



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS

**ESTUDIO DEL GEN *SONIC HEDGEHOG* EN
PACIENTES CON HOLOPROSENFALIA
Y ASOCIACIÓN VATER-VACTER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A :

DRA. MÓNICA AGUINAGA RÍOS

**ASESORA: DRA. SUSANA KOFMAN
EPSTEIN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

I. Título	3
II. Introducción	4
II.A Holoprosencefalia	5
II.A.1 Causas Genéticas	9
II.A.2 Causas Ambientales	12
II.B Asociación VATER- VACTER	13
II.C Gen Sonic Hedgehog	16
II.D SHH y Holoprosencefalia	31
II.D.1 Diagnóstico Prenatal	33
II.E SHH y Asociación VATER-VACTER	35
III. Planteamiento del Problema	38
IV. Objetivos	40
V. Criterios de Inclusión y Exclusión	40
VI. Variables en Estudio	41
VII. Tipo de Investigación	41
VIII. Material y Métodos	42

IX.	Resultados	47
IX.A	Estudio Molecular <i>SHH</i>	53
X.	Discusión	58
XI.	Conclusiones	74
XII.	Referencias	75

I. TITULO

**ESTUDIO DEL GEN *SONIC HEDGEHOG* EN PACIENTES
CON HOLOPROSENCEFALIA Y ASOCIACIÓN VATER-VACTER**

II. INTRODUCCIÓN

Los defectos congénitos son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en fetos y recién nacidos. La mayoría de éstos se reportan relacionados a herencia multifactorial, desconociéndose los principales factores que los desencadenan. El estudio de alteraciones en los procesos embrionarios tempranos ayuda a identificar y conocer cuáles son los principales genes involucrados y su mecanismo de expresión.

El gen *SHH* es uno de los más estudiados en la actualidad y se conoce que en modelos animales sus mutaciones se relacionan con múltiples alteraciones ó entidades clínicas descritas en la literatura médica.

La holoprosencefalia (HPE) es la anomalía cerebral más común durante la embriogénesis, su etiología es heterogénea incluyendo factores genéticos y/ó ambientales, nueve genes han sido implicados. En la literatura se han descrito diferentes mutaciones de *SHH* asociadas a HPE, 17% en casos familiares y 3.8% en esporádicos.

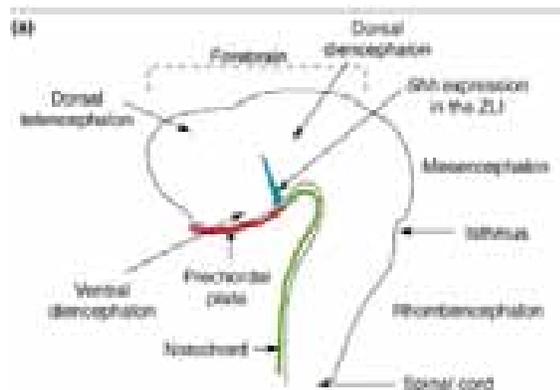
La asociación VATER-VACTER es un conjunto de defectos que se presentan simultáneamente sin una etiología determinada. El gen *Shh* está involucrado en el desarrollo normal de varios órganos que se encuentran afectados en esta asociación. Estudios recientes en animales señalan que alteraciones en la vía de señalización de este gen pudiera ser la causa de la asociación VATER.

II.A. HOLOPROSENCEFALIA

El desarrollo del cerebro anterior (prosencefalo) comienza durante las etapas iniciales de la embriogénesis. La inducción en el ectodermo primitivo es resultado de las señales del mesodermo axial adyacente, el cual da origen a la notocorda y a la placa precordal. Posterior a la inducción, el prosencefalo crece rápidamente y se divide en dos vesículas secundarias llamadas telencefalo y diencefalo. La corteza cerebral, cuerpo estriado, hipotálamo y tálamo del cerebro adulto derivan de estas dos vesículas (Norman, 1995)(Figura 1).

FIGURA 1

División del prosencefalo en telencefalo y diencefalo. Tomado de Bertrand y Dahmane, 2006.



La holoprosencefalia (HPE) es una malformación cerebral caracterizada por una división incompleta del prosencefalo en hemisferios cerebrales, en telencefalo y diencefalo y en los tractos y bulbos ópticos y olfatorios entre los 18 y 28 días de gestación. El término fue introducido en 1963 para enfatizar la alteración del diencefalo y telencefalo como componentes del prosencefalo (De Myer y Zeman W, 1963). La HPE se clasifica en clásica, si la porción ventral del cerebro se

encuentra afectada y en HPE interhemisférica medial o sintelencefalia, si la porción dorsal del cerebro presenta una alteración en su formación (McInnes *et al.*, 2008).

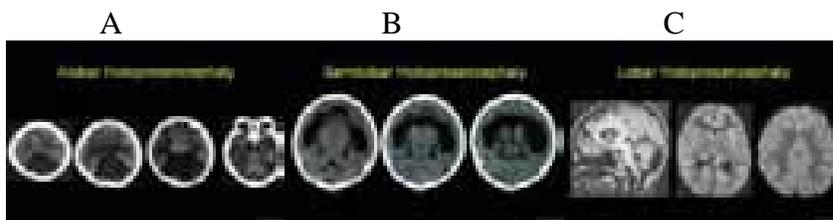
La HPE clásica se clasifica a su vez en tres categorías que reflejan el grado de severidad: 1) la HPE alobar es la forma más común, presenta un solo ventrículo y hemisferios cerebrales sin separación, 2) en la HPE semilobar se observa una fisura interhemisférica en la porción posterior del cerebro con fusión de los lóbulos frontales y parietales y 3) la HPE lobar se caracteriza por la separación de gran parte de los hemisferios cerebrales y ventrículos laterales con fusión de la porción ventral de los lóbulos frontales (Golden, 1998)(Figura 2).

FIGURA 2

Imágenes de Tomografía Axial Computarizada y Resonancia Magnética que demuestran la clasificación de Holoprosencefalia como: a) Alobar, b) Semilobar y c) Lobar.

Tomado de: <http://www.mir.wustl.edu/neurorad/internal.asp>

Neuroradiology. Washington University of St.Louis, School of Medicine.



El espectro de HPE incluye diferentes anomalías del sistema nervioso central (SNC) como: agenesia ó disgenesia del cuerpo caloso, hipoplasia cerebelar, agenesia de la glándula hipófisis, migración neuronal anormal, arrinencefalia e hipoplasia de los tractos ópticos (Lazaro, 2004). El fenotipo es muy variable, aún dentro de una misma familia, e incluye desde manifestaciones severas con anomalías cerebrales y faciales hasta individuos clínicamente normales o con diferentes microformas, tales como hipotelorismo leve, incisivo central medio, coloboma de iris, frenillo ausente, hiposmia/anosmia e hipoplasia medio facial (Odent, 1998)(Figura 3).

FIGURA 3

Incisivo central medio como microforma de holoprosencefalia.
Tomado de Garavelli *et al*, 2004.



Las malformaciones cerebrales generalmente se presentan asociadas a anomalías faciales y están determinadas por una migración lateral anormal de los primordios ópticos y diversos grados de detención en el desarrollo del proceso frontonasal. DeMyer (1963) propuso que en 70 a 80% de los casos “la cara predice el cerebro” y describió cinco diferentes tipos faciales de HPE los cuales se muestran en la Tabla 1 y Figura 4. Las características faciales mencionadas se observan en aproximadamente 80% de los pacientes con HPE y reflejan la severidad de la enfermedad.

Tabla 1. Características faciales en pacientes con Holoprosencefalia

Nombre	Características
Ciclopedia	Orbita única con proboscis por arriba de la órbita
Etmocefalia	Hipotelorismo extremo con proboscis entre las órbitas
Cebocefalia	Hipotelorismo con narina única
Labio hendido medial con hipotelorismo y nariz plana	Las descritas
Labio y paladar hendido bilateral con hipotelorismo y nariz plana	Las descritas

FIGURA 4

Ejemplos de tipos faciales en holoprosencefalia

- a) Ciclopedia, la flecha señala la proboscis
- b) Labio hendido medial con hipotelorismo y nariz plana



La prevalencia de la HPE varía de acuerdo a la etapa gestacional en que se estudie, siendo de 1 en 250 durante el período embrionario; de 1 en 8,000 en el segundo trimestre del embarazo y de 1 en 10,000 a 1 en 20,000 en recién nacidos vivos (Matsunaga, 1977; Olsen *et al*, 1997; Bullen PJ *et al*, 2001).

El 64% de los casos con HPE son del tipo alobar, 24% semilobar y 12% lobar. La HPE es dos veces más frecuente en el sexo femenino cuando está asociada a alteraciones cromosómicas y los pacientes presentan retraso en el desarrollo psicomotor, crisis convulsivas, disfunción hipotalámica y de tallo cerebral y alteraciones endócrinas por disgenesia hipofisiaria. La supervivencia de la HPE alobar ha sido reportada en 50% de los casos a los 6 días de vida y 20% sobrevive más de 12 meses (Olsen *et al*, 1997).

La HPE es una enfermedad de etiología heterogénea causada por factores genéticos y ambientales.

II. A.1 Causas genéticas de holoprosencefalia:

- a) Casos familiares con diferentes mecanismos hereditarios como: autosómico dominante (MIM#142945), autosómico recesivo (MIM#236100) y ligado al cromosoma X (MIM#306990). En estas familias se ha observado gran variabilidad clínica intrafamiliar en individuos con HPE alobar, pacientes con microformas e individuos sin alteraciones pero con la misma mutación génica, por lo que no ha sido posible establecer una correlación genotipo- fenotipo. (Nanni *et al*, 1999)(Figura 5).
- b) Presencia de HPE en diferentes síndromes genéticos. Se estima que 18 a 25% de los pacientes con HPE la presentan asociada a un síndrome génico, los más

frecuentes son Smith-Lemli-Opitz, Pallister-Hall, Meckel, Rubinstein-Taybi, Agnata- HPE, Kallmann y Velocardiofacial, entre otros (Croen, 1996).

- c) Alteraciones citogenéticas. Reportadas en 24 a 45% de los pacientes con HPE. La trisomía 13 corresponde a 75% de los cariotipos anormales descritos en HPE (Scriver, 2001).

FIGURA 5

Variabilidad intrafamiliar en holoprosencefalia.

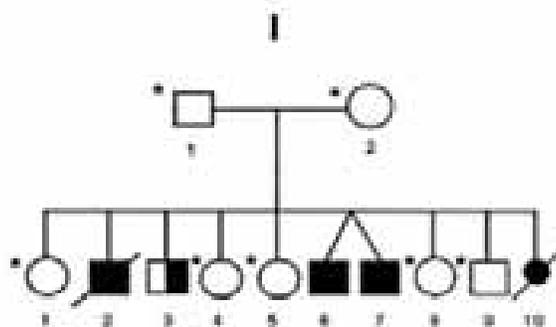
5.A Foto clínica de los pacientes II.3 y II.6 del árbol genealógico descrito en 5.B Modificado de Nanni *et al*, 1999.



II.3

II.6

5A



5B

II.3 Microcefalia, hipotelorismo ocular, nariz plana, hipoplasia medio facial con inteligencia normal.
II.6 Sinoftalmia y proboscis

*Secuencia normal de SHH
■ / HPE

El análisis de anomalías cromosómicas recurrentes ha identificado 12 *loci* en 11 diferentes cromosomas que contienen genes relacionados con HPE. Nueve genes de HPE han sido

identificados y el fenotipo observado, la localización cromosómica y frecuencia se muestran en la Tabla 2 (Belloni, 1996; Gallardo, 1999; Gripp, 2000; Brown, 2001; Nowaczyk, 2001; Witsch, 2001; Roessler, 2002; Oupenskaia, 2002 y De la Cruz, 2002). Otros *loci* propuestos son: HPE1 en 21q22, HPE7 en 13q12, HPE8 en 14q13, HPE9 en 20p13, HPE10 en 1q42, HPE11 en 5p y HPE12 en 6q26 (Roessler, 1998).

TABLA 2 Fenotipo, localización y Frecuencia de Mutaciones en los genes asociados con Holoprosencefalia

Genes	Localización cromosómica	Fenotipo de Holoprosencefalia	Frecuencias
<i>SHH</i>	7q36	Gran variabilidad fenotípica	17% casos familiares 3.7% casos esporádicos
<i>ZIC2</i>	13q32	Defecto cerebral severo, alteración facial leve	3 – 9.2%
<i>SIX3</i>	2p21	Alteraciones oculares severas	1.3- 4%
<i>TGIF</i>	18p11.3	Variable	1.5%
<i>DHRC7</i>	11q12	Facies alterada	2-4% de los casos de Smith-Lemli-Opitz
<i>TDGF1</i>	3p21	Variable	0.5%
<i>GLI2</i>	2q14	Variable	1.8%
<i>FAST1</i>	8q24.3	Variable	20 variantes en 100 casos de HPE
<i>PTC1</i>	9q22.3	Variable	4 casos reportados

El primer gen identificado en relación con la génesis de HPE fue el gen *SHH* (MIM #600725) cuyas características serán definidas adelante (Roessler, 1996). El segundo gen reconocido (MIM #603073) codifica para una proteína nuclear con dedos de zinc denominada *ZIC2* (Aruga *et al*, 1996) que interviene en la formación del ojo y cerebro (Nagai *et al*, 1997). Las mutaciones observadas sugieren que la pérdida de función de *ZIC2* causa HPE con anomalías cerebrales severas y características faciales leves (Brown *et al*, 2001). *SIX3* (MIM #603714) fue el

tercer gen identificado para HPE. La familia de genes *SIX* funciona como factores de transcripción involucrados en la formación del ojo, los pacientes con mutaciones en *SIX3* han mostrado gran variabilidad en el fenotipo de HPE (Wallis, 1999). *TGIF* codifica para una proteína que compete con el receptor del ácido retinoico (Bertolino *et al*, 1996), el fenotipo encontrado en pacientes con HPE y mutaciones de *TGIF* ha sido variable (Gripp *et al*, 2000). Los otros genes descritos participan en dos importantes vías de señalización las cuales intervienen en el desarrollo cerebral: *DHCR7*, *PATCHED1* y *GLI2* en la vía de señalización de *SHH* y *TDGF1/CRIPTO* y *FAST1* en la vía de señalización *NODAL/TGFβ* (Dubourg *et al*, 2004).

II. A.2 Causas ambientales de holoprosencefalia:

Diversos factores ambientales y metabólicos han sido involucrados en la patogénesis de la holoprosencefalia, sin embargo sólo la diabetes materna es la enfermedad considerada como una causa de HPE. Estudios poblacionales reportan diabetes insulino-dependiente materna en 4 a 8% de los casos de HPE, lo que significa un incremento en el riesgo 8 a 16 veces mayor con respecto a la población general (Barr *et al*, 1983). Se ha sugerido que los mecanismos fisiopatológicos de la embriopatía diabética son complejos y que ocasionan de manera temprana una alteración en el saco vitelino, el aumento de sorbitol y de radicales libres de O₂, la glucosilación de proteínas y la disminución de mioinositol y de ácido araquidónico son algunos de los mecanismos causales propuestos. Sin embargo, la relación de esta alteración metabólica con los mecanismos causantes de HPE no ha sido esclarecida (Kousseff, 1999).

El síndrome alcohólico-fetal incluye formas leves de HPE y el fenotipo severo ha sido observado en hijos de madres con antecedente de ingesta de grandes cantidades de alcohol durante el primer trimestre (Ronen y Andrews, 1991). La exposición a etanol en modelos animales ha

causado HPE. Esto podría estar relacionado con la interferencia en la función de la placa precordial (Sulik, 1982). Li *et al* (2007) demostraron que la exposición de embriones de pez cebra a bajas concentraciones de alcohol durante la gastrulación bloquea la modificación covalente de colesterol a SHH y que el suplemento con colesterol rescata la pérdida de transducción de la señal.

Existen varias evidencias que demuestran que una alteración en la biosíntesis de colesterol puede causar HPE. La HPE se observa en 5% de los pacientes con síndrome de Smith-Lemli-Opitz el cual es causado por un defecto enzimático en la biosíntesis de colesterol (Kelley *et al*, 1996). Se ha sugerido que bajos niveles de colesterol materno en embriones de ratón, pueden tener alguna influencia sobre el desarrollo del feto y que la hipocolesterolemia materna en etapas tempranas de la gestación causa HPE en embriones de ratón (Ming, 1998). Haas *et al* (2007) examinaron la biosíntesis de colesterol en líneas celulares de linfoblastos en 228 pacientes con HPE, donde 6% de ellos mostró un patrón anormal de esteroides. El nivel promedio de colesterol fue de 58 mg/dl en los pacientes y de 82 mg/dl en los controles. Los autores concluyen que la biosíntesis alterada de colesterol puede ser un factor contribuyente en la causa de HPE.

Además, la HPE en los humanos se ha observado posterior a la exposición de ácido retinoico (Lammer *et al*, 1985; Rosa *et al*, 1986). Se ha propuesto que el ácido retinoico puede interferir con el desarrollo de las células de la cresta neural, Helms *et al* (1997) demostró que este agente inhibe la expresión de *SHH* y su receptor *PTCH* en el primordio craneofacial en embriones de pollo.

II. B. ASOCIACIÓN VATER- VACTER

La asociación de ciertos defectos congénitos es un concepto que fue introducido para designar la tendencia de algunas malformaciones de presentarse juntas con mayor frecuencia que lo esperado por el azar, sin ser componentes de síndromes conocidos (Aase, 1992). El acrónimo

VATER-VACTER fue originalmente descrito por Quan y Smith (1973) y se refiere a la presencia de anomalías vertebrales (V), atresia anal (A), fístula tráqueo-esofágica (TE) y anomalías radiales y renales (R). Esta entidad no ha sido reconocida como un síndrome y sus componentes son variables. Otros defectos congénitos se han presentado asociados, por lo que el término original de VATER ha sido ampliado a VACTERLH para incluir anomalías cardíacas (C), de extremidades (L) e hidrocefalia (H).

Diferentes estudios han reportado que las anomalías encontradas con mayor frecuencia son: renales (82%), cardiovasculares (80%), en extremidades (68%), anorectales (40%), vertebrales (36%) y fístula tráqueo-esofágica (24%) (Landing, 1975)(Figuras 6 y 7). Botto *et al* (1997) reportaron en un estudio de 2,295 pacientes con múltiples anomalías, 12.5% presentaba tres o más defectos de la asociación y de éstos, 74.8% presentaba algún defecto asociado como atresia intestinal y/o anomalías en genitales. Los mayores rangos de asociación observados incluyen: atresia anal con fístula tráqueo-esofágica (FTE), alteración en extremidades y FTE, atresia anal y alteraciones vertebrales y FTE. Aproximadamente la mitad de pacientes con FTE presentan otras características de la Asociación VATER (Khoury *et al*, 1983).

FIGURA 6

Alteraciones radiales en Asociación VATER.

a) Pulgar hipoplásico de mano derecha. Tomado de www.thefetus.net

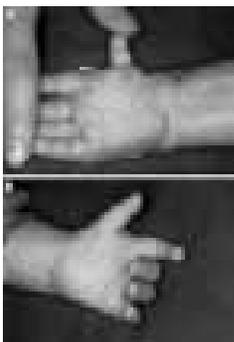


FIGURA 7

Ano imperforado en Asociación VATER.



Actualmente se acepta el diagnóstico de Asociación VATER cuando están presentes al menos tres de los cinco defectos y se considera un diagnóstico de exclusión. El principal diagnóstico diferencial es la trisomía 18 donde el paciente presenta un cromosoma extra del par 18 y múltiples anomalías internas y externas. Otras entidades a descartar son el síndrome de Townes-Brocks causado por una mutación en el gen que codifica para el factor de transcripción *SALL1* y cuyas principales manifestaciones clínicas son: ano imperforado, microtia, pulgar trifalángico y sordera, el síndrome de Feingold caracterizado por atresia duodenal o esofágica, braquimesofalangia del 2º y 5º dedos de manos y mutación en el gen *MYCN*, el síndrome de Baller-Gerold que presenta cráneosinostosis con defectos radiales y es causado por una mutación en *RECQL4* (Jones, 2006), el Síndrome de Fanconi el cual tiene diferentes grupos de complementación y se ha sugerido que 5% de los pacientes con diagnóstico de VATER presentan este síndrome (Esmer *et al.*,2004). Además, el síndrome de CHARGE, Pallister Hall, delección de 22q11 y de 13q pueden presentar características similares a la asociación VATER (Shaw-Smith, 2006). La incidencia de la asociación VATER es de 1 cada 5,000 nacidos vivos, es más frecuente

en varones y no se relaciona con edad materna avanzada (Rittler *et al*, 1996). Se estima que 48% de los pacientes fallece durante el primer año de vida (Khoury *et al*, 1983).

Aproximadamente 1,000 casos han sido reportados en la literatura médica dentro de los cuales existen muy pocos casos familiares por lo que es poco probable que esta asociación presente herencia monogénica. La etiología de esta asociación se desconoce y se piensa que presenta herencia multifactorial (Kim *et al*, 2001). El único modelo animal conocido es en ratas embarazadas inyectadas con adriamicina. Los efectos teratógenos de la adriamicina fueron reconocidos en 1978 por Thompson *et al*, quienes reportaron diferentes defectos estructurales como atresia intestinal y esofágica, FTE, hipoplasia de vejiga urinaria y varias anomalías cardíacas. La adriamicina inhibe la síntesis de ácidos nucleicos al intercalarse con el DNA e interferir con los procesos de replicación y transcripción (Beasley *et al*, 2000).

II.C. GEN SONIC HEDGEHOG

El gen *hedgehog* de *Drosophila* fue originalmente descrito posterior a un estudio de defectos de segmentación embrionaria (Nüsslein-Volhard y Wieschaus, 1980). En su estudio, estos autores observaron la presencia de proyecciones en la larva de *Drosophila*, simulando las espinas de un erizo (*hedgehog* en inglés), asignándose este nombre al gen (Figura 8). Estos autores propusieron que se trataba de un gen de polaridad segmentaria que regulaba el patrón dentro de cada segmento de la larva.

FIGURA 8

Erizo (*Hedgehog*). Tomado de <http://images.search.yahoo.com>



Posteriormente, una caricatura de un videojuego llamada “sonic” inspiró el nombre del gen, ya que presentaba ciclopia y una estructura parecida a una nariz por debajo de los ojos.

En el ratón han sido identificados tres homólogos del gen: *Indian (Ihh)*, *Dessert (Dhh)* y *Sonic hedgehog (Shh)* (Marigo *et al*, 1995). *Dhh* está muy relacionado con el gen *hedgehog* de *Drosophila* mientras que *Ihh* y *Shh* se relacionan más entre ellos, lo que puede indicar un evento de duplicación génica reciente. El gen *Shh* es el único que se expresa en la línea media del sistema nervioso en desarrollo. *Shh* se encuentra involucrado en diversos elementos clave del desarrollo en diferentes momentos durante la embriogénesis. Participa en el establecimiento del eje derecho-izquierdo el cual es esencial para determinar la asimetría de los órganos (Meyers *et al*, 1999) iniciando con la formación del mesodermo axial (Roessler y Muenke, 2001). Además, *Shh* tiene un papel importante en la especificación de la placa basal de la médula espinal, así como en la identidad ventral del cerebro a lo largo de toda la extensión rostro-caudal del sistema nervioso central (Ho y Scott, 2002). Durante la embriogénesis tardía, *Shh* define el eje antero-posterior de la extremidad y participa en el desarrollo de la hipófisis, células de la cresta neural, cerebro medio, cerebelo, oligodendrocitos, ojo y cara (Nasrallah y Golden, 2001).

Diferentes investigaciones demuestran que *Shh* es el principal factor en establecer la identidad ventral del sistema nervioso central. La expresión de *Shh* en el ratón se detecta

inicialmente en el período de la gastrulación, exclusivamente en el mesodermo medio del proceso cefálico. Para el período de 8 somitas, la expresión se inicia en la porción ventral del cerebro medio y se extiende rostralmente al cerebro anterior y caudalmente al cerebro posterior y médula espinal (Echelard *et al*, 1993). *Shh* actúa en la especificación de los tipos celulares ventrales en el tubo neural y la pérdida de la placa precordial causa HPE en modelos animales (Schier, 2001).

Las señales de Hedgehog actúan como morfógenos por medio de la inducción dosis-dependiente en un tejido blanco, como mitógenos regulando la proliferación celular o como factores de inducción controlando la forma del órgano en desarrollo. Por ello las señales de *Shh* regulan la especificación, proliferación y la supervivencia celular de la porción ventral del cerebro. La segmentación dorsal y ventral del prosencéfalo es controlada, en su porción ventral, por el gen *Shh* y en su porción dorsal por las proteínas morfogenéticas del hueso (BMPs). Los receptores de BMPs pertenecen a la familia TGF β que actúan en los receptores cinasa transmembrana de serina y treonina que regulan la actividad de otros factores de transcripción (Massague *et al*, 2005).

Diferentes vías de señalización controlan la expresión del gen *Shh* entre las cuales se encuentran: las proteínas Nodal, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y algunos retinoides. Las proteínas Nodal son factores secretados de la familia TGF β y se unen predominantemente a los receptores activina, aparentemente, esta proteína, regula la expresión de *Shh* (Rohr *et al*, 2001). Los FGF activan receptores de transmembrana tirosín-cinasa, en experimentos realizados en pez-cebra se ha observado que algunos FGF regulan elementos de la vía de *Shh* (Miyake *et al*, 2005). Por último, los retinoides son moléculas activas que actúan en receptores nucleares y regulan la expresión de algunos genes que especifican el carácter intermedio del tejido telencefálico (Marklund *et al*, 2004)(Figura 9). La interrelación de estas vías de señalización en el humano aún no se encuentra bien esclarecida (Ingham y McMahon, 2001).

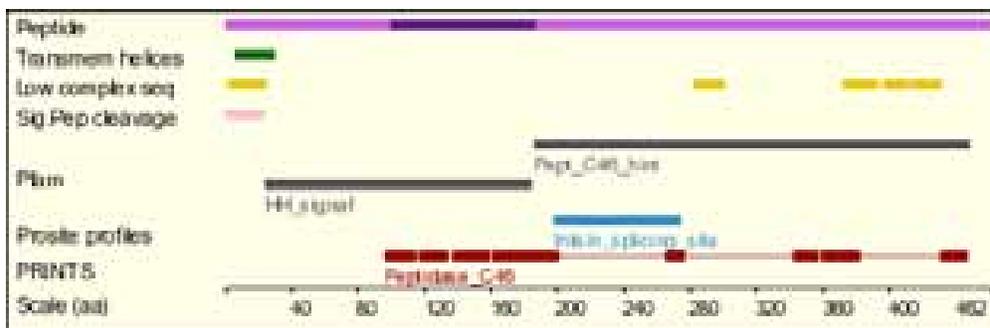
La proteína tiene una longitud de 462 residuos y se han identificado 3 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), un dominio hélice transmembrana, cinco secuencias de baja complejidad y un péptido señal. El péptido está formado por tres regiones: una región de señalización amino-terminal la cual es la responsable de la señalización local y a distancia de la proteína y dos peptidasas C46 (Figura 11)(www.ensembl.org).

FIGURA 11

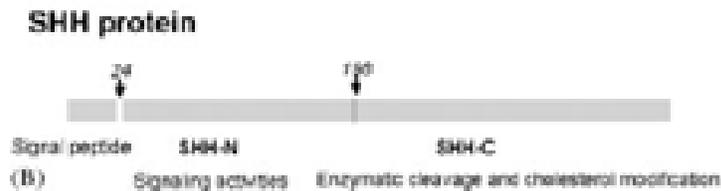
Proteína SHH.

A) Estructura de la proteína SHH formada por 462 aminoácidos, un dominio hélice transmembranal, cinco secuencias de baja complejidad y un péptido señal.

Tomado de www.ensembl.org



b) Figura que demuestra la localización del péptido señal y dominios N y C.



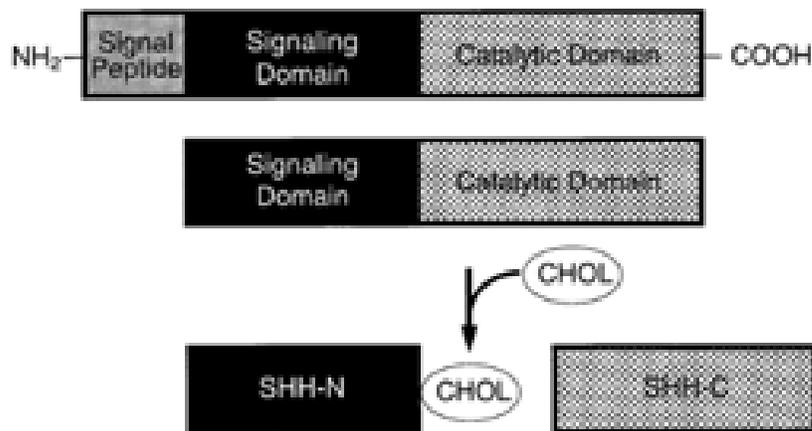
La proteína SHH se secreta como una molécula de señalización intercelular que es sintetizada como un precursor de 45kD y que necesita ser procesada a una forma activa para funcionar. Esta proteína lleva a cabo una división autocatalítica, posterior a la cual se separa en un

dominio N-terminal (SHH-N) de 19 kD y otro dominio C-terminal (SHH-C) de 25 kD. Durante la reacción de autoprosesamiento, el colesterol realiza un ataque nucleofílico y se une covalentemente al extremo C-terminal de SHH-N activando su porción de señalización (Wallis, 1999)(Figura 12).

FIGURA 12

Dominios y división autocatalítica de la molécula SHH.

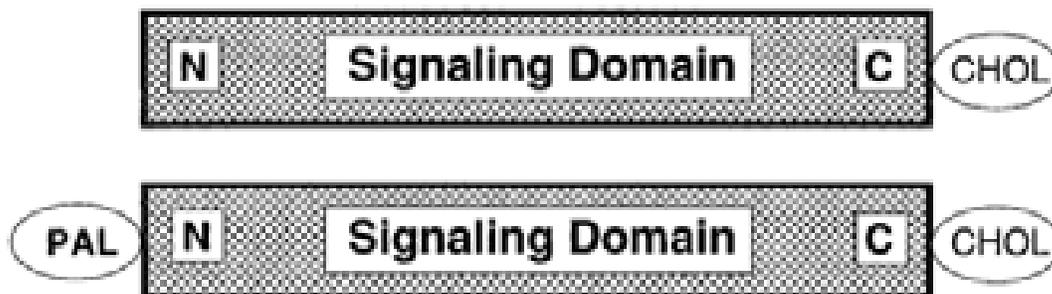
El dominio C-terminal causa un corte autocatalítico de la proteína con transferencia de colesterol al dominio N-terminal. Tomado de Cohen y Shiota, 2002.



Además de esta unión, la molécula es modificada en su cisteína N-terminal por la unión de un palmitato que transforma a la molécula en hidrofóbica. Se ha observado que la unión del colesterol es necesaria para la señalización a larga distancia en la extremidad vertebral además de que esta forma de Hedgehog unida a colesterol es multimérica. Ambas modificaciones aumentan la actividad específica de la proteína (Nybakken y Perrimon, 2002)(Figura 13).

FIGURA 13

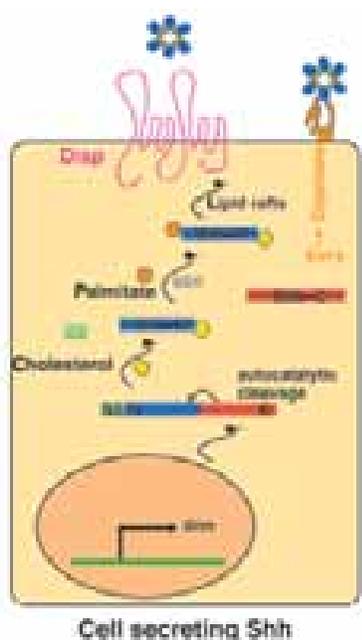
Unión de un grupo palmitoil al extremo N-terminal de la molécula SHH. En la parte superior se observa la unión de colesterol al extremo C-terminal y en la parte inferior la unión de palmitato a la porción N-terminal. Ambas modificaciones permiten la unión a la membrana celular. Tomado de Cohen y Shoita, 2002.



La proteína modificada en sus dos extremos se asocia con vesículas de lípidos y es secretada por una proteína transmembranal llamada Dispatched (Dis) la cual funciona liberando a SHH de la membrana en donde se encuentra anclada (Burke *et al*, 1999)(Figura 14).

FIGURA 14

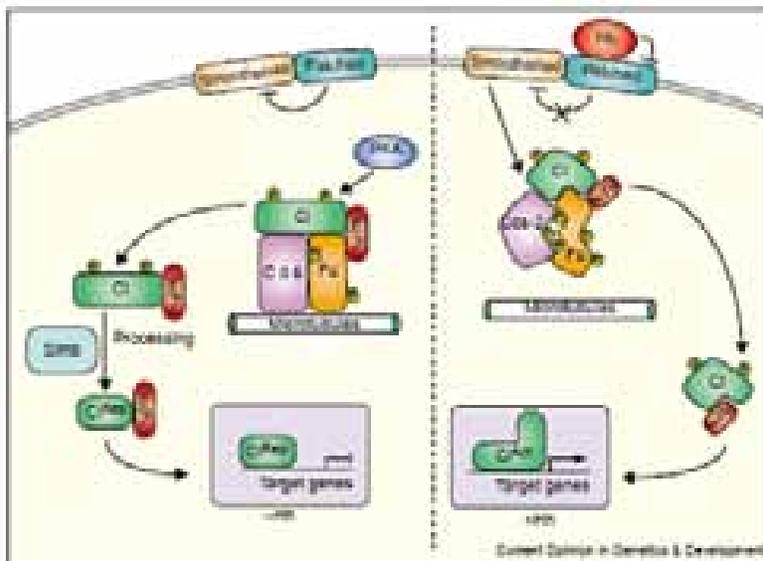
Célula secretora de sonic hedgehog. El multímero Shh-N se asocia con vesículas de lípidos y es liberada por Dispatched. Tomado de Nieuwenhuis y Hui, 2004.



El receptor de SHH es una proteína de membrana asociada con el transporte de moléculas, contiene secuencias transmembranales homólogas a dominios de unión esteroideos. En vertebrados se han encontrado dos diferentes tipos de receptores denominados Patched1 y 2 (Ptc). La interpretación clásica menciona que Ptc controla la expresión de los genes blancos de *Shh* reprimiendo la actividad de una proteína transmembrana asociada a proteínas G y denominada Smoothened (Smo). La unión de Shh a Ptc inhibe la represión de Smo por medio de un cambio conformacional en la molécula (Stone *et al*, 1996). Se ha sugerido que el complejo Shh- Ptc es internalizado por medio de vesículas y que este complejo actúa sobre Smo (Ingham y McMahon, 2001). Otros autores sugieren que Ptc y Smo se encuentran unidos en ausencia de hedgehog y que ambas proteínas endocitan posteriormente a la unión del ligando para luego separarse (Incardona *et al*, 2002). A su vez, *Ptc* es también un gen blanco en esta vía de señalización, la sobre-expresión de este gen produce el secuestro de hedgehog, inhibiendo su función (Chen y Struhl, 1996) (Figura 15).

FIGURA 15

Receptores y transducción de señales de SHH. La figura demuestra que en presencia de Hh Ptc libera a Smo la cual causa la hiperfosforilación de Fu y Cos2 lo que separa la unión de estos complejos de los microtúbulos. Esto ocasiona la estabilización de Ci que actúa como un regulador transcripcional de genes blanco del núcleo. Tomado de Nybakken y Perrimon, 2002.



Existen otras sustancias que funcionan como coreceptores tales como la proteína caveolina, la cual forma una invaginación de la membrana plasmática involucrada en la endocitosis y tráfico de sustancias y la megalina, que es una lipoproteína de baja densidad que regula la endocitosis de la forma multimérica de Shh (Mc Marthy, 2002)(Figura 16).

FIGURA 17

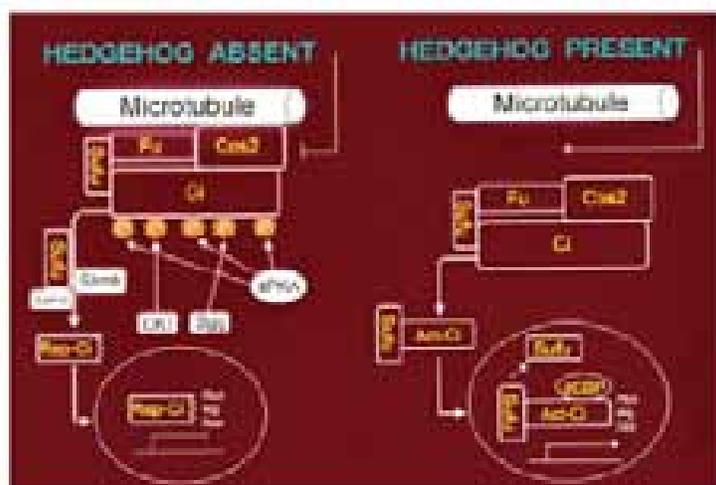
Inhibidores de la señalización de SHH. En células que no reciben Shh, Ptc reprime a Smo, el represor Gli está presente en el núcleo, y la transcripción de *Ptc1* y *Gli1* no se lleva a cabo. Tomada de Nieuwenhuis E y Hui C, 2004.



La vía de señalización Shh-Ptc-Smo tiene un regulador transcripcional bifuncional, codificado en *Drosophila* por el gen de polaridad segmentaria *cubitus interruptus* (*ci*) (Cohen, 2003). Varios factores están involucrados en la señalización corriente abajo de Shh como son: Costal 2(Cos2), Fused (Fu) y Supresor de fused (Sufu), los cuales regulan la transcripción nuclear y la actividad de cubitus interruptus. Estos tres elementos y Ci forman un complejo tetramérico el cual lleva a la transcripción nuclear y activación de Ci (Figura 18).

FIGURA 19

Transducción de señales en ausencia y presencia de Hedgehog. En esta figura se demuestra la formación de un complejo tetramérico que en presencia de Shh regula genes blanco como *Ptch*, *Wg* y *Dpp*. Tomado de Cohen, 2003.



El homólogo de *ci* en vertebrados ha sido designado como *GLI*, éste fue originalmente identificado como un gen amplificado en el glioma maligno (Kinzler *et al*, 1987) y codifica para tres diferentes proteínas. GLI1, 2 y 3 son factores de transcripción con dedos de zinc y secuencias consenso de histidina y cisteína y son el blanco transcripcional de la señalización de SHH (Lee *et al*, 1997).

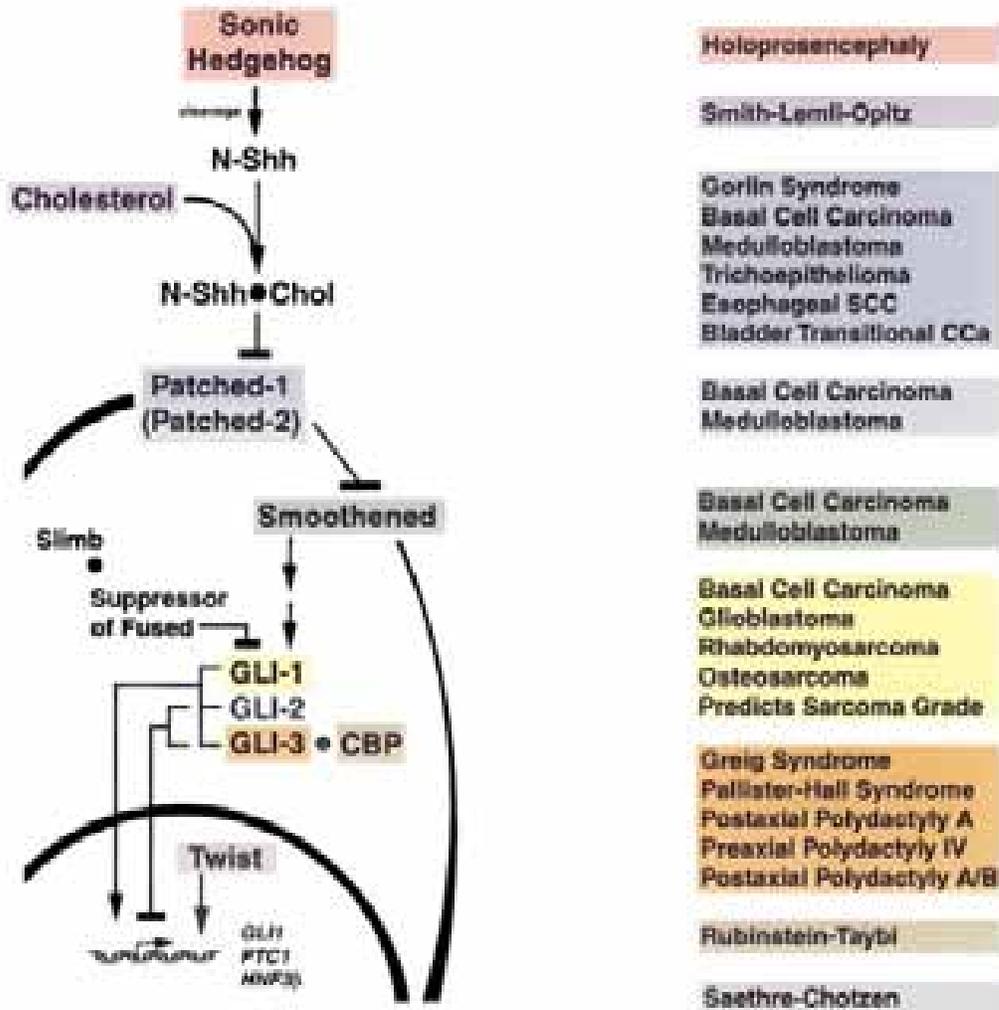
Diferentes estudios han demostrado que: a) GLI1 y GLI2 son activadores SHH-dependientes, b) GLI2 es también un represor independiente de SHH y se ha propuesto que actúa reclutando complejos de histona deacetilasas a través de Sufu c) GLI3 es un represor dorsal de la diferenciación ventral y actúa como promotor de la diferenciación a nivel ventral y d) la proteólisis de GLI2 y GLI3 genera formas represoras de la proteína. Los genes blanco de GLI1, GLI2 y GLI3 incluyen a *WNT*, *IGF2* y *PDGFR α* (Nybakken y Perrimon, 2002).

Los genes *WNT* codifican para una familia de glucoproteínas implicadas en varios procesos del desarrollo como son la diferenciación, polaridad, migración y proliferación celular (Kühl *et al*, 2000). *GLII* es considerado un oncogen y se ha observado amplificado en diferentes tumores. Además, su expresión en ratones transgénicos ocasiona retraso en el crecimiento y enfermedad de Hirshprung (Park *et al*, 2000). Estudios en ratones sugieren que el gen *Gli2* está asociado con carcinoma de células basales y alteraciones esqueléticas (Park *et al*, 2000). Las alteraciones de *GLI2* en el humano causan un fenotipo parecido a la HPE con aplasia nasal, anomalías orbitarias, anoftalmia, alteraciones de arcos braquiales y HPE lobar (Rahimov *et al*, 2006).

Las mutaciones en *GLI3* han sido observadas en varias enfermedades en el humano como la cefalopolisindactilia de Greig, el síndrome de Pallister-Hall así como polidactilias postaxiales tipo I y tipo IV. Esta proteína es coactivada por una proteína de unión a CREB (CBP) y se sugiere que la interacción bioquímica entre CBP y *GLI3* influencía la señalización de SHH. Normalmente, la actividad represora de *GLI3* es inhibida por SHH (Villavicencio *et al*, 2000). En la figura 20 se muestran los diferentes elementos de la vía de señalización de SHH y la asociación con diferentes enfermedades en el humano.

FIGURA 20

Vía de señalización SHH-PTCH-GLI y su relación con diferentes enfermedades en el humano. Tomado de Villavicencio *et al*, 2000.



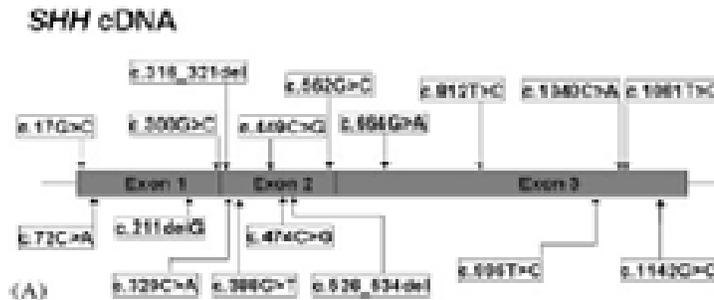
II.D. SHH y HOLOPROSENCEFALIA

La relación de HPE con *SHH* fue postulada en base a su posición con respecto a cuatro puntos de ruptura cromosómica (Muenke, 1994) y se corroboró que era el gen involucrado mediante el análisis mutacional detectado inicialmente en 30 familias con HPE (Roessler, 1996). Posteriormente, se estudiaron 344 pacientes con HPE reportándose 23 (6.7%) con mutaciones en el gen *SHH*, 14 (4.06%) mutaciones se observaron en casos familiares y 9 (2.61%) en casos esporádicos (Nanni *et al*, 1999). Dubourg *et al* (2004) realizaron el análisis mutacional de holoprosencefalia en cuatro diferentes genes (*SHH*, *ZIC2*, *SIX3* y *TGIF*) y encontraron que 34 (17%) de 200 pacientes presentaban diferentes tipos de mutaciones, 17 (50%) mutaciones fueron encontradas en el gen *SHH*, de las cuales 12 (70%) se presentaron en casos familiares y 5 (30%) en casos esporádicos. Combinando los datos de diferentes estudios, se estima que 17% de los casos familiares y 3.7% de los casos esporádicos con HPE tienen mutaciones en *SHH* (Scriver, 2001).

En los casos familiares con patrón de herencia autosómico dominante, la frecuencia de mutaciones en *SHH* ha sido reportada en 24% hasta 37% si se consideran también las anomalías estructurales severas en los criterios de inclusión (Nanni *et al*, 1999). Las mutaciones se han identificado en estado heterocigoto a todo lo largo del gen e incluyen mutaciones de sentido equivocado, sin sentido, deleciones e inserciones que causan pérdida de función de la proteína, por lo que se ha considerado que la haploinsuficiencia de este gen causa la enfermedad (Roessler *et al*, 1996)(Figura 21).

FIGURA 22

Representación esquemática de las mutaciones del gen *SHH* distribuidas en los 3 exones de la proteína. Tomado de Dubourg *et al*, 2004.



II.D.1 Diagnóstico Prenatal

El diagnóstico prenatal de holoprosencefalia se puede realizar por ultrasonido de alta definición a partir de la semana trece de la gestación al no encontrarse el signo de “la mariposa”. Éste se refiere a la visualización de ambos plexos coroides, fusión de tálamos y presencia de un solo ventrículo, así como la ausencia de hueso nasal, perfil facial plano y características de etmocefalia y proboscis (Cho *et al*, 2005)(Figura 23).

FIGURA 23

Ultrasonido de HPE alobar en el segundo trimestre del embarazo en donde observa en un corte sagital la presencia de monoventrículo y tálamos fusionados. Tomado de www.thefetus.net



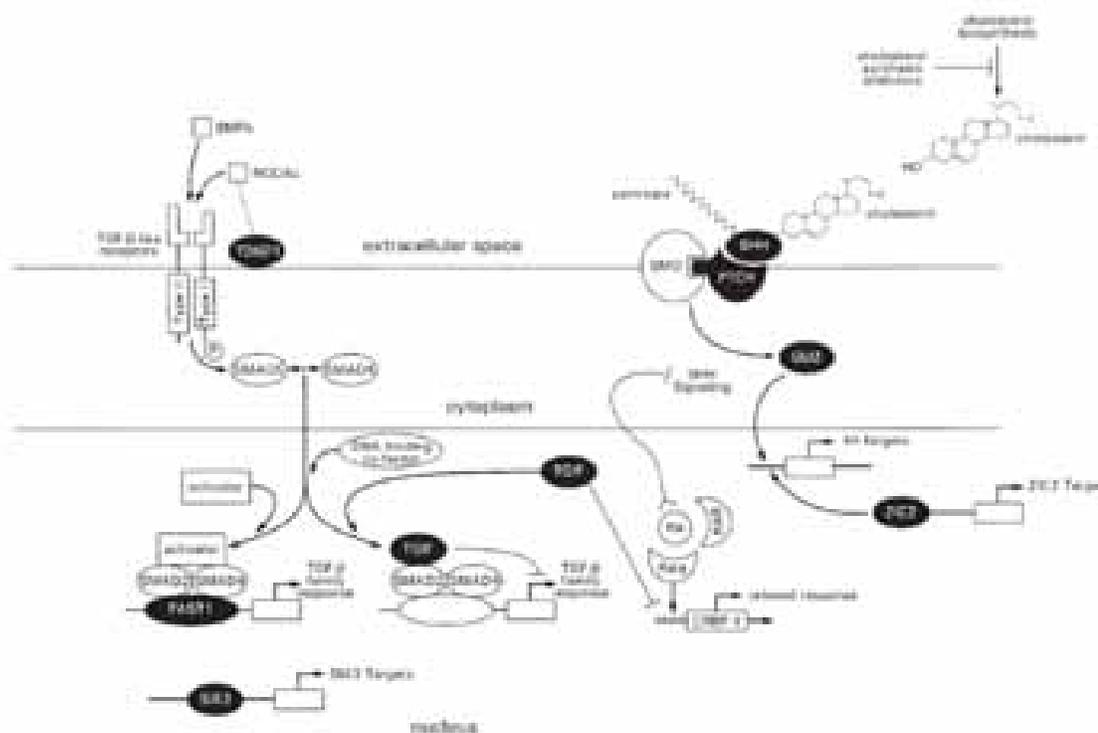
El primer reporte de diagnóstico prenatal de HPE a lo largo se realizó en 1980 (Kurtz *et al*, 1980). La microcefalia es un hallazgo frecuentemente asociado.

En el período comprendido entre 1985 y 1998 se detectaron durante el período prenatal 71% de los casos con HPE en el norte de Inglaterra. El estudio fue dividido en dos fases, durante el primer período (1985-1991) se detectaron 52% de los fetos con HPE a las 21.6 semanas de gestación y durante el segundo período (1992-1998) la detección incrementó a 86%, con edad promedio de diagnóstico a las 19 semanas (Bullen *et al*, 2001).

Lazaro *et al* (2004) publicaron el análisis mutacional de los cuatro genes principales relacionados con HPE, *SHH*, *ZIC2*, *SIX3* y *TGIF* en fetos con esta patología y encontraron que 14% de los pacientes presentaba mutaciones puntuales en alguno de estos genes. Bendavid *et al* (2006) estudiaron 94 fetos con HPE en los que 14% presentaba mutaciones en alguno de los genes previamente mencionados (4 pacientes presentaron mutaciones en *SHH*) y 9.4% presentó microdeleciones en alguno de estos genes (2 pacientes en *SHH*) con lo que el porcentaje de detección fue 22.3% en fetos con HPE y cariotipo normal. En la Figura 24 se muestran los genes relacionados con HPE.

FIGURA 24

La figura muestra los diferentes genes (óvalos negros) en donde se han descrito mutaciones en pacientes con holoprosencefalia.



II.E. SHH y ASOCIACIÓN VATER-VACTER

El análisis fenotípico de los ratones con mutaciones en *Shh* y *Gli* ha demostrado que la vía de señalización de *Shh* participa en el desarrollo de numerosos órganos y sistemas, principalmente en la segmentación de las somitas lo que da origen a la columna vertebral y en el dermamiotomo que forma el músculo y la piel (Christ *et al*, 2000). En la extremidad en desarrollo, *Shh* se expresa en la región posterior conocida como “zona de actividad polarizante”, que está involucrada en la especificación de la extremidad a lo largo del eje antero-posterior (Dudley *et al*, 2000). Los ratones

Shh^{-/-} muestran alteraciones en la columna vertebral y ausencia en la formación de la porción distal de las cuatro extremidades (Kraus *et al*, 2001).

Además, *Shh* se expresa en el endodermo del tracto intestinal donde induce la expresión de *Patched* y de la proteína morfogenética del hueso en el mesénquima intestinal. Los ratones *Shh*^{-/-} presentan defectos de separación entre la tráquea y el esófago (Pepicelli *et al*, 1998) y malformaciones anorectales que incluyen estenosis anal, ano imperforado y cloaca persistente. Los fenotipos de los ratones *Gli2*^{-/-} y *Gli3*^{-/-} son menos severos que los de *Shh*^{-/-} (Kimmel *et al*, 2000).

En un modelo de rata con exposición a adriamicina, Orfrod *et al* (2001) observaron una localización ectópica de la notocorda por lo que sugieren que ésta puede alterar la señalización de *Shh*.

Los genes *Shh*, *Bmp4*, *Hoxa13* y *Hoxd13* se expresan durante el desarrollo del intestino posterior en el ratón. *Shh* induce a *Bmp4* que recluta al mesodermo visceral y a *Hoxa13* y *Hoxd13* (Bitgood y McMahon, 1995). Mandhan *et al* (2006) demostraron en un modelo murino que la expresión de *Shh* mostraba cambios temporales en el desarrollo del intestino posterior y que la disrupción de *Shh* con etilenetiourea ocasionaba una gran variedad de defectos anorectales.

Kim *et al* (2001) reportaron que la expresión de la mutación sin sentido *Gli2* *zfd/zfd* en ratón se asemeja a la asociación VACTERL en el humano con defectos vertebrales, anales, cardiacos, tráqueo-esofágicos y en extremidades. Estos autores encontraron que *Gli2* *zfd/zfd*; *Gli3* *zfd/+* también causan la asociación VACTERL con anomalías renales agregadas. Los ratones *Shh*^{-/-} mostraron los fenotipos más severos y el espectro completo de la Asociación VATER. En la Figura 25 se muestran las alteraciones que presentan los ratones con mutaciones en *Gli2* y *Gli3* en relación con el fenotipo normal (Kim *et al.*, 2001).

V
A
C
T
E
R
L

normal

mutante

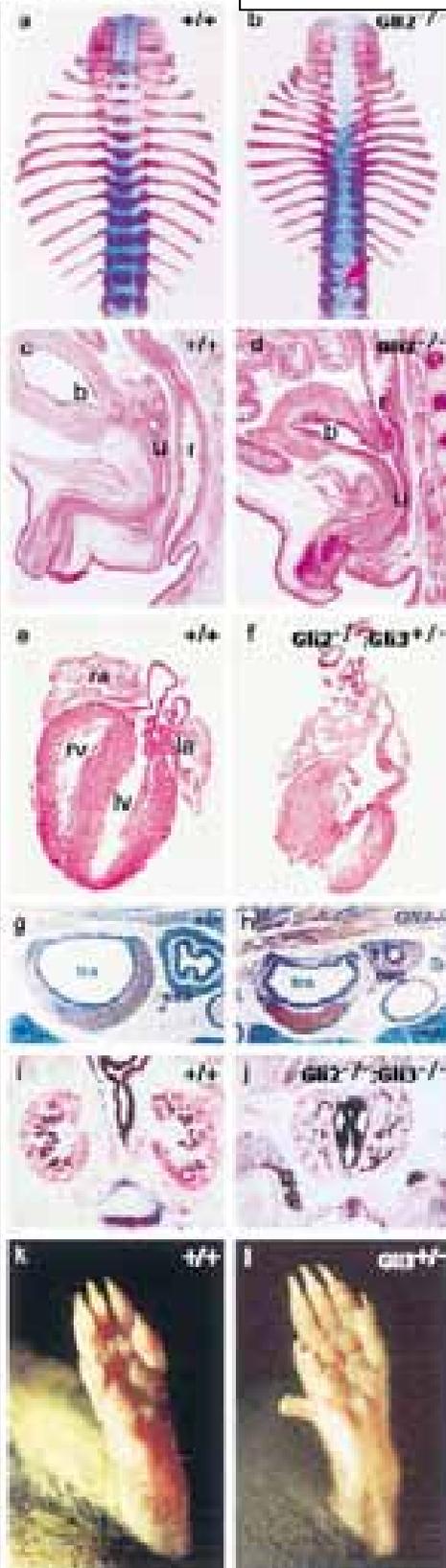


Figura 25.
Asociación VACTERL
en ratones con
mutaciones en *Gli2* y 3.
Vertebral: Ausencia de
cuerpos vertebrales
Malformación anorectal:
Ano imperforado
Cardiopatía: persistencia
de conducto arterioso
Anomalía tráqueo-
esofágica, renal y de
extremidades (limbs):
polidactilia preaxial.

Estos hallazgos sugieren que la señalización de *Shh* participa en la base molecular de las malformaciones altas y bajas del tracto intestinal. También se conoce que los ratones *Shh*^{-/-} presentan defectos cardíacos y renales lo que puede ser secundario a un error en la especificación de la lateralidad (Meyers *et al*, 1999).

De acuerdo a la expresión de *Shh* y al fenotipo observado en los ratones nulisómicos, Kim *et al* (2001) propusieron que la asociación VATER se puede presentar cuando existe una alteración en la señalización de *SHH*, lo que explicaría las bases moleculares de esta enfermedad. Estos autores no descartan la participación ambiental dentro de la etiología de la asociación VATER ya que el período de la señalización de *SHH* es diferente para cada órgano, lo que puede explicar las diferentes anomalías encontradas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El gen *SHH* es uno de los más estudiados en la actualidad y se conoce que en modelos animales sus mutaciones se relacionan con múltiples alteraciones ó entidades clínicas. La HPE es la anomalía cerebral más común durante la embriogénesis, su etiología es heterogénea incluyendo factores genéticos y/ó ambientales, nueve genes han sido implicados. En la literatura se han descrito diferentes mutaciones de *SHH* asociadas a holoprosencefalia, 17% en casos familiares y 3.8% en esporádicos. En México no se tienen estudios representativos de la epidemiología de estas patologías y no se han realizado estudios moleculares que identifiquen alteraciones en el gen *SHH*, por lo que la implementación de este estudio molecular permitirá analizar de una manera más completa la patología observada en los pacientes.

La asociación VATER-VACTER es un conjunto de defectos que se presentan simultáneamente sin una etiología determinada. El gen *Shh* está involucrado en el desarrollo normal de varios órganos que se encuentran afectados en esta asociación. Estudios recientes en animales señalan que alteraciones en la vía de señalización del gen pudieran ser la causa de la asociación VACTER. Se desconoce si en humanos existe homología funcional con este gen, por lo que consideramos trascendente participar en su inclusión o exclusión en relación con la asociación VATER-VACTER, lo que será una contribución para la genética clínica y en la biología del desarrollo humano.

El gen *Shh* actúa de forma directa e indirecta y es considerado un morfógeno ya que las diferentes respuestas moleculares que realiza dependen de la concentración de la proteína en los diferentes tejidos en los que se expresa.

Este estudio se realiza en pacientes con HPE, la cual es una enfermedad en donde diversas mutaciones han sido descritas, y por otra parte se realiza un estudio que no se ha realizado previamente en pacientes con una enfermedad de etiología desconocida en donde el mismo gen es expresado de forma temprana en los órganos afectados y en donde no se ha explorado si algún tipo de mutación pudieran alterar la función de la proteína de forma tejido-específico.

Aunque las dos enfermedades son muy diferentes, se plantea en este estudio la posibilidad de estudiar ambas, en el caso de pacientes con HPE aislada, la secuenciación del gen *SHH* se realiza en el extranjero y está indicado realizarla cuando la enfermedad se presenta de forma aislada y con cariotipo normal. En pacientes con Asociación VATER, se ha propuesto por estudios realizados en ratones que el gen *SHH* pudiera ser la causa de esta enfermedad de etiología desconocida, por lo que aunque no existe relación entre estas dos enfermedades consideramos importante implementar

la metodología para realizar el estudio molecular de un gen que es expresado tempranamente durante el desarrollo y que induce una vía importante de transducción de señales.

Con este estudio se pretende ofrecer a los pacientes con HPE aislada la posibilidad del estudio molecular en nuestro país e implementar esta metodología en pacientes con Asociación VATER-VACTER como un estudio innovador en donde mutaciones en el gen han sido propuestas como causa de esta alteración en animales.

IV. OBJETIVOS

1. Identificar y determinar la frecuencia de mutaciones en el gen *SHH* en pacientes mexicanos con holoprosencefalia.
2. Determinar si las mutaciones en el gen *SHH* se presentan en pacientes con asociación VATER-VACTER .

V. CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN.

Criterios de inclusión:

Pacientes con holoprosencefalia

Pacientes con diagnóstico de asociación VATER-VACTER

Criterios de exclusión:

Presencia de bandas amnióticas por ultrasonido prenatal.

Pacientes con cromosopatía o síndrome genético definido.

Criterio de eliminación:

Pacientes en quienes la muestra de DNA no pueda ser obtenida o procesada.

VI.VARIABLES EN ESTUDIO.

Variables Dependientes:

1. Paciente con holoprosencefalia.

Variable cualitativa, nominal.

2. Paciente con asociación VATER- VACTER.

Variable cualitativa, nominal.

Variable Independiente:

Mutaciones en el gen *SHH*.

Variable cualitativa, nominal.

VII. TIPO DE INVESTIGACIÓN.

Diseño: Observacional

Serie de Casos

Características del estudio: Descriptivo

Transversal

El universo está formado por todos los pacientes referidos con holoprosencefalia y asociación VATER-VACTER.

Método de Muestreo: No Probabilística, de casos consecutivos sujeto a la temporalidad del estudio.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para el estudio se invitó a participar a los Departamentos de Genética del Instituto Nacional de Pediatría (INP), Hospital General de México (HGM) y Hospital Infantil de México (HIM). Fueron estudiados 17 pacientes con el diagnóstico clínico de holoprosencefalia. Dieciséis casos fueron esporádicos y uno familiar.

Se incluyeron once pacientes quienes presentaron los criterios diagnósticos para asociación VATER- VACTER. Todos los pacientes tuvieron cariotipo normal.

Posterior a la firma del consentimiento informado y al llenado de la hoja de recolección de datos, se procedió a obtener 3 ml de sangre periférica de cada paciente en un tubo con EDTA.

Extracción de DNA:

Se realizó utilizando el kit de extracción de DNA Genómico GFX (GE HealthCare, Biosciences). Se transfirieron 300 µl de sangre completa a 900µl de solución de lisis de glóbulos rojos a un tubo eppendorf de 1.5ml. Se mezcló varias veces por inversión, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 rpm durante 20 segundos. El sobrenadante fue removido y el botón de glóbulos blancos fue resuspendido en el volumen residual. Se agregaron 500µl de solución de extracción y se volvió a mezclar. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. La mezcla completa fue transferida a una columna GFX y se centrifugó a 8,000 rpm en una microcentrífuga durante 1 minuto. Se vació el tubo colector y se agregaron 500µl de solución de extracción a la columna, centrifugándose

a 8000 rpm por 1 minuto. Se repitió el procedimiento anterior pero se centrifugó a 16000 rpm durante 3 minutos y se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5ml, se agregaron 200µl de buffer de elución directo a la columna, se incubó la muestra a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto para recuperar el DNA. La cuantificación de DNA se realizó por espectrofotometría utilizando el factor de conversión de 50 y un factor de dilución de 100.

Reacción en cadena de la polimerasa:

El análisis mutacional de la región codificante de *SHH* se realizó amplificando los tres exones por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados a partir de la secuencia del gen *SHH* establecida en www.ensemble.org. Para la amplificación del exón 1 de 451 pares de bases, se diseñaron dos *primers*: el primero en sentido *forward* a 180 pares de bases corriente arriba del primer exón y el segundo en sentido *reverse* 33 pares de bases corriente abajo. Para el segundo exón de 262 pares de bases, se diseñaron dos *primers*: el primero en sentido *forward* 42 pares de bases corriente arriba del exón 2 y el segundo 191 pares de bases corriente abajo en sentido *reverse*. Para el exón 3 de 863 pares de bases fue necesario diseñar tres *primers*: el primero en sentido *forward* 58 pares de bases corriente arriba del exón 3, un *primer* interno de sentido *forward* localizado a 302 pares de bases y un tercer *primer* de sentido *reverse* 67 pares de bases corriente abajo del exón 3.

La secuencia de pares de bases utilizada para la amplificación de los 3 exones fue la siguiente:

EXON 1: *Forward*: TCTCCAGGCTTGCTACCATTT

Reverse: GGACCTTTCGGTGTGTAAG

EXON 2: *Forward*: AGGCTAACGTGTCCGTCGGT

Reverse: GGAGTTTCCATCCCCACTAAA

EXON 3: *Forward*: CTCCCTCTCGGAACTCAATG

Forward: TCGGGCTCGGGGCCGCCTT

Reverse: TGAGTCAGACCAAGCACGCGGAA

Las condiciones de la PCR utilizadas para la amplificación de los exones 1 y 2 fueron las siguientes: 5 μ l de DNA, 6.9 μ l de agua bidestilada, 12.5 μ l de solución HotStartTaq Master Mix (Qiagen), 0.3 μ l de cada primer para un volumen final de 25 μ l, la concentración del primer deseada fue de 100 μ M.

Para la amplificación del exón 3 se utilizó: 5 μ l de DNA, 5.4 μ l de agua bidestilada, 10 μ l de solución HotStartTaq Master Mix (Qiagen), 0.3 μ l de cada primer y 4 μ l de solución Q (Qiagen) ya que este exón tiene un alto contenido de bases G-C, para un volumen final de 25 μ l.

Las condiciones de las PCR se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

	Ciclos	Minutos	Temperatura
EXON 1 <i>SHH</i>	1	15	95°C
	40	1.3	95°C
		1.3	54.6°C
		1.3	72°C
	1	10	72°C
EXON 2 <i>SHH</i>	1	15	95°C
	40	1.3	95°C
		1.3	58.7°C
		1.3	72°C
	1	10	72°C
EXON 3 <i>SHH</i>	1	15	95°C
	40	1	95°C
		50 seg	58.7°C
		1	72°C
	1	10	72°C

Los productos de la reacción de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta. Para el exón 1 se esperaba la amplificación de aproximadamente 664 pares de bases, para el exón 2 de 495 pares de bases y para el 3 de 988 pares de bases.

Una vez identificadas las bandas se escindieron del gel utilizando navajas estériles.

La purificación de la banda de PCR de los productos amplificados se realizó por medio del kit GFX PCR DNA and Gel Band Puriftn (GEHealthcare, Biosciences).

Secuenciación:

La secuenciación automatizada directa fue realizada con el kit de Secuenciación BigDye Terminator Cycle (Applied Biosystems, Foster City, CA) con las siguientes condiciones: 1µl de agua estéril, 6µl de producto de PCR purificado, 1µl de Buffer BigDye, 1.5µl de BigDye Reaction Mix y 0.5µl de oligonucleótido (Forward o Reverse según fué el caso). El programa utilizado en el termociclador fue 25 x 30seg - 95°C, 1 x 15 seg - 50°C y 1 x 4 min - 60°C. El producto de Big Dye se mezcló con 10µl de agua estéril y se colocó en una columna de Sephadex, se centrifugó a 2200 rpm por 2 minutos y se liofilizó por 20 minutos en un tubo eppendorf de 600µl. Se procedió a reconstituir con 20µl de formamida, se desnaturalizó por 5 minutos a 95°C y se dio choque térmico con hielo durante 2 minutos.

El análisis de cada muestra se realizó en un secuenciador ABI Prism 310 (Applied Biosystems) y las secuencias fueron comparadas manualmente con la secuencia *wild type* del gen *SHH* (Gen Bank NM0001193).

IX. RESULTADOS

Durante el período del estudio, se realizó la secuenciación del gen *SHH* a 17 pacientes con el diagnóstico de holoprosencefalia aislada. Se recibieron 7 muestras de pacientes con esta enfermedad del INP y las 10 muestras restantes fueron de pacientes del Instituto Nacional de Perinatología (INPer).

Once pacientes con 3 o más criterios de Asociación VATER-VACTER fueron estudiados, de los cuales, 2 muestras fueron enviadas del INP, 2 pacientes fueron enviados del HIM y los 7 pacientes restantes nacieron en el INPer.

Todos los pacientes tuvieron un cariotipo normal.

Se obtuvieron los antecedentes familiares y perinatales de los pacientes nacidos en el INPer.

De los 10 pacientes con HPE valorados en el INPer, en 9 se realizó el diagnóstico de forma perinatal, en 5 por ultrasonido prenatal y en 4 al nacimiento.

Un paciente fue valorado en la consulta de Genética de la Reproducción en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer), por los siguientes antecedentes: paciente masculino, 37 años postoperado de labio y paladar hendido central, con hipoplasia medifacial y ausencia de incisivo central (Figuras 26 y 27). Pareja de sexo femenino, de 27 años Gesta:3 Aborto:2 Cesárea:1, sin hijos vivos, aparentemente sana. Historia familiar de dos abortos no estudiados e hija previa con muerte neonatal temprana no valorada en el INPer con reporte clínico de holoprosencefalia de tipo no especificado con microftalmia, labio paladar hendido central y nariz única. No se realizó estudio de necropsia.

Ocho de los 9 pacientes con diagnóstico perinatal fueron del sexo femenino y uno de sexo masculino, 6 pacientes fueron producto de la primera gestación y dos madres tenían hijos sanos previos. La media de edad materna fue de 23.6 años con rango de 18 a 31 años y la media de edad paterna de 24.3 años con rango de 16 a 37 años. Las madres de 5 pacientes eran originarias del DF,

3 del Estado de México y una de Puebla. En 6 pacientes se resolvió el embarazo por vía abdominal. Se obtuvieron 4 recién nacidos (RN) de término eutróficos, 4 RN pretérmino eutróficos y un RN pretérmino hipotrófico. La media de edad gestacional calculada por Capurro promedio fue de 36.1 semanas de gestación con un rango de 33 a 39.1 semanas. Cuatro pacientes tuvieron una calificación de Apgar de 8/9, 3 de 4/8 y uno de 1/3.

Las características clínicas de los pacientes estudiados con HPE se describen en la Tabla 4.

TABLA 4

NO. CASO	TIPO DE HPE	ANOMALIAS FACIALES	DEFECTOS ASOCIADOS	PRESENTACION
1	Alobar	Agenesia premaxilar, nariz plana e hipotelorismo	Atresia esofágica tipo III	Esporádica
2	Alobar	Agenesia premaxilar, nariz plana e hipotelorismo	Ninguno	Esporádica
3	Alobar	Hipotelorismo	Ninguno	Esporádica
4	Semilobar	Ninguna	Hidrocefalia, arteria umbilical única	Esporádica
5	Alobar	Hipotelorismo, paladar hendido	Atresia pulmonar, CIV	Esporádica
6	Lobar	Ninguna	Espectro facio-aurículo-vertebral	Esporádica
7	Alobar	Cebocefalia	Ninguno	Esporádica
8	Alobar	Hipotelorismo, paladar hendido	Ninguno	Esporádica
9	Alobar	Agenesia premaxilar, nariz plana e	Atresia esofágica tipo III	Esporádica

		hipotelorismo		
10	Semilobar	Ninguna	Hidrocefalia	Esporádica
11	Semilobar	Agenesia de premaxila nariz plana e hipotelorismo	Hidrocefalia	Esporádica
12	Alobar	Etmocefalia	Ninguno	Esporádica
13	Semilobar	Ninguna	Ninguno	Esporádica
14	Semilobar	Hipotelorismo	Ninguno	Esporádica
15	Lobar	Hipotelorismo, hipoplasia nasal	Ninguno	Esporádica
16	Alobar	Agenesia de premaxila, nariz plana e hipotelorismo	Ninguno	Esporádica
17	TAC normal	Labio hendido medial, ausencia de incisivos centrales, hipotelorismo	Ninguno	Familiar

Cuatro pacientes presentaron muerte neonatal temprana, 2 casos con HPE y atresia esofágica y los dos pacientes con alteraciones faciales. Los pacientes restantes fueron referidos a un hospital pediátrico para su seguimiento.

FIGURA 26

Paciente con antecedente de labio hendido central, ausencia de incisivo central y paladar hendido.



FIGURA 27

Perfil del paciente en el que se observa hipoplasia medio facial



Se solicitó Tomografía Axial Computarizada de cráneo al paciente la cual fue valorada por el Departamento de Neurología y reportada como normal. Se solicitó cariotipo a ambos padres los cuales fueron reportados como normales. Se invitó al paciente (caso no.17) a participar en el estudio para el análisis molecular de *SHH*.

En 7 pacientes se realizó el diagnóstico de Asociación VATER-VACTER en el INPer. En 5 casos las madres tuvieron control prenatal, 4 pacientes fueron del sexo masculino y 3 femeninos. Tres pacientes fueron producto de la primera gesta, dos de la segunda y dos de la cuarta, en un caso existía el antecedente de pérdida gestacional recurrente y 3 madres tenían hijos sanos. La media de edad materna fue de 25.7 años con un rango de 21 a 37 años, y la media de edad paterna de 20.3 años con un rango de 19 a 36 años. Seis madres eran originarias del DF y 1 de Guerrero. En 7 casos el embarazo se resolvió por vía abdominal con una media de edad gestacional de

37.1semanas con un rango de 36 a 39.2 semanas. Tres pacientes fueron RN pretérmino, dos RN eutróficos y 2 RN hipotróficos a término.

Las características clínicas de los pacientes estudiados con Asociación VATER- VACTER se muestran en la **Tabla 5**.

TABLA 5

NO. CASO	ANOMALIA VERTEBRAL	ANO IMPER-FORADO	CARDIO-PATIA	FTE	ANOMALIA RENAL
1	Hemivértebra torácica	Sí	No	Atresia esofágica III	Agenesia renal izquierda
2	Fusión vertebral T4	No	PCA	Atresia esofágica III	Hipoplasia renal izquierda
3	Hemivértebra torácica	No	No	Sí	No
4	Hemivértebra C7	No	PCA	No	Hipoplasia renal izquierda
5	Agenesia de sacro	Sí	PCA	No	No
6	Hemivértebra torácica	Sí	Tetralogía de Fallot	No	No
7	Hemivértebra lumbar	Sí	CIV subaórtica	No	Agenesia renal derecha
8	No	No	PCA	Sí	Agenesia renal izquierda
9	Hemivértebra torácica	No	CIV muscular	Atresia esofágica III	No
10	Hemivértebra lumbar	Sí	CIV apical	No	No
11	Hemivértebra lumbar	No	No	No	Displasia renal derecha

FTE: Fístula tráqueo-esofágica. CIV: Comunicación interventricular. PCA: Persistencia conducto arterioso

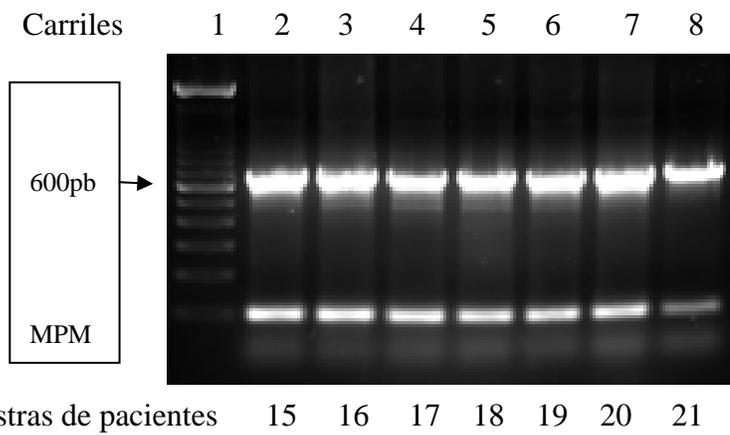
IX.A. RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR DEL GEN *SHH*

Un paciente con diagnóstico de HPE y otro con Asociación VATER fueron eliminados del estudio debido a la baja concentración de DNA y a la imposibilidad de tomar nueva muestra.

En las figuras 28, 29 y 30 se muestran las bandas de amplificación en los geles de agarosa de los 3 exones del gen *SHH*, con su respectivo peso molecular.

FIGURA 28

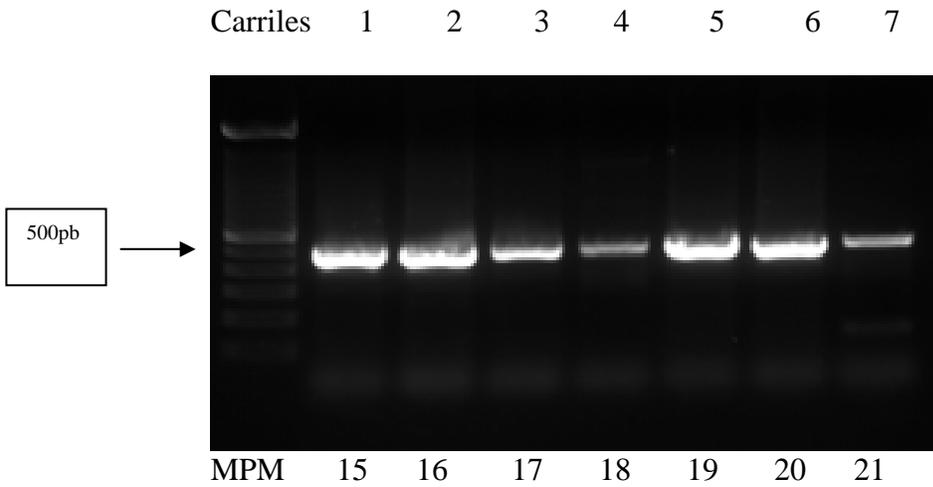
Amplificación por PCR del exón 1 del gen *SHH* en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%



En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 a 8 se demuestra la amplificación de un segmento de 664pb de los pacientes identificados con los números 15 a 21.

FIGURA 29

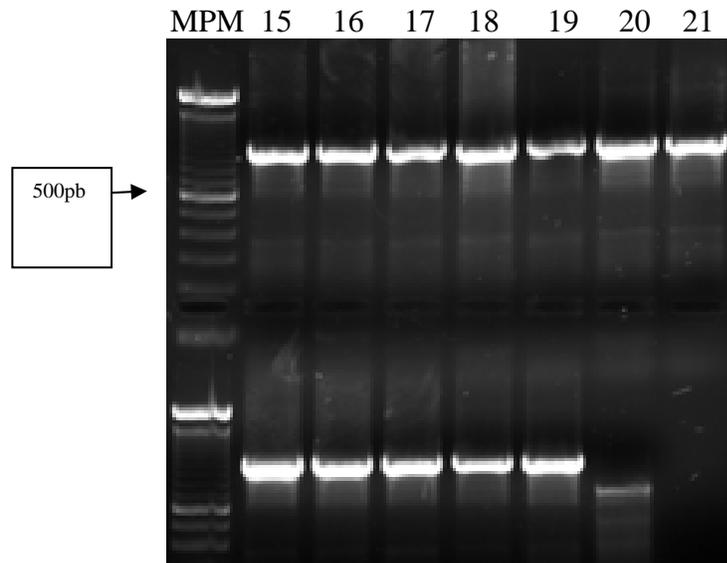
Amplificación por PCR del exón 2 del gen *SHH* en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%



En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 1 a 7 se demuestra la amplificación de un segmento de 495 pb de los pacientes identificados con los números 15 a 21.

FIGURA 30

Amplificación por PCR del exón 3 del gen *SHH* en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%



En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular, en los carriles 2 a 8 se demuestra la amplificación de un segmento de 900 pb de los pacientes identificados con los números 15 a 21.

La secuenciación de los tres exones del gen *SHH* no demostró mutación en ninguno de los 15 casos esporádicos con HPE.

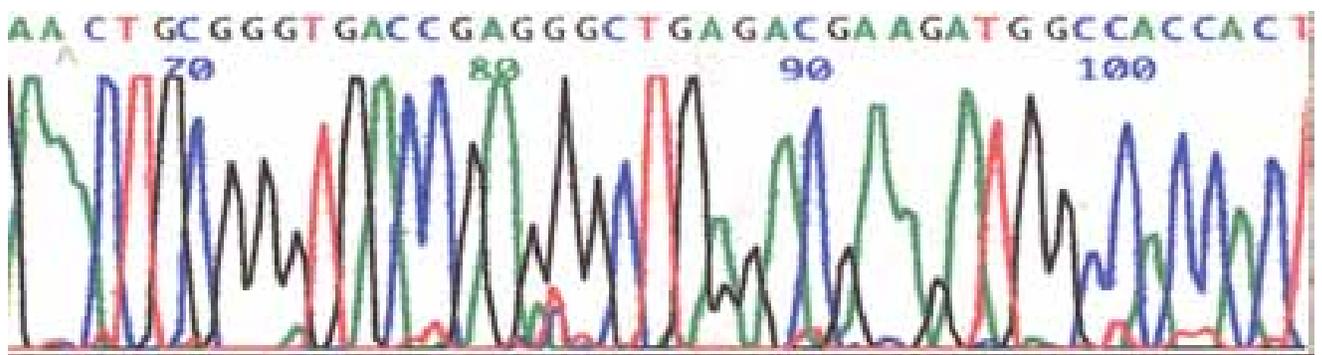
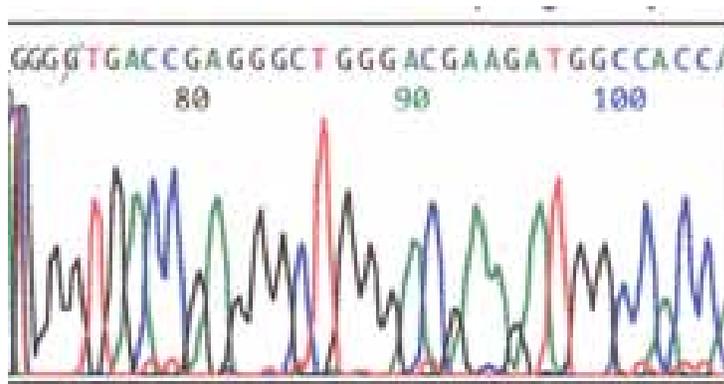
La secuenciación del gen *SHH* en los 10 casos con diagnóstico de Asociación VATER-VACTER no demostró mutaciones en ninguno de los pacientes.

En el paciente 17, con antecedentes familiares y características faciales de HPE se demostró una mutación sin sentido en el codón 127 del exón 2 del gen *SHH*. Se observó un cambio del codón TGG (que codifica para triptofano) por el TGA que es un codón de terminación (Figura 31). La mutación es referida como W127X y no ha sido reportada con anterioridad en pacientes

con HPE. El transcrito del gen *SHH* tiene una longitud de 1575 pares de bases y está conformado por 450 codones. La mutación encontrada en el paciente está presente en uno de los alelos y está localizada en el codón 127. Este codón se encuentra dentro de los codones 24 a 184 que codifican para la región de señalización de la proteína, por lo que la mutación ocasiona una forma truncada de la parte funcional de la proteína (Figura 32).

FIGURA 31

Electroferograma que demuestra la secuencia normal del gen *SHH*.



TGG ⇌ TGA

Mutación heterocigota sin sentido en el codón 127 del exón 2 del gen *SHH*.

X. DISCUSIÓN

Este estudio fue realizado con la finalidad de implementar en el Departamento de Genética el estudio molecular del gen *SHH* para pacientes con diagnóstico de holoprosencefalia, el cual no se realizaba en nuestro país. Se realizó difusión del mismo y se recibieron muestras de diferentes hospitales, con este estudio se pretende iniciar una línea de investigación para defectos congénitos muchos de los cuales se detectan prenatalmente en el INPer.

Para la secuenciación del gen *SHH* se obtuvo el apoyo del Hospital Conde de la Valenciana gracias al cual fue posible concluir el presente estudio, ya que nuestra Institución no cuenta con el equipo necesario para realizar este tipo de estudios.

En base a este análisis, se solicitará el apoyo para realizar diferentes pruebas moleculares en las áreas de mayor demanda del Departamento de Genética como son: Diagnóstico Prenatal, Defectos Congénitos y Genética de la Reproducción y así, poder ser un centro de referencia para el estudio integral de las principales patologías genéticas perinatales.

Este estudio permitió descartar la presencia de mutaciones del gen *SHH* en los pacientes con HPE sin antecedentes heredo-familiares y otorgar un adecuado asesoramiento al paciente con la nueva mutación encontrada. Considero necesario continuar con esta línea de investigación y ampliar el estudio en otros genes descritos en HPE.

La secuenciación del gen *SHH* realizada en pacientes con asociación VATER no mostró cambios, el objetivo fue realizar un estudio innovador que no se había llevado a cabo. Por los estudios realizados en ratones, es importante buscar mutaciones en otros genes implicados en la vía de señalización de *SHH* como lo son los genes *GLI2* y *GLI3*.

Los genes Hedgehog (Hh) codifican para moléculas de señalización que intervienen en numerosos procesos durante el desarrollo embrionario y la vida adulta. En vertebrados, tres genes de la familia Hh han sido caracterizados: Sonic hedgehog (*Shh*), Indian Hedgehog (*Ihh*) y Desert Hedgehog (*Dhh*).

El gen Sonic Hedgehog codifica para una proteína que pertenece a una familia de señalización producida por la placa precordial y es necesaria para la inducción de estructuras del cerebro ventral. Las mutaciones en *SHH* causan una disminución de la función de la proteína y han sido implicadas en diferentes formas de holoprosencefalia (Belloni *et al*, 1996; Roessler *et al*, 1996; Roessler *et al*, 1997; Ming and Muenke, 1998; Nanni *et al*, 1999; Odent *et al*, 1999; Wallis and Muenke, 2000; Marini *et al*, 2003; Dubourg *et al*, 2004; Lazaro *et al*, 2004) y microftalmia con coloboma no sindrómica (Schimmenti *et al*, 2003). El incremento en la función de *SHH* en el adulto se ha relacionado con la presencia de diversos tumores como gliomas, meduloblastomas y carcinomas de células basales (Ruiz *et al*, 2002).

La holoprosencefalia (HPE) es una malformación cerebral compleja causada por una falta de inducción de la línea media en el prosencéfalo entre los 18 y 28 días de gestación en el humano. En nuestro estudio se estudiaron 16 pacientes con HPE de tipo esporádico y un caso familiar.

De los casos con HPE esporádica, nueve pacientes (52.9%) presentaban HPE alobar, cinco HPE semilobar (29.4%) y dos HPE lobar (11.7%). La literatura refiere que aproximadamente 64% de los pacientes presentan la forma alobar, 24% semilobar y 12% lobar, lo que concuerda con las formas observadas (Olsen *et al*, 1997). Estudios realizados en mamíferos y pájaros mostraron que la severidad de la HPE correlaciona con la etapa embrionaria en la que se lleva a cabo la interrupción de la señal de *Shh* (Incardona *et al*, 1998).

En nuestro grupo de pacientes, todos los que presentaban HPE alobar tenían características faciales de la enfermedad y las dos formas más severas (cebocefalia y etmocefalia) se observaron en pacientes con este tipo de HPE, los cuales presentaron muerte neonatal temprana. Dos de los cinco pacientes con HPE semilobar y uno de los 2 pacientes con HPE lobar presentaron algunas características faciales. Se ha reportado que existe una relación inversa entre la severidad del fenotipo facial y el pronóstico de vida (Olsen *et al*, 1997).

Cordero *et al* (2004) realizaron un estudio para conocer si la variabilidad en el fenotipo de HPE es secundaria a una alteración en la señalización de *Shh* en diferentes etapas embriológicas en las aves y pudieron confirmar que si el bloqueo en la señalización de *Shh* se produce antes de que el gen se exprese en la región facial, las alteraciones fenotípicas están limitadas a ésta. Se ha postulado que la pérdida de *Shh* en la cara es compensada por el incremento en la función del gen *Fgf*, el cual se expresa en la línea media y forma las estructuras ventrales (Comoul *et al*, 2003) y que la disrupción de la zona ectodérmica frontonasal altera la proliferación y/o diferenciación celular en las condensaciones osteogénicas y condrogénicas del primordio frontonasal. Esta anomalía causa una disminución y una posición aberrante de los elementos esqueléticos de la cara.

Jellinger (1980) reportó que 70% de los pacientes con HPE presentaban otros defectos no faciales asociados. En su estudio, siete pacientes presentaron defectos mayores asociados, dos de ellos tenían atresia esofágica. Los ratones *Shh*^{-/-} presentan defectos de separación entre la tráquea y el esófago (Pepicelli *et al*, 1998), sin embargo, dos pacientes de este estudio con esta malformación no mostraron mutación en *SHH*. El caso 6 del presente estudio, presentó HPE y espectro facio- aurículo- vertebral que puede ser considerado como un defecto coincidental o secundario a hiperglicemia materna no detectada durante el embarazo. Esta es un factor de riesgo para ambas entidades. Tres de nuestros pacientes presentaron hidrocefalia, la cual es considerada

como una complicación de la holoprosencefalia y presenta una fuerte correlación con el grado de severidad de la HPE y la presencia de quiste dorsal (Plawner *et al*, 2002).

Dubourg *et al* (2004) reportaron que las mutaciones en *SHH* se han encontrado predominantemente en pacientes con atresia de coanas, hipoplasia cerebelar y anomalías de la glándula hipofisiaria, sin embargo, la baja frecuencia de estos eventos aislados no permite determinar una asociación.

Odent *et al* (1999) estudiaron 6 pacientes con HPE y anomalías asociadas de tipo esquelético, renal, intestinal y cardiaco y no encontraron mutaciones en la secuencia del gen *SHH*. Lazaro *et al* (2004) reportaron cuatro pacientes con mutaciones en *SHH* que presentaban HPE e hipoplasia cerebelar y 14 casos con anomalías de extremidades y mutación en *SHH*. Esto sugiere que en humanos, la porción medial del SNC puede ser particularmente sensible a la dosis del gen (Odent *et al*, 1999).

En nuestro estudio, un paciente mostraba únicamente alteraciones faciales caracterizadas por labio y paladar hendido central, hipoplasia medio facial y ausencia de incisivo central. Cohen (2001) sugiere que un paciente con incisivo central único debe ser abordado como: 1- un componente integral de HPE severa, 2- una anomalía que puede ocurrir aislada y en otras condiciones sin relación con HPE, 3- la única manifestación de algunos miembros de una familia afectada con herencia autosómico dominante con expresión variable y penetrancia incompleta y 4- como un rasgo dominante con mutación en *SHH*.

En este paciente, el antecedente de una hija, que no pudo ser estudiada, con una forma severa de HPE, sugiere un patrón de herencia autosómico dominante. Veintisiete familias con HPE con patrón de herencia autosómico dominante y expresión variable han sido descritas (Roessler *et al*, 1996; Nanni *et al*, 1999; Odent *et al*, 1999, Marini *et al*, 2003). Nanni *et al* (1999) realizaron el estudio mutacional en 78 familias con HPE y encontraron en 9 de ellas mutaciones en *SHH*. En

cuatro familias se observó que el progenitor no afectado clínicamente presentaba la mutación, por lo que se ha estimado que 30% de los portadores obligados de HPE son clínicamente normales (Cohen, 1989). Además, en dos familias se observó HPE en dos hermanos, sin embargo, ninguno de los padres tenía la mutación lo cual sugiere un mosaicismo germinal. Estos autores comentan que si se utilizan criterios más amplios en las familias con transmisión autosómica dominante, incluyendo características como microcefalia, hipotelorismo y retraso mental, la frecuencia de mutaciones en *SHH* es de 24% y cuando la inclusión se limita a anomalías estructurales como agenesia de cuerpo calloso, labio y paladar hendido e incisivo central único, la frecuencia es de 37%. Marini *et al* (2003) reportaron una familia en la cual la madre presentaba incisivo central único con antecedente de tres hijos con HPE alobar.

En nuestro estudio, el análisis mutacional del gen *SHH* se realizó en 16 pacientes con HPE. La secuencia fue normal en los 15 casos esporádicos y en el padre del caso familiar se demostró una mutación sin sentido en el exón 2 del gen. Esta mutación no ha sido descrita con anterioridad y corresponde a un cambio de triptofano por un codón de terminación en el residuo 127 de la proteína (W127X). El paciente tiene el antecedente de una hija fallecida con una forma severa de HPE y cebocefalia.

Las mutaciones en el gen *SHH* son la causa monogénica más frecuente identificada en HPE en el humano (Nanni *et al*, 1999), 17% en los casos familiares y 3.7% en los esporádicos. Wallis y Muenke (2000) reportaron que 37% de los casos familiares con herencia autosómica- dominante presentaba mutaciones en *SHH*. Sin embargo, las mutaciones en los 9 genes implicados explican sólo 12.2% de los casos de HPE, por lo que la mayoría de éstos son secundarios a otras causas tales como alteraciones cromosómicas, enfermedades monogénicas o factores ambientales aún no determinados.

Las mutaciones reportadas en el humano en *SHH* se encuentran distribuidas a lo largo de sus tres exones y pueden afectar cualquiera de las tres regiones del gen *SHH*. Estudios genéticos han asociado a la HPE no sindrómica con el gen *SHH* habiéndose observado aproximadamente 40 mutaciones de sentido equivocado, una inserción, siete deleciones y nueve mutaciones sin sentido (Traiffort *et al*, 2004).

La vía de señalización de *SHH* controla la identidad y el destino neuronal de los diferentes tipos celulares encontrados en la porción ventral del tubo neural, por lo que la pérdida de la inducción ventral o el incremento en la inducción dorsal pueden causar HPE. El estudio de dos mutaciones sin sentido demostró una alteración en la actividad de segmentación ventral de *Shh* (Schell-Apacik *et al*, 2003).

La mayoría de las mutaciones de *Shh* identificadas en *Drosophila* son deleciones. Las mutaciones puntuales han sido agrupadas en dos clases: clase I, en el dominio N-terminal y clase II en el dominio C-terminal (Nüsslein-Volhard *et al*, 1985).

La mutación encontrada en un paciente del presente estudio está localizada en el exón 2, que codifica para la región de señalización de la proteína. Traiffort *et al* (2004) realizaron la caracterización funcional de 11 mutaciones de sentido equivocado y concluyeron que existen dos clases de mutaciones, las primeras afectan la estabilidad de la proteína precursora o la de SHH-N y la segunda clase afecta la reacción de autoprosamiento, alterando la unión o transferencia del colesterol. Posteriormente, Maity *et al* (2005) estudiaron el efecto funcional de siete mutaciones sin sentido y concluyeron que la mayoría de éstas ocasionan defectos en la producción de la señal en el extremo SHH-N, desestabilizando la proteína o alterando su procesamiento.

La mutación encontrada en nuestro estudio se presenta en un paciente con características faciales de HPE mientras que su hija presentó un fenotipo más severo de la enfermedad, lo que

muestra una expresión variable con mayor severidad en la descendencia. El estudio de Marini *et al* (2003) señala un caso familiar en donde la madre tenía un incisivo central y tres hijos con HPE alobar, el análisis mutacional demostró una mutación sin sentido en el codón 128 del exón 2, que presenta un cambio de TGG por TAG en la madre y en los tres hijos estudiados. Estos datos sugieren que mutaciones sin sentido de los residuos 127 y 128 de *SHH* se asocian a una importante variabilidad clínica intrafamiliar.

En la **Tabla 6** se muestran las mutaciones sin sentido descritas en la literatura en el gen *SHH* en pacientes con HPE.

TABLA 6
Mutaciones sin sentido en el gen *SHH* en pacientes con HPE

Mutación	Cambio de aminoácido	Exón	Tipo de HPE	Referencia
G384A	W127X	2	Expresión mínima	Estudio Actual
C72A	C24X	1	Alobar	Dubourg, 2004
C298T	Q100X	1	No definido	Roessler, 1996
A307T	K105X	2	No definido	Roessler, 1996
C475G	Y158X	2	Atípico	Odent, 1999
G383A	W128X	2	Alobar	Marini, 2003
G388T	E130X	2	Semilobar	Dubourg, 2004
C625T	Q209X	3	Semilobar	Nanni, 1999
G766T	E256X	3	Lobar	Nanni, 1999
G850T	E284X	3	No definido	Nanni, 1999

Las observaciones clínicas indican que la HPE es un trastorno multigénico más que una enfermedad monogénica y que la variabilidad en el fenotipo puede ser secundaria a la presencia de polimorfismos génicos, mutaciones no alélicas adicionales o influencias ambientales (Ming y

Muenke, 2002). Basándose en las mutaciones observadas en los pacientes con HPE, Roessler *et al* (1996) especularon respecto al posible efecto de las mutaciones. En primer lugar, la asociación con deleciones cromosómicas que incluyen a *SHH* es consistente con pérdida de función, por lo que se ha pensado que las mutaciones de *SHH* en humanos se presentan de forma heterocigota y que la haploinsuficiencia es suficiente para distorsionar la neurogénesis ventral.

El ratón con mutación homocigota en *Shh* presenta características de HPE y ciclopia y muere durante el desarrollo embrionario, mientras que el ratón heterocigoto es normal (Chiang *et al*, 1996). Esto puede reflejar que los humanos con mutación homocigota de *SHH* no sobreviven por lo que se ha postulado que en pacientes heterocigotos es necesaria la presencia de alguna otra alteración de tipo genético o ambiental para presentar HPE (Ming y Muenke, 2002).

El fenotipo de HPE es muy variable aún dentro de la misma familia y presenta un espectro continuo de manifestaciones severas con anomalías cerebrales y faciales hasta individuos clínicamente normales (Cohen, 1989). Dada la variabilidad familiar se ha sugerido que otros genes que intervienen en la misma vía de desarrollo, actúan como modificadores en la expresión clínica de HPE. Nanni *et al* (1999) reportaron que tres pacientes estudiados con mutaciones en *SHH* también presentaban mutaciones en otros genes, el primer paciente presentó mutaciones en *SHH* y en *TGIF*, el segundo mutación en *SHH* y deleción en el cromosoma 18p y el tercero mutación en *SHH* y *ZIC2*.

Recientemente, se ha descrito que varias enfermedades en el humano presentan herencia digénica la cual se define como la presencia simultánea de mutaciones en dos genes no ligados entre sí y presentes en el mismo individuo. La combinación de estas dos alteraciones ocasiona el fenotipo anormal, el cual no se observa al tener sólo una de las mutaciones (Kajiwara *et al*, 1994). Para ciertas enfermedades, la herencia digénica puede ser la causante de la enfermedad, mientras

que para otras, puede afectar la severidad de la misma (Mykytyn *et al*, 2003). Los modelos animales de HPE confirman esta hipótesis, ya que los ratones *Shh*^{-/-} presentan características de HPE o mueren durante el desarrollo embrionario (Chiang *et al*, 1996). Otros modelos de animales heterocigotos para mutaciones en genes de la vía de señalización *Shh* o *Tgfβ* muestran que únicamente los “mutantes dobles” tienen el fenotipo de HPE, lo que sugiere una herencia digénica en modelos de ratón (Song *et al*, 1999).

La hipótesis de los “múltiples hits” predice que para algunas condiciones, específicamente las que se originan durante las etapas tempranas de la embriogénesis, las alteraciones en los genes modificadores o las interacciones con el medio ambiente son necesarias para la expresión completa de la enfermedad (Ming y Muenke, 2002). Estos datos apoyan la idea de que se requiere la interacción de muchos factores para el desarrollo del cerebro anterior y que debe existir un balance entre los factores involucrados.

La posibilidad de que un gen modificador ligado al cromosoma X participe en esta patología había sido propuesta basándose en los reportes familiares previos con mutación en *SHH*, donde se observaba que las mutaciones eran heredadas por rama materna en 77.7% de los casos, y que la mayoría de los afectados eran varones (Roessler *et al*, 1996; Nanni *et al*, 1999; Odent *et al*, 1999, Marini *et al*, 2003).

Suthers *et al* (1999) describen un sesgo en la proporción de sexos en los padres que transmiten las mutaciones de *SHH*, con mayor número de madres que padres transmitiendo la mutación ($p=0.002$), ya que de 9 familias estudiadas con mutaciones en *SHH*, 14 de 16 padres que transmitieron la mutación fueron mujeres. Estos autores consideran la posibilidad de que los varones con la mutación tienen un mayor riesgo de malformaciones fuera del sistema nervioso central, lo que puede disminuir su capacidad reproductiva.

En este estudio se presenta una transmisión vertical de padre a hija, la cual mostró una mayor severidad de la enfermedad. Este es el segundo caso familiar con transmisión paterna, este paciente únicamente presenta anomalías faciales.

En base al análisis de las formas autosómico dominante de HPE, se ha estimado que de los portadores del gen anormal, 37% presentará HPE y 27% tendrá una microforma de la misma. Es interesante señalar que 36% de los portadores obligados no presenta anomalía clínica y tienen inteligencia normal (Cohen, 1989) por lo que no ha sido posible establecer una correlación genotipo- fenotipo en base al tipo y posición de la mutación en *SHH*.

En el estudio actual, no fue posible determinar si la hija del paciente con HPE presentaba alguna otra mutación que explicara la severidad del fenotipo. Debido a la variabilidad en la expresión clínica y a la heterogeneidad de la enfermedad se ha determinado que el riesgo de recurrencia es de 13% en los casos esporádicos (Odent, 1998). Para un portador obligado de la enfermedad el riesgo de HPE severa es de 16 a 21%, para un HPE lobar o microforma es de 13 a 14% y el riesgo total para algún efecto clínico es de 29 a 35% (Cohen, 1989).

La relación de *Shh* con otros genes implicados en HPE ha sido estudiada por diferentes autores. Kobayashi *et al* (2002) reportaron que en ratones, *Six3* se expresa también en el cerebro anterior por lo que puede modular el efecto de *Shh*. Nagai *et al* (1997) reportaron que en ratones *Zic2* se expresa principalmente en la porción dorsal del tubo neural y que esta proteína se une a las mismas secuencias blanco de *Shh*. *Tgif* codifica para un factor de transcripción que inhibe competitivamente la unión del receptor de ácido retinoico al promotor de respuesta del retinoide. Se sabe que las dosis altas de ácido retinoico disminuyen la expresión de *Shh* en el pollo por lo que la disminución de *Tgif* puede causar una disminución en la expresión de *Shh* (Helms *et al*, 1997).

Chen *et al* (2006) realizaron un estudio en ratones en donde demuestran que la holoprosencefalia puede ser causada por deficiencia de Cdc42 la cual es una GTPasa de la familia Rho la cual funciona en el establecimiento de la polaridad apical-basal del neuroepitelio en mamíferos, demostrando que otros genes independientes de *Shh* intervienen en esta patología.

En el estudio actual únicamente se demostró una mutación en el gen *SHH* en un caso familiar, el estudio mutacional en los casos esporádicos no es realizado como estudio de rutina, sin embargo el estudio del gen *SHH* en los casos familiares está indicado para poder otorgar un adecuado asesoramiento genético a la familia (Firth y Hurst, 2005).

El estudio de los genes *SHH*, *HPE6*, *PTCH1*, *SIX3*, *TGIF*, *TMEM* y *ZIC2* se encuentra disponible en diferentes laboratorios en el extranjero. La realización del estudio molecular en pacientes con cariotipo normal y sin exposición a teratógenos permite otorgar un adecuado asesoramiento genético y conocer la etiología de la enfermedad.

Asociación VATER- VACTER

La Asociación VATER-VACTER representa la ocurrencia de anomalías congénitas que afectan el desarrollo vertebral, anal, cardíaco, tráqueo-esofágico, renal y de las extremidades. Afecta aproximadamente 1 de cada 5000 nacidos vivos y se piensa que es de etiología multifactorial con una significativa influencia ambiental. El reporte inicial postula un defecto común en el mesodermo primitivo (Quan y Smith, 1973).

Los estudios realizados en pacientes con esta asociación incluyen tres o más de los seis defectos descritos, sin embargo, se sugiere que la presencia de únicamente dos defectos puede hacer sospechar el diagnóstico (Khuory *et al*, 1983).

Este estudio incluyó a 11 pacientes con tres o más defectos de esta entidad y demostró que 10 pacientes presentaban alteraciones vertebrales, 8 anomalías cardíacas, 6 renales, 6 radiales, 5 casos ano imperforado y 4 con fístula- tráqueoesofágica. En la **Tabla 7** se comparan los diferentes estudios realizados en una serie de casos con asociación VATER. En este estudio no fue posible establecer una relación entre las anomalías presentadas debido probablemente al pequeño número de pacientes estudiados.

TABLA 7

Frecuencia de defectos en pacientes con Asociación VATER

	Khoury, 1983	Weaver, 1986	Botto, 1997	Estudio Actual
No de casos	50	46	286	11
Vertebral	36%	58.7%	66.4%	90.9%
Ano imperforado	40%	56.5%	82.5%	45.4%
Cardíaco	80%	78.3%	47.6%	72.7%
Tráquea-esofago	24%	67.4%	58.7%	36.3%
Renal	82%	60.9%	80.8%	54.5%
Radial	68%	15.2%	35%	54.5%
Otro	20%	43.5%	50%	27.2%

Se ha propuesto la expansión del término VATER a VATERH/L lo cual incluye la presencia de hidrocefalia y alteraciones en las extremidades, sin embargo no se conoce la relación que puedan tener estos defectos agregados.

La mayoría de los casos con asociación VATER- VACTER se han presentado de forma esporádica con un bajo riesgo de recurrencia, aunque para VATERH se han reportado mutaciones en el gen BRCA2 con patrón de herencia autosómico recesiva (Alter *et al.*, 2007). Los pacientes del estudio actual no tenían antecedentes familiares de la enfermedad.

El único modelo animal publicado para VACTERL es en ratas embarazadas a las cuales se les inyectó adriamicina durante un período crítico del desarrollo. Este tratamiento causó varias anomalías observadas en esta asociación como son: FTE, atresia esofágica y malformaciones esqueléticas observadas en vértebras, costillas y huesos largos. La principal limitante de este modelo es la ausencia de un factor etiológico molecular para el estudio de la enfermedad (Arsic y Beasley, 2002).

El análisis fenotípico de los ratones con mutaciones en *Shh* y *Gli* demuestra que la vía de señalización de *Shh* está involucrada en el desarrollo de diferentes órganos y sistemas. En relación con la asociación VATER se ha postulado que SHH es secretado por la notocorda y las células de la placa basal, las cuales llevan a cabo la segmentación de las somitas que dan origen a la columna vertebral, músculo y piel.

Los ratones *Shh*^{-/-} y *Gli2*^{-/-}; *Gli3*^{-/-} presentan una disrupción severa de la columna vertebral (Mo *et al*, 1997). En la extremidad en desarrollo, *Shh* se expresa en la región posterior, denominada zona de actividad polarizante, que lleva a cabo la segmentación a lo largo del eje anteroposterior de la misma (Buscher y Ruther, 1998).

Además, *Shh* se expresa en el endodermo del intestino anterior y posterior y estudios mutacionales indican que diferentes elementos de la vía de *Shh* participan en el desarrollo del intestino (Kimmel *et al*, 2000; Ramalho- Santos *et al*, 2000).

Los ratones *Shh*^{-/-}; *Gli2*^{-/-} y *Gli3*^{-/-} presentan cloaca persistente y ano imperforado (Kimmel *et al*, 2000). Además, los ratones *Shh*^{-/-} presentan hipoplasia pulmonar severa y diferentes anomalías en la tráquea y esófago lo que indica que *Shh* es una señal esencial en el endodermo para el desarrollo de estos derivados (Litingtung, 1998). En casos menos severos, los ratones *Shh*^{-/-} desarrollan FTE (Motoyama *et al*, 1998). La función de *Shh* en el desarrollo del corazón y riñón está menos

definida. Meyers *et al* (1999) reportaron que este gen interviene en la especificación de la asimetría corporal derecho-izquierda del embrión.

En base al estudio en ratones, Kim *et al* (2001) sugirieron que la mayoría de los defectos observados en la Asociación VACTERL pueden ser explicados por alteraciones en la señalización de *SHH*. Los autores propusieron que debido a que el periodo de señalización es variable en los diferentes órganos, la alteración en esta vía durante la embriogénesis temprana puede causar la disrupción de una parte de los procesos dependientes de *SHH*. Finalmente, estos autores proponen que los ratones con mutaciones en *Shh* y *Gli* representan el mejor modelo para estudiar la patogénesis de la Asociación VATER.

Este es el primer estudio en donde se realiza el análisis molecular de la secuencia del gen *SHH* en pacientes con diagnóstico de asociación VATER/VACTER. En 10 pacientes con esta asociación no se observaron cambios en la secuencia del gen *SHH*, sin embargo, este dato no excluye la posibilidad de que alteraciones en otros genes de la vía de señalización de *SHH* causen la Asociación VATER- VACTER. Debido a la etiología heterogénea de esta enfermedad es necesario realizar el estudio en un mayor número de pacientes.

Existe la posibilidad de que mutaciones en *GLI2* o en otros genes de la vía de señalización de *SHH* causen asociación VATER- VACTER, por ejemplo, el síndrome de Pallister-Hall es una enfermedad autosómica dominante que presenta polidactilia central o postaxial, sindactilia, ano imperforado y otras anomalías faciales (Kang *et al*, 1997). En algunos pacientes se ha observado fístula tráqueo-esofágica y anomalías pulmonares (Ondrey *et al*, 2000). Este síndrome se ha asociado con mutaciones en *GLI3*, el cual es uno de los genes blanco de *SHH*.

Diferentes estudios han reportado otras etiologías en relación con esta enfermedad. Carter *et al* (2006) reportaron un caso con el antecedente de madre con exposición a antagonistas del

factor de necrosis tumoral y Thauvin y Robinet (2006) reportaron dos casos con deficiencia del complejo IV de la cadena respiratoria. Estos estudios apoyan la hipótesis de que la Asociación VATER es causada por diferentes factores genéticos y ambientales los cuales están actualmente siendo reconocidos.

El diagnóstico de asociación VATER es considerado como un diagnóstico de exclusión. Es importante realizar el diagnóstico diferencial con algunos síndromes monogénicos como Townes-Brocks, Feingold y Baller Gerold, los cuales pueden presentar algunas características clínicas similares. Varios casos han sido reportados con antecedente de diabetes materna (Jones, 2003).

El conocer la etiología de esta enfermedad permitirá clasificarla dentro de los síndromes genéticos y probablemente conocer los factores ambientales prevenibles de la misma.

En este estudio se realizó el análisis mutacional del gen *SHH* en pacientes con diferentes tipos de holoprosencefalia no sindrómica y en pacientes con 3 o más anomalías de la asociación VATER-VACTERL con cariotipo normal. La relación entre la HPE y las mutaciones en el gen *SHH* está bien definida en otras poblaciones, este estudio es el primero realizado en pacientes mexicanos con esta patología y el hallazgo de una mutación en un caso familiar confirma la indicación de realizar el estudio molecular en los casos familiares con HPE autosómico dominante ya que es el gen que con mayor frecuencia se encuentra mutado.

Estudios en animales con mutación en *Shh* han sugerido que este gen o alguno involucrado en la misma vía de señalización causan las anomalías observadas en los pacientes con asociación VATER- VACTERL cuya etiología aún no se conoce. El análisis mutacional del gen *SHH* en estos pacientes se realizó con el objetivo de encontrar una posible causa de la asociación. Los 10 casos analizados mostraron una secuencia normal de *SHH*. Es importante estudiar a un mayor número de

pacientes e incluir dentro de este estudio otros genes que participan dentro de la misma vía de señalización.

XI. CONCLUSIONES

- En este estudio realizado en 16 pacientes mexicanos con HPE se encontró una mutación en un caso familiar la cual no ha sido previamente reportada. El árbol genealógico sugiere un patrón de herencia de tipo autosómico dominante. El caso estudiado presenta expresión variable con mayor severidad en la descendencia. En estos casos se debe realizar el análisis mutacional en otros genes relacionados con HPE con la finalidad de poder explicar la variabilidad en el fenotipo.

- En este estudio se estudiaron 10 pacientes mexicanos con asociación VATER- VACTER y no se demostró la presencia de mutaciones en el gen *SHH*. Se propone ampliar el tamaño de la muestra analizada y realizar la búsqueda de mutaciones en otros genes involucrados en la vía de señalización de *SHH* en pacientes con Asociación VATER- VACTER ya que el modelo en ratones con mutaciones en diferentes genes de esta vía muestra los mismos defectos encontrados en esta asociación.

XII. REFERENCIAS

1.- Referencias Electrónicas:

- www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM
- www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank
- www.ensembl.org
- www.genetests.com

2.- Referencias de libros y artículos

- 1.- Aase J. Diagnostic Dysmorphology. Plenum Medical Book Company. 1992. p.11
- 2.- Alter B, Rosenberg P and Brody L. Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/ BRCA2. J Med Genet 44:1-9, 2007.
- 3.- Arsic D, Qi BQ and Beasley SW. Hedgehog in the human: a possible explanation for the VATER association. J Pediatr Child Care 38:117-121, 2002.
- 4.- Aruga J, Nagai T, Tokuyama T, Hayashizaki Y, Okazaki Y, Chapman VM, Mikoshiba K. The mouse *Zic* gene family; homologues of the Drosophila pair-rule gene *odd-paired*. J Biol Chem 271(2):1043-1047, 1996.
- 5.- Barr M, Hanson JW, Currey K, Charp S, Toriello H, Schmickel RD. Holoprosencephaly in infants of diabetic mothers. J Pediatr 102:565-568, 1983.
- 6.- Beasley SW, Diez Pardo J, Qi BQ, Tovar JA, Xia HM. The contribution of the adriamycin- induced rat model of the VATER association to our understanding of

- congenital abnormalities and their embryogenesis. *Pediatr Surg Int* 16:465-72, 2000.
- 7.- Bellaiche Y, The I, Perrimon N. Tout-velu is a Drosophila homologue of the putative tumor suppressor EXT-1 and is needed for Hh diffusion. *Nature* 394:85-88, 1998.
 - 8.- Belloni E, Muenke M, Rossler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW. Identification of sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:353-356, 1996.
 - 9.- Bendavid C, Dubourg C, Gicquel I, Pasquier L, Saugier-Veber P, Durou M, Jaillard S, Frébourg T, Haddad B, Henry C, Odent S, David V. Molecular evaluation of fetuses with holoprosencephaly show high incidence of microdeletions in the HPE genes. *Hum Genet* 119:1-8, 2006.
 - 10.- Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 270(52):31178-31188, 1995.
 - 11.- Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at any diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol* 172:1:126-138, 1995.
 - 12.- Botto L, Khoury M, Mastroiacovo P, Castilla E, Moore C, Skjaerven R, Mutchinik O, Borman B, Cocchi G, Czeizel A, Martínez Frías ML, Sumiyoshi Y. The spectrum of congenital anomalies of the VATER Association. *Am J Med Genet* 71:8-15, 1997.

- 13.- Brown LY, Odent S, David V, Blayau M, Dubourg C, Apacik C, Delgado M, Hall BD, Reynolds JF, Sommer A, Wieczorek D, Brown SA, Muenke M. Holoprosencephaly due to mutations in *ZIC2*: Further definition of the spectrum of mutations and phenotypes: recurrence of an alanine tract expansion mutation. *Hum Mol Genet* 10:791-796, 2001.
- 14.- Bullen PJ, Rankin JM y Robson SC. Investigation of epidemiology and prenatal diagnosis in the North of England. *Am J Obstet Gynecol* 184(6):1256-1262, 2001.
- 15.- Burke R, Mellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol- modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99:803-815, 1999.
- 16.- Buscher D and Ruther U. Expression profile of *Gli* family members and *Shh* in normal and mutant mouse limb development. *Dev Dyn* 211:88-96, 1998.
- 17.- Carter JD, Valeriano J, Vasey FB. Tumor necrosis factor-alpha inhibition and VATER association: a causal relationship. *J Rheumatol* 33(5):1014-7, 2006.
- 18.- Chen Y, Sruhl G. Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 87:553-563, 1996.
- 19.- Chen L, Liao G, Yang L, Campbell K, Nakafuku M, Kuan C, Zheng Y. Cdc42 deficiency causes Sonic hedgehog- independent holoprosencephaly. *PNAS* 103:16520-16525, 2006.
- 20.- Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383:407-413, 1996.

- 21.- Christ B, Huang R, Wilting J. The development of the avian vertebral column. *Anat Embryol* 202:179-194, 2000.
- 22.- Cho FN, Kan YY, Chen SN, Lee TC, Hsu TJ and Hsu PH. Prenatal diagnosis of cyclopia and proboscis in a fetus with normal chromosomes at 13 weeks of gestation by three dimensional transabdominal ultrasonography. *Pren Diagn* 25: 1059- 1072, 2005.
- 23.- Chuang PT, Kawcak T, McMahon AP. Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog- binding protein. *Hip 1*, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev* 17(3):342-7, 2003
- 24.- Cohen MM Jr: Perspectives on holoprosencephaly, Part I. Epidemiology, genetics and syndromology. *Teratology* 40:211, 1989.
- 25.- Cohen MM Jr. Nevroid basal cell carcinoma syndrome: Molecular biology and new hypotheses. *Int J Oral Maxillofac Surg* 28:216- 223, 1999.
- 26.- Cohen MM Jr. Problems in the definition of Holoprosencephaly. *Am J Med Genet Ed Com* 30(8):183- 187, 2001.
- 27.- Cohen MM Jr, Shiota K. Teratogenesis of holoprosencephaly. *Am J Med Genet* 109:1-15, 2002.
- 28.- Cohen M Jr. The Hedgehog signaling network. *Am J Med Genet* 123A:5-28, 2003.
- 29.- Comoul X and Deng CX. Roles of FGF receptors in mammalian development and congenital diseases. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today*. 69:286- 304, 2003.

- 30.- Cordero D, Marcucio R, Hu D, Gaffield W, Tapadia M and Helms J. Temporal perturbations in sonic hedgehog signaling elicit the spectrum of holoprosencephaly phenotypes. *J Clin Invest* 114(4):485- 494, 2004.
- 31.- Croen LA, Shaw GM, Lammer EJ: Holoprosencephaly: Epidemiologic and clinical characteristics of a California population. *Am J Med Genet* 64:465, 1996.
- 32.- De la Cruz JM, Bamford RN, Burdine RD, Roessler E, Barkovich AJ, Donnai D, Schier AF, Muenke M. A loss-of- function in the CFC domain of TDGF1 is associated with human forebrain defects. *Hum Genet* 110:422-428, 2002.
- 33.- DeMyer W, Zeman W, Palmer CG: The face predicts the brain: Diagnostic significance of median facial anomalies for holoprosencephaly (arhinencephaly). *Pediatrics* 34: 256, 1963.
- 34.- Dubourg C, Lazaro L, Pasquier L, Bendavid C, Blayau M, Le Duff F, Durou M, Odent S, David V. Molecular screening of *SHH*, *ZIC2*, *SIX3*, and *TGIF* genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: mutation review and genotype- phenotype observations. *Hum Mutat* 24:43-51, 2004.
- 35.- Dudley AT, Tabin CJ. Constructive antagonism in limb development. *Curr Opin Genet Dev* 10:387- 392, 2000.
- 36.- Echelard Y, Epstein D, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon J, McMahon A. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75:1417-1430, 1993.
- 37.- Esmer C, Sánchez S, Ramos S, Molina B, Frías S, Carnevale A. DEB test for Fanconi anemia detection in patients with atypical phenotypes. *Am J Med Genet* 124A: 35-9, 2004.

- 38.- Firth H, Hurst J. Oxford Desk Reference. Clinical Genetics. 2005.Oxford University Press.
- 39.- Gallardo ME, López Ríos J, Fernaud- Espinosa I, Granadino B, Sanz R, Ramos C, Ayuso C, Séller MJ, Brunner HG, Bonolenta P, Rodríguez S. Genetic cloning and characterization of the human homeobox gene *SIX6* reveals a cluster of six genes in chromosome 14 and associates *SIX6* hemizyosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics* 61:82-91, 1999.
- 40.- Golden JA: Holoprosencephaly: A defect in brain patterning. *J Neuropath Exp Neurol* 57:1991, 1998.
- 41.- Gripp KW, Wotton D, Edwards MC, Roessler E, Ades L, Meinecke P, Richieri-Costa A, Zackai EH, Massague J, Muenke M, Elledge SJ. Mutations in *TGIF* cause holoprosencephaly and link *NODAL* signaling to human neural axis determination. *Nat Genet* 2:205-208, 2000.
- 42.- Haas D, Morgenthaler J, Lacbawan F, Long B, Runz H, Garbade SF, Zschocke J, Kelley RI, Okun JG, Hoffmann GF, Muenke M. Abnormal sterol metabolism in HPE studies in cultured lymphoblasts. *J Med Genet* 44(5):298-305, 2007.
- 43.-Helms JA, Kim CH, Hu D, Minkoff R, Thaller C y Eichele G. Sonic hedgehog participates in craniofacial morphogenesis and is down-regulated by teratogenic doses of retinoic acid. *Dev Biol* 187:25-35, 1997.
- 44.- Ho KS and Scott MP. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 12:57-63, 2002.

- 45.- Incardona JP, Gaffield W, Kapur RP, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125:3553-3562, 1998.
- 46.- Ingham PW y McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 15:3059- 3087, 2001.
- 47.- Jellinger K, Gross H, Kaltenback E. Holoprosencephaly and agenesis of the corpus callosum: frequency of associated malformations. *Acta Neuropathol* 55:1, 1981.
- 48.- Jones. Smith's Recognizable patterns of human malformation. Elsevier, Saunders, 2006. 6th edition.
- 49.- Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* 264:1604-1608, 1994.
- 50.- Kang S, Graham MJ, Olney AH, Biesecker LG. GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister- Hall syndrome. *Nat Genet* 15:266-268, 1997.
- 51.- Kelley RL, Roessler E, Hennekam RC, Feldman GL, Kosaki K, Jones MC, Palumbos JC, Muenke M. Holoprosencephaly in RSH/Smith- Lemli- Opitz syndrome: does abnormal cholesterol metabolism affect the function of Sonic Hedgehog? *Am J Med Genet* 66:478- 484, 1996.
- 52.- Khoury M, Cordero J, Greenberg F, James L, Erickson D. A population study of the VACTERL Association: Evidence for its etiologic heterogeneity. *Pediatrics* 71:5, 1983.
- 53.- Kim PCW, Mo R, Hui CC. Murine models of VACTERL syndrome : role of Sonic Hedgehog signaling pathway. *J Pediatr Surg* 36:381- 384, 2001.

- 54.- Kimmel SG, Mo R, Hui CC, Kim PC. New mouse models of congenital anorectal malformations. *J Pediatr Surg* 35:227-230, 2000.
- 55.- Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B. Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science* 236:70-73, 1987.
- 56.- Kobayashi D, Kobayashi M, Matsumoto K, Ogura T, Nakafuku M, Shimamura K. Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129:83-93, 2002.
- 57.- Kousseff BG. Gestational diabetes mellitus (class A): a human teratogen *Am J Med Genet* 83:402-408, 1999.
- 58.- Kraus P, Fraidenraich D, Loomis CA. Some distal limb structures develop in mice lacking Sonic hedgehog signaling. *Mech Dev* 100:45-58, 2001.
- 59.- Kühl M, Sheldahl LC, Park M, Miller JR, Moon RT. The Wnt Ca pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* 16:279-283, 2000.
- 60.- Kurtz AB, Wapner RJ, Rubin CS, Cole-Beuglet C, Ross RD, Goldberg BB. Ultrasound criteria for in utero diagnosis of microcephaly. *J Clin Ultrasound* 8:11-15, 1980.
- 61.- Lammer EJ, Chen DT, Hoar KN, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW, Lott IT, Richard JM, Sun SL. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* 313:837-841, 1985.
- 62.- Landing BH: Syndromes of congenital heart disease with tracheobronchial anomalies. *AJR* 123:579, 1975.

- 63.- Lazaro L, Dubourg C, Pasquier L, Le Duff F, Blayau M, Durou MR, Thomas A. Phenotypic and Molecular variability of the holoprosencephaly spectrum. *Am J Med Genet* 129A:21-27, 2004.
- 64.- Lee J, Platt K, Censullo P and Altaba A. *Gli* is a target of sonic hedgehog that induces ventral neural tube development. *Development* 124:2537-2552, 1997.
- 65.- Li YX, Yang HT, Zdanowicz M, Sicklick JK, Qi Y, Camp TJ, Diehl AM. Fetal alcohol exposure impairs hedgehog cholesterol modification and signaling. *Lab Invest* 87:231-240, 2007.
- 66.- Litingtung Y, Lei L, Westphal H, Chiang C. Sonic hedgehog is essential to foregut development. *Nat Genet* 20:58-61, 1998.
- 67.- Maity T, Fuse N and Beachy P. Molecular mechanisms of Sonic hedgehog mutant effects in holoprosencephaly. *PNAS* 102(47):17026-17031, 2005.
- 68.- Mandhan P, Bao Q, Beasley S, Sullivan M. Sonic Hedgehog, BMP4, and Hox genes in the development of anorectal malformations in Ethylenethiourea- exposed fetal rats. *J Pediatr Surg* 41:2041-2045, 2006.
- 69.- Marigo V, Roberts DJ, Lee SMK, Tsukurov O, Levi T, Gastier JM, Epstein DJ, Gilbert DJ, Copeland NG, Seidman CE, Jenkins NA, Seidman JG, McMahon AP, Tabin C. Cloning, expression, and chromosomal location of *SHH* and *IHH*: two human homologs of the *Drosophila* segment polarity gene hedgehog. *Genomics* 28:44-51, 1995.
- 70.- Marini M, Cusano R, De Biasio P, Caroli F, Lerone M, Silengo M, Ravazzollo R, Seri M, Camera G. Previously undescribed nonsense mutation in *SHH* caused autosomal dominant holoprosencephaly with wide intrafamilial variability. *Am J Med Genet* 117A:112-115, 2003.

- 71.- Marklund, M et al. Retinoic acid signaling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* 131:4323-4332, 2004.
- 72.- Marti E., Bumcrot DA, Takada R and McMahon AP. Requirement of the 19K form of sonic hedgehog for induction of distinct ventral cell types in CNS explants. *Nature* 375:322-325, 1995.
- 73.- Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* 4:172-178, 1994.
- 74.- Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev* 19:2783-2810, 2005.
- 75.- Matsunaga E, Shiota K: Holoprosencephaly in human embryos: epidemiologic studies of 150 cases. *Teratology* 16:261, 1977.
- 76.- McCarthy RA, Barthy JL, Chintalapudi MR, Knaak C, Argraves WS. Megalin functions as an endocytic Sonic Hedgehog receptor. *J Biol Chem* 277:25660-25667, 2002.
- 77.- Meyers EN, Martin GR. Differences in the left- right axis pathways in mouse and chick: functions of *Fgf8* and *Shh*. *Science* 285:403-406, 1999.
- 78.- Ming JE, Roessler E, Muenke M: Human developmental disorders and the sonic hedgehog pathway. *Mol Med Today* 4:343, 1998.
- 79.- Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, Stratton RF, Sujansky E, Bale SJ, Muenke M. Mutations in patched-1, the receptor for sonic hedgehog, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet* 110:297-301, 2002.
- 80.- Ming JE and Muenke M. Multiple hits during early embryonic development: digenic diseases and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 71:1017-1032, 2002.

- 81.- Miyake, A et al. *Fgf19* regulated by Hh signaling is required for zebrafish forebrain development. *Dev Biol* 288:259-275, 2005.
- 82.- Mo R, Freer AM, Zinyk DL. Specific and redundant functions of *Gli2* and *Gli3* zinc finger genes in skeletal patterning and development. *Development* 124:113-123, 1997.
- 83.- Motoyama J, Lui J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC. Essential function of *Gli2* and *Gli3* in the formation of lung, trachea and oesophagus. *Nat Genet* 20:54-57, 1998.
- 84.- Muenke M, Gurrieri F, Bay C, Yi DH, Collins AL, Johnson VP, Hennekam RCM. Linkage of human malformation, familial holoprosencephaly, to chromosome 7 and evidence for genetic heterogeneity. *Proc Nat Acad Sci USA* 91:8101, 1994.
- 85.- Mykytyn K, Nishimura DY, Searby CC, Beck G, Bugge K et al. Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl syndrome locus (BBS1). *Am J Hum Genet* 72:429, 2003.
- 86.- Nagai T, Aruga J, Takada S, Gunther T, Sporle R, Schughart K, Mikoshiba K. The expression of the mouse *Zic1*, *Zic2* and *Zic3* suggests an essential role for *Zic* genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182:299-313, 1997.
- 87.- Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, DieSmulders C, Giannotti A, Roessler E, Muenke M. The mutational spectrum of the Sonic hedgehog gene in holoprosencephaly: *SHH* mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:2479-2488, 1999.
- 88.- Nasrallah I, Golden JA. Brain, eye, and face defects as a result of ectopic localization of sonic hedgehog protein in the developing rostral neural tube. *Teratology* 64:107-113, 2001.

- 89.- Norman MG, McGillivray B, Kalousek DK, Hill A, Poskitt J, Norman MG. Holoprosencephaly: Defects of the mediobasal prosencephalon. In *Congenital Malformations of the Brain: Pathological, Embryological, Clinical, Radiological Aspects*. New York, Oxford University Press, 1995, p187.
- 90.- Nowaczyk MJ, Farrell SA, Sirkin WL, Velsher L, Krakowiak PA, Wayne JS, Porter FD. Smith-Lemli-Opitz (RHS) syndrome: Holoprosencephaly and homozygous IVS8-1G-C genotype. *Am J Med Genet* 103:75-80, 2001.
- 91.- Nüsslein- Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801, 1980.
- 92. Nüsslein- Volhard C, Kluding H, Jürgens C. Genes affecting the segmental subdivision of the *Drosophila* embryo. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50: 145-154, 1985.
- 93.- Nybakken K and Perrimon N. Hedgehog signal transduction: recent findings. *Curr Opin Genet Dev* 12:503-511, 2002.
- 94.- Odent S, Le Marec B, Munnich A, Le Merrer M, Bonaiti- Pellie C. Segregation analysis in nonsyndromic holoprosencephaly. *Am J Hum Genet* 77: 139-143, 1998.
- 95.- Odent S, Attié-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Augé J, Delezoide AL, Le Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V and Vekemans M. Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:9, 1999.
- 96.- Olsen CL, Hughes JP, Youngblood LG, Sharpe- Stimac M: The epidemiology of holoprosencephaly and phenotypic characteristics of affected children: New York State, 1984- 1989. *Am J Med Genet* 73:217-226, 1997.

- 97.- Ondrey F, Griffith A, Van Waes C. Asymptomatic laryngeal malformations are common in patients with Pallister-Hall syndrome. *Am J Med Genet* 94:64-67, 2000.
- 98.- Orford J, Manglick P, Cass DT, Tau PP. Mechanisms for the development of esophageal atresia. *J Pediatr Surg* 36(7):985-994, 2001.
- 99.- Ouspenskaia MV, Karkera JD, Roessler E, Shen MM, Goldmunts E, Bowers P, Towbin J, Belmont J, Muenke M. Role of FAST1 gene in the development of holoprosencephaly (HPE) and congenital cardiac malformations in humans. American Society of Human Genetics 52nd Annual Meeting, Baltimore, Maryland, October 15-19, 2002. 313 p, Abstract No.822.
- 100.- Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui C, Nakashima M, Joyner AL. Mouse *Gli 1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development* 127:1593- 1605, 2000.
- 101.- Pepicelli CV, Lewis PM, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung. *Curr Biol* 8:1083-1086, 1998.
- 102.- Plawner LL, Delgado MR, Miller VS. Neuroanatomy of holoprosencephaly as a predictor of function. *Beyond the face predicting the brain. Neurology* 59:1058, 2002.
- 103.- Qi BQ, Diez Pardo JA, Navaro C. Narrowing the embryologic window of the adriamycin- induced rat model of esophageal atresia and tracheoesophageal fistula. *Pediatr Surg Int* 11: 444-447, 1996.
- 104.- Quan L, Smith DW: The VATER association: Vertebral defects, anal atresia, T-E fistula with esophageal atresia, radial and renal dysplasia: A spectrum of associated defects. *J Pediatr* 82:104, 1973.

- 105.- Rahimov F, Ribeino LA, De Miranda E, Richieri- Costa A, Murrey JC. *GLI2* mutations in four brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 140 (23): 2571-76, 2006.
- 106.- Ramalho- Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development* 127:2763-2772, 2000.
- 107.- RCOG. Report of the RCOG working party on routine ultrasound examination in pregnancy. Royal College of Obstetricians and Gynecologists 1984 London.
- 108.- Rittler M, Paz JE, Castilla EE. VACTERL association, epidemiologic definition and delineation. *Am J Med Genet* 63:529-536, 1996.
- 109.- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC. Mutations in the human sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:357, 1996.
- 110.- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Vargas F, Scherer SW, Tsui LC and Muenke M. Mutations in the C-terminal domain of sonic hedgehog cause holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 6:1847-1853, 1997.
- 111.- Roessler E, Muenke M: Holoprosencephaly: A paradigm for the complex genetics of brain development. *J Inherit Metab Dis* 21:481, 1998.
- 112.- Roessler E. and Muenke M. Midline and laterality defects: left and right meet in the middle. *Bioessays* 23:888-900, 2001.
- 113.- Roessler E, Du Y, Mullos JL, Casas E, Allen WP, Ellis I, Gillessen- Kaesbach G, Roeder E, Ming JE, Ruiz A. Loss-of-function mutations in the human *GLI2* gene cause holoprosencephaly and familial panhypopituitarism. *American Society of*

Human Genetics 52nd Annual Meeting, Baltimore, Maryland, October 15-19, 2002.
190 p, Abstract No.132.

- 114.- Rohr, KB. The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron* 29:341-351, 2001.
- 115.- Ronen GM, Andrews WL. Holoprosencephaly as a possible embryonic alcohol effect. *Am J Med Genet* 40:151-54, 1991.
- 116.- Rosa FW, Wilk AC, Kelsey FO. 1986. Vitamin A congeners. In: Sever JL, Brent KL, editors. *Teratogen update: environmentally induced birth defect risks*. New York: Alan R. Liss, Inc. p 61–70.
- 117.- Ruiz I, Sanchez P and Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumors, embryos and stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 2;361-372, 2002.
- 118.- Schell- Apacik C, Rivero M, Knepper J, Roessler E, Muenke M and Ming J. Sonic Hedgehog mutations causing human holoprosencephaly impair neural patterning activity. *Hum Genet* 113:170-177, 2003.
- 119.- Schier AF. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev* 11:393-404, 2001.
- 120.- Schimmenti LA, de la Cruz J, Lewis RA. Novel mutation in sonic hedgehog in non- syndromic colobomatous microphthalmia. *Am J Med Genet* 116A :215-221, 2003.
- 121.- Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D (ed): Holoprosencephaly, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York, McGraw- Hill, 2001, p 6215.

- 122.- Shaw-Smith C. Oesophageal atresia, trachea-oesophageal fistula, and the VACTERL association: review of genetics and epidemiology. *J Med Genet* 43:545-554, 2006.
- 123.- Song J, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, Gridley T, Li E. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213:157-169, 1999.
- 124.- Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumor-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature* 384:129-134, 1996.
- 125.- Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger-transcription factor Gli. *J Cell Sci* 112:4437-4448, 1999.
- 126.- Sulik KK, Johnston MC. Embryonic origin of holoprosencephaly: interrelationship of the developing brain and face. *Scan Electron Microsc* 309-322, 1982.
- 127.- Graeme Suthers, Scott Smith and Sue Springbett. Skewed sex ratios in familial holoprosencephaly and in people with isolated single maxillary central incisor. *J Med Genet* 36:924-926, 1999.
- 128.- Thauvin-Robinet C, Faivre L, Huet F, Jourenau P, Glorion C, Rustin P, Rotig A, Munich A, Cormier-Daire V. Another observation with VATER association and a complex IV respiratory chain deficiency. *Eur J Med Genet* 49(1):71-77, 2006.

- 129.- Thompson DJ, Molello JA, Strebing RJ, Dyke IL. Teratogenicity of adriamycin and daunomycin in the rat and rabbit. *Teratology* 17:151-7, 1978.
- 130.- Traiffort E, Dubourg C, Faure H, Rognan D, Odent S, Durou MR, David V, Ruat M. Functional characterization of sonic hedgehog mutations associated with holoprosencephaly. *J Bio Chem* 279(41):42889-42897, 2004.
- 131.- Villavicencio E, Walterhouse D, Iannaccone P. The Sonic hedgehog- patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 67: 1047-1054, 2000.
- 132.- Wallis DE, Muenke M. Molecular mechanisms of holoprosencephaly. *Mol Genet Metab* 68:126- 138, 1999.
- 133.- Wallis DE, Muenke M. Mutations in holoprosencephaly. *Hum Mut* 16:99-108, 2000.
- 134.- Witsch- Baumgartner M, Loffler J, Utermann G. Mutations in the human DHCR7 gene. *Hum Mutat* 17:172- 182, 2001.