



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACTULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARIA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCION DE EDUCACION E INVESTIGACION
SUBDIRECCION DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CENTRO DERMATOLOGICO "DR. LADISLAO DE LA PASCUA"
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA**

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACION EN DERMATOLOGIA

**"IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN EL GEN PTCH1 EN PACIENTES CON
SINDROME DE GORLIN-GOLTZ"
TRABAJO DE INVESTIGACION**



**PRESENTADO POR: DRA. NATALIA ESPINOSA VILLASEÑOR
PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGÍA**

DIRECTOR DE TESIS: DR. ARMANDO MEDINA BOJORQUEZ

TUTORES: DRA. ROSA MARIA ALVAREZ GOMEZ

DRA. MARTHA ALEJANDRA MORALES SANCHEZ

DRA. MARIA TERESA DE JESUS VEGA GONZALEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**“Identificación de mutaciones en el gen PTCH1 en pacientes con Síndrome de
Gorlin-Goltz”**

Dra. Natalia Espinosa Villaseñor

Dr. Armando Medina Bojórquez

Subdirector de Atención Médica y Jefe del servicio de Dermatooncología

Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”

Vo.Bo.

Dra. Rosa María Álvarez Gómez

Médico Genetista e Investigadora

Instituto Nacional de Cancerología

Vo.Bo.

Dra. Martha Alejandra Morales Sánchez

Jefa de Enseñanza e Investigación

Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”

Vo.Bo.

Dra. María Teresa de Jesús Vega González

Jefa del Servicio de Dermatología

Instituto Nacional de Cancerología

Vo.Bo.

RESUMEN

ANTECEDENTES. El síndrome de Gorlin-Goltz, también conocido como síndrome de nevus de células basales, es una enfermedad hereditaria (autosómica dominante con penetrancia completa y expresividad variable) poco frecuente, causada por mutaciones en el gen supresor de tumores *PTCH1* localizado en el cromosoma 9q21-23 que se encuentra involucrado en la vía de señalización de *Hedgehog*, cuya función es controlar el crecimiento y desarrollo normal de los tejidos en la embriogénesis. Las mutaciones en éste gen en adultos pueden llevar a la expresión aumentada de proteínas esenciales para la proliferación celular y la formación de neoplasias. Fue reportado por primera vez en 1894 por Jarish y White, posteriormente Robert Gorlin y Robert Goltz describieron el síndrome distintivo caracterizado por la presencia de múltiples carcinomas basocelulares, queratoquistes odontogénicos, malformaciones musculoesqueléticas, calcificación de la hoz del cerebro y meduloblastomas.

El objetivo de este estudio fue describir las mutaciones asociadas al Síndrome de Gorlin-Goltz en una muestra de población mexicana.

MATERIAL Y MÉTODOS. Se realizó un estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo con 11 pacientes con el diagnóstico de síndrome de Gorlin-Goltz que acudieron a la consulta de dermatología del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” y dermatología y genética en el Instituto Nacional de Cancerología entre 1990 y 2015. Mediante un muestreo no probabilístico de casos consecutivos se incluyeron a los sujetos que cumplieron con los criterios diagnósticos para el síndrome de Gorlin-Goltz y se excluyeron a los que no aceptaron participar en el estudio. En una entrevista se recabaron las variables sociodemográficas de los pacientes, se les realizó una exploración física para obtener las variables clínicas, y a los que aceptaron, mediante consentimiento informado, se les tomó una muestra de sangre periférica para la obtención de las variables moleculares. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS, versión 20.0).

RESULTADOS. Se realizó una descripción de todas las variables de estudio: sociodemográficas (género, edad, edad al diagnóstico, escolaridad, ocupación y estado civil); clínicas (carcinoma basocelular, su variedad clínica e histológica, queratoquiste odontogénico, *pits* palmo-plantares, calcificación de la hoz del cerebro, meduloblastoma, malformaciones esqueléticas, macrocefalia, labio y/o paladar hendido, fibroma ovárico, fibroma cardiaco, quistes linfomesentéricos, alteraciones oculares y familiares de primer grado afectados) y moleculares (mutación, tipo y efecto de la mutación, región del gen donde ocurre la mutación, polimorfismo y clasificación de los polimorfismos asociados).

CONCLUSIÓN. En 4/9 pacientes se encontraron mutaciones en el gen PTCH1 que no están reportadas en la literatura. En dos pacientes se encontraron mutaciones que provocaron el corrimiento del marco de lectura (*frameshift*), lo que conlleva a la generación de un codón de paro; en un paciente se encontró una mutación que por sí sola produce la generación de un codón de paro o mutación tipo *non-sense*, éstas tres mutaciones causan alteraciones o el truncamiento de la formación de la proteína PTCH1; en un paciente se encontró una mutación del tipo *missense* que condiciona un cambio de un aminoácido a otro.

INDICE

Antecedentes	7
Introducción	7
Epidemiología	7
Etiología y patogenia	7
Cuadro clínico	12
Diagnóstico	13
Tratamiento	15
Planteamiento del problema	17
Justificación	17
Objetivo	18
Hipótesis	18
Aspectos metodológicos	18
Definición de variables	20
Estrategias de recolección de datos	30
Procesamiento estadístico y análisis	33
Recursos	34
Aspectos éticos y de bioseguridad	34
Resultados	36
Discusión	43
Conclusión	50
Anexos	51
Bibliografía	63

1. ANTECEDENTES.

INTRODUCCION

El síndrome de Gorlin-Goltz, también conocido como síndrome de nevus de células basales, es una enfermedad hereditaria poco frecuente que se caracteriza por múltiples carcinomas basocelulares, queratoquistes odontogénicos y malformaciones musculoesqueléticas^{1,2}.

Fue reportada por primera vez en 1894 por Jarish y White quienes describieron las características fenotípicas del síndrome. En 1959 Howell y Caro sugirieron una relación entre los carcinomas basocelulares y el desarrollo de malformaciones; posteriormente Robert Gorlin y Robert Goltz describen el síndrome distintivo caracterizado por la presencia de múltiples carcinomas basocelulares, quistes odontogénicos y costillas bífidas^{1,3}.

EPIDEMIOLOGIA.

Es un síndrome raro, cuya incidencia varía desde 1 en 50,000 hasta 1 en 256,000 personas en la población general. Se ha observado de manera más frecuente en blancos, y afecta por igual a hombres y mujeres^{1,4}.

ETIOLOGIA Y PATOGENIA.

Es una enfermedad autosómica dominante con penetrancia completa y expresividad variable. En el 65 a 80% de los pacientes que cumplen con los criterios clínicos diagnósticos del Síndrome de Gorlin-Goltz, se han identificado mutaciones germinales en estado heterocigoto del gen supresor tumoral *PTCH1* localizado en el cromosoma 9q21-23⁵.

Los estudios genéticos sugieren que el fundamento subyacente de éste trastorno es una alteración en la vía de señalización de *Hedgehog* (Hh). La función de ésta vía en

la embriogénesis es bien conocida; controla el crecimiento y desarrollo normal de los tejidos, así como controla la interacción epitelial y mesenquimal en muchos tejidos durante éste periodo^{6,7}.

El gen *PTCH1* –homólogo humano del gen de polaridad de segmento *patched* de la mosca *Drosophila*– que se encuentra en el cromosoma 9q21-23 posee una secuencia altamente conservada de 23 exones que codifican para un miembro de la familia de genes “*Patch*”; un receptor de membrana llamado PTCH1 de 1447 aminoácidos con doce dominios transmembranales y dos bucles extracelulares^{8,9}. La proteína PTCH1 tiene una función clave durante la embriogénesis y el modelado tisular, regulando la vía de señalización intracelular *Hedgehog*. Durante la embriogénesis, esta proteína se localiza en el tubo neural ventral, las somitas y los tejidos que están alrededor de la zona de polaridad de las extremidades y controla el crecimiento y desarrollo normal de los tejidos, así como la interacción epitelial y mesenquimal en muchos tejidos durante éste periodo^{6,7}. En el adulto se expresa en cerebro, pulmón, corazón y placenta, músculo esquelético, páncreas y riñones⁸.

El gen *PTCH1* es parte de un receptor para una proteína denominada *Sonic Hedgehog* (SHH), la cual está involucrada en el desarrollo embrionario. Si hay una mutación en *PTCH1* que no permita que se forme el segundo bucle, la unión con SHH no se lleva a cabo y la vía de señalización se ve afectada¹⁰.

Investigaciones más recientes han revelado que el rol de la vía de señalización de Hh en adultos es la de inhibir el crecimiento y diferenciación celular y generalmente es inactiva. PTCH1 en ausencia de su ligando, SHH, actúa como un regulador del ciclo celular, inhibiendo la expresión de genes río abajo que controlan el patrón del crecimiento celular. Con éste fundamento, las mutaciones en *PTCH1* producen una señalización aberrante de la vía de Hh que puede llevar a la expresión aumentada de proteínas esenciales para la proliferación celular y la formación de neoplasias. Estos

datos sugieren que actúa como un supresor tumoral; de hecho, se ha visto que los carcinomas basocelulares esporádicos tienen mutaciones somáticas en *PTCH1*^{1,6,7,11}.

La vía de señalización de *Hedgehog* fue descubierta en 1980 por los Premios Nobel, Nusslein-Volhard y Wieschaus después del aislamiento de mutaciones en los genes que controlan el desarrollo de la segmentación del eje del cuerpo anterior-posterior en *Drosophila melanogaster*¹². En los mamíferos los genes, *Desert Hedgehog (DHH)*, *Indian Hedgehog (IHH)*, y *Sonic Hedgehog (SHH)*, funcionan como ligandos del receptor *PTCH1*¹³. En estado disociado, el receptor *PTCH1* inhibe a la proteína con siete dominios transmembranales *SMO (smoothed, frizzled class receptor)*. Unido al ligando *SHH*, *PTCH1* se internaliza y se degrada, como resultado, *SMO* se activa y promueve la disociación del complejo Supresor Fusionado (*SUFU*) y el Homólogo del Oncogén asociado a Glioma (*GLI*)^{13,14}, esto genera la translocación y activación en el núcleo de los factores de transcripción *GLI1* y *GLI2* y la degradación de las formas represoras de *GLI (GLI3)*^{15,16}. Las proteínas *GLI* estimulan la transcripción de los genes blanco de la vía *Hh*, incluyendo *GLI1*, *GLI2*, *PTCH1*, *Ciclina D1*, *BCL2*, y *MYCN (V-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Neuroblastoma)*; que a su vez, participan en una amplia variedad de señales en las vías involucradas en el desarrollo¹⁷.

Asociación del síndrome de Gorlin-Goltz y la vía de señalización de *Hedgehog*.

Una contribución genética clara de la vía de señalización de *Hedgehog* en la activación de la oncogénesis, se estableció con el descubrimiento de mutaciones en línea germinal con pérdida de función del gen *PTCH1* y el desarrollo del síndrome de carcinoma epitelial de células basales (*NBCCS* o Síndrome de Gorlin-Goltz)⁹.

La patogénesis de los tumores asociados al síndrome de Gorlin Goltz (*SGG*), pueden ser comprendidos bajo el modelo del doble golpe o doble hit de *PTCH1*^{18,19,20}. Más del

90 % de los carcinomas de células basales asociados SGG y 50-90 % de los carcinomas basocelulares esporádicos, tienen pérdida de heterocigosidad^{19,21}; lo que sugiere que las pérdidas alélicas son un evento clave en los carcinomas basocelulares asociados a SGG y los carcinomas basocelulares esporádicos^{22,23,24}.

De manera similar, los queratoquistes odontogénicos asociados SGG presentan pérdida de heterocigosidad en el locus *PTCH1*; en los de tipo esporádico se detectan mutaciones hasta en el 30%^{18,20}.

Se han demostrado hasta el momento por lo menos 288 mutaciones diferentes de *PTCH1*, que incluyen: deleciones, inserciones, alteración en el sitio de empalme, sin sentido y de sentido erróneo. Más del 80% de estas mutaciones dan lugar a un desplazamiento del marco o truncamiento prematuro de la proteína codificada y las mutaciones restantes conducen a la producción de un receptor anormal. Todas las mutaciones de *PTCH1* se han asociado como causantes de alteraciones en la vía *Hedgehog* durante el desarrollo^{25,26}.

Entre 50 a 80% de los pacientes con síndrome de Gorlin-Goltz presentan la mutación en *PTCH1*, sin embargo se han descrito en algunos pacientes con mutaciones en el gen *PTCH2* y *SUFU*; éste último es otro componente de la vía de señalización de *Hedgehog* y se ha observado relación entre la mutación de éste gen y la susceptibilidad para el desarrollo de meduloblastomas. En el 2009, Pastorino y cols describieron las características de una familia con signos y síntomas de síndrome de Gorlin-Goltz y mutación en *PTCH1* negativa, el resultado fue una mutación germinal en el gen *SUFU* en todos los miembros afectados^{11,27}.

Las pruebas genéticas moleculares empleadas para la confirmación del genotipo del SGG, son: la exploración de la totalidad de la región codificante de *PTCH1*, así como el análisis de las regiones de unión intrón-exón. También se ha reportado el análisis de las variantes transcripcionales, la búsqueda de deleciones cromosómicas, y

estudios de pérdida de heterocigosidad. De no identificarse una alteración mediante las estrategias citadas, es recomendable realizar la búsqueda de mutaciones en los genes *SUFU* y *PTCH2*²⁸.

Otros genes asociados a Síndrome de Gorlin-Goltz: Participación de *PTCH2* y *SUFU*.

PTCH2 es otro miembro homólogo de la familia “*patched*” de *Drosophila*, el cual comparte el 56% de identidad con *PTCH1*. Se encuentra en el cromosoma 1p32.1-p32.3. Está formado por 22 exones y tiene un tamaño aproximado de 15 Kb. Codifica para una proteína transmembranal de 1203 aminoácidos, que es altamente homóloga a *PTCH1*. Se han identificado algunas mutaciones germinales en familias con SGG que no tuvieron mutaciones en *PTCH1*²⁹. Se han detectado mutaciones somáticas en carcinomas basocelulares esporádicos y meduloblastomas. Estos resultados sugieren que *PTCH2* puede actuar de manera similar a *PTCH1* en la oncogénesis asociada^{30,31}.

El gen Supresor de Fusión (*SUFU*) es un regulador negativo de la vía Hedgehog. Se encuentra en el cromosoma 10q24-25 y está formado por 12 exones³². Codifica para una proteína de 484 aminoácidos denominada *SUFU-FL*³³. Se han detectado mutaciones sin sentido y de sentido erróneo en el gen *SUFU* en pacientes con SGG^{27,34}.

Recientemente, se han desarrollado drogas que bloquean la señalización del *Hedgehog*, como el vismodegib, el cual es un inhibidor de esta vía. El vismodegib está aprobado para el tratamiento de carcinomas basocelulares y se encuentra en estudio para el tratamiento de meduloblastomas^{35,36}.

CUADRO CLINICO.

Las características clínicas principales del síndrome de Gorlin-Goltz son la presencia de carcinomas basocelulares múltiples, queratoquistes odontogénicos, *pits* palmo-plantares, calcificación de la hoz del cerebro, meduloblastomas y la afeción de familiares de primer grado. Estas seis características se consideran criterios mayores para el diagnóstico de la enfermedad^{2,4}.

La manifestación clínica más frecuente del síndrome de Gorlin-Goltz son los carcinomas basocelulares que se presentan en 50-97% de los pacientes, pueden llegar a ser cientos y se localizan con mayor frecuencia en la cara, pecho y espalda. La mayoría de ellos aparecen durante la pubertad o la adultez temprana, sin embargo se han reportado casos en paciente de hasta dos años de edad^{2,37,38}.

La incidencia de carcinomas basocelulares en el síndrome de Gorlin-Goltz varía entre los grupo étnicos, se ha reportado que el 90% de los pacientes afectados son predominantemente caucásicos^{3,4}.

El desarrollo de los carcinomas basocelulares en éstos pacientes aumenta por la radiación ultravioleta, por lo que la fotoprotección en estos pacientes es imprescindible. De la misma manera está contraindicada la radioterapia para el tratamiento de los carcinomas basocelulares, ya que los pacientes con Gorlin-Goltz tienen un riesgo más elevado de desarrollar tumores secundarios agresivos en el área radiada^{3,38}.

Los queratoquistes odontogénicos son otra manifestación frecuente de la enfermedad, se observan hasta en 75% de los casos y ocurren con mayor frecuencia en la mandíbula que en el maxilar^{5,39}.

Los *pits* palmo-plantares son depresiones puntiformes de uno a dos milímetros, asimétricas, no palpables, que afecta palmas y/o plantas, causadas por la ausencia

parcial o total de la capa córnea. Se observan en 50 a 70% de los pacientes y aparecen en la segunda década de la vida. Son permanentes y aumentan en número con la edad. Cuando se encuentran en niños son un fuerte marcador diagnóstico^{3,4,39}.

Las alteraciones esqueléticas son frecuentes, se manifiestan por defectos en cráneo, costillas y columna vertebral. Algunos de estos defectos incluyen costillas bífidas, hipoplásicas, fusionadas o parcialmente faltantes y cifoescoliosis, que es menos frecuente^{2,3}.

Alrededor de 2 a 5% de los pacientes desarrollan tumores cerebrales, el más frecuente es el meduloblastoma, que puede ser causa de muerte temprana y se observa con mayor frecuencia antes de los dos años de edad. Se tratan con resección amplia y quimioterapia, aunado o no a radioterapia. Se ha reportado la formación de carcinomas basocelulares posterior a la radioterapia para meduloblastoma. Si no se puede evitar la radioterapia, éstos pacientes deben tratarse con radioterapia de partículas pesadas, la cual causa menor daño en tejidos próximos al tumor^{4,37}.

DIAGNOSTICO.

Los criterios diagnósticos se definieron por primera vez en 1993 por Evans y cols., y fueron modificados por Kimonis y cols., en 1997. Recientemente se realizó una nueva modificación por Bree y cols., en 2011⁴⁰. De acuerdo a estos criterios, el diagnóstico del síndrome de Gorlin-Goltz se establece con la presencia de: a) Dos criterios mayores, b) Un criterio mayor y confirmación molecular ó c) Un criterio mayor y dos menores, de los siguientes:

Criterios mayores:

1. Número excesivo de carcinomas basocelulares (más de cinco), fuera de proporción en correlación con la exposición solar previa y fototipo.

2. Presencia de quistes odontogénicos en mandíbula o maxilar, antes de los 20 años de edad.
3. *Pits* en palmas o plantas.
4. Calcificación de la hoz del cerebro.
5. Meduloblastoma desmoplásico.
6. Familiar de primer grado con diagnóstico de Síndrome de Gorlin-Goltz.

Criterios menores:

1. Alteraciones de la parrilla costal.
2. Otras malformaciones esqueléticas con cambios radiológicos (alteraciones vertebrales, cifoescoliosis, acortamiento del 4to metacarpiano, polidactilia postaxial).
3. Macrocefalia.
4. Labio y/o paladar hendido.
5. Fibroma ovárico/cardiaco.
6. Quistes linfomesentéricos.
7. Alteraciones oculares (estrabismo, hipertelorismo, catarata congénita, glaucoma, coloboma).

Durante el embarazo se pueden detectar algunas anomalías en el feto sugerentes del síndrome de Gorlin-Goltz, tales como la detección por ultrasonido de tumores cardíacos, macrocefalia o paladar hendido. En las familias conocidas con mutaciones de *PTCH1* el diagnóstico puede realizarse en etapas tempranas del embarazo a través de una muestra de ADN tomada por biopsia de las vellosidades coriónicas, o líquido amniótico. La detección temprana puede minimizar las complicaciones relacionadas con el síndrome, y en aquellos en quienes el resultado de la prueba resulte negativo para mutaciones en *PTCH1*, se puede continuar con vigilancia en el periodo neonatal⁵.

Durante en periodo postnatal, debe realizarse a todos los infantes con antecedentes personales y familiares de mutación en *PTCH1*, una exploración física completa así como ecocardiograma para descartar fibromas cardíacos; medición de la circunferencia cefálica, y resonancia magnética nuclear (RMN) cada seis meses para descartar alteraciones neurológicas, hasta los siete años de edad, ya que después de éste periodo es poco frecuente la aparición de meduloblastomas².

El escrutinio de alteraciones dentales con panortotomografía de la mandíbula debe realizarse desde los 4 a 8 años de edad hasta los 40 años, para detectar quistes mandibulares y/o maxilares^{3,38,39}.

Anualmente se debe realizar una exploración cutánea de toda la superficie corporal desde la pubertad para la detección de carcinomas basocelulares. Sin embargo, en pacientes con antecedente de algún tipo de tumor cutáneo o crecimiento rápido de alguna lesión, ésta exploración debe realizarse con mayor frecuencia^{3,37}.

A todos los pacientes con diagnóstico de síndrome de Gorlin-Goltz se les debe enviar a consejo genético, se recomienda también la consejería de los familiares de primer grado^{5,38}.

TRATAMIENTO.

El tratamiento del síndrome de Gorlin-Goltz requiere un manejo multidisciplinario debido a las alteraciones en múltiples órganos y sistemas³.

Las alteraciones odontológicas deben ser tratadas de manera quirúrgica o ablativa. Como se mencionó con anterioridad, la presencia de meduloblastomas confiere un peor pronóstico y su tratamiento temprano es crucial para la mejoría de la sobrevida de los pacientes, la primera línea de tratamiento para éstos tumores es quirúrgica, sin embargo, se ha descrito también tratamiento con quimioterapia y radioterapia,

recordando que ésta última esta contraindicada en pacientes con síndrome de Gorlin-Goltz^{2,39}.

Los carcinomas basocelulares se pueden tratar de múltiples formas, la escisión quirúrgica con márgenes sigue siendo el tratamiento de elección, sin embargo, debido a la gran cantidad de tumores que presentan éstos pacientes, se ha optado por tratamientos que tengan un resultado cosmético más aceptado, tal es el caso del imiquimod tópico y el 5-fluorouracilo, que se aplican de manera tópica por 8 a 10 semanas teniendo una remisión clínica de hasta 54% de las lesiones^{41,42}.

En raras ocasiones se observa metástasis causada por los carcinomas basocelulares, sin embargo, se han estudiado nuevas drogas para el tratamiento de carcinomas basocelulares invasivos con potencial metastático, tal es el caso del *Vismodegib*, el cual es un inhibidor sistémico de la vía de señalización de Hedgehog, aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés) en enero de 2012 para el tratamiento de carcinomas basocelulares localmente avanzados o metastáticos. Se ha reportado que éste medicamento disminuye el tamaño de los tumores alcanzando remisión clínica casi completa en algunos casos. Las tasas de respuesta varían desde 43 hasta 58%^{3,35,36}.

De la misma forma, en pacientes en quienes se ha administrado éste tratamiento, se ha visto aclaramiento de los *pits* palo-plantares. Algunos efectos adversos reportados son disgeusia, espasmos musculares, caída de pelo, fatiga y pérdida de peso³⁵.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El síndrome de Gorlin-Goltz es una enfermedad hereditaria, autosómica dominante con penetrancia completa y expresividad variable que se caracteriza por la presencia de carcinomas basocelulares múltiples, quistes odontogénicos, *pits* palmo-plantares y calcificación de la hoz del cerebro. Las características clínicas han sugerido que el trastorno genético subyacente es una mutación de un gen supresor de tumores denominado *PTCH1*. Una mutación puntual en un alelo de éste gen puede resultar en malformaciones y variabilidad de expresión clínica. La inactivación de los dos alelos resulta en la formación de tumores. Existen pocos estudios que se concentran en delimitar la correlación fenotipo-genotipo de la enfermedad y ninguno se ha realizado en población mexicana. Por tanto este estudio contribuye a la investigación clínica, molecular y epidemiológica del síndrome de Gorlin-Goltz en población mexicana, al dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son las mutaciones asociadas al síndrome de Gorlin-Goltz y su correlación feno-genotípica en una muestra de población mexicana?.

3. JUSTIFICACION.

Como se ha mencionado anteriormente el síndrome de Gorlin-Goltz es una enfermedad poco frecuente, con una incidencia de hasta 1 en 256,000 personas. Existen diversos estudios en donde se describen las características clínicas de la enfermedad basados en reporte de casos y series de casos, sin embargo, la información acerca de las características genéticas de la enfermedad es más escasa, aún más la correlación feno-genotípica. Así mismo, no existen estudios genéticos de síndrome de Gorlin-Goltz realizados en población mexicana. Con base a esto, el presente estudio pretende aportar datos importantes para el conocimiento de ésta enfermedad en la población mexicana.

Los pacientes con síndrome de Gorlin Goltz generalmente son diagnosticados en la edad adulta o cuando ya tienen ciertas complicaciones, como por ejemplo, carcinomas

basocelulares extensos y alteraciones óseas en maxilar y mandíbula debido a los queratoquistes odontogénicos, entre otras. El diagnóstico temprano de estos pacientes reduce dichas complicaciones así como los costos que genera el tratamiento de éstas para los pacientes y las instituciones en donde se tratan; por lo que el diagnóstico molecular es una herramienta útil para éste fin.

4. OBJETIVO.

1. GENERAL:

- Describir las mutaciones asociadas al síndrome de Gorlin-Goltz en una muestra de población mexicana.

2. ESPECIFICOS:

- Delimitar la correlación de las características clínicas con el tipo de mutación en *PTCH1*.
- Identificar la frecuencia de las mutaciones de los pacientes en estudio atribuibles a *PTCH1*.
- Describir los aspectos sociodemográficos de los pacientes en estudio.

5. HIPOTESIS.

No aplica.

6. ASPECTOS METODOLOGICOS.

DISEÑO DEL ESTUDIO: Estudio observacional, descriptivo, transversal y prospectivo.

Material y Métodos.

POBLACIÓN: Pacientes con síndrome de Gorlin-Goltz que acudieron a la consulta de dermatología y genética del Instituto Nacional de Cancerología y del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua” entre 1990 y 2015.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

Pacientes que cumplieron con los criterios diagnósticos modificados según Bree et al., en 2011 de síndrome de Gorlin-Goltz⁴⁰.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Pacientes que no desearon participar en el estudio y que no aceptaron firmar el consentimiento informado (Anexos 1, 2 y 3).

TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Dentro del curso de los estudios cualitativos y dado que la incidencia del síndrome de Gorlin-Goltz es tan baja, se considera una enfermedad rara, recordando que para que una enfermedad se catalogue como “rara” debe tener una incidencia de por lo menos 1 en 5,000⁴³; el síndrome de Gorlin-Goltz tiene una incidencia aproximada de 1 en 250,000 por lo que siendo una enfermedad rara, no se puede calcular el tamaño de muestra.

TIPO DE MUESTREO.

La muestra se obtuvo mediante un muestreo no probabilístico de casos consecutivos.

DESCRIPCIÓN DEL ESTUDIO.

En una revisión histórica de los expedientes del área de Piel y Partes Blandas del Instituto Nacional de Cancerología y de los expedientes de consulta de Dermatología General y Dermatooncología del Centro Dermatológico Pascua, se encontraron 17 pacientes con diagnóstico de síndrome de Gorlin Goltz, a quienes se contactó por vía telefónica. Al momento de contactar a los pacientes, se encontró que tres de ellos fallecieron, uno a causa de SGG, los otros dos de causas no relacionadas con el síndrome. Los 14 pacientes restantes acudieron a una entrevista de primera vez para darles a conocer el objetivo del estudio. De éstos 14 pacientes, tres de ellos no

cumplían con criterios de inclusión para síndrome de Gorlin Goltz, por lo que solo se consideraron a 11 pacientes. Se realizó una primera consulta en donde se recabaron los datos sociodemográficos, se explicó a los pacientes detalladamente a cerca del síndrome de Gorlin Goltz, la importancia de su estudio y la razón por la cual ellos serían candidatos a realizarse el estudio molecular así como las implicaciones que este conllevaba. Se realizó una historia clínica de cada paciente, así como un familiograma para obtener un panorama en cuanto a los familiares que también pudieran estar afectados. De la misma manera, se realizó una exploración física con el objetivo de obtener datos importantes como el número de carcinomas basocelulares que presentaban los pacientes, entre otras características del síndrome. Se dio a cada paciente un consentimiento informado en el cual se explicaba qué es el síndrome de Gorlin Goltz así como el objetivo del estudio y la forma en que se realizaría dicho estudio. Los pacientes que aceptaron participar en el estudio, firmaron el consentimiento y se les tomó una muestra de 6ml de sangre periférica para la obtención de ADN; sin embargo, dos pacientes rechazaron la toma de la muestra, por lo que se excluyeron y se consideraron para el estudio molecular a nueve pacientes.

7. DEFINICION DE VARIABLES.

1. Variables sociodemográficas.

a) Género.

Definición conceptual: Constitución orgánica y roles socialmente construidos, comportamientos, actividades y atributos que una sociedad considera como apropiados para hombres y mujeres y que los distinguen como tal.

Definición operacional: Se registró con base al sexo de asignación social.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Masculino, Femenino.

b) Edad.

Definición conceptual: Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.

Definición operacional: Se registró la edad en años.

- Tipo de variable: Cuantitativa discreta.
- Unidad de medición: Edad en años.

c) Edad de diagnóstico.

Definición conceptual: Tiempo transcurrido desde el nacimiento en el que se establecen criterios para decir que una persona padece de alguna enfermedad.

Definición operacional: Se interrogó la edad en que se realizó el diagnóstico de síndrome de Gorlin-Goltz a los pacientes en estudio en base a los criterios.

- Tipo de variable: Cuantitativa discreta.
- Unidad de medición: Edad en años.

d) Escolaridad.

Definición conceptual: Periodo de tiempo que dura la estancia de una persona en una escuela para estudiar y recibir la enseñanza adecuada.

Definición operacional: Se interrogó a los pacientes a cerca del nivel escolar más alto terminado.

- Tipo de variable: Cualitativa ordinal.
- Unidad de medición: Primaria, Secundaria, Preparatoria/Bachillerato, Licenciatura, Posgrado.

e) Ocupación.

Definición conceptual: Acción o función que se desempeña para ganar el sustento durante un tiempo determinado que generalmente requiere conocimientos especializados.

Definición operacional: Se interrogó al paciente su ocupación al momento del estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Estudiante, Empleado(a), Hogar, Desempleado(a).

f) Estado civil.

Definición conceptual: Situación de las personas determinada por sus relaciones de familia, provenientes del matrimonio o del parentesco, que establece ciertos derechos y deberes de acuerdo con el código civil.

Definición operacional: Se registró el estado civil al momento del estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Casado(a), Soltero(a), Viudo(a), Divorciado(a).

2. Variables clínicas.

a) Carcinoma basocelular.

Definición conceptual: Es el tipo de cáncer de piel más frecuente, originado de las células de la capa basal de la epidermis.

Definición operacional: Se registró el número de carcinomas basocelulares que han presentado los pacientes en estudio, registrados en el expediente, a lo largo de su vida hasta el momento del estudio.

- Tipo de variable: Cuantitativa discreta.
- Unidad de medición: Cantidad de carcinomas basocelulares en números naturales.

b) Variedad clínica del carcinoma basocelular.

Definición conceptual: Se refiere a los distintos tipos de tumores basocelulares que se reportan de acuerdo a las características clínicas macroscópicas y dermatoscópicas.

Definición operacional: Se describió la variedad clínica según la clasificación que da al carcinoma basocelular sus características clínicas y evolutivas.

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Unidad de medición: Tumoral, Tumoral pigmentado, Tumoral ulcerado, Pseudoquístico, Esclerodermiforme, Escleroatrófico, Plano, Plano pigmentado, Plano ulcerado, Vegetante, Ulcus rodens, Fibroepitelioma de Pinkus.

c) Variedad histológica del carcinoma basocelular.

Definición conceptual: Se refiere a los distintos tipos de tumores basocelulares que se reportan de acuerdo a las características microscópicas.

Definición operacional: Se describió la variedad histológica según la clasificación que da al carcinoma basocelular sus características microscópicas.

Tipo de variable: Cualitativa nominal.

Unidad de medición: Solido, Solido pigmentado, Adenoide, Quístico, Queratósico, Infiltrante, Superficial, Micronodular, Metatípico, Fibroepitelioma Pinkus, Células claras, Multicéntrico.

d) Queratoquiste odontogénico.

Definición conceptual: Es una tumoración quística cuya cápsula está formada por un epitelio escamoso derivado de la lámina dental o el epitelio odontogénico primordial.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de queratoquistes odontogénicos.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presentes, Ausentes.

e) Pits palmo-plantares.

Definición conceptual: Son depresiones puntiformes de 1 a 2 milímetros, asimétricas, no palpables, que afecta palmas y/o plantas, causadas por la ausencia parcial o total de la capa córnea.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de pits palmo-plantares en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presentes, Ausentes.

f) Calcificación de la hoz del cerebro.

Definición conceptual: Depósitos de calcio a nivel de la hoz del cerebro demostrada por tomografía axial computarizada.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de calcificación de la hoz del cerebro en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente.

g) Meduloblastoma.

Definición conceptual: Tumor neuroectodérmico primitivo cerebeloso observado con mayor frecuencia en la primera década de la vida. Se considera una neoplasia maligna con mortalidad elevada.

Definición operacional: Se describió la presencia, ausencia o antecedente de meduloblastoma en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente, Antecedente de meduloblastoma.

h) Malformaciones esqueléticas.

Definición conceptual: Defectos congénitos a nivel de huesos o cartílagos.

Definición operacional: Presencia o ausencia de alteraciones en la parrilla costal, vertebrales, cifoescoliosis, acortamiento del 4to metacarpiano o polidactilia postaxial.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presencia, Ausencia.

i) Macrocefalia.

Definición conceptual: Aumento del perímetro craneal en más de dos desviaciones estándar por encima de los rangos normales para la edad y sexo.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de macrocefalia en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente.

j) Labio y/o paladar hendido.

Definición conceptual: Defecto congénito que ocurre cuando el labio superior y/o paladar no se desarrollan correctamente debido a un defecto de la línea media en el periodo embrionario.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de labio y/o paladar hendido en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente.

k) Fibroma ovárico.

Definición conceptual: Neoplasia sólida generalmente benigna originada de las células estromales del ovario.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de fibromas ováricos en las pacientes de sexo femenino incluidas en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente.

l) Fibroma cardiaco.

Definición conceptual: Tumor cardiaco primario, infrecuente, habitualmente benigno originado de células cardiacas mesenquimales, de predominio septal, observado generalmente en la infancia.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de fibromas cardiacos en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente.

m) Quistes linfomesentéricos.

Definición conceptual: Tumores abdominales, benignos y muy poco frecuentes localizados en el mesenterio.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de quistes linfomesentéricos en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presente, Ausente

n) Alteraciones oculares.

Definición conceptual: Alteraciones a cualquier nivel del globo ocular o sus estructuras adyacentes.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de alguna de las siguientes alteraciones oculares en los pacientes en estudio: estrabismo, hipertelorismo, catarata congénita, glaucoma, coloboma.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.

- Unidad de medición: Presente, Ausente.

o) Familiar de primer grado afectado.

Definición conceptual: Padres, hermanos o hijos con síndrome de Gorlin-Goltz o antecedente de haber padecido éste síndrome.

Definición operacional: Se interrogó a los pacientes en estudio a cerca de la presencia o ausencia de familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) afectados con síndrome de Gorlin-Goltz.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presencia, Ausencia.

p) Numero de familiares con características compatibles con síndrome de Gorlin-Goltz.

Definición conceptual: Se refiere a la cantidad de personas relacionadas por parentesco al caso índice o paciente estudiado, que también cumple con criterios diagnósticos clínicos compatibles con el diagnóstico de Síndrome de Gorlin-Goltz.

Definición operacional: Se interrogó a los pacientes en estudio a cerca de la presencia y la cantidad de familiares afectados y diagnosticados con el síndrome de Gorlin-Goltz.

- Tipo de variable: Cuantitativa discreta.
- Unidad de medición: Número de familiares afectados.

3. Variables moleculares.

a) Mutación.

Definición conceptual: Cambio fijo y heredable que ocurre en la secuencia nucleotídica de un cromosoma, el cual a su vez puede ubicarse en los segmentos codificantes o regulatorios de un gen, ocasionando una alteración en el nivel de expresión, la regulación, la transcripción o procesamiento del RNA o la traducción de

éste, y cuyos efectos en el fenotipo pueden llegar a ser deletéreos. Debido a lo anterior, este tipo de cambios no suelen observarse en la población sana.

Definición operacional: Presencia o ausencia de mutación en el gen en estudio *PTCH1*

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presencia, Ausencia.

b) Tipo de Mutación.

Definición conceptual: Clasificación de acuerdo al efecto que produce en la expresión de la información genética una mutación, definida como un cambio fijo y heredable en la secuencia nucleotídica. Es así que las mutaciones pueden ser puntuales, deleciones o inserciones que interrumpen el marco de lectura, así como alteraciones de las secuencias de corte-empalme (*splicing*). También se pueden incluir aquellas mutaciones que no afectan a la secuencia del transcrito (ARNm) sino a su estabilidad, de forma que el mensajero se degrada rápidamente y no llega a traducirse en la proteína correspondiente.

Definición operacional: Se describió que tipo de mutación presentaban los pacientes: puntual, deleción o inserción.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Mutación puntual, Deleción, Inserción.

c) Efecto de la mutación.

Definición conceptual: Se refiere a la repercusión de la mutación sobre la función de la proteína, para la cual codifica el gen en donde se encuentra. Así, las mutaciones pueden ser deletéreas o patogénicas, neutras o variantes de significado incierto.

Definición operacional: Se describió el efecto de la mutación encontrada en los pacientes en estudio, dividiéndolas en deletéreas y neutras.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.

- Unidad de medición: Mutación deletérea, Mutación neutra.

d) Región del gen donde ocurre la mutación.

Definición conceptual: Localización a nivel de la estructura del gen (exón, intrón, región promotora), en donde se identifica la variante en la secuencia del DNA.

Definición operacional: Se describió la región del gen en donde ocurrió la mutación del gen en estudio, siendo ésta exón, intrón o región promotora.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Exón, Intrón, Región promotora.

e) Polimorfismo.

Definición conceptual: Variante en la secuencia del DNA que se observa en por lo menos el 1% de la población sana.

Definición operacional: Se describió la presencia o ausencia de polimorfismo en los pacientes en estudio.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Presencia, Ausencia.

f) Clasificación de polimorfismos asociados.

Definición conceptual: Descripción del tipo de polimorfismo de acuerdo a su composición (número de nucleótidos), localización en el gen y asociación reportada con enfermedades complejas.

Definición operacional: Se describieron las características para la clasificación de los polimorfismos asociados.

- Tipo de variable: Cualitativa nominal.
- Unidad de medición: Composición del polimorfismo, Localización en el gen, Asociación reportada.

8. ESTRATEGIAS DE RECOLECCION DE DATOS.

INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCION DE DATOS.

En la consulta de primera vez que tuvieron los pacientes incluidos en el estudio, se realizó una historia clínica con detalle de los antecedentes heredofamiliares y árbol genealógico de tres generaciones, así como se les otorgó asesoría genética pre-prueba a los pacientes. De la misma manera se realizó una exploración física completa, historia clínica dermatológica y estudios de extensión necesarios para descartar y/o confirmar características del síndrome de Gorlin-Goltz.

Los datos sociodemográficos necesarios de los pacientes se recolectaron mediante encuesta a los pacientes y revisión del expediente clínico de cada paciente.

RECOLECCION DE DATOS CLINICO-DERMATOLOGICOS.

Se obtuvieron mediante la hoja de recolección de datos clínicos (Anexo 4) en donde se describieron las variables clínicas y criterios diagnósticos del síndrome de Gorlin-Goltz.

ESTRATEGIA PARA EL ANÁLISIS MOLECULAR DE LAS MUESTRAS.

Extracción de ácidos nucleicos. Para el diagnóstico molecular se incluyeron a nueve pacientes, ya que dos pacientes se rehusaron a la toma de la muestra. Éstos nueve pacientes firmaron el consentimiento informado y posteriormente se tomaron 6ml de sangre periférica por venopunción, con la asepsia y antisepsia requeridas para éste fin, con sistema cerrado al vacío (Vacutainer®) en tubos con EDTA como anticoagulante, el cual no interfiere con el proceso de extracción de ADN.

Posteriormente se realizó la extracción de ADN, para el análisis del gen implicado en el síndrome de Gorlin Goltz, a partir de las muestras de sangre periférica a través del uso de sales caotrópicas y perlas magnéticas que permiten separar al DNA del resto de moléculas por diferencias de cargas⁴⁴.

Tras el proceso descrito, se cuantificó el ADN de los pacientes por espectrofotometría y se verificó la integridad de los ácidos nucleicos mediante un gel de agarosa al 1%, evaluando la presencia de una sola banda del peso molecular esperado para el ADN genómico y sin evidencia de degradación.

Aquellas muestras que fueron evaluadas con adecuada cantidad (cantidad mínima de 50ng de DNA genómico por muestra), pureza y calidad, fueron las empleadas para el análisis molecular.

SECUENCIACION DE SIGUIENTE GENERACION (NGS) DEL GEN *PTCH1*.

Preparación de librerías de ADN para secuenciación masiva. Se emplearon 200ng de ADN extraído de sangre periférica para amplificar la región codificante y los sitios de corte y empalme (*splicing*) del panel de 143 genes de alta susceptibilidad para cáncer hereditario, dentro de los cuales se incluyó el gen de interés, *PTCH1*. Por medio de diversas Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR), empleando el kit *GeneRead DNA Gene Panel Custom V2* (Qiagen®), se prepararon las librerías de cada paciente, las cuales se identificaron con una etiqueta molecular (*barcode*) individual. El control de calidad de las librerías se realizó empleando el equipo de micro-electroforesis de ácidos nucleicos *Bioanalyzer* (Agilent®).

Secuenciación masiva en paralelo de librerías de ADN. Las librerías de cada paciente fueron secuenciadas en el equipo *MiSeq System* (Illumina®), empleando el kit *MiSeq Reagent kit V3* (Illumina®), siguiendo las especificaciones del fabricante. Como control positivo se analizó el ADN genómico de los de pacientes incluidos en el protocolo de estudio.

Análisis bio-informático. Para identificar alteraciones patogénicas, las lecturas de secuenciación del gen *PTCH1* se mapearon con la secuencia de referencia del genoma humano (GRCh38), empleando el programa GATK. Las alteraciones que se consideraron fueron: cambios de un nucleótido, inserciones y deleciones. Las

muestras con alteraciones potencialmente patogénicas se analizaron con los paquetes IGV, *Variant Interpreter*, *Variant Studio*, PolyPhen2, SIFT, así como con la revisión exhaustiva en las bases de datos internacionales de cáncer y variación genética en humanos (COSMIC, 1000 *Genomes Project*, *Exome Sequencing Project* NHLBI, dbSNP 141, TCGA, ICGC), para identificar a las alteraciones con impacto potencial en la función proteica.

AMPLIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS POR PCR Y CORROBORACIÓN DE LAS Mutaciones identificadas. Para poder llevar a cabo la verificación de las mutaciones patogénicas identificadas, se diseñaron los oligonucleótidos de toda la región codificante del gen *PTCH1* utilizando para el diseño la secuencia de referencia reportada en *gene bank* (Anexo 5).

Se realizaron las PCRs relacionadas a la búsqueda mutacional dirigida de las regiones involucradas del gen *PTCH1*. Posteriormente se analizaron por secuenciación capilar o secuenciación *Sanger*. La secuenciación *Sanger* es un método con el que se identifica la secuencia de nucleótidos a partir de la incorporación en cadena de dideoxinucleótidos empleando una DNA polimerasa durante una replicación in vitro del fragmento de DNA seleccionado.

Adicionalmente, en aquellas regiones del gen *PTCH1* que no tuvieron una cobertura óptima mediante secuenciación masiva, se amplificaron de manera dirigida por PCR dichos fragmentos, se secuenciaron por *Sanger* y se realizó el análisis correspondiente para descartar la presencia o existencia de alguna variante.

DESCRIPCIÓN DE LAS MUTACIONES IDENTIFICADAS.

Al identificarse alguna mutación en el gen *PTCH1*, se realizó una búsqueda en las bases de datos *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) y ClinVar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) con el fin de evaluar la importancia clínica de dichas mutaciones. Las mutaciones que no se encontraron en las bases de datos, se

evaluaron mediante análisis *in silico*, para predecir el impacto en la función de la proteína mediante programas diseñados para este fin (PolyPhen). Aquellas que tuvieron un impacto deletéreo y/o patogénico, se reportaron como mutaciones patogénicas no descritas previamente. Las mutaciones cuyo valor de predicción de riesgo fue intermedio o bajo, y de las cuales no se tuvieron reportes de su impacto por estudios funcionales, se reportaron como Variantes de Significado Clínico Incierto (VUS), no pudiendo dar un resultado concluyente para el manejo clínico, como se recomienda en el caso de estos reportes⁴⁵.

Reporte de resultados

Se redactó un reporte de las mutaciones identificadas donde se indicó la metodología empleada, la nomenclatura y de encontrarse en las bases de datos antes citadas, la relevancia clínica que representa. Dicho reporte fue entregado junto con el asesoramiento genético post-prueba a los pacientes participantes del estudio.

9. PROCESAMIENTO ESTADISTICO Y ANALISIS.

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico para las ciencias sociales (SPSS, versión 20.0).

Para responder a los objetivos del estudio se realizó estadística descriptiva de todas las variables consideradas, por medio de las frecuencias, medianas como medida de tendencia central (cuando fue pertinente) y las proporciones (como medida de dispersión).

Para las variables moleculares se determinaron las frecuencias alélicas de las mutaciones o polimorfismos del gen *PTCH1*. Las frecuencias alélicas de las mutaciones y/o polimorfismos encontrados se compararon con los datos descritos en la literatura utilizando la prueba de χ^2 . Sin embargo, tras obtener los resultados de secuenciación, validación de la misma y búsqueda en la literatura, ninguna de las

mutaciones se encontraba reportada en la literatura, por lo que no se realizó este análisis.

10. RECURSOS.

El proyecto fue financiado con recursos de la Clínica de Cáncer Hereditario bajo la Dirección de Investigación del Instituto Nacional de Cancerología.

11. ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

En la consulta externa de Dermatología, Dermatooncología y la Clínica de Cáncer Hereditario se identificaron a aquellos pacientes que fueron candidatos para el estudio molecular de *PTCH1*. A aquellos que cumplieron los criterios clínicos, se les explicó de manera detallada el propósito de realizar el análisis del gen citado con la finalidad de conocer su genotipo y con ello, el riesgo que representa, así como brindar la evidencia necesaria para orientar y personalizar su tratamiento, seguimiento y pronóstico, dentro del equipo multidisciplinario involucrado en su atención integral.

Se les invitó a participar de manera voluntaria en éste estudio, sin remuneración económica, o de otra índole, con la toma de una muestra de sangre para la determinación de mutaciones en *PTCH1*, así mismo se le informó que tras el resultado del estudio se le brindaría consejo genético detallado para explicarlo ampliamente así como las posibles decisiones derivadas del mismo. Lo anterior dentro del marco bioético inherente al consejo/asesoramiento genético. De la misma manera se les comentó a los pacientes que una vez concluido el estudio, continuarán con el manejo médico integral que necesitaran para su seguimiento, vigilancia y tratamiento.

A todos los pacientes que se incluyeron en el estudio se les otorgó una carta de consentimiento informado, la cual debieron firmar si estaban de acuerdo con los términos para poder participar en el estudio, previa aclaración de dudas del paciente o testigos. Para los pacientes menores de edad (menos de 18 años) la carta de

consentimiento informado debió ser firmada por los padres o tutores, así como se les otorgaba una carta de asentimiento informado que ellos mismos firmaban al estar de acuerdo en la toma de la muestra (Anexos 3, 4 y 5). Todas las muestras de sangre periférica se obtuvieron mediante una punción venosa.

12. RESULTADOS

Se reclutaron pacientes de dos centros de concentración de la Ciudad de México (Instituto Nacional de Cancerología y Centro Dermatológico Pascua), obteniendo a 11 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión para síndrome de Gorlin Goltz. A éstos 11 pacientes, se les brindó una consulta genética y dermatológica de primera vez, otorgándose consejería genética pre-prueba, la cual consistió en explicar a los pacientes la probabilidad de ser portador de una mutación la cual confiere un mayor riesgo para el desarrollo de carcinomas basocelulares y de otras malformaciones y tumores. De la misma manera se les explicó a los pacientes en qué consistía la prueba, sus riesgos, limitaciones y beneficios, el patrón de herencia que tiene la enfermedad y los posibles resultados que se podían obtener. Se explicó el procedimiento de la toma de muestra, y se tomó la muestra a los nueve pacientes que accedieron a ésta.

Entre las características sociodemográficas de los 11 pacientes de los que se obtuvieron datos, se encontró que seis de ellos eran mujeres y 5 hombres. La mediana de edad fue de 39 años, con un rango que osciló entre los 15 y 72 años. En cuanto a la escolaridad, cuatro pacientes contaban con licenciatura, tres con bachillerato, dos con secundaria terminada y dos con primaria incompleta. En relación al estado civil, seis pacientes eran solteros y cinco casados. (Tabla 1).

TABLA 1. Características sociodemográficas de 11 pacientes con el Síndrome de Gorlin-Goltz.

PACIENTE	EDAD	SEXO	OCUPACION	ESCOLARIDAD	ESTADO CIVIL
G01	46	F	Comerciante	Primaria incompleta	Casado
G02	72	F	Hogar	Primaria incompleta	Casado
G03	39	M	Empleado	Primaria	Casado
G04	60	F	Hogar	Secundaria	Casado
G05	41	F	Empleado	Bachillerato	Soltero
G06	29	M	Desempleado	Secundaria	Soltero
G07	15	M	Estudiante	Secundaria	Soltero
G08	53	M	Comerciante	Licenciatura	Casado
G09	31	F	Hogar	Licenciatura	Soltero
G10	31	F	Estudiante	Licenciatura	Soltero
G11	33	M	Empleado	Licenciatura	Soltero

F: Femenino, M: Masculino

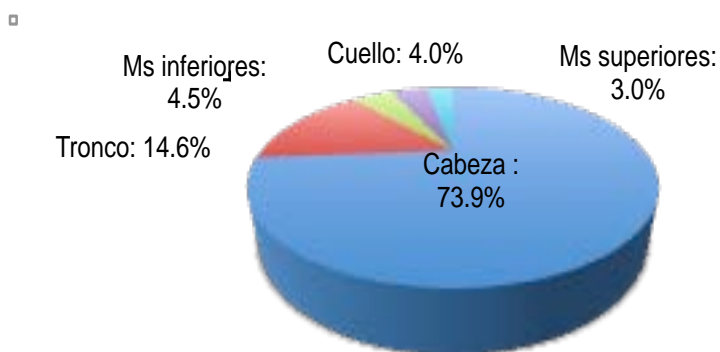
Se realizó dentro de la consulta de primera vez una exploración física completa, buscando intencionadamente el número de carcinomas basocelulares (CBCs) que tenían los pacientes, mediante una revisión dermatológica específica y exhaustiva. Junto con los datos del expediente, se determinó el número de carcinomas basocelulares que había presentado cada paciente a lo largo de su vida. De los 11 pacientes, cuatro de ellos presentaban de 5 a 10 carcinomas basocelulares, un paciente de 10 a 20, y seis pacientes de 20 a 50 carcinomas basocelulares. El paciente con el menor número de CBCs fue de 6, el mayor con 34. El rango de CBCs encontrados en los pacientes fue de 6 a 34 con una mediana de 21 CBCs en la historia de los pacientes. La mediana de edad al diagnóstico fue de 24 años, con un rango de 11 a 44 años. (Tabla 2).

TABLA 2. Número de Carcinomas basocelulares y edad al diagnóstico de 11 pacientes con el Síndrome de Gorlin-Goltz.

PACIENTE	NO. CBC	EDAD INICIO
G01	7	44
G02	21	23
G03	7	37
G04	25	31
G05	13	26
G06	6	23
G07	34	11
G08	10	42
G09	24	14
G10	25	24
G11	26	21

La topografía más afectada por el carcinoma basocelular en los pacientes estudiados fue la cabeza en un 73.9%, afectando más a piel cabelluda, seguida de frente y nariz. La segunda topografía más frecuente fue tronco (14.6%), principalmente en espalda, seguida de miembros inferiores en un 4.5% con mayor frecuencia en piernas, y por último cuello en un 4.04% y miembros superiores en 3.03%. (Gráfica 1).

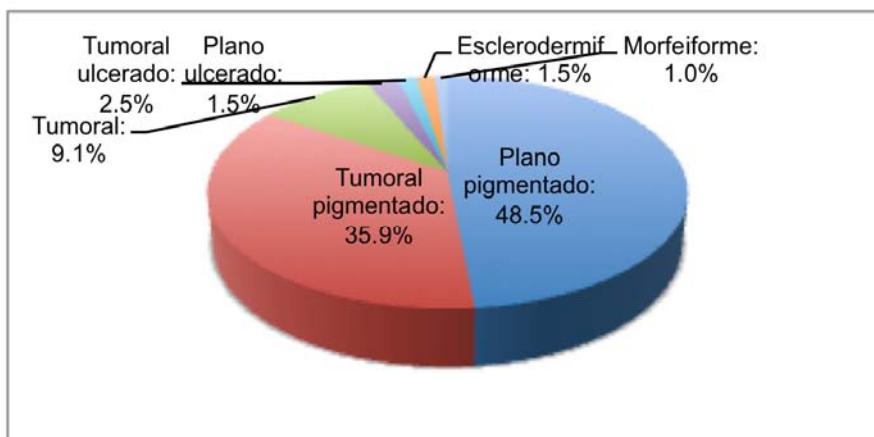
Gráfica 1. Topografía afectada por el CBC en 11 pacientes con Síndrome de Gorlin-Goltz.



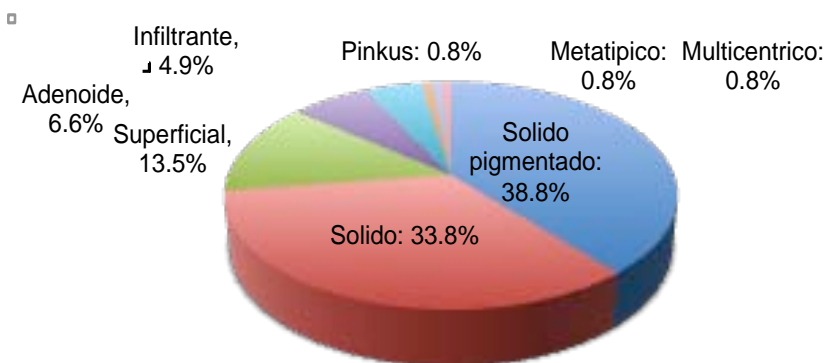
Se realizó un análisis de todos los carcinomas basocelulares presentados por los pacientes, se encontró un total de 198 tumores, de los cuales el tipo clínico más frecuente fue el plano pigmentado en un 48.5%, seguido del tumoral pigmentado en un 35.9%, tumoral en 9.1%, tumoral ulcerado en 2.5%, plano ulcerado y esclerodermiforme ambos en un 1.5% respectivamente y con menor frecuencia el tipo morfeiforme encontrándose en un 1.0% de los pacientes (Gráfica 2).

En cuanto al tipo histológico, el más frecuente fue el solido pigmentado en un 38.8%, seguido del sólido en 33.8%, superficial en 13.5%, adenoide en 6.6%, infiltrante 4.9%, y las variedades multicéntrico, metatípico y fibroepitelioma de Pinkus en un 0.8% cada una (Gráfica 3)

Gráfica 2. Tipos clínicos más frecuentes de carcinomas basocelulares encontrados en los pacientes en estudio.



Gráfica 3. Tipos histológicos más frecuentes de carcinomas basocelulares encontrados en los pacientes de estudio.



En relación a los *pits* palmo-plantares, el 90.9% (10 de 11) los presentaron al momento de la exploración.

A todos los pacientes estudiados se les realizaron, además de la exploración física, estudios de gabinete, que incluyeron: ortopantomografía, tomografía computada de cráneo, serie ósea, ultrasonido abdomino-pélvico y ecocardiograma en búsqueda de queratoquistes odontogénicos, calcificación de la hoz del cerebro, alteraciones esqueléticas, quistes linfomesentéricos, fibromas ováricos y fibromas cardiacos, respectivamente; los cuales se reportan en la tabla 3.

En relación a los queratoquistes odontogénicos, se encontró que el 100% de los pacientes los había presentado en algún momento, con una mediana en la edad de diagnóstico del primero a los 24 años.

La calcificación de la hoz del cerebro se presentó en 7 de los 11 pacientes (63.6%) y en uno de ellos se encontraron lesiones líticas en cráneo, éstos hallazgos fueron diagnosticados mediante tomografía computada de cráneo. Ningún paciente tenía antecedente de meduloblastoma ni se diagnosticó al momento de la evaluación.

Dentro las malformaciones esqueléticas de los pacientes estudiados, la más frecuente fue costilla bífida, que se encontró en 5 de los 11 pacientes (45.5%), uno de los cuales presentaba también escoliosis, que fue la segunda manifestación más frecuente encontrada también en otros 3 pacientes; otras manifestaciones esqueléticas fueron *pectum excavatum* en un paciente, espondiloartrosis dorsolumbar en un paciente y un paciente presentó xifoescoliosis.

En ningún paciente se encontraron quistes linfomesentéricos o fibromas cardiacos. Dos pacientes presentaron quistes ováricos, sin ser diagnosticados por ultrasonido como fibromas.

Otro criterio menor del síndrome de Gorlin Goltz es la macrocefalia. Se midió a los pacientes el perímetro cefálico, encontrándose macrocefalia en 5 de los 11 pacientes (45.5%).

Las manifestaciones oculares encontradas en los pacientes fueron visión borrosa, que se observó en 3 de 11 pacientes (27.3%), otras fueron glaucoma congénito en un paciente, catarata en un paciente y alteración de la visión nocturna en un paciente; el resto no presentaros alteraciones oculares.

TABLA 3. Hallazgos clínicos presentados en 11 pacientes con Síndrome de Gorlin-Goltz.

PACIENTE	QOQ	PPP	CHC	ME	MC	AO
01	+	+	-	+	-	-
02	+	+	-	+	-	+
03	+	+	+	+	-	-
04	+	+	+	+	+	+
05	+	+	+	+	+	+
06	+	+	-	+	-	-
07	+	-	+	+	-	-
08	+	+	-	+	-	+
09	+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	-

QOQ: Queratoquistes odontogénicos; PPP: Pits palmoplantares; CHC: Calcificación de la hoz del cerebro; ME: Malformaciones esqueléticas; MC: Macrocefalia; AO: Alteraciones oculares. En todos los casos: (+) Presente; (-) Ausente.

Con respecto al número de familiares con características compatibles con el Síndrome de Gorlin-Goltz se encontró que 7 de los 11 pacientes (63.6%) no tenían familiares con el Síndrome; de los cuatro pacientes restantes, en dos casos, el padre y un hermano(a); y en los otros dos pacientes, la madre y un hermano(a) presentaban queratoquistes odontogénicos.

De los nueve pacientes a los que se les tomo muestra de sangre periférica, se les realizaron estudios moleculares, que consistían en la detección de mutaciones en el gen *PTCH1*.

De éstos nueve pacientes, se encontraron mutaciones en cuatro de ellos (44.4%). En el paciente G01 se encontró una duplicación de una base (c.631dupA) en el exón 4 y el paciente G06 presentó una deleción de una base (c.1044delG) en el exón 7; éstas mutaciones producen un corrimiento del marco de lectura, lo que conlleva a la generación de un codón de paro. El paciente G09 presentó un cambio de una guanina por una timina (c.3406G>T) en el exón 20, ésta mutación condiciona un codón de paro por si sola, lo que se denomina mutación tipo *non-sense*.

El paciente G03 presentó una mutación en el gen *PTCH1* caracterizada por un cambio de una adenina por una citosina (c.1488C>A) en el exón 10, esto determina un cambio en la proteína (p.N496K), siendo una mutación de sentido equivocado (*missense*), reportada *in silico* como patogénica. (Tabla 4).

En el paciente G07 se encontró el polimorfismo c.3944C>T (p.Pro1315Leu) en el exón 24 que se reporta en la literatura como no patogénica.

TABLA 4. Mutaciones encontradas en el gen *PTCH1* en cuatro pacientes con el Síndrome de Gorlin-Goltz.

PACIENTE	GEN	MUTACIÓN	PROTEÍNA	EXÓN	TIPO DE MUTACIÓN	REFERENCIAS	PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i>
G01	<i>PTCH1</i>	c.631dupA	p.T211X	4	F	NR	NA
G03	<i>PTCH1</i>	c.1488C>A	p.N496K	10	M	NR	P
G06	<i>PTCH1</i>	c.1044delG	p.K348X	7	F	NR	NA
G09	<i>PTCH1</i>	c.3406G>T	p.G1136X	20	NS	NR	NA

F: *Frameshift*; M: *Missense*; NS: *Non-sense*; NR: no reportada; P: patogénica; NA: no aplica.

13. DISCUSIÓN

A nivel mundial, el cáncer de piel no-melanoma representa la neoplasia más frecuente, vinculada a una baja mortalidad pero una importante morbilidad, que repercute en la calidad de vida de los pacientes afectados y un problema de atención para la salud pública, al involucrar una gama diversa de tratamientos médicos y quirúrgicos. A nivel etiológico, se reconoce que hasta el 10% del total de todos los tipos de cáncer guardan una etiología hereditaria, inherente a mutaciones germinales en genes de alta susceptibilidad para cáncer⁴⁶.

El síndrome de Gorlin-Goltz (SGG) es el principal síndrome de cáncer hereditario que involucra un riesgo elevado para padecer cáncer de piel, particularmente carcinomas basocelulares. Se ha descrito que hasta el 97% de los pacientes afectados por el SGG, presentaran múltiples carcinoma basocelulares en el transcurso de su vida. Así mismo es alta la frecuencia para afecciones a otros niveles, como las manifestaciones dentales y óseas^{5,46}.

Dentro del análisis de los datos sociodemográficos de éste estudio destaca que no se encontró una predilección de sexo, ya que la relación hombre-mujer fue de 6 mujeres y 5 hombres, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura ya que se ha descrito que, el Síndrome de Gorlin Goltz afecta a hombres y mujeres por igual^{3,47}.

La mediana de edad de presentación del Síndrome en los pacientes fue de 24 años, con un rango de edad de 11 a 44 años. Larsen et al., reportan una edad media al diagnóstico de 21 años; éste resultado quizá esté relacionado con la tardanza en buscar atención medica de algunos pacientes, así como su estado socioeconómico³.

El número de carcinomas basocelulares presentados por los pacientes fue variable, desde 6 hasta 34 (mediana de 21 CBCs) en la historia dermatológica de los pacientes. En la Tabla 2, se puede observar que no se encontró una relación clínica entre la cantidad de carcinomas basocelulares con la edad inicio de la enfermedad. En la

literatura, el número de carcinomas basocelulares presentados por paciente varía de pocos hasta cientos y se reporta que el número de carcinomas basocelulares es mayor en pacientes caucásicos³. Probablemente en este estudio el número de CBCs por paciente fue más bajo por el reducido tamaño de muestra, lo que se considera como una de las principales limitantes de éste estudio.

El tipo clínico más frecuente de carcinoma basocelular que presentaron los pacientes, fue el plano pigmentado en un 48.4%, seguido del tumoral pigmentado en un 40.9%; así mismo el tipo histológico más frecuente fue el sólido pigmentado en un 57.5%, lo cual correlaciona con el tipo clínico más frecuentemente encontrado. No se encontraron reportes de estudios que se enfoquen en los tipos clínicos e histológicos más frecuentes de carcinomas basocelulares presentados en éstos pacientes, por lo que ésta información es de gran relevancia, ya que no se ha reportado a nivel mundial, sin embargo sería necesario, realizar un trabajo con una muestra más grande para corroborar estos datos. De la misma manera, se sabe que afortunadamente, el tipo histológico más frecuentemente observado no se considera un subtipo de alta agresividad, lo que hace que el tratamiento de estos tumores sea menos agresivo, si se detectan en etapas tempranas^{48,49}.

Respecto a los queratoquistes odontogénicos, se ha publicado que hasta un 90.9% de los pacientes los pueden presentar³⁸; en este trabajo se observaron en un 100%. Así mismo se ha descrito que después de los carcinomas basocelulares, los queratoquistes odontogénicos son la característica más frecuentemente encontrada en pacientes con síndrome de Gorlin Goltz³⁸.

Los *pits* palmoplantares se encontraron en el 90.9% de los pacientes, siendo ésta cifra superior a lo reportado en la literatura (de 66.7% hasta 87%)^{38,50}.

Otra característica que se considera dentro de los criterios mayores del síndrome de Gorlin-Goltz es la calcificación de la hoz del cerebro, la cual se encontró en 54.5% de los pacientes; en la literatura se ha reportado una prevalencia de 53.8%⁵¹, lo que es casi similar a lo encontrado en este estudio.

Dentro de las malformaciones esqueléticas reportadas, la más frecuente son costillas bífidas, que se encontró en 36.3% de los pacientes, al igual que la escoliosis. En la literatura, las costillas bífidas se reportan en los pacientes entre un 25% hasta 36.4%^{38,50}.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el perímetro cefálico (PC) crece hasta los 3-5 años de edad. A partir de ésta edad, es muy poco el crecimiento que se tiene, por lo que los parámetros normales de PC en adultos se basan en las tablas de la OMS para niñas y niños tomando la referencia de mayor edad en la tabla (Imagen 1 y 2). La macrocefalia se define como un perímetro cefálico por arriba del percentil 85. Basándose en ésta definición, se encontró que el 45.4% de los pacientes (5 de 11) presentaron macrocefalia. Ahn et al., reportaron en 2004 que de 33 pacientes con síndrome de Gorlin Goltz el 42.4% presentaron macrocefalia, lo que se asemeja a lo encontrado en este estudio³⁸.

IMAGEN 1. Perímetro cefálico para la edad en niñas

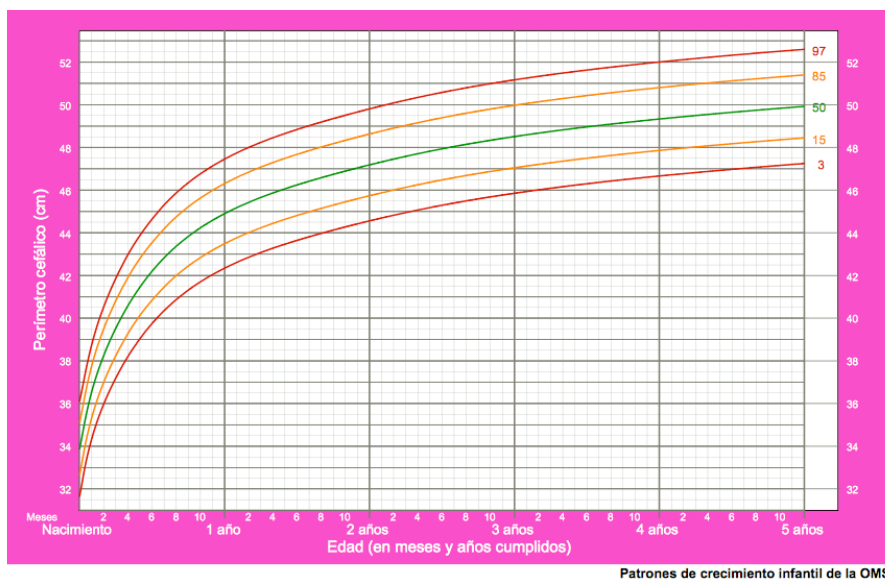
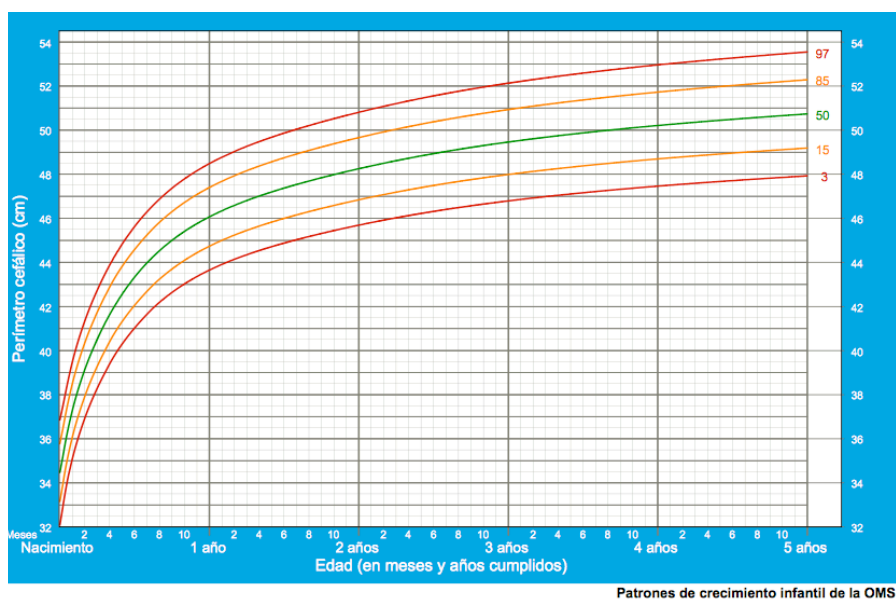


IMAGEN 2. Perímetro cefálico para la edad en niños



Las manifestaciones oculares más frecuentemente encontradas en los pacientes de esta muestra fueron visión borrosa, que se observó en 3 de 11 pacientes (27.2%).

Otras alteraciones oftalmológicas fueron glaucoma congénito, catarata y nictalopía, en tres pacientes independientes. En el resto de los pacientes estudiados, no se encontraron otras alteraciones a este nivel. Por tanto, el 54.5% de los pacientes presentó algún tipo de manifestación ocular. Ahn et al., reportaron en 2004 una prevalencia de alteraciones oculares en pacientes con síndrome de Gorlin Goltz de 21.2%, siendo la alteración más frecuente visión borrosa y ceguera en un 15.2%, seguido de catarata y estrabismo³⁸.

En ningún paciente se encontró antecedente o diagnóstico de meduloblastoma, fibromas cardiacos o quistes linfomesentéricos. Estos datos son similares a lo reportado en la literatura ya que es extremadamente raro encontrar meduloblastoma en pacientes con síndrome de Gorlin Goltz después de la infancia^{52,53}.

Entre los nueve pacientes a quienes se realizó el análisis molecular del gen PTCH1, se detectaron mutaciones en cuatro de ellos. Ninguna de las mutaciones que se

encontraron, está reportada en la literatura, lo cual constituye un dato de interés y contribución para el conocimiento del síndrome de Gorlin-Goltz de manera global.

En tres pacientes se encontraron mutaciones que afectan el marco de lectura abierta, condicionando un codón de paro, c.631dupA en el exón 4, c.1044delG en el exón 7 y c.3406G>T en el exón 20; la generación de un codón de paro resulta en el truncamiento de la formación de la proteína PTCH1 (47). En uno de los pacientes estudiados, se identificó una mutación de sentido erróneo (*missense*), c.1488C>A, la cual se ubicó en el exón 10. Dicha alteración condiciona el cambio del aminoácido asparagina por el aminoácido lisina, en la posición proteica 496 (p.N496K). En el análisis de la implicación patogénica de este cambio de aminoácido, se utilizaron herramientas de análisis *in silico* (SIFT, PolyPhen), con lo que se predice una alta probabilidad de su patogenicidad y por tanto, de su contribución etiológica al SGG en el paciente portador (Figura 1). Dicha mutación tampoco se encuentra reportada previamente en la literatura.

FIGURA 1. Análisis *in silico* de la mutación de sentido erróneo c.1488C>A que corresponde a la posición proteica 496 (p.N496K) encontrada en el paciente G03

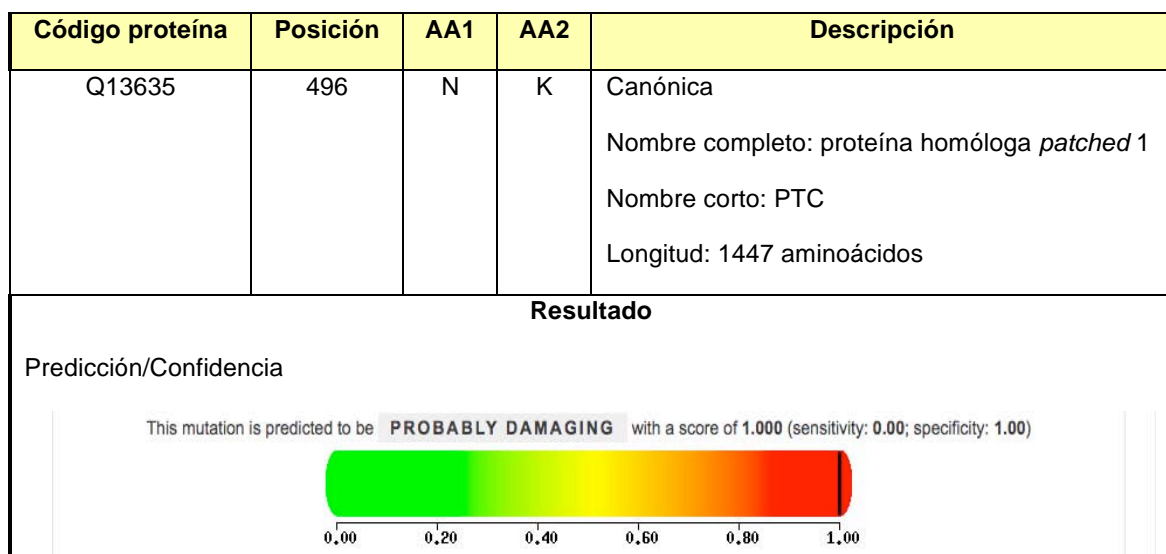


Figura 1. Predicción *in silico* de la mutación c.1488C>A, p.N496K. Se muestra un score de 1.00 en una escala de 0.00-1.00) que predice que dicha mutación es probablemente patogénica con una especificidad del 100%)

Fuente:<http://genetics.bwh.harvard.edu/ggi/pph2/5da24c596651e1acf071ced8ef80c01ae65d5d8e/3706958.html>

Para el polimorfismo c.3944C>T (p.Pro1315Leu) en el exón 24, identificado en el paciente G07, la variante fue analizada tanto *in silico*, como en fuentes bibliográficas y bases de datos internacionales. Se trata de un polimorfismo previamente reportado y considerado como una variante benigna. Inclusive se ha reportado un probable efecto protector para el desarrollo de tumores malignos de ovario⁵⁴.

El diagnóstico clínico y molecular oportuno de los pacientes con síndrome de Gorlin Goltz, permite brindar una atención personalizada así como evitar posibles complicaciones que repercutan en su calidad de vida. De la misma manera, el diagnóstico molecular, permite hacer extensivo el diagnóstico pre-sintomático o predictivo, al resto de la familia que se encuentre en riesgo potencial de estar afectado (familiares en primer grado, de manera inicial), haciendo posible el seguimiento estrecho y la instauración de medidas preventivas.

El presente estudio es el primero en reportar, tanto a nivel nacional como en Latinoamérica, a un grupo de pacientes en quienes se cuenta con la caracterización clínica y molecular del síndrome de Gorlin Goltz. De esta forma fue posible documentar la presencia de cuatro mutaciones patogénicas en el gen *PTCH1* en nueve pacientes en quienes se realizó el análisis molecular mediante secuenciación de siguiente generación, por tanto reportándose una frecuencia mutacional del 44%. Ninguna de las mutaciones identificadas había sido reportada previamente.

Se encuentra a la perspectiva el análisis detallado de los genes *PTCH2* y *SUFU* como probables responsables etiológicos en el resto de pacientes en quienes no se identificó una mutación (5 pacientes). Así mismo, sería pertinente en estudios a futuro, realizar pruebas que permitan identificar nuevos genes involucrados en la etiología del SGG, a nivel del exoma, en aquellos pacientes en quienes continúen sin identificación de mutaciones patogénicas en los tres genes relacionados al SGG hasta el momento.

Es así, que éste trabajo se constituye como un punto de referencia para el estudio del SGG a nivel internacional, al brindar información no descrita de un grupo de pacientes mexicanos.

De forma sustancial, el abordaje de los pacientes participantes busca contribuir al mejor entendimiento etiológico de su padecimiento, a la mejora de su atención, y al establecimiento de medidas preventivas en los familiares de los pacientes que se encuentran en riesgo.

La limitante principal de éste estudio es el tamaño de muestra, al ser una enfermedad poco frecuente, es difícil reunir un número importante de pacientes. Sería así conveniente continuar con éste estudio a largo plazo, incluyendo como colaboradores a más instituciones y centros del país, para complementar los datos registrados en éste estudio, lo cual daría mayor impacto estadístico.

14. CONCLUSION

En el presente estudio se mostró un panorama general a cerca del síndrome de Gorlin Goltz y de las mutaciones genéticas que presentaron los pacientes.

En 4/9 pacientes se encontraron mutaciones en el gen PTCH1 que no están reportadas en la literatura. En dos pacientes se encontraron mutaciones que provocaron el corrimiento del marco de lectura (*frameshift*), lo que conlleva a la generación de un codón de paro, en un paciente se encontró una mutación que por sí sola produce la generación de un codón de paro; estas tres mutaciones producen alteraciones o truncamiento de la formación de la proteína PTCH1; en un paciente se encontró una mutación del tipo *missense* que condiciona un cambio de un aminoácido a otro.

Debido a que no existen reportes previos realizados en alguna población similar, el presente estudio constituye la primera referencia en el ámbito dermatológico, molecular y genético tanto en población mexicana como latinoamericana.

15. ANEXOS

Anexo 1.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:
“IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON
SINDROME DE GORLIN-GOLTZ EN DOS CENTROS DE REFERENCIA EN
MEXICO”.

Versión 1.0 Fecha: 11 de mayo de 2015 en Español

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.
POBLACIÓN OBJETIVO: OBTENCIÓN DE DNA.

México, D. F., a ____ de _____ de 201_.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que yo, _____ participe en el proyecto “IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SINDROME DE GORLIN-GOLTZ EN DOS CENTROS DE REFERENCIA EN MEXICO”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología, México y en el Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 6 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá mi material genético (ADN) el cual determina mis características físicas y biológicas. De éste, se analizarán el gen *PTCH1*, que están implicados en el síndrome de Gorlin-Goltz. Se me ha explicado, que el presente estudio busca identificar mutaciones en el gen citado con el fin brindarme la información necesaria para conocer la mutación presente en mi material genético y las implicaciones que esto tiene en el curso de la enfermedad. De igual forma, se me explico que el no identificar mutaciones en el gen *PTCH1* por las metodologías empleadas, no excluye que existan mutaciones en otros genes no estudiados en el presente proyecto que expliquen el síndrome de Gorlin-Goltz.

Entiendo que mis datos personales en el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda mi información clínica e impresa, recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que mi muestra de ADN quedará codificada bajo una clave que no incluya mi nombre y datos clínicos en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo de la Unidad de Genómica y Secuenciación Masiva, del Instituto Nacional de Cancerología (Secretaría de Salud, México) por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Gorlin-Goltz, siempre que se preserve la confidencialidad de la información derivada. Se me ha asegurado que toda información derivada del análisis de la muestra de ADN para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al desarrollo del trabajo de investigación. Además, en el entendido que mi participación es total y

absolutamente voluntaria, pudiendo abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en mi atención en cualquier servicio de las Instituciones.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione, decido participar en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que mi participación no conlleva ningún tipo de compensación económica. Finalmente hago constar que si deseo no participar, ello no repercutirá en la atención médica que se me brinda dentro de las Instituciones y que se me ha informado que ninguno de los estudios derivados del presente proyecto de investigación, tendrán un costo para mí.

Atentamente,

Nombre del Paciente

Firma

Fecha

Dirección: _____

Teléfono: _____

Nombre Testigo 1

Firma

Fecha

Nombre Testigo 2

Firma

Fecha

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre

Fecha

Investigadores responsables:

Dra. Rosa María Álvarez Gómez

Teléfono: 56 28 04 00 / extensión 134

Dra. Natalia Espinosa Villaseñor

Teléfono: 5567875519

Anexo 2.

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES Y PERSONAS
CON DISCAPACIDAD**

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:
“IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON
SINDROME DE GORLIN-GOLTZ EN DOS CENTROS DE REFERENCIA EN
MEXICO”.

Versión 1.0 Fecha: 11 de mayo de 2015 en Español

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.
POBLACIÓN OBJETIVO: OBTENCIÓN DE DNA.

México, D. F., a ____ de _____ de 201_.

Por medio de la presente hago constar que estoy de acuerdo en que mi hijo(a) o familiar, _____ participe en el proyecto “IDENTIFICACION DE MUTACIONES EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SINDROME DE GORLIN-GOLTZ EN DOS CENTROS DE REFERENCIA EN MEXICO”, que se lleva a cabo en el Instituto Nacional de Cancerología, México y en el Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. Se me ha explicado que para la realización del estudio, se requiere una muestra de sangre periférica de 6 ml. tomada por personal calificado y bajo todas las medidas de seguridad, como son el uso de equipo estéril y desechable, así como el uso de guantes.

De igual forma, me han informado que de esta muestra se obtendrá del material genético (ADN) de mi hijo(a) o familiar, el cual determina sus características físicas y biológicas. De éste, se analizará el gen *PTCH1*, que está implicado en el síndrome de Gorlin-Goltz. Se me ha explicado, que el presente estudio busca identificar mutaciones en el gen citado con el fin brindar la información necesaria para conocer la mutación presente en su material genético y las implicaciones que esto tiene en el curso de la enfermedad. De igual forma, se me explico que el no identificar mutaciones en el gen *PTCH1* por las metodologías empleadas, no excluye que existan mutaciones en otros genes no estudiados en el presente proyecto que expliquen el síndrome de Gorlin-Goltz.

Entiendo que mis datos personales y los de mi hijo(a) o familiar obtenidos para el estudio serán mantenidos en estricta confidencialidad y no serán compartidos con terceros como empleadores, aseguradoras, escuelas, otros familiares, etc., si no es con mi autorización expresa y por escrito. Sin embargo, autorizo que la información necesaria para el análisis de los resultados, pueda ser evaluada y revisada por los médicos e investigadores del presente proyecto. De igual forma, se me ha asegurado que toda la información clínica e impresa, recabada para el presente proyecto, quedará resguardada bajo llave y los datos clínicos y genéticos en archivos electrónicos quedarán encriptados. Sólo los investigadores responsables del proyecto tendrán la llave y la clave de acceso a esta información para preservar la confidencialidad.

Se me ha informado que la muestra de ADN quedará codificada bajo una clave que no incluya el nombre y datos clínicos de mi hijo(a) o familiar en el contenedor de dicha muestra, y ésta quedará bajo el resguardo de la Unidad de Genómica y Secuenciación Masiva, del Instituto Nacional de Cancerología (Secretaría de Salud, México) por un periodo indefinido y acepto que esta muestra sea empleada para futuros estudios de investigación encaminados al estudio del síndrome de Gorlin-Goltz, siempre que se preserve la confidencialidad de la información derivada. Se me ha asegurado que toda información derivada del análisis de la muestra de ADN para este estudio es absolutamente confidencial y con fines exclusivamente destinados al

desarrollo del trabajo de investigación. Además, en el entendido que la participación es total y absolutamente voluntaria, pudiendo abandonar el estudio y retirar el consentimiento informado en cualquier momento sin que esto tenga ningún tipo de repercusión en la atención en cualquier servicio de las Instituciones.

DECLARACION DE CONSENTIMIENTO

Declaro que en forma libre y sin que nadie me presione decido que mi hijo(a) o familiar participe en este estudio, una vez que he leído cuidadosamente esta forma y se me ha explicado en forma clara en que consiste este estudio. Así mismo entiendo que nuestra participación no conlleva ningún tipo de compensación económica y además es completamente voluntaria, por lo que si no deseamos participar, ello no repercutirá en la atención médica brindada a mi hijo(a) o familiar dentro de las Instituciones. Atentamente,

Nombre del Paciente

Nombre del Tutor y parentesco

Firma

Fecha

Dirección: _____

Teléfono: _____

Nombre Testigo 1

Firma

Fecha

Nombre Testigo 2

Firma

Fecha

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre

Fecha

Investigadores responsables:

Dra. Rosa María Álvarez Gómez

Teléfono: 56 28 04 00 / extensión 134

Dra. Natalia Espinosa Villaseñor

Teléfono: 5567875519

Anexo 3.

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO PARA MENORES

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN:
“IDENTIFICACIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN PTCH1 EN PACIENTES
MEXICANOS CON SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ”
Versión 1.0 Fecha: 11 de mayo de 2015 en Español

CARTA DE ASENTIMIENTO INFORMADO.
POBLACIÓN OBJETIVO: OBTENCIÓN DE DNA.

México, D. F., a ____ de _____ de 201_.

Por _____ medio _____ de _____ ésta _____ carta,
yo: _____ acepto
participar en el proyecto que lleva por nombre ““IDENTIFICACION DE MUTACIONES
EN UNA MUESTRA DE PACIENTES CON SINDROME DE GORLIN-GOLTZ EN DOS
CENTROS DE REFERENCIA EN MEXICO”. Me han explicado que en éste proyecto
se va a estudiar mi enfermedad para detectar errores en mis genes; para esto, sé que
se necesita tomar una muestra de sangre la cual se realizará por medio de una aguja
con mucho cuidado. Estoy de acuerdo en que se me tome ésta muestra de sangre y
que sea usada para el estudio.

Nombre del Paciente

Nombre del Tutor y parentesco

Firma

Fecha

Dirección: _____

Teléfono: _____

Nombre Testigo 1

Firma

Fecha

Dirección: _____

Teléfono: _____

Relación de parentesco con el paciente: _____

Nombre Testigo 2

Firma

Fecha

Dirección: _____

Teléfono: _____

Relación de parentesco con el paciente: _____

Obtuvo el consentimiento: _____

Nombre

Fecha

Investigadores responsables:

Dra. Rosa María Álvarez Gómez

Teléfono: 56 28 04 00 / extensión 134

Dra. Natalia Espinosa Villaseñor

Teléfono: 5567875519

Anexo 4.

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

“Identificación de mutaciones en el gen PTCH1 en pacientes mexicanos con síndrome de Gorlin-Goltz”

No. _____

DATOS PERSONALES

Nombre: _____

Edad: _____ **Sexo:** Femenino Masculino

Fecha de nacimiento: _____

Escolaridad (completada): Primaria Secundaria Preparatoria/Bachillerato
 Licenciatura Posgrado

Ocupación: Estudiante Empleado(a) Hogar Desempleado(a)

Estado civil: Casado(a) Soltero(a) Unión libre
 Viudo(a) Divorciado(a)

Correo electrónico: _____

Teléfono: _____

Contacto:

Nombre: _____

Parentesco: _____ **Teléfono:** _____

EXPLORACION Y DATOS CLINICOS

1. Carcinomas basocelulares (CBC)

- Presencia de CBC: Si No
- Número de CBC que ha presentado el paciente: _____
- Edad de diagnóstico: _____
- Topografía, morfología, variedad clínica e histológica (**Llenar punto 17**)

2. Queratoquistes odontogénicos (QO)

- Presencia de queratoquistes odontogénicos: Si No
- Número de QO que presenta el paciente: _____

- Edad de diagnóstico: _____

3. Pits palmo-plantares (PPP)

- Presencia de PPP: Si No

4. Calcificación de la hoz del cerebro (CHC)

- Presencia de CHC: Si No

5. Meduloblastoma (MB)

- Antecedente o presencia de MB: Si No
- Edad de diagnóstico: _____

6. Familiares afectados

- El paciente tiene familiares de primer grado afectados con síndrome de Gorlin-Goltz: Si No
- Número de familiares afectados: _____
- Grado de parentesco de los familiares afectados: _____

7. Malformaciones esqueléticas (ME)

- Presencia de malformaciones esqueléticas: Si No
- Tipo de ME que presenta el paciente: _____

8. Macrocefalia (MC)

- Presencia de macrocefalia: Si No
- Perímetro cefálico del paciente: _____

9. Labio y/o paladar hendido (LPH)

- Antecedente o presencia de LPH: Si No

10. Fibroma ovárico

- Presencia o antecedente de FO: Si No
- Método de diagnóstico: _____

11. Fibroma cardiaco

- Presencia o antecedente de FC: Si No
- Edad de diagnóstico: _____

12. Quistes linfomesentéricos

- Presencia o antecedente de quistes linfomesentéricos: Si No
- Edad de diagnóstico: _____

13. Alteraciones oculares

- Presencia de alteraciones oculares: Si No
- Tipo de AO: _____

14. Genotipo

Del caso índice:

Gen *PTCH1*, mutación: _____

Nomenclatura c.DNA: : _____

Nomenclatura a nivel proteico: : _____

Relevancia Clínica: _____

- Reportada previamente Si No

Polimorfismo: _____

Asignación de rs: _____

15. Genotipo de Familiares (estudio molecular de extensión)

Nombre del familiar: _____

Gen *PTCH1*, mutación identificada en la familia: _____

- Portador de la mutación familiar Si No

16. Familiograma

17. Características de los carcinomas basocelulares.

	TOPOGRAFIA	MORFOLOGIA	VARIEDAD CLINICA	VARIEDAD HISTOLOGICA
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Anexo 5.

Tabla de oligonucleótidos para amplificar el gen PTCH1

Exón	Tamaño del producto	Secuencia del oligo
1	672	F GAGCACAAGGTGGAGAAGCC R CGCGCTGGCTGCACTC
Alternativo 1	463	F TGCCGGGTTTCATTGTGTTTAC R TGATGGACAGAGCAGGACTG
2	281	F CACTCCTCCCTTCTGCTTCG R CTCTATCAACCGCGAGGAGG
3	286	F GAGTTTGCAGTGATTTTGCTATTC R CCGCCTTACCTGCTGCTC
4+5	446	F GTGAGAAATTTTTGTCTCTGCTTTT R CCTCTCCCCGACTATTCAC
6	284	F GGCTCTTTTCATGGTCTCGTC R TGTTTTGCTCTCCACCCTTC
7	226	F GCACTGGATTTTAACAAGGCATG R CAGGGCATAGATTGTCCTCG
8	232	F TGGGAATACTGATGATGTGCC R CATAACCAGCGAGTCTGCAC
9	213	F CATTTGGGCATTTTCGCATTC R CAACCAAACCAAACCTCCAGC
10	208	F TGCCCCCATTGTTCTGCTTG R GGACAGCAGATAAATGGCTCC
11	188	F GCATCTCGCATGTCTAATGCCAC R AAGCTGTGATGTCCCCAAAG
12	211	F GACCATGTCCAGTGCAGCTC R CGTTCAGGATCACCCACAGCC

13	222	F AGTCCTCTGATTGGGCGGAG R CCATTCTGCACCCAATCAAAAG
14	541	F AAAAATGGCAGAATGAAAGCACC R CTGATGAACTCCAAAGGTTCTG
15	405	F GGAAGAGTCAGTGGTGCTCC R CGCAAAGACCGAAAGGAC
16	318	F AGGGTCCTTCTGGCTGCGAG R AGCTCCCAGTGCCTT
17	303	F GCTCTCAAGGCAGAAGTGTG R GGAAGGCACCTCTGTAAGTTC
18	344	F GCTCCTAACCTGTGCCCTTC R TTGACTTCCACAAAGCCCCTT
19	227	F CGCCCACTGACCACTGTGTG R GAGCCAGAGGAAATGGGTTG
20	217	F AGCATTTACCAGGTGAAGTCC R TTGCACACGCCTGCTTAC
21	309 187	F1 TGTTCCCGTTTCCTCTTG F2 TGAATGTGAACTGCGGTTGGA R GCACAGGAAACACAGCATTTC
22	352	F GCAGGTAAATGGACAAGAACAC R ACTACCACGGTGGGAAGACC
23	731	F CCCTTCTAACCACCCCTCAC R GACACATCAGCCTTGCTC
24	259	F AAAGCTTGAAGGTTAGCCAAC R AGCTAAACTGGCACGTTA

*Secuencia [GeneBank: NG_007664]

16. BIBLIOGRAFIA

1. Ljubenović M, Ljubenović D, Binić I, Jovanović D, Stanojević M. Gorlin-Goltz syndrome. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat.* 2007 Dec; 16(4): 166-9.
2. Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome: unanswered issues. *J Lab Clin Med.* 1999 Dec; 134(6): 551-2.
3. Larsen AK, Mikkelsen DB, Hertz JM, Bygum A. Manifestations of Gorlin-Goltz syndrome. *Dan Med J.* 2014 May; 61(5): A4829.
4. Ortega García de Amezaga A, García Arregui O, Zepeda Nuño S, Acha Sagredo A, Aguirre Urizar JM. Gorlin-Goltz syndrome: clinicopathologic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Jun 1; 13(6): E338-43.
5. García de Marcos JA, Dean-Ferrer A, Arroyo Rodríguez S, Calderón-Polanco J, Alamillos Granados FJ, Poblet E. Basal cell nevus syndrome: clinical and genetic diagnosis. *Oral Maxillofac Surg.* 2009 Dec; 13(4): 225-30.
6. Athar M, Li C, Kim AL, Spiegelman VS, Bickers DR. Sonic hedgehog signaling in Basal cell nevus syndrome. *Cancer Res.* 2014 Sep 15; 74(18): 4967-75.
7. Ingham PW. Hedgehog signalling. *Curr Biol.* 2008 Mar 25;18(6): R238-41.
8. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A et al. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):841-51.
9. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science.* 1996 Jun 14;272(5268):1668-71.
10. Wicking C, Bale AE. Molecular basis of the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 1997 Dec;9(6):630-5.
11. Valdivielso-Ramos M, Solera J, Mauleon C, Hernanz JM, Amiñoso C, Galiano S et al. Novel mutation in the PTCH1 gene in a patient with Gorlin syndrome with prominent clinical features. *Clin Exp Dermatol.* 2014 Apr; 39(3): 406-7.
12. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980 Oct 30;287(5785):795-801.
13. Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet.* 2011 Jun;12(6):393-406.
14. Ng JM, Curran T. The Hedgehog's tale: developing strategies for targeting cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011 May 26;11(7):493-501.
15. Kinzler KW, Vogelstein B. The GLI gene encodes a nuclear protein which binds specific sequences in the human genome. *Mol Cell Biol.* 1990 Feb;10(2):634-42.

16. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development*. 1997 Apr;124(7):1313-22.
17. McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:1-114.
18. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat Genet*. 1996 Jan;12(1):85-7.
19. Ling G, Ahmadian A, Persson A, Undén AB, Afink G, Williams C et al. PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene*. 2001 Nov 22;20(53):7770-8.
20. Pan S, Wu X, Jiang J, Gao W, Wan Y, Cheng D et al. Discovery of NVP-LDE225, a Potent and Selective Smoothed Antagonist. *ACS Med Chem Lett*. 2010 Mar 16;1(3):130-4.
21. Gailani MR, Bale SJ, Leffell DJ, DiGiovanna JJ, Peck GL, Poliak S et al. Developmental defects in Gorlin syndrome related to a putative tumor suppressor gene on chromosome 9. *Cell*. 1992 Apr 3;69(1):111-7.
22. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, Köhler B, Schönicke A, Scharwächter C et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005 Jan;152(1):43-51.
23. Teh MT, Blaydon D, Chaplin T, Foot NJ, Skoulakis S, Raghavan M et al. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinomas unveils uniparental disomy as a key somatic event. *Cancer Res*. 2005 Oct 1;65(19):8597-603.
24. Danaee H, Karagas MR, Kelsey KT, Perry AE, Nelson HH. Allelic loss at *Drosophila* patched gene is highly prevalent in Basal and squamous cell carcinomas of the skin. *J Invest Dermatol*. 2006 May;126(5):1152-8.
25. Boutet N, Bignon YJ, Drouin-Garraud V, Sarda P, Longy M, Lacombe D et al. Spectrum of PTCH1 mutations in French patients with Gorlin syndrome. *J Invest Dermatol*. 2003 Sep;121(3):478-81.
26. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis*. 2008 Nov 25;3:32.
27. Pastorino L, Ghiorzo P, Nasti S, Battistuzzi L, Cusano R, Marzocchi C et al. Identification of a SUFU germline mutation in a family with Gorlin syndrome. *Am J Med Genet A*. 2009 Jul; 149A(7): 1539-43.

28. Lo Muzio L, Pastorino L, Levanat S, Musani V, Situm M, Ponti G et al. Clinical utility gene card for: Gorlin syndrome--update 2013. *Eur J Hum Genet.* 2013 Oct;21(10).
29. Klein RD, Dykas DJ, Bale AE. Clinical testing for the nevoid basal cell carcinoma syndrome in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med.* 2005 Nov-Dec;7(9):611-9.
30. Smyth I, Narang MA, Evans T, Heimann C, Nakamura Y, Chenevix-Trench G et al. Isolation and characterization of human patched 2 (PTCH2), a putative tumour suppressor gene in basal cell carcinoma and medulloblastoma on chromosome 1p32. *Hum Mol Genet.* 1999 Feb;8(2):291-7.
31. Fan Z, Li J, Du J, Zhang H, Shen Y, Wang CY et al. A missense mutation in PTCH2 underlies dominantly inherited NBCCS in a Chinese family. *J Med Genet.* 2008 May;45(5):303-8.
32. Grimm T, Teglund S, Tackels D, Sangiorgi E, Gurrieri F, Schwartz C et al. Genomic organization and embryonic expression of Suppressor of Fused, a candidate gene for the split-hand/split-foot malformation type 3. *FEBS Lett.* 2001 Sep 7;505(1):13-7.
33. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999 Dec;112 (Pt 23):4437-48.
34. Svärd J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergström A et al. Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. *Dev Cell.* 2006 Feb;10(2):187-97.
35. Tang JY, Mackay-Wiggan JM, Aszterbaum M, Yauch RL, Lindgren J, Chang K et al. Inhibiting the hedgehog pathway in patients with the basal-cell nevus syndrome. *N Engl J Med.* 2012 Jun 7; 366(23): 2180-8.
36. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD et al. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2012 Jun 7; 366(23): 2171-9.
37. Mehta D, Raval N, Patadiya H, Tarsariya V. Gorlin-goltz syndrome. *Ann Med Health Sci Res.* 2014 Mar; 4(2): 279-82.
38. Ahn SG, Lim YS, Kim DK, Kim SG, Lee SH, Yoon JH. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a retrospective analysis of 33 affected Korean individuals. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Jul; 33(5): 458-62.

39. Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004 Mar; 33(2): 117-24.
40. Bree AF, Shah MR; BCNS Colloquium Group. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A.* 2011 Sep;155A(9):2091-7.
41. Alter M, Hillen U, Leiter U, Sachse M, Gutzmer R. Current diagnosis and treatment of basal cell carcinoma. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2015 Sep;13(9):863-74
42. Papakostas D, Stockfleth E. Topical treatment of basal cell carcinoma with the immune response modifier imiquimod. *Future Oncol.* 2015 Nov;11(22):2985-90
43. Cui Y, Han J. A proposed definition of rare diseases for China: from the perspective of return on investment in new orphan drugs. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 Mar 7;10:28.
44. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
45. Mahon SM. Management of Patients with a Genetic Variant of Unknown Significance. *Oncol Nurs Forum.* 2015 May;42(3):316-8.
46. Shanley S, McCormack C. Diagnosis and Management of Hereditary Basal Cell Skin Cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2016;205:191-212
47. Ortega García de Amezaga A, García Arregui O, Zepeda Nuño S, Acha Sagredo A, Aguirre Urizar JM. Gorlin-Goltz syndrome: clinicopathologic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008 Jun 1;13(6):E338-43.
48. Pătrașcu V, Stoica LE, Georgescu CV, Pătru E. Histopathological and clinical-progressive profile of skin carcinomas: study on 1688 cases. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(1):171-80.
49. Raasch BA, Buettner PG, Garbe C. Basal cell carcinoma: histological classification and body-site distribution. *Br J Dermatol.* 2006 Aug;155(2):401-7.
50. Tanioka M, Takahashi K, Kawabata T, Kosugi S, Murakami K, Miyachi Y et al. Germline mutations of the PTCH gene in Japanese patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Arch Dermatol Res.* 2005 Jan;296(7):303-8.
51. Pastorino L, Cusano R, Nasti S, Faravelli F, Forzano F, Baldo C et al. Molecular characterization of Italian nevoid basal cell carcinoma syndrome patients. *Hum Mutat.* 2005 Mar;25(3):322-3.

52. Lata J, Verma N, Kaur A. Gorlin-Goltz syndrome: A case series of 5 patients in North Indian population with comparative analysis of literature. *Contemp Clin Dent*. 2015 Sep;6(Suppl 1):S192-201.
53. Thalakoti S, Geller T. Basal cell nevus syndrome or Gorlin syndrome. *Handb Clin Neurol*. 2015;132:119-28.
54. Musani V, Sabol M, Car D, Ozretić P, Kalafatić D, Maurac I et al. PTCH1 gene polymorphisms in ovarian tumors: potential protective role of c.3944T allele. *Gene*. 2013 Mar 15;517(1):55-9.