, J. J., Morales-Ríos, E., Massó, F., Sandoval-Jones, J. P., Cervantes-Salazar, J., García-Montes, J. A., Calderón-Colmenero, J., & Vargas-Alarcón, G. (2015). *Novel mutations in the transcriptional activator domain of the human TBX20 in patients with atrial septal defect*. *BioMed research international*, 2015, 718786. <https://doi.org/10.1155/2015/718786>
22. Monteagudo, A., Millán E Timor-Tritsch, (2020). *Prenatal diagnosis of CNS anomalies other than neural tube defects and ventriculomegaly*.

23. Pal, K. and Mukhopadhyay, S. (2015), *Primary cilium and sonic hedgehog signaling during neural tube patterning: Role of GPCRs and second messengers*. *Devel Neurobio*, 75: 337-348. doi:10.1002/dneu.22193
24. Pepinsky Blake, R., Paul Rayhorn, Eric S. Day, Amie Dergay, Kevin P. Williams, Alphonse Galdes, Frederick R. Taylor, P. Ann Boriack-Sjodin, y Ellen A. Garber (2000). *Mapping Sonic Hedgehog-Receptor Interactions by Steric Interference*. Vol. 275, No. 15, Issue of April 14, pp. 10995–11001. *The journal of biological chemistry*.
25. Raam, MS, Solomon, BD y Muenke, M. (2011). *Holoprosencefalia: una guía para el diagnóstico y el manejo clínico*. *Pediatría India* 48 (6), 457-466. (2011). doi.org/10.1007/s13312-011-0078-x
26. Ramírez-Bello, Vargas-Alarcón G, 2, Tovilla-Zárate C, Fragoso JM. (2013). *Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas*. *Gaceta Médica de México*;149 220
27. Roessler, E., & Muenke, M. (2010). The molecular genetics of holoprosencephaly. *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics*, 154C(1), 52–61.
28. Rojas, M.; Signore, I. A. & Mejías, R. *Morphogens during embryonic development of vertebrates*. *Int. J. Morphol.*, 32(1):319- 326, 2014.
29. Ryan, KE y Chiang, C. (2012). *Hedgehog secretion and signal transduction in vertebrates*. *J Biol Chem*. May 25;287 (22), 17905-17913. doi.org/10.1074/jbc.R112.356006. Epub 2012 Apr 2.
30. Sanchez de Abajo, A., De la Hoya, M. (2016). *Manejo de las variantes genéticas sin clasificar en una consulta de consejo genético*. *Ed Cont Lab Clín*; 27: 77 - 93
31. Sanchez, Sanchez, M. (2017). *La vía de regulación sonic hedgehog como diana terapéutica en tumores pediátricos malignos del sistema nervioso*. *Universidad del país Vasco*. 15; 154C(1): 52–61
32. Sauna, Z., Kimchi-Sarfaty, C. *Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease*. *Nat Rev Genet* 12, 683–691 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrg3051>
33. Sherry, ST, Ward, MH, Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, EM y Sirotkin, K. (2001). dbSNP: la base de datos NCBI de variación genética. *Investigación de ácidos nucleicos* , 29 (1), 308-311.
34. Steri, M., Idda, M. L., Whalen, M. B., & Orrù, V. (2018). Genetic variants in mRNA untranslated regions. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9(4), e1474. <https://doi.org/10.1002/wrna.1474>

35. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real*. Vol. 2, Núm. 2. Mayo-Agosto 2013 pp 70-78
36. Tekendo-Ngongang C, Muenke M, Kruszka P. *Holoprosencefalia Descripción general*. (Actualizado en Marzo, 2020). GeneReviews® . Seattle (WA): Universidad de Washington, Seattle; 1993-2020. Vuolo, L. (2015). *El cilio primario y la vía de señalización de Sonic Hedgehog: papel de las Adenilato Ciclasas*. Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBBCSIC) y en el Instituto de Biología Molecular de Barcelona (IBMB-CSIC)

LIBROS CONSULTADOS

Carlson, B. M. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo* . 5 ed. Barcelona, España : Elsevier.

PÁGINAS WEB CONSULTADAS

URL 1. Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades. *Bebé normal y bebé con microcefalia*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/381K1Zn> Consultada el día: 19-02-2020.

URL 2. Stanford Children's Health. *Síntomas de microcefalias*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2UapyxJ> .Consultado el día: 20-02-2020.

URL 3. OMS. *Diagnóstico de Microcefalia*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/3bj5Ky4> . Consultada el día: 22-02-2020.

URL 4. OMS. *Tabla de medida de la circunferencia de la cabeza para niñas*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2HXSodZ> .Consultada el día: 23-02-2020.

URL 5. *Tabla de medida de la circunferencia de la cabeza para niños*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/3a0KUmm>. Consultada el día: 23-02-2020.

URL 6. *Sistema ventricular en los tipos de Holoprosencefalia*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2S4X46X>. Consultado el día: 25-02-2020.

URL 7. Genetics Home Reference. *Localización cromosómica de SHH*. [En línea]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/SHH> . Consultada el día: 28-02-2020.

URL 8. NCBI. *Molécula de señalización de Homo sapiens sonic hedgehog (SHH), RefSeqGene en el cromosoma 7*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/3dhTUGh> .Consultada el día: 28-02-2020.

URL 9. *Vías de desarrollo y cáncer*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2yLO7bW> . Consultada el día: 01-03-2020.

URL 10. *Procesamiento de las proteínas SHH*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/3adU6Ef>. Consultada el día: 01-03-2020.

URL 11. *Transducción de señales de SHH en vertebrados*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2UcJfK2> .Consultada el día: 03-03-2020.

URL 12. *Esquema de expresión de SHH en la ZPA durante la formación de los esbozos de las extremidades*. [En línea]. Disponible en:<https://bit.ly/3bjoixW> . Consultada el día: 05-03-2020.

URL 13. QIAGEN. *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2QAoQry>. Consultada el día: 07-03-2020.

URL 14. Sigma-Aldrich. *7-Deaza-2'-deoxyguanosine 5'-trifosfato sal de litio*. [En línea]. Disponible en:<https://bit.ly/2QF2xke>. Consultada el día: 10-03-2020.

URL 15. Sigma-Aldrich. *Dimetil sulfóxido*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2S7TwkA>. Consultada el día: 15-03-2020.

URL 16. BIO-RAD. *Precision Melt Supermix for High Resolution Melt*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2U8qbYK> Consultada el día: 18-03-2020.

URL 17. Bioinformatics at COMAV. *Secuenciación de Sanger*. [En línea]. Disponible en:<https://bit.ly/3eUtaMz>. Consultada el día: 20-03-2020.

URL 18. PolyPhen-2. *PolyPhen-2 Wiki*. [En línea]. Disponible en: <https://bit.ly/2Y6VCVO> .Consultada el día: 22-03-2020.