

**ESTUDIO MOLECULAR DE PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR  
ENANISMO ESENCIAL**

**JULIE VIVIANA NAVARRETE VARGAS**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA**

**BOGOTÁ, D.C.**

**ABRIL DE 2017**

**ESTUDIO MOLECULAR DE PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR  
ENANISMO ESENCIAL**

**JULIE VIVIANA NAVARRETE VARGAS**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**MAGISTER EN GENÉTICA HUMANA**

**DIRECTOR**

**PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD**

**CO-DIRECTOR**

**HEIDI ELIANA MATEUS ARBELAEZ MD, MSc**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE NUESTRA SEÑORA DEL ROSARIO**

**ESCUELA DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**MAESTRÍA EN GENÉTICA HUMANA**

**BOGOTÁ, D.C.**

**ABRIL DE 2017**

## **NOTA DE SALVEDAD DE RESPONSABILIDAD INSTITUCIONAL**

**“La Universidad del Rosario no se hace responsable por los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

**ESTUDIO MOLECULAR DE PACIENTES COLOMBIANOS AFECTADOS POR  
ENANISMO ESENCIAL**

**JULIE NAVARRETE VARGAS**

**APROBADO**

---

**PAUL LAISSUE MD, MSc, PhD**

**DIRECTOR**

---

**JURADO**

---

**JURADO**

## TABLA DE CONTENIDO

1. MARCO TEORICO.....	1
1.1. Introducción a la fisiología del crecimiento en la especie humana .....	1
1.1.1 Embriología y etapas del crecimiento en la especie humana .....	1
1.1.2 Factores que intervienen en el crecimiento .....	9
1.1.3 Factores genéticos.....	12
1.2. Alteraciones en el crecimiento.....	16
1.2.1 Talla baja proporcionada de inicio prenatal.....	18
1.2.1.1. Síndrome de Cornelia de Lange.....	19
1.2.1.2. Síndrome de Russell-Silver .....	20
1.2.1.3. Síndrome de Dubowitz.....	21
1.2.1.4. Síndrome de Smith–Lemli–Opitz.....	22
1.2.1.5. Síndrome de Robinow .....	23
1.2.1.6. Síndrome de Coffin-Siris.....	24
1.2.1.7. Síndrome de Turner .....	25
1.2.2 Talla baja proporcionada de inicio posnatal .....	26
1.2.2.1 Síndrome de Rubinstein-Taybi .....	28
1.2.2.2 Síndrome de Noonan .....	29
1.2.3 Talla baja desproporcionada .....	30
1.2.3.1 Acondroplasia.....	31
1.2.3.2 Hipocondroplasia .....	32
1.2.3.3 Displasia tanatofórica.....	33
1.2.3.4 Acondrogénesis tipo 1B.....	34
1.2.3.5 Acondrogénesis tipo 1A .....	35
1.2.3.6 Acondrogénesis tipo 2.....	35
1.2.3.7 Osteogénesis imperfecta.....	36
1.2.3.8 Displasia diastrófica.....	39
1.2.3.9 Displasia torácica asfixiante (síndrome de Jeune) .....	40
1.2.3.10 Raquitismo.....	41
1.2.4 Talla alta patológica .....	43
1.2.5 Talla baja esencial .....	44

1.2.5.1	Mecanismos y vías de la falla del crecimiento en el enanismo esencial.....	45
1.2.5.1.1	Determinantes del tamaño de un organismo .....	45
1.2.5.1.2	Principales vías de señalización reguladoras del crecimiento .....	48
1.2.5.2	Genes y mutaciones asociadas a la etiología del enanismo esencial.....	50
1.2.5.2.1	<i>ATR</i> .....	50
1.2.5.2.2	<i>NIN</i> .....	51
1.2.5.2.3	<i>ATRIP</i> .....	52
1.2.5.2.4	<i>RBBP8</i> .....	52
1.2.5.2.5	<i>CEP152</i> .....	53
1.2.5.2.6	<i>CENPJ</i> .....	54
1.2.5.2.7	<i>CEP63</i> .....	55
1.2.5.2.8	<i>PHC1</i> .....	56
1.2.5.2.9	<i>RNU4ATAC</i> .....	57
1.2.5.2.10	<i>ORC1</i> .....	58
1.2.5.2.11	<i>ORC4</i> .....	59
1.2.5.2.12	<i>ORC6</i> .....	59
1.2.5.2.13	<i>CDT1</i> .....	60
1.2.5.2.14	<i>CDC6</i> .....	60
1.2.5.2.15	<i>PCNT</i> .....	61
1.2.5.3	Proteína PCNT .....	62
1.2.5.3.1	Características estructurales .....	62
1.2.5.3.2	Función biológica de PCNT.....	65
1.2.5.4	PCNT en el ciclo celular .....	66
1.2.5.5	Mutaciones en el gen <i>PCNT</i> .....	68
1.2.5.6	<i>ASPM</i> .....	71
1.2.5.7	<i>DDX11</i> .....	72
1.2.5.7.1	Proteína DDX11 .....	72
1.2.5.7.1.1	Características estructurales .....	72
1.2.5.7.1.2	Función biológica de DDX11.....	73
1.2.5.7.1.3	Mutaciones en el gen <i>DDX11</i> .....	74
1.2.6	Síndromes de enanismo esencial .....	74
1.2.6.1	Síndrome de Seckel .....	77
1.2.6.2	Enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo II (MOPD II).....	82

1.2.6.3	Enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo I/III (MOPD I/III).....	92
1.2.6.4	Síndrome de Meier-Gorlin .....	97
1.2.7	Microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH).....	100
1.2.7.1	Síndrome de rupturas Nijmegen.....	103
1.2.7.2	Síndrome de inmunodeficiencia combinada severa con microcefalia y talla baja 104	
1.2.7.3	Síndrome de Cockayne.....	105
1.2.7.4	Síndrome de <i>Warsaw Breakage</i> .....	107
1.2.7.5	Síndrome de aneuploidía variegada en mosaico (MVA).....	108
1.3	Técnicas de secuenciación .....	109
1.3.1	Secuenciación de Sanger.....	109
1.3.2	Secuenciación de siguiente generación (Next generation sequencing – NGS).....	110
1.3.2.1	Técnica de adición de nucleótido único ( <i>Single nucleotide addition</i> – SNA) o pirosecuenciación (Roche/454 FLX Pyrosequencer).....	112
1.3.2.2	<i>Applied Biosystems SOLiD™ Sequencer</i> .....	113
1.3.2.3	Secuenciación en tiempo real (real time sequencing) de Pacific Biosciences ....	114
1.3.2.4	Ion proton Sequencer.....	115
1.3.2.5	Illumina Genome Analyzer .....	116
2.	PREGUNTA CIENTÍFICA.....	117
3.	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	117
3.1.	Objetivo general.....	117
3.2.	Objetivos específicos.....	117
4.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	118
4.1.	Pacientes incluidos en el estudio .....	118
4.1.1	Caracterización clínica de los pacientes de la población de estudio .....	118
4.2.	Amplificación por PCR del gen PCNT.....	140
4.3.	Secuenciación y análisis bioinformático.....	141
4.4.	Secuenciación de exoma por técnica NGS .....	142
4.5.	Amplificación por PCR del exón 7 y el intrón 7 del gen DDX11.....	145
4.6.	Secuenciación y análisis bioinformático.....	146
5.	RESULTADOS .....	147
5.1.	Secuenciación del gen <i>PCNT</i> .....	147
5.2.	Análisis bioinformático de las variantes.....	151
5.3.	Resultados de la secuenciación de exoma.....	152

5.4.	Amplificación y secuenciación del exón 7 y el intrón 7 del gen DDX11 .....	154
5.5.	Análisis bioinformático de las variantes encontradas.....	155
6.	DISCUSIÓN.....	156
7.	PERSPECTIVAS .....	160
8.	BIBLIOGRAFÍA .....	162
9.	ANEXOS .....	224
9.1.	Anexo 1. <i>Primers</i> de amplificación del gen <i>PCNT</i> .....	224
9.2.	Anexo 2. Programas de PCR para la amplificación de todos los exones del gen <i>PCNT</i> ...	228
9.3.	Anexo 3. <i>Primers</i> de secuenciación del gen <i>PCNT</i> .....	232
9.4.	Anexo 4 – Tabla de resumen de los genes evaluados según revisión bibliográfica y paneles descritos para microcefalia y síndromes asociados con enanismo esencial .....	235

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Desarrollo del disco embrionario bilaminar

**Figura 2.** Plegamiento embrionario

**Figura 3.** Clasificación de la talla baja

**Figura 4.** Vía quinasa Hippo serina/treonina

**Figura 5.** Dominios de la proteína PCNT

**Figura 6.** Modelo de la función de la pericentrina en el arresto del punto de chequeo G2/M dependiente de ATR

**Figura 7-** Representación esquemática de los motivos helicasa y Fe-S de la proteína DDX11

**Figura 8.** Árbol genealógico de los pacientes PCNT1 y PCNT2

**Figura 9.** Árbol genealógico del paciente PCNT3

**Figura 10.** Principales características dismórficas del paciente PCNT3

**Figura 11.** Árbol genealógico de la paciente PCNT4

**Figura 12.** Árbol genealógico de la paciente PCNT5

**Figura 13.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6

**Figura 14.** Características dismórficas faciales de la paciente denominada PCNT6

**Figura 15.** Otras características dismórficas de la paciente PCNT6

**Figura 16.** Principales características radiológicas en extremidades inferiores de la paciente PCNT7

**Figura 17.** Principales características radiológicas pélvicas de la paciente PCNT7

**Figura 18.** Principales características radiológicas de la columna vertebral, las clavículas y las escápulas de la paciente PCNT7

**Figura 19.** Árbol genealógico de la paciente PCNT7

**Figura 20.** Principales características dismórficas faciales de la paciente PCNT7

**Figura 21.** Diagrama de flujo de los algoritmos utilizados en el análisis de los resultados del exoma

**Figura 22 –** Cromatogramas representativos de las variantes codificantes encontradas en el gen *PCNT*

**Figura 23.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6 con las variantes encontradas en el gen *PCNT* y segregación familiar de la variante c. 1468C>T

**Figura 24.** Alineamiento múltiple de secuencias entre especies de mamíferos para la región *PCNT* Gln<sup>490</sup>

**Figura 25.** Alineamiento múltiple de secuencias entre especies de mamíferos para la región *PCNT* T<sup>539</sup>

**Figura 26.** Diagrama de flujo de la cantidad de variantes encontradas en cada uno de los filtros utilizados en la lectura de la secuenciación de exoma para la paciente PCNT6 (ver igualmente la sección de materiales y métodos)

**Figura 27.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6 con las variantes encontradas en el gen *DDX11*

**Figura 28.** Posibles hipótesis de *splicing* alternativo para la mutación *DDX11* c.792+1G>A

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Principales genes asociados con enanismo esencial microcefálico

**Tabla 2.** Caracterización clínica de los pacientes que participaron en el estudio

**Tabla 3 –** *Primers* de amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11*

**Tabla 4 -** Programa de PCR para la amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11*

**Tabla 5.** Caracterización genotípica de la población de estudio

**Tabla 6 –** Variante en estado homocigoto en los 144 genes analizados por su asociación con microcefalia, enanismo esencial y función en el ciclo celular

**Tabla 7.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 32, 34, 35, 41, 43, 44, 45 y 46

**Tabla 8.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 6, 18, 29, 31, 33, 40, 42 y 47

**Tabla 9.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 2, 15, 28, 30, 36, 37, 38

**Tabla 10.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 14 y 22

**Tabla 11.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 1 y 8

**Tabla 12.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 7 y 39

**Tabla 13.** Programa de PCR para la amplificación del exón 3

**Tabla 14.** Programa de PCR para la amplificación

# **1. MARCO TEORICO**

## **1.1. Introducción a la fisiología del crecimiento en la especie humana**

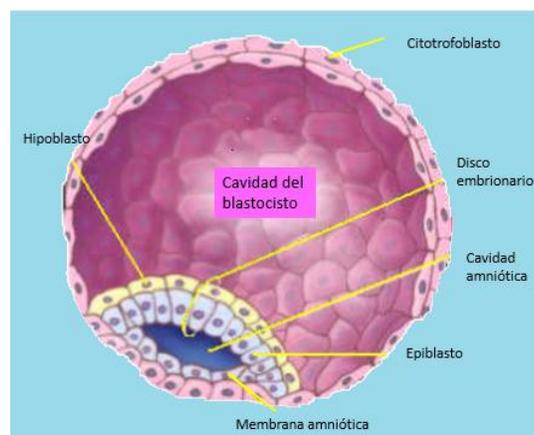
### **1.1.1 Embriología y etapas del crecimiento en la especie humana**

El crecimiento se define como el aumento continuo en el tamaño de un organismo, resultante de la proliferación celular que conduce al desarrollo de estructuras más especializadas (Cusminsky, Lejarraga et al. 1986). El crecimiento inicia en el período embrionario. En la especie humana es un proceso complejo que comprende múltiples etapas desde la gametogénesis hasta el momento del nacimiento. Luego de la fertilización del ovocito en la ampolla del oviducto se completa la meiosis II. El pronúcleo del ovocito y el espermatozoide se fusionan, y alrededor de 24 a 27 horas después, el cigoto diploide sufre la primera división para formar dos blastómeros. El subsecuente clivaje resulta en la formación de una mórula con 12 a 15 células al cuarto día post-fertilización, la cual se compone de una colección de células que formará la masa celular interna (ICM) rodeada por una capa externa de células llamada trofoblasto, que formará el trofoectodermo (TE) (Hill 2001).

La ICM dará origen al embrión mientras que la mayoría de las células del TE formarán el corion, el cual es el componente embriológico de la placenta (Wong, Loewke et al. 2010). En el embrión humano los genes cigóticos son expresados por primera vez alrededor del día tres post-fertilización entre los estadios de la cuarta y octava células (Epstein, Erickson et al. 2004). En el cuarto día post-fertilización, antes de la formación de

la mórula, los blastómeros que tenían una “configuración móvil” se agregan fuertemente en un proceso conocido como compactación, en el que se expresan proteínas de adhesión celular como la E-cadherina (*CDH1*) (Gasperowicz and Natale 2011).

El momento preciso en el cual los blastómeros se convierten en ICM o en trofoblastos es controversial pero se cree que ocurre luego de la formación de la mórula. Durante el quinto día post-fertilización se forma el blastocisto secundario a la formación del blastocele. La ICM se convierte en una masa separada del trofoectodermo en el estadio de 64 células (Opitz 2012). En los días seis a siete aproximadamente, la ICM se diferencia en el epiblasto y el hipoblasto constituyendo la capa de células más externa que se encuentra sobre el epiblasto. El epiblasto da origen a todos los linajes embrionarios y al mesodermo extraembrionario. El hipoblasto da origen al endodermo parietal y visceral (Gasperowicz and Natale 2011). El epiblasto e hipoblasto forman el disco embrionario bilaminar estableciendo el eje dorso-ventral del embrión, siendo el epiblasto la superficie dorsal y el hipoblasto la ventral. Cuando estas dos capas se diferencian, una membrana basal se forma entre ellas (Schoenwolf, Bleyl et al. 2012). (**Figura 1**)



**Figura 1.** Desarrollo del disco embrionario bilaminar (tomado y modificado de Langman)

Después de la fertilización la zona pelúcida continúa cubriendo al embrión en desarrollo para evitar su adherencia a la pared del oviducto (Opitz 2012). El endometrio es receptivo a la implantación por el blastocisto solo por un periodo de 48 horas alrededor de siete a diez días después de la ovulación (Hill 2001). Aproximadamente el día ocho post-fertilización una cavidad amniótica se forma dentro del epiblasto y sus células conforman una membrana extraembrionaria conocida como el amnios (Schoenwolf, Bleyl et al. 2012). Las células del hipoblasto migran para formar la membrana exocelómica alrededor de la cavidad del blastocisto, lo cual se transforma en el saco vitelino primario. Simultáneamente el trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto y en sincitiotrofoblasto en expansión, estructuras que contribuyen a la formación de la placenta (Aghajanova, Hamilton et al. 2008). El mesoderma extraembrionario se forma alrededor del día diez y aproximadamente el día doce se divide para formar la cavidad coriónica que se expande para rodear al saco vitelino primario, al disco embrionario bilaminar y a la cavidad amniótica. Una segunda migración de células del hipoblasto desplaza el saco vitelino primario para formar el saco vitelino secundario (definitivo). El saco vitelino primario se degenera en el día 13 (Schoenwolf, Bleyl et al. 2012). Aproximadamente en el día 15, las células del epiblasto proliferan y migran para convertirse en el extremo caudal del disco embrionario bilaminar y se forma la línea primitiva. Las células del epiblasto migran hacia la línea primitiva donde ocurre la transición epitelio-mesenquimal (EMT) (Moore, Persaud et al. 2007). Estas células epiblasticas transformadas invaden y desplazan el hipoblasto, reemplazándolo con una nueva capa de células conocida como el endoderma embrionario definitivo. Alrededor de la tercera semana las células del epiblasto mesenquimal se invaginan para entrar al espacio entre el epiblasto y

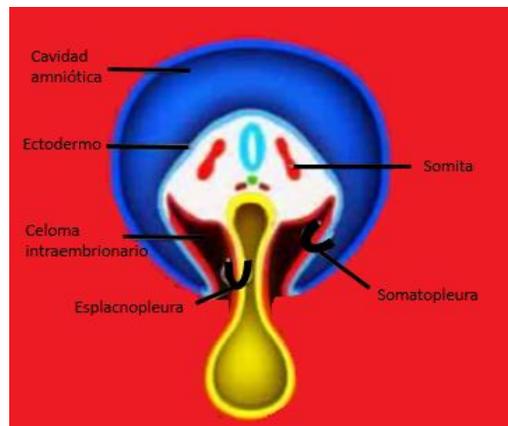
el hipoblasto/endodermo y formar el mesodermo intraembrionario. Una vez el endodermo definitivo y el mesodermo intraembrionario se han formado, las células del epiblasto se convierten en el ectodermo (Schoenwolf, Bleyl et al. 2012). La formación de las tres capas germinales de las células del epiblasto resultan en el disco embrionario trilaminar durante la gastrulación. La formación de la línea primitiva establece el eje principal del cuerpo (Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

En un área craneal a la línea primitiva, el ectodermo forma una depresión y se fusiona con el endodermo (sin mesodermo) para formar una membrana bilaminar conocida como membrana orofaríngea, en donde luego ocurre una apertura que forma la boca. De manera similar ocurre en la región caudal, en la membrana cloacal, que posteriormente da origen a la apertura del ano, el tracto genital y el tracto urinario. Alrededor del día 17 células mesodérmicas migran cranealmente para formar el proceso notocordal, el cual se transformará en notocorda sólida en el día 22. Esta estructura dará origen a los cuerpos vertebrales (Langman and Leland 1975).

Posteriormente, una subpoblación de células mesodérmicas se convierte en el mesodermo paraxial que limita con la notocorda a cada lado. En la región que se convertirá en la cabeza, estas células forman “bandas” que no se segmentarán. En la región que se desarrollará en el tronco, la columna de mesodermo paraxial a cada lado de la notocorda (conocida como el mesodermo presomítico) formará “bandas de células” que se segmentan en bloques conocidos como somitas en una dirección cráneo-caudal. Este proceso inicia en la unión cabeza-tronco el día 20 y se prolonga hasta el día 30, cuando aproximadamente 42 a 44 pares de somitas son formadas. Las somitas más caudales regresan, quedando aproximadamente 37 pares de somitas (Schoenwolf, Bleyl et al. 2012). Los primeros cuatro

pares de somitas contribuyen a la formación del hueso occipital del cráneo, los huesos medio-faciales, el oído interno y los músculos de la lengua. Las demás somitas forman las vértebras, los músculos esqueléticos, la dermis del cuello, el tórax y las regiones lumbar y sacra. Las tres somitas más caudales forman el coxis (Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

En el segundo mes de gestación empiezan a aparecer los esbozos de todos los órganos del cuerpo, los cuales se desarrollan a partir de las tres hojas embrionarias. En este periodo se producen cambios que definen la forma corporal secundaria al plegamiento cefalo-caudal y transversal para modificar un disco plano en un embrión cilíndrico que permanecerá unido al cordón umbilical (Langman and Leland 1975). **(Figura 2)**



**Figura 2.** Plegamiento embrionario (tomado y modificado de Langman)

A partir del ectodermo se desarrolla el sistema nervioso central, el epitelio de la piel, las glándulas endocrinas y los órganos de los sentidos. El mesodermo da origen a los fibroblastos, los condroblastos y los osteoblastos, a la musculatura de las extremidades y el tronco, a la dermis y al tejido celular subcutáneo, al aparato urogenital, las vísceras del tronco, la musculatura de las paredes laterales y anteriores del tronco, los vasos y tejidos sanguíneos.

El endodermo da origen al tubo digestivo, el hígado, el páncreas, el aparato respiratorio, la tiroides y la paratiroides (Langman and Leland 1975).

El periodo fetal transcurre desde el tercer mes hasta el momento del parto y se caracteriza por la maduración de los órganos y los tejidos. En este período ocurre un crecimiento rápido del cuerpo. Durante el tercer, cuarto y quinto mes el feto crece en longitud. El incremento en peso ocurre en los últimos meses antes del parto (Eynard, Valentich et al. 2008).

El hueso es uno de los tejidos con una función principal durante el proceso de crecimiento. Es una forma particular de tejido conectivo con una trama de colágeno embebida en sales de calcio y de fosfato, en particular cristales de hidroxapatita. El hueso interviene en la homeostasis global del calcio y del fosfato, protege órganos vitales y su rigidez permite la locomoción y el sostén (Ganong and Barrett 2005).

En el desarrollo fetal casi todos los huesos son “modelados” en cartílago para después osificarse y convertirse en hueso (formación endocondral). Las excepciones son las clavículas, los maxilares y algunos huesos del cráneo en los cuales la formación ósea se produce directamente a partir de las células mesenquimales (formación intramembranosa). Durante el crecimiento las epífisis se separan de la diáfisis por medio de una lámina de cartílago que prolifera activamente, la lámina epifisiaria. El hueso aumenta su longitud cuando esta lámina deposita tejido nuevo en el extremo de la diáfisis. La amplitud de la lámina epifisiaria es proporcional a la rapidez del crecimiento. Éste parámetro es modificado por diversas hormonas pero muy particularmente por la hormona de crecimiento (GH) y el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF1) (Ganong 2001).

El crecimiento lineal del hueso se produce durante el lapso de tiempo en que las epífisis están separadas de las diáfisis, pero se detiene una vez se unen (cierre epifisiario). Las células de cartílago finalizan su proliferación, sufren hipertrofia y secretan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que lleva a la vascularización y a la osificación. Las epífisis se cierran en un orden cronológico específico y las últimas en cerrarse lo hacen luego de la pubertad (Blumer, Longato et al. 2008). El crecimiento somático en los seres vivos es dependiente de la multiplicación y del aumento del tamaño de las células. Presenta diferentes etapas en las que la tasa de crecimiento es variable (Dvorkin, Dvorkin et al. 2010).

Fases del crecimiento:

*Crecimiento prenatal:* después de la finalización de la organogénesis en el primer trimestre hay una rápida aceleración del crecimiento en el segundo trimestre hasta una velocidad pico de 2.5 cm/semana. La influencia más importante sobre el crecimiento en esta etapa es la nutrición. (Rosenbloom 2007, Jones, Jones et al. 2013).

El enanismo esencial afecta esta etapa y se caracteriza por una severa restricción del crecimiento intrauterino. Esta condición puede ser reconocida entre las 12 y 14 semanas de gestación. Si el nacimiento ocurre a término el peso del recién nacido es inferior a los 1500 g., aunque habitualmente se encuentra entre el rango de 1100 g a 1300 g. Al igual que el peso, la talla se encuentra severamente comprometida y se puede observar entre 30 cm y 40 cm al término (Hall, Flora et al. 2004).

*Crecimiento en la lactancia:* posterior al nacimiento, la velocidad de crecimiento ya no está determinada principalmente por factores maternos sino que está condicionada fundamentalmente por factores genéticos. El crecimiento lineal es un proceso gradual y

discontinuo como puede ser valorado durante la lactancia (Lampl, Veldhuis et al. 1992). La velocidad de crecimiento durante el primer año va disminuyendo de 20 cm/año durante los primeros meses a 10 a 12 cm/año al año de edad. Durante este periodo la talla aumenta un 50% y el peso se triplica. Durante los tres a seis meses posteriores al nacimiento los hombres crecen más rápidamente que las mujeres (Rosenbloom 2007).

*Crecimiento en la infancia:* durante el segundo año de vida la velocidad de crecimiento tiene un promedio de 10 a 13 cm/año y durante el tercer año es de 7.5 a 10 cm/año. Después de los 3 años y hasta la adolescencia la tasa de crecimiento se estabiliza en 5 a 6 cm/año, pero puede producirse un pequeño retraso (de hasta 2 cm/año) durante un tiempo antes de la adolescencia (Rosenbloom 2007). Durante la infancia el crecimiento presenta un cambio en las proporciones corporales debido a que las extremidades crecen más rápido que el tronco y ambos más rápido que la cabeza. La proporción entre el segmento superior (distancia entre el vértex craneal y la sínfisis púbica) y el segmento inferior del cuerpo (distancia desde la parte superior de la sínfisis púbica hasta el suelo) oscila entre 1.7 al nacimiento y 1 a los 10 años de edad, pasando por 1.4 a los 2 años (Smith 1977).

*Crecimiento en la adolescencia:* aunque las niñas empiezan su adolescencia con la aparición del botón mamario, seis meses antes que los niños quienes la inician con el crecimiento testicular, el inicio del crecimiento acelerado en la adolescencia empieza dos años antes en las niñas. Esta cronología que proporciona a los niños un mayor periodo de crecimiento lento puede explicar en parte la mayor estatura que alcanzan los hombres en la edad adulta junto con la contribución al proceso de la testosterona. El crecimiento durante el periodo de la adolescencia confiere más del 20% de la estatura final del adulto. Éste finaliza cuando por función de los estrógenos producidos por el ovario en la mujer u obtenidos por

aromatización de testosterona en el hombre, se produce la fusión epifisiaria (Root and Diamond Jr 2007, Rosenbloom 2007). En los síndromes con enanismo esencial la talla pospuberal final es usualmente inferior a 100 cm (Hall, Flora et al. 2004).

### **1.1.2 Factores que intervienen en el crecimiento**

La adecuada alimentación es una condición fundamental para el crecimiento normal en los niños. En los primeros seis meses de vida los requerimientos energéticos (115 cal/kg/día al nacimiento – 100 cal/kg/día a los 6 meses) y proteicos (2 a 2.4 g/kg/día en el primer mes, disminuyendo de manera gradual a 1.5 g/kg/día a los 6 meses), son cubiertos de manera apropiada por la leche materna. La lactancia materna debe ser la alimentación exclusiva en los primeros seis meses de vida e idealmente debe mantenerse hasta el año de edad. Luego de los seis meses se debe iniciar alimentación complementaria a la lactancia materna. El requerimiento diario de hierro es aproximadamente 2 mg/kg/día de los cuales la mitad son aportados por la lactancia y la alimentación, por lo cual se recomienda suministrar 1 mg/kg/día de sulfato ferroso por un periodo mínimo de un año a partir de los seis meses de edad (Rosenbloom 2007). Durante las siguientes etapas todos los requerimientos son cubiertos por una dieta adecuada (Lampl, Veldhuis et al. 1992).

Los componentes hormonales son factores fundamentales que intervienen en el crecimiento normal del individuo. La hormona de crecimiento (GH) también llamada somatotropina es una proteína de 191 aminoácidos, producida y secretada por la hipófisis anterior. Esta hormona puede ejercer su función de manera directa o también a través de factores de crecimiento similares a la insulina (IGF) producidos en el hígado y en otros tejidos. En la especie humana la GH se produce durante toda la vida, pero su pico máximo

de producción es entre los 10 y 15 años. Con el paso de la edad la producción desciende con extensas variaciones interindividuales (Perry, Farquharson et al. 2008).

La acción principal de la GH es la inducción del crecimiento óseo, cartilaginoso y tisular. Esta hormona induce la proliferación de los condrocitos y de los osteoblastos por lo que contribuye de manera importante en el crecimiento en longitud y a la mineralización ósea. Es una hormona anabólica (aumenta la síntesis de proteínas). Sus principales acciones son ejercidas en el hueso y en el músculo pero también estimula la degradación (lipólisis) del tejido adiposo provocando la reducción de la masa en este tejido. Además posee una acción hiperglucemiante (Mezquita 2011).

El control de la secreción de la GH es complejo, siendo ejercido básicamente por un equilibrio entre dos péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de GH (GHRH) que tiene un efecto estimulador y la somatostatina con un efecto inhibitor. Sin embargo está bien documentado que múltiples neuropéptidos, neurotransmisores y hormonas interfieren en la regulación de la dinámica de la GH (Soliman, De Sanctis et al. 2014).

La secreción de GH es pulsátil. Los intervalos entre los pulsos son de aproximadamente dos horas en humanos. Los hombres presentan mayores pulsos por influencia androgénica que regula la amplitud del pulso, mientras que los estrógenos regulan la secreción basal. Un pico de secreción de GH está asociado con el sueño profundo (estadios III y IV) y el 70% de su liberación ocurre durante la noche. La GH tiene una vida media en la circulación plasmática de 15 a 20 minutos luego de su secreción o de inyección intravenosa si se encuentra libre. La mayoría de las veces se encuentra unida a una proteína transportadora (GHBP) que prolonga su vida media (Perry, Farquharson et al. 2008).

El receptor de GH (Picq, Santoni et al. 2014) es una proteína transmembrana que se une a la hormona con alta afinidad y especificidad. Pertenece a la súper familia de receptores de citoquinas que comprende receptores con un único dominio transmembrana. Está acoplado a las tirosinquinazas (JAK-2). Este receptor ha sido detectado en gran cantidad de tejidos incluyendo el hígado, el músculo estriado, el riñón, el pulmón, la glándula mamaria, la placenta, el tejido adiposo, los linfocitos, el hueso, el cartílago y las células del sistema nervioso central (Camacho-Hübnerb 2011).

La tiroxina por su parte ejerce un papel “permisivo”, esto hace referencia a que es necesaria para que se manifieste de forma óptima el efecto de otra hormona. Actúa de forma sinérgica con la GH induciendo la síntesis de proteínas y el desarrollo del sistema nervioso. La insulina estimula el crecimiento tisular promoviendo la síntesis de proteínas y la proliferación celular. También ejerce un papel permisivo para la GH (Mezquita 2011).

La TSH suprime la remodelación ósea interviniendo directamente sobre los osteoclastos. La FSH por el contrario, activa la diferenciación osteoclástica y la resorción ósea. La oxitocina es esencial en el mantenimiento de la masa ósea tanto en hombres como en mujeres. Tiene un efecto anabólico con acción dominante sobre los osteoblastos (Mezquita 2011).

Los estrógenos favorecen la maduración ósea, el crecimiento, la fusión epifisiaria y el mantenimiento de la masa y la densidad del hueso. Inducen la producción del ligando FASL, citoquina efectora de linfocitos T implicada tanto en fenómenos de tolerancia inmunológica como en apoptosis. Disminuyen de manera radical la supervivencia de osteoclastos aumentando así la masa ósea. El efecto de los andrógenos sobre el crecimiento depende de la aromatasa (enzima que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos) la

cual se expresa en la placa de crecimiento y de la activación por la testosterona y la dihidrotestosterona del receptor de andrógenos presente en los condrocitos de la placa de crecimiento. Los estrógenos y los andrógenos activan el crecimiento óseo actuando sinérgicamente con la GH (Hall 2011).

Los glucocorticoides impiden el crecimiento óseo por medio de la inhibición de la proliferación de los condrocitos en la placa de crecimiento y por estimulación apoptótica. Además retrasan la senescencia de la placa de crecimiento (Mezquita 2011).

### **1.1.3 Factores genéticos**

Los factores genéticos son fundamentales en el crecimiento humano. Se estima que del 70% al 90% de la talla adulta está determinada genéticamente. Aparte de los factores moleculares que intervienen en la producción hormonal, existe un gran control genético del crecimiento por la expresión de diversos genes que actúan en la placa de crecimiento. Durante la embriogénesis ejercen su acción un grupo común de genes y de vías del desarrollo. El mismo gen puede ser expresado en diferentes tejidos durante distintos estadios del desarrollo o regular diferentes vías y por lo tanto afectar el desarrollo de varios sistemas a la vez (Epstein, Erickson et al. 2004). Por ejemplo, la familia de genes *Hox* (Homeobox) son responsables de la determinación del eje antero-posterior y del perfil del esqueleto axial en todos los vertebrados (Wellik and Capecchi 2003).

Los factores de transcripción homeodominio (Homeobox) *POU5F1* (también conocido como *OCT4*) y *NANOG* confieren pluripotencialidad. Están inicialmente presentes en todos los blastómeros tempranos pero posteriormente son únicamente expresados en la ICM. *POU5F1* es requerido para la determinación de la ICM. *NANOG* es crítico para la

pluripotencialidad y para la formación del epiblasto. El factor de transcripción *SALL4* es necesario para la diferenciación de la ICM en el epiblasto y en el ectodermo primitivo. Un factor HMG-box, *SOX2*, se heterodimeriza con *POU5F1* y promueve su unión a genes blanco. *POU5F1* se une al promotor de *CDX2* y viceversa para suprimir mutuamente la transcripción uno del otro y así las células se diferenciarán en ICM o trofoblasto (Chen, Wang et al. 2010).

Los factores de transcripción *CDX2* y *TEAD4* son requeridos para la transformación inicial de los blastómeros a trofoblastos. Se cree que el *CDX2* derivado de la madre y presente en el cigoto temprano es también necesario para el paso inicial y la polarización de los blastómeros en el trofoectodermo (Gilbert and Epel 2009). En el momento en que la ICM se ha diferenciado en epiblasto y en ectodermo primitivo *NANOG* es expresado exclusivamente en el epiblasto. El factor de transcripción *GATA6* es expresado específicamente en el hipoblasto y es requerido para su desarrollo (Arnold and Robertson 2009).

Ha sido sugerido que la expresión de *GATA6* es inducida por la activación de la vía RTK-MAPK por el factor de crecimiento fibroblástico y por *GRB2*. Este proceso también parece inhibir la expresión de *NANOG* (Gasperowicz and Natale 2011). Se ha evidenciado que *SOX17* promueve la expresión de *GATA6* y *GATA4*, y los tres son requeridos para la diferenciación de la ICM en el hipoblasto (Albert and Peters 2009). Adicionalmente, algunos microRNAs suprimen la transcripción de factores pluripotenciales específicos como *POU5F1*, *SOX2* y *KLF4* en células madre embrionarias humanas. Esto sugiere que los microRNAs pueden ser importantes en la regulación de la diferenciación de la ICM (Chazaud, Yamanaka et al. 2006).

El conjunto de genes *GH* consiste de cinco genes muy similares: *GHI*, *CSHP* (pseudogen de la somatotropina coriónica), *CSHI* (gen de la somatotropina coriónica), *GH2* y *CSH2*. Estos comprenden 65 kb del brazo largo del cromosoma 17 (Hirt, Kimelman et al. 1987). El gen *GH2* codifica una proteína que es expresada en la placenta más que en la hipófisis. Esta hormona reemplaza la GH hipofisaria en la circulación materna durante la segunda mitad del embarazo (Frankenne, Closset et al. 1988). Los genes *CSHI* y *CSH2* codifican proteínas de secuencias idénticas. El gen *CSHP* codifica una proteína que difiere por 13 aminoácidos y contiene una variante que altera su patrón de *splicing* y, por lo tanto, la secuencia primaria de la proteína (Hirt, Kimelman et al. 1987). Estos genes tienen una importante función en el control del crecimiento (Selby, Barta et al. 1984).

La fuerte homología (92-98%) entre estos cinco genes sugiere que esta familia génica surgió de una serie de eventos ancestrales duplicativos (Mullis 2005). Con la excepción de *CSHP*, cada gen codifica una prohormona de 217 aminoácidos que es clivada para producir una hormona madura con 191 aminoácidos (Mullis 2005).

Los factores de transcripción con funciones relevantes para el desarrollo embrionario temprano de la glándula hipófisis son *PITX1/2*, *HESX1*, *SHH* y *LHX3/4*. Los genes *PROPI* y *POUIF1* tienen una importante función sobre las células que secretan hormonas en la hipófisis anterior (Kelberman, Rizzoti et al. 2009). En general, las alteraciones de los genes involucrados en el desarrollo hipofisario temprano resultan en defectos más severos y frecuentemente en anomalías cerebrales; por ejemplo, la holoprosencefalia debida a mutaciones en el gen *SHH*. Los defectos en genes involucrados en el desarrollo tardío de la hipófisis llevan a diferentes combinaciones de defectos hormonales hipofisarios (Dattani and Preece 2004) (Mullis 2005).

El gen del receptor 2 de FCF se expresa en los condrocitos tempranos e induce la expresión del factor de transcripción *SOX9* necesario para la diferenciación de los condrocitos. El gen del receptor 3 de FCF induce la proliferación de células inmaduras y limita la división de los condrocitos proliferantes y sus mutaciones se asocian con acondroplasia (Rosenbloom 2007) (Root and Diamond Jr 2007).

El gen *SHOX* fue descubierto a partir del mapeo de deleciones del brazo corto del cromosoma X (Rao, Weiss et al. 1997). El gen está localizado en el extremo de los brazos cortos de ambos cromosomas sexuales X y Y. Este gen hace parte de los genes homeobox los cuales cumplen una importante función durante la embriogénesis y el desarrollo por medio de la regulación de los perfiles de formación morfológica espacio/temporal (Binder 2011). La función del gen *SHOX* es dosis dependiente, su haploinsuficiencia resulta en un trastorno que causa falla en el crecimiento. La ganancia de una o dos copias adicionales del gen debido a aberraciones estructurales del cromosoma X pueden estar asociadas con talla alta (Thomas, Harvey et al. 2009). Las mutaciones más frecuentemente encontradas en este gen son deleciones de diferentes tamaños y la pérdida de ambos alelos del gen causa un fenotipo extremo de osteodisplasia llamado síndrome de Langer (Zinn, Wei et al. 2002).

El péptido natriurético tipo C (PNC) es un regulador del crecimiento esquelético recientemente descrito. Interactúa fundamentalmente con el receptor tipo B produciendo un aumento de GMP cíclico intracelular e interacción con la proteína quinasa. La mutación homocigota del gen del receptor tipo B de PNC lleva a un tipo de displasia esquelética conocido como Maroteaux-Lamy (displasia acromesomélica). Los portadores heterocigotos de la mutación se han descrito con menor talla que los no portadores (Olney, Bükülmez et al. 2006).

## 1.2. Alteraciones en el crecimiento

La talla normal varía ampliamente tanto entre grupos étnicos como de una población específica. La talla alta y baja son por lo tanto términos relativos y se determinan comparando al individuo con personas de la misma etnia, familia y estado nutricional. Cuando se establece que un individuo presenta talla baja teniendo en cuenta sus bases genéticas (y no simplemente dado por un retraso constitucional), su etiología debe ser esclarecida para establecer un manejo adecuado (Tolmie and Rimoin 1996) (Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

La talla baja se define como aquella que está por debajo de -2 desviaciones estándar (DE) para la edad y el género con relación a la media de la población de referencia (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Actualmente se clasifica en talla baja idiopática y talla baja patológica (Ramírez, Barros et al. 2013).

La talla baja idiopática refiere a aquella condición en la cual se desconoce la causa subyacente. Un paciente clasificado en este grupo debe cumplir con unos criterios establecidos: la talla y el peso del recién nacido deben ser normales para la edad gestacional, las proporciones corporales normales, ausencia de enfermedades crónicas, endocrinopatías o trastornos psicoafectivos y presentar una adecuada nutrición. Dentro de este grupo se encuentran clasificados los pacientes que presentan talla baja familiar (Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

El retraso constitucional del crecimiento también se encuentra en este grupo de condiciones. Los pacientes presentan longitud y pesos neonatales normales, pero tienen una velocidad de crecimiento adecuada durante un periodo de tiempo variable, seguido de una desaceleración. El pico de crecimiento en la adolescencia se retrasa de dos a cuatro años con respecto a individuos normales. En la mayoría de los casos la talla final es normal, pero un

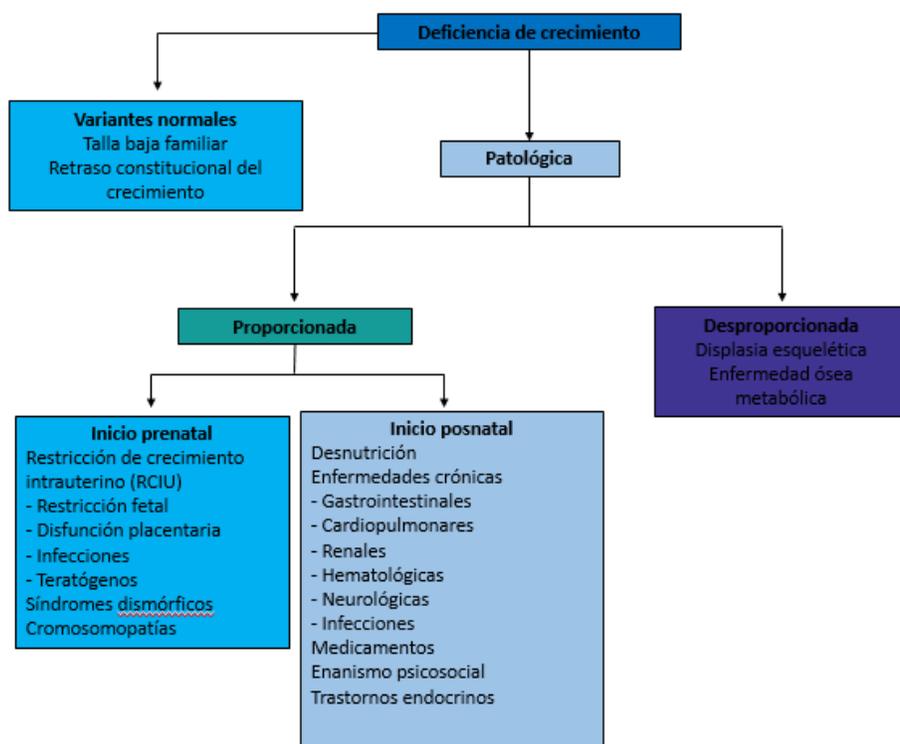
10% a 20% de los pacientes alcanzan una talla final por debajo de los límites habituales (Ramírez, Barros et al. 2013).

La talla baja patológica hace alusión un grupo de enfermedades que alteran el desarrollo normal de la talla. Este grupo de trastornos puede ser clasificado en talla baja proporcionada (armónica) y no proporcionada (disarmónica) (Warman, Cormier-Daire et al. 2011). Los niños con talla baja desproporcionada usualmente padecen una displasia esquelética o una enfermedad ósea metabólica mientras aquellos con talla baja proporcionada pueden tener un trastorno más generalizado, por ejemplo: una enfermedad crónica, un trastorno psicosocial, una enfermedad endocrina, entre otros (Warman, Cormier-Daire et al. 2011).

La talla baja proporcionada puede ser clasificada según el momento de aparición en la etapa prenatal o posnatal (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). La deficiencia de crecimiento de inicio prenatal usualmente implica una injuria en el ambiente fetal o un defecto genético celular generalizado que podría alterar la mitosis. Dentro de las principales causas prenatales se encuentran las cromosomopatías y los factores externos que causan supresión en el desarrollo del feto, como la malnutrición materna, los tóxicos o las infecciones (Graham and Rimoin 1997).

El inicio posnatal de deficiencia de crecimiento proporcionado usualmente implica una injuria medioambiental posnatal como el hipocrecimiento de origen nutricional (causa principal), el hipocrecimiento de origen psicosocial, las patologías crónicas, las enfermedades gastrointestinales (trastorno inflamatorio intestinal, enfermedad celiaca y de Chron, fibrosis quística), los desórdenes cardiopulmonares (patología cardíaca crónica, fibrosis quística y asma crónica severa), los trastornos hepáticos, las alteraciones hematológicas (anemia crónica severa), la insuficiencia renal crónica, las infecciones

crónicas e inmunodeficiencias, los errores congénitos del metabolismo y las enfermedades endocrinas (déficit de hormona de crecimiento, hipotiroidismo, diabetes mellitus, hipocrecimiento en el hipogonadismo, pubertad precoz, hipercortisolismo, patología paratiroidea), entre otras (Melmed, Polonsky et al. 2011). **(Figura 3)**



**Figura 3.** Clasificación de la talla baja (tomado y modificado de Emery & Rimoin's)

### 1.2.1 Talla baja proporcionada de inicio prenatal

La restricción de crecimiento intrauterino (RCIU) puede ser atribuida a diversas causas tanto genéticas como adquiridas. La restricción mecánica tardía gestacional se ha propuesto como la causa más común de deficiencia de crecimiento de inicio prenatal. La

preeclampsia, la insuficiencia placentaria u otras causas fetales tardías muestran usualmente una rápida resolución, a diferencia de las alteraciones presentes en etapas tempranas de la vida fetal, como por ejemplo, la hipertensión crónica materna (Gómez, Padilla et al. 2014) (Graham and Rimoin 1997).

Se han descrito gran cantidad de síndromes complejos asociados a malformaciones en el feto causados por alteraciones monogénicas, trastornos cromosómicos, teratógenos o infecciones intrauterinas en los cuales la hipoplasia fetal es una de sus principales características. En los niños que padecen estos síndromes malformativos no se espera que alcancen un crecimiento normal y algunos de estos trastornos pueden estar asociados con un alto grado de letalidad perinatal (Resnik 2002).

En varios casos es posible realizar un diagnóstico de un trastorno genético específico por sus características clínicas particulares. Algunos de estos síndromes se describen a continuación.

#### 1.2.1.1. **Síndrome de Cornelia de Lange**

El síndrome de Cornelia de Lange tiene una prevalencia aproximada de 1 en 10.000 individuos (Opitz and Reynolds 1985). Las características incluyen talla baja proporcionada que inicia en el periodo prenatal, talla en promedio en la edad adulta de 156 cm en hombres y 131 cm en mujeres y microcefalia. Las características faciales son lo más representativo del síndrome, entre las que se encuentran el hirsutismo frontal, la sinofris que se extiende hasta el puente nasal con una apariencia curva de las cejas, la ptosis severa, las pestañas gruesas y largas, el tercio medio facial aplanado y la nariz pequeña con un puente nasal deprimido y narinas antevertidas, los pabellones auriculares gruesos y displásicos con implantación baja y/o rotados posteriormente, un filtro largo, prominente y bien formado, un

labio superior delgado y comisuras labiales dirigidas hacia abajo, el paladar alto, la diastasis dental y la micrognatia. Algunos hallazgos en las extremidades que se presentan frecuentemente incluyen las manos y los pies pequeños, el acortamiento del quinto hueso metacarpiano, la braquidactilia, la clinodactilia y el pliegue palmar único. En general, cualquier sistema puede verse afectado; sin embargo, se altera principalmente el neurodesarrollo y los sistemas craneofacial, gastrointestinal y musculoesquelético. Este síndrome presenta heterogeneidad genética. Alrededor del 50-60% de los casos son debidos a la mutación en el gen *NIPBL*. Otros genes asociados son el *SMC1A*, el *SMC3* y el *RAD21*. Todos estos genes codifican componentes del complejo cohesina. Otros casos han sido asociados con mutaciones en el gen *HDAC8*, una deacetilasa de histonas. Se han reportado patrones de herencia autosómico dominante y ligado al X (Kline, Krantz et al. 2007) (Ptacek, Opitz et al. 1963).

#### 1.2.1.2. Síndrome de Russell-Silver

El Síndrome de Russell-Silver tiene una prevalencia estimada de 1 en 100.000 individuos (Christoforidis, Maniadaki et al. 2005). Sus principales características clínicas incluyen RCIU, retardo de crecimiento posnatal (alcanzando una talla final promedio en adultos de 151 cm en hombres y de 139 cm en mujeres), perímetro cefálico normal, clinodactilia del quinto dedo y asimetría de las extremidades. Otros hallazgos de este síndrome son una edad ósea retardada, una facies típica con frente prominente, la cara triangular pequeña, el mentón pequeño y las comisuras labiales dirigidas hacia abajo, braquidactilia, campodactilia, máculas café con leche en la piel, hipoglucemia, déficit de la hormona de crecimiento, retardo en el desarrollo motor y cognitivo, diaforesis y trastornos gastrointestinales. Este síndrome es genéticamente heterogéneo. Se ha asociado

principalmente con anomalías en un dominio de impronta en el cromosoma 11p15.5, región cromosómica en la que se encuentra un grupo de genes que cumplen funciones críticas en el crecimiento fetal y placentario. En este caso, la hipometilación del centro de impronta 1 (IC1) conduce a la expresión bialélica del gen *H19* y al silenciamiento bialélico del gen *IGF2* resultando en la restricción del crecimiento. En otros casos se han descrito duplicaciones que involucran la región 11p15.5 materna. También ha sido asociada la disomía uniparental materna del cromosoma 7 (UPD7) en ciertos casos. (Saal, Pagon et al. 1985) (Wollmann, Kirchner et al. 1995) (Price, Stanhope et al. 1999).

#### 1.2.1.3. **Síndrome de Dubowitz**

Se han descrito menos de 200 casos del síndrome de Dubowitz en la literatura. Esta patología se caracteriza por presentar rasgos faciales distintivos dentro de los cuales se encuentran una forma triangular de la cara, el pelo y las cejas delgadas y escasas, la frente amplia, el puente nasal ancho o plano (algunas veces se presentan con una punta nasal prominente y redondeada), micrognatia con un mentón retraído, implantación baja de los pabellones auriculares que en algunos casos evidencian displasia. En los ojos se pueden encontrar algunas alteraciones como ptosis palpebral y pliegues epicánticos, o alteraciones en las fisuras palpebrales. También se han reportado alteraciones estructurales de los globos oculares y defectos visuales, así como diferentes anomalías en la cavidad oral. Los pacientes presentan restricción de crecimiento pre y posnatal, microcefalia y múltiples malformaciones esqueléticas variables. Se han evidenciado varios casos de anomalías genitales y rectales y es común encontrar déficit cognitivo leve a moderado con características comportamentales alteradas que incluyen alteraciones del lenguaje y del temperamento. Se ha establecido un patrón de herencia autosómico recesivo. Aunque algunas investigaciones sugieren que se

trata de un síndrome causado por microdeleciones o microduplicaciones, su causa es desconocida (Ilyina and Lurie 1990, Chan and King 2005) (Huber, Houlihan et al. 2011) (Tsukahara and Opitz 1996, Pascual, Betlloch et al. 2005) (Swartz, Resnick et al. 2003) (Maas, Thienpont et al. 2006) (Orrison, Schnitzler et al. 1980, Tsukahara and Opitz 1996) (Swartz, Resnick et al. 2003) (Ilyina and Lurie 1990) (Parrish, Wilroy et al. 1980) (Huber, Houlihan et al. 2011).

#### 1.2.1.4. **Síndrome de Smith–Lemli–Opitz**

La prevalencia del Síndrome de Smith–Lemli–Opitz ha sido estimada en 1 en 20.000 a 1 en 40.000 individuos (Nowaczyk, Zeesman et al. 2004). Este síndrome presenta expresividad variable. En los casos severos se evidencia retardo en el crecimiento pre y posnatal, déficit cognitivo moderado a severo, microcefalia y otras malformaciones presentes en la cara (frente estrecha, pliegues epicánticos, ptosis palpebral, nariz pequeña con narinas antevertidas, micrognatia y hemangioma en la raíz nasal que se extiende a la glabella, entre otras) y alteraciones en el corazón, el riñón, los genitales o las estructuras esqueléticas (Cunniff, Kratz et al. 1997, Ryan, Bartlett et al. 1998, Krajewska-Walasek, Gradowska et al. 1999, Kelley and Hennekam 2000, Nowaczyk and Waye 2001). Los individuos con expresión más leve presentan rasgos faciales tenues, hipotonía, sindactilia entre el segundo y el tercer dedo de los pies y no cursan con déficit cognitivo (Nowaczyk and Waye 2001, Eroglu, Nguyen-Driver et al. 2011).

Se reportan diferentes dificultades para la alimentación en la edad neonatal y alteraciones gastrointestinales (Dallaire and Fraser 1966, Patterson, Toomey et al. 1983). Además, se evidencian anomalías del comportamiento y trastornos del sueño (Diaz-Stransky and Tierney 2012). Se encuentran también alteraciones estructurales cerebrales y/o

cerebelares (Lee, Conley et al. 2013). La fotosensibilidad es común (Anstey 2001). En los genitales es posible encontrar hipospadias y/o criptorquidia en hombres y útero bicorne y/o vagina septada en mujeres (Dallaire and Fraser 1966). También se han identificado anomalías endocrinas (Chemaitilly, Goldenberg et al. 2002). Este síndrome tiene una herencia autosómica recesiva (Nowaczyk and Waye 2001). Es causado por mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *DHCR7* (Fitzky, Witsch-Baumgartner et al. 1998).

#### 1.2.1.5. **Síndrome de Robinow**

El Síndrome de Robinow es un trastorno raro aunque no se conoce su prevalencia exacta (Robinow, Silverman et al. 1969, Pagon 1987). Los pacientes presentan facies típicas en el nacimiento y en la niñez temprana asociadas a una apariencia caracterizada por la presencia de una cara pequeña asociada a telecantho y macrocefalia. Más adelante en el desarrollo se presenta un rápido crecimiento de la nariz durante la adolescencia, lo cual da una apariencia más habitual a la cara, aunque la frente es amplia, el puente nasal ancho y existe hipertelorismo ocular hasta la edad adulta. También se presentan diferentes alteraciones dentales (Beiraghi, Leon-Salazar et al. 2011). La mayoría de los pacientes presentan talla baja desde la niñez hasta la edad adulta y otras anormalidades esqueléticas como el acortamiento mesomélico o acromesomélico de los antebrazos, sindactilias, cifoescoliosis y alteraciones costales (Pagon, Adam et al. 2013) (Tufan, Cefle et al. 2005). Se han reportado además alteraciones genitales como clítoris pequeño y labios hipoplásicos en mujeres, y pene aparentemente pequeño por una inserción anómala en los hombres. También se presentan alteraciones cardíacas como la atresia valvular pulmonar o tricuspídea, los defectos septales, la tetralogía de Fallot y la coartación aórtica, las cuales constituyen la principal causa de muerte (Al-Ata, Paquet et al. 1998) (Wilcox, Quinn et al. 1997). Su

coeficiente intelectual es habitualmente normal (Pagon, Adam et al. 2013). Este síndrome presenta patrones de herencia autosómicos dominantes y recesivos. El fenotipo puede variar de acuerdo a su herencia en algunas características específicas pero en general se evidencian anomalías similares (Roifman, Brunner et al. 1993). Las mutaciones en el gen *ROR2* causan el síndrome de Robinow autosómico recesivo y las mutaciones heterocigotas en los genes *WNT5A* o *DVLI* causan el síndrome de Robinow autosómico dominante (Afzal, Rajab et al. 2000, Person, Beiraghi et al. 2010, White, Mazzeu et al. 2015).

#### 1.2.1.6. **Síndrome de Coffin-Siris**

El Síndrome de Coffin-Siris constituye un trastorno raro con menos de 100 casos reportados en el mundo (Schrier Vergano, Santen et al. 2014). Los pacientes presentan característicamente hipoplasia o aplasia de la falange distal o ausencia de la uña del quinto dedo, déficit cognitivo que varía de leve a severo, retardo en el desarrollo psicomotor y características faciales específicas con cejas gruesas y pestañas largas, puente y punta nasal anchas, labios gruesos y evertidos (Fleck, Pandya et al. 2001, Schrier, Bodurtha et al. 2012). Otras características que pueden estar presentes son la microcefalia, la talla baja pre y posnatal, el hirsutismo, las alteraciones dentales, las dificultades para la alimentación y las anomalías estructurales gastrointestinales como la hernia diafragmática, la intususcepción y la mucosa gástrica redundante. También se presentan alteraciones cardíacas como los defectos septales ventriculares o auriculares, la tetralogía de Fallot o el ductus arterioso persistente, las malformaciones renales (riñón en herradura) y las hipospadias, las afecciones cerebrales o craneales que pueden incluir la variante de Dandy Walker, la agenesia del cuerpo calloso y la hipoacusia neurosensorial. Además se hacen observables anomalías oftalmológicas como ptosis, estrabismo y cataratas (Schrier, Bodurtha et al.

2012) (Delvaux, Moerman et al. 1997) (Bodurtha, Kessel et al. 1986) (Coffin and Siris 1970). Este síndrome presenta patrones de herencia autosómico dominante y recesivo (Fleck, Pandya et al. 2001). Se han encontrado mutaciones en los genes *ARID1A*, *ARID1B*, *SMARCA4*, *SMARCB1* o *SMARCE1* como causales en algunos de los pacientes (Tsurusaki, Okamoto et al. 2012).

#### 1.2.1.7. Síndrome de Turner

El Síndrome de Turner es una de las anomalías cromosómicas más frecuentes. Presenta una incidencia aproximada de 1 en 2.500 recién nacidas vivas femeninas (Ranke and Saenger 2001). El espectro clínico es muy variado e incluye linfedema en pies y manos al nacimiento, pterigium colli o cuello alado secundario a higroma nuchal en el periodo neonatal, retraso de crecimiento con una talla baja al final de la adolescencia, ensanchamiento relativo del tórax y de los hombros constituyendo el llamado “tórax en escudo” (ocasionalmente asociado a *pectum excavatum*), alteraciones en las extremidades dadas por *cubitus valgus* (ángulo entre el eje del brazo y el antebrazo superior a 15°), acortamiento del cuarto hueso metacarpiano y deformidad de Madelung (subluxación dorsal del extremo distal del cúbito proyectándose más allá del dorso de la mano). En las extremidades inferiores es posible encontrar *genu varo* y acortamiento de los huesos del metatarso (Ferrández, Labarta et al. 2002) (Labarta, Ferrandez et al. 1994) (Lippe, Rosenfeld et al. 1990).

El cuello es generalmente corto debido a la hipoplasia de las vértebras cervicales. En la facies se encuentra retrognatía, micrognatía y paladar ojival con maloclusión dental, ptosis palpebral, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, labio superior delgado con comisuras dirigidas hacia abajo y filtro largo, epicanto e implantación baja de los pabellones auriculares con rotación posterior, implantación baja del pelo a nivel cervical, uñas hipoplásicas,

estrechas y convexas (Lippe, Rosenfeld et al. 1990). En la piel son frecuentes múltiples *nevus* pigmentarios, telangiectasias y cicatrices queloides. Es posible encontrar alteraciones en diferentes órganos y sistemas tales como trastornos cardiovasculares, principalmente válvula aórtica bicúspide y coartación de la aorta, alteraciones renales más frecuentemente dadas por anomalías en la rotación y la estructura renal, y malformaciones del sistema colector (Bilge, Kayserili et al. 2000) (Mazzanti, Cacciari et al. 1998). Las pacientes presentan otitis media con mayor frecuencia, estrabismo y telecanto, enfermedades autoinmunes como la tiroiditis de Hashimoto, obesidad y osteoporosis entre otras alteraciones (Gravholt, Juul et al. 1998). Este síndrome es secundario a la ausencia total o parcial de un cromosoma X. Dentro de las posibles alteraciones cromosómicas se encuentran la monosomía total del X (45,X), la monosomía parcial por alteraciones estructurales como deleciones, microdeleciones o isocromosomas y los mosaicismos (Saenger, Wikland et al. 2001).

### **1.2.2 Talla baja proporcionada de inicio posnatal**

Las personas que presentan talla baja de inicio posterior al nacimiento comúnmente han sufrido de algún tipo de alteración medioambiental posnatal, como una enfermedad endocrina que puede estar asociada con un descenso de las cantidades normales de IGF o por la falta de su acción periférica secundaria a la supresión de su síntesis hepática (Laron 2001, Rimoin, Pyeritz et al. 2013). El estado de desnutrición crónica, además de ser una condición caracterizada por la ausencia del sustrato necesario para el crecimiento, es una de las causas de disminución en la síntesis de IGF (Haspolat, Ece et al. 2007). Es importante tener en cuenta que la malnutrición puede ser secundaria a condiciones como el síndrome de malabsorción intestinal y no únicamente a la ingesta inadecuada (Mziray-Andrew and Sentongo 2009). Algunos pacientes que sufren problemas emocionales o psicosociales

padecen de un grave retardo en el crecimiento. Se ha demostrado que estas situaciones conducen a bajos niveles de GH e IGF circulantes y a una edad ósea retardada hasta que es tratado el origen del trastorno (Muñoz-Hoyos, Molina-Carballo et al. 2011).

Algunos medicamentos usados para tratar la hiperactividad como el metilfenidato o la dextroanfetamina podrían alterar la regulación normal de GH. Los glucocorticoides se han asociado a la supresión del crecimiento incluso con dosis bajas (Pliszka, Matthews et al. 2006, Faraone, Biederman et al. 2008). Muchas enfermedades crónicas en la niñez, como la falla renal o hepática, la diabetes mellitus, la enfermedad cardíaca congénita y el asma están asociadas con defectos en el crecimiento. En estas patologías es frecuente hallar niveles bajos de IGF y en algunos casos es posible alcanzar una talla normal cuando es tratada la causa subyacente (Haspolat, Ece et al. 2007). Múltiples trastornos endocrinos se han asociado con defectos en el crecimiento. El hipotiroidismo por ejemplo, puede relacionarse con talla baja proporcionada o desproporcionada. La enfermedad de Cushing puede generar talla baja proporcionada. En general, las alteraciones endocrinas se caracterizan por deficiencia de GH (Mullis 2011, Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

Múltiples anomalías genéticas o del desarrollo que afectan el hipotálamo y la hipófisis resultan en deficiencia de GH y/o de otras hormonas. Algunas de ellas son la ausencia congénita de la hipófisis, el encefalocele transesfenoidal y el síndrome de silla turca vacía. Muchos de estos síndromes se asocian con anomalías faciales u ópticas, por lo que en los pacientes con dichas alteraciones, asociadas a deficiencia de GH, se deben practicar imágenes radiológicas cerebrales y de la silla turca (Rimoin, Connor et al. 2007). Algunas anomalías genéticas que no se asocian con trastornos del desarrollo del hipotálamo o de la hipófisis tienen insuficiencia hipofisaria. Este es el caso del síndrome Pallister-Hall que presenta

hamartoma o hamartoblastoma hipotalámico, alteraciones renales, anales, polidactilia, cambios faciales e hipopituitarismo (Biesecker and Graham 1996). En las talasemias se presenta hemosiderosis que afecta la hipófisis en el tratamiento transfusional. En otros síndromes la patogénesis de la insuficiencia hipofisaria se desconoce (Rimoin, Pyeritz et al. 2013).

En la mayoría de casos la deficiencia de GH es idiopática, es decir que se desconoce la causa orgánica subyacente. Este es un grupo variado de trastornos que usualmente se clasifica como una deficiencia aislada de GH (Jones, Jones et al. 2013, Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Existen algunos síndromes de causa genética que se presentan con talla baja proporcionada de inicio posnatal. Algunos de ellos se describen a continuación.

#### **1.2.2.1 Síndrome de Rubinstein-Taybi**

El Síndrome de Rubinstein-Taybi tiene una incidencia de 1 en 10.000 a 1 en 25.000 nacidos vivos. Sus principales características son la ganancia lenta de talla y de peso posnatales con un desarrollo prenatal normal, microcefalia, déficit cognitivo, características faciales dismórficas que incluyen la implantación frontal baja del pelo, las cejas arqueadas y gruesas, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, la nariz prominente, los pabellones auriculares displásicos y con baja implantación, el paladar arqueado, la micrognatia leve, las anomalías dentales, la sonrisa atípica asociada a la realización de gestos con apariencia de “muecas”, y los ojos casi completamente cerrados o incluso con ptosis palpebral. También se presentan pulgares y hallux anchos y largos, criptorquidia, retardo en el lenguaje y reflujo gastroesofágico. Los casos son esporádicos en la mayoría de las presentaciones y se han reportado únicamente algunos casos familiares (Milani, Manzoni et al. 2015). Se han

encontrado mutaciones en los genes *CREBBP* o *EP300* como causales en algunos de los pacientes (Bartsch, Labonté et al. 2010).

### **1.2.2.2 Síndrome de Noonan**

El Síndrome de Noonan es un trastorno común cuya prevalencia oscila entre 1 en 1.000 a 1 en 2.500 individuos (Roberts, Allanson et al. 2013). La talla de estos pacientes al nacimiento es usualmente normal, pero existe una falla en el crecimiento posnatal que puede ser evidente durante el primer año de vida (Otten and Noordam 2009). La talla adulta final puede alcanzar el límite inferior de la normalidad (Noonan, Raaijmakers et al. 2003). Se presentan algunas características faciales distintivas en los neonatos como la frente alta, el hipertelorismo ocular, los pabellones auriculares de implantación baja con hélix engrosado y rotados posteriormente, el cuello corto con piel excesiva y el pelo de implantación baja posterior. En la niñez se puede ver una carencia de expresión facial y en la adolescencia una cara triangular (Roberts, Allanson et al. 2013). Uno de los rasgos más característicos es la presencia de pectus excavatum inferior y carinatum superior en el esternón y la posibilidad de segregarse de manera autosómica dominante (Van der Burgt 2007).

Los defectos cardíacos congénitos o las anomalías electrocardiográficas pueden estar presentes hasta en el 80% de los pacientes (Noonan 2005). Pueden presentar hipotonía, retardo en el desarrollo psicomotor y problemas del lenguaje. Aproximadamente un tercio de los pacientes tienen un déficit cognitivo leve (Lee, Portnoy et al. 2005) (Pierpont, Weismer et al. 2010). Se han reportado varios casos de criptorquidia e hipogonadismo hipergonadotrófico en hombres (Marcus, Sweep et al. 2008). La fertilidad en mujeres es reportada como normal (Roberts, Allanson et al. 2013). Defectos en la coagulación y anomalías linfáticas son frecuentes (Derbent, Oncel et al. 2010). Alteraciones oculares como

el estrabismo o defectos de refracción se encuentran en la mayoría de los pacientes (Roberts, Allanson et al. 2013). Este síndrome puede ser diagnosticado por la presencia de características clínicas específicas. Los estudios moleculares han identificado mutaciones en el gen *PTPN11* en el 50% de los individuos afectados, en el gen *SOS1* en aproximadamente el 13%, en el gen *RAF1* en el 3 al 17% y en el gen *KRAS* en menos del 5% de los pacientes (Roberts, Allanson et al. 2013) (Razzaque, Nishizawa et al. 2007) (Schubbert, Zenker et al. 2006) (Tartaglia, Mehler et al. 2001). Las mutaciones en el gen *PTPN11* predisponen a la aparición de malignidades con una frecuencia tres veces superior a la de la población general, una de las más frecuentes es la leucemia mielomonocítica juvenil (Tartaglia, Niemeyer et al. 2003, Jongmans, Van Der Burgt et al. 2011). Este síndrome tiene una herencia autosómica dominante (Roberts, Allanson et al. 2013).

### **1.2.3 Talla baja desproporcionada**

Un paciente que presenta un hábito corporal desproporcionado al examen físico probablemente padece una displasia esquelética. Este término se refiere a un grupo considerable de trastornos caracterizados por presentar anormalidades en el tamaño y en la forma de las extremidades, el tronco y/o el cráneo, que habitualmente resultan en una talla baja desproporcionada. El término displasia se refiere a un “crecimiento desordenado” (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Aunque de manera aislada cada tipo de displasia esquelética es infrecuente, su incidencia global ha sido estimada en 2.4 por cada 10.000 nacidos vivos (Camera and Mastroiacovo 1981). Por la heterogeneidad de estos trastornos ha sido difícil realizar una clasificación precisa. Existen actualmente diversas clasificaciones clínicas fundamentadas en diferentes criterios, como por ejemplo en la porción del esqueleto afectada, según los términos griegos que describen la apariencia ósea o el curso de la enfermedad,

utilizando un epónimo y cuando un término pretende describir la patogénesis de la condición (Jeanty and Valero , Gratacós 2007). A continuación se realizará una breve descripción de algunas de las displasias esqueléticas más frecuentes.

### **1.2.3.1 Acondroplasia**

La acondroplasia es el trastorno de talla baja desproporcionada más común. Se estima que ocurre en 1: 26.000 a 1: 28.000 nacidos vivos (Oberklaid, Danks et al. 1979). Sus características clínicas y radiológicas han sido bien definidas. La descripción clínica incluye la talla baja con un promedio de 131+/-5 cm en hombres y de 124+/-5 cm en mujeres adultas, el acortamiento rizomélico de los brazos y de las piernas con pliegues de piel redundantes, la limitación para la extensión del codo, los dedos cortos, la configuración de las manos en tridente, el *genu varo*, la cifosis toracolumbar en la infancia, la lordosis lumbar pronunciada, la macrocefalia con abombamiento frontal, la hipoplasia medifacial y el puente nasal deprimido (Langer, Baumann et al. 1968, Pauli 1993).

La obesidad es frecuente en estos pacientes (Hecht, Hood et al. 1988). La hipotonía leve a moderada en la infancia es típica lo que conduce a una dificultad en la adquisición de las habilidades motoras (Fowler, Glinski et al. 1997). Los pacientes presentan frecuentemente disfunción del oído medio (Berkowitz, Grundfast et al. 1991). La inteligencia es normal, a excepción de los pacientes que sufran complicaciones en el sistema nervioso central. La muerte puede ocurrir en el primer año de vida secundaria a una compresión en la unión cráneo-cervical que conduce a una apnea central (Hecht, Francomano et al. 1987). Se ha reportado una mortalidad incrementada secundaria a enfermedad cardíaca en adultos con acondroplasia (Wynn, King et al. 2007). Los principales hallazgos radiológicos son los huesos tubulares cortos y anchos, el estrechamiento de la distancia interpeduncular de la

columna en su porción distal, la hipoplasia vertebral con marcado aplanamiento, la radiolucencia femoral proximal y los cambios metafisiarios generalizados (Pauli 1993). El modo de herencia de la acondroplasia es autosómico dominante y su única causa conocida son las mutaciones en el gen *FGFR3* (Rousseau, Bonaventure et al. 1996).

### **1.2.3.2 Hipocondroplasia**

La hipocondroplasia es una displasia esquelética relativamente común. Su incidencia se aproxima a la acondroplasia puesto que se ha estimado en 1:15.000 – 1: 40.000 nacidos vivos (Kozlowski and Bartkowiak 1965). Los criterios clínicos y radiológicos de esta enfermedad son aún controversiales debido a que no se han establecido características únicas del síndrome y su expresión es muy variable entre individuos (Bober, Bellus et al. 2013). El diagnóstico de hipocondroplasia debe ser considerado en pacientes que presenten talla baja (hombres: 138-165 cm, mujeres: 128-151 cm, niños: 2-3 DE por debajo de la media), una apariencia “gruesa o robusta”, las extremidades con acortamiento rizomélico o mesomélico, una limitación a la extensión del codo, braquidactilia, hiperlaxitud articular leve y macrocefalia con rasgos faciales relativamente normales. Los pacientes presentan menos comúnmente escoliosis, *genu varo*, lordosis lumbar, déficit cognitivo de leve a moderado, osteoartritis en la edad adulta, *acantosis nigricans* y epilepsia del lóbulo temporal (Hulse, Lin et al. 2012) (Song, Balce et al. 2012, Bober, Bellus et al. 2013) (Alatzoglou, Hindmarsh et al. 2009) (Rousseau, Bonaventure et al. 1996) (Wynne-Davies and Patton 1991).

Dentro de las características radiológicas más comunes se encuentran el acortamiento de los huesos largos con ensanchamiento metafisiario (principalmente en la tibia y en el fémur), el estrechamiento interpeduncular en las vértebras lumbares inferiores, la braquidactilia leve a moderada y el cuello femoral amplio y corto (Heselson, Cremin et al.

1979). Sus características esqueléticas son similares a las encontradas en los pacientes con acondroplasia pero tienden a ser más leves, además las complicaciones médicas son menos frecuentes (Bober, Bellus et al. 2013). Las mutaciones en el gen *FGFR3* son las únicas conocidas como causales de la hipocondroplasia, pero se sospecha que existe heterogeneidad genética debido a que únicamente se han encontrado en aproximadamente el 70% de los pacientes con el diagnóstico clínico (Heuertz, Le Merrer et al. 2006). Su tipo de herencia es autosómica dominante (Bober, Bellus et al. 2013).

### **1.2.3.3 Displasia tanatofórica**

La incidencia de esta patología en estudios recientes se ha estimado en 1:20.000 recién nacidos pero puede llegar a ser mayor en ciertas poblaciones como en las del Norte de Irlanda (1:12.000 recién nacidos) (Barbosa-Buck, Orioli et al. 2012) (Donnelly, McConnell et al. 2010). Es una displasia esquelética usualmente letal en el periodo perinatal. Se clasifica en dos tipos según sus hallazgos clínicos. La tipo I se caracteriza por presentar micromelia, el fémur arqueado y en algunos casos la deformidad del cráneo en trébol en diferentes grados de severidad. La tipo II que se caracteriza por micromelia con el fémur normal y la presencia en todos los casos de deformidad del cráneo en trébol de moderada a severa (Karczeski and Cutting 2013). La displasia tanatofórica debe sospecharse ante la presencia de los huesos largos acortados y el tórax estrecho por detección prenatal o neonatal, especialmente cuando ocurre la muerte en este periodo (Lemyre, Azouz et al. 1999).

Los hallazgos ecográficos prenatales incluyen el acortamiento de los huesos largos (detectado entre las semanas 12 a 14 de la gestación), una translucencia nucal incrementada, un flujo reverso en el ducto venoso durante el primer trimestre, deficiencia de crecimiento con la longitud de las extremidades por debajo del percentil 5 a las 20 semanas de gestación,

vértebras y cráneo completamente osificados, platispondilia, ventriculomegalia, cavidad torácica estrecha, polihidramnios, encefalocele y deformidad del cráneo en trébol detectadas en el segundo a tercer trimestre de la gestación (Chen, Chern et al. 2001, Khalil, Pajkrt et al. 2011) (Martínez-Frías, Egüés et al. 2011) (Ferreira, Matias et al. 2004).

Durante el examen físico posnatal se pueden identificar presentes la macrocefalia, la fontanela anterior agrandada, el abombamiento frontal, la cara aplanada con un puente nasal deprimido, la proptosis ocular, la micromelia, la mano en tridente con braquidactilia, los pliegues de piel redundantes, el tórax estrecho con un abdomen protuberante, la hipotonía generalizada, el fémur arqueado (tipo I) y el cráneo en trébol (siempre en tipo II y algunas veces en tipo I) (Lemyre, Azouz et al. 1999, Passos-Bueno, Wilcox et al. 1999). Es una enfermedad causada por mutaciones en el gen *FGFR3*. Su tipo de herencia es autosómica dominante y la mayoría de pacientes tienen una mutación *de novo* (Bellus, Spector et al. 2000).

#### **1.2.3.4 Acondrogénesis tipo 1B**

No existen datos disponibles de la prevalencia de esta enfermedad infrecuente (Pagon, Adam et al. 2013). Es una patología letal en el periodo prenatal o poco tiempo después del nacimiento. Sus principales características clínicas son las extremidades muy cortas con braquidactilia en las manos y en los pies, la hipoplasia del tórax, el abdomen protuberante, la presencia de hernias inguinales y/o umbilicales, la apariencia fetal hidrópica causada por la abundancia de tejidos blandos relativo al pequeño esqueleto, la cara aplanada, el cuello corto y los tejidos blandos engrosados en el cuello (Pagon, Adam et al. 2013). Dentro de la descripción radiológica es posible encontrar desproporción entre un cráneo cercano al tamaño normal y un cuerpo muy pequeño, una osificación escasa o ausente de los cuerpos

vertebrales, las costillas pequeñas y delgadas, la osificación del hueso ilíaco limitada a la parte superior dando una apariencia de “parapente”, el acortamiento severo de los huesos tubulares y las falanges pobremente osificadas (Borochowitz, Lachman et al. 1988) (Warman, Cormier-Daire et al. 2011, Pagon, Adam et al. 2013). Esta enfermedad es causada por mutaciones en el gen *SLC26A2*. Su patrón de herencia es autosómico recesivo (Hästbacka, de la Chapelle et al. 1994).

#### **1.2.3.5 Acondrogénesis tipo 1A**

La prevalencia es desconocida pero también es una enfermedad muy poco frecuente (Kapur 2007). Se caracteriza por anomalías faciales variables dentro de las cuales se encuentran la cara aplanada y la protrusión de los ojos y de la lengua. También se observa un cuello corto, micromelia, un tronco muy pequeño, las costillas cortas y los huesos craneales delgados. En algunos casos se encuentra una apariencia fetal hidrópica al igual que en la acondrogénesis tipo 1B (Grigelioniene, Geiberger et al. 2013). Los pacientes tienen una formación ósea anormal en la columna vertebral, la pelvis y las extremidades pero los grados de severidad pueden ser variables. El tórax pequeño conduce a un pobre desarrollo pulmonar desencadenando la muerte temprana posterior al nacimiento (Aigner, Rau et al. 2007). Esta condición es causada por mutaciones en el gen *TRIP11* y su herencia es de tipo autosómica recesiva (Smits, Bolton et al. 2010).

#### **1.2.3.6 Acondrogénesis tipo 2**

La incidencia de la acondrogénesis tipo 2 ha sido estimada en 1: 40.000 – 1: 60.000 recién nacidos. Los pacientes que padecen este trastorno presentan el tórax estrecho, los huesos anormalmente cortos en las extremidades superiores e inferiores, las costillas delgadas, los pulmones poco desarrollados, el mentón pequeño y el paladar hendido. Tienen

una formación ósea anormal en la columna vertebral y en la pelvis (Kapur 2007). También se encuentra una apariencia fetal hidrópica y el abdomen protuberante. El pronóstico de vida es pobre y tienden a fallecer en el periodo prenatal o poco después del nacimiento al igual que en los demás tipos de acondrogénesis. Esta anomalía es originada por mutaciones en el gen *COL2A1*. Tiene un patrón de herencia autosómico dominante (Warman, Cormier-Daire et al. 2011) (Superti-Furga, Bonafé et al. 2001).

### **1.2.3.7 Osteogénesis imperfecta**

La osteogénesis imperfecta (OI) es un trastorno caracterizado por fracturas con trauma mínimo o ausente, dentinogénesis imperfecta de grado variable y pérdida auditiva en la edad adulta. Los hallazgos clínicos son muy variables y van desde deformidades esqueléticas severas asociadas a dificultades en la movilidad y talla muy baja hasta individuos asintomáticos con leve predisposición a fracturas, dentición normal y talla normal (Basel and Steiner 2009). Las fracturas pueden ocurrir en cualquier hueso pero son más comunes en las extremidades. La dentinogénesis imperfecta hace referencia a dientes de apariencia gris o café que pueden parecer traslúcidos con ruptura o fácil pérdida de las piezas dentales (Van Dijk and Silence 2014). Las características clínicas de la enfermedad incluyen las fracturas múltiples, la talla baja asociada frecuentemente a deformidad ósea, las escleras azules o grises, la dentinogénesis imperfecta, la hipoacusia pospuberal progresiva, la hiperlaxitud ligamentaria. La historia familiar de la enfermedad usualmente refiere a un patrón de herencia autosómico dominante (Basel and Steiner 2009).

Los principales hallazgos radiológicos consisten en las fracturas óseas en diferentes estadios, las vértebras en forma de pez, los huesos *wormianos* o supernumerarios, la protrusión acetabular y la osteopenia u osteoporosis (Cremin, Goodman et al. 1982) (Lund,

Mølgaard et al. 1999) (Roughley, Rauch et al. 2003). Esta patología ha sido clasificada en cuatro grupos por sus características clínicas, radiológicas, su historia natural y su historia familiar (Sillence, Senn et al. 1979) (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Su descripción clínica se realizará a continuación:

OI clásica no deformante con esclera azul (previamente llamada OI tipo I): los pacientes presentan la esclera azul y la talla normal. Algunos de ellos tienen arqueamiento femoral en el momento del nacimiento. Las fracturas se presentan más frecuentemente cuando el niño empieza la marcha, disminuyen en frecuencia durante la pubertad y vuelven a ser habituales en el estado posmenopáusico en la mujeres y posterior a la quinta década en hombres (Paterson, McAllion et al. 1984). Algunos pacientes cursan con dentinogénesis imperfecta. Además presentan hipermovilidad articular e hipoacusia progresiva en la edad adulta (van Dijk, Cobben et al. 2011).

OI prenatal letal (previamente llamada OI tipo II): las anomalías son evidentes desde el nacimiento con el peso y la talla bajos para la edad gestacional, las escleras azules oscuras y el tejido conectivo extremadamente frágil. El cráneo es de consistencia blanda y grande para el tamaño corporal, las extremidades son pequeñas y arqueadas, las caderas están habitualmente flexionadas y abducidas. Aunque algunos fetos mueren en el periodo prenatal o son espontáneamente abortados, la mayoría fallecen en el periodo perinatal temprano debido a una falla respiratoria asociada a fracturas costales y por el tórax pequeño (Byers, Tsipouras et al. 1988).

OI deformante progresiva (antes llamada OI tipo III): su diagnóstico es evidente al nacimiento. Ocurren múltiples fracturas desde el periodo perinatal secundarias a la simple manipulación del infante. Algunos de los pacientes fallecen por insuficiencia ventilatoria

debido a fracturas costales múltiples. Quienes sobreviven a este periodo evolucionan satisfactoriamente aunque la mayoría no logra la marcha por sí mismos y requieren uso de silla de ruedas por la severa fragilidad ósea y las deformidades esqueléticas. El crecimiento en estos pacientes es extremadamente lento y los adultos pueden alcanzar tallas tan bajas como un metro o menos. La inteligencia es normal. Pueden presentar macrocefalia relativa, dentinogénesis imperfecta y el tórax en tonel. La esclera es azul durante la infancia pero se aclara con el tiempo. La hipoacusia se inicia en la adolescencia y algunos pacientes pueden presentar impresión basilar (base craneal descendida respecto al límite superior de la odontoides) (Sillence, Barlow et al. 1986).

OI variable común con esclera normal (previamente llamada OI tipo IV): los pacientes exhiben talla levemente baja, dentinogénesis imperfecta, hipoacusia de inicio en la adultez y esclera normal o de color gris tenue, la impresión basilar puede presentarse (Hayes, Parker et al. 1999). Este grupo de pacientes presenta un espectro de severidad de la enfermedad muy amplio lo cual dificulta el diagnóstico (Rauch and Glorieux 2004).

Otros hallazgos relevantes en cualquier paciente con OI son la cara en forma triangular, el cráneo relativamente grande comparado con el tamaño corporal, la presencia de escoliosis, la artritis de inicio temprano, la fácil equimosis en la piel, el prolapso de la válvula mitral y la dilatación aórtica (McKusick 1972) (Hortop, Tsipouras et al. 1986). La inteligencia en estos pacientes es usualmente normal pero el desarrollo motor grueso puede estar retardado. Considerando todos los grupos la OI tiene una prevalencia de 6–7: 100000 nacimientos. La forma clásica no deformante y la variable común constituyen más de la mitad de los casos. Esta patología es causada por mutaciones en los genes *COL1A1* y *COL1A2* y

los cuatro grupos acá mencionados tienen una herencia autosómica dominante (Sillence, Senn et al. 1979).

### **1.2.3.8 Displasia diastrófica**

No existen datos exactos de la incidencia de esta enfermedad, pero se cree que se aproxima a 1: 100.000 recién nacidos (Bonafé, Mittaz-Crettol et al. 2013). Dentro de sus principales hallazgos clínicos están el cráneo de tamaño normal, los hemangiomas frontales, la frente amplia, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, el puente nasal deprimido, las narinas antevertidas, la nariz larga y delgada por hipoplasia de las alas nasales, el paladar hendido, la boca pequeña y la mandíbula normal. También puede observarse una protuberancia quística del pabellón auricular en el periodo neonatal, un leve acortamiento del tronco y un tórax pequeño por lo cual los pacientes pueden experimentar insuficiencia respiratoria. El abdomen es protuberante, las extremidades son cortas, los pulgares abducidos y proximalmente desplazados. Estos pacientes presentan contracturas de grandes articulaciones causando movilidad restringida. Son frecuentes las luxaciones de los radios, la desviación cubital de los dedos, la hendidura entre el primer y segundo dedos del pie y el pie equinovaro (Royce and Steinmann 2003, Barbosa, Sousa et al. 2011, Pagon, Adam et al. 2013). En los adultos la talla final alcanza entre 100 cm y 140 cm y es común la artrosis degenerativa de la cadera. El desarrollo mental y la inteligencia son usualmente normales (Horton, Hall et al. 1982).

Dentro de los hallazgos radiológicos se encuentran el cráneo de tamaño normal con un esqueleto pequeño y desproporcionado, la cifosis cervical, la osificación incompleta de las vértebras torácicas superiores con ensanchamiento del canal espinal cervical, las hendiduras coronales en las vértebras lumbares y en las torácicas inferiores, y el

estrechamiento de la distancia interpeduncular de L1 a L5. El esternón podría presentar duplicación de los centros de osificación. Las costillas más cefálicas son pequeñas y el tórax puede tener forma de campana. El íleon es hipoplásico y los acetábulos son planos. Los huesos largos se encuentran moderadamente acortados con ensanchamiento metafisiario, el húmero distal ocasionalmente es bífido o con forma de V y algunas veces hipoplásico. El fémur es distalmente redondeado, la patela puede parecer fragmentada, el radio y la tibia son arqueados y puede existir luxación proximal del radio al nacimiento (Vaara, Marttinen et al. 1997, Remes, Tervahartiala et al. 2002, Weiner, Jonah et al. 2008, Weiner, Jonah et al. 2010). La displasia diastrófica es causada por mutaciones en el gen *SLC26A2* y su modo de herencia es autosómico recesivo (Hästbacka, de la Chapelle et al. 1994, Rossi and Superti-Furga 2001).

#### **1.2.3.9 Displasia torácica asfixiante (síndrome de Jeune)**

La displasia torácica asfixiante (síndrome de Jeune) tiene una prevalencia aproximada de 1 en 100.000 a 1 en 130.000 individuos. Es un trastorno del crecimiento óseo caracterizado por una talla baja, el tórax estrecho, las costillas cortas, los huesos largos acortados en las extremidades superiores e inferiores, y polidactilia en los pies y en las manos (Baujat, Huber et al. 2013). Otras alteraciones esqueléticas incluyen las clavículas y los huesos pélvicos con formas anormales y los extremos distales de los huesos largos en forma de cono (Keppler-Noreuil, Adam et al. 2011). Muchos recién nacidos con esta condición presentan un tórax extremadamente estrecho en forma de campana que puede restringir el crecimiento y la expansión pulmonar llevando a una muerte temprana. Quienes sobreviven suelen presentar mejoría de su condición respiratoria a través del tiempo. Algunas personas presentan

anormalidades esqueléticas menos severas con alteraciones respiratorias más leves (Baujat, Huber et al. 2013).

Es posible encontrar alteraciones renales, cardíacas y estenosis subglótica y, menos frecuentemente, enfermedad hepática, quistes pancreáticos, anormalidades dentales y distrofia retinal (Schmidts, Arts et al. 2013, Schmidts 2014). Se han descrito mutaciones en al menos once genes como causales de la displasia torácica asfixiante. El primer gen asociado a la condición fue el *IFT80*. Estudios posteriores mostraron que las mutaciones en el gen *DYNC2H1* son la causa de más de la mitad de los casos. Aproximadamente el 70% de los pacientes con esta enfermedad tienen mutaciones en uno de los genes conocidos. Es una condición de herencia autosómica recesiva (Beales, Bland et al. 2007, Schmidts, Arts et al. 2013).

#### **1.2.3.10 Raquitismo**

Como se mencionó previamente, cuando se evalúa un paciente con talla baja desproporcionada, debe estudiarse la presencia de raquitismo debido a que es la forma más común de enfermedad ósea de origen metabólico en niños (Spranger 1984, Ramírez, Barros et al. 2013). La deficiencia de vitamina D es la causa más frecuente de esta patología aunque la insuficiente ingesta nutricional de calcio y fósforo genera signos clínicos similares. También ocurre cuando los metabolitos de vitamina D son deficientes (DeLuca 1986). Esta entidad generalmente empieza a manifestarse entre los 4 y los 18 meses de edad por las deficiencias nutricionales de la vitamina D y en el raquitismo hipofosfatémico ligado al X. Los niños pretérmino desarrollan cambios desde las siete semanas de edad si su dieta es inadecuada. Los signos clínicos de déficit de calcio ocurren después de los dos años de edad.

La insuficiencia de vitamina D durante la adolescencia resulta en osteomalacia (Bishop 1989, Robinson, Höglér et al. 2006, Dimitri and Bishop 2007).

El signo radiológico más temprano del raquitismo es la pérdida de la demarcación entre la placa de crecimiento y la metáfisis. Estos hallazgos progresan hasta las características radiológicas clásicas: la fragmentación y el ensanchamiento de las metáfisis principalmente visibles en las articulaciones radio-cúbito-carpianas, las rodillas y los tobillos. El periostio parece separado de la diáfisis. La osteomalacia aparece radiológicamente como una osteopenia generalizada con engrosamiento visible de las trabéculas. Una vez el niño empieza a caminar ocurre el arqueamiento de las extremidades inferiores por el debilitamiento de la tibia y el fémur. El *genu varo* con una distancia intercondilar de más de 5 cm es sugestivo de raquitismo y es la deformidad ósea más común en niños. El dolor óseo difuso es característico. La cifoescoliosis puede aparecer en niños mayores de dos años. La pelvis puede disminuir su diámetro anteroposterior llevando a una “pelvis plana” que en mujeres puede alterar posteriormente el trabajo de parto (Nozza and Rodda 2001). Después del año de edad puede aparecer el “rosario raquítrico” debido a una inflamación de las uniones costocondrales. También es posible encontrar *pectus carinatum* secundario a la tracción que ejercen los músculos sobre los huesos debilitados (Dimitri and Bishop 2007).

El craneotabes es el debilitamiento de los huesos del cráneo por falla en la osificación intramembranosa y está usualmente presente en estos pacientes desde la infancia temprana. La expansión de la bóveda craneal relativa al esqueleto facial causa abombamiento frontal y en algunos casos se ha encontrado un cierre retardado de la fontanela anterior e hipertensión endocraneana benigna. Además de los signos clínicos mencionados, en estos pacientes puede

observarse una talla baja desproporcionada (Econs and McEnery 1997, Wharton and Bishop 2003, Dimitri and Bishop 2007).

Otros posibles hallazgos en el raquitismo son la erupción dental retardada y la hipoplasia del esmalte dental. Es probable encontrar convulsiones hipocalcémicas, tetania, apneas y estridor en niños menores de 6 meses. También son frecuentes la cardiomiopatía hipertrófica o dilatada, la prolongación del intervalo QT, las arritmias, la hipotensión o la falla cardíaca secundarios a hipocalcemia. Igualmente es probable que aparezca debilidad muscular debida a miopatía proximal, a anemia o a pancitopenia (Rugg-Gunn, Al-Mohammadi et al. 1998, Uysal, Kalayci et al. 1999, Dimitri and Bishop 2007).

#### **1.2.4 Talla alta patológica**

En el otro extremo de los trastornos del crecimiento se encuentran aquellos defectos por aumento excesivo de la talla y el peso, o también llamados los síndromes de sobrecrecimiento. Las condiciones patogénicas que pueden resultar en estas enfermedades son limitadas frente a las numerosas situaciones que generan una baja tasa de crecimiento (Graham 2007). Estos pacientes presentan talla alta, definida por una altura en bipedestación mayor a 2 desviaciones estándar (DE) para la media de la misma población y el género (Sotos, Dodge et al. 1964).

Estas enfermedades también se clasifican según su origen en la etapa prenatal o posnatal. La mayoría de trastornos de sobrecrecimiento prenatales persisten después del nacimiento y en algunos casos el déficit cognitivo, el riesgo de desarrollo tumoral o ambos, son características importantes asociadas (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Los factores relacionados con un sobrepeso fetal incluyen la predisposición genética, la ganancia de peso

materno excesivo, la obesidad materna, la diabetes, la posmadurez y la multiparidad (Stothard, Tennant et al. 2009, Ouzounian, Hernandez et al. 2011).

A nivel celular, el exceso primario de crecimiento resulta de una hiperplasia celular intrínseca, mientras que el exceso secundario de crecimiento se debe a una estimulación por factores mediados humoralmente fuera del sistema esquelético (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). Entre los trastornos de sobrecrecimiento patogénicos, la mayoría de aquellos de inicio prenatal son de tipo primario como el síndrome Beckwith Wiedemann o el síndrome Sotos (Choufani, Shuman et al. 2010). El exceso de crecimiento secundario de inicio prenatal es usualmente no sindrómico como la macrosomía diabética.

El sobrecrecimiento de inicio posnatal es generalmente secundario, este involucra la sobreproducción de estrógenos, de andrógenos, de GH o de hormona tiroidea, como por ejemplo durante la acromegalia y el hiperinsulinismo. Menos frecuentemente los trastornos de sobrecrecimiento primarios se manifiestan en el periodo posnatal. Algunos ejemplos de ellos son el síndrome de Klinefelter, la homocistinuria y el síndrome de Marfan (Argente, Pérez-Jurado et al. 2000, Dvorkin, Dvorkin et al. 2010, Warman, Cormier-Daire et al. 2011).

### **1.2.5 Talla baja esencial**

La talla baja esencial hace parte de un grupo de patologías que han sido clasificadas como enfermedades aisladas. Se trata de disfunciones poco frecuentes en las cuales el crecimiento está severamente restringido desde etapas muy tempranas del desarrollo que continúa en la etapa posnatal. Estos pacientes también presentan microcefalia severa y otros hallazgos clínicos típicos específicos de cada síndrome. Los síndromes explicados hasta ahora hacen parte de los trastornos más frecuentes dentro de la clasificación general de

alteraciones en el crecimiento y aunque algunas de estas comparten las características típicas de talla baja y microcefalia con la talla baja esencial, presentan signos adicionales que las diferencian de esta. Por tratarse del tema principal de la presente tesis, la talla baja esencial se abordará de forma detallada a continuación.

### **1.2.5.1 Mecanismos y vías de la falla del crecimiento en el enanismo esencial**

#### **1.2.5.1.1 Determinantes del tamaño de un organismo**

La medida de un animal u órgano depende del número y tamaño de sus células, así como de la cantidad de matriz y de fluido extracelular. Los órganos de los vertebrados son habitualmente formados primero en tamaño muy reducido para luego aumentar mediante división celular. De esta manera el interrogante principal del control del tamaño de un organismo se asocia a la determinación de la masa celular total (Conlon and Raff 1999). Existen factores locales y sistémicos conocidos que definen el tamaño de los órganos, como las hormonas GH y la IGF1. Está claro que aunque los genes determinan en gran proporción el tamaño de los órganos, los factores medioambientales como la nutrición tienen una importante función. Las diferencias en las dimensiones entre los animales de la misma o de diferente especie están determinadas por una desigualdad en el tamaño, en el número celular o en ambas características. El número de células depende del balance entre la división y la muerte celular mientras que el tamaño de las mismas es controlado por moléculas de señalización intra y extracelulares que lo regulan (Conlon and Raff 1999).

El crecimiento de las células no depende de la progresión a través del ciclo de división celular. Por lo tanto las mutaciones que bloquean la progresión de este ciclo no detienen el crecimiento celular (Johnston, Pringle et al. 1977, Weigmann, Cohen et al. 1997). El aumento de tamaño en las células animales depende generalmente de los factores de crecimiento

extracelulares producidos por otras células. Estos factores activan las vías de señalización intracelular que estimulan la síntesis proteica y otros procesos biosintéticos para que la tasa de síntesis de macromoléculas exceda la tasa de degradación. Una de las vías más importantes en este proceso es la de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) la cual activa la cascada de serina/treonina quinasa (Zetterberg, Engström et al. 1984, Thomas and Hall 1997). Es importante resaltar que también existe un límite en el crecimiento celular incluso cuando hay cantidades excesivas de factores de crecimiento y de nutrientes, lo cual está determinado principalmente por genes específicos. Los mecanismos intracelulares que limitan la biosíntesis (y por lo tanto limitan el crecimiento y el tamaño celular) son aún desconocidos (Britton and Edgar 1998).

Existe una relación establecida entre el tamaño de la célula y el ADN nuclear, más específicamente con su ploidía. Por ejemplo una célula tetraploide tiene dos veces el tamaño de una célula diploide del mismo tipo. Esta característica es común en todos los organismos que han sido examinados (Nurse 1985). Sin embargo, la relación entre la ploidía y el tamaño celular no se extiende hasta el tamaño del organismo completo o de sus órganos, puesto que los animales poliploides usualmente compensan este fenómeno porque tienen menor número de células que el correspondiente en animales diploides (Fankhauser 1952, Eakin and Behringer 2003). Los factores de supervivencia celular también son necesarios para alcanzar el tamaño final del organismo puesto que de ellos depende el control de la muerte celular programada. Por ejemplo, cuando hay una sobreproducción de GH durante el desarrollo, se produce una excesiva masa celular total debido al estímulo incrementado sobre el IGF1 que es un potente factor de crecimiento y de supervivencia para muchos tipos celulares (Palmiter, Norstedt et al. 1983, Raff 1992).

Los mitógenos extracelulares y las moléculas inhibitorias regulan la división o la proliferación celular para asegurar que las células animales únicamente se dividan cuando se requiere un mayor número de ellas (Sherr and Roberts 1995). Los mitógenos activan las vías de señalización intracelular que inducen la producción y/o la activación de factores del sistema de control del ciclo celular para favorecer el progreso a través del ciclo (Brooks and Riddle 1988). De manera contraria, los inhibidores de la proliferación activan las vías de señalización intracelular que estimulan la producción de componentes del sistema de control para detener el progreso a través del ciclo celular, habitualmente en la fase G1 (Sherr 1994). Así mismo, la concentración de un mitógeno puede influenciar la tasa de progresión del ciclo celular aumentando la velocidad del ciclo cuando incrementa la concentración del mitógeno o viceversa (Gao and Raff 1997, Conlon and Raff 1999).

Las proporciones que alcanza un organismo son establecidas desde el momento en que la embriogénesis empieza. Los organismos de cada especie logran tamaños reproducibles con poca variación. De igual manera los órganos crecen hasta lograr tamaños acorde a las dimensiones del organismo completo, aunque los mecanismos por los cuales los programas genéticos fijan esos límites siguen siendo desconocidos (Klingseisen and Jackson 2011). En los mamíferos las variaciones en las medidas parecen estar determinadas por el número de células. Por ejemplo, se ha observado una diferencia en la masa corporal aproximada de 3.000 veces entre los humanos y los ratones asociado a una desigualdad de las mismas veces en el número de células (Conlon and Raff 1999).

Aunque la cantidad de células haya sido establecida como el factor determinante en las diferencias de tamaño de las especies, éste es un fenómeno complejo constituido por la unión de muchos factores que participan en procesos como la proliferación, la diferenciación

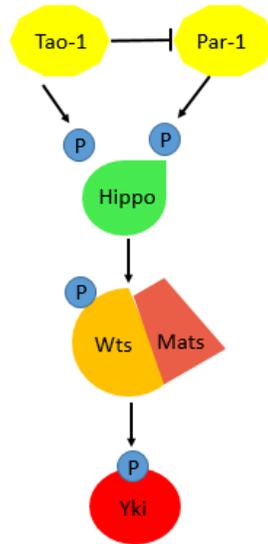
y la muerte celular (Conlon and Raff 1999). En levaduras existe un “punto de restricción” donde las células frenan su progreso en G1 o en G2 si no han alcanzado un tamaño mínimo (Hartwell, Culotti et al. 1974, Nurse 1975, Jorgensen and Tyers 2004).

#### **1.2.5.1.2 Principales vías de señalización reguladoras del crecimiento**

Los organismos requieren de las vías de señalización sutilmente reguladas para el control y la coordinación del desarrollo del crecimiento. Estas vías necesitan de una integración de múltiples factores y la sucesiva acción de efectores sobrelapados que regulan el crecimiento actuando sobre la masa, la supervivencia y/o la proliferación celular (Klingseisen and Jackson 2011). Las hormonas de crecimiento tienen un efecto importante en la talla final adulta y las mutaciones en los factores integrantes del eje GH/IGF1 causan una alteración en la talla (Savage, Burren et al. 2010). Corriente abajo del receptor de IGF1 ésta vía interactúa con otras señales del crecimiento por medio de la quinasa blanco de rapamicina (TOR). A través de una gran red de señalización esta proteína integra la IGF1, los factores de crecimiento, los nutrientes y la energía celular (Caron, Ghosh et al. 2010). También promueve el inicio de la traducción a través de la fosforilación y la activación de la maquinaria traduccional, promoviendo la síntesis de proteínas y evitando su degradación, aumentando así la masa celular (Wullschleger, Loewith et al. 2006) (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

La quinasa Hippo serina/treonina es una vía regulatoria del crecimiento conservada desde la *Drosophila* hasta los mamíferos. Corriente abajo la vía Hippo inhibe la actividad del coactivador transcripcional Yorkie por medio de su fosforilación y su expulsión nuclear (Khaykin, Kotzerke et al. 2014) (Dong, Feldmann et al. 2007). Yorkie interactúa con diversos blancos transcripcionales para la inducción de la proliferación y de la supervivencia celular

por lo cual, al parecer, esta vía promueve la transición de la proliferación a la quiescencia celular (Tapon, Harvey et al. 2002, Neto-Silva, de Beco et al. 2010, Ziosi, Baena-López et al. 2010) (Pan 2010). **(Figura 4)**



**Figura 4.** Vía quinasa Hippo serina/treonina (tomado y modificado de Dong, 2007)

La vía de la quinasa reguladora de la señal extracelular (ERK1/2), MAPK se activa en respuesta a los factores mitogénicos en múltiples tipos celulares (Meloche and Pouyssegur 2007). La unión de los mitógenos a los receptores de la superficie celular inicia una cascada intracelular de quinasas que a su vez activan la quinasa ERK1/2, la cual fosforila varios sustratos proteicos (Lewis, Shapiro et al. 1998, Pearson, Robinson et al. 2001). La actividad de ERK 1/2 es requerida para la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, para la estimulación de los reguladores positivos y para la inhibición de la expresión de los genes antiproliferativos. También está involucrada en la síntesis de proteínas y de esta forma en el crecimiento celular por medio de activación de la vía mTOR (Yamamoto, Ebisuya et al. 2006, Meloche and Pouyssegur 2007) (Carrière, Cargnello et al. 2008).

Los morfógenos también han demostrado ser potentes agentes promotores del crecimiento por medio de la interrelación con las vías de señalización en donde actúan importantes factores como el WNT, el TGF- $\beta$ , el Sonic Hedgehog (SHH) y el NOTCH (Leervers and McNeill 2005, Crickmore and Mann 2008). Estos factores ejercen funciones en la vía Hippo y son importantes para el mantenimiento de la homeostasis tisular por medio de la regulación de las tasas de renovación de las células madre y la proliferación o la diferenciación de las células progenitoras (Alarcón, Zaromytidou et al. 2009, Varelas, Miller et al. 2010, Zhao, Li et al. 2010, Heallen, Zhang et al. 2011). Adicionalmente, los morfógenos influyen en el número celular por medio de la promoción de la diferenciación que usualmente resulta en la salida del ciclo celular y a través de su acción sobre las células madre regulando su proliferación y su diferenciación (Katoh 2007). A pesar de los conocimientos adquiridos por medio de los numerosos estudios de las vías regulatorias del crecimiento la forma como se establece el tamaño de un organismo permanece sin ser determinada (Klingseisen and Jackson 2011).

### **1.2.5.2 Genes y mutaciones asociadas a la etiología del enanismo esencial**

A la fecha mutaciones en 15 genes principales han sido asociadas con enanismo esencial microcefálico. Algunas de estas moléculas tienen funciones biológicas superpuestas en el ciclo celular.

#### **1.2.5.2.1 *ATR***

*ATR* (Ataxia telangiectasia y relacionado con Rad3 ó proteína relacionada con FRAP1/FRP1) abarca 130 kb y su localización cromosómica es 3q23 (MIM\*601215). Este gen codifica para una proteína de 2.644 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína *ATR* (ATM-y relacionada con Rad3) quinasa es un miembro de la familia de proteínas

serina/treonina quinasa (PIKK) fosfoinositol 3- quinasa (PI3K). ATR es un sensor de daño del ADN y forma un complejo estable con ATRIP (Cortez, Guntuku et al. 2001). Cuando la replicación del ADN se detiene una hebra de ADN de cadena única queda expuesta para ser recubierta por la proteína de replicación A (RPA) la cual recluta a ATR a través de su unión con ATRIP. Una vez activada, ATR fosforila y activa múltiples quinasas efectoras corriente abajo (BRCA1, CHEK1, MCM2, RAD17, RPA2, SMC1, and TP53) las cuales inhiben la replicación del ADN y la mitosis, promueven la reparación del ADN y fosforilan la histona H2AX en los sitios de daño del ADN (Alderton, Joenje et al. 2004). El ATR activado con CHK1 coordina la replicación del ADN, su reparación y la transición al ciclo celular (Matsuoka, Ballif et al. 2007). ATR es entonces un regulador esencial de la integridad del genoma y coordina el origen de la replicación del ADN, los puntos de chequeo del ciclo celular y la reparación del ADN (Tanaka, Weinel et al. 2012).

Los individuos afectados por mutaciones en este gen padecen de síndrome de Seckel típico con microcefalia severa (MIM\*210600) (Goodship, Gill et al. 2000). Además, este gen ha sido asociado con el síndrome de cáncer y telangiectasias cutáneas familiar (MIM\*614564).

#### **1.2.5.2.2 *NIN***

*NIN* (nineína o proteína de interacción GSK3B) abarca 130 kb y su localización cromosómica es 14q22.1 (MIM\*608684). El transcrito más largo codifica para una proteína de 2133 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína coiled-coil Nineína es importante para la función centrosómica. En células en interfase la Nineína está localizada en el centrosoma formando estructuras tubulares oligoméricas, disminuye en la metafase y en la anafase y reaparece en la telofase. Esta proteína es importante para el posicionamiento

de los microtúbulos y constituye un enlace molecular entre las actividades de nucleación y de anclaje de los microtúbulos en el centrosoma (Hong, Chen et al. 2000). PCM1 es requerida para su localización centrosómica. La Nineína es entonces una proteína centrosómica requerida para el funcionamiento del centro organizador de microtúbulos (MTOC) y es esencial para la reforma de la arquitectura del centrosoma en la interfase seguida a la mitosis (Ou, Mack et al. 2002). Las mutaciones en el gen *NIN* han sido asociadas con el síndrome de Seckel (MIM\*614851).

#### **1.2.5.2.3 *ATRIP***

*ATRIP* (proteína de interacción con ATR) abarca 21 kb y su localización cromosómica es 3p21.31 (MIM\*606605). El transcrito más largo codifica para una proteína de 791 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína ATRIP es un componente del punto de chequeo al daño del ADN, que forma un heterodímero con ATR (Cortez, Guntuku et al. 2001). Se une a una hebra simple de ADN recubierta con la proteína RPA que se acumula en los sitios de daño del ADN. ATRIP media la acumulación de ATR en la cromatina alterada por una interacción con el complejo RPA resultando en la acumulación de ATR quinasa inducida por el daño en el ADN. Las mutaciones en el gen *ATRIP* han sido asociadas con síndrome de Seckel (Zou and Elledge 2003).

#### **1.2.5.2.4 *RBBP8***

*RBBP8* (proteína de unión al retinoblastoma 8 o *CTIP*) abarca 228 kb y su localización cromosómica es 18q11.2 (MIM\*604124). El transcrito más largo codifica para una proteína de 897 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína endonucleasa nuclear RBBP8 coopera con el complejo MRN (MRE11-RAD50-NBN) en el procesamiento

meiótico y mitótico de las rupturas de doble cadena. Pertenece a un complejo con el co-represor transcripcional CTBP. RBBP8 cumple una función principal en la actividad de ATR/ATRIP corriente abajo del complejo MRN para promover la activación de ATR y su reclutamiento en las rupturas de doble cadena en la fase S/G2 (Yu and Baer 2000). RBBP8 forma un complejo con BRCA1 que regula la activación de CHK1 y controla el punto de chequeo G2/M del ciclo celular en el daño del ADN (Wong, Ormonde et al. 1998). En ausencia de RBBP8, el procesamiento de las rupturas de doble cadena (DBS) se altera, la activación de ATR se reduce y las células mutantes no responden adecuadamente al daño del ADN (Qvist, Huertas et al. 2011). Las tres mutaciones en *RBBP8* reportadas conducen a una pérdida de función y han sido asociadas con el síndrome de Jawad (MIM\*251255), el carcinoma pancreático y el síndrome de Seckel (MIM\*606744).

#### **1.2.5.2.5 *CEP152***

*CEP152* (proteína centrosómica de 152 kd) abarca 98 kb y su localización cromosómica es 15q21.1 (MIM\*613529). El transcrito más grande codifica para una proteína de 1.710 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína CEP152 se localiza en la periferia de los centriolos. Es una proteína de andamiaje que promueve la acumulación centrosómica de CENPJ y PLK4. Es reclutada por CEP63 para formar un anillo en el extremo proximal de los centriolos parentales y es requerida para su duplicación (Sonnen, Gabryjonczyk et al. 2013). Las células en interfase de los tejidos de individuos afectados muestran una variedad de anormalidades morfológicas como células multinucleadas, centrosomas sin microtúbulos astrales (microtúbulos que sólo existen inmediatamente antes y durante la mitosis), centrosomas fragmentados y micronúcleos (Dzhindzhev, Quan et al. 2010). En metafase los cromosomas están mal alineados y se observa un haz monopolar y

uno tripolar con centrosomas estructuralmente anormales, un exceso de células anafásicas tempranas y defectos en la citocinesis. Los errores en la segregación mitótica conducen a aneuploidías variables en el 10% de las células de un individuo afectado (Kalay, Yigit et al. 2011).

La función alterada de CEP152 se asocia a una acumulación de defectos genómicos que resultan de estrés replicativo a través de una activación aumentada de la señalización ATM provocando retrasos en la entrada a la fase S y en la progresión G2/M. CEP152 es un componente principal del centro organizador de microtúbulos en las células animales. Este factor influencia la forma, la polaridad y la motilidad celular, y tiene una función esencial en la división celular (Andersen, Wilkinson et al. 2003).

Mutaciones en el gen *CEP152* en 7 familias con síndrome de Seckel han sido reportadas. Una mutación recurrente (c.261+1G>C) se identificó en múltiples individuos no relacionados de origen turco (Kalay, Yigit et al. 2011). Las mutaciones en este gen han sido asociadas con la microcefalia primaria autosómica recesiva (MIM\*614852) y el síndrome de Seckel (MIM\*613823).

#### **1.2.5.2.6 *CENPJ***

*CENPJ* (proteína centromérica J) abarca 86 kb y su localización cromosómica es 13q12.12 (MIM\*609279). El transcrito principal codifica para una proteína de 1.138 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína CENPJ (también conocida como CPAP) contiene cinco dominios coiled-coil CC4 (un dominio se une a los dímeros de tubulina y es importante para la elongación del centriolo) y un dominio C-terminal que interactúa con CEP152. CENPJ está presente en el citoplasma de las células en proliferación.

Durante la biogénesis del centriolo CENPJ está concentrada dentro del lumen proximal de los centriolos parentales, los procentriolos y la matriz pericentriolar (Chen, Chern et al. 2001, Tang, Fu et al. 2009). Es reclutada en el centrosoma por CEP152 junto con PLK4 y está asociada con el complejo en anillo de gamma-tubulina para formar un homodímero (Cizmecioglu, Arnold et al. 2010). (Zhao, Jin et al. 2010).

La fosforilación de CENPJ por PLK2 y PLK4 incrementa en la transición de la fase G1/S y disminuye durante la finalización de la mitosis. CENPJ está involucrada en el desensamblaje de los microtúbulos en el centrosoma (Basto, Lau et al. 2006). Se cree que las mutaciones en el gen llevan a la producción de proteínas no funcionales. CENPJ es entonces una proteína centrosómica con una función principal en la regulación del proceso de ensamblaje y la nucleación de los microtúbulos (Hung, Tang et al. 2000).

Mutaciones con pérdida de función en este gen fueron observadas en múltiples pacientes con el fenotipo de microcefalia primaria (Darvish, Esmaeeli-Nieh et al. 2010). Las mutaciones en el gen *CENPJ* han sido asociadas con la microcefalia primaria autosómica recesiva (MIM\*608393) y el síndrome de Seckel (MIM\*613676).

#### **1.2.5.2.7 *CEP63***

*CEP63* (proteína centrosómica de 63 kd) abarca 89 kb y su localización cromosómica es 3q22.2 (MIM\*614724). El transcrito codifica para una proteína de 1.140 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína CEP63 contiene seis dominios coiled-coil. Esta proteína se localiza en el centrosoma durante todo el ciclo celular y mediante el extremo N-terminal interactúa con CEP152 para formar un anillo en el extremo proximal de los centriolos parentales en donde se predice que ocurre su acoplamiento con los procentriolos

(Sir, Barr et al. 2011). CEP63 recluta en el centrosoma a CDK1, una quinasa mitótica (Löffler, Fechter et al. 2011).

Luego del daño del ADN (como en las rupturas de doble cadena), CEP63 es removido de los centrosomas inactivando el ensamblaje del huso y retardando la progresión mitótica. La ausencia de CEP63 retrasa el ensamblaje de los procentriolos y altera el acoplamiento de los centriolos. Las células carentes de CEP63 muestran defectos estructurales como los husos mono y multipolares. Además presentan abolición de la mitosis causando endopoliploidía (un estado poliploide en el cual los cromosomas se han dividido repetidamente sin división subsecuente del núcleo o de la célula) (Löffler, Fechter et al. 2011, Sir, Barr et al. 2011). CEP63 es entonces una subunidad del centrosoma que participa en la forma, la polaridad y la motilidad celular, con una función esencial en la división celular (Andersen, Wilkinson et al. 2003). Las mutaciones en el gen *CEP63* han sido asociadas con el síndrome de Seckel (MIM\*614728).

#### **1.2.5.2.8 *PHC1***

*PHC1* (proteína polihomeótica 1 o proteína reguladora del desarrollo temprano 1, EDR1) abarca 28 kb y su localización cromosómica es 12p13.31 (MIM\*602978). El transcrito codifica una proteína de 1.004 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). Las estructuras PRC (*Polycomb repressive complexes*) 1 y 2 son complejos proteicos que funcionan como represores transcripcionales de silenciamiento de numerosos genes durante el desarrollo mediante la remodelación de la cromatina y la modificación de las histonas. La proteína PHC1 es un componente del complejo PRC1 y actúa como una ligasa de ubiquitina E3 implicada en la ubiquitinación de H2A y de geminina (Ohtsubo, Yasunaga et al. 2008). PHC1 está también involucrada en la reparación del ADN y es reclutada en regiones de

cromatina en respuesta al daño del ADN (Awad, Al-Dosari et al. 2013). Las mutaciones en el gen *PHCI* han sido asociadas con la microcefalia primaria autosómica recesiva (MIM\*615414) y el síndrome de Seckel (Pagon, Adam et al. 2013).

#### **1.2.5.2.9 *RNU4ATAC***

*RNU4ATAC* (RNA pequeño nuclear U4ATAC) tiene una localización cromosómica en 2q14.2 (MIM\*601428). El complejo de ribonucleoproteínas del *spliceosoma* menor U12 dependiente comprende los snRNA U11, U12, U4atac, U5 y U6atac (Edery, Marcaillou et al. 2011). Está estructural y funcionalmente relacionado con los snRNA del *spliceosoma* principal U2 dependiente U1, U2, U4, U5 y U6. El genoma humano contiene aproximadamente 700 intrones del tipo U12 removidos por el *spliceosoma* menor (Levine and Durbin 2001, Alioto 2007). Los intrones de tipo U12 se caracterizan por presentar secuencias de reconocimiento de *splicing* consenso (Sharp and Burge 1997).

La mayoría de los genes que contienen intrones tipo U12 están involucrados en funciones celulares importantes como la replicación y la reparación del ADN, la transcripción, el procesamiento y el transporte de ARN, la traducción y la organización del citoesqueleto. El ARN pequeño nuclear U4ATAC es entonces un componente del *spliceosoma* menor y es requerido para el corte apropiado de los intrones tipo U12 dependientes (He, Liyanarachchi et al. 2011). Las mutaciones en el gen *RNU4ATAC* han sido asociadas con el enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo I/III (MOPD I/III) (MIM\*210710).

#### **1.2.5.2.10 *ORC1***

*ORC1* (complejo de reconocimiento de origen, subunidad 1) tiene una localización cromosómica en 1p32.3 (MIM\*601902). Este gen codifica para una proteína de 861 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). Ha sido demostrado que la expresión de la proteína *ORC1* humana es baja en las células de los fibroblastos quiescentes y es inducida por la estimulación del crecimiento celular. Se ha determinado que existe una relación directa entre el inicio de la replicación del ADN y la vía regulatoria del crecimiento celular involucrando la quinasa dependiente de la ciclina G1, el supresor tumoral Rb y el E2F (Ohtani, DeGregori et al. 1996). Se ha establecido que la regulación de *ORC1* podría ser un mecanismo importante en el mantenimiento de la ploidía de las células humanas debido a que presenta variación durante el ciclo celular. Es expresado en células rápidamente proliferativas y cuando las células entran a la fase S sufre ubiquitinación y degradación (Méndez, Zou-Yang et al. 2002).

Se ha descrito una función de la proteína *ORC1* en el control del número de copias de los centriolos y de los centrosomas en las células humanas, independientemente de su función en la replicación del ADN (Hemerly, Prasanth et al. 2009). La depleción de la proteína en peces ha sido asociada a un fenotipo de reducción general en el tamaño de los tejidos similar a lo observado en pacientes con síndrome de Meier Gorlin (Bicknell, Walker et al. 2011, Kuo, Song et al. 2012). *ORC1*, una subunidad del complejo de reconocimiento de origen, es entonces un componente fundamental de la maquinaria de la replicación del ADN. También tiene una función en el control del número de copias de los centriolos y los centrosomas en las células humanas independientemente de su papel en la replicación del

ADN (Hemerly, Prasanth et al. 2009). Las mutaciones en el gen *ORC1* están asociadas con el síndrome de Meier Gorlin (Guernsey, Matsuoka et al. 2011) (MIM\*224690).

#### **1.2.5.2.11 *ORC4***

*ORC4* (complejo de reconocimiento de origen, subunidad 4) tiene una localización cromosómica en 2q22.3-q23.1 (MIM\*603056). Este gen codifica para una proteína de 436 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). En estudios de inmunoprecipitación pudo ser determinado que la proteína humana *ORC4* se asocia con múltiples proteínas celulares, incluyendo *ORC2 in vivo* (Quintana, Hou et al. 1997). Las alteraciones en el complejo pre-replicación reducen la fase G1 del ciclo celular y de esta manera limitan la cantidad de tiempo disponible para el reconocimiento del origen de replicación. Esto impide la proliferación celular resultando en una reducción total del número de células y en una detención del crecimiento (de Munnik, Hoefsloot et al. 2015). Las mutaciones en el gen *ORC4* han sido asociadas con el síndrome de Meier Gorlin (MIM\*613800).

#### **1.2.5.2.12 *ORC6***

*ORC6* (complejo de reconocimiento de origen, subunidad 6) tiene una localización cromosómica en 16q11.2 (MIM\*607213). El gen codifica para una proteína de 252 aminoácidos (Dhar and Dutta 2000). Se ha reportado que la proteína *ORC6* interactúa con múltiples proteínas celulares. Sin embargo este proceso no se efectúa con otras subunidades *ORC* (Dhar and Dutta 2000). Durante la mitosis se localiza en los cinetocoros y en una estructura reticular alrededor de la periferia de la célula. Ha sido implicada en la coordinación de la replicación y en la segregación con la citocinesis (Prasanth, Prasanth et al. 2002).

El silenciamiento de *ORC6* por siRNA (*small interfering RNA*) resultó en células con los husos multipolares, la mitosis aberrante, con formación de células multinucleadas y con la replicación del ADN disminuida. Periodos prolongados de depleción de *ORC6* terminaron en la disminución de la proliferación celular y en el incremento de la muerte celular (Prasanth, Prasanth et al. 2002). Las mutaciones en el gen *ORC6* han sido asociadas con el síndrome de Meier Gorlin (MIM\*613803).

#### **1.2.5.2.13 *CDT1***

*CDT1* (factor de licencia de cromatina y de replicación de ADN 1) tiene una localización cromosómica en 16q24.3 (MIM\*605525). El gen codifica para una proteína de 546 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). La proteína codificada tiene la capacidad de unirse a la geminina que evita la replicación. De esta forma podría prevenir el inicio de la replicación en orígenes inapropiados (Wohlschlegel, Dwyer et al. 2000). La fosforilación de esta proteína por la quinasa dependiente de ciclina A resulta en su degradación (Whittaker, Royzman et al. 2000). Al parecer la disociación entre *ORCA* y *CDT1* es un paso importante en el desensamblaje del complejo pre-replicación al final de la fase G1 (Shen, Chakraborty et al. 2012). Las mutaciones en el gen *CDT1* han sido asociadas con el síndrome de Meier Gorlin (MIM\*613804).

#### **1.2.5.2.14 *CDC6***

*CDC6* (gen del ciclo de división celular 6) tiene una localización cromosómica en 17q21.2 (MIM\*602627). El gen codifica para una proteína de 560 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005). Fue demostrado que la proteína *CDC6* se expresa selectivamente en las células proliferantes pero no en las células quiescentes de los mamíferos. Se ha observado

que la expresión de la proteína CDC6 en la especie humana es regulada en respuesta a las señales mitógenas a través de los mecanismos de control transcripcional que involucran las proteínas E2F. CDC6 es requerida para el inicio de la replicación del ADN en los mamíferos (Yan, DeGregori et al. 1998).

Al parecer, la desfosforilación de CDC6 por la proteína fosfatasa 2A (PP2A) es un evento regulatorio que controla el inicio de la replicación del ADN en los mamíferos (Yan, DeGregori et al. 1998). Las mutaciones en el gen *CDC6* han sido asociadas con el síndrome de Meier Gorlin (MIM\*613805).

Las características del gen *PCNT* serán abordadas a continuación en el contexto del enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo II (MOPD II) puesto que es una de las temáticas principales de esta tesis. La mayoría de los estudios experimentales de este trabajo se localizaron en este gen.

#### **1.2.5.2.15 *PCNT***

El gen *PCNT* también llamado gen de la pericentrina o kendrina (MIM\*605925), fue mapeado en 21q22.3 por medio de amplificación por PCR, análisis con *Southern blot* y FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Está constituido por 47 exones codificantes y tiene una longitud de 10560 pb (Hamosh, Scott et al. 2005). Se conocen tres variantes de *splicing* de genes ortólogos en los ratones y en los humanos. La forma más larga, llamada *PCNT B*, está presente tanto en los ratones como en los humanos. Dos formas más pequeñas llamadas *Pcnt A* y *Pcnt S* se conocen únicamente en los ratones (Mühlhans, Brandstätter et al. 2012).

Se han realizado estudios de expresión en tejidos neuronales de ratones mediante RT-PCR encontrando expresión de una de las variantes de *splicing* pequeñas, la *Pcnt S*, en células

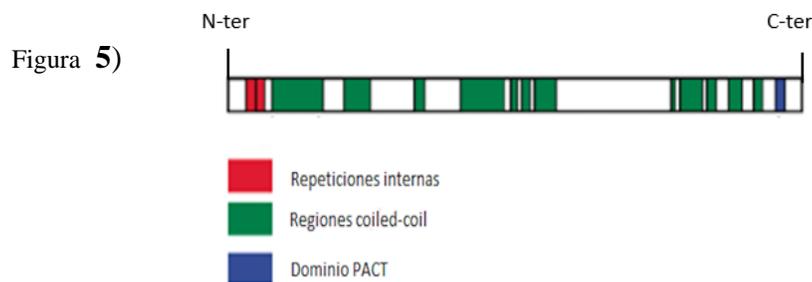
fotoreceptoras y en el resto de la retina. *Pcnt B* se encuentra en menores cantidades en los fotorreceptores pero sí se expresa abundantemente en otras células retinales y en otros tejidos neuronales. La variante de *splicing B* se expresa además en el epitelio olfatorio y en una línea celular NIH 3T3 de fibroblastos de ratón (Li, Hansen et al. 2001, Mühlhans, Brandstätter et al. 2012). Las mutaciones en este gen causan enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo II (MOPD II) en la especie humana. En los ratones se cree que no tienen efectos globales sino específicos en las células o en los tejidos (Mühlhans and Giebl 2012).

La **Tabla 1** resume las características de los genes asociados con el enanismo esencial microcefálico.

### 1.2.5.3 Proteína PCNT

#### 1.2.5.3.1 Características estructurales

El gen *PCNT* codifica para la proteína PCNT (pericentrina 2, pericentrina B, kendrina) que se expresa en el centrosoma y está involucrada principalmente en la organización de los microtúbulos durante la mitosis y la meiosis. Es una gran coiled-coil de 380 kDa y 3.336 aminoácidos. Contiene dos dominios coiled-coil principales, uno extenso en la región N-terminal de aproximadamente 1.500 residuos y otro en la región C-terminal más pequeño de aproximadamente 500 aminoácidos. Posee repeticiones internas y un dominio PACT C-terminal que tiene un blanco que se localiza en los centrosomas durante todo el ciclo celular (Flory, Moser et al. 2000, Gillingham and Munro 2000, Rauch 2011).



**Figura 5.** Dominios de la proteína PCNT (tomado y modificado de *Griffith et. Al*, 2008).

La proteína PCNT se une a la calmodulina y es un componente integral del material pericentriolar (PCM) (Sillibourne, Delaval et al. 2007). Esta proteína interactúa con el factor de nucleación de los microtúbulos ( $\gamma$ -tubulina) y es esencial para el normal funcionamiento de los centrosomas, el citoesqueleto y para la progresión del ciclo celular (Doxsey, Stein et al. 1994).

**Tabla 1.** Principales genes asociados con enanismo esencial microcefálico

<b>Gen</b>	<b>Enfermedad asociada</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Función principal</b>
<b><i>ATR</i></b>	Síndrome de Seckel. Síndrome de cáncer y telangiectasias cutáneas familiar	3q23	Reguladora de la integridad del genoma. Coordina el origen de replicación del ADN, los puntos de chequeo del ciclo celular y la reparación del ADN
<b><i>NIN</i></b>	Síndrome de Seckel	14q22.1	Reguladora de las actividades de nucleación y de anclaje de los microtúbulos en el centrosoma
<b><i>ATRIP</i></b>	Síndrome de Seckel	3p21.31	Componente del punto de chequeo al daño del ADN
<b><i>RBBP8</i></b>	Síndrome de Jawad. Carcinoma pancreático. Síndrome de Seckel	18q11.2	Promueve la activación de ATR y su reclutamiento en las rupturas de doble cadena en la fase S/G2. Controla el punto de chequeo G2/M del ciclo celular en el daño del ADN
<b><i>CEP152</i></b>	Microcefalia primaria autosómica recesiva. Síndrome de Seckel	15q21.1	Promueve la acumulación centrosómica de CENPJ y PLK4. Es un componente principal del centro organizador de microtúbulos.

			Influencia la forma, la polaridad, la motilidad y la división celular.
<b><i>CENPJ</i></b>	Microcefalia primaria autosómica recesiva. Síndrome de Seckel	13q12.12	Regulación del proceso de ensamblaje y nucleación de los microtúbulos
<b><i>CEP63</i></b>	Síndrome de Seckel	3q22.2	Es una subunidad del centrosoma que participa en la forma, la polaridad y la motilidad celular. Tiene una función esencial en la división celular
<b><i>PHC1</i></b>	Microcefalia primaria autosómica recesiva. Síndrome de Seckel	12p13.31	Forma parte del complejo represor transcripcional PRC1. Está involucrada en la reparación del ADN y es reclutada en regiones de cromatina en respuesta al daño del ADN
<b><i>RNU4ATAC</i></b>	MOPD I/III	2q14.2	Es un componente del <i>spliceosoma</i> menor. Es requerida para el corte apropiado de los intrones tipo U12 dependientes
<b><i>ORC1</i></b>	Síndrome de Meier Gorlin	1p32.3	Es un componente fundamental de la maquinaria de la replicación del ADN. Tiene una función en el control del número de copias de los centriolos y los centrosomas en las células humanas
<b><i>ORC4</i></b>	Síndrome de Meier Gorlin	2q22.3-q23.1	Promueve el reconocimiento del origen de replicación del ADN. Se asocia con ORC2
<b><i>ORC6</i></b>	Síndrome de Meier Gorlin	16q11.2	Tiene una función en la coordinación de la replicación y en la segregación con la citocinesis

<i>CDTI</i>	Síndrome de Meier Gorlin	16q24.3	Tiene la capacidad de unirse a la geminina que evita la replicación y así podría prevenir el inicio de la replicación en orígenes inapropiados
<i>CDC6</i>	Síndrome de Meier Gorlin	17q21.2	Es requerida para el inicio de la replicación del ADN en los mamíferos
<i>PCNT</i>	MOPD II	21q22.3	Proteína multifuncional en andamio que interactúa con otras proteínas para cumplir funciones principales en la organización de los microtúbulos, la división celular, la progresión del ciclo celular y el ensamblaje de las cilias

### 1.2.5.3.2 Función biológica de PCNT

La pericentrina actúa tanto a nivel estructural como regulatorio. Primero, recluta múltiples proteínas centrosómicas, principalmente el complejo de gamma-tubulina que inicia la nucleación de los microtúbulos y la organización del huso mitótico. Segundo, tiene una importante función en la regulación del ciclo celular por medio de su interacción con la vía ATR (Doxsey, Stein et al. 1994, Dichtenberg, Zimmerman et al. 1998, Miyoshi, Asanuma et al. 2004, Zimmerman, Sillibourne et al. 2004). Los ensayos con anticuerpos antipericentrina realizados con las técnicas de inmunofluorescencia secundaria usando anticuerpos anti-IgG de ratón y de conejo y con la técnica de inmunolot con anticuerpos secundarios IgG anti-conejo demuestran que se presenta una disrupción de la mitosis, sugiriendo una función esencial en la progresión mitótica. También actúa como una proteína de andamiaje que recluta otras proteínas de señalización como la PKA (proteína quinasa A), la PKB (proteína

quinasa B), la proteína quinasa C $\beta$ II y la calmodulina en el centrosoma (Diviani, Langeberg et al. 2000, Chen, Purohit et al. 2004, Zimmerman, Sillibourne et al. 2004, Griffith, Walker et al. 2008). Además interactúa con la dineína, las proteínas CG-NAP/AKAP450, la proteína DISC1 y la PCM1 (Miyoshi, Asanuma et al. 2004) (Takahashi, Yamagiwa et al. 2002) (Li, Hansen et al. 2001) (Purohit, Tynan et al. 1999).

La pericentrina se localiza en el centrosoma, un organelo celular que consiste en dos centriolos acoplados contenidos en un conjunto de agregados proteicos que lo rodean y que se denomina el material pericentriolar (PCM). La función principal del centrosoma consiste en la nucleación y la organización de los microtúbulos, por lo cual de forma genérica se denominan centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). Durante la interfase del ciclo celular los microtúbulos determinan la forma, la polaridad y la motilidad celular, mientras que durante la mitosis forman el huso mitótico que es fundamental para la segregación de los cromosomas entre las dos células hijas (Doxsey, Stein et al. 1994).

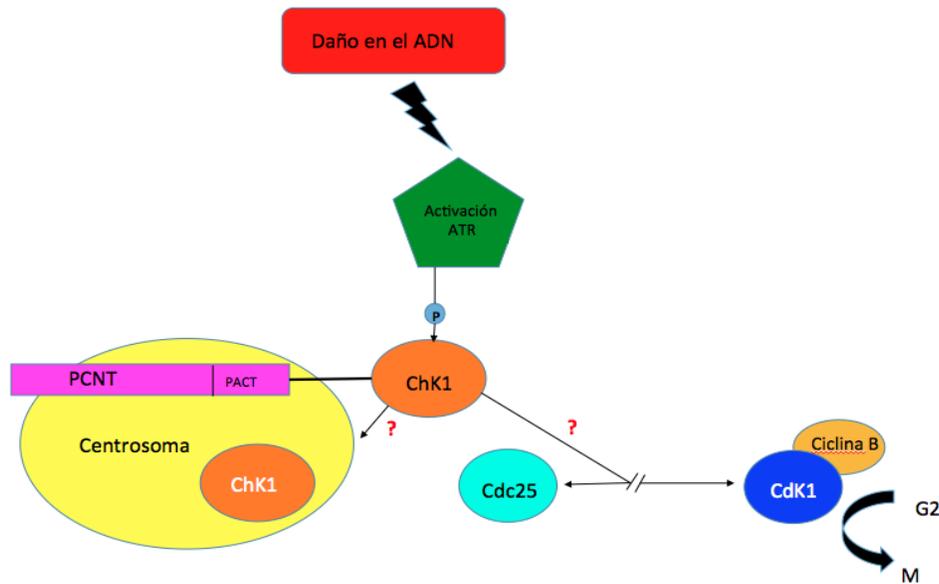
#### **1.2.5.4 PCNT en el ciclo celular**

Se evidenció que PCNT en el ciclo celular regula la entrada mitótica a través de CHK1 (Tibelius, Marhold et al. 2009). Por medio de estudios funcionales fue comprobado que las células de los pacientes que presentan mutaciones provocadas con luz UV o nocodazole llevan a la producción de una proteína truncada con defectos en el arresto en el punto de chequeo G2-M, con fragmentación nuclear y con centrosomas supernumerarios. Estas alteraciones son similares a las que ocurren en los pacientes que presentan mutaciones en ATR. Esto sugiere que las mutaciones en PCNT impactan en la activación del punto de chequeo del ciclo celular y en la respuesta al daño del ADN dependiente de ATR (Sillibourne,

Delaval et al. 2007). También fue determinado que la pericentrina funciona corriente abajo de la activación por las quinasas de ATR en esta vía.

Ha sido determinado que la alteración en la señalización de ATR por sí misma podría causar el fenotipo a través de los mecanismos de progresión mitótica alterada o de supervivencia celular reducida. En el centrosoma CHK1 retarda la transición G2-M por medio de la inhibición de la activación dependiente de CDC25 del complejo Ciclina B-CDK1 (Krämer, Mailand et al. 2004). La fusión de CHK1 con el dominio PACT de la pericentrina evita la progresión mitótica G2-M, sugiriendo que la pericentrina endógena provee los medios de la localización de CHK1 en el centrosoma para mediar el arresto del punto de chequeo G2-M. También podría ser necesaria para que CHK1 transmitiera su señal a los componentes centrosómicos ubicados corriente abajo para efectuar el arresto G2-M (Griffith, Walker et al. 2008, Tibelius, Marhold et al. 2009). (**Figura 6**)

La depleción de PCNT por siRNA conduce a la apoptosis, posterior a la activación de los puntos de chequeo mitóticos y el arresto celular en la transición de la fase G2 a la mitosis (Zimmerman, Sillibourne et al. 2004).



**Figura 6.** Modelo de la función de la pericentrina en el arresto del punto de chequeo G2/M dependiente de ATR (tomado y modificado de Griffith et al. 2008).

### 1.2.5.5 Mutaciones en el gen *PCNT*

Griffith et al. (2008) desarrollaron un análisis de ligamiento en dos familias consanguíneas del oriente medio que incluían individuos clínicamente diagnosticados con síndrome de Seckel. Fue mapeado el trastorno en el cromosoma 21q22.3 en la región del gen *PCNT*. Por secuenciación de los 47 exones codificantes en los individuos afectados de las dos familias fueron identificadas mutaciones homocigotas que truncaban la proteína, una que llevaba a un codón de parada prematuro c.658G>T (p.Glu220X) y otra que conducía a un corrimiento del marco de lectura c.1887delA (p.Ser62fs) (Griffith, Walker et al. 2008).

Rauch et al. (2008) identificaron 29 mutaciones diferentes homocigotas o heterocigotas compuestas en el gen *PCNT* en 25 pacientes con MOPD II. Entre ellas doce mutaciones generaban un codón de parada prematuro y 17 conducían al corrimiento del

marco de lectura. La ausencia de la proteína PCNT fue confirmada por análisis de *Western Blot* de líneas celulares de linfoblastos de dos pacientes (Rauch, Thiel et al. 2008).

Los estudios funcionales mostraron evidencia en modelos celulares de defectos en la señalización de ATR. Se reportó una morfología mitótica anormal en el 71% de los fibroblastos de los pacientes con síndrome MOPD II y una separación prematura de las cromátides hermanas sugestivo de una función de PCNT en el punto de chequeo del ensamblaje del huso mitótico (Rauch, Thiel et al. 2008). Posteriormente fue sugerido que las células de los pacientes con MOPD II eran más susceptibles a la muerte debido a una segregación cromosómica y una mitosis defectuosas. Esto resultaría en una disminución en la celularidad total embrionaria y en la restricción del crecimiento en el adulto (Rauch 2011). Un nuevo tamizaje de casos identificó otra mutación consistente en una inserción c.3568insT (p.Cys1190fs) en el gen *PCNT* en una familia consanguínea procedente de Marruecos (Griffith, Walker et al. 2008).

Willems et al. (2008) observaron que las mutaciones en el gen *PCNT* habían sido identificadas en 28 pacientes, incluyendo los 25 con MOPD II reportados por Rauch et al. (2008) y los tres diagnosticados con síndrome de Seckel reportados por Griffith et al. (2008). El análisis clínico de los pacientes con mutaciones en el gen *PCNT* inicialmente diagnosticados con síndrome de Seckel (descrito en detalle en la sección de síndromes de enanismo esencial) demostró que todos ellos presentaban alteraciones esqueléticas menores y una restricción de crecimiento severa más sugestiva de MOPD II (Willems, Genevieve et al. 2008). Se concluyó que a pesar de la variabilidad en la severidad clínica, MOPD II es una condición homogénea genéticamente debida a la pérdida de la función de la pericentrina (Willems, Genevieve et al. 2009). Así, los pacientes reportados por Griffith et al. (2008) con

mutaciones en el gen *PCNT* tuvieron un diagnóstico de MOPD II (Griffith, Walker et al. 2008).

En su reporte completo, en el que fueron estudiados pacientes adicionales, Willems et al. (2009) identificaron un total de 13 mutaciones diferentes en el gen *PCNT* incluyendo una en otro paciente diagnosticado con síndrome de Seckel, este paciente también tenía defectos esqueléticos menores y características clínicas compatibles con MOPD II (Willems, Genevieve et al. 2009).

En un niño de origen italiano quien fue evaluado al nacimiento con síndrome de Seckel pero en quien el diagnóstico fue posteriormente corregido a síndrome MOPD II, los autores identificaron una inserción de 1 pb en estado homocigoto c.1527insA (p.Thr510fs) en el gen *PCNT*. Debido al solapamiento fenotípico entre el síndrome de Seckel y el MOPD II los autores enfatizaron en la necesidad de reevaluar a los pacientes. Ciertas características clínicas podrían no ser evidentes en el momento del nacimiento por lo que realizar la búsqueda de las mutaciones en *PCNT* es fundamental para el diagnóstico correcto de MOPD II (Piane, Della Monica et al. 2009).

Posteriormente, en cuatro pacientes de dos familias tailandesas no relacionadas con características de MOPD II y llamativa microdontia e hipoplasia ósea alveolar se identificaron mutaciones homocigotas y heterocigotas compuestas en el gen *PCNT* (Kantaputra, Tanpaiboon et al. 2011). Müller et al. (2012) encontraron dos mutaciones diferentes en el gen *PCNT* c.1753C>T (p.Arg585X) y c.5320G>T (p.Glu1774X) como causales de MOPD II de forma heterocigota compuesta en una paciente en quien el fenotipo inicialmente había sido atribuido a mutaciones en *IGF1* (Müller, Dunstheimer et al. 2012).

Todas las mutaciones en el gen reportadas a la fecha conducen a una pérdida de función de la pericentrina.

A continuación será descrito el gen *ASPM* debido a que sus mutaciones son causales de la forma más común de microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) y el gen *DDX11* que está implicado en la fisiopatología del síndrome *Warsaw Breakage*. Este es importante en los resultados del presente trabajo de tesis como será descrito en la sección correspondiente.

#### **1.2.5.6 ASPM**

El gen *ASPM* (gen del huso anormal asociado a microcefalia) (MIM\*605481) fue mapeado en el brazo largo del cromosoma 1 por medio de estudio de haplotipos comunes entre familias y análisis con FISH, específicamente en 1q31.3. El transcrito más largo codifica para una proteína de 3477 aminoácidos (Hamosh, Scott et al. 2005).

La proteína ASPM contiene un dominio terminal de unión a los microtúbulos-NH<sub>2</sub>, dos dominios de homología calponina (CH) que se encuentran en el citoesqueleto y en las proteínas de transducción de señal y 81 motivos IQ que sirven como sitios de unión para diferentes proteínas incluyendo las esenciales cadenas livianas de la miosina, la calmodulina y las proteínas similares a la calmodulina. Los motivos IQ son sitios de fosforilación de la proteína quinasa C (Higgins, Midgley et al. 2010). ASPM se localiza en los centrosomas y es reclutado dependientemente de los microtúbulos en el material pericentriolar durante la mitosis y se colocaliza con la gamma-tubulina (Singhmar and Kumar 2011).

En Pakistán e India las mutaciones en este gen constituyen entre un tercio y la mitad de los casos de MCPH, y las variantes incluyen translocaciones, deleciones, inserciones,

duplicaciones y sustituciones de bases (Bond, Roberts et al. 2002, Kumar, Blanton et al. 2004, Pichon, Vankerckhove et al. 2004, Gul, Tariq et al. 2007). Incluso en familias consanguíneas han sido reportadas variantes heterocigotas compuestas (Saadi, Borck et al. 2009). Una translocación cromosómica familiar balanceada fue reportada en un niño con microcefalia primaria. En este caso el punto de ruptura de la translocación estaba situado en el intrón 17 de *ASPM* (Pichon, Vankerckhove et al. 2004). Las mutaciones en este gen causan Microcefalia primaria autosómica recesiva 5 (MCPH5) (MIM\*608716).

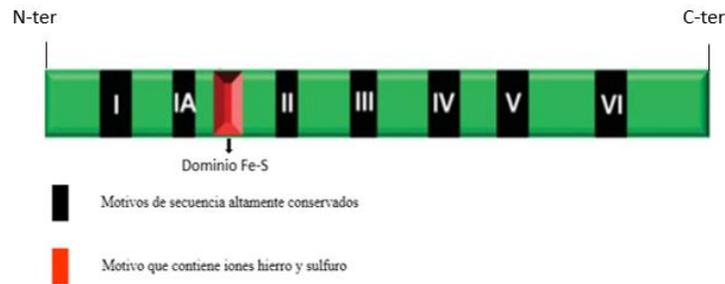
### **1.2.5.7 DDX11**

El gen *DDX11* (gen del factor de crecimiento de queratinocitos 2, *KRG2*) (\*MIM 601150) fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 12, específicamente en 12p11.21 por medio de análisis de híbridos de células somáticas y por *FISH* (Amann, Valentine et al. 1996). Este gen está constituido por 27 exones de los cuales 26 son codificantes, tiene una longitud de 3079 pb (Fan, Newman et al. 2002, Hamosh, Scott et al. 2005).

#### **1.2.5.7.1 Proteína DDX11**

##### **1.2.5.7.1.1 Características estructurales**

El gen *DDX11* codifica para una proteína de 906 aminoácidos que pertenece a la familia *DEAD Box* compuesta por helicasas de RNA que tienen una estructura característica de Asp-Glu-Ala-Asp como uno de los 8 motivos de secuencia altamente conservados. Estos motivos están conformados por una estructura hélice-vuelta-hélice sugiriendo que se une al ADN. Uno de sus motivos contiene iones hierro y sulfuro (motivo Fe-S) (Amann, Valentine et al. 1996, Fan, Newman et al. 2002) (**Figura 7**).



**Figura 7-** Representación esquemática de los motivos helicasa y Fe-S de la proteína DDX11

(tomado y modificado de Capo-Chichi, 2012)

#### 1.2.5.7.1.2 Función biológica de DDX11

DDX11 se une a la cromatina. Aumenta cuando la célula entra en la fase S y disminuye precipitadamente cuando sale de esta fase. Su reclutamiento es promovido por la replicación activa del ADN. Esto fue demostrado en estudios de inmunoprecipitación de cromatina en las levaduras (Rudra and Skibbens 2013).

Las helicasas son componentes esenciales de los complejos multiproteicos que tienen una función biológica principal en el desenrollamiento de la doble cadena del ADN, en la regulación de la transcripción, en el *splicing*, en la traducción y en la reparación del ADN. DDX11 parece ser una proteína esencial para la estructura normal de los cromosomas y para la progresión del ciclo celular (Amann, Valentine et al. 1996). También es un posible determinante de la longitud de los telómeros en la especie humana (Vasa-Nicotera, Brouillette et al. 2005). La proteína es requerida para el reclutamiento de la SCC2 y las cohesinas durante la fase S del ciclo celular (Amann, Valentine et al. 1996).

### **1.2.5.7.1.3 Mutaciones en el gen *DDX11***

Las mutaciones en el gen *DDX11* causan el síndrome de *Warsaw Breakage* en la especie humana. Han sido descritos cinco casos en tres familias diferentes en todo el mundo. El primer caso fue un paciente de origen polaco en quien se encontró una mutación heterocigota compuesta en el gen *DDX11* conformada por la variante c.2271+2T>C en un sitio de *splicing* y la variante c.2689\_2691del (p.Lys897del). Luego fueron descritos tres hermanos afectados de una familia libanesa con la variante *DDX11* c.788G>A (p.Arg263Gln) en estado homocigoto. Posteriormente en una paciente de origen británico en quien fueron encontradas dos variantes en estado heterocigoto compuesto *DDX11* c.638+1G>A en un sitio de *splicing* y la variante c.1888delC (van der Lelij, Chrzanowska et al. 2010, Capo-Chichi, Bharti et al. 2013, Bailey, Fryer et al. 2015).

### **1.2.6 Síndromes de enanismo esencial**

El enanismo esencial es un conjunto de trastornos monogénicos en los cuales el crecimiento se encuentra severamente comprometido. Sus manifestaciones inician en las etapas más tempranas del desarrollo y continúan hasta la etapa posnatal (Klingseisen and Jackson 2011). Usualmente estos pacientes son de conformación “miniatura” con proporciones antropométricas cercanas a la normalidad (McKusick 1955). Es también definido como un fenotipo de extrema falla global en el crecimiento. Usualmente alcanzan una talla final adulta inferior a un metro (Rauch, Thiel et al. 2008). Característicamente la marcada deficiencia en el crecimiento no es modificada por la intervención con hormona de crecimiento exógena ni con el fortalecimiento en el aporte nutricional (Rauch 2011). A causa de los mecanismos desencadenantes del cuadro clínico, este grupo de trastornos podrían ser

contemplados como una forma de talla baja “hipocelular”. Tienen una herencia autosómica recesiva (Rischbieth and Barrington 1912).

Característicamente los individuos con enanismo esencial tienen una marcada reducción en el tamaño de la cabeza en proporción a su tamaño corporal, o en algunos casos incluso de tamaño más reducido. Esta microcefalia diferencia a este grupo de alteraciones de otros tipos de enanismo (McKusick 1955). La disminución en el tamaño de la cabeza es resultado de un limitado tamaño cerebral, específicamente de un pobre volumen cortical el cual es originado por una falla en la proliferación celular durante un periodo clave del desarrollo cerebral, el periodo fetal temprano (Wood, Johnson et al. 1967, Friede 1989). Este fenotipo cefálico es similar al encontrado en pacientes con microcefalia primaria (Woods, Bond et al. 2005). En ambos trastornos el tamaño cerebral se encuentra reducido a un tercio del volumen normal, una dimensión comparable a la de los humanos ancestrales (Ponting and Jackson 2005).

La inteligencia en los pacientes con enanismo esencial es usualmente normal (McKusick 1955). Otra particularidad que se encuentra de manera casi generalizada en las diferentes formas de enanismo esencial es el infantilismo sexual y aunque la fertilidad está considerablemente reducida, la esterilidad no es un rasgo universal entre este grupo de pacientes. Sin embargo la madurez sexual es alcanzada más tardíamente (McKusick 1955). El enanismo esencial microcefálico abarca diferentes entidades clínicas que incluyen el síndrome Seckel, el enanismo esencial osteodisplásico microcefálico (MOPD) tipos I/III y II y el síndrome Meier-Gorlin (MGS).

Otro abordaje más reciente de estos trastornos reúne las microcefalias primarias autosómicas recesivas (MCPH) y los trastornos del espectro del síndrome de Seckel (SCKS) en un mismo grupo de desórdenes caracterizados por microcefalia y ausencia de

malformaciones viscerales. Aunque las MCPH y los SCKS fueron inicialmente diferenciados por la talla baja de estos últimos, en este abordaje ya no es tomada en cuenta la estatura como un rasgo discriminativo debido a que es posible que estos fenotipos constituyan una gama de manifestaciones más que distintas entidades (Pagon, Adam et al. 2013).

La microcefalia inicia durante el segundo trimestre de la gestación y tiende a empeorar con el tiempo. Los hallazgos que se encuentran de forma variable en los trastornos del espectro MCPH-SCKS son alteraciones estructurales cerebrales como un pequeño tamaño cerebral y giros cerebrales disminuidos. En algunos casos se presenta el cuerpo calloso adelgazado y anomalías en la migración neuronal. También se han encontrado diferentes grados de déficit cognitivo, talla baja en un grado muy variable y craneosinostosis de manera menos frecuente (Woods, Bond et al. 2005, Cox, Jackson et al. 2006).

El diagnóstico de estos trastornos se fundamenta en los hallazgos clínicos, las neuroimágenes, una historia familiar consistente en herencia autosómica recesiva y en pruebas moleculares específicas cuando están disponibles. Los trastornos del espectro MCPH-SCKS han sido confirmados con pruebas moleculares y reportados en menos de 200 familias (Passemar, Titomanlio et al. 2009).

A continuación serán expuestos en detalle los síndromes de enanismo esencial microcefálico y posteriormente se realizará la descripción de la microcefalia primaria autosómica recesiva en el contexto del abordaje de los trastornos del espectro MCPH-SCKS y sus diagnósticos diferenciales.

### **1.2.6.1 Síndrome de Seckel**

El síndrome de Seckel es un tipo infrecuente y heterogéneo de enanismo esencial. Fue definido por Seckel en el año 1.960 a partir de 13 casos reportados en la literatura y dos pacientes estudiados por él mismo. Con base en los hallazgos encontrados le dio la siguiente definición semiológica: “enanismo proporcionado severo intrauterino y posnatal, microcefalia severa, perfil con “cabeza de pájaro” con frente recedida y microretrognatia, nariz larga y picuda, déficit cognitivo severo y algunas otras anomalías como luxación de la cabeza del radio” (Seckel 1960).

En su monografía de 1.960 Seckel describió a sus dos pacientes con algunas diferencias con respecto a los otros 13 afectados reunidos de la literatura durante los 200 años anteriores. Su caso número dos no tenía “cabeza de pájaro”, tenía la frente más alta, su nariz no era sobresaliente o ganchuda, no tenía marcada microretrognatia. Este niño presentaba microtia, constricciones en anillo en extremidades superiores e inferiores y padeció de múltiples luxaciones articulares similares a las descritas por otros autores. El caso número uno presentó marcada restricción del crecimiento intrauterino y posnatal proporcionado, microcefalia severa, “cara de pájaro” con frente recedida y retrognatia, nariz larga y ganchuda, grandes ojos y dientes desproporcionados. Esta niña tenía un déficit cognitivo severo, sus exámenes radiológicos revelaron maduración ósea disarmónica y retardada, luxación de la cabeza del radio y braquimetatarso, no presentaba signos de osteocondrodisplasia generalizada (Seckel 1960, Majewski, Goecke et al. 1982).

Puesto que solo el caso número uno cumplía con la definición del fenotipo establecido, todos los demás casos fueron comparados con éste para definir su diagnóstico clínico. Entonces el síndrome fue definido de la siguiente manera: retraso severo del crecimiento intrauterino y posnatal relativamente proporcionado (talla al nacimiento entre

34-43 cm), microcefalia severa (15.2-29 cm al nacimiento), cierre prematuro de suturas craneales, déficit cognitivo severo, cara típica con frente recedida y microretrognatia marcada, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, nariz prominente y curvada, ojos y dientes relativamente grandes, paladar alto y arqueado, pabellones auriculares displásicos, clinodactilia del quinto dedo, luxación de la cabeza del radio, retraso disarmónico de la osificación y anomalías esqueléticas no generalizadas. Otros hallazgos presentes de manera menos frecuente en los casos “típicos” estudiados fueron paladar hendido, hipoplasia enamel, criptorquidia, clitoromegalia, hirsutismo y displasia de cadera (de Lange 1919, Mann and Russell 1959, Black 1961, De La Cruz 1963, Aarons 1964, Maitinsky 1964, Szalay 1964, Gellis and Feingold 1967, Harper, Orti et al. 1967, Heinisch 1967, McKusick, Mahloudji et al. 1967, Fitch, Pinsky et al. 1970, Bixler and Antley 1973, Brizard, Mimouni et al. 1973, Lim and Wong 1973, Sauk, Litt et al. 1973, Anoussakis, Liakakos et al. 1974, Spennati and Persichetti 1974, Szalay 1974, Lambotte, Dony et al. 1975, Majewski, Michaelis et al. 1975, Payet 1975, Frijns and van den Berghe 1976, Schöenberg 1976, Toudic, Roche et al. 1977, CERVENKA, TSUCHIYA et al. 1979).

Los padres de todos los pacientes tenían talla e inteligencia normal. Fueron reportados hermanos afectados. Ambos géneros presentaban similar severidad y se asumió que se trataba de un síndrome con patrón de herencia autosómico recesivo. No fueron detectadas alteraciones hormonales importantes, especialmente de la hormona de crecimiento, en los casos afectados (McKusick, Mahloudji et al. 1967, Sauk, Litt et al. 1973, Majewski, Goecke et al. 1982). En estudios posteriores se ha hecho énfasis en otras alteraciones presentes en los pacientes y ha sido establecido que se encuentran con mayor frecuencia ciertas anomalías del sistema nervioso central como la agenesia del cuerpo calloso, la corteza cerebral disgenésica, la presencia de grandes quistes cerebrales y paquigiria, lo que sugiere una afección de la

migración neuronal (Shanske, Caride et al. 1997). Menos de un tercio de los pacientes descritos en la literatura hasta la actualidad parecen cumplir con los criterios establecidos por Seckel en 1.960 y de acuerdo a los casos reseñados más recientemente han sido añadidas algunas características al síndrome como son personalidad sociable, estrabismo, pelo delgado y ralo (McKusick, Mahloudji et al. 1967).

En la actualidad algunos autores consideran que las MCPH y el síndrome de Seckel pertenecen al mismo espectro de trastornos y los definen como síndromes clínicamente caracterizados por microcefalia y ausencia de malformaciones viscerales. Además refieren que aunque la distinción entre ambos se efectuaba por la talla (muy baja en el síndrome de Seckel), ésta ya no es una característica discriminativa, por lo cual llegan a la conclusión de que estos fenotipos constituyen un espectro más que entidades distintas (Pagon, Adam et al. 2013).

Los hallazgos aceptados en la actualidad para el diagnóstico clínico del síndrome de Seckel incluyen la microcefalia caracterizada por un inicio durante el segundo trimestre de la gestación, una circunferencia craneana occipito-frontal al nacimiento igual o menor a -2 DE por debajo de la media para género, edad y grupo étnico y que en la etapa posnatal continúa con un crecimiento a una tasa menor que la usual por lo cual tiende a empeorar con el tiempo. En los individuos con mayor edad la circunferencia craneana occipito-frontal se encuentra en un rango entre -4 y -12 DE de la media (Basel-Vanagaite and Dobyns 2010, Pagon, Adam et al. 2013). Adicionalmente los pacientes presentan un cerebro disminuido de tamaño con giros pequeños, con un volumen de los hemisferios reducido aproximadamente a un tercio del normal (principalmente presente en la corteza cerebral) y el patrón de los giros puede verse simplificado, el tamaño del rombencéfalo y el cerebelo se encuentran reducidos pero tienen una forma normal (Aicardi, Bax et al. 2009). El cuerpo calloso tiende a ser más

delgado cuando la microcefalia es más severa (Adachi, Poduri et al. 2011). Algunos individuos afectados muestran anormalidades en la migración neuronal como heterotopías, paquigiria o polimicrogria focal (Woods, Bond et al. 2005, Passemard, Titomanlio et al. 2009). Se encuentra en estos pacientes un déficit cognitivo de moderado a severo. La talla es extremadamente baja y se encuentra típicamente en el rango entre -4 y -12 DE de la media. Asimismo el crecimiento posnatal está severamente restringido y los pacientes presentan bajo peso al nacer con una media cercana a los 1500 g. Algunos individuos desarrollan algún tipo de craneosinostosis posiblemente secundaria al lento e insuficiente crecimiento cefálico (Cox, Jackson et al. 2006, Darvish, Esmaeeli-Nieh et al. 2010, Dauber, LaFranchi et al. 2012, Pagon, Adam et al. 2013).

Los procesos del desarrollo algunas veces son alcanzados de manera normal pero más usualmente se encuentran levemente retrasados y en ausencia de malformaciones cerebrales los pacientes logran la marcha antes de los dos años de edad (Mahmood, Ahmad et al. 2011, Pagon, Adam et al. 2013). Es aceptado que dentro de las particularidades faciales se encuentran la apariencia de “cabeza de pájaro” que resulta de la hipoplasia de las estructuras mediofaciales comparadas con el resto de la cabeza, la frente estrecha e inclinada, los ojos proporcionalmente prominentes, las fisuras palpebrales dirigidas hacia abajo, la nariz proporcionalmente larga y convexa, microretrognatia y dientes pequeños. Los pabellones auriculares son pequeños pero proporcionales al tamaño de la cabeza y habitualmente carecen de lóbulos (Seckel 1960, Majewski, Goecke et al. 1982).

Algunos individuos sin diagnóstico molecular confirmado parecen tener tendencia a desarrollar síndromes mielodisplásicos (Hayani, Suarez et al. 1994). Ciertos reportes indican que la supervivencia puede ser mayor a los 50 años de edad en pacientes que no presenten complicaciones severas (Pagon, Adam et al. 2013). Los estudios radiológicos esqueléticos

tradicionalmente muestra una maduración ósea severamente retardada y presencia de epífisis en forma de cono (Poznanski, Iannaccone et al. 1983).

Al parecer, menos de 50 casos que cumplen realmente los criterios de síndrome de Seckel han sido reportados y el espectro MCPH-síndrome de Seckel ha sido confirmado por pruebas moleculares y reportado en menos de 200 familias (Anonymous, 2011]. El diagnóstico se fundamenta en los hallazgos clínicos, en imágenes cerebrales que muestran un volumen cerebral reducido con una arquitectura general normal, en la historia familiar consistente con herencia autosómica recesiva y en pruebas genéticas moleculares para su confirmación (cuando están disponibles). Los genes en los cuales han sido identificadas mutaciones bialélicas causales son *ATR* (SCKL1), *NIN* (SCKL7), *ATRIP* (SCKL8), *RBBP8* (SCKL2), *CEP152* (MCPH9/SCKL5), *CENPJ* (MCPH6/SCKL4), *CEP63* (SCKL6) y *PHC1* (MCPH11) en los cuales principalmente han sido halladas mutaciones puntuales y en menor proporción deleciones o duplicaciones.

Es importante resaltar que en aproximadamente la mitad de los pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Seckel no han sido identificadas mutaciones causales. Además han sido identificadas algunas mutaciones más frecuentes en ciertas poblaciones (Faivre, Le Merrer et al. 2002, Pagon, Adam et al. 2013).

Para el abordaje inicial de los pacientes es necesario tener acceso al concepto del médico especialista en neurología, junto con una evaluación neuropsicológica o psicomotora adaptada a la edad del paciente. Es importante la realización de una resonancia magnética cerebral para determinar posibles malformaciones y un estudio esquelético completo (Rimoin, Pyeritz et al. 2013). El tratamiento específico va dirigido a mejorar la calidad de vida del individuo con terapia de soporte por medio de programas de educación especial de acuerdo a las necesidades, terapias del lenguaje, comportamentales y ocupacionales, y una

red de apoyo familiar. El seguimiento debe incluir monitoreo del perímetro cefálico y de la talla con curvas estándar para la edad y el grupo étnico, seguimiento neurológico enfocado en detectar problemas del comportamiento, hiperactividad, trastorno de atención o problemas motores (Pagon, Adam et al. 2013).

#### **1.2.6.2 Enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo II (MOPD II)**

El enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo II o enanismo tipo Majewski (MOPD II) es un trastorno que no había sido distinguido del síndrome de Seckel en la literatura. Sin embargo sus características fueron reconocidas y descritas por Seckel en su monografía de 1.960 al menos en un individuo afectado (Seckel 1960). Posiblemente fue por primera vez detallado explícitamente por Brizard et. al en 1.973 (Brizard, Mimouni et al. 1973). Más tarde Majewski lo definió en artículos de síndrome de Seckel y como otros síndromes particulares del grupo de los enanismos esenciales (Majewski, Goecke et al. 1982, Majewski, Stoeckenius et al. 1982). Antes de esta época se había realizado una manifiesta reseña en los archivos de un circo acerca de una mujer que claramente presentaba los hallazgos típicos del síndrome (Drimmer 1973). La historia natural de la enfermedad se ha podido esclarecer gracias a diversas publicaciones de casos realizadas en diferentes partes del mundo. Además han sido añadidas múltiples características que ahora son reconocidas como parte del síndrome y lo diferencian de los demás tipos de enanismo esencial microcefálico. A continuación serán descritos sus principales hallazgos clínicos según lo que ha sido publicado en la literatura.

Los embarazos de niños afectados por esta enfermedad frecuentemente presentan complicaciones asociadas a hiperémesis gravídica, hemorragias, desaceleraciones en el monitoreo fetal, preeclampsia y parto pretérmino. La placenta suele ser de tamaño más

pequeño que el usual llegando incluso a alcanzar solo la mitad del tamaño normal (Hall, Flora et al. 2004). El momento del parto tiene una media de 35 semanas de gestación, con un rango que va desde 28 semanas hasta el post término (Kogut and Sensenbrenner 1974). La RCIU es una característica constante en esta condición que frecuentemente puede ser reconocida entre las 12 y 14 semanas de gestación por ultrasonido. A medida que progresa el embarazo la deficiencia de crecimiento se va haciendo cada vez más severa (Bondeson 1992).

Si el nacimiento llega al término el peso del recién nacido siempre es inferior a los 1500 g, pero es más frecuente encontrarlo en el rango entre 1.100 a 1.300 g. La talla al nacimiento también se encuentra severamente disminuida y se localiza entre 30 y 40 cm al término (Brizard, Mimouni et al. 1973, Anoussakis, Liakakos et al. 1974). La talla final post puberal alcanza en la mayoría de los casos menos de 100 cm. Se considera que con respecto al síndrome Seckel el RCIU es menos severo que la deficiencia de crecimiento posnatal (Scott 1969, Tekin, Ng et al. 2000). La talla presente en el momento del nacimiento a término de un paciente con MOPD II es la esperada para un feto de 28 a 29 semanas de gestación, el peso es el que normalmente se encuentra a las 31 a 32 semanas y el perímetro cefálico es el ideal para las 30 a 31 semanas de gestación (Bober, Niiler et al. 2012). La mayoría de los niños alcanzan el tamaño de un recién nacido normal solo entre los dos y cinco años de edad (Pasquino and Iannaccone 1978). Los pacientes crecen lento pero con velocidades constantes y no muestran un pico de aceleración puberal (Bober, Niiler et al. 2012). El crecimiento usualmente se detiene a los doce años. Por todo lo anterior es de esperar que las mediciones de crecimiento revelen una restricción de crecimiento intrauterino y posnatal muy severas, la cual es una de las principales características de MOPD II (Boscherini, Iannaccone et al. 1981, Hall, Flora et al. 2004). La circunferencia craneana occipito-frontal al momento del nacimiento se encuentra en un rango entre 22 cm y 29 cm y es proporcionada con respecto

al tamaño corporal pero considerada microcefalia severa con respecto a los rangos normales para la edad gestacional. En la etapa pospuberal la circunferencia craneana se encuentra en un rango entre 38.5 cm y 41 cm (Fukuzawa, Sato et al. 2002). Se considera que la microcefalia es menos severa en el momento del nacimiento con respecto a la severidad que se presenta en la etapa posnatal por la deficiencia de crecimiento tan marcada de la cabeza en esta etapa de la vida comparada con los pacientes que padecen el síndrome de Seckel (Faivre, Le Merrer et al. 2002).

Al igual que para la talla y el peso, la circunferencia craneana de un paciente con MOPD II al término es la esperada para un feto de 28 semanas de gestación. Con todo lo anterior, es posible definir la RCIU en MOPD II como proporcionada debido a que se mantiene una proporción adecuada entre el tamaño de la cabeza y el tamaño corporal (Lin, Sue et al. 1995). Es importante resaltar que el diámetro cefálico se va volviendo desproporcionadamente pequeño con respecto al tamaño corporal posterior al nacimiento (Majewski and Goecke 1998, Hall, Flora et al. 2004).

Algunos pacientes han presentado anormalidades de mielinización o estructurales del sistema nervioso central como la ventriculomegalia, un patrón anormal de los giros cerebrales, quistes del cuerpo caloso y la región selar e hipoplasia del cuerpo caloso. Además se ha encontrado un engrosamiento irregular de las meninges (Halder, Pahi et al. 1998, Galasso, Lo-Castro et al. 2008). En algunos casos se ha evidenciado un cierre prematuro de las fontanelas y de las suturas craneales y puede existir mayor riesgo de craneosinostosis (Sugio, Tsukahara et al. 1993). Se ha reportado sobrecrecimiento de los vasos y anormalidades arteriales del sistema nervioso central con riesgo incrementado de ruptura de vasos, diferentes cambios vasculares como enfermedad de Moya Moya (vasculitis)

(D'Angelo, Ceddia et al. 1998, Nishimura, Hasegawa et al. 2003, Waldron, Hetts et al. 2009). Estas anomalías parecen verse agravadas en la etapa de la pubertad (Hall, Flora et al. 2004).

Los hallazgos faciales de los pacientes con MOPD II son muy característicos. Sin embargo puede existir variabilidad incluso dentro de la misma familia que puede llevar a un difícil diagnóstico. A diferencia de otros tipos de enanismo esencial microcefálico, estos pacientes habitualmente no presentan frente alta ni recedida y la cabeza no es desproporcionadamente pequeña al nacimiento (Majewski, Ranke et al. 1982, Thompson and Pembrey 1985). Los ojos parecen prominentes durante la niñez, las fisuras palpebrales pueden ser normales para la edad lo cual hace que los ojos se realcen más (Buebel, Salinas et al. 1996). Con el tiempo los ojos se hacen menos prominentes y pueden verse las fisuras palpebrales levemente dirigidas hacia abajo, los globos oculares son normales o pequeños y no crecen en longitud por lo cual se desarrolla hipermetropía en la mayoría de los pacientes requiriendo lentes de corrección antes de los 5 años de edad, asimismo pueden desarrollar esotropía y astigmatismo (Majewski and Goecke 1998).

Las cejas se vuelven escasas en la niñez tardía. La nariz es prominente y este rasgo se hace más marcado durante el primer año de vida, la raíz es ancha y elevada y el puente nasal es amplio. Las crestas supraorbitarias son hipoplásicas y se continúan con la raíz nasal, la punta es amplia pero hipoplásica, las alas nasales son delgadas e infradesarrolladas lo cual lleva a una fosas pequeñas y a medida que la nariz crece la punta se dirige hacia abajo dando en la visión lateral un puente nasal curvo (Haan, Furness et al. 1989). El filtro podría parecer largo pero en realidad es pequeño para la edad. En general la nariz es diferente a la de los demás miembros de la familia (Hall, Flora et al. 2004).

La boca es pequeña pero con los movimientos faciales se ve normal comparada con el resto de la cara, la micrognatía es frecuente durante la infancia pero es leve y las mejillas

pueden ser prominentes, la lengua es proporcionada al tamaño de la boca y el paladar es alto (Lin, Sue et al. 1995). Presentan microdontia severa incluso en proporción con el tamaño de la cara. Además presentan diástasis dental y frecuentemente hiperpigmentación y opalescencia con escaso enamel. En algunos casos los dientes pueden parecer pequeñas puntas afiladas, las raíces dentales suelen ser hipoplásicas e incluso pueden estar ausentes (Tsuchiya, Kobayashi et al. 1981). Los individuos afectados de mayor edad han perdido sus dientes al completar la segunda década de la vida (Kantaputra, Tanpaiboon et al. 2011).

Los pabellones auriculares podrían verse simplificados o levemente displásicos y usualmente carecen de lóbulos, pueden parecer de implantación baja y eventualmente prominentes aunque al realizar las mediciones son pequeños para la edad. Muchos de los niños afectados padecen de otitis a repetición difíciles de manejar en los primeros años de vida. También se han visto casos de hipoacusia neuroconductiva durante la niñez (ALGAZAL, Hamada et al. 1995, Hall, Flora et al. 2004).

La gran mayoría de los pacientes afectados presentan problemas para la alimentación secundarios a la dificultad para tomar grandes cantidades de alimentos requiriendo nutrición fraccionada en pequeñas y frecuentes porciones, las cuales también deben proporcionarse durante la noche. En algunos casos se ha llegado a requerir el uso de sonda gástrica de alimentación (Buebel, Salinas et al. 1996). Pueden presentar pobre succión y vómitos frecuentes. Inicialmente los pacientes tienen un cuerpo delgado con escasa cantidad de grasa subcutánea pero generalmente entre los tres y cinco años de edad desarrollan obesidad centrípeta (Hennekam, Bijlsma et al. 1987).

Muchos de los niños presentan afectaciones respiratorias severas en el periodo neonatal y se han descrito casos de estenosis subglótica con requerimiento ocasional de traqueostomía debido al severo trastorno respiratorio que genera. Muchos pacientes

presentan infecciones respiratorias altas y neumonías a repetición durante los primeros años de vida lo cual alude a una propensión a infecciones o a la presencia de problemas mecánicos de la vía respiratoria. El tórax muestra un diámetro anteroposterior aumentado y puede haber *pectus carinatum o excavatum* pero la función pulmonar es casi siempre normal a excepción de los casos en los cuales la escoliosis severa puede llevar a una capacidad pulmonar disminuida (Hurst, Winter et al. 1988, Hersh, Joyce et al. 1994). Es característica de estos pacientes una voz nasalizada, relativamente alta y “chillona” lo cual es seguramente secundario a una laringe y tráquea pequeñas y estrechas (Majewski, Ranke et al. 1982, Hall, Flora et al. 2004).

En cuanto a los rasgos de la personalidad se ha documentado que estos pacientes son altamente sociables y que durante la etapa de la infancia y niñez temprana exhiben hiperactividad y déficit de atención (Masuno, Imaizumi et al. 1995). Muchos padres describen que los pacientes presentan dificultades para la adaptación a los cambios con ocasionales ataques de ira, además eventualmente manifiestan trastornos del sueño (Shebib, Hugosson et al. 1991). La mayor parte de los individuos afectados presentan retardo en el desarrollo con una excelente adaptación social. Algunos niños tienen inteligencia normal con solo algunas dificultades en el aprendizaje aunque usualmente el cociente intelectual se encuentra en un rango entre 50 y 90 puntos, el desarrollo del lenguaje es lento (Spranger, Tariverdian et al. 1996). Casi todos los individuos afectados caminan, se comunican y ejercen sus labores diarias a pesar de su talla baja extrema, aunque sin independencia total. Algunos pacientes han llegado a finalizar sus estudios de la secundaria e incluso a tener estudios superiores (Théau and Maroteaux 1993, Hall, Flora et al. 2004).

En estos individuos los niveles de GH séricos se encuentran dentro de límites normales y los pacientes que han sido tratados con hormona de crecimiento recombinante no

han mostrado mejoría de la talla en el momento de la administración y tampoco de la talla final post puberal. Por otro lado se ha reportado un deterioro de las lesiones vasculares del sistema nervioso central en los pacientes que reciben la terapia de suplencia (Brancati, Castori et al. 2005). Frecuentemente se encuentra pubertad precoz en mujeres afectadas quienes pueden mostrar un desarrollo mamario y menarquia tempranas (Toudic, Maroteaux et al. 1983).

Se han evidenciado mujeres con labios mayores hipoplásicos y clitoromegalia. En una paciente fue reportado la presencia de hirsutismo y el síndrome de ovario poliquístico. No han sido documentados embarazos en mujeres con MOPD II y se ha reportado menopausia prematura en algunas pacientes (Verloes, Lambrechts et al. 1987). En los hombres en quienes se han obtenido datos del inicio de la pubertad ha sido entre los 11 y 13 años de edad con crecimiento de vello facial, presencia de acné, engrosamiento de la voz y eyaculaciones nocturnas (Willems, Rouwé et al. 1987). En algunos pacientes se ha presentado criptorquidia. Los testículos generalmente son pequeños para la edad e incluso para el tamaño corporal. De forma más infrecuente se presentan hipospadias. El pene se ha descrito como pequeño pero proporcionado (Winter, Wigglesworth et al. 1985). Asimismo en hombres se ha descrito la presencia de una areola grande para el tamaño del tórax y pezones hiperpigmentados (Hall, Flora et al. 2004).

Dentro de los trastornos esqueléticos y de extremidades característicos observados en este síndrome se han descrito una edad ósea retardada a pesar de que la maduración dental es precoz y los huesos faciales son pequeños (Goldblatt, Carman et al. 1991). Las manos son relativamente pequeñas pero anchas y pueden tener menor número de pliegues o un pliegue palmar único. En las personas más jóvenes se puede tener la percepción de la presencia de edema en el dorso de las manos (Poznanski, Iannaccone et al. 1983). Con el paso del tiempo

las manos se perciben más pequeñas, anchas, con mayor número de pliegues y la piel se torna seca. Además se evidencia clinodactilia del quinto dedo, braquimesofalanges y puede generarse fusión de las falanges (Herman, Mendelsohn et al. 1991). Los antebrazos son cortos desde el nacimiento pero se tornan cada vez más desproporcionadamente cortos con respecto a la talla. El radio y el cúbito en la región distal presentan metafisis anchas y arqueadas y se vuelven displásicos antes de la fusión epifisiaria (Poznanski, Iannaccone et al. 1983). La cabeza del radio usualmente presenta luxaciones limitando la movilidad del codo lo que ocurre aproximadamente entre los cinco y los diez años de edad (Saul and Wilson 1990). Los pies también se tornan más pequeños y anchos con la edad y se puede observar edema en el dorso. En algunos pacientes puede encontrarse un espacio amplio entre el primer y el segundo dedo. Es también frecuente encontrar la luxación de rodillas (Al GAZAL, Hamada et al. 1995). En general los huesos largos son delgados pero presentan un ensanchamiento gradual de las metafisis y la fusión de las epífisis puede ocurrir a edad temprana. Todas las articulaciones desarrollan hiperlaxitud y pueden generarse subluxaciones prácticamente en cualquiera de ellas (Haan, Furness et al. 1989). Una progresiva desproporción esquelética se va generando con el paso del tiempo secundaria a un relativo acortamiento de las extremidades distales (Hersh, Joyce et al. 1994).

Las caderas pueden estar luxadas en el momento del nacimiento. Como un hallazgo muy frecuente se presenta coxa vara, inicialmente leve, que se va volviendo más severa y en los estudios radiológicos hay una aparente epifisiólisis femoral proximal asociada a un deslizamiento de la epífisis a lo largo del eje (Hurst, Winter et al. 1988). Con la marcha se genera marcada lordosis lumbar y de manera más tardía puede presentarse escoliosis lumbar principalmente en mujeres. Los grados de severidad de las alteraciones esqueléticas pueden variar ampliamente entre los pacientes (Majewski and Goecke 1998, Hall, Flora et al. 2004).

El examen radiológico de la edad ósea de estos pacientes exhibe maduración disarmónica de los centros de osificación y edad ósea retardada, la cual se encuentra entre dos y cinco años por debajo de la edad cronológica. Estos pacientes presentan displasia esquelética que involucra epífisis y metáfisis, por lo cual la edad ósea podría no reflejar realmente la maduración ósea (Saul and Wilson 1990). En la etapa neonatal se aprecia una pelvis alta y delgada con alerones ilíacos pequeños y acetábulo plano (Herman, Mendelsohn et al. 1991). En etapas posteriores se encuentra una cabeza femoral pequeña e hipoplásica con cuello corto y progresivamente se desarrolla coxa vara severa. El fémur distal comienza a generar ensanchamiento metafisiario y cuando las epífisis se osifican se vuelven triangulares mientras que las metáfisis femorales distales muestran forma de V (Goldblatt, Carman et al. 1991). Los huesos púbicos e isquiales son delgados. Las vértebras podrían ser levemente planas en los niños pequeños. El radio y el cúbito en la región distal desarrollan ensanchamiento metafisiario, crecimiento lento y usualmente muestran arqueamiento entre ellos. El segmento mesomélico se vuelve corto. Algunos huesos del carpo pueden fusionarse. Es posible encontrar pseudoepífisis de los metacarpos, el primero y quinto metacarpo son más cortos y todas las falanges distales son hipoplásicas (Poznanski, Iannaccone et al. 1983). Las clavículas son largas y delgadas, y se pueden encontrar costillas hipoplásicas o ausentes. El cráneo es relativamente proporcionado aunque los huesos faciales son pequeños. La silla turca puede verse grande (Hall, Flora et al. 2004).

Otras alteraciones sistémicas que es posible encontrar en estos pacientes incluyen el pelo fino y ralo (incluso es posible visualizar el cuero cabelludo directamente), las cejas delgadas y la piel seca. En todos los pacientes se desarrolla un patrón inusual de pigmentación que va progresando con el paso del tiempo caracterizado por manchas café con leche, efélides, hiperpigmentación en el cuello, el tórax y las axilas que incrementa con la

exposición solar, especialmente en áreas que han sufrido traumas (Nishimura, Hasegawa et al. 2003). En la pubertad se empiezan a presentar zonas de engrosamiento y eczema. Posteriormente puede encontrarse queratosis difusa con áreas adelgazadas y se desarrolla poiquilodermia en zonas de exposición solar. Se han identificado algunos pacientes que presentan “hoyuelos” en la región sacra (Majewski, Ranke et al. 1982).

Además, ha sido evidenciada anemia y susceptibilidad incrementada a las infecciones en múltiples pacientes, trastornos del perfil lipídico, resistencia severa a la insulina y diabetes prematura (Huang-Doran, Bicknell et al. 2011). También es posible encontrar otras anomalías como hernias inguinales y riñones hipoplásicos o malformados como por ejemplo riñón en herradura (Salerno, Amabile et al. 2003, Hall, Flora et al. 2004).

Las causas de muerte son variadas e incluyen sepsis, trastornos gastrointestinales, renales, cardiomiopatías y rupturas de aneurismas en el sistema nervioso central. Se han reportado pacientes que alcanzan la tercera década de la vida, aunque generalmente presentan muerte muy temprana debida a diferentes complicaciones sistémicas (Majewski, Ranke et al. 1982, Hall, Flora et al. 2004). Se han evidenciado diferencias entre el síndrome de Seckel y el síndrome MOPD II, en este último la restricción del crecimiento es más severa, se presentan anomalías radiológicas múltiples y el déficit cognitivo se encuentra ausente o es menos severo (Piane, Della Monica et al. 2009, Willems, Genevieve et al. 2009).

Las mutaciones bialélicas con pérdida de función del gen *PCNT* son las causales de este síndrome (Rauch, Thiel et al. 2008) (Griffith, Walker et al. 2008). Su patrón de herencia es autosómico recesivo (Black, Fitzsimmons et al. 1982). Su prevalencia es menor a 1: 1.000.000 con menos de 100 casos bien documentados en la literatura (Viteri et al. 2014).

El seguimiento de estos pacientes incluye resonancia magnética o angiografía tomográfica computarizada del sistema nervioso central desde los 12-18 meses de edad.

Según el caso es posible efectuar revascularización y tratamiento de los aneurismas con el fin de mejorar la expectativa y la calidad de vida (Bober, Khan et al. 2010, Liu, Zhang et al. 2012, Perry, Robertson et al. 2013). En algunos pacientes está indicada la utilización de medicamentos como anticoagulantes o anticonvulsivantes.

Es importante la realización regular de exámenes paraclínicos, principalmente el estudio de niveles de insulina y el perfil lipídico, estudios radiológicos esqueléticos completos, monitoreo de circunferencia craneana y talla con curvas estandarizadas, seguimiento neurológico y neuropsicológico (Hall, Flora et al. 2004, Rimoin, Pyeritz et al. 2013). El manejo incluye terapia de apoyo con educación especial en caso de déficit cognitivo o alteraciones comportamentales, terapias ocupacionales y redes de apoyo a familiares. Además son importantes las evaluaciones neuropsicológicas periódicas para mejorar la adaptación a la educación. Igualmente es crucial el manejo ortopédico (Pagon, Adam et al. 2013).

#### **1.2.6.3 Enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo I/III (MOPD I/III)**

El enanismo esencial osteodisplásico microcefálico tipo I/III (MOPD I/III), síndrome Taybi Linder o displasia cefaloesquelética es un trastorno descrito por primera vez por Taybi y Linder en el año 1967 (Taybi and Linder 1967). Inicialmente fueron puntualizadas como dos patologías distintas de acuerdo a criterios radiológicos que en su descripción presentaban pequeñas diferencias en la estructura ósea de la pelvis y de los huesos largos. Posteriormente se observó que estas características se sobrelapan aunque exista cierta variación fenotípica. Para la mayoría de los autores es claro que los casos reportados de MOPD I y III se refieren a la misma patología, la cual presenta expresividad variable (Haan, Furness et al. 1989). Hasta la fecha han sido descritos menos de 50 casos en la literatura (Vichi, Currarino et al.

2000). Las principales características reseñadas por los autores en la descripción de los casos son microcefalia, RCIU desproporcionado, muy bajo peso y talla al nacer, alteraciones esqueléticas múltiples, defectos neurológicos, cardiacos y tegumentarios, entre otros (Taybi and Linder 1967, Winter, Wigglesworth et al. 1985, Nadjari, Fasouliotis et al. 2000, Vichi, Currarino et al. 2000).

Realizando una síntesis de las descripciones clínicas encontradas en la literatura es posible definir las principales características del síndrome como sigue: pacientes con RCIU desproporcionada severa ( $<-5$  DE), microcefalia importante ( $<-6$  DE), frente recedida con occipucio prominente, suturas craneales realizadas, fontanela anterior muy pequeña o incluso no palpable, pueden presentar hipotricosis o alopecia, pelo ralo y cejas escasas, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, grandes ojos desproporcionados, hipotelorismo ocular, nariz grande y prominente, hipoplasia medio facial, labios gruesos, boca relativamente grande, erupción dental retardada, micrognatia marcada, pabellones auriculares con aparente implantación baja, simplificación y trago ausente (Thomas and Nevin 1976, Vichi, Currarino et al. 2000, Hennekam 2009). Además, se describen con cuello muy corto y levemente ensanchado, *pectus excavatum*, clavículas largas y prominentes, acromion saliente y grasa subcutánea casi ausente (Meinecke, Schaefer et al. 1991). Las manos y los pies son relativamente grandes pero con braquidactilia y clinodactilia del quinto dedo, exhiben pliegue palmar único, linfedema en manos y pies. También se ha descrito que presentan “manos en pala” por presencia de dedos fusiformes, hipertonia principalmente en miembros inferiores y se han encontrado contracturas en flexión en codos, caderas, rodillas y dedos, talón valgo, hiperlaxitud ligamentaria y escoliosis (Majewski and Spranger 1976, Majewski, Stoeckenius et al. 1982, Castro-Gago, Pombo et al. 1983).

Los pacientes con esta enfermedad padecen además retardo del desarrollo psicomotor, convulsiones de difícil manejo y comportamiento autista (Pierce and Morse 2012). Asimismo, se encuentran criptorquidia y micropene aunque no se han descrito alteraciones en los genitales femeninos (Meinecke and Passarge 1991). En cuanto a otros sistemas se han encontrado trastornos congénitos que incluyen defectos septales ventriculares, foramen oval permeable, hipertensión pulmonar, hipopituitarismo, alteraciones renales, hepatoesplenomegalia, vasculopatías, hipoacusia neurosensorial y ceguera de causas neurológicas y/o catarata congénita (Maldergem, Gillerot et al. 1990, Pierce and Morse 2012). La piel es seca e hiperqueratósica con algunos casos de ictiosis. Además se pueden encontrar anomalías de la pigmentación en la piel y los anexos (Majewski, Stoeckenius et al. 1982, Eason, Hall et al. 1995, Berger, Haschke et al. 1998, Abdel-Salam, Abdel-Hamid et al. 2013).

Los trastornos radiológicos esqueléticos son hallazgos primordiales que permiten realizar el diagnóstico. Dentro de los principales se han descrito la dolicocefalia, la base del cráneo empinada y esclerótica y los techos orbitarios muy cóncavos (Majewski, Stoeckenius et al. 1982, Meinecke and Passarge 1992). En las radiografías laterales del cráneo ha sido observada braquicefalia y una región occipital redondeada (Taybi 1992, Sigaudy, Toutain et al. 1998). Se evidencia también marcada micrognatia, clavículas elongadas, extremos esternales de las costillas ensanchados y no osificados, menor número de costillas, platispondilia craneocaudal, hendidura de los arcos vertebrales cervicales y torácicos 1-3, acortamiento de la distancia interpedúncular más prominente en la región lumbar baja, espacios intervertebrales profundos o más amplios, techos acetabulares casi horizontales, pelvis displásica con alerones iliacos y acetábulos hipoplásicos. Además, se ha encontrado ensanchamiento de los alerones iliacos, hipoplasia del pubis y huesos púbicos pobremente

osificados, luxación de cadera, metáfisis femorales proximales amplias con exostosis en el margen proximal medial, tibia y fémur con margen proximal irregular, cuello femoral corto, región intertrocantérica ensanchada. El peroné puede ser más largo que la tibia en la región proximal (Vichi, Currarino et al. 2000, Nagy, Wang et al. 2012). El radio puede verse acortado en su porción proximal y el cúbito elongado y arqueado, ambos huesos pueden estar luxados posteriormente en la articulación del codo (Kozlowski, Donovan et al. 1993). Todos los huesos largos están acortados pero principalmente el húmero, que al igual que el fémur puede presentar arqueamiento (Westman, Stover et al. 1999). La falange proximal del hallux puede verse ensanchada y algunos metacarpos o metatarsos cóncavos (Kozlowski, Donovan et al. 1993).

Dentro de los defectos neurológicos que han sido encontrados están la microcefalia, la hipoplasia generalizada de los hemisferios cerebrales con giros pobremente desarrollados especialmente en el área frontoparietal, los grandes quistes intrahemisféricos o colecciones interhemisféricas de líquido cefalorraquídeo, la agenesia completa o parcial de cuerpo calloso, el tercer ventrículo unido con el ventrículo lateral o fusión extensa y la dilatación de los ventrículos laterales, los lóbulos frontales y temporales hipoplásicos o incluso atróficos, la agenesia del vermis cerebelar con pequeños hemisferios cerebelares en una pequeña fosa posterior, la escasez de giros corticales, la heterotopía periventricular, el estrechamiento del canal espinal en C1-C2. La glándula hipófisis es de características usuales. Se encuentra retardo en la mielinización, paquigiria frontal y evidencia microscópica de defectos de migración neuronal (Miller, Dilenge et al. 1998, Klinge, Schaper et al. 2002, Yamatogi and Ohtahara 2002, Juric-Sekhar, Kapur et al. 2011, Abolila, Alsawan et al. 2012, Pierce and Morse 2012).

Algunos hallazgos se han descrito en la literatura de las autopsias realizadas como el cerebro sin alteraciones visibles pero de pequeño tamaño, la ausencia del cuerpo calloso, la lisencefalia y la hipoplasia cerebelar, una glándula tiroides pequeña, la vesícula biliar relativamente grande, los uréteres y la pelvis renal ensanchados. Microscópicamente los testículos muestran un desarrollo retardado correspondiente a una edad fetal de ocho meses (Majewski, Stoeckenius et al. 1982).

Las principales diferencias con respecto a los demás tipos de enanismo esencial microcefálico consisten en la evidencia de anomalías radiológicas distintivas principalmente la platispondilia, la displasia marcada de la pelvis y el ensanchamiento de las metafisis femorales proximales, además los múltiples defectos neurológicos característicos. Sin embargo los hallazgos faciales son similares (Majewski, Stoeckenius et al. 1982, Vichi, Currarino et al. 2000). En los pacientes con síndrome MOPD I/III se ha reportado muerte temprana que ocurre en la mayoría de los casos a los pocos meses de vida secundaria a infecciones, descompensación cardiovascular y en algunos casos por causas no claras. Se han descrito pacientes que alcanzan hasta los seis años de vida (Abdel-Salam, Abdel-Hamid et al. 2012).

La prevalencia general de este síndrome se estima en menos de 1: 1.000.000. Su patrón de herencia es autosómico recesivo y es causado por mutaciones bialélicas del gen *RNU4ATAC* el cual codifica para U4ATAC, un snRNA componente del spliceosoma menor (Leutenegger, Labalme et al. 2006, Edery, Marcaillou et al. 2011, He, Liyanarachchi et al. 2011, Jafarifar, Dietrich et al. 2014). El manejo de los pacientes está dirigido al tratamiento de los síntomas y signos dentro del cual se encuentra la terapia anticonvulsivante y los procedimientos especializados ortopédicos, neurológicos, cardiacos, entre otros, los cuales

puedan mejorar la calidad de vida del paciente y de su familia (Kozlowski, Donovan et al. 1993, Abdel-Salam, Abdel-Hamid et al. 2012).

#### **1.2.6.4 Síndrome de Meier-Gorlin**

El síndrome de Meier-Gorlin fue descrito por Meier en 1.959 (Meier and Rothschild 1959) y por Gorlin en 1.975 (Gorlin, Cervenka et al. 1974). Es un trastorno caracterizado por la tríada de microtia, patela pequeña o ausente y talla baja, por lo cual también ha recibido el nombre en inglés de “Ear patella short stature syndrome” (de Munnik, Otten et al. 2012). Por lo menos dos de estas tres características están presentes en el 97% de los pacientes reportados con la enfermedad, siendo la presencia de hipoplasia/aplasia patelar y microtia en combinación la presentación más frecuente (Bongers, Opitz et al. 2001). Hasta la fecha han sido descritos 67 pacientes en la literatura, Su prevalencia exacta no ha sido determinada pero se estima que es menor de 1: 1.000.000 (de Munnik, Hoefsloot et al. 2015).

Los principales hallazgos clínicos que han sido reportados en estos pacientes incluyen la microtia con rangos diferentes de severidad. En los casos más graves se evidencian pabellones auriculares infradesarrollados con implantación baja y es posible encontrar canales auditivos estrechos con hipoacusia conductiva (Boles, Teebi et al. 1994). Los pacientes presentan ausencia de patela en la mayoría de los casos pero también puede encontrarse hipoplasia, lo cual puede conducir al desarrollo de osteoartritis a una edad temprana (de Munnik, Bicknell et al. 2012). La mayoría de pacientes exhiben RCIU que continúa hasta la etapa posnatal. En los pacientes estudiados se ha podido apreciar un crecimiento posnatal retardado durante el primer año de vida (<-2 DE) pero una velocidad de crecimiento casi normal en los años posteriores aunque no llegan a alcanzar el crecimiento esperado para la edad (Cohen, Temple et al. 1991). La microcefalia (<3 DE) es un rasgo que

está presente en menos de la mitad de los casos. Ha sido evidenciado que la talla alcanzada y las medidas de la circunferencia craneana difieren significativamente de acuerdo al gen afectado. Además varía según el género y el grupo étnico (Buebel, Salinas et al. 1996, de Munnik, Bicknell et al. 2012). El tratamiento con hormona del crecimiento no ha mostrado mejoría de la talla final en estos pacientes, excepto en quienes presentan niveles de IGF1 bajos (Faqeih, Sakati et al. 2005, de Munnik, Hoefsloot et al. 2015).

Estos pacientes presentan un fenotipo facial caracterizado por microtia, microstomía, labios gruesos y microrretrognatia a edad temprana. La nariz usualmente es delgada y convexa, la cual se vuelve más prominente con el paso del tiempo (Fryns 1998, Cohen, Mulas et al. 2002). Una edad ósea retardada, huesos largos delgados y *genu recurvatum* (hiperextensión de la rodilla) pueden encontrarse, además de contracturas o subluxaciones articulares o pie equinovaro en menor frecuencia (Hurst, Winter et al. 1988). Las anomalías del tracto urogenital son también frecuentes principalmente la criptorquidia, los testículos pequeños y el micropene y unos labios mayores hipoplásicos en mujeres (Feingold 2002). Todas las mujeres en etapa pospuberal padecen de hipoplasia mamaria y se han reportado casos de útero hipoplásico y ovarios poliquísticos (Terhal, Ausems et al. 2000). En ambos géneros el vello axilar es usualmente escaso y ralo pero el vello púbico es de características normales (Shalev and Hall 2003, de Munnik, Bicknell et al. 2012).

La inteligencia es normal en la mayoría de los pacientes aunque un retardo en el desarrollo psicomotor y/o desarrollo del lenguaje puede ser encontrado (Martínez-Barrera, García-Delgado et al. 2013). En algunos pacientes se presentan defectos en el tracto respiratorio como el enfisema pulmonar congénito, la broncomalacia, la laringomalacia y/o la traqueomalacia (Loeys, Lemmerling et al. 1999). Infecciones en la vía respiratoria son

frecuentes en la niñez pero mejoran con el tiempo (Gezdirici, Yosunkaya et al. 2010). Las anomalías cardíacas congénitas son raras pero se han encontrado defectos septales ventriculares y ductus arterioso permeable (Boles, Teebi et al. 1994). Los trastornos alimentarios son frecuentes durante la infancia y la niñez temprana, los cuales van desde la hiporexia hasta el reflujo gastroesofágico con requerimiento de sonda gástrica de alimentación o gastrostomía en algunos casos (Bongers, Opitz et al. 2001, de Munnik, Hoefsloot et al. 2015).

El síndrome de Meier Gorlin presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. Mutaciones en cinco genes (*ORC1*, *ORC4*, *ORC6*, *CDT1* y *CDC6*) que codifican para proteínas del complejo pre-replicativo se han descrito como causales en aproximadamente el 80% de los pacientes (Bicknell, Bongers et al. 2011, Bicknell, Walker et al. 2011, Guernsey, Matsuoka et al. 2011). Aunque el mecanismo causal no ha sido establecido, se ha propuesto que la alteración en el funcionamiento del complejo pre-replicativo que reduce la fase G1 de la replicación del ADN se asocia al impedimento de la proliferación celular que finalmente resulta en una reducción del número celular total (Hossain and Stillman 2012, Kuo, Song et al. 2012, Stiff, Alagoz et al. 2013).

Para el diagnóstico del síndrome es importante tener en cuenta que los pacientes pueden presentar solo algunas de las principales características fenotípicas. Además en niños la radiolucencia patelar en los primeros cinco a seis años de vida dificulta su estudio radiológico y en ellos se debe considerar la realización de un ultrasonido (Boles, Teebi et al. 1994, Cohen, Mulas et al. 2002). Para el estudio molecular en pacientes que presentan talla baja severa y/o microcefalia es pertinente iniciar el análisis de los genes *ORC1* y *ORC4* (Bicknell, Bongers et al. 2011, de Munnik, Bicknell et al. 2012).

El manejo de estos pacientes debe ser multidisciplinario e incluye la valoración por otorrinolaringología, ortopedia y rehabilitación física (Dudkiewicz and Tanzer 2004). Es importante considerar la medición de IGF1 y GH puesto que es pertinente el tratamiento con suplencia de la hormona del crecimiento en pacientes con IGF1 disminuido (Faqeih, Sakati et al. 2005). En caso de presentar problemas severos para la alimentación se debe considerar el posible manejo con sonda gástrica de alimentación o incluso una gastrostomía (Loeys, Lemmerling et al. 1999). Cuando se presenta enfisema pulmonar congénito que ponga en peligro la vida es posible considerar el manejo quirúrgico. En pacientes mayores puede ser tratado con fármacos Beta-2-antagonistas selectivos (Bongers, Opitz et al. 2001).

Aunque no es muy frecuente encontrar pacientes con defectos cardiacos congénitos es aconsejable realizar estudios de electrocardiografía y/o ecocardiografía en el momento del diagnóstico (Feingold 2002). En algunas mujeres con hipoplasia mamaria se ha realizado tratamiento estrogénico exógeno con éxito, lo cual podría considerarse si no se ha contemplado una cirugía mamaria estética (Terhal, Ausems et al. 2000). Deben efectuarse exámenes ginecológicos preconceptionales por las anomalías genitales reportadas (Boles, Teebi et al. 1994). La expectativa de vida es similar a la esperada para la población general a excepción de los casos que presentan trastornos pulmonares o cardíacos severos con complicaciones (de Munnik, Bicknell et al. 2012, de Munnik, Hoefsloot et al. 2015).

### **1.2.7 Microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH)**

La MCPH ha sido clasificada en por lo menos doce subtipos diferentes según el gen asociado a su etiología. Debido a que la MCPH5 (causada por mutaciones en *ASPM*) es la forma más común y de la cual se han realizado la mayor cantidad de publicaciones, muchos

datos clínicos solo están disponibles para esta forma de MCPH (Pagon, Adam et al. 2013). En esta enfermedad se presenta un crecimiento cerebral deficiente que se asocia a microcefalia, la cual es evidente aproximadamente a las 24 semanas de gestación. La medida de la circunferencia occipito-frontal al nacimiento se encuentra por lo menos -2 DE por debajo de la media para la edad, el género y el grupo étnico, la cual va empeorando con el tiempo. Por definición, la talla es normal en los individuos con MCPH. El desarrollo psicomotor es normal en algunos pacientes pero usualmente se presenta un leve retardo y en la mayoría de los casos existe un retraso en el inicio del lenguaje y un déficit cognitivo de leve a moderada intensidad (Woods, Bond et al. 2005, Cox, Jackson et al. 2006, Aicardi, Bax et al. 2009).

Estos pacientes han sido descritos con personalidad alegre, afable, sociable y son cariñosos con las personas con quienes se relacionan. Sin embargo los niños pequeños pueden mostrar un comportamiento agresivo e hiperactivo. Se ha reportado la presencia de convulsiones usualmente tónico-clónicas de fácil manejo en aproximadamente el 10% de los pacientes. Los hallazgos neurológicos se limitan a un síndrome piramidal leve, como por ejemplo una ligera espasticidad en las extremidades inferiores. No se presentan características faciales particulares. No existen datos específicos acerca de la expectativa de vida de estos pacientes, pero se ha reportado una supervivencia superior a los 50 años de edad. Tiene una incidencia de 1: 30000 a 1: 250000 (Pattison, Crow et al. 2000, Bond, Scott et al. 2003, Passemard, Titomanlio et al. 2009, Basel-Vanagaite and Dobyns 2010).

Para su diagnóstico deben efectuarse en todos los casos estudios con neuroimágenes, un examen neurológico, pruebas de integridad retinal y un análisis de rearreglos

cromosómicos. Además, es importante excluir la presencia de fenilcetonuria materna (Passemard, Titomanlio et al. 2009).

Existe una gran variedad de diagnósticos diferenciales en el espectro de los trastornos MCPH-SCKS que pueden ser divididos según sus características clínicas. Por ejemplo, la microcefalia asociada a malformaciones cerebrales dentro de las cuales se encuentra el fenotipo con defectos en la organización o migración cortical, el espectro lisencefalia-paquigiria, la microlisencefalia y la polimicrogiria, entre otras (Basel-Vanagaite and Dobyns 2010) (Rosenberg, Agarwala et al. 2002). Las microcefalias sindrómicas pueden además ser divididas en subgrupos de acuerdo a algunos hallazgos clínicos comunes como los síndromes con talla baja severa los cuales son denominados enanismos esenciales microcefálicos (síndromes MOPD II, Meier Gorlin y Taybi Linder) (Majewski, Ranke et al. 1982, Ogi, Walker et al. 2012, Pierce and Morse 2012).

Otros diagnósticos diferenciales son las microcefalias con trastornos de reparación del ADN que incluyen síndromes con inestabilidad cromosómica, fotosensibilidad y trastornos inmunológicos o hematológicos como la anemia de Fanconi, el síndrome *Nijmegen breakage*, el síndrome *Warsaw breakage*, la microcefalia con inmunodeficiencia severa combinada y talla baja y el síndrome Cockayne, entre otros (Pagon, Adam et al. 2013). Otro grupo se ha constituido por microcefalias asociadas a inestabilidad mitótica como el síndrome de aneuploidía variegada en mosaico (MVA) (Katyal and McKinnon 2007, O'Driscoll and Jeggo 2008). A continuación serán descritos algunos de los síndromes más representativos en el marco del desarrollo del presente trabajo de tesis.

### 1.2.7.1 Síndrome de rupturas Nijmegen

El síndrome de rupturas *Nijmegen* tiene una incidencia aproximada de 1: 100.000 recién nacidos vivos aunque no existen datos precisos. Se caracteriza por la presencia de RCIU con peso y talla bajos para la edad gestacional en el momento del nacimiento que continúa aproximadamente hasta los dos años de edad. Posteriormente, el crecimiento lineal tiende a normalizarse pero los individuos continúan siendo pequeños para la edad. Presentan microcefalia desde el nacimiento o la cual puede también desarrollarse en los primeros meses de vida progresando a una microcefalia severa. Los hallazgos faciales se hacen distintivos a medida que progresa la microcefalia e incluyen la frente inclinada, las fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, una prominencia medio facial, la nariz prolongada con puente nasal prominente y retrognatia y los pabellones auriculares grandes (Hiel, Weemaes et al. 2001, Chrzanowska, Gregorek et al. 2012).

Los pacientes muestran retraso en el desarrollo psicomotor e hiperactividad en la niñez temprana, aunque usualmente no se encuentra afectación durante el primer año de vida. Las habilidades intelectuales tienden a disminuir con el tiempo y la mayoría de los pacientes a la edad de siete años muestran déficit cognitivo de leve a moderado. Los pacientes tienen buenas relaciones interpersonales y son descritos como tímidos y alegres. Tienen susceptibilidad a diferentes infecciones principalmente en el tracto respiratorio, el sistema gastrointestinal y en las vías urinarias (Pagon, Adam et al. 2014).

Estos pacientes presentan una tendencia incrementada a desarrollar malignidades, las cuales han sido reportadas en aproximadamente el 40% de los pacientes antes de los 20 años de edad. Se presentan linfomas primarios principalmente (en 45% de los casos son de células B y en 55% de células T). También se han encontrado tumores sólidos como

meduloblastomas, gliomas y rabdomiosarcomas (Bakhshi, Cerosaletti et al. 2003, Michałkiewicz, Barth et al. 2003).

Se ha demostrado una alta incidencia de falla ovárica prematura en las mujeres que padecen el síndrome evidenciada por una elevada concentración sérica de gonadotropinas y amenorrea primaria. Además exhiben ausencia del desarrollo de caracteres sexuales secundarios. Otros hallazgos clínicos son la presencia de alteraciones en la pigmentación de la piel y malformaciones congénitas en algunos pacientes como la polidactilia preaxial, la atresia de coanas, el labio y paladar hendido, el riñón en herradura, las hipospadias y la atresia anal (Wegner, Chrzanowska et al. 1999, Warcoin, Lespinasse et al. 2009).

En las pruebas de inestabilidad cromosómica se encuentran inversiones y translocaciones que involucran los cromosomas 7 y 14 en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina. Se ha encontrado en el 100% de los pacientes la variante c.657\_661 del 5' en el gen *NBN*. Tiene un patrón de herencia autosómico recesivo (Distel, Neubauer et al. 2003).

#### **1.2.7.2 Síndrome de inmunodeficiencia combinada severa con microcefalia y talla baja**

Este síndrome se caracteriza por microcefalia presente desde el nacimiento, hallazgos faciales similares a los descritos para el síndrome de Seckel con frente recedida, microrretrognatia y nariz larga y picuda. Presentan además restricción del crecimiento leve, déficit cognitivo y anormalidades de la pigmentación de la piel. Todos los pacientes tienen hipogammaglobulinemia, linfocitopenia severa de células B y células T, y niveles de células NK normales. Los pacientes desarrollan infecciones recurrentes severas que usualmente causan la muerte. Sus fibroblastos muestran variable pero incrementada sensibilidad a la

radiación ionizante. Este síndrome es causado por mutaciones bialélicas en el gen *NHEJ1* (Buck, Malivert et al. 2006, Chistiakov, Voronova et al. 2009).

### **1.2.7.3 Síndrome de Cockayne**

El síndrome de Cockayne tiene una incidencia aproximada de 2.7: 1.000.000 de nacimientos, aunque es probable que esté subdiagnosticado. Se caracteriza por falla en el crecimiento y alteraciones multisistémicas con una edad de inicio y tasa de progresión variables. El espectro fenotípico puede dividirse en cuatro presentaciones clínicas generales que serán descritas a continuación (Nance and Berry 1992).

El síndrome de Cockayne tipo I (CS I) es el subtipo clásico y se presenta con un crecimiento prenatal típicamente normal. La talla, el peso y la circunferencia occipito-frontal son normales en el momento del nacimiento. Sin embargo, dentro de los primeros dos años el crecimiento y el desarrollo son más lentos de lo normal. Para el momento en el que se manifiestan todas las características clínicas del síndrome el paciente muestra la talla, el peso y el perímetro cefálico por debajo del percentil 5. Progresivamente se desarrolla una pérdida de la visión, de la audición, y una alteración de la función del sistema nervioso central y periférico conducentes a una discapacidad extrema. También se presentan caries dentales severas en más del 85% de los pacientes. La fotosensibilidad se ha descrito como severa pero los pacientes no presentan mayor predisposición al cáncer de piel (Boltshauser, Yalcinkaya et al. 1989).

Otras anomalías clínicas se encuentran en más del 10% de los pacientes e incluyen alteraciones neurológicas como espasticidad, hipo o hiperreflexia, marcha anormal, ataxia, incontinencia, temblor, alteraciones del lenguaje, convulsiones, atrofia muscular, desmielinización o calcificaciones en el sistema nervioso central. Pueden presentar

anhidrosis o erupción malar. Problemas oftalmológicos como enoftalmos, retinopatía pigmentaria, cataratas, atrofia óptica, estrabismo, nistagmo, fotofobia y microftalmia, también han sido encontrados. Alteraciones dentales como dientes hipoplásicos o ausentes, erupción dental retardada y maloclusión pueden estar presentes. Se pueden encontrar malformaciones renales pero usualmente no son significativas. Se han observado trastornos endocrinos como maduración sexual ausente o retardada e infertilidad y gastrointestinales tales como hepato-esplenomegalias o pruebas de función hepática alteradas. La muerte de estos pacientes ocurre típicamente en la primera o segunda década de la vida (Lowry and Opitz 1982, Sugita, Takanashi et al. 1992).

El síndrome de Cockayne tipo II (CS II) es un subtipo más severo en el que los pacientes presentan evidencia de falla en el crecimiento desde el nacimiento con poco o ningún desarrollo neurológico posnatal. Cataratas congénitas u otras anomalías oculares estructurales están presentes en aproximadamente el 30% de los casos. Los individuos afectados presentan además artrogriposis o contracturas posnatales tempranas de la columna (cifosis o escoliosis) y las articulaciones. La muerte se presenta cerca de los siete años de edad. El CS tipo II se sobrelapa clínicamente con el síndrome cerebrooculofacioesquelético (COFS) que también lleva el nombre de síndrome de Pena-Shokeir tipo II (Nance and Berry 1992, Lahiri and Davies 2003).

El síndrome de Cockayne tipo III (CS III) se caracteriza por un crecimiento y desarrollo cognitivo esencialmente normales. Es diagnosticado en los pacientes que presentan características clínicas asociadas con CS pero en quienes el crecimiento y/o el desarrollo cognitivo excede las expectativas de CS tipo I (Mallery, Tanganelli et al. 1998).

El espectro Xeroderma Pigmentoso-Síndrome de Cockayne (XP-CS) incluye efélides faciales y cáncer de piel temprano típico del xeroderma pigmentoso. Además tiene algunas características típicas del CS como el déficit cognitivo, la espasticidad, la talla baja y el hipogonadismo. El XP-CS no involucra alteraciones esqueléticas, desmielinización o calcificaciones del sistema nervioso central (Greenhaw, Hebert et al. 1992).

Este síndrome tiene un patrón de herencia autosómico recesivo. Los dos genes que presentan mutaciones causales del CS son *ERCC6* (65% de los casos) y *ERCC8* (35% de los casos). Los ensayos de reparación del ADN en las regiones mutantes de estos genes muestran una marcada sensibilidad a la radiación UV, una deficiente recuperación de la síntesis de ARN seguida de daño con luz UV y una alteración en la reparación de genes transcripcionalmente activos (Henning, Li et al. 1995, Meira, Graham et al. 2000).

#### **1.2.7.4 Síndrome de *Warsaw Breakage***

Este es un defecto asociado con un fenotipo celular único en el que coexisten la ruptura de cromosomas inducida por químicos y los defectos de cohesión de cromátides hermanas. Pertenece al grupo de las cohesinopatías. Se han descrito sólo cinco casos en el mundo en tres familias diferentes. Es causado por mutaciones bialélicas en el gen *DDX11*. Tiene un patrón de herencia autosómico recesivo (Amann, Valentine et al. 1996, Fan, Newman et al. 2002, Capo-Chichi, Bharti et al. 2013).

Las características clínicas del síndrome de *Warsaw Breakage* son la presencia de microcefalia severa, la restricción del crecimiento pre y posnatal (todos los valores por debajo del percentil 3). Los principales hallazgos faciales son el diámetro bifrontal estrecho, estrabismo, ojos prominentes, pliegues epicánticos, nariz y narinas pequeñas (aunque un caso fue descrito con nariz prominente), filtro plano, boca pequeña, pabellones auriculares

displásicos y cara elongada. Otros signos típicos del síndrome son una cóclea pequeña sin espirales cocleares visibles en la TAC cerebral que lleva a una hipoacusia neurosensorial bilateral que puede ser confirmada con la realización de potenciales evocados (van der Lelij, Chrzanowska et al. 2010, Capo-Chichi, Bharti et al. 2013, Bailey, Fryer et al. 2015).

Además, presentan el cuello corto, clinodactilia del quinto dedo, solapamiento entre el segundo y el tercer dedo de los pies e hipotonía al examen neurológico. Es común observar pigmentación anormal de la piel y déficit cognitivo de moderado a severo. Se han evidenciado alteraciones cardíacas como la tetralogía de Fallot y el ductus arterioso persistente. En un caso se reportó hipotiroidismo y problemas para la alimentación. En los familiares de los pacientes quienes son portadores de las mutaciones en el gen se ha encontrado susceptibilidad a malignidades como el linfoma Hodgkin, el adenocarcinoma endometrial y el cáncer cervico-uterino lo que sugiere que este gen podría actuar como un supresor tumoral (Vasa-Nicotera, Brouillette et al. 2005, van der Lelij, Chrzanowska et al. 2010, Capo-Chichi, Bharti et al. 2013, Bailey, Fryer et al. 2015).

#### **1.2.7.5 Síndrome de aneuploidía variegada en mosaico (MVA)**

El síndrome de aneuploidía variegada en mosaico (MVA) es un trastorno caracterizado por la presencia de aneuploidías múltiples presentes en mosaico, predominantemente trisomías y monosomías, que involucran diferentes cromosomas y tejidos. La proporción de células aneuploides varía pero usualmente es mayor del 25% y definitivamente mayor que en personas normales. Tiene una prevalencia estimada de menos de uno en un millón de individuos (Callier, Faivre et al. 2005).

Los pacientes presentan RCIU severo y microcefalia, anomalías oculares (principalmente cataratas y dismorfismo leve), retardo en el desarrollo y déficit cognitivo

variable. Además, se ha observado un amplio espectro de anomalías congénitas adicionales como la malformación de *Dandy Walker*, convulsiones, quistes renales, genitales ambiguos, alteraciones en la pigmentación de la piel y labio y paladar hendidos. El riesgo de malignidades es alto y se han reportado rhabdomiomas, tumor de Wilms y leucemia en múltiples casos. También se han encontrado pacientes con inmunodeficiencia. Este síndrome es causado por mutaciones bialélicas del gen *BUB1B* y tiene un patrón de herencia autosómico recesivo (Flejter, Issa et al. 1998, Jacquemont, Bocéno et al. 2002, Hanks, Coleman et al. 2004).

A continuación se describirán las bases teóricas de las técnicas de secuenciación empleadas actualmente puesto que hacen parte de la metodología del presente trabajo de tesis.

### **1.3 Técnicas de secuenciación**

#### **1.3.1 Secuenciación de Sanger**

La secuenciación de ADN fue ejecutada inicialmente utilizando el método de Sanger desarrollado por el bioquímico inglés Frederick Sanger en la década de 1.970. Esta técnica también llamada “método dideoxi o método enzimático de terminación de cadena” emplea nucleótidos que carecen del grupo hidroxilo (-OH) en el extremo 3' (Sanger and Coulson 1975). El ADN se sintetiza *in vitro* por medio de la utilización de un molde de la cadena a secuenciar, un exceso de nucleótidos deoxi (dGTP, dCTP, dATP y dTTP), un *primer* o cebador, una escasa cantidad de dideoxi específicos (ddGTP, ddCTP, ddATP o ddTTP) y la polimerasa. Para llevar a cabo el proceso de secuenciación se deben colocar juntos los cuatro

deoxinucleótidos (dNTPs) más un dideoxinucleótido (ddNTP), el molde, el *primer* y la ADN polimerasa (Sanger, Nicklen et al. 1977).

Al final de la reacción se habrán sintetizado cadenas de diferente longitud terminando todas en el lugar en que fue incorporado el dideoxinucleótido correspondiente según la reacción. Los productos de las cuatro reacciones, cada uno con una pequeña cantidad de uno de los cuatro dideoxinucleótidos, son colocados en un gel de agarosa y sometidos a una electroforesis obteniendo un patrón de bandas ordenado del cual es posible deducir la secuencia de ADN estudiada (Murphy, Berg et al. 2005).

Este método fue luego modificado para permitir la adaptación a los equipos de electroforesis capilar, los cuales, a diferencia de la utilización de radioactividad, utilizan fluorescencia. En cada reacción un nucleótido trifosfato (dTTP) se encuentra marcado con un fluorocromo diferente (Smith, Sanders et al. 1986). Este sistema permite automatizar el proceso y efectuar la lectura simultánea de los cuatro nucleótidos marcados. Además, la detección del tipo de fluorescencia correspondiente a cada reacción se lleva a cabo al mismo tiempo que la electroforesis y los fragmentos de ADN de menor tamaño que ya han sido detectados salen del gel permitiendo aumentar el número de nucleótidos que se pueden determinar en cada electroforesis, es decir en cada secuenciación (SenGupta and Cookson 2010).

### **1.3.2 Secuenciación de siguiente generación (Next generation sequencing – NGS)**

El método de Sanger es considerado como una tecnología de “primera generación” y los nuevos métodos utilizados son conocidos como secuenciación de siguiente generación (NGS). El principal avance ofrecido por la NGS es la capacidad de producir un enorme

volumen de datos con una importante disminución de los costos. Es conocida también como secuenciación de alto rendimiento (*High-throughput sequencing*) debido a que es un proceso en el cual es posible identificar la secuencia de más de 1.6 billones de fragmentos de ADN en paralelo por cada ciclo de reacción (Mardis 2008, DePristo, Banks et al. 2011).

Con esta técnica cada base es leída entre 20 y 2.000 veces (profundidad de exploración) con altos niveles de cobertura lo cual alcanza para leer la mayoría de las secuencias blanco. El proceso de un estudio NGS comprende diferentes procedimientos dentro y fuera del laboratorio que incluyen la preparación de librerías, la secuenciación de las librerías, los análisis bioinformáticos primarios y la aplicación de los filtros de las variantes con su interpretación (Shendure and Ji 2008, Gilissen, Hoischen et al. 2012, Lohmann and Klein 2014).

La posibilidad de secuenciar un exoma o un genoma completos permite obtener conocimiento de todas las variantes exónicas/genómicas presentes en un individuo. Dentro de las aplicaciones que ofrece este conocimiento se encuentran la detección de las causas genéticas de enfermedades raras, de los mosaicismos, si existe un buen nivel de profundidad, de las mutaciones *de novo*, sin tener un conocimiento previo de las vías alteradas o de los genes candidatos, realizando un análisis de tríos que incluye el paciente afectado y sus dos padres sanos. Además permite identificar la causa de enfermedades digénicas y poligénicas (Lohmann and Klein 2014).

Las principales desventajas que se pueden encontrar cuando se realizan estudios con NGS son la dificultad para la interpretación de la gran cantidad de variantes encontradas, por lo que en muchos de los casos es necesario la realización de pruebas funcionales. Cada una de las variantes requiere tener altos niveles de profundidad de exploración para evitar al

máximo los falsos positivos. Sin embargo estos resultados deben ser siempre confirmados con secuenciación directa. Es necesario además contar con controles de calidad con respecto a la cobertura y la profundidad de las lecturas y para la interpretación de las variantes por parte de personal entrenado (Klein, König et al. 2012, Lohmann and Klein 2014).

Existen diferentes métodos o plataformas para llevar a cabo la NGS pero en general hay unos pasos comunes a todas las plataformas. Estos incluyen la fragmentación del ADN (50-400 pb), la adición de los adaptadores a los extremos de los fragmentos, la amplificación de los fragmentos con los adaptadores mediante PCR y finalmente la cuantificación del ADN (Mardis 2008). A continuación se realizará una breve explicación del funcionamiento de las plataformas más utilizadas en la actualidad.

#### **1.3.2.1 Técnica de adición de nucleótido único (*Single nucleotide addition* – SNA) o pirosecuenciación (Roche/454 FLX Pyrosequencer)**

En este método cada incorporación de un nucleótido por la ADN polimerasa resulta en la liberación de pirofosfato, para dar inicio a una serie de reacciones corriente abajo que finalmente producen luz por la enzima luciferasa *firefly*. La cantidad de luz producida es proporcional al número de nucleótidos incorporados. La librería de fragmentos está mezclada con una población de perlas de agarosa que en la superficie llevan oligonucleótidos complementarios a las secuencias adaptadoras específicas en la librería de fragmentos y debido a esto cada perla está asociada con un fragmento único (Edwards, Rodriguez-Brito et al. 2006).

Cada uno de estos complejos fragmento/perla es aislado en micelas individuales de agua/aceite que también contienen reactantes de PCR (PCR en emulsión) y los ciclos térmicos de las micelas producen aproximadamente un millón de copias de cada fragmento

de ADN en la superficie de cada perla. Estas moléculas amplificadas son entonces secuenciadas masivamente. Las perlas son colocadas en una placa que contiene una sola perla por cada uno de los miles de pozos, lo que provee una localización fija que permite que cada reacción de secuenciación sea monitoreada. La placa está colocada en una posición opuesta a una cámara que graba la luz emitida por cada perla. El orden e intensidad de los picos de luz se miden como diagramas de flujo que muestran la correspondiente secuencia de ADN. Las lecturas son procesadas en un *software* y sometidas a filtros de calidad para remover las secuencias de baja calidad (Cheung, Haas et al. 2006, Mardis 2008, Biesecker and Green 2014).

### **1.3.2.2 Applied Biosystems SOLiD<sup>TM</sup> Sequencer**

Este método utiliza una librería de fragmentos ligados a adaptadores y la PCR en emulsión con pequeñas perlas magnéticas para amplificar los fragmentos a secuenciar. A diferencia de otras plataformas, SOLiD usa la ADN ligasa. Se realiza con una sonda marcada con fluorescencia híbrida y su secuencia complementaria adyacente al *primer* junto con la ADN ligasa que las une. Las sondas no ligadas son lavadas. La ADN ligasa está marcada con octámeros fluorescentes. Cada paso de ligación es seguido por detección de fluorescencia y luego por un paso de remoción de bases del octámero ligado. En este momento se prepara el *primer* para otra ligación. Debido a que cada grupo fluorescente en los octámeros ligados identifica una combinación de dos bases, la lectura de la secuencia resultante puede ser alineada para conocer las secuencias de alta o pobre calidad (Mardis 2008, Clark, Chen et al. 2011).

### 1.3.2.3 Secuenciación en tiempo real (real time sequencing) de Pacific Biosciences

Este método implica la continua incorporación de dNTPs marcados con fluoróforos al mismo tiempo que se lee la fluorescencia del ADN sintetizado. Las moléculas de ADN se unen covalentemente a la superficie de unos detectores ZMW (*Zero mode waveguide*) que obtienen información de la secuencia mientras que se incorporan los nucleótidos fosforilados a la cadena nueva. Un detector ZMW es básicamente un agujero de 10 nm de diámetro fabricado en una placa de metal de 100 nm y depositado en un soporte de vidrio. El pequeño tamaño del ZMW evita que la luz visible del láser (de una longitud de onda aproximada de 600 nm) lo atraviese completamente por lo que al iluminarlo sólo llega la luz al fondo de 30 nm. Dentro de cada detector ZMW se une covalentemente una sola molécula de ADN polimerasa, posteriormente se añaden los nucleótidos (cada uno marcado con un fluoróforo diferente) a la matriz de detectores ZMW con una concentración determinada (DePristo, Banks et al. 2011, Otto 2011).

Al cabo de tan solo milisegundos, los nucleótidos marcados penetran en el detector ZMW, difunden y salen del agujero. Puesto que la luz del láser no penetra a través de los agujeros para excitar los fluoróforos, los nucleótidos marcados por encima del detector ZMW no emiten luz y solo emiten fluorescencia cuando difunden por el fondo de 30 nm del detector ZMW. Cuando la polimerasa detecta el nucleótido correcto, lo incorpora a la cadena recién sintetizada en un proceso que tarda milisegundos, en contraste con los microsegundos que tarda la difusión de los nucleótidos cuando no se incorporan a la nueva hebra. Esta diferencia de tiempo ocasiona una mayor intensidad de señal de los nucleótidos incorporados frente a los no incorporados (Dressman, Yan et al. 2003, Metzker 2010, DePristo, Banks et al. 2011).

### 1.3.2.4 Ion proton Sequencer

La secuenciación de ADN por *Ion proton* es un método basado en la detección de protones liberados durante la polimerización del ADN. Este tipo de secuenciación difiere de las demás plataformas en que no usa nucleótidos modificados y que la detección no se realiza vía óptica sino por cambios de pH. El sistema combina tecnología de secuenciación semiconductora con bioquímica para directamente traducir la información química en datos digitales. No utiliza cámaras, lentes ni láseres. Esta tecnología fue desarrollada por *Ion Torrent Systems Inc.* y salió al mercado en el año 2010 (Perkel 2011, Shokralla, Spall et al. 2012).

La incorporación de dNTPs trifosforilados en el ADN en la replicación implica la generación de un enlace covalente y la liberación de un pirofosfato y un protón. Este principio es en el que se basa esta técnica de secuenciación. En primer lugar, se aísla el ADN y se corta en fragmentos de aproximadamente 200 pb. Luego se añaden adaptadores a estos fragmentos que se unen a perlas de agarosa. Cada una de ellas, unidas con millones de fragmentos de ADN, se introduce en los micropocillos de un microchip. A continuación se baña el microchip con una solución de uno de los nucleótidos y ocurre una PCR en emulsión (Merriman, Torrent et al. 2012).

Si el nucleótido se incorpora en la cadena de ADN, se libera un protón el cual es detectado por la base del pocillo que actúa como un mini-pHmetro (*ISFET-Ion sensitive Field Effect Transistor*). Gracias a que cada lámina del microchip es semiconductora se pueden detectar estos pequeños cambios iónicos (Pennisi 2010, Mascher, Wu et al. 2013). Este proceso se repite cada 15 segundos con una nueva solución de cada nucleótido. Este proceso ocurre simultáneamente en millones de pozos y el proceso tarda unas pocas horas. Las señales

generadas en los pocillos se transmiten directamente a un ordenador sin necesidad de ser procesadas durante la transferencia. Generalmente tiene una cobertura mayor del 90% de las bases y una profundidad superior a 20X en promedio (Merriman, Torrent et al. 2012, Sawyer, Schwartzenruber et al. 2014).

### **1.3.2.5 Illumina Genome Analyzer**

El proceso se inicia con una librería de adaptadores específicos para Illumina y toma lugar en un dispositivo automatizado de vidrio microfabricado y sellado que contiene ocho canales. Esto permite la amplificación en puente de fragmentos en la superficie, utilizando la ADN polimerasa para producir múltiples copias de la matriz. Puede ser utilizada la misma librería o diferentes librerías en cada uno de los ocho canales. Cada grupo de amplificación contiene aproximadamente un millón de copias del fragmento original, las cuales son suficientes para reportar las bases incorporadas en la intensidad de señal requerida para la detección durante la secuenciación. Illumina utiliza la secuenciación por síntesis en la cual los 4 nucleótidos son añadidos simultáneamente a los canales junto con la ADN polimerasa (Minoche, Dohm et al. 2011).

Los nucleótidos llevan un marcador fluorescente único para cada base y el grupo 3'-OH está químicamente bloqueado, lo que remite a que cada incorporación es un evento químico único. Un paso de toma de imágenes es seguido a la incorporación de cada base. Después de cada imagen, el grupo 3' bloqueado es químicamente removido para preparar cada hebra para la siguiente incorporación por la ADN polimerasa. Esta serie de pasos continúa por 36-50 ciclos dependiendo de la librería de ADN utilizada. Es empleado un láser para excitar los marcadores fluorescentes. Los reactivos son entonces lavados permitiendo una próxima

extensión del fragmento de ADN. Por medio de algoritmos informáticos son retiradas las secuencias de baja calidad (Mardis 2008, Shendure and Ji 2008, Torres, Metta et al. 2008).

Dentro de las principales ventajas de esta plataforma se reportan una baja tasa de error, con una exactitud de 98.5% en la lectura de cada base, un bajo costo por base, y una gran producción de datos simultáneos (aproximadamente 3 GB por corrida), lo cual corresponde a cerca de 7.000 bases por segundo. Sus principales desventajas incluyen la lectura de fragmentos cortos, de aproximadamente 50-150 pb y que requiere de un tiempo de corrida prolongado para regiones extensas del genoma (Hert, Fredlake et al. 2008).

## **2. PREGUNTA CIENTÍFICA**

¿Cuáles son las causas moleculares de enanismo esencial microcefálico en 6 pacientes no relacionados de la población de El Santuario, Antioquia, en Colombia?

## **3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **3.1. Objetivo general**

Determinar la causa molecular del fenotipo de enanismo esencial en varios pacientes provenientes de una zona endogámica colombiana.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Realizar la secuenciación directa de genes candidato que puedan explicar los fenotipos.
2. En casos en los que no se identifiquen variantes potencialmente causales efectuar secuenciación de exoma por técnica de NGS.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Pacientes incluidos en el estudio**

El presente estudio fue realizado con muestras de siete pacientes con talla baja extrema y microcefalia severa en quienes se efectuó una caracterización clínica y molecular. Ellos asistieron al Centro de Investigación en Genética y Genómica (CIGGUR) de la Universidad del Rosario en Bogotá o a la consulta médica de genética de la Fundación Valle del Lili en Cali, Colombia. Por ser menores de edad, fueron firmados los consentimientos informados por cada uno de sus padres.

Los pacientes presentaban hallazgos clínicos compatibles con enanismo esencial microcefálico. Todos eran naturales y procedentes de El Santuario, Antioquia, en Colombia. Fue diligenciada una historia clínica completa y una revisión de los exámenes paraclínicos disponibles. Los detalles clínicos de estos individuos serán expuestos a continuación.

#### **4.1.1 Caracterización clínica de los pacientes de la población de estudio**

A continuación serán descritas las características clínicas y se expondrán las fotografías y los árboles genealógicos de los pacientes que participaron en el presente estudio. Son denominados PCNT del número 1 al 7 para facilitar la descripción según la tabla de resumen de caracterización clínica de este apartado (**Tabla 2**).

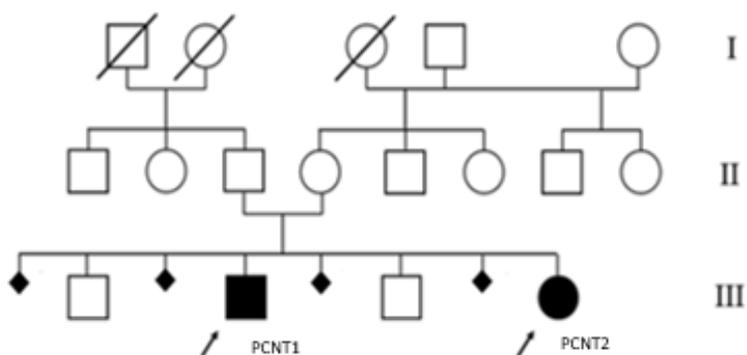
#### **Pacientes PCNT1 y PCNT2**

Los pacientes PCNT1 y PCNT2 son hermanos.

## **PCNT1:**

Paciente de catorce años de edad, de género masculino, producto del cuarto embarazo no controlado. Se reportó diagnóstico de retraso de crecimiento intrauterino en el tercer trimestre de la gestación, parto vaginal a término, con peso al nacer de 750 g (<P3). No hay registro de talla pero fue referida como baja, requirió hospitalización en la unidad de recién nacidos por un mes debido al bajo peso sin soporte ventilatorio. Se le realizó diagnóstico de síndrome de Seckel y el paciente continuó un bajo crecimiento y desarrollo. Presentó retraso en el desarrollo psicomotor con bipedestación a los 3 años, no escolarizado, no sabía leer ni escribir, no realizaba operaciones matemáticas simples, ayudaba en las labores del campo a su padre con dificultad. Refirieron una personalidad sociable y fácil relación con su entorno. No se le realizaron estudios paraclínicos ni controles médicos, ya que su familia estaba radicada en una vereda distante de El Santuario. Como antecedentes patológicos del paciente, los padres refirieron una alteración en el metabolismo de los carbohidratos y una dislipidemia, en manejo irregular con dieta.

Los datos familiares hacen referencia a padre de 52 años y madre de 47 años sanos procedentes de El Santuario y referidos como no consanguíneos, pero que comparten sus apellidos. Como se observa en el árbol genealógico (**Figura 8**), la madre refiere que presentó múltiples pérdidas en el primer trimestre de la gestación de etiología desconocida.



**Figura 8.** Árbol genealógico de los pacientes PCNT1 y PCNT2

Al examen físico del paciente se encontró peso de 12 kg (<P3), talla de 85 cm (<P3), perímetro cefálico de 42 cm (<P3), envergadura de 83 cm. Talla baja extrema ligeramente desproporcionada por acortamiento mesomélico de las extremidades, microcefalia severa, fenotipo particular dado por frente recedida, cejas escasas, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, proptosis ocular, nariz con puente nasal prominente, filtro largo borrado, microdontia, micrognatia leve, microtia grado 1 bilateral, voz aguda, acortamiento discretamente mesomélico en extremidades superiores e inferiores, clinodactilia del quinto dedo de manos bilateral, braquidactilia en manos y pies, pelo fino y ralo y un patrón inusual de pigmentación de la piel dado por múltiples máculas café con leche diseminadas.

Con los hallazgos clínicos se realizó diagnóstico de síndrome MOPD II y se tomaron muestras de sangre periférica para la extracción de ADN del paciente y de sus familiares disponibles.

El paciente falleció a la edad de 18 años, la causa es desconocida debido a que no recibió atención médica.

## **PCNT2:**

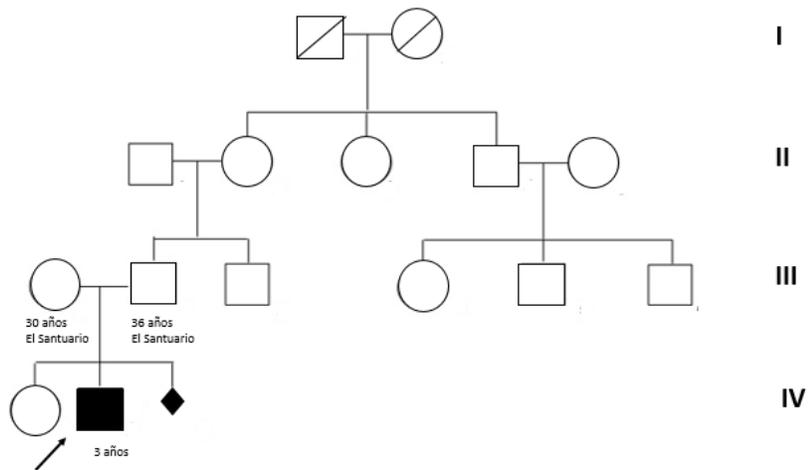
Se trata de una paciente de siete años de edad, de género femenino, producto de una octava gestación no controlada, presentó RCIU severo identificado en el último trimestre de la gestación, parto vaginal a término. Al nacimiento tuvo un peso de 750 g (<P3) y talla baja extrema (<P3). Requirió hospitalización en la unidad de recién nacidos por 45 días, sin soporte ventilatorio, con leve dificultad respiratoria. Se le realizó diagnóstico de síndrome de Seckel. Su desarrollo psicomotor fue referido como normal, caminó a los 18 meses, lenguaje adecuado para la edad, no escolarizada, no sabía leer, escribía su nombre, no realizaba operaciones matemáticas simples. No se le realizaron estudios paraclínicos. Como antecedente patológico de la paciente los padres referían que tenía diagnóstico de alteración en el metabolismo de los carbohidratos y dislipidemia, en manejo irregular con dieta y sin control médico. Al examen físico mostró una talla de 70 cm (<P3), un peso de 8,5 kg (<P3), un perímetro cefálico de 38cm (<P3), una envergadura de 66 cm. Talla baja extrema desproporcionada por discreto acortamiento mesomélico de las extremidades, microcefalia severa, frente amplia y recedida, cejas escasas, proptosis ocular, nariz prominente, microdontia, microtia grado 1 bilateral, voz de tono agudo, acortamiento mesomélico en las cuatro extremidades con incurvamiento de antebrazos y piernas, braquidactilia en manos y pies, clinodactilia del quinto dedo de las manos bilateral, pelo fino y ralo. Su diagnóstico clínico fue el síndrome MOPD II.

La paciente no realizó un control médico regular y solo fue valorada por genética en una oportunidad, al igual que su hermano. Se tomaron muestras de sangre periférica para la extracción de ADN.

### **Paciente PCNT3**

Paciente de tres años de edad, de género masculino, producto de segundo embarazo controlado. La gestación fue complicada por RCIU severo diagnosticado a las 25 semanas, con repercusión hemodinámica, ventriculomegalia, oligoamnios y arteria umbilical única. A las 28 semanas se realizó esquema de maduración pulmonar con esteroides y a las 36 semanas se llevó a cesárea por una ruptura prematura de membranas sin inicio espontáneo de actividad uterina. Su peso al nacer fue de 1.310 g (<P3) y su talla de 37 cm (<P3). Requirió manejo en la unidad de cuidados intensivos neonatales por bajo peso. Se le realizó diagnóstico de síndrome de Seckel. Su desarrollo psicomotor fue referido como normal con sostén cefálico a los 3 meses, sedestación a los 6 meses y marcha independiente a los 17 meses. Al año de edad se inició manejo con hormona de crecimiento, la cual fue suspendida un año después ante la ausencia de respuesta. Sus padres refirieron que el paciente era muy sociable y que presentaba un déficit cognitivo leve confirmado por pruebas neuropsicológicas. Dentro de los antecedentes médicos de importancia presentó una luxación de la cabeza del radio derecha y múltiples aneurismas en las arterias cerebrales. Los hallazgos radiológicos a la edad de siete años mostraron alerones iliacos pequeños y displásicos, ensanchamiento metafisiario, fémur y húmero ensanchados, retardo en la maduración epifisiaria y epifisiolisis femoral, con epífisis triangulares.

Los datos familiares hacen referencia a padre de 36 años y madre de 30 años sanos procedentes de El Santuario y referidos como no consanguíneos. La madre comentó que presentó una pérdida en el primer trimestre de causa desconocida en su tercer embarazo (**Figura 9**).



**Figura 9.** Árbol genealógico del paciente PCNT3

El examen físico a la edad de tres años mostró un peso de 9.2 kg (<P3), una talla de 57.5 cm (<P3) y un perímetro cefálico de 39 cm (<P3). La talla baja era desproporcionada por acortamiento e incurvación mesomélica en las extremidades. Presentó una microcefalia severa, la frente amplia y recedida, cejas escasas, telecanto, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, proptosis ocular, la nariz en forma de pico, el filtro corto y borrado, microdontia, diastasis dental y micrognatia, los pabellones auriculares tenían el hélix hipoplásico. El cuello, el tórax y el abdomen eran simétricos, además presentaba criptorquidia izquierda. En las extremidades superiores e inferiores se evidenció mesomelia. Mostró clinodactilia del quinto dedo de manos bilateral, antebrazos y piernas desproporcionadamente cortos. Tenía la voz aguda y el pelo fino y ralo (**Figura 10**).

Se realizó diagnóstico de síndrome MOPD II y se tomaron muestras para estudios moleculares.

A la edad de siete años, el paciente presentó un episodio de cefalea súbita asociada a náuseas, vómito, convulsiones, pérdida del conocimiento y déficit motor. Se realizó una TAC

cerebral en la cual se observó una hemorragia subaracnoidea y una angiografía que reportó en la carótida interna izquierda una dilatación infundibular en el segmento de la arteria comunicante posterior y un aneurisma de 3 mm de tipo transicional en la carótida izquierda. Además se observó en la carótida interna derecha una dilatación infundibular en el segmento de la arteria comunicante posterior y un aneurisma de la arteria basilar de aproximadamente 13 mm, con signos claros de ruptura trilobulada que comprometió el nacimiento de ambos vasos cerebrales posteriores. El paciente fue tratado mediante una intervención endovascular con la cual presentó leve mejoría de su estado de conciencia, pero persistió con cuadriparesia y dificultad severa para el lenguaje. A la edad de ocho años falleció por complicaciones relacionadas con un catéter femoral.



**Figura 10. Principales características dismórficas del paciente PCNT3.** Talla baja desproporcionada, microcefalia severa, frente amplia y recedida, cejas escasas, telecanto, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, proptosis ocular, nariz en forma de pico, filtro corto y borrado, microdontia, diastasis dental y micrognatia, pabellones auriculares con hélix hipoplásico. El cuello, el tórax y el abdomen simétricos. En las extremidades superiores e inferiores se evidencia mesomelia. Antebrazos y piernas desproporcionadamente cortos. El pelo fino y ralo. (Fotografías tomadas con el consentimiento de los padres del paciente).



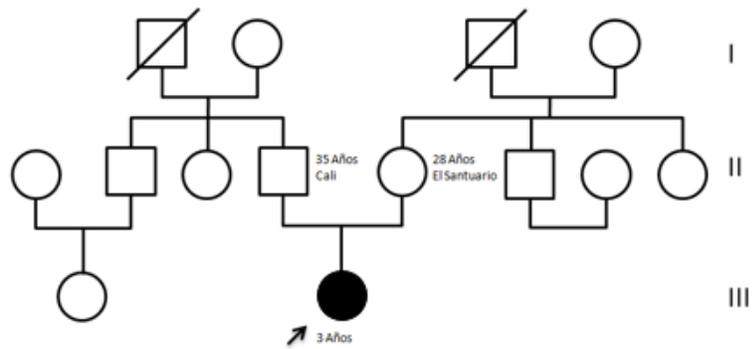
Al examen físico se evidenció una talla baja extrema proporcionada, peso y talla por debajo del percentil 3, relación segmento superior / segmento inferior de 1.42, relación talla / envergadura de 1.0, perímetro cefálico de 38 cm (<P3), microcefalia severa, frente amplia y recedida, las cejas escasas, la nariz con puente nasal prominente, microdontia, diastasis dental, microtia con ausencia de lóbulos bilateral (grado 1), la voz de tono muy agudo, mesomelia en extremidades superiores, braquimesofalanges en todos los dedos de las manos, clinodactilia del quinto dedo bilateral en ambas manos. Además el pelo era fino y ralo.

Con los hallazgos clínicos se realizó un diagnóstico de síndrome MOPD II y se tomaron muestras de sangre periférica para la extracción de ADN.

### **Paciente PCNT5**

Paciente de tres años de edad, de género femenino, producto del primer embarazo controlado, con diagnóstico de RCIU severo desde el segundo trimestre de la gestación. Tuvo un parto vaginal a las 29 semanas, con peso al nacer de 725 g (<P3) y talla de 31 cm (<P3). Requirió hospitalización en la unidad de recién nacidos durante dos meses por bajo peso y pobre ganancia de peso. Se efectuó el diagnóstico de enanismo esencial al nacimiento. Presentó retraso global del desarrollo psicomotor, caminó a los 28 meses, mostró retraso en el desarrollo del lenguaje, no fue escolarizada. Sus padres negaron antecedentes patológicos de importancia y no se le realizaron estudios paraclínicos. La paciente solo fue valorada en una única ocasión por el departamento de genética, y no existieron evoluciones posteriores.

Los datos familiares hacen referencia a padre de 35 años procedente de Cali, Valle y madre de 28 años procedente de El Santuario, Antioquia, referidos como sanos y no consanguíneos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Árbol genealógico de la paciente PCNT5.

Al examen físico se encontró una talla de 68 cm (<P3) y un peso de 4.7 kg (<P3), la talla baja fue desproporcionada con acortamiento de predominio mesomérico en las cuatro extremidades. Presentó microcefalia severa, la frente amplia y recedida, ptosis palpebral bilateral, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, proptosis ocular, la nariz prominente, microdontia, micrognatia, los pabellones auriculares simplificados con microtia y ausencia de lóbulos, la voz muy aguda, mesomelia en las extremidades superiores e inferiores, braquimesofalanges en todos los dedos, clinodactilia del quinto dedo en ambas manos y el pelo fino y ralo.

Su diagnóstico clínico fue el síndrome MOPD II. Se tomaron muestras de sangre periférica para la extracción de ADN.

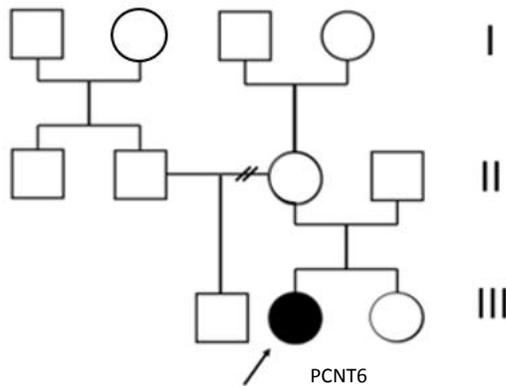
### **Paciente PCNT6**

Paciente de siete años de edad, de género femenino, producto del segundo embarazo controlado. A las 30 semanas de gestación presentó oligohidramnios y RCIU severos, motivo por el cual se realizó cesárea. El peso al nacimiento fue de 660 g (<P3), la talla de 31 cm (<P3) y el perímetro cefálico de 20.3 cm (<P3). Por signos de dificultad respiratoria grave

fue necesario realizar intubación oro traqueal y fue trasladada a la unidad de cuidados intensivos neonatales. Los principales hallazgos físicos al nacimiento fueron microcefalia severa, exoftalmos bilateral, soplo cardiaco holosistólico grado 4/6, abdomen globoso con asas visibles, pie equino varo bilateral e ictericia severa. Fue dada de alta con diagnósticos de recién nacida pre término de 30 semanas, RCIU simétrico severo, microcefalia severa, ductus arterioso persistente, enterocolitis necrotizante grado IIA, hipertrofia pilórica, malrotación intestinal, trombocitopenia y pie equino varo bilateral. Dentro de los exámenes paraclínicos de salida tenía una resonancia magnética cerebral dentro de límites normales y un cariotipo 46,XX. Sus padres refirieron que presentó un retardo global en el desarrollo psicomotor con marcha independiente a los 36 meses de edad, no recuerdan la edad de los demás hitos del desarrollo alcanzados.

Los principales exámenes paraclínicos reportados a la edad de seis años fueron unos potenciales evocados auditivos que mostraban hipoacusia profunda bilateral y ausencia de otoemisiones acústicas en ambos oídos. La angioresonancia cerebral fue normal. La TAC con reconstrucción 3D reportaba aplanamiento facial con aparente cierre prematuro de la sutura metópica e hipoplasia maxilar y nasal. Tenía perfil lipídico, glicemia y pruebas de función tiroidea normales. Las pruebas neuropsicológicas evidenciaban un déficit cognitivo moderado.

Los datos de la historia familiar incluyen madre de 36 años sana quien conformó una segunda unión de donde nació la paciente, un padre de 36 años sano. Los padres se refieren no consanguíneos pero ambos son procedentes de El Santuario, Antioquia (**Figura 13**).



**Figura 13.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6

El examen físico realizado a los siete años de edad evidenció un peso de 11.9 kg (<P3), una talla de 100 cm (<P3) y un perímetro cefálico de 38.5 cm (<P3). Microcefalia, diámetro bifrontal estrecho, la sutura metópica prominente, estrabismo bilateral, ojos prominentes, pliegues epicánticos bilaterales, las fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, la nariz y las narinas pequeñas, el filtro plano, la boca pequeña, el paladar alto y la cara elongada. Además presentaba pabellones auriculares en forma de copa, el cuello corto y fueron evidenciadas aproximadamente 20 máculas café con leche generalizadas. Además presentó clinodactilia del quinto dedo en ambas manos y un solapamiento entre el segundo y el tercer dedo de ambos pies (**Figuras 14 y 15**).



**Figura 14. Características dismórficas faciales de la paciente denominada PCNT6.** Microcefalia, diámetro bifrontal estrecho, estrabismo, ojos prominentes, pliegues epicánticos bilaterales, fisuras palpebrales oblicuas hacia arriba, nariz y narinas pequeñas, filtro plano, boca pequeña y cara elongada. Además presenta pabellones auriculares en forma de copa, cuello corto y se evidencia una mácula café con leche. (Fotografías tomadas con el consentimiento de los padres de la paciente).



**Figura 15. Otras características dismórficas de la paciente PCNT6.** Clinodactilia del quinto dedo bilateral. Sobrelapamiento entre segundo y tercer dedo de los pies. (Fotografías tomadas con el consentimiento de los padres de la paciente).

Por el antecedente de la procedencia de los padres y un cuadro clínico de enanismo esencial se tuvo inicialmente la sospecha clínica del síndrome MOPDII. Se tomaron muestras para estudio molecular de la paciente y de sus padres.

Actualmente la paciente se encuentra en manejo por el servicio de genética, sin mayores cambios en el examen físico ni nuevos hallazgos patológicos.

### **Paciente PCNT7**

Paciente de doce años de edad, de género femenino, producto del primer embarazo deseado y controlado. Su gestación fue complicada por una RCIU severa. El parto fue por cesárea a las 36 semanas de gestación por presentar líquido amniótico con meconio. El peso al nacimiento fue de 1.125 g (<P3) y la talla de 38 cm (<P3). Presentó una microcefalia severa con un perímetro cefálico de 24 cm (<P3). Requirió hospitalización durante 39 días por peso y talla bajos extremos, precisó además la utilización de sonda nasogástrica por pobre succión. Fue diagnosticada con anemia no especificada. Se le realizó diagnóstico de enanismo esencial al nacimiento. Recibió alimentación con lactancia materna exclusiva hasta los tres meses de edad y continuó con fórmulas lácteas debido a problemas para la deglución. Presentó un retraso en el desarrollo psicomotor con sostén cefálico a los cuatro meses de edad, sedestación a los siete meses, gateo a los ocho meses, bipedestación a los diez meses, marcha sin apoyo a los 18 meses, control de esfínteres a los cuatro años, lenguaje con vocabulario completo a los cuatro años. Refirió la madre que la paciente tenía una personalidad sociable y alegre.

Dentro de los antecedentes médicos de importancia fueron referidos una meningitis bacteriana a los diez meses de edad por lo que fue hospitalizada durante trece días, en esta estancia hospitalaria fue diagnosticada con proteinuria de causa desconocida y dislipidemia

mixta, además se encontró que la anemia era persistente. Tuvo otra hospitalización por gastroenteritis de difícil manejo durante seis días a los dos años de edad. Posteriormente la paciente fue sometida desde la edad de tres años a cuatro procedimientos quirúrgicos para corrección de luxación del fémur y displasia de cadera bilateral. Recibió dos transfusiones sanguíneas postoperatorias. Fue tratada farmacológicamente con suplementación con sulfato ferroso y omega 3 de forma constante.

En los hallazgos radiológicos se describieron huesos largos delgados con ensanchamiento gradual de las metáfisis. Clavículas delgadas, largas y rectas. Escapulas hipoplásicas y vertebras levemente aplanadas, escoliosis severa de convexidad derecha con vértice a nivel de T10, epífisis femorales distales triangulares y metáfisis femorales distales en forma de V invertida, aparente epifisiolisis femoral proximal, cabeza femoral pequeña e hipoplásica con cuello corto y coxa vara, huesos púbicos e isquiales delgados, pelvis alta y delgada, alerones iliacos pequeños y ángulo acetabular plano (**Figuras 16, 17 y 18**).



**Figura 16. Principales características radiológicas en extremidades inferiores de la paciente PCNT7.**

Huesos largos delgados con ensanchamiento gradual de las metáfisis. Epífisis femorales distales triangulares y

metáfisis femorales distales en forma de V invertida. (Fotografía tomada con el consentimiento de los padres del paciente).

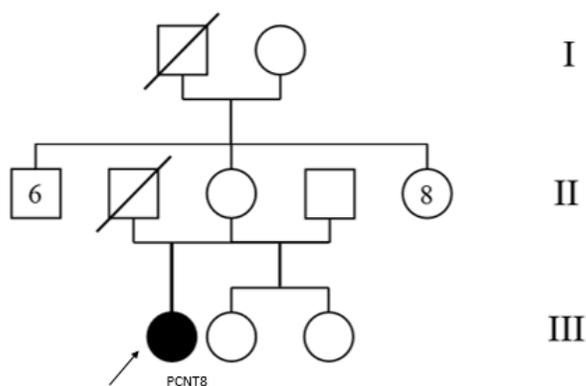


**Figura 17. Principales características radiológicas pélvicas de la paciente PCNT7.** Material de osteosíntesis por corrección de luxación de cadera, aparente epifisiolisis femoral proximal. Cabeza femoral pequeña e hipoplásica con cuello corto y coxa vara. Huesos púbicos e isquiales delgados. Pelvis alta y delgada, alerones iliacos pequeños y ángulo acetabular plano. (Fotografía tomada con el consentimiento de los padres del paciente)



**Figura 18. Principales características radiológicas de la columna vertebral, las clavículas y las escápulas de la paciente PCNT7.** Vertebrae levemente aplanadas. Escoliosis severa, clavículas delgadas, largas y rectas. Escápulas hipoplásicas. (Fotografía tomada con el consentimiento de los padres del paciente).

La historia familiar incluyó al padre de 40 años y la madre de 33 años ambos sanos, quienes se refieren no consanguíneos procedentes de El Santuario, Antioquia (**Figura 19**).



**Figura 19.** Árbol genealógico de la paciente PCNT7

En el examen físico realizado a los doce años de edad se evidenció un peso de 8.6 kg (<P3), una talla de 75.5 cm (<P3) y un perímetro cefálico de 40 cm (<P3). Presentaba talla baja extrema proporcionada. Tenía la frente amplia, las fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, las cejas escasas, la nariz prominente con raíz ancha y elevada, el puente nasal amplio, las crestas supraorbitarias hipoplásicas que se continuaban con la raíz nasal, la punta nasal amplia pero hipoplásica. La boca pequeña, micrognatia leve, las mejillas prominentes, microdontia y diastasis dental. Los pabellones auriculares simplificados y levemente displásicos sin lóbulos. Presentaba una voz muy aguda y el pelo fino y ralo (**Figura 20**). Se encontró un acortamiento mesomélico de las extremidades superiores, arqueamiento de radio y cúbito, manos pequeñas y anchas con pliegue palmar único, clinodactilia del quinto dedo en ambas manos y braquimesofalanges. Su patrón de pigmentación de la piel era inusual dado principalmente por presencia de efélides y áreas de hiperpigmentación en el dorso.



**Figura 20. Principales características dismórficas faciales de la paciente PCNT7.** Frente amplia, fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, cejas escasas, nariz prominente con raíz ancha y elevada, puente nasal amplio, crestas supraorbitarias hipoplásicas que se continúan con la raíz nasal, punta nasal amplia pero hipoplásica. Boca pequeña, mejillas prominentes, microdontia y diastasis dental. Micrognatia leve. Pabellones auriculares simplificados o levemente displásicos sin lóbulos. Pelo fino y ralo. (Fotografía tomada con el consentimiento de los padres de la paciente).

La madre refirió que la paciente en el momento de la consulta se encontraba cursando quinto grado con dificultades en el aprendizaje y que presentaba déficit cognitivo moderado confirmado con pruebas neuropsicológicas. Además tenía diagnóstico de hipermetropía corregida con lentes. Hasta el momento de la consulta los estudios con neuroimágenes no mostraban alteraciones.

El diagnóstico clínico fue de síndrome MOPD II. Se tomaron muestras de sangre periférica de la paciente y de sus padres para la extracción de ADN.

La paciente falleció a la edad de trece años por causa de hemorragias cerebrales severas secundarias a anomalías arteriales en el sistema nervioso central principalmente

dadas por tortuosidad de vasos y aneurismas que fueron diagnosticados en el momento del evento cerebral agudo.

La **Tabla 2** resume las principales características clínicas de toda la población de estudio.

**Tabla 2.** Caracterización clínica de los pacientes que participaron en el estudio

<i>Pacientes</i>	PCNT1	PCNT2	PCNT3	PCNT4	PCNT5	PCNT6	PCNT7
<i>Datos de Historia Clínica</i>							
<i>RCIU severo</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Déficit cognitivo</i>	ND	ND	+	-	ND	+	+
<i>Personalidad sociable</i>	+	ND	+	+	ND	-	+
<i>Hipermetropía</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
<i>Ductus arterioso persistente</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Hipertrofia pilórica</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Malrotación intestinal</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Hallazgos al examen físico</i>							
<i>Talla baja extrema</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Microcefalia severa</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Cejas escasas</i>	+	+	+	+	-	+	+
<i>Estrabismo</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Exoftalmos</i>	+	+	+	-	+	+	-

<i>Nariz prominente</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Microdontia</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Diastasis dental</i>	ND	ND	+	+	-	-	+
<i>Micrognatia leve</i>	+	+	+	-	+	-	-
<i>Pabellones auriculares simplificados y displásicos</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Microtia</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Ausencia de lóbulo</i>	-	-	-	+	+	-	+
<i>Hipoacusia profunda bilateral</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Voz muy aguda</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Mesomelia</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Braquimesofalanges</i>	+	+	-	+	+	-	+
<i>Clinodactilia del quinto dedo</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Segundo y tercer dedo de pies sobrelapados</i>	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pelo fino y ralo</i>	+	+	+	+	+	-	+
<i>Patrón inusual de pigmentación</i>	+	-	-	-	-	+	+

<i>Otros hallazgos</i>							
<i>Anormalidades vasculares en el SNC</i>	ND	ND	+	ND	ND	-	+
<i>Anormalidades radiológicas</i>	ND	ND	+	ND	ND	-	+
<i>Diabetes mellitus</i>	+	+	ND	+	ND	-	-
<i>Dislipidemia</i>	+	+	ND	-	ND	-	+
<i>Muerte temprana</i>	+	ND	+	ND	ND	-	+

El signo + corresponde a la presencia de la característica. El signo – corresponde a la ausencia de la característica. Las letras ND corresponden a los datos no disponibles.

Luego del análisis clínico de los pacientes y teniendo en cuenta que presentaban características compatibles con enanismo esencial microcefálico, específicamente de síndrome MOPD II, se decidió realizar la secuenciación del gen *PCNT* en todos ellos. Se consideró que el fenotipo de la paciente PCNT6 no era el clásico, pero teniendo en cuenta su procedencia se incluyó en este estudio.

Se realizó extracción de ADN genómico de muestras de sangre periférica de cada uno de los pacientes mediante la purificación por precipitación salina, previo consentimiento informado y con aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad del Rosario.

#### **4.2. Amplificación por PCR del gen PCNT**

Inicialmente se diseñaron secuencias de oligonucleótidos con el programa Primer 3 para la amplificación de la región codificante del gen *PCNT* de los siete pacientes con diagnóstico clínico de MOPD II (**Anexo 1**). Fueron preparados los *primers* de amplificación a 10  $\mu$ M y los *primers* de secuenciación a 3 $\mu$ M. Las condiciones de la PCR utilizadas están descritas en el **Anexo 2** (**Tablas 7 a 14 del anexo 2**).

Todos los fragmentos fueron amplificados mediante reacciones de PCR con un volumen final de mezcla de 25  $\mu$ l con 12.5  $\mu$ l de *GoTaq® Green Master Mix*, 2  $\mu$ l de *primer* Forward-HuPCNTex1-1F hasta el Forward-HuPCNTex47-1F para cada uno de los exones, 2  $\mu$ l de *primer* Reverse-HuPCNTex1-1R hasta el Reverse-HuPCNTex47-1R para cada uno de los exones y 150-200 ng de ADN. Para el exón 27 se utilizaron 1.25  $\mu$ l de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5% durante la estandarización inicial de los exones como coadyuvante de la reacción luego de haber modificado las condiciones de PCR sin obtener amplificación del mismo.

La amplificación de cada exón fue comprobada en un gel de agarosa al 1% en un buffer TBE 1X teñido con bromuro de etidio y seguido de electroforesis de 3µl del producto amplificado de cada exón a 110V por una hora. Se comparó el tamaño del fragmento amplificado con el de un patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen).

Además de los siete pacientes analizados, se realizó la extracción del ADN por precipitación salina y se amplificó el exón 10 del gen *PCNT* de los padres de los pacientes PCNT1, PCNT2 y PCNT6 debido a que estos pacientes presentaron variantes heterocigotas en el gen durante el análisis de los resultados (ver más adelante). Estos tres pacientes conforman dos familias como fue descrito en el apartado de caracterización clínica.

#### **4.3. Secuenciación y análisis bioinformático**

Para la secuenciación se utilizaron *primers* localizados internamente de los amplicones específicos de secuenciación (**Anexo 3**) y se procedió a un alineamiento comparando las secuencias nucleotídicas de las muestras de los pacientes con la secuencia *Wild Type* de *PCNT* de *H. Sapiens*- NC\_000021.9 empleando los programas informáticos ClustalW y Geneious. También se realizaron alineamientos de aminoácidos entre especies para conocer la conservación evolutiva de los aminoácidos intercambiados y fueron utilizadas herramientas *in silico* para la predicción de probables efectos deletéreos de las variantes *missense* encontradas (SIFT, Polyphen2 y Mutation Taster).

El programa bioinformático SIFT se fundamenta en las características de hidrofobicidad de los aminoácidos y en la conservación proteica entre especies para así establecer la probabilidad de efectos deletéreos. Un puntaje por debajo de 0.05 está a favor de la patogenicidad. Polyphen2 predice los resultados comparando la secuencia proteica entre diferentes especies, teniendo en cuenta las características físico-químicas de los aminoácidos intercambiados y analiza algunos

datos de la estructura potencial de la proteína. Sus resultados se designan como benigno, probablemente deletéreo y posiblemente deletéreo. Para el programa de predicción Mutation Taster se tienen en cuenta los cambios en la estructura y en las propiedades físico-químicas entre el aminoácido original y el aminoácido por el cual fue sustituido, con un puntaje que tiene un rango de 0 a 215, siendo este último el puntaje para un cambio absoluto del aminoácido (Abd-Elsalam 2003, Li, Li et al. 2005, Flanagan, Patch et al. 2010).

#### 4.4. Secuenciación de exoma por técnica NGS

Según los resultados encontrados en la secuenciación directa del gen *PCNT* (descritos en el apartado de resultados), tres pacientes tenían variantes en estado heterocigoto que no explicaban el fenotipo (pacientes PCNT1, PCNT2 y PCNT6). Se decidió por consecuente realizar un estudio de secuenciación de exoma en la paciente PCNT6 y en su padre (el padre no era portador de las variantes heterocigotas en el gen *PCNT* que se encontraron presentes en la paciente y en su madre (**Figura 13** - III2, II4)). No se realizó el estudio de secuenciación de exoma en los pacientes PCNT1 y PCNT2 debido a que la muestra de ADN disponible tenía mala calidad. Entonces se tomaron 10 µg de ADN genómico de la paciente PCNT6 y de su padre. Posteriormente se procedió a la comprobación de la calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, previo a la liofilización de las muestras para el envío a la secuenciación del exoma en una plataforma externa, en *Genotypic Technology* (Bangalore, India).

La preparación de las librerías y el NGS se efectuaron de la siguiente manera. A tres microgramos de ADN genómico de la paciente PCNT6 y de su padre se les adicionó agua libre de nucleasas hasta completar 130 microlitros de volumen total. Se realizó sonicación hasta obtener fragmentos de ADN de un tamaño entre 100 a 200 pb (Covaris S220). El tamaño de la distribución se verificó corriendo una alícuota de la muestra en la plataforma *Agilent HS Bioanalyzer*. El ADN

fragmentado fue seleccionado por tamaño usando perlas *Agencourt AMPure beads* (Beckman Coulter). Las librerías de ADN genómico se construyeron de acuerdo al protocolo del sistema de enriquecimiento *SureSelect Library prep kit* (Agilent). El ADN fue sometido a una serie de reacciones enzimáticas para reparar los extremos, se fosforilaron los fragmentos, se adicionó un nucleótido A y fueron ligados los adaptadores. Posteriormente, se realizaron cinco ciclos de amplificación por PCR para el enriquecimiento de los fragmentos. Las librerías preparadas fueron sometidas a hibridación según el protocolo de *SureSelect Target Enrichment System* para SOLiD *5500 Multiplexed Sequencing*. Los fragmentos hibridados de la librería fueron aislados utilizando perlas magnéticas de estreptavidina. Luego se realizó amplificación por PCR (ocho ciclos) de la librería y se purificó con perlas *AMPure XP* (Beckman Coulter). Una máquina Illumina NextSeq500 fue usada para la secuenciación.

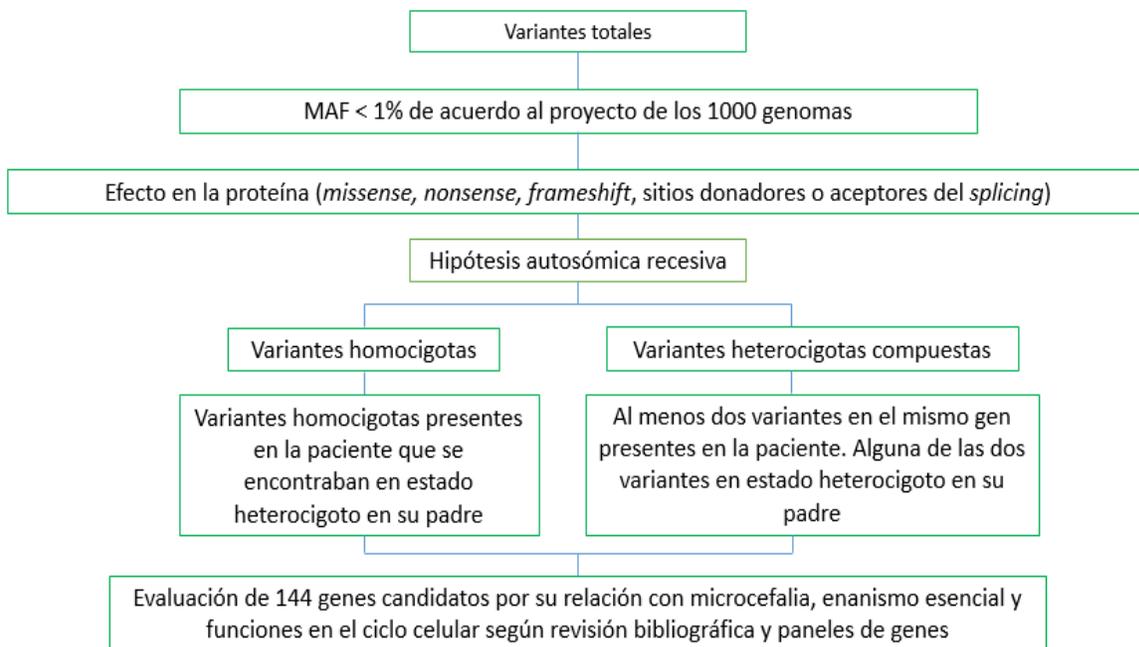
El procesamiento de los datos fue realizado con los programas bioinformáticos *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* y *MEME Suite Aligner* para el alineamiento de las secuencias. La información de los alineamientos de secuencias fue almacenada en *SAMtools* y la identificación, clasificación y anotación de las variantes relevantes fueron ejecutadas con el programa *Illumina Variant Studio*. Estos resultados fueron comparados con la base de datos dbSNP, esto ayudó a identificar nuevas variantes y sus efectos funcionales potenciales utilizando SIFT y PolyPhen2.

Para el proceso de filtrado de las variantes fueron incluidas sólo las que tenían una MAF (*Minor allele frequency*) inferior al 1%. Además, se incluyeron sólo las variantes *missense*, *nonsense*, *frameshift* y en sitios donadores o aceptores del *splicing* (**Figura 21**). Luego se utilizó un algoritmo de selección focalizado en la transmisión de variantes de manera autosómica recesiva (**Figura 21**). De acuerdo a la hipótesis de transmisión recesiva dos escenarios fueron considerados según los tipos de mutaciones posibles (homocigotas o heterocigotas compuestas). Para filtrar las variantes

homocigotas potencialmente patogénicas se incluyeron aquellas presentes en estado homocigoto en la paciente y en estado heterocigoto en el padre (no afectado). En el caso de los filtros referentes a variantes heterocigotas compuestas se seleccionaron todos aquellos genes que presentaran, en la paciente, al menos dos mutaciones. Posteriormente se seleccionaron aquellos genes que presentaran alguna de estas mutaciones en estado heterocigoto en el padre.

Finalmente, con el objetivo de concentrar la búsqueda en un gen candidato, se realizó una revisión en la literatura y en los paneles disponibles para obtener una lista de 144 genes (**Anexo 4**). Estas moléculas han demostrado una importancia en la aparición de microcefalia, enanismo esencial y funciones en el ciclo celular. Se realizó la revisión de cada una de las variantes en estos genes que cumplieran con las características tenidas en cuenta en los filtros utilizados. La **figura 21** es un diagrama de flujo que sintetiza los pasos utilizados para este análisis.

**Figura 21.** Diagrama de flujo de los algoritmos utilizados en el análisis de los resultados del exoma



#### 4.5. Amplificación por PCR del exón 7 y el intrón 7 del gen DDX11

Según los resultados de la lectura de la secuenciación de exoma, que serán descritos en la sección correspondiente, en la que se encontró la mutación *DDX11* c.792+1G>A en estado homocigoto en la paciente PCNT6, se realizó la confirmación de esta variante por secuenciación directa. Este experimento se hizo además en los otros pacientes que tenían variantes heterocigotas en el gen *PCNT* (pacientes PCNT1 y PCNT2). Para realizar la amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11* se diseñaron secuencias de oligonucleótidos con el programa *Primer 3* (**Tabla 3**). Fueron preparados los *primers* de amplificación a 10 µM. Las condiciones de la reacción de amplificación se muestran en la **Tabla 4**.

Cada fragmento fue amplificado mediante una reacción de PCR con un volumen final de mezcla de 25 µl con 12.5 µl de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega), 2 µl de *primer* forward, 2 µl de *primer* reverse y 150 ng de ADN.

La amplificación fue comprobada por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se comparó el tamaño del fragmento amplificado con los de un patrón de peso molecular (1kb *Plus DNA Ladder* de Invitrogen).

**Tabla 3** – *Primers* de amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11*

Exón / Tamaño del amplicón	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Exón/Intrón 7 (482 pb)	Forward - HuDDX11ex7-1F	5'ATAGATGCCTGACATGGGACAT3'
Exón/Intrón 7 (482 pb)	Reverse - HuDDX11ex7-1R	5'CCAGCTAAATGACATCCTACCAA3'

**Tabla 4** - Programa de PCR para la amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11*

Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®	Temperatura	Tiempo
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 30</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	61°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	40 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

#### 4.6. Secuenciación y análisis bioinformático

Para la secuenciación directa se utilizaron los mismos *primers* de la amplificación. Se procedió a un alineamiento múltiple comparando las secuencias nucleotídicas de las muestras de la paciente y de sus padres con la secuencia *Wild Type* de *DDX11* de *H. Sapiens*- NC\_000012.12 empleando los programas informáticos ClustalW y Geneious. También fueron utilizadas herramientas para la predicción de los potenciales efectos deletéreos de la variante *DDX11* c.792+1G>A (*SplicePort* y *Human Splice Finder 3.0*).

*SplicePort* es una herramienta bioinformática que permite hacer predicciones del efecto de las variantes localizadas en los sitios importantes para el *splicing* a partir de los datos de una colección de 4000 secuencias *RefSeq* humanas de pre-ARNm y de la región implicada (donador o aceptor). Este predictor utiliza 80 nucleótidos corriente arriba y corriente abajo del sitio del *splicing*. Finalmente genera un valor predictivo, el cual cuando es cercano a 1 es considerado un sitio donador o aceptor del *splicing* (Hammer, Strickert et al. 2005).

*Human Splice Finder 3.0* incluye todos los intrones y exones humanos construidos a partir de *Ensembl Genome Browser* y contiene datos extraídos de *Ensembl Variation database* para estudiar los efectos potenciales de los SNPs en los sitios del *splicing*. Utiliza el algoritmo MaxEnt que se fundamenta en el principio de máxima entropía. Este se enfoca en el modelado de secuencias cortas de los complejos nucleares del *spliceosoma* y le da un valor a cada nucleótido a partir de su frecuencia y según la importancia relativa de su posición en la secuencia. Además usa algoritmos que tienen en cuenta los *enhancers* y los *silencers* del *splicing*. El puntaje que otorga tiene un rango de 0 a 20, siendo este último el de mayor probabilidad de ser un sitio crítico del *splicing*. También utiliza el algoritmo de Matrices HSF que permite clasificar una secuencia usando valores apropiados para cada posición de los nucleótidos basado en la información de su secuencia consenso. El puntaje final de una secuencia es la sumatoria de los puntajes específicos de cada una de sus bases, el cual se encuentra en un rango de 0 a 100. Este resultado predice si el sitio podría ser donador o aceptor del *splicing* con el porcentaje de variación de la secuencia (Desmet, Hamroun et al. 2009, Jian, Boerwinkle et al. 2013).

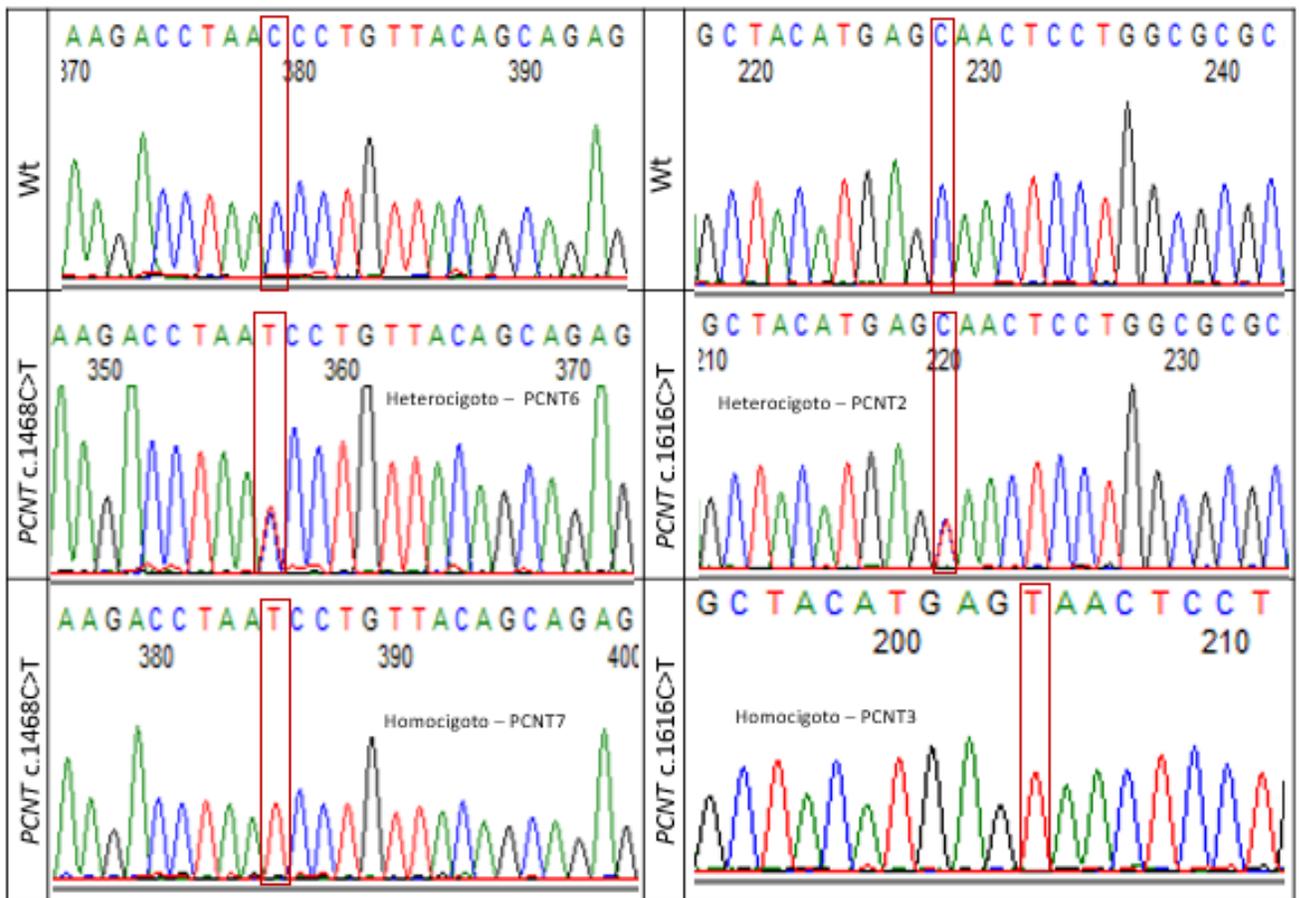
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Secuenciación del gen *PCNT*

La secuenciación de los 47 exones del gen *PCNT* demostró la presencia de dos variantes no sinónimas: *PCNT* c.1468C>T (p.Gln490X) y *PCNT* c.1616C>T (p.Thr539Ile) (**Tabla 5**). La variante c.1468C>T (p.Gln490X) se encontró en estado homocigoto en cuatro pacientes (PCNT3, PCNT4, PCNT5 y PCNT7) y en estado heterocigoto en tres pacientes (PCNT1, PCNT2 y PCNT6). La variante *PCNT* c.1616C>T (p.Thr539Ile) se encontró en estado homocigoto en dos pacientes (PCNT3 y PCNT7) y en estado heterocigoto en tres pacientes (PCNT1, PCNT2 y PCNT6). Cromatogramas representativos de estas variantes han sido incluidos en la **figura 22**. Los

resultados del estudio de la segregación familiar de las mutaciones en los padres disponibles, por secuenciación de Sanger, han sido incluidos en la **tabla 5**.

**Figura 22** – Cromatogramas representativos de las variantes codificantes encontradas en el gen *PCNT*



**Tabla 5.** Caracterización genotípica de la población de estudio

Mutación \ Paciente	<i>PCNT c.1468C&gt;T</i> (p.Gln490X)	<i>PCNT c.1616C&gt;T</i> (p.Thr539Ile)
PCNT1	Heterocigoto	Heterocigoto
PCNT2	Heterocigoto	Heterocigoto
Padre PCNT1 y PCNT2	<i>Wildtype</i>	<i>Wildtype</i>
Madre PCNT1 y PCNT2	Heterocigoto	Heterocigoto

} Hermanos

Mutación \ Paciente	<i>PCNT c.1468C&gt;T</i> (p.Gln490X)	<i>PCNT c.1616C&gt;T</i> (p.Thr539Ile)
PCNT3	Homocigoto	Homocigoto
Padre PCNT3	Heterocigoto	Heterocigoto

Mutación \ Paciente	<i>PCNT c.1468C&gt;T</i> (p.Gln490X)	<i>PCNT c.1616C&gt;T</i> (p.Thr539Ile)
PCNT4	Homocigoto	<i>Wildtype</i>

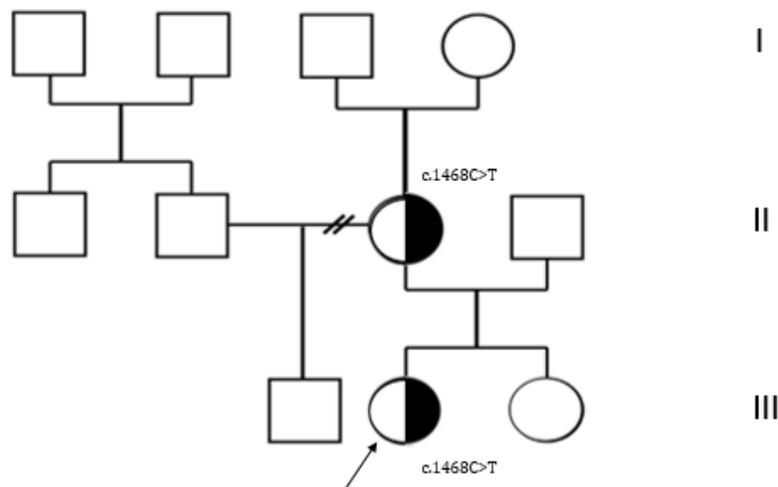
Mutación \ Paciente	<i>PCNT c.1468C&gt;T</i> (p.Gln490X)	<i>PCNT c.1616C&gt;T</i> (p.Thr539Ile)
PCNT5	Homocigoto	<i>Wildtype</i>
Padre PCNT5	Heterocigoto	<i>Wildtype</i>
Madre PCNT5	Heterocigoto	Heterocigoto

Mutación	<i>PCNT</i> c.1468C>T (p.Gln490X)	<i>PCNT</i> c.1616C>T (p.Thr539Ile)
Paciente		
PCNT6	Heterocigoto	Heterocigoto
Padre PCNT6	<i>Wildtype</i>	<i>Wildtype</i>
Madre PCNT6	Heterocigoto	Heterocigoto

Mutación	<i>PCNT</i> c.1468C>T (p.Gln490X)	<i>PCNT</i> c.1616C>T (p.Thr539Ile)
Paciente		
PCNT7	Homocigoto	Homocigoto
Madre PCNT7	Heterocigoto	Heterocigoto

En la **figura 23** se aprecia el árbol genealógico de la paciente PCNT6 con las variantes encontradas en ella y en sus padres. A esta paciente se le realizó el estudio de secuenciación de exoma (ver más adelante).

**Figura 23.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6 con las variantes encontradas en el gen *PCNT* y segregación familiar de la variante c. 1468C>T

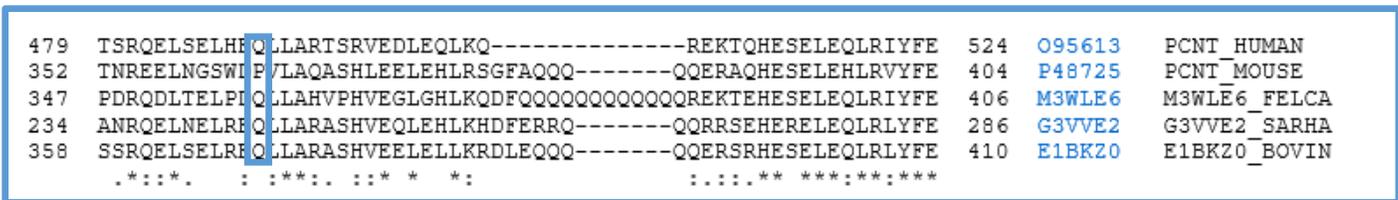


## 5.2. Análisis bioinformático de las variantes

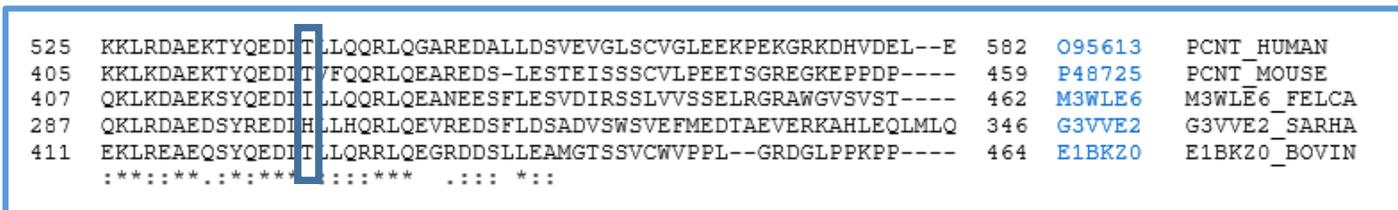
Para comprobar la potencial conservación evolutiva de las regiones genómicas portadoras de mutaciones y de los aminoácidos intercambiados (mutación *missense*) se realizaron alineamientos múltiples de secuencias entre especies de mamíferos. Para las dos mutaciones las regiones afectadas no están conservadas de manera estricta (**Figuras 24 y 25**). Sin embargo debe considerarse la mutación p.Gln490X como drástica en términos funcionales puesto que genera una proteína truncada en gran parte de su extremo C-terminal.

Las predicciones *in silico* de la potencial patogenicidad de la variante de secuencia PCNT c.1616C>T (p.Thr539Ile) se realizaron con los programas bioinformáticos SIFT, Polyphen2 y Mutation Taster. Esta variante arrojó con el programa SIFT un resultado de 0.07 (no patogénica). Para Polyphen2 la variante mostró un puntaje de 0.142 (“benigna”). Para el programa Mutation Taster el puntaje se distribuye entre 0 a 215 (siendo este último el de un cambio drástico del aminoácido). Para esta variante el puntaje fue de 89 (Jeanty and Valero , Abd-Elsalam 2003, Li, Li et al. 2005, Flanagan, Patch et al. 2010).

**Figura 24.** Alineamiento múltiple de secuencias entre especies de mamíferos para la región PCNT Gln<sup>490</sup>



**Figura 25.** Alineamiento múltiple de secuencias entre especies de mamíferos para la región PCNT T<sup>539</sup>



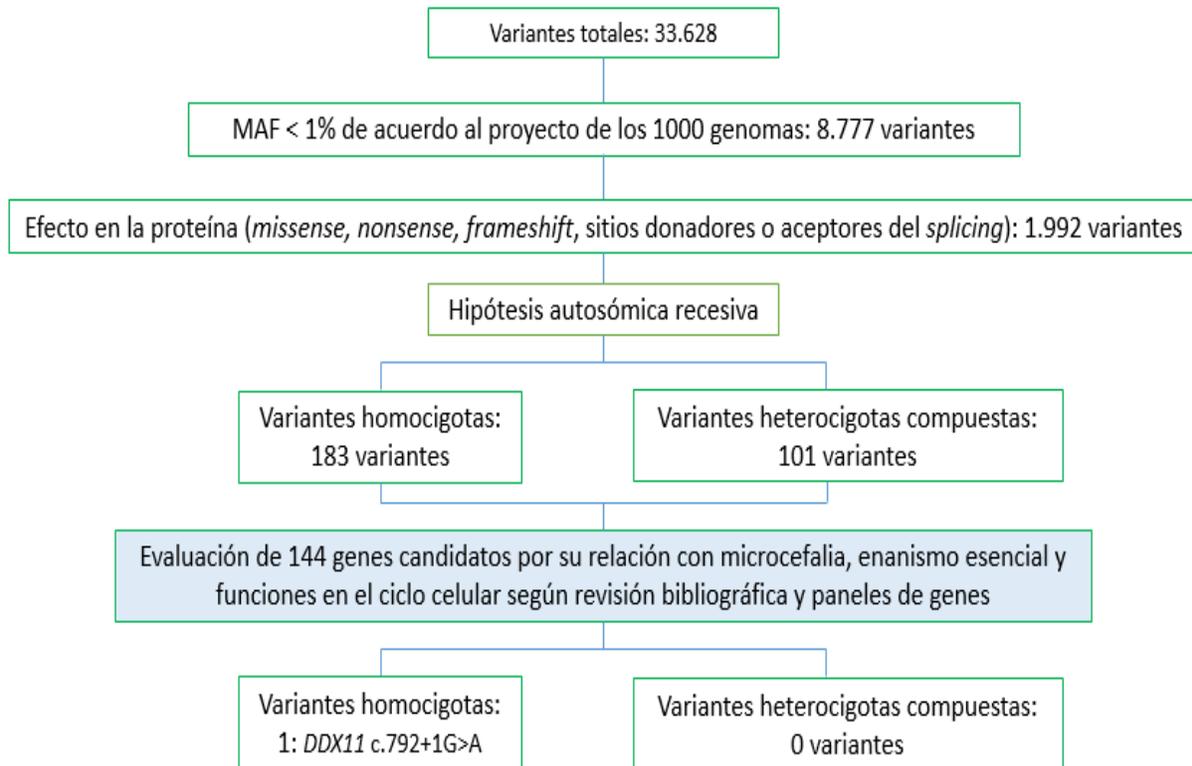
### 5.3. Resultados de la secuenciación de exoma

Debido a que las variantes en estado heterocigoto del gen *PCNT* no explicaban el fenotipo del síndrome MOPD II en algunos pacientes, se decidió ampliar el estudio con el objetivo de encontrar otras posibles mutaciones en estado homocigoto o heterocigoto compuesto en otros genes asociados con las vías de señalización implicadas en el crecimiento y relacionadas con el enanismo esencial microcefálico. Para lograr este objetivo se efectuó un estudio de secuenciación de exoma en la paciente PCNT6 y en su padre.

En el estudio de secuenciación de exoma se informó una cobertura promedio en ambas muestras de aproximadamente 1X en el 98%, una profundidad de 10X en el 91% y una de 20X en el 85%. En la **figura 26** se muestra, por medio de un diagrama de flujo, la cantidad de variantes encontradas en cada uno de los filtros utilizados en la lectura de la secuenciación de exoma.

Fueron evaluados 144 genes según una revisión bibliográfica y paneles comerciales descritos para microcefalia, síndromes asociados a enanismo esencial y funciones en el ciclo celular, encontrando una variante en estado homocigoto en un gen, la cual se describe en la **tabla 6**.

**Figura 26.** Diagrama de flujo de la cantidad de variantes encontradas en cada uno de los filtros utilizados en la lectura de la secuenciación de exoma para la paciente PCNT6 (ver igualmente la sección de materiales y métodos)



**Tabla 6** – Variante en estado homocigoto en los 144 genes analizados por su asociación con microcefalia, enanismo esencial y función en el ciclo celular

Gen	Variante en el cDNA	Cigosidad	Mecanismo de la mutación
<i>DDX11</i>	c.792+1G>A	Homocigoto	<i>Splice donor</i>

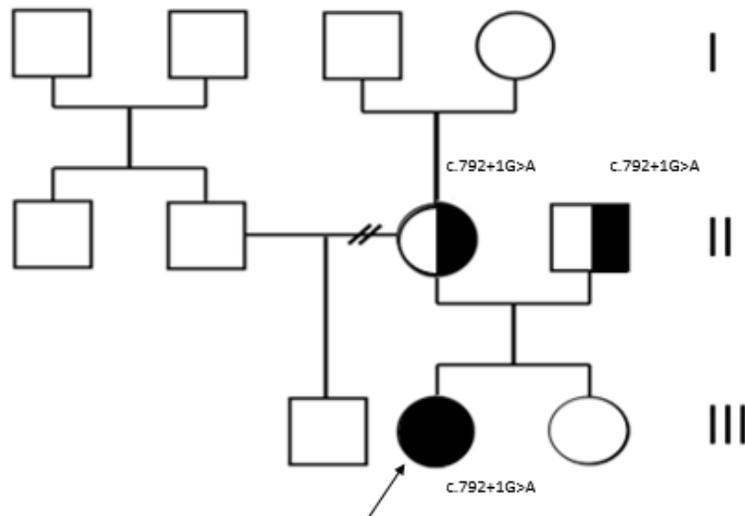
Se efectuaron posteriormente verificaciones por secuenciación de Sanger y predicciones computacionales del efecto de la mutación *DDX11* c.792+1G>A. Mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome de *Warsaw Breakage*.

#### 5.4. Amplificación y secuenciación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11*

La amplificación del exón 7 y el intrón 7 del gen *DDX11* y el análisis de las secuencias con los programas *ClustalW* y *Geneious* validaron la presencia de la variante c.792+1G>A en estado homocigoto en la paciente. El estudio en sus padres sanos reveló la presencia de la misma variante en estado heterocigoto (**Figura 27**). En los pacientes denominados PCNT1 y PCNT2 no fue hallada la variante en el gen *DDX11*, quienes eran portadores de las variantes *PCNT* c.1468C>T y *PCNT* c.1616C>T en estado heterocigoto.

**Figura 27.** Árbol genealógico de la paciente PCNT6 con las variantes encontradas en el gen

*DDX11*



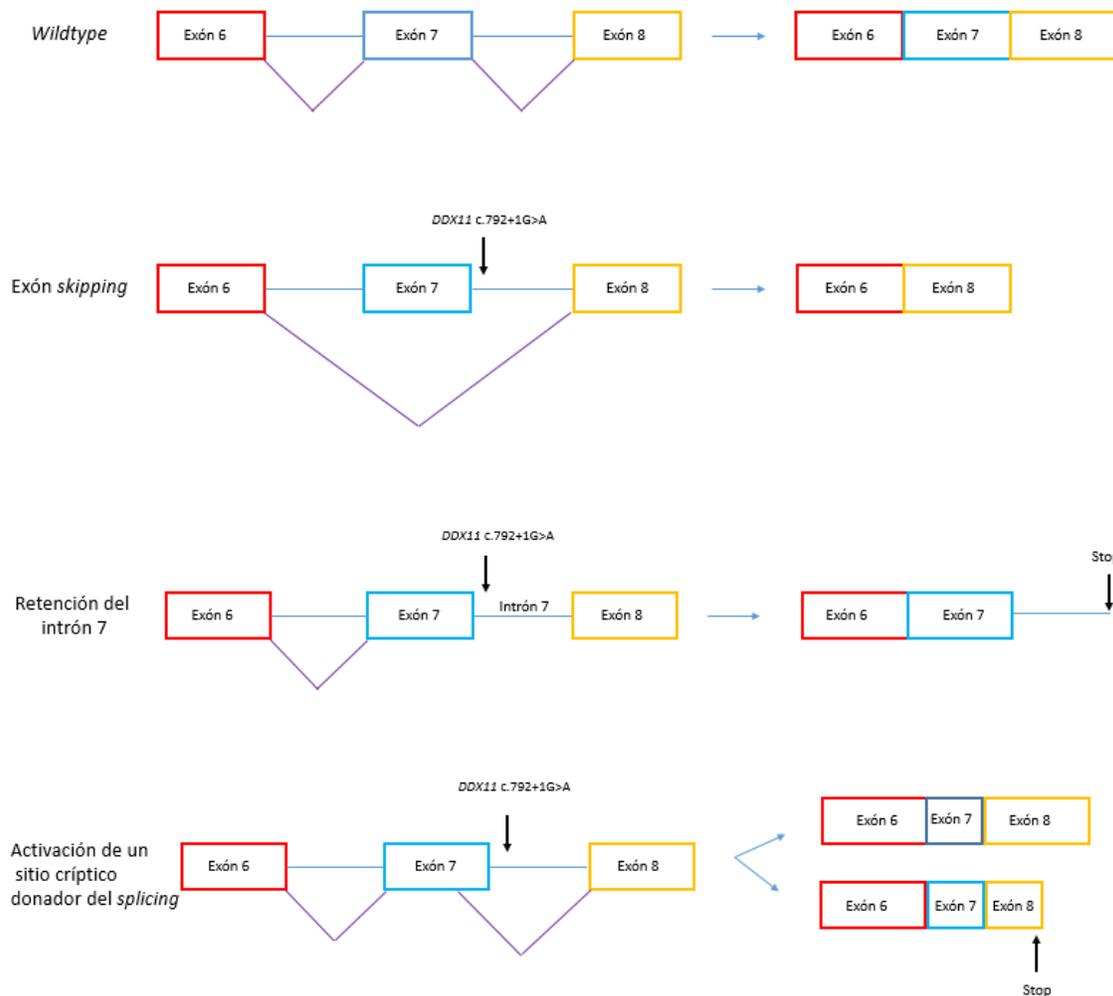
### 5.5. Análisis bioinformático de las variantes encontradas

La predicción *in silico* de la patogenicidad de la variante de secuencia *DDX11* c.792+1G>A se realizó con los programas bioinformáticos *SplicePort* y *Human Splice Finder 3.0*. Para *SplicePort* se demostró que este era un sitio donador del *splicing* (puntaje de 1.00314 en la secuencia *Wild Type* y puntaje de -0.303061 en la secuencia mutada). Estos resultados sugieren que la región no es reconocida como un sitio donador del *splicing*. Adicionalmente, todos los sitios donadores críticos cercanos a esta mutación (*DDX11* c.792+1G>A) tienen un puntaje de predicción negativo. Este resultado en el programa podría sugerir que no se activarían estos sitios críticos lo que conduciría a postular alguna de las otras hipótesis de *splicing* alternativo como el exón *skipping* o la retención de intrón.

Para *Human Splice Finder 3.0* el resultado indicó que el sitio donador del *splicing* se encontraba alterado cuando se presentaba la variante, con un porcentaje de variación de -104.48 (puntaje de referencia para la secuencia *WildType* de 7.82 y para la secuencia mutada de -0.35). Este programa predijo la posible activación de varios sitios críticos donadores del *splicing* localizados en el exón 7. El sitio que mayor puntaje demostró se localiza a 57 nucleótidos corriente arriba del sitio de la mutación (HSF score de 82.98 y MaxEnt score de 4.4).

Según estos resultados se podrían postular algunas hipótesis de *splicing* alternativo para esta mutación según las predicciones computacionales. En la **figura 28** se demuestran los posibles rearrreglos del *splicing* con sus respectivas traducciones hipotéticas para nuestra mutación en estudio.

**Figura 28.** Posibles hipótesis de *splicing* alternativo para la mutación *DDX11* c.792+1G>A



## 6. DISCUSIÓN

Los síndromes de enanismo esencial microcefálico son un grupo de enfermedades monogénicas infrecuentes que se caracterizan principalmente por talla baja extrema proporcionada de inicio prenatal y microcefalia severa. El síndrome MOPD II tiene una fascies similar al síndrome de Seckel pero se diferencia principalmente por presentar mayor cantidad de alteraciones radiológicas, un déficit cognitivo menos severo y una talla baja más extrema. En los pacientes que

formaron parte del presente estudio se investigaron variantes en el gen *PCNT* por los hallazgos clínicos compatibles con el síndrome MOPD II.

El síndrome MOPD II es una enfermedad con herencia autosómica recesiva presente en la población de El Santuario Antioquia en Colombia en por lo menos uno de cada 6.780 habitantes. En la población mundial la prevalencia de este síndrome es menor a 1 por cada 1.000.000 de habitantes. La mayor prevalencia de MOPD II en esta población colombiana es consecuencia de un probable efecto fundador que se produce cuando unos pocos individuos se separan para establecer una nueva población que tiene solo una pequeña fracción de la variación genética total (Mayr, Mayr et al. 1963, Castro, Ramírez et al. 2010).

La población de El Santuario Antioquia en Colombia es conocida por su alto índice de endogamia, fenómeno que ha sido investigado por historiadores de la región y atribuido a ciertas costumbres sociales arraigadas desde la época de la conquista, que llevaron a la constitución de una población genéticamente aislada (Aguiar 1988). Además, el comportamiento endogámico conduce a un incremento de la homocigosidad y a una reducción en la variabilidad genética, lo que se evidencia en los resultados del presente estudio en el que los siete pacientes estudiados comparten las mismas variantes en el gen *PCNT*. Además se identificó una nueva mutación en el gen *DDX11* asociada a un caso del síndrome de *Warsaw Breakage*.

La variante *PCNT* c.1468C>T (p.Gln490X) presenta una MAF inferior al 1% pero fue hallada en el proyecto de los 1.000 genomas en un individuo procedente del departamento de Antioquia en Colombia, hallazgo que apoya la hipótesis de que en esta región existe una alta frecuencia de portadores. La variante c.1616C>T (p.Thr539Ile), por el contrario, sí presenta una alta frecuencia en la población general.

La secuenciación directa del gen *PCNT* en cuatro pacientes permitió realizar la asociación con el fenotipo, causado por pérdida potencial de la función en la proteína pericentrina. En el presente trabajo de investigación tres de los siete pacientes presentaban mutaciones heterocigotas en *PCNT* que no pueden ser asociadas con el fenotipo. Esto condujo al planteamiento de diferentes hipótesis y a la ampliación de la metodología utilizando la secuenciación de exoma en una de las pacientes con mutaciones monoalélicas en *PCNT*.

Se ha propuesto que la *NGS* es una herramienta eficiente para constituir un diagnóstico molecular en enfermedades monogénicas en las cuales la caracterización clínica y genética muestra dificultades debido al solapamiento de fenotipos (Laissue 2015). El equipo de investigación del CIGGUR ha desarrollado esta y otras técnicas para la identificación de mutaciones asociadas a patologías mono y poligénicas (Laissue, Copelli et al. 2006, Bergadá, Andreone et al. 2008, BRIEF 2008, Laissue, Vinci et al. 2008, Lakhal, Laissue et al. 2008, Laissue, Burgio et al. 2009, Laissue, L'hôte et al. 2009, Laissue, Lakhal et al. 2009, Lakhal, Laissue et al. 2009, L'hôte, Laissue et al. 2010, Lakhal, Laissue et al. 2010, Ojeda, Lakhal et al. 2011, Caburet, Zavadakova et al. 2012, Diggle, Parry et al. 2012, Fonseca, Garzón et al. 2012, Fonseca, Ojeda et al. 2012, Fonseca, Prada et al. 2012, Niño, Mateus et al. 2012, Vatin, Burgio et al. 2012, Castro, Mateus et al. 2013, Fonseca, Rojas et al. 2013, Ortega-Recalde, Fonseca et al. 2013, Ortega-Recalde, Vergara et al. 2013, Fonseca, Ortega-Recalde et al. 2014, Patiño, Battu et al. 2014, Prada and Laissue 2014, Vatin, Bouvier et al. 2014, Fonseca, Patiño et al. 2015, Laissue 2015, Mitropoulos, Al Jaibeji et al. 2015, Ortega-Recalde, Beltrán et al. 2015, Ortega-Recalde, Moreno et al. 2015, Ducat, Doridot et al. 2016, Forero, Wonkam et al. 2016, Laissue, Lakhal et al. 2016, Ortega-Recalde, Silgado et al. 2016, Patiño, Silgado et al. 2017, Patiño, Walton et al. 2017). Con la realización de este experimento en la paciente PCNT6 se esperaba encontrar variantes deletéreas

en otros genes relacionados con enanismo esencial microcefálico o variantes que se encuentren en los genes de las vías comunes de señalización.

Al ampliar el estudio con la realización de la secuenciación de exoma se encontró una variante homocigota en el gen *DDX11*. Este gen ha sido asociado con microcefalia y alteración del crecimiento desde la etapa prenatal. Esta variante en el gen fue validada por secuenciación directa. Al revisar el fenotipo presente en los pacientes con mutaciones homocigotas en *DDX11* se encontró que es muy similar al que presenta la paciente PCNT6 lo que nos permitió establecer el diagnóstico de síndrome de *Warsaw Breakage*. La paciente de nuestro caso presenta todas las características clínicas descritas del síndrome excepto el hipotiroidismo y los problemas para la alimentación aunque se evidenció en ella hipertrofia pilórica. Además presentó pie equino varo bilateral y malrotación intestinal en el momento del nacimiento. Su alteración cardíaca principal es el ductus arterioso persistente y su patrón de pigmentación anormal está constituido por múltiples máculas café con leche generalizadas. Este sería el sexto paciente reportado en el mundo, en este caso con una nueva variante en el gen *DDX11* (c.792+1G>A) en estado homocigoto. Las predicciones computacionales para esta variante sugirieron que el sitio de la mutación ya no puede ser reconocido como un donador del *splicing* e indicaron la posible activación de otros sitios críticos donadores en el exón 7.

Los pacientes que hicieron parte de la población de estudio de la presente tesis presentaban una fascies característica consistente con la anteriormente designada “cara de pájaro” la cual se refiere a un conjunto de rasgos faciales como ojos grandes, frente recedida, nariz larga y encorvada, retrognatia y dientes muy pequeños. Estas características peculiares han sido relacionadas con los síndromes de Seckel y MOPD II, por lo que estas patologías fueron las principales a tener en cuenta en la evaluación clínica. En el momento de iniciar este estudio ya había sido descartado el síndrome

de Seckel en algunos pacientes por medio del estudio molecular y se habían descrito diversas malformaciones óseas en los pacientes, por lo cual el primer enfoque diagnóstico fue hacia el síndrome MOPD II. Es importante destacar que al ser pacientes pertenecientes a una misma población en la cual se estaba estudiando un efecto fundador se realizó el enfoque hacia un mismo síndrome para todos los participantes en el inicio del estudio, incluyendo a la paciente PCNT6 a quien se le diagnosticó posteriormente el síndrome de *Warsaw Breakage* a partir de la identificación de la mutación *DDX11* c.792+1G>A.

Los otros dos pacientes quienes presentaron variantes en el gen *PCNT* en estado heterocigoto que no pueden ser atribuidas como causales del fenotipo, al igual que en el caso de la paciente PCNT6, podrían estar cursando con otro síndrome de enanismo esencial microcefálico debido al solapamiento de las características clínicas y por tanto es conveniente ampliar el análisis en ellos.

## 7. PERSPECTIVAS

Con el objetivo de ampliar nuestros resultados sería de utilidad efectuar un estudio de minigenes *in vitro* con el fin de evaluar el potencial efecto funcional de la variante encontrada en el sitio donador del *splicing*. Los minigenes son vectores que permiten el estudio del efecto de las mutaciones implicadas en los procesos del *splicing* y están indicados cuando las muestras de ARN de los pacientes no están disponibles. El vector de los minigenes contiene porciones exónicas de un gen definido por sitios donadores 5' y aceptores 3' funcionales del *splicing* separados por secuencias intrónicas. El constructo resultante es transfectado en líneas celulares establecidas y el patrón del *splicing* del vector es analizado luego de la secuenciación de los transcritos alternativos. Es esperado que el minigen *Wild type* presente una correcta inclusión del exón mientras que el minigen mutado resulte en un *exon skipping*, en la retención del intrón o en la activación de sitios

críticos del *splicing* (Desviat, Pérez et al. 2012). En estos casos, la secuencia predicha de la proteína es distinta de la *Wild type* y puede incluir aminoácidos diferentes y/o ser de distinta longitud.

En los pacientes con variantes heterocigotas en el gen *PCNT* y negativos para mutaciones en el gen *DDX11*, resultaría de utilidad ampliar el estudio con la secuenciación del exoma con el fin de encontrar posibles nuevas variantes que expliquen la enfermedad. Conociendo las particularidades que han llevado al aumento de la prevalencia de ciertas enfermedades genéticas en la población de El Santuario, Antioquia sería útil efectuar estudios poblacionales para determinar la frecuencia genotípica de portadores y afectados tanto del síndrome MOPD II como del síndrome de *Warsaw Breakage*. Esta aproximación podría igualmente extenderse a otros fenotipos comunes en esa población.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Aarons, P. (1964). "Vogelkopdwergen." Maandschr Kinderge-neesk **32**: 384-394.

Abd-Elsalam, K. A. (2003). "Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design." african Journal of biotechnology **2**(5): 91-95.

Abdel-Salam, G. M., M. S. Abdel-Hamid, N. A. Hassan, M. Y. Issa, L. Effat, S. Ismail, M. S. Aglan and M. S. Zaki (2013). "Further delineation of the clinical spectrum in RNU4ATAC related microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I." American Journal of Medical Genetics Part A **161**(8): 1875-1881.

Abdel-Salam, G. M., M. S. Abdel-Hamid, M. Issa, A. Magdy, A. El-Kotoury and K. Amr (2012). "Expanding the phenotypic and mutational spectrum in microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(6): 1455-1461.

Abolila, R. A., R. M. Alsawan and M. T. Alrefaie (2012). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism (MOPD) type I with lissencephaly and brain cyst." Egyptian Journal of Medical Human Genetics **13**(3): 363-365.

Adachi, Y., A. Poduri, A. Kawaguch, G. Yoon, M. Salih, F. Yamashita, C. Walsh and A. Barkovich (2011).

"Congenital microcephaly with a simplified gyral pattern: associated findings and their significance."

American Journal of Neuroradiology **32**(6): 1123-1129.

Afzal, A. R., A. Rajab, C. D. Fenske, M. Oldridge, N. Elanko, E. Ternes-Pereira, B. Tüysüz, V. A. Murday, M.

A. Patton and A. O. Wilkie (2000). "Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type

B, is caused by mutation of ROR2." Nature genetics **25**(4): 419-422.

Aghajanova, L., A. Hamilton and L. Giudice (2008). Uterine receptivity to human embryonic implantation:

histology, biomarkers, and transcriptomics. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.

Aguiar, M. L. J. B. (1988). Estudio de los factores de riesgo para el desarrollo prematuro de las enfermedades cardiovasculares en la poblacion escolar de El Santuario, Universidad de Antioquia.

Aicardi, J., M. Bax and C. Gillberg (2009). Diseases of the nervous system in childhood, Mac Keith Press.

Aigner, T., T. Rau, M. Niederhagen, F. Zaucke, M. Schmitz, U. Pöhls, H. Stöss, A. Rauch and C. T. Thiel (2007). "Achondrogenesis Type IA (Houston-Harris): a still-unresolved molecular phenotype." Pediatric and Developmental Pathology **10**(4): 328-334.

Al-Ata, J., M. Paquet and A. S. Teebi (1998). "Congenital heart disease in Robinow syndrome." American journal of medical genetics **77**(4): 332-333.

Al GAZAL, A., M. Hamada and W. Lytle (1995). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II." Clinical dysmorphology **4**(3): 234-238.

Alarcón, C., A.-I. Zaromytidou, Q. Xi, S. Gao, J. Yu, S. Fujisawa, A. Barlas, A. N. Miller, K. Manova-Todorova and M. J. Macias (2009). "Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF- $\beta$  pathways." Cell **139**(4): 757-769.

Alatzoglou, K. S., P. C. Hindmarsh, C. Brain, J. Torpiano and M. T. Dattani (2009). "Acanthosis nigricans and insulin sensitivity in patients with achondroplasia and hypochondroplasia due to FGFR3 mutations." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **94**(10): 3959-3963.

Albert, M. and A. H. Peters (2009). "Genetic and epigenetic control of early mouse development." Current opinion in genetics & development **19**(2): 113-121.

Alderton, G. K., H. Joenje, R. Varon, A. D. Børglum, P. A. Jeggo and M. O'Driscoll (2004). "Seckel syndrome exhibits cellular features demonstrating defects in the ATR-signalling pathway." Human molecular genetics **13**(24): 3127-3138.

Alioto, T. S. (2007). "U12DB: a database of orthologous U12-type spliceosomal introns." Nucleic acids research **35**(suppl 1): D110-D115.

Amann, J., M. Valentine, V. J. Kidd and J. M. Lahti (1996). "Localization ofChl1-Related Helicase Genes to Human Chromosome Regions 12p11 and 12p13: Similarity between Parts of These Genes and Conserved Human Telomeric-Associated DNA." Genomics **32**(2): 260-265.

Andersen, J. S., C. J. Wilkinson, T. Mayor, P. Mortensen, E. A. Nigg and M. Mann (2003). "Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling." Nature **426**(6966): 570-574.

Anoussakis, C., D. Liakakos, N. Zervos and T. Karpathios (1974). "Les nanismes congénitaux avec dysmorphie: II. Le nanisme congénital atête d’oiseau (type Virchow–Seckel)." Pediatrie **29**: 261-267.

Anstey, A. (2001). "Photomedicine: lessons from the Smith–Lemli–Opitz syndrome." Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology **62**(3): 123-127.

Argente, J., L. Pérez-Jurado and J. F. Sotos (2000). "Molecular bases of pathological growth." International Journal on Disability and Human Development **1**(4): 179-210.

Arnold, S. J. and E. J. Robertson (2009). "Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo." Nature reviews Molecular cell biology **10**(2): 91-103.

Awad, S., M. S. Al-Dosari, N. AlYacoub, D. Colak, M. A. Salih, F. S. Alkuraya and C. Poizat (2013). "Mutation in PHC1 implicates chromatin remodeling in primary microcephaly pathogenesis." Human molecular genetics: ddt072.

Bailey, C., A. E. Fryer and M. Greenslade (2015). "Warsaw Breakage Syndrome–A further report, emphasising cutaneous findings." European journal of medical genetics **58**(4): 235-237.

Bakhshi, S., K. M. Cerosaletti, P. Concannon, E. V. Bawle, J. Fontanesi, R. A. Gatti and K. Bhambhani (2003). "Medulloblastoma with adverse reaction to radiation therapy in Nijmegen breakage syndrome." Journal of pediatric hematology/oncology **25**(3): 248-251.

Barbosa-Buck, C. O., I. M. Orioli, M. da Graça Dutra, J. Lopez-Camelo, E. E. Castilla and D. P. Cavalcanti (2012). "Clinical epidemiology of skeletal dysplasias in South America." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(5): 1038-1045.

Barbosa, M., A. Sousa, A. Medeira, T. Lourenço, J. Saraiva, J. Pinto-Basto, G. Soares, A. Fortuna, A. Superti-Furga and L. Mittaz (2011). "Clinical and molecular characterization of diastrophic dysplasia in the Portuguese population." Clinical genetics **80**(6): 550-557.

Bartsch, O., J. Labonté, B. Albrecht, D. Wiczorek, S. Lechno, U. Zechner and T. Haaf (2010). "Two patients with EP300 mutations and facial dysmorphism different from the classic Rubinstein–Taybi syndrome." American Journal of Medical Genetics Part A **152**(1): 181-184.

Basel-Vanagaite, L. and W. B. Dobyns (2010). "Clinical and brain imaging heterogeneity of severe microcephaly." Pediatric neurology **43**(1): 7-16.

Basel, D. and R. D. Steiner (2009). "Osteogenesis imperfecta: recent findings shed new light on this once well-understood condition." Genetics in medicine **11**(6): 375-385.

Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C. G. Woods, A. Khodjakov and J. W. Raff (2006). "Flies without centrioles." Cell **125**(7): 1375-1386.

Baujat, G., C. Huber, J. El Hokayem, R. Caumes, C. D. N. Thanh, A. David, A.-L. Delezoide, A. Dieux-Coeslier, B. Estournet and C. Francannet (2013). "Asphyxiating thoracic dysplasia: clinical and molecular review of 39 families." Journal of medical genetics **50**(2): 91-98.

Beales, P. L., E. Bland, J. L. Tobin, C. Bacchelli, B. Tuysuz, J. Hill, S. Rix, C. G. Pearson, M. Kai and J. Hartley (2007). "IFT80, which encodes a conserved intraflagellar transport protein, is mutated in Jeune asphyxiating thoracic dystrophy." Nature genetics **39**(6): 727-729.

Beiraghi, S., V. Leon-Salazar, B. Larson, M. John, M. Cunningham, A. Petryk and J. Lohr (2011). "Craniofacial and intraoral phenotype of Robinow syndrome forms." Clinical genetics **80**(1): 15-24.

Bellus, G. A., E. B. Spector, P. W. Speiser, C. A. Weaver, A. T. Garber, C. R. Bryke, J. Israel, S. S. Rosengren, M. K. Webster and D. J. Donoghue (2000). "Distinct missense mutations of the FGFR3 lys650 codon modulate receptor kinase activation and the severity of the skeletal dysplasia phenotype." The American Journal of Human Genetics **67**(6): 1411-1421.

Bergadá, I., L. Andreone, P. Bedecarrás, M. G. Ropelato, S. Copelli, P. Laissue, R. A. Rey and S. Campo (2008). "Seminiferous tubule function in delayed-onset X-linked adrenal hypoplasia congenita associated with incomplete hypogonadotropic hypogonadism." Clinical endocrinology **68**(2): 240-246.

Berger, A., N. Haschke, C. Kohlhauser, G. Amman, U. Unterberger and M. Weninger (1998). "Neonatal cholestasis and focal medullary dysplasia of the kidneys in a case of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism." Journal of medical genetics **35**(1): 61-64.

Berkowitz, R., K. Grundfast, C. Scott, H. Saal, H. Stern and K. Rosenbaum (1991). "Middle ear disease in childhood achondroplasia." Ear, nose, & throat journal **70**(5): 305-308.

Bicknell, L. S., E. M. Bongers, A. Leitch, S. Brown, J. Schoots, M. E. Harley, S. Aftimos, J. Y. Al-Aama, M. Bober and P. A. Brown (2011). "Mutations in the pre-replication complex cause Meier-Gorlin syndrome." Nature genetics **43**(4): 356-359.

Bicknell, L. S., S. Walker, A. Klingseisen, T. Stiff, A. Leitch, C. Kerzendorfer, C.-A. Martin, P. Yeyati, N. Al Sanna and M. Bober (2011). "Mutations in ORC1, encoding the largest subunit of the origin recognition complex, cause microcephalic primordial dwarfism resembling Meier-Gorlin syndrome." Nature genetics **43**(4): 350-355.

Biesecker, L. G. and J. Graham (1996). "Pallister-Hall syndrome." Journal of medical genetics **33**(7): 585-589.

Biesecker, L. G. and R. C. Green (2014). "Diagnostic clinical genome and exome sequencing." New England Journal of Medicine **370**(25): 2418-2425.

Bilge, I., H. Kayserili, S. Emre, A. Nayir, A. Sirin, T. Tukul, F. Bas, G. Kilic, S. Basaran and H. Gunoz (2000). "Frequency of renal malformations in Turner syndrome: analysis of 82 Turkish children." Pediatric Nephrology **14**(12): 1111-1114.

Binder, G. (2011). "Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy." Hormone research in paediatrics **75**(2): 81-89.

Bishop, N. (1989). "Bone disease in preterm infants." Archives of disease in childhood **64**(10 Spec No): 1403-1409.

Bixler, D. and R. M. Antley (1973). "Microcephalic dwarfism in sisters." Birth defects original article series **10**(7): 161-165.

Black, I., J. Fitzsimmons, E. Fitzsimmons and A. Thomas (1982). "Parental consanguinity and the Majewski syndrome." Journal of medical genetics **19**(2): 141-143.

Black, J. (1961). "Low birth weight dwarfism." Archives of disease in childhood **36**(190): 633.

Blumer, M. J., S. Longato and H. Fritsch (2008). "Structure, formation and role of cartilage canals in the developing bone." Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger **190**(4): 305-315.

Bober, M. B., G. A. Bellus, S. M. Nikkel and G. E. Tiller (2013). "Hypochondroplasia."

Bober, M. B., N. Khan, J. Kaplan, K. Lewis, J. A. Feinstein, C. I. Scott and G. K. Steinberg (2010). "Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): expanding the vascular phenotype." American Journal of Medical Genetics Part A **152**(4): 960-965.

Bober, M. B., T. Niiler, A. L. Duker, J. E. Murray, T. Ketterer, M. E. Harley, S. Alvi, C. Flora, C. Rustad and E. M. Bongers (2012). "Growth in individuals with Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II caused by pericentrin mutations." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(11): 2719-2725.

Bodurtha, J., A. Kessel, W. Berman and M. Hartenberg (1986). "Distinctive gastrointestinal anomaly associated with Coffin-Siris syndrome." The Journal of pediatrics **109**(6): 1015-1017.

Boles, R., A. Teebi, D. Schwartz and J. Harper (1994). "Further delineation of the ear, patella, short stature syndrome (Meier-Gorlin syndrome)." Clinical dysmorphology **3**(3): 207-214.

Boltshauser, E., C. Yalcinkaya, W. Wichmann, F. Reutter, A. Prader and A. Valavanis (1989). "MRI in Cockayne syndrome type I." Neuroradiology **31**(3): 276-277.

Bonafé, L., L. Mittaz-Crettol, D. Ballhausen and A. Superti-Furga (2013). "Diastrophic dysplasia."

Bond, J., E. Roberts, G. H. Mochida, D. J. Hampshire, S. Scott, J. M. Askham, K. Springell, M. Mahadevan, Y. J. Crow and A. F. Markham (2002). "ASPM is a major determinant of cerebral cortical size." Nature genetics **32**(2): 316-320.

Bond, J., S. Scott, D. J. Hampshire, K. Springell, P. Corry, M. J. Abramowicz, G. H. Mochida, R. C.

Hennekam, E. R. Maher and J.-P. Fryns (2003). "Protein-truncating mutations in ASPM cause variable reduction in brain size." The American Journal of Human Genetics **73**(5): 1170-1177.

Bondeson, J. (1992). "Caroline crachami, the sicilian fairy: A case of bird-headed dwarfism." American journal of medical genetics **44**(2): 210-219.

Bongers, E. M., J. M. Opitz, A. Fryer, P. Sarda, R. Hennekam, B. D. Hall, D. W. Superneau, M. Harbison, A.

Poss and H. v. Bokhoven (2001). "Meier-Gorlin syndrome: Report of eight additional cases and review." American journal of medical genetics **102**(2): 115-124.

Borochoowitz, Z., R. Lachman, G. Adomian, G. Spear, K. Jones and D. Rimoin (1988). "Achondrogenesis type I: delineation of further heterogeneity and identification of two distinct subgroups." The Journal of pediatrics **112**(1): 23-31.

Boscherini, B., G. Iannaccone, C. La Cauza, G. Mancuso, F. Girotti, G. Finocchi and A. Pasquino (1981).

"Intrauterine growth retardation." European journal of pediatrics **137**(2): 237-242.

Brancati, F., M. Castori, R. Mingarelli and B. Dallapiccola (2005). "Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II) complicated by stroke: clinical report and review of cerebral vascular anomalies." American Journal of Medical Genetics Part A **139**(3): 212-215.

BRIEF, M. I. (2008). "Identification of 34 novel and 56 known FOXL2 mutations in patients with Blepharophimosis syndrome."

Britton, J. S. and B. A. Edgar (1998). "Environmental control of the cell cycle in Drosophila: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms." Development **125**(11): 2149-2158.

Brizard, J., M. Mimouni, J. Seneze and J. Thoyer-Rozat (1973). "Sur un cas de nanisme extreme adebut intra-uterin vraisemblablement du type Seckel." Ann Pediatr **20**: 655-660.

Brooks, R. and P. Riddle (1988). "The 3T3 cell cycle at low proliferation rates." Journal of cell science **90**(4): 601-612.

Buck, D., L. Malivert, R. de Chasseval, A. Barraud, M.-C. Fondanèche, O. Sanal, A. Plebani, J.-L. Stéphan, M. Hufnagel and F. le Deist (2006). "Cernunnos, a novel nonhomologous end-joining factor, is mutated in human immunodeficiency with microcephaly." Cell **124**(2): 287-299.

Buebel, M. S., C. F. Salinas, G. S. Pai, R. I. Macpherson, M. K. Greer and A. Perez-Comas (1996). "A new Seckel-like syndrome of primordial dwarfism." American journal of medical genetics **64**(3): 447-452.

Byers, P., P. Tsiouras, J. Bonadio, B. Starman and R. Schwartz (1988). "Perinatal lethal osteogenesis imperfecta (OI type II): a biochemically heterogeneous disorder usually due to new mutations in the genes for type I collagen." American journal of human genetics **42**(2): 237.

Caburet, S., P. Zavadakova, Z. Ben-Neriah, K. Bouhali, A. Dipietromaria, C. Charon, C. Besse, P. Laissue, V. Chalifa-Caspi and S. Christin-Maitre (2012). "Genome-wide linkage in a highly consanguineous pedigree reveals two novel loci on chromosome 7 for non-syndromic familial premature ovarian failure." PLoS One **7**(3): e33412.

Callier, P., L. Faivre, V. Cusin, N. Marle, C. Thauvin-Robinet, D. Sandre, T. Rousseau, P. Sagot, E. Lacombe and V. Faber (2005). "Microcephaly is not mandatory for the diagnosis of mosaic variegated aneuploidy syndrome." American Journal of Medical Genetics Part A **137**(2): 204-207.

Camacho-Hübner, J. M. W. C. (2011). "Endocrine regulation of longitudinal bone growth." Endocr Dev **21**: 30-41.

Camera, G. and P. Mastroiacovo (1981). "Birth prevalence of skeletal dysplasias in the Italian Multicentric Monitoring System for Birth Defects." Progress in clinical and biological research **104**: 441-449.

Capo-Chichi, J. M., S. K. Bharti, J. A. Sommers, T. Yammine, E. Chouery, L. Patry, G. A. Rouleau, M. E. Samuels, F. F. Hamdan and J. L. Michaud (2013). "Identification and biochemical characterization of a novel mutation in DDX11 causing Warsaw breakage syndrome." Human mutation **34**(1): 103-107.

Caron, E., S. Ghosh, Y. Matsuoka, D. Ashton-Beaucage, M. Therrien, S. Lemieux, C. Perreault, P. P. Roux and H. Kitano (2010). "A comprehensive map of the mTOR signaling network." Molecular systems biology **6**(1): 453.

Carrière, A., M. Cargnello, L.-A. Julien, H. Gao, É. Bonneil, P. Thibault and P. P. Roux (2008). "Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation." Current Biology **18**(17): 1269-1277.

Castro-Gago, M., M. Pombo, I. Novo, R. Tojo and J. Peña (1983). "Síndrome familiar de microcefalia con albinismo oculocutáneo y anomalías digitales." An Esp Pediatr **19**: 128-131.

Castro, T., H. E. Mateus, D. J. Fonseca, D. Forero, C. M. Restrepo, C. Talero, A. Vélez and P. Laissue (2013). "Sequence analysis of the ADRA2A coding region in children affected by attention deficit hyperactivity disorder." Neurological Sciences **34**(12): 2219-2222.

Castro, T., N. Ramírez, S. Ospina and H. Mateus (2010). "Probable efecto fundador de Síndrome Seckel en una población de Antioquia, Colombia." Iatreia **23**(4-5): S-38.

CERVENKA, J., H. TSUCHIYA, T. ISHIKI, M. SUZUKI and H. MORI (1979). "Seckel's dwarfism: Analysis of chromosome breakage and sister chromatid exchanges." American Journal of Diseases of Children **133**(5): 555-556.

Cizmecioglu, O., M. Arnold, R. Bahtz, F. Settele, L. Ehret, U. Haselmann-Weiß, C. Antony and I. Hoffmann (2010). "Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome." The Journal of cell biology **191**(4): 731-739.

Clark, M. J., R. Chen, H. Y. Lam, K. J. Karczewski, R. Chen, G. Euskirchen, A. J. Butte and M. Snyder (2011). "Performance comparison of exome DNA sequencing technologies." Nature biotechnology **29**(10): 908-914.

Coffin, G. S. and E. Siris (1970). "Mental retardation with absent fifth fingernail and terminal phalanx." American Journal of Diseases of Children **119**(5): 433-439.

Cohen, A., R. Mulas, M. Seri, A. Gaiero, G. Fichera, M. Marini, M. Baffico and G. Camera (2002). "Meier-Gorlin syndrome (ear–patella–short stature syndrome) in an Italian patient: Clinical evaluation and analysis of possible candidate genes." American journal of medical genetics **107**(1): 48-51.

Cohen, B., I. Temple, J. Symons, C. Hall, D. Shaw, M. Bhamra, A. Jackson and M. Pembrey (1991). "Microtia and short stature: a new syndrome." Journal of medical genetics **28**(11): 786-790.

Conlon, I. and M. Raff (1999). "Size control in animal development." Cell **96**(2): 235-244.

Cortez, D., S. Guntuku, J. Qin and S. J. Elledge (2001). "ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling." Science **294**(5547): 1713-1716.

Cox, J., A. P. Jackson, J. Bond and C. G. Woods (2006). "What primary microcephaly can tell us about brain growth." Trends in molecular medicine **12**(8): 358-366.

Cremin, B., H. Goodman, J. Spranger and P. Beighton (1982). "Wormian bones in osteogenesis imperfecta and other disorders." Skeletal radiology **8**(1): 35-38.

Crickmore, M. A. and R. S. Mann (2008). "The control of size in animals: insights from selector genes." BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **30**(9): 843.

Cunniff, C., L. E. Kratz, A. Moser, M. R. Natowicz and R. I. Kelley (1997). "Clinical and biochemical spectrum of patients with RSH/Smith-Lemli-Opitz syndrome and abnormal cholesterol metabolism." American journal of medical genetics **68**(3): 263-269.

Cusminsky, M., H. Lejarraga, R. Mercer, M. Martell and R. Feschina (1986). Manual de crecimiento y desarrollo del niño. Manual de crecimiento y desarrollo del niño, Organización Panamericana de la Salud.

Chan, K. M. and N. M. King (2005). "Dubowitz syndrome: report of a case with emphasis on the oral features." Journal of dentistry for children **72**(3): 100-103.

Chazaud, C., Y. Yamanaka, T. Pawson and J. Rossant (2006). "Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway." Developmental cell **10**(5): 615-624.

Chemaitilly, W., A. Goldenberg, G. Baujat, E. Thibaud, V. Cormier-Daire and V. Abadie (2002). "Adrenal insufficiency and abnormal genitalia in a 46XX female with Smith-Lemli-Opitz syndrome." Hormone research **59**(5): 254-256.

Chen, C. P., S. R. Chern, J. C. Shih, W. Wang, L. F. Yeh, T. Y. Chang and C. Y. Tzen (2001). "Prenatal diagnosis and genetic analysis of type I and type II thanatophoric dysplasia." Prenatal diagnosis **21**(2): 89-95.

Chen, D., A. Purohit, E. Halilovic, S. J. Doxsey and A. C. Newton (2004). "Centrosomal anchoring of protein kinase C  $\beta$ II by pericentrin controls microtubule organization, spindle function, and cytokinesis." Journal of Biological Chemistry **279**(6): 4829-4839.

Chen, L., D. Wang, Z. Wu, L. Ma and G. Q. Daley (2010). "Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis." Cell research **20**(9): 982-993.

Cheung, F., B. J. Haas, S. M. Goldberg, G. D. May, Y. Xiao and C. D. Town (2006). "Sequencing Medicago truncatula expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology." BMC genomics **7**(1): 272.

Chistiakov, D. A., N. V. Voronova and A. P. Chistiakov (2009). "Ligase IV syndrome." European journal of medical genetics **52**(6): 373-378.

Choufani, S., C. Shuman and R. Weksberg (2010). Beckwith–Wiedemann syndrome. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, Wiley Online Library.

Christoforidis, A., I. Maniadaki and R. Stanhope (2005). "Managing children with Russell-Silver syndrome: more than just growth hormone treatment?" Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism **18**(7): 651-652.

Chrzanowska, K. H., H. Gregorek, B. Dembowska-Bagińska, M. A. Kalina and M. Digweed (2012). "Nijmegen breakage syndrome (NBS)." Orphanet journal of rare diseases **7**(1): 1.

D'Angelo, V., A. M. Ceddia, L. Zelante and F. P. Florio (1998). "Multiple intracranial aneurysms in a patient with Seckel syndrome." Child's Nervous System **14**(1-2): 82-84.

Dallaire, L. and F. C. Fraser (1966). "The syndrome of retardation with urogenital and skeletal anomalies in siblings." The Journal of pediatrics **69**(3): 459-460.

Darvish, H., S. Esmaeeli-Nieh, G. Monajemi, M. Mohseni, S. Ghasemi-Firouzabadi, S. Abedini, I. Bahman, P. Jamali, S. Azimi and F. Mojahedi (2010). "A clinical and molecular genetic study of 112 Iranian families with primary microcephaly." Journal of medical genetics **47**(12): 823-828.

Dattani, M. and M. Preece (2004). "Growth hormone deficiency and related disorders: insights into causation, diagnosis, and treatment." The Lancet **363**(9425): 1977-1987.

Dauber, A., S. H. LaFranchi, Z. Maliga, J. C. Lui, J. E. Moon, C. McDeed, K. Henke, J. Zonana, G. A. Kingman and T. H. Pers (2012). "Novel microcephalic primordial dwarfism disorder associated with variants in the centrosomal protein ninein." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **97**(11): E2140-E2151.

De La Cruz, F. (1963). "Bird-headed dwarf: a case report." American journal of mental deficiency **68**: 54.

de Lange, C. (1919). "Nanosomia vera." Jahrb. f. Kinderheilk **89**.

de Munnik, S. A., L. S. Bicknell, S. Aftimos, J. Y. Al-Aama, Y. van Bever, M. B. Bober, J. Clayton-Smith, A. Y. Edrees, M. Feingold and A. Fryer (2012). "Meier–Gorlin syndrome genotype–phenotype studies: 35

individuals with pre-replication complex gene mutations and 10 without molecular diagnosis." European Journal of Human Genetics **20**(6): 598-606.

de Munnik, S. A., E. H. Hoefsloot, J. Roukema, J. Schoots, N. V. Knoers, H. G. Brunner, A. P. Jackson and E. M. Bongers (2015). "Meier-Gorlin syndrome." Orphanet journal of rare diseases **10**(1): 114.

de Munnik, S. A., B. J. Otten, J. Schoots, L. S. Bicknell, S. Aftimos, J. Y. Al-Aama, Y. van Bever, M. B. Bober, G. F. Borm and J. Clayton-Smith (2012). "Meier–Gorlin syndrome: growth and secondary sexual development of a microcephalic primordial dwarfism disorder." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(11): 2733-2742.

DeLuca, H. F. (1986). The metabolism and functions of vitamin D. Steroid Hormone Resistance, Springer: 361-375.

Delvaux, V., P. Moerman and J.-P. Fryns (1997). "Diaphragmatic hernia in the Coffin-Siris syndrome." Genetic counseling (Geneva, Switzerland) **9**(1): 45-50.

DePristo, M. A., E. Banks, R. Poplin, K. V. Garimella, J. R. Maguire, C. Hartl, A. A. Philippakis, G. Del Angel, M. A. Rivas and M. Hanna (2011). "A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data." Nature genetics **43**(5): 491-498.

Derbent, M., Y. Oncel, K. Tokel, B. Varan, A. Haberal, A. C. Yazıcı, E. Legius and N. Ozbek (2010). "Clinical and hematologic findings in Noonan syndrome patients with PTPN11 gene mutations." American Journal of Medical Genetics Part A **152**(11): 2768-2774.

Desmet, F.-O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Bérout, M. Claustres and C. Bérout (2009). "Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals." Nucleic acids research **37**(9): e67-e67.

Desviat, L. R., B. Pérez and M. Ugarte (2012). "Minigenes to confirm exon skipping mutations." Methods Mol Biol **867**: 37-47.

Dhar, S. K. and A. Dutta (2000). "Identification and characterization of the human ORC6 homolog." Journal of Biological Chemistry **275**(45): 34983-34988.

Diaz-Stransky, A. and E. Tierney (2012). Cognitive and behavioral aspects of Smith–Lemli–Opitz syndrome. American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics, Wiley Online Library.

Dictenberg, J. B., W. Zimmerman, C. A. Sparks, A. Young, C. Vidair, Y. Zheng, W. Carrington, F. S. Fay and S. J. Doxsey (1998). "Pericentrin and  $\gamma$ -tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome." The Journal of cell biology **141**(1): 163-174.

Diggie, C. P., D. A. Parry, C. V. Logan, P. Laissue, C. Rivera, C. M. Restrepo, D. J. Fonseca, J. E. Morgan, Y. Allanore and M. Fontenay (2012). "Prostaglandin transporter mutations cause pachydermoperiostosis with myelofibrosis." Human mutation **33**(8): 1175-1181.

Dimitri, P. and N. Bishop (2007). "Rickets." Paediatrics and Child Health **17**(7): 279-287.

Distel, L., S. Neubauer, R. Varon, W. Holter and G. Grabenbauer (2003). "Fatal toxicity following radio- and chemotherapy of medulloblastoma in a child with unrecognized Nijmegen Breakage Syndrome." Medical and pediatric oncology **41**(1): 44-48.

Diviani, D., L. K. Langeberg, S. J. Doxsey and J. D. Scott (2000). "Pericentrin anchors protein kinase A at the centrosome through a newly identified RII-binding domain." Current Biology **10**(7): 417-420.

Dong, J., G. Feldmann, J. Huang, S. Wu, N. Zhang, S. A. Comerford, M. F. Gayyed, R. A. Anders, A. Maitra and D. Pan (2007). "Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals." Cell **130**(6): 1120-1133.

Donnelly, D. E., V. McConnell, A. Paterson and P. J. Morrison (2010). "The prevalence of thanatophoric dysplasia and lethal osteogenesis imperfecta type II in Northern Ireland-a complete population study." The Ulster medical journal **79**(3): 114.

Doxsey, S. J., P. Stein, L. Evans, P. D. Calarco and M. Kirschner (1994). "Pericentrin, a highly conserved centrosome protein involved in microtubule organization." Cell **76**(4): 639-650.

Dressman, D., H. Yan, G. Traverso, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (2003). "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(15): 8817-8822.

Drimmer, F. (1973). Very special people: The struggles, loves, and triumphs of human oddities, Amjon Publishers.

Ducat, A., L. Doridot, R. Calicchio, C. Méhats, J.-L. Vilotte, J. Castille, S. Barbaux, B. Couderc, S. Jacques and F. Letourneur (2016). "Endothelial cell dysfunction and cardiac hypertrophy in the STOX1 model of preeclampsia." Scientific reports **6**.

Dudkiewicz, M. and M. Tanzer (2004). "Total knee arthroplasty in Meier-Gorlin syndrome." The Journal of arthroplasty **19**(7): 931-934.

Dvorkin, C., M. A. Dvorkin and D. P. Cardinali (2010). Best & Taylor. Bases Fisiológicas de la Práctica Médica, Ed. Médica Panamericana.

Dzhindzhev, N. S., D. Y. Quan, K. Weiskopf, G. Tzolovsky, I. Cunha-Ferreira, M. Riparbelli, A. Rodrigues-Martins, M. Bettencourt-Dias, G. Callaini and D. M. Glover (2010). "Asterless is a scaffold for the onset of centriole assembly." Nature **467**(7316): 714-718.

Eakin, G. S. and R. R. Behringer (2003). "Tetraploid development in the mouse." Developmental Dynamics **228**(4): 751-766.

Eason, J., C. Hall and J. Trounce (1995). "Renal tubular leakage complicating microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism." Journal of medical genetics **32**(3): 234-235.

Econs, M. J. and P. T. McEnery (1997). "Autosomal dominant hypophosphatemic rickets/osteomalacia: clinical characterization of a novel renal phosphate-wasting disorder." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **82**(2): 674-681.

Edery, P., C. Marcaillou, M. Sahbatou, A. Labalme, J. Chastang, R. Touraine, E. Tubacher, F. Senni, M. B. Bober and S. Nampoothiri (2011). "Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA." Science **332**(6026): 240-243.

Edwards, R. A., B. Rodriguez-Brito, L. Wegley, M. Haynes, M. Breitbart, D. M. Peterson, M. O. Saar, S. Alexander, E. C. Alexander and F. Rohwer (2006). "Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology." BMC genomics **7**(1): 57.

Epstein, C. J., R. P. Erickson and A. J. Wynshaw-Boris (2004). Inborn errors of development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis, Oxford University Press.

Eroglu, Y., M. Nguyen-Driver, K. Freeman, L. Merkens, M. Merkens, J. Rouillet, E. Elias, G. Sarphare, F. Porter and E. Tierney (2011). Smith-Lemli-Opitz syndrome with normal IQ. Pediatric Academic Societies and Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting.

Eynard, A. R., M. A. Valentich and R. A. Rovasio (2008). Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares, Ed. Médica Panamericana.

Faivre, L., M. Le Merrer, S. Lyonnet, H. Plauchu, N. Dagoneau, A. Campos-Xavier, J. Attia-Sobol, A. Verloes, A. Munnich and V. Cormier-Daire (2002). "Clinical and genetic heterogeneity of Seckel syndrome." American journal of medical genetics **112**(4): 379-383.

Fan, Y., T. Newman, E. Linardopoulou and B. J. Trask (2002). "Gene content and function of the ancestral chromosome fusion site in human chromosome 2q13–2q14. 1 and paralogous regions." Genome research **12**(11): 1663-1672.

Fankhauser, G. (1952). "Nucleo-cytoplasmic relations in amphibian development." International Review of Cytology **1**: 165-193.

Faqeih, E., N. Sakati and A. S. Teebi (2005). "Meier-Gorlin (ear-patella-short stature) syndrome: Growth hormone deficiency and previously unrecognized findings." American Journal of Medical Genetics Part A **137**(3): 339-341.

Faraone, S. V., J. Biederman, C. P. Morley and T. J. Spencer (2008). "Effect of stimulants on height and weight: a review of the literature." Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry **47**(9): 994-1009.

Feingold, M. (2002). "Meier-Gorlin syndrome." American journal of medical genetics **109**(4): 338-338.

Ferrández, A., J. Labarta, M. Calvo, E. Mayayo, B. Puga, E. Cáncer and M. Pombo (2002). "Síndrome de Turner." Pombo M. Tratado de Endocrinología Pediátrica. 3a ed, Madrid: McGraw-Hill Interamericana: 780-803.

Ferreira, A., A. Matias, O. Brandão and N. Montenegro (2004). "Nuchal translucency and ductus venosus blood flow as early sonographic markers of thanatophoric dysplasia." Fetal diagnosis and therapy **19**(3): 241-245.

Fitch, N., L. Pinsky and R. C. Lachance (1970). "A form of bird-headed dwarfism with features of premature senility." American Journal of Diseases of Children **120**(3): 260-264.

Fitzky, B. U., M. Witsch-Baumgartner, M. Erdel, J. N. Lee, Y.-K. Paik, H. Glossmann, G. Utermann and F. F. Moebius (1998). "Mutations in the  $\Delta 7$ -sterol reductase gene in patients with the Smith–Lemli–Opitz syndrome." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(14): 8181-8186.

Flanagan, S. E., A.-M. Patch and S. Ellard (2010). "Using SIFT and PolyPhen to predict loss-of-function and gain-of-function mutations." Genetic testing and molecular biomarkers **14**(4): 533-537.

Fleck, B. J., A. Pandya, L. Vanner, K. Kerkering and J. Bodurtha (2001). "Coffin-Siris syndrome: Review and presentation of new cases from a questionnaire study." American journal of medical genetics **99**(1): 1-7.

Flejter, W. L., B. Issa, B. A. Sullivan, J. C. Carey and A. R. Brothman (1998). "Variegated aneuploidy in two siblings: Phenotype, genotype, CENP-E analysis, and literature review." American journal of medical genetics **75**(1): 45-51.

Flory, M. R., M. J. Moser, R. J. Monnat and T. N. Davis (2000). "Identification of a human centrosomal calmodulin-binding protein that shares homology with pericentrin." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(11): 5919-5923.

Fonseca, D., R. Rojas, J. Vergara, X. Rios, C. Uribe, L. Chavez, F. Velandia, C. Vargas, C. Restrepo and P. Laissue (2013). "A severe familial phenotype of Ichthyosis Curth–Macklin caused by a novel mutation in the KRT1 gene." British Journal of Dermatology **168**(2): 456-458.

Fonseca, D. J., E. Garzón, B. Lakhal, R. Braham, D. Ojeda, H. Elghezal, A. Saâd, C. M. Restrepo and P. Laissue (2012). "Screening for mutations of the FOXO4 gene in premature ovarian failure patients." Reproductive biomedicine online **24**(3): 339-341.

Fonseca, D. J., D. Ojeda, B. Lakhal, R. Braham, S. Eggers, E. Turbitt, S. White, S. Grover, G. Warne and M. Zacharin (2012). "CITED2 mutations potentially cause idiopathic premature ovarian failure." Translational Research **160**(5): 384-388.

Fonseca, D. J., O. Ortega-Recalde, C. Esteban-Perez, H. Moreno-Ortiz, L. C. Patiño, O. M. Bermúdez, A. M. Ortiz, C. M. Restrepo, E. Lucena and P. Laissue (2014). "BMP15 c.-9C> G promoter sequence variant may contribute to the cause of non-syndromic premature ovarian failure." Reproductive biomedicine online **29**(5): 627-633.

Fonseca, D. J., L. C. Patiño, Y. C. Suárez, A. de Jesús Rodríguez, H. E. Mateus, K. M. Jiménez, O. Ortega-Recalde, I. Díaz-Yamal and P. Laissue (2015). "Next generation sequencing in women affected by nonsyndromic premature ovarian failure displays new potential causative genes and mutations." Fertility and sterility **104**(1): 154-162. e152.

Fonseca, D. J., C. F. Prada, L. M. Siza, D. Angel, Y. M. Gomez, C. M. Restrepo, H. Douben, F. Rivadeneira, A. de Klein and P. Laissue (2012). "A de novo 14q12q13. 3 interstitial deletion in a patient affected by a severe neurodevelopmental disorder of unknown origin." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(3): 689-693.

Forero, D. A., A. Wonkam, W. Wang, P. Laissue, C. López-Correa, J. C. Fernández-López, R. Mugasimangalam and G. Perry (2016). "Current needs for human and medical genomics research infrastructure in low and middle income countries." Journal of medical genetics: jmedgenet-2015-103631.

Fowler, E. S., L. P. Glinski, C. A. Reiser, V. K. Horton and R. M. Pauli (1997). "Biophysical bases for delayed and aberrant motor development in young children with achondroplasia." Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics **18**(3): 143-150.

Frankenne, F., J. Closset, F. Gomez, M.-L. Scippo, J. Smal and G. Hennen (1988). "The Physiology of Growth Hormones (GHs) in Pregnant Women and Partial Characterization of the Placental GH Variant\*." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **66**(6): 1171-1180.

Friede, R. L. (1989). Disturbances in bulk growth: megalencephaly, micrencephaly, atelencephaly and others. Developmental neuropathology, Springer: 296-308.

Frijns, J. and H. van den Berghe (1976). "Familial bird headed dwarfism." Acta Paediatr Belg **29**: 121-122.

Fryns, J.-P. (1998). "Meier-Gorlin syndrome: the adult phenotype." Clinical dysmorphology **7**(3): 231-232.

Fukuzawa, R., S. Sato, M. J. Sullivan, G. Nishimura, T. Hasegawa and N. Matsuo (2002). "Autopsy case of microcephalic osteodysplastic primordial "dwarfism" type II." American journal of medical genetics **113**(1): 93-96.

Galasso, C., A. Lo-Castro, C. Lalli, C. Cerminara and P. Curatolo (2008). "Neurologic aspects of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II." Pediatric neurology **38**(6): 435-438.

Ganong, W. F. (2001). "Hormonal control of calcium metabolism and the physiology of bone." Review of medical physiology: 369-382.

Ganong, W. F. and K. E. Barrett (2005). Review of medical physiology, McGraw-Hill Medical ^ eNew York New York.

Gao, F.-B. and M. Raff (1997). "Cell size control and a cell-intrinsic maturation program in proliferating oligodendrocyte precursor cells." The Journal of cell biology **138**(6): 1367-1377.

Gasperowicz, M. and D. R. Natale (2011). "Establishing three blastocyst lineages—then what?" Biology of reproduction **84**(4): 621-630.

Gellis, S. S. and M. Feingold (1967). "Picture of the Month." American journal of diseases of children **113**(1): 177-NP.

Gezirici, A., E. Yosunkaya, A. Paydas, M. Seven and A. Yuksel (2010). "Expanding the phenotypical spectrum of Meier–Gorlin syndrome with novel findings: Multiple hypopigmented skin lesions and sacral dimple." Clin Genet **78**(Suppl 1): 29.

Gilbert, S. F. and D. Epel (2009). Ecological developmental biology: integrating epigenetics, medicine, and evolution, Sinauer Associates Sunderland.

Gilissen, C., A. Hoischen, H. G. Brunner and J. A. Veltman (2012). "Disease gene identification strategies for exome sequencing." European Journal of Human Genetics **20**(5): 490-497.

Gillingham, A. K. and S. Munro (2000). "The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin." EMBO reports **1**(6): 524-529.

Goldblatt, J., P. Carman and P. Sprague (1991). "Unique dwarfing, spondylometaphyseal skeletal dysplasia, with joint laxity and dentinogenesis imperfecta." American journal of medical genetics **39**(2): 170-172.

Gómez, S. O., V. S. Padilla, G. A. Lain, M. A. L. Vilchez and M. B. Alcaina (2014). "Una causa de talla baja de inicio prenatal A prenatal cause of short stature." Rev Esp Endocrinol Pediatr **5**(2): 65-72.

Goodship, J., H. Gill, J. Carter, A. Jackson, M. Splitt and M. Wright (2000). "Autozygosity mapping of a seckel syndrome locus to chromosome 3q22. 1-q24." The American Journal of Human Genetics **67**(2): 498-503.

Gorlin, R. J., J. Cervenka, K. Moller, M. Horrobin and C. Witkop Jr (1974). "Malformation syndromes. A selected miscellany." Birth defects original article series **11**(2): 39-50.

Graham, J. M. (2007). Smith's recognizable patterns of human deformation, Elsevier Health Sciences.

Graham, J. M. and D. Rimoin (1997). "Abnormal body size and proportion." Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, eds. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone: 737-752.

Gratacós, E. (2007). Medicina fetal, Ed. Médica Panamericana.

Gravholt, C. H., S. Juul, R. W. Naeraa and J. Hansen (1998). "Morbidity in Turner syndrome." Journal of clinical epidemiology **51**(2): 147-158.

Greenhaw, G., A. Hebert, M. Duke-Woodside, I. Butler, J. Hecht, J. Cleaver, G. Thomas and W. Horton (1992). "Xeroderma pigmentosum and Cockayne syndrome: overlapping clinical and biochemical phenotypes." American journal of human genetics **50**(4): 677.

Griffith, E., S. Walker, C.-A. Martin, P. Vagnarelli, T. Stiff, B. Vernay, N. Al Sanna, A. Saggar, B. Hamel and W. C. Earnshaw (2008). "Mutations in pericentrin cause Seckel syndrome with defective ATR-dependent DNA damage signaling." Nature genetics **40**(2): 232-236.

Grigelioniene, G., S. Geiberger, N. Papadogiannakis, O. Mäkitie, G. Nishimura, A. Nordgren and P. Conner (2013). "The phenotype range of achondrogenesis 1A." American Journal of Medical Genetics Part A **161**(10): 2554-2558.

Guernsey, D. L., M. Matsuoka, H. Jiang, S. Evans, C. Macgillivray, M. Nightingale, S. Perry, M. Ferguson, M. LeBlanc and J. Paquette (2011). "Mutations in origin recognition complex gene ORC4 cause Meier-Gorlin syndrome." Nature genetics **43**(4): 360-364.

Gul, A., M. Tariq, M. N. Khan, M. J. Hassan, G. Ali and W. Ahmad (2007). "Novel protein-truncating mutations in the ASPM gene in families with autosomal recessive primary microcephaly." Journal of neurogenetics **21**(3): 153-163.

Haan, E., M. Furness, S. Knowles, L. Morris, G. Scott, J. Svigos and R. Vigneswaren (1989).

"Osteodysplastic primordial dwarfism: report of a further case with manifestations similar to those of types I and III." American journal of medical genetics **33**(2): 224-227.

Halder, A., J. Pahi, A. K. Sharma, V. Bhatia, R. Phadke, R. Gujral and S. Agarwal (1998). "Brief Clinical Report: Osteodysplastic Primordial Dwarfism Type II With Normal Intellect but Delayed Central Nervous System Myelination." American journal of medical genetics **80**: 12-15.

Hall, J. E. (2011). Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica, Elsevier Health Sciences.

Hall, J. G., C. Flora, C. I. Scott, R. M. Pauli and K. I. Tanaka (2004). "Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): natural history and clinical findings." American Journal of Medical Genetics Part A **130**(1): 55-72.

Hammer, B., M. Strickert and T. Villmann (2005). Prototype based recognition of splice sites.

Bioinformatics using computational intelligence paradigms, Springer: 25-55.

Hamosh, A., A. F. Scott, J. S. Amberger, C. A. Bocchini and V. A. McKusick (2005). "Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders." Nucleic acids research **33**(suppl 1): D514-D517.

Hanks, S., K. Coleman, S. Reid, A. Plaja, H. Firth, D. FitzPatrick, A. Kidd, K. Méhes, R. Nash and N. Robin (2004). "Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B." Nature genetics **36**(11): 1159-1161.

Harper, R. G., E. Orti and R. K. Baker (1967). "Bird-headed dwarfs (Seckel's syndrome): A familial pattern of developmental, dental, skeletal, genital, and central nervous system anomalies." The Journal of pediatrics **70**(5): 799-804.

Hartwell, L. H., J. Culotti, J. R. Pringle and B. J. Reid (1974). "Genetic control of the cell division cycle in yeast." Science **183**(4120): 46-51.

Haspolat, K., A. Ece, F. Gürkan, Y. Atamer, M. Tutanç and İ. Yolbaş (2007). "Relationships between leptin, insulin, IGF-1 and IGFBP-3 in children with energy malnutrition." Clinical biochemistry **40**(3): 201-205.

Hästbacka, J., A. de la Chapelle, M. M. Mahtani, G. Clines, M. P. Reeve-Daly, M. Daly, B. A. Hamilton, K. Kusumi, B. Trivedi and A. Weaver (1994). "The diastrophic dysplasia gene encodes a novel sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping." Cell **78**(6): 1073-1087.

Hayani, A., C. R. Suarez, Z. Molnar, M. LeBeau and J. Godwin (1994). "Acute myeloid leukaemia in a patient with Seckel syndrome." Journal of medical genetics **31**(2): 148-149.

Hayes, M., G. Parker, J. Ell and D. Sillence (1999). "Basilar impression complicating osteogenesis imperfecta type IV: the clinical and neuroradiological findings in four cases." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry **66**(3): 357-364.

He, H., S. Liyanarachchi, K. Akagi, R. Nagy, J. Li, R. C. Dietrich, W. Li, N. Sebastian, B. Wen and B. Xin (2011). "Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I." Science **332**(6026): 238-240.

Heallen, T., M. Zhang, J. Wang, M. Bonilla-Claudio, E. Klysik, R. L. Johnson and J. F. Martin (2011). "Hippo pathway inhibits Wnt signaling to restrain cardiomyocyte proliferation and heart size." Science **332**(6028): 458-461.

Hecht, J. T., C. Francomano, W. Horton and J. Annegers (1987). "Mortality in achondroplasia." American journal of human genetics **41**(3): 454.

Hecht, J. T., O. J. Hood, R. J. Schwartz, J. C. Hennessey, B. A. Bernhardt, W. A. Horton, J. M. Opitz and J. F. Reynolds (1988). "Obesity in achondroplasia." American journal of medical genetics **31**(3): 597-602.

Heinisch, H. (1967). "[On the differential diagnosis of bird's head dwarfism and Rubinstein-Taybi syndrome]." Der Radiologe **7**(12): 387-390.

Hemerly, A. S., S. G. Prasanth, K. Siddiqui and B. Stillman (2009). "Orc1 controls centriole and centrosome copy number in human cells." Science **323**(5915): 789-793.

Hennekam, R., J. B. Bijlsma, J. Spranger and G. Neri (1987). "Further delineation of the 3-M syndrome with review of the literature." American journal of medical genetics **28**(1): 195-209.

Hennekam, R. C. (2009). Gorlin's Syndromes of the Head and Neck, Oxford University Press USA.

Henning, K. A., L. Li, N. Iyer, L. D. McDaniel, M. S. Reagan, R. Legerski, R. A. Schultz, M. Stefanini, A. R. Lehmann and L. V. Mayne (1995). "The Cockayne syndrome group A gene encodes a WD repeat protein that interacts with CSB protein and a subunit of RNA polymerase II TFIIH." Cell **82**(4): 555-564.

Herman, T., N. Mendelsohn, S. B. Dowton and W. McAlister (1991). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism, type II." Pediatric radiology **21**(8): 602-604.

Hersh, J., M. Joyce, J. Spranger, E. Goatley, R. Lachman, S. Bhatt and D. Rimoin (1994). "Microcephalic osteodysplastic dysplasia." American journal of medical genetics **51**(3): 194-199.

Hert, D. G., C. P. Fredlake and A. E. Barron (2008). "Advantages and limitations of next-generation sequencing technologies: A comparison of electrophoresis and non-electrophoresis methods." Electrophoresis **29**(23): 4618-4626.

Heselson, N., B. Cremin and P. Beighton (1979). "The radiographic manifestations of hypochondroplasia." Clinical radiology **30**(1): 79-85.

Heuertz, S., M. Le Merrer, B. Zabel, M. Wright, L. Legeai-Mallet, V. Cormier-Daire, L. Gibbs and J. Bonaventure (2006). "Novel FGFR3 mutations creating cysteine residues in the extracellular domain of the receptor cause achondroplasia or severe forms of hypochondroplasia." European journal of human genetics **14**(12): 1240-1247.

Hiel, J., C. Weemaes, B. van Engelen, D. Smeets, M. Ligtenberg, I. van Der Burgt, L. van den Heuvel, K. Cerosaletti, F. Gabreëls and P. Concannon (2001). "Nijmegen breakage syndrome in a Dutch patient not resulting from a defect in NBS1." Journal of medical genetics **38**(6): e19-e19.

Higgins, J., C. Midgley, A.-M. Bergh, S. M. Bell, J. M. Askham, E. Roberts, R. K. Binns, S. M. Sharif, C. Bennett and D. M. Glover (2010). "Human ASPM participates in spindle organisation, spindle orientation and cytokinesis." BMC cell biology **11**(1): 1.

Hill, M. A. (2001). "Unsw embryology." UNSW Embryology.

Hirt, H., J. Kimelman, M. J. Birnbaum, E. Y. Chen, P. H. Seeburg, N. L. Eberhardt and A. Barta (1987). "The human growth hormone gene locus: structure, evolution, and allelic variations." Dna **6**(1): 59-70.

Hong, Y.-R., C.-H. Chen, M.-H. Chuo, S.-Y. Liou and S.-L. Howng (2000). "Genomic organization and molecular characterization of the human ninein gene." Biochemical and biophysical research communications **279**(3): 989-995.

Horton, W. A., J. G. Hall, C. I. Scott, R. E. Pyeritz and D. L. Rimoin (1982). "Growth curves for height for diastrophic dysplasia, spondyloepiphyseal dysplasia congenita, and pseudoachondroplasia." American Journal of Diseases of Children **136**(4): 316-319.

Hortop, J., P. Tsipouras, J. Hanley, B. Maron and J. Shapiro (1986). "Cardiovascular involvement in osteogenesis imperfecta." Circulation **73**(1): 54-61.

Hossain, M. and B. Stillman (2012). "Meier-Gorlin syndrome mutations disrupt an Orc1 CDK inhibitory domain and cause centrosome reduplication." Genes & development **26**(16): 1797-1810.

Huang-Doran, I., L. S. Bicknell, F. M. Finucane, N. Rocha, K. M. Porter, Y. L. Tung, F. Szekeres, A. Krook, J. J. Nolan and M. O'Driscoll (2011). "Genetic defects in human pericentrin are associated with severe insulin resistance and diabetes." Diabetes **60**(3): 925-935.

Huber, C., A.-L. Delezoide, F. Guimiot, C. Baumann, V. Malan, M. Le Merrer, D. B. Da Silva, D. Bonneau, P. Chatelain and C. Chu (2009). "A large-scale mutation search reveals genetic heterogeneity in 3M syndrome." European Journal of Human Genetics **17**(3): 395-400.

Huber, R. S., D. Houlihan and K. Filter (2011). "Dubowitz syndrome: a review and implications for cognitive, behavioral, and psychological features." Journal of clinical medicine research **3**(4): 147.

Hulse, T., J. Lin and M. Irving (2012). Hypochondroplasia with hippocampal dysgenesis and neonatal onset of medial temporal lobe epilepsy. Poster. Leipzig, Germany: 51 st Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology.

Hung, L.-Y., C.-J. C. Tang and T. K. Tang (2000). "Protein 4.1 R-135 interacts with a novel centrosomal protein (CPAP) which is associated with the  $\gamma$ -tubulin complex." Molecular and cellular biology **20**(20): 7813-7825.

Hurst, J., R. Winter, M. Baraitser, J. M. Optiz and J. F. Reynolds (1988). "Distinctive syndrome of short stature, craniosynostosis, skeletal changes, and malformed ears." American journal of medical genetics **29**(1): 107-115.

Ilyina, H. G. and I. W. Lurie (1990). "Dubowitz syndrome: possible evidence for a clinical subtype." American journal of medical genetics **35**(4): 561-565.

Jacquemont, S., M. Bocéno, J. M. Rival, F. Méchinaud and A. David (2002). "High risk of malignancy in mosaic variegated aneuploidy syndrome." American journal of medical genetics **109**(1): 17-21.

Jafarifar, F., R. C. Dietrich, J. M. Hiznay and R. A. Padgett (2014). "Biochemical defects in minor spliceosome function in the developmental disorder MOPD I." rna **20**(7): 1078-1089.

Jeanty, P. and G. Valero "La valoración del feto con displasia esquelética."

Jian, X., E. Boerwinkle and X. Liu (2013). "In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users." Genetics in Medicine **16**(7): 497-503.

Johnston, G., J. Pringle and L. Hartwell (1977). "Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Experimental cell research **105**(1): 79-98.

Jones, K. L., M. C. Jones and M. Del Campo (2013). Smith's recognizable patterns of human malformation, Elsevier Health Sciences.

Jongmans, M. C., I. Van Der Burgt, P. M. Hoogerbrugge, K. Noordam, H. G. Yntema, W. M. Nillesen, R. P. Kuiper, M. J. Ligtenberg, A. G. Van Kessel and J. H. J. van Krieken (2011). "Cancer risk in patients with Noonan syndrome carrying a PTPN11 mutation." European Journal of Human Genetics **19**(8): 870-874.

Jorgensen, P. and M. Tyers (2004). "How cells coordinate growth and division." Current Biology **14**(23): R1014-R1027.

Juric-Sekhar, G., R. P. Kapur, I. A. Glass, M. L. Murray, S. E. Parnell and R. F. Hevner (2011). "Neuronal migration disorders in microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I/III." Acta neuropathologica **121**(4): 545-554.

Kalay, E., G. Yigit, Y. Aslan, K. E. Brown, E. Pohl, L. S. Bicknell, H. Kayserili, Y. Li, B. Tüysüz and G. Nürnberg (2011). "CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome." Nature genetics **43**(1): 23-26.

Kantaputra, P., P. Tanpaiboon, T. Porntaveetus, A. Ohazama, P. Sharpe, A. Rauch, A. Hussadaloy and C. T. Thiel (2011). "The smallest teeth in the world are caused by mutations in the PCNT gene." American Journal of Medical Genetics Part A **155**(6): 1398-1403.

Kapur, R. P. (2007). "Achondrogenesis." Pediatric and Developmental Pathology **10**(4): 253-255.

Karczeski, B. and G. R. Cutting (2013). "Thanatophoric dysplasia."

Katoh, M. (2007). "Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis." Stem cell reviews **3**(1): 30-38.

Katyal, S. and P. J. McKinnon (2007). "DNA repair deficiency and neurodegeneration." Cell Cycle **6**(19): 2360-2365.

Kelberman, D., K. Rizzoti, R. Lovell-Badge, I. C. Robinson and M. T. Dattani (2009). "Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse." Endocrine reviews **30**(7): 790-829.

Kelley, R. I. and R. C. Hennekam (2000). "The smith-lemlie-opitz syndrome." Journal of Medical Genetics **37**(5): 321-335.

Kepler-Noreuil, K. M., M. P. Adam, J. Welch, A. Muilenburg and M. C. Willing (2011). "Clinical insights gained from eight new cases and review of reported cases with Jeune syndrome (asphyxiating thoracic dystrophy)." American Journal of Medical Genetics Part A **155**(5): 1021-1032.

Khalil, A., E. Pajkrt and L. S. Chitty (2011). "Early prenatal diagnosis of skeletal anomalies." Prenatal diagnosis **31**(1): 115-124.

Khaykin, P., P. Kotzerke, C. Stephan, G. Nisius, M. Bickel, A. Haberl, M. Sturmer, M. Kurowski, R. Brodt and N. von Hentig (2014). "Lopinavir/ritonavir pharmacokinetics, efficacy, and safety in HIV and hepatitis B or C coinfecting adults without symptoms of hepatic impairment." Ther Drug Monit **36**(2): 192-201.

Klein, C., I. R. König and K. Lohmann (2012). "Exome sequencing for gene discovery: time to set standard criteria." Annals of neurology **72**(4): 627-628.

Kline, A. D., I. D. Krantz, A. Sommer, M. Kliewer, L. G. Jackson, D. R. FitzPatrick, A. V. Levin and A. Selicorni (2007). "Cornelia de Lange syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance." American journal of medical genetics part A **143**(12): 1287-1296.

Klinge, L., J. Schaper, D. Wiczorek and T. Voit (2002). "Microlissencephaly in microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism: a case report and review of the literature." Neuropediatrics **33**(6): 309-313.

Klingseisen, A. and A. P. Jackson (2011). "Mechanisms and pathways of growth failure in primordial dwarfism." Genes & development **25**(19).

Kogut, M. and J. Sensenbrenner (1974). "Low birthweight syndrome in two brothers." Birth defects original article series **11**(2): 450-452.

Kozłowski, K. and K. Bartkowiak (1965). "Hypochondroplasia." Pediatrics polska **40**: 379.

Kozłowski, K., T. Donovan, J. Masel and R. Wright (1993). "Microcephalic, osteodysplastic, primordial dwarfism." Australasian radiology **37**(1): 111-114.

Krajewska-Walasek, M., W. Gradowska, J. Ryzko, P. Socha, J. Chmielik, W. Szapłyko, J. Kasprzyk, B. Górski, M. Szreter and J. Wolski (1999). "Further delineation of the classical Smith-Lemli-Opitz syndrome phenotype at different patient ages: clinical and biochemical studies." Clinical dysmorphology **8**(1): 29-40.

Krämer, A., N. Mailand, C. Lukas, R. G. Syljuåsen, C. J. Wilkinson, E. A. Nigg, J. Bartek and J. Lukas (2004). "Centrosome-associated Chk1 prevents premature activation of cyclin-B-Cdk1 kinase." Nature cell biology **6**(9): 884-891.

Kumar, A., S. Blanton, M. Babu, M. Markandaya and S. Girimaji (2004). "Genetic analysis of primary microcephaly in Indian families: novel ASPM mutations." Clinical genetics **66**(4): 341-348.

Kuo, A. J., J. Song, P. Cheung, S. Ishibe-Murakami, S. Yamazoe, J. K. Chen, D. J. Patel and O. Gozani (2012). "The BAH domain of ORC1 links H4K20me2 to DNA replication licensing and Meier-Gorlin syndrome." Nature **484**(7392): 115-119.

L'hôte, D., P. Laissue, C. Serres, X. Montagutelli, R. A. Veitia and D. Vaiman (2010). "Interspecific resources: a major tool for quantitative trait locus cloning and speciation research." Bioessays **32**(2): 132-142.

Labarta, J., A. Ferrandez, M. Sanjuan, E. Cancer and E. Mayayo (1994). "20. Síndrome de Turner: Talla final espontánea y tras diferentes tratamientos." Anales Espanoles de Pediatria-Suplemento(58): 75.

Lahiri, S. and N. Davies (2003). "Cockayne's Syndrome: case report of a successful pregnancy." BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology **110**(9): 871-872.

Laissue, P. (2015). "Aetiological coding sequence variants in non-syndromic premature ovarian failure: From genetic linkage analysis to next generation sequencing." Molecular and cellular endocrinology **411**: 243-257.

Laissue, P., G. Burgio, D. l'Hote, G. Renault, C. Marchiol-Fournigault, D. Fradelizi, M. Fellous, C. Serres, X. Montagutelli and P. Monget (2009). "Identification of Quantitative Trait Loci responsible for embryonic

lethality in mice assessed by ultrasonography." International Journal of Developmental Biology **53**(4): 623-629.

Laissue, P., S. Copelli, I. Bergada, C. Bergada, G. Barrio, S. Karaboga, J. M. Wurtz, M. Fellous, E. Lalli and R. A. Veitia (2006). "Partial defects in transcriptional activity of two novel DAX-1 mutations in childhood-onset adrenal hypoplasia congenita." Clinical endocrinology **65**(5): 681-686.

Laissue, P., D. L'hôte, C. Serres and D. Vaiman (2009). "Mouse models for identifying genes modulating fertility parameters." animal **3**(01): 55-71.

Laissue, P., B. Lakhal, B. A. Benayoun, A. Dipietromaria, R. Braham, H. Elghezal, P. Philibert, A. Saâd, C. Sultan and M. Fellous (2009). "Functional evidence implicating FOXL2 in non-syndromic premature ovarian failure and in the regulation of the transcription factor OSR2." Journal of medical genetics **46**(7): 455-457.

Laissue, P., B. Lakhal, M. Vatin, F. Batista, G. Burgio, E. Mercier, E. Dos Santos, C. Buffat, D. C. Sierra-Diaz and G. Renault (2016). "Association of FOXD1 variants with adverse pregnancy outcomes in mice and humans." Open Biology **6**(10): 160109.

Laissue, P., G. Vinci, R. A. Veitia and M. Fellous (2008). "Recent advances in the study of genes involved in non-syndromic premature ovarian failure." Molecular and cellular endocrinology **282**(1): 101-111.

Lakhal, B., P. Laissue, R. Braham, H. Elghezal, A. Saâd, M. Fellous and R. A. Veitia (2009). "A novel BMP15 variant, potentially affecting the signal peptide, in a familial case of premature ovarian failure." Clinical endocrinology **71**(5): 752-753.

Lakhal, B., P. Laissue, R. Braham, H. Elghezal, A. Saâd, M. Fellous and R. A. Veitia (2010). "BMP15 and premature ovarian failure: causal mutations, variants, polymorphisms?" Clinical endocrinology **72**(3): 425-426.

Lakhal, B., P. Laissue, H. Elghezal and M. Fellous (2008). "Genetic analysis of premature ovarian failure: role of forkhead and TGF-beta genes." Gynecologie, obstetrique & fertilité **36**(9): 862-871.

Lambotte, C., G. Dony and F. Bonnet (1975). "Seckel syndrome: bird-headed dwarfism." Acta paediatrica Belgica **29**(2): 79-82.

Lampl, M., J. D. Veldhuis and M. L. Johnson (1992). "Saltation and stasis: a model of human growth." Science **258**(5083): 801-803.

Langer, L. O., P. A. Baumann and R. J. Gorlin (1968). "Achondroplasia Clinical Radiologic Features with Comment on Genetic Implications." Clinical pediatrics **7**(8): 474-485.

Langman, J. and J. Leland (1975). Medical embryology: human development, normal and abnormal, Williams & Wilkins Baltimore.

Laron, Z. (2001). "Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone." Molecular Pathology **54**(5): 311.

Lee, D., S. Portnoy, P. Hill, C. Gillberg and M. Patton (2005). "Psychological profile of children with Noonan syndrome." Developmental Medicine & Child Neurology **47**(1): 35-38.

Lee, R. W., S. K. Conley, A. Gropman, F. D. Porter and E. H. Baker (2013). "Brain magnetic resonance imaging findings in smith–lemlı–opitz syndrome." American Journal of Medical Genetics Part A **161**(10): 2407-2419.

Leevers, S. J. and H. McNeill (2005). "Controlling the size of organs and organisms." Current opinion in cell biology **17**(6): 604-609.

Lemyre, E., E. M. Azouz, A. S. Teebi, P. Glanc and M.-F. Chen (1999). "Bone dysplasia series. Achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia: review and update." Canadian Association of Radiologists journal= Journal l'Association canadienne des radiologistes **50**(3): 185-197.

Leutenegger, A.-L., A. Labalme, E. Génin, A. Toutain, E. Steichen, F. Clerget-Darpoux and P. Edery (2006). "Using genomic inbreeding coefficient estimates for homozygosity mapping of rare recessive traits: application to Taybi-Linder syndrome." The American journal of human genetics **79**(1): 62-66.

Levine, A. and R. Durbin (2001). "A computational scan for U12-dependent introns in the human genome sequence." Nucleic Acids Research **29**(19): 4006-4013.

Lewis, T. S., P. S. Shapiro and N. G. Ahn (1998). "Signal transduction through MAP kinase cascades." Advances in cancer research **74**: 49-114.

Li, Q., D. Hansen, A. Killilea, H. C. Joshi, R. Palazzo and R. Balczon (2001). "Kendrin/pericentrin-B, a centrosome protein with homology to pericentrin that complexes with PCM-1." Journal of cell science **114**(4): 797-809.

Li, Y., T. Li, T. Kahveci and J. Fortes (2005). Workload characterization of bioinformatics applications. Modeling, Analysis, and Simulation of Computer and Telecommunication Systems, 2005. 13th IEEE International Symposium on, IEEE.

Lim, K. and H. Wong (1973). "Ocular anomalies in Seckel's syndrome." Australian and New Zealand journal of medicine **3**(5): 520-522.

Lin, H. J., G. Y. Sue, C. D. Berkowitz, J. A. Brasel and R. S. Lachman (1995). "Microdontia with severe microcephaly and short stature in two brothers: osteodysplastic primordial dwarfism with dental findings." American journal of medical genetics **58**(2): 136-142.

Lippe, B., R. Rosenfeld and M. Grumbach (1990). "Physical and anatomical abnormalities in Turner syndrome." EN: Rosenfeld RG, Grumbach MM. Turner syndrome. Nueva York: Marcel Dekker: 183-196.

Liu, X., D. Zhang, W. Shuo, Y. Zhao, R. Wang and J. Zhao (2012). "Long term outcome after conservative and surgical treatment of haemorrhagic moyamoya disease." Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry: jnnp-2012-302236.

Loeys, B. L., M. M. Lemmerling, C. E. Van Mol and J. G. Leroy (1999). "The Meier-Gorlin syndrome, or ear–patella–short stature syndrome, in sibs." American journal of medical genetics **84**(1): 61-67.

Löffler, H., A. Fechter, M. Matuszewska, R. Saffrich, M. Mistrik, J. Marhold, C. Hornung, F. Westermann, J. Bartek and A. Krämer (2011). "Cep63 recruits Cdk1 to the centrosome: implications for regulation of mitotic entry, centrosome amplification, and genome maintenance." Cancer research **71**(6): 2129-2139.

Lohmann, K. and C. Klein (2014). "Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis." Neurotherapeutics **11**(4): 699-707.

Lowry, R. and J. M. Opitz (1982). "Early onset of Cockayne syndrome." American journal of medical genetics **13**(2): 209-210.

Lund, A., C. Mølgaard, J. Müller and F. Skovby (1999). "Bone mineral content and collagen defects in osteogenesis imperfecta." Acta Paediatrica **88**(10): 1083-1088.

Maas, N., B. Thienpont, J. Vermeesch and J.-P. Fryns (2006). "Facial asymmetry, cardiovascular anomalies and adducted thumbs as unusual symptoms in Dubowitz syndrome: a microdeletion/duplication in 13q." Genetic counseling (Geneva, Switzerland) **17**(4): 477.

Mahmood, S., W. Ahmad and M. J. Hassan (2011). "Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum." Orphanet J Rare Dis **6**(1): 39.

Maitinsky, S. P. (1964). Vogelköpfiger Zwergwuchs: Bericht über drei neue Fälle.

Majewski, F., T. Goecke and J. M. Opitz (1982). "Studies of microcephalic primordial dwarfism I: approach to a delineation of the Seckel syndrome." American journal of medical genetics **12**(1): 7-21.

Majewski, F. and T. O. Goecke (1998). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II: report of three cases and review." American journal of medical genetics **80**(1): 25-31.

Majewski, F., R. Michaelis, K. Moosmann and J. Bierich (1975). "A rare type of low birthweight dwarfism: The Dubowitz syndrome." Zeitschrift für Kinderheilkunde **120**(4): 283-292.

Majewski, F., M. Ranke, A. Schinzel and J. M. Opitz (1982). "Studies of microcephalic primordial dwarfism II: the osteodysplastic type II of primordial dwarfism." American journal of medical genetics **12**(1): 23-35.

Majewski, F. and J. Spranger (1976). "Case report 49." Syndrome Identification **4**(2): 17-21.

Majewski, F., M. Stoeckenius, H. Kemperdick and J. M. Opitz (1982). "Studies of microcephalic primordial dwarfism III: an intrauterine dwarf with platyspondyly and anomalies of pelvis and clavicles—osteodysplastic primordial dwarfism type III." American journal of medical genetics **12**(1): 37-42.

Maldergem, L., Y. Gillerot, M. Godhaird, E. Nemeč and L. Koulischer (1990). "Primordial osteodysplastic dwarfism type I in association with corneal clouding: evidence for autosomal recessive inheritance." Clinical genetics **38**(5): 359-361.

Mallery, D. L., B. Tanganelli, S. Colella, H. Steingrimsdottir, A. J. van Gool, C. Troelstra, M. Stefanini and A. R. Lehmann (1998). "Molecular analysis of mutations in the CSB (ERCC6) gene in patients with Cockayne syndrome." The American Journal of Human Genetics **62**(1): 77-85.

Mann, T. and A. Russell (1959). "Study of a microcephalic midget of extreme type." Proceedings of the Royal Society of Medicine **52**: 1024.

Marcus, K., C. Sweep, I. van der Bürgt and C. Noordam (2008). "Impaired Sertoli cell function in males diagnosed with Noonan syndrome." Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism **21**(11): 1079-1084.

Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. **9**: 387-402.

Martínez-Barrera, L., C. García-Delgado, C. Manzano-Sierra and V. Morán-Barroso (2013). "Left cerebral hemisphere and ventricular system abnormalities in a Mexican Meier Gorlin syndrome patient: widening the clinical spectrum." Genetic counseling (Geneva, Switzerland) **25**(2): 189-195.

Martínez-Frías, M. L., X. Egüés, A. Puras, J. Hualde, C. de Frutos, E. Bermejo, M. Nieto and S. Martínez (2011). "Thanatophoric dysplasia type II with encephalocele and semilobar holoprosencephaly: insights into its pathogenesis." American Journal of Medical Genetics Part A **155**(1): 197-202.

Mascher, M., S. Wu, P. S. Amand, N. Stein and J. Poland (2013). "Application of genotyping-by-sequencing on semiconductor sequencing platforms: a comparison of genetic and reference-based marker ordering in barley." PLoS One **8**(10).

Masuno, M., K. Imaizumi, G. Nishimura, K. Kurosawa, Y. Makita, Y. Shimazaki and Y. Kuroki (1995). "Osteodysplastic primordial dwarfism: a case with features of type II." Clinical dysmorphology **4**(1): 57-62.

Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini and Y. Lerenthal (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." Science **316**(5828): 1160-1166.

Mayr, E., E. Mayr, E. Mayr and E. Mayr (1963). Animal species and evolution, Belknap Press of Harvard University Press Cambridge, Massachusetts.

Mazzanti, L., E. Cacciari and I. S. G. f. T. Syndrome (1998). "Congenital heart disease in patients with Turner's syndrome." The Journal of pediatrics **133**(5): 688-692.

McKusick, V. A. (1955). "Primordial dwarfism and ectopia lentis." American journal of human genetics **7**(2): 189.

McKusick, V. A. (1972). Heritable disorders of connective tissue, Cv Mosby.

McKusick, V. A., M. Mahloudji, M. H. Abbott, R. Lindenberg and D. Kepas (1967). "Seckel's Bird-Headed Dwarfism\*." New England Journal of Medicine **277**(6): 279-286.

Meier, Z. and M. Rothschild (1959). "Case of arthrogryposis multiplex congenita with mandibulofacial dysostosis (Franceschetti syndrome)." Helvetica paediatrica acta **14**(2): 213.

Meinecke, P. and E. Passarge (1991). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I/III in sibs." Journal of medical genetics **28**(11): 795-800.

Meinecke, P. and E. Passarge (1992). "Reply to Dr. Taybi." American Journal of Medical Genetics **43**(3): 629-629.

Meinecke, P., E. Schaefer and H. R. Wiedemann (1991). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism: Further evidence for identity of the so-called types I and III." American journal of medical genetics **39**(2): 232-236.

Meira, L. B., J. M. Graham, C. R. Greenberg, D. B. Busch, A. T. Doughty, D. W. Ziffer, D. M. Coleman, I. Savre-Train and E. C. Friedberg (2000). "Manitoba aboriginal kindred with original cerebro-oculo-facio-skeletal syndrome has a mutation in the Cockayne syndrome group B (CSB) gene." The American Journal of Human Genetics **66**(4): 1221-1228.

Melmed, S., K. S. Polonsky, P. R. Larsen and H. M. Kronenberg (2011). Williams textbook of endocrinology: Expert consult, Elsevier Health Sciences.

Meloche, S. and J. Pouyssegur (2007). "The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition." Oncogene **26**(22): 3227-3239.

Méndez, J., X. H. Zou-Yang, S.-Y. Kim, M. Hidaka, W. P. Tansey and B. Stillman (2002). "Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication." Molecular cell **9**(3): 481-491.

Merriman, B., I. Torrent, J. M. Rothberg and D. Team (2012). "Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing." Electrophoresis **33**(23): 3397-3417.

Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies—the next generation." Nature reviews genetics **11**(1): 31-46.

Mezquita, C. (2011). Fisiología médica: del razonamiento fisiológico al razonamiento clínico, Editorial Médica Panamericana.

Michałkiewicz, J., C. Barth, K. Chrzanowska, H. Gregorek, M. Syczewska, C. Weemaes, K. Madaliński and J. Stachowski (2003). "Abnormalities in the T and NK lymphocyte phenotype in patients with Nijmegen breakage syndrome." Clinical & Experimental Immunology **134**(3): 482-490.

Milani, D., F. M. Manzoni, L. Pezzani, P. Ajmone, C. Gervasini, F. Menni and S. Esposito (2015). "Rubinstein-Taybi syndrome: clinical features, genetic basis, diagnosis, and management." Italian journal of pediatrics(1): 4.

Miller, S. P., M.-E. Dilenge, K. Meagher-Villemure, A. M. O’Gorman and M. I. Shevell (1998). "Infantile epileptic encephalopathy (Ohtahara syndrome) and migrational disorder." Pediatric neurology **19**(1): 50-54.

Minoche, A. E., J. C. Dohm and H. Himmelbauer (2011). "Evaluation of genomic high-throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and genome analyzer systems." Genome Biol **12**(11): R112.

Mitropoulos, K., H. Al Jaibaji, D. A. Forero, P. Laissue, A. Wonkam, C. Lopez-Correa, Z. Mohamed, W. Chantratita, M. T. M. Lee and A. Llerena (2015). "Success stories in genomic medicine from resource-limited countries." Human genomics **9**(1): 11.

Miyoshi, K., M. Asanuma, I. Miyazaki, F. J. Diaz-Corrales, T. Katayama, M. Tohyama and N. Ogawa (2004). "DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin." Biochemical and biophysical research communications **317**(4): 1195-1199.

Moore, K. L., T. V. N. Persaud and M. G. Torchia (2007). Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects (with Student Consult Online Access), Elsevier Health Sciences.

Mühlhans, J., J. H. Brandstätter and A. Gießl (2012). The centrosomal protein pericentrin identified at the basal body complex of the connecting cilium in mouse photoreceptors, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg (FAU).

Mühlhans, J. and A. Gießl (2012). "Pericentrin in health and disease." Communicative & Integrative Biology **5**(4).

Müller, E., D. Dunstheimer, J. Klammt, D. Friebe, W. Kiess, J. Kratzsch, T. Kruis, S. Laue, R. Pfäffle and T. Wallborn (2012). "Clinical and functional characterization of a patient carrying a compound heterozygous pericentrin mutation and a heterozygous IGF1 receptor mutation."

Mullis, P.-E. (2011). "Genetics of GHRH, GHRH-receptor, GH and GH-receptor: its impact on pharmacogenetics." Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism **25**(1): 25-41.

Mullis, P. E. (2005). "Genetic control of growth." European Journal of Endocrinology **152**(1): 11-31.

Muñoz-Hoyos, A., A. Molina-Carballo, M. Augustin-Morales, F. Contreras-Chova, A. Naranjo-Gómez, F. Justicia-Martínez and J. Uberos (2011). "Psychosocial dwarfism: psychopathological aspects and putative neuroendocrine markers." Psychiatry research **188**(1): 96-101.

Murphy, K. M., K. D. Berg and J. R. Eshleman (2005). "Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction." Clinical chemistry **51**(1): 35-39.

Mziray-Andrew, C. H. and T. A. Sentongo (2009). "Nutritional deficiencies in intestinal failure." Pediatric Clinics of North America **56**(5): 1185-1200.

Nadjari, M., S. J. Fasouliotis, I. Ariel, A. Raas-Rothschild, J. Bar-Ziv and U. Elchalal (2000). "Ultrasonographic prenatal diagnosis of microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism types I/III." Prenatal diagnosis **20**(8): 666-669.

Nagy, R., H. Wang, B. Albrecht, D. Wiczorek, G. Gillissen-Kaesbach, E. Haan, P. Meinecke, A. de la Chapelle and J. A. Westman (2012). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I with biallelic mutations in the RNU4ATAC gene." Clinical genetics **82**(2): 140-146.

Nance, M. A. and S. A. Berry (1992). "Cockayne syndrome: review of 140 cases." American journal of medical genetics **42**(1): 68-84.

Neto-Silva, R. M., S. de Beco and L. A. Johnston (2010). "Evidence for a growth-stabilizing regulatory feedback mechanism between Myc and Yorkie, the Drosophila homolog of Yap." Developmental cell **19**(4): 507-520.

Neumann, B., T. Walter, J.-K. Hériché, J. Bulkescher, H. Erfle, C. Conrad, P. Rogers, I. Poser, M. Held and U. Liebel (2010). "Phenotypic profiling of the human genome by time-lapse microscopy reveals cell division genes." Nature **464**(7289): 721-727.

Niño, M. Y., H. E. Mateus, D. J. Fonseca, M. A. Kroos, S. Y. Ospina, J. F. Mejía, J. A. Uribe, A. J. Reuser and P. Laissue (2012). Identification and functional characterization of GAA mutations in Colombian patients affected by Pompe disease. JIMD Reports-Case and Research Reports, 2012/4, Springer: 39-48.

Nishimura, G., T. Hasegawa, M. Fujino, N. Hori and Y. Tomita (2003). "Microcephalic osteodysplastic primordial short stature type II with cafe-au-lait spots and moyamoya disease." American Journal of Medical Genetics Part A **117**(3): 299-301.

Noonan, J. A. (2005). "Noonan syndrome and related disorders." Progress in Pediatric cardiology **20**(2): 177-185.

Noonan, J. A., R. Raaijmakers and B. Hall (2003). "Adult height in Noonan syndrome." American Journal of Medical Genetics Part A **123**(1): 68-71.

Nowaczyk, M. and J. Waye (2001). "The Smith–Lemli–Opitz syndrome: a novel metabolic way of understanding developmental biology, embryogenesis, and dysmorphology." Clinical genetics **59**(6): 375-386.

Nowaczyk, M. J., S. Zeesman, J. S. Waye and J. D. Douketis (2004). "Incidence of Smith-Lemli-Opitz syndrome in Canada: results of three-year population surveillance." The Journal of pediatrics **145**(4): 530-535.

Nozza, J. M. and C. P. Rodda (2001). "Vitamin D deficiency in mothers of infants with rickets." The Medical journal of Australia **175**(5): 253-255.

Nurse, P. (1975). "Genetic control of cell size at cell division in yeast." Nature **256**: 547-551.

Nurse, P. (1985). "The genetic control of cell volume." The evolution of genome size: 185-196.

O'Driscoll, M. and P. A. Jeggo (2008). "The role of the DNA damage response pathways in brain development and microcephaly: insight from human disorders." DNA repair **7**(7): 1039-1050.

Oberklaid, F., D. Danks, F. Jensen, L. Stace and S. Rosshandler (1979). "Achondroplasia and hypochondroplasia. Comments on frequency, mutation rate, and radiological features in skull and spine." Journal of medical genetics **16**(2): 140-146.

Ogi, T., S. Walker, T. Stiff, E. Hobson, S. Limsirichaikul, G. Carpenter, K. Prescott, M. Suri, P. J. Byrd and M. Matsuse (2012). "Identification of the first ATRIP-deficient patient and novel mutations in ATR define a clinical spectrum for ATR-ATRIP Seckel syndrome."

Ohtani, K., J. DeGregori, G. Leone, D. R. Herendeen, T. J. Kelly and J. R. Nevins (1996). "Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor." Molecular and Cellular Biology **16**(12): 6977-6984.

Ohtsubo, M., S. i. Yasunaga, Y. Ohno, M. Tsumura, S. Okada, N. Ishikawa, K. Shirao, A. Kikuchi, H. Nishitani and M. Kobayashi (2008). "Polycomb-group complex 1 acts as an E3 ubiquitin ligase for Geminin to sustain hematopoietic stem cell activity." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(30): 10396-10401.

Ojeda, D., B. Lakhal, D. J. Fonseca, R. Braham, H. Landolsi, H. E. Mateus, C. M. Restrepo, H. Elghezal, A. Saâd and P. Laissue (2011). "Sequence analysis of the CDKN1B gene in patients with premature ovarian failure reveals a novel mutation potentially related to the phenotype." Fertility and sterility **95**(8): 2658-2660. e2651.

Olney, R. C., H. I. Bükülmez, C. F. Bartels, T. C. Prickett, E. A. Espiner, L. R. Potter and M. L. Warman (2006). "Heterozygous mutations in natriuretic peptide receptor-B (NPR2) are associated with short stature." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **91**(4): 1229-1232.

Opitz, J. M. (2012). "2011 William Allan Award: Development and Evolution." The American Journal of Human Genetics **90**(3): 392-404.

Opitz, J. M. and J. F. Reynolds (1985). "The Brachmann-de Lange syndrome." American journal of medical genetics **22**(1): 89-102.

Orrison, W. W., E. R. Schnitzler, R. W. Chun and J. M. Optiz (1980). "The Dubowitz syndrome: further observations." American journal of medical genetics **7**(2): 155-170.

Ortega-Recalde, O., D. J. Fonseca, L. C. Patiño, J. J. Atuesta, C. Rivera-Nieto, C. M. Restrepo, H. E. Mateus, M. S. van der Knaap and P. Laissue (2013). "A novel familial case of diffuse leukodystrophy related to NDUFV1 compound heterozygous mutations." Mitochondrion **13**(6): 749-754.

Ortega-Recalde, O., J. I. Vergara, D. J. Fonseca, X. Ríos, H. Mosquera, O. M. Bermúdez, C. L. Medina, C. I. Vargas, A. E. Pallares and C. M. Restrepo (2013). "Whole-exome sequencing enables rapid determination of xeroderma pigmentosum molecular etiology." PLoS One **8**(6): e64692.

Ortega-Recalde, O., O. Beltrán, J. Gálvez, A. Palma-Montero, C. Restrepo, H. Mateus and P. Laissue (2015). "Biallelic HERC1 mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability." Clinical genetics **88**(4): e1-e3.

Ortega-Recalde, O., M. Moreno, J. Vergara, D. Fonseca, R. Rojas, H. Mosquera, C. Medina, C. Restrepo and P. Laissue (2015). "A novel TGM1 mutation, leading to multiple splicing rearrangements, is associated with autosomal recessive congenital ichthyosis." Clinical and experimental dermatology **40**(7): 757-760.

Ortega-Recalde, O., D. Silgado, C. Fetiva, D. Fonseca and P. Laissue (2016). "Transcriptomic analysis of skin in a case of ichthyosis Curth–Macklin caused by a KRT1 mutation." British Journal of Dermatology **175**(6): 1372-1375.

Otten, B. and C. Noordam (2009). "Growth in Noonan syndrome." Hormone research **72**: 31-35.

Otto, T. D. (2011). "Real-time sequencing." Nature Reviews Microbiology **9**(9).

Ou, Y. Y., G. J. Mack, M. Zhang and J. B. Rattner (2002). "CEP110 and ninein are located in a specific domain of the centrosome associated with centrosome maturation." Journal of Cell Science **115**(9): 1825-1835.

Ouzounian, J., G. Hernandez, L. Korst, M. Montoro, L. Battista, C. Walden and R. Lee (2011). "Pre-pregnancy weight and excess weight gain are risk factors for macrosomia in women with gestational diabetes." Journal of Perinatology **31**(11): 717-721.

Pagon, R. A. (1987). "Diagnostic approach to the newborn with ambiguous genitalia." Pediatric Clinics of North America **34**(4): 1019-1031.

Pagon, R. A., M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, K. Stephens, L. Bonafé and L. M. Crettol (2013). "Achondrogenesis Type 1B."

Pagon, R. A., M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, K. Stephens, L. Bonafé and L. Mittaz-Crettol (2013). "Diastrophic Dysplasia."

Pagon, R. A., M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, K. Stephens, R. Varon and I. Demuth (2014). "Nijmegen Breakage Syndrome."

Pagon, R. A., M. P. Adam, H. H. Ardinger, T. D. Bird, C. R. Dolan, C.-T. Fong, R. J. Smith, K. Stephens, A. Verloes and S. Drunat (2013). "Primary autosomal recessive microcephalies and seckel syndrome spectrum disorders."

Palmiter, R. D., G. Norstedt, R. E. Gelinias, R. E. Hammer and R. L. Brinster (1983). "Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice." Science **222**(4625): 809-814.

Pan, D. (2010). "The hippo signaling pathway in development and cancer." Developmental cell **19**(4): 491-505.

Parrish, J., R. Wilroy and R. B. Lowry (1980). "The Dubowitz syndrome: The psychological status of ten cases at follow-up." American journal of medical genetics **6**(1): 3-8.

Pascual, J. C., I. Betlloch, J. Bañuls and G. Vergara (2005). "What syndrome is this?" Pediatric dermatology **22**(5): 480-481.

Pasquino, A. and G. Iannaccone (1978). "Il nanismo nanocefalico o nanismo "a testa di uccello"(cosiddetta "sindrome di Seckel"). Revisione critica della letteratura." Prog Med (Roma) **34**(1021): 34-45.

Passemard, S., L. Titomanlio, M. Elmaleh, A. Afenjar, J.-L. Alessandri, G. Andria, T. B. de Villemeur, O. Boespflug-Tanguy, L. Burglen and E. Del Giudice (2009). "Expanding the clinical and neuroradiologic phenotype of primary microcephaly due to ASPM mutations." Neurology **73**(12): 962-969.

Passos-Bueno, M., W. Wilcox, E. Jabs, A. Sertie, L. Alonso and H. Kitoh (1999). "Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations." Human mutation **14**(2): 115-125.

Paterson, C. R., S. McAllion and J. L. Stellman (1984). "Osteogenesis imperfecta after the menopause." New England Journal of Medicine **310**(26): 1694-1696.

Patiño, L. C., R. Battu, O. Ortega-Recalde, J. Nallathambi, V. R. Anandula, U. Renukaradhya and P. Laissue (2014). "Exome sequencing is an efficient tool for variant late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis molecular diagnosis." PloS one **9**(10): e109576.

Patiño, L. C., D. Silgado and P. Laissue (2017). "A potential functional association between mutant BMP2 and primary ovarian insufficiency." Systems Biology in Reproductive Medicine: 1-5.

Patiño, L. C., K. L. Walton, T. D. Mueller, K. E. Johnson, W. Stocker, D. Richani, D. Agapiou, R. B. Gilchrist, P. Laissue and C. A. Harrison (2017). "BMP15 Mutations Associated With Primary Ovarian Insufficiency Reduce Expression, Activity, or Synergy With GDF9." The Journal of clinical endocrinology and metabolism **102**(3): 1009.

Patterson, K., K. E. Toomey and R. S. Chandra (1983). "Hirschsprung disease in a 46, XY phenotypic infant girl with Smith-Lemli-Opitz syndrome." The Journal of pediatrics **103**(3): 425-427.

Pattison, L., Y. J. Crow, V. J. Deeble, A. P. Jackson, H. Jafri, Y. Rashid, E. Roberts and C. G. Woods (2000).

"A fifth locus for primary autosomal recessive microcephaly maps to chromosome 1q31." The American Journal of Human Genetics **67**(6): 1578-1580.

Pauli, R. (1993). "Achondroplasia. 1998 Oct 12 [Updated 2012 Feb 16]." GeneReviews™[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Payet, G. (1975). "Nanisme et hyperlaxité dysmorphie faciale et luxations multiples: syndrome de Larsen." Arch Fr Pediatr **32**: 601-608.

Pearson, G., F. Robinson, T. Beers Gibson, B.-e. Xu, M. Karandikar, K. Berman and M. H. Cobb (2001).

"Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions 1." Endocrine reviews **22**(2): 153-183.

Pennisi, E. (2010). "Semiconductors inspire new sequencing technologies." Science **327**(5970): 1190-1190.

Perkel, J. (2011). "Making contact with sequencing's fourth generation." BioTechniques **50**(2): 93-95.

Perry, L. D., F. Robertson and V. Ganesan (2013). "Screening for cerebrovascular disease in microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II): an evidence-based proposal." Pediatric neurology **48**(4): 294-298.

Perry, R., C. Farquharson and S. Ahmed (2008). "The role of sex steroids in controlling pubertal growth." Clinical endocrinology **68**(1): 4-15.

Person, A. D., S. Beiraghi, C. M. Sieben, S. Hermanson, A. N. Neumann, M. E. Robu, J. R. Schleiffarth, C. J.

Billington, H. Van Bokhoven and J. M. Hoogeboom (2010). "WNT5A mutations in patients with autosomal dominant Robinow syndrome." Developmental dynamics **239**(1): 327-337.

Piane, M., M. Della Monica, G. Piatelli, P. Lulli, F. Lonardo, L. Chessa and G. Scarano (2009). "Majewski osteodysplastic primordial dwarfism type II (MOPD II) syndrome previously diagnosed as Seckel

syndrome: report of a novel mutation of the PCNT gene." American Journal of Medical Genetics Part A **149**(11): 2452-2456.

Picq, S., S. Santoni, T. Lacombe, M. Latreille, A. Weber, M. Ardisson, S. Ivorra, D. Maghradze, R. Arroyo-Garcia, P. Chatelet, P. This, J. F. Terral and R. Bacilieri (2014). "A small XY chromosomal region explains sex determination in wild dioecious *V. vinifera* and the reversal to hermaphroditism in domesticated grapevines." BMC Plant Biol **14**: 229.

Pichon, B., S. Vankerckhove, G. Bourrouillou, L. Duprez and M. J. Abramowicz (2004). "A translocation breakpoint disrupts the ASPM gene in a patient with primary microcephaly." European journal of human genetics **12**(5): 419-421.

Pierce, M. J. and R. P. Morse (2012). "The neurologic findings in Taybi–Linder syndrome (MOPD I/III): Case report and review of the literature." American journal of medical genetics Part A **158**(3): 606-610.

Pierpont, E. I., S. E. Weismer, A. E. Roberts, E. Tworog-Dube, M. E. Pierpont, N. J. Mendelsohn and M. S. Seidenberg (2010). "The language phenotype of children and adolescents with Noonan syndrome." Journal of Speech, Language, and Hearing Research **53**(4): 917-932.

Pliszka, S. R., T. L. Matthews, K. J. Braslow and M. A. Watson (2006). "Comparative effects of methylphenidate and mixed salts amphetamine on height and weight in children with attention-deficit/hyperactivity disorder." Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry **45**(5): 520-526.

Ponting, C. and A. P. Jackson (2005). "Evolution of primary microcephaly genes and the enlargement of primate brains." Current opinion in genetics & development **15**(3): 241-248.

Poznanski, A., G. Iannaccone, A. Pasquino and B. Boscherini (1983). "Radiological findings in the hand in Seckel syndrome (bird-headed dwarfism)." Pediatric radiology **13**(1): 19-24.

Prada, C. F. and P. Laissue (2014). "A high resolution map of mammalian X chromosome fragile regions assessed by large-scale comparative genomics." Mammalian genome **25**(11-12): 618-635.

Prasanth, S. G., K. V. Prasanth and B. Stillman (2002). "Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis." Science **297**(5583): 1026-1031.

Price, S., R. Stanhope, C. Garrett, M. Preece and R. Trembath (1999). "The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria." Journal of medical genetics **36**(11): 837-842.

Ptacek, L. J., J. M. Opitz, D. W. Smith, T. Gerritsen and H. A. Waisman (1963). "The Cornelia de Lange syndrome." The Journal of pediatrics **63**(5): 1000-1020.

Purohit, A., S. H. Tynan, R. Vallee and S. J. Doxsey (1999). "Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization." The Journal of cell biology **147**(3): 481-492.

Quintana, D. G., Z.-h. Hou, K. C. Thome, M. Hendricks, P. Saha and A. Dutta (1997). "Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex." Journal of Biological Chemistry **272**(45): 28247-28251.

Qvist, P., P. Huertas, S. Jimeno, M. Nyegaard, M. J. Hassan, S. P. Jackson and A. D. Børghlum (2011). "CtIP mutations cause Seckel and Jawad syndromes." PLoS Genet **7**(10): e1002310.

Raff, M. C. (1992). "Social controls on cell survival and cell death."

Ramírez, C. E. H., F. Barros, J. B. Conde, L. Castro-Feijóo, P. C. Rodríguez and M. P. Arias (2013). "Rev Esp Endocrinol Pediatr." Rev Esp Endocrinol Pediatr **4**(1): 68-86.

Ranke, M. B. and P. Saenger (2001). "Turner's syndrome." The Lancet **358**(9278): 309-314.

Rao, E., B. Weiss, M. Fukami, A. Rump, B. Niesler, A. Mertz, K. Muroya, G. Binder, S. Kirsch and M. Winkelmann (1997). "Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and Turner syndrome." Nature genetics **16**(1): 54-63.

Rauch, A. (2011). "The shortest of the short: pericentrin mutations and beyond." Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism **25**(1): 125-130.

Rauch, A., C. T. Thiel, D. Schindler, U. Wick, Y. J. Crow, A. B. Ekici, A. J. van Essen, T. O. Goecke, L. Al-Gazali and K. H. Chrzanowska (2008). "Mutations in the pericentrin (PCNT) gene cause primordial dwarfism." Science **319**(5864): 816-819.

Rauch, F. and F. H. Glorieux (2004). "Osteogenesis imperfecta." The Lancet **363**(9418): 1377-1385.

Razzaque, M. A., T. Nishizawa, Y. Komoike, H. Yagi, M. Furutani, R. Amo, M. Kamisago, K. Momma, H. Katayama and M. Nakagawa (2007). "Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome." Nature genetics **39**(8): 1013-1017.

Remes, V., P. Tervahartiala, I. Helenius and J. Peltonen (2002). "Magnetic resonance imaging analysis of hip joint development in patients with diastrophic dysplasia." Journal of pediatric orthopaedics **22**(2): 212-216.

Resnik, R. (2002). "Intrauterine growth restriction." Obstetrics & Gynecology **99**(3): 490-496.

Rimoin, D. L., J. M. Connor, R. E. Pyeritz and B. R. Korf (2007). Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics, Churchill Livingstone Elsevier.

Rimoin, D. L., R. E. Pyeritz and B. Korf (2013). Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics, Academic Press.

Rischbieth, H. and A. Barrington (1912). "Dwarfism, Treasury of Human Inheritance." Univ. of London, Francis Galton Laboratory for National Eugenics, Memoir **15**.

Roberts, A. E., J. E. Allanson, M. Tartaglia and B. D. Gelb (2013). "Noonan syndrome." The Lancet **381**(9863): 333-342.

Robinow, M., F. N. Silverman and H. D. Smith (1969). "A newly recognized dwarfing syndrome." American journal of diseases of children **117**(6): 645-651.

Robinson, P. D., W. Högler, M. E. Craig, C. F. Verge, J. L. Walker, A. C. Piper, H. J. Woodhead, C. T. Cowell and G. R. Ambler (2006). "The re-emerging burden of rickets: a decade of experience from Sydney." Archives of disease in childhood **91**(7): 564-568.

Roifman, M., H. Brunner, J. Lohr, J. Mazzeu and D. Chitayat (1993). "Autosomal Dominant Robinow Syndrome."

Root, A. W. and F. B. Diamond Jr (2007). "Overgrowth syndromes: evaluation and management of the child with excessive linear growth." Pediatric Endocrinology, ed **5**: 163-194.

Rosenberg, M. J., R. Agarwala, G. Bouffard, J. Davis, G. Fiermonte, M. S. Hilliard, T. Koch, L. M. Kalikin, I. Makalowska and D. H. Morton (2002). "Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly." Nature genetics **32**(1): 175-179.

Rosenbloom, A. L. (2007). "Fisiología del crecimiento." Annales Nestle-Spanish Edition **65**(3): 99.

Rosenbloom, A. L. (2007). "Recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) and rhIGF-I/rhIGF-binding-protein-3: new growth treatment options?" The Journal of pediatrics **150**(1): 7-11.

Rossi, A. and A. Superti-Furga (2001). "Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene (SLC26A2): 22 novel mutations, mutation review, associated skeletal phenotypes, and diagnostic relevance." Human mutation **17**(3): 159.

Roughley, P., F. Rauch and F. Glorieux (2003). "Osteogenesis imperfecta—clinical and molecular diversity." Eur Cell Mater **5**: 41-47.

Rousseau, F., J. Bonaventure, L. Legeai-Mallet, A. Pelet, J.-M. Rozet, P. Maroteaux, M. Le Merrer and A. Munnich (1996). "Mutations of the fibroblast growth factor receptor-3 gene in achondroplasia." Hormone Research in Paediatrics **45**(1-2): 108-110.

Rousseau, F., J. Bonaventure, L. Legeai-Mallet, H. Schmidt, J. Weissenbach, P. Maroteaux, A. Munnich and M. Le Merrer (1996). "Clinical and genetic heterogeneity of hypochondroplasia." Journal of medical genetics **33**(9): 749-752.

Royce, P. M. and B. Steinmann (2003). Connective tissue and its heritable disorders: molecular, genetic, and medical aspects, John Wiley & Sons.

Rudra, S. and R. V. Skibbens (2013). "Chl1 DNA helicase regulates Scc2 deposition specifically during DNA-replication in *Saccharomyces cerevisiae*." *PloS one* **8**(9): e75435.

Rugg-Gunn, A., S. Al-Mohammadi and T. Butler (1998). "Malnutrition and developmental defects of enamel in 2-to 6-year-old Saudi boys." *Caries Research* **32**(3): 181-192.

Ryan, A., K. Bartlett, P. Clayton, S. Eaton, L. Mills, D. Donnai, R. Winter and J. Burn (1998). "Smith-Lemli-Opitz syndrome: a variable clinical and biochemical phenotype." *Journal of medical genetics* **35**(7): 558-565.

Saadi, A., G. Borck, N. Boddaert, M. C. Chekkour, B. Imessaoudene, A. Munnich, L. Colleaux and M. Chaouch (2009). "Compound heterozygous ASPM mutations associated with microcephaly and simplified cortical gyration in a consanguineous Algerian family." *European journal of medical genetics* **52**(4): 180-184.

Saal, H. M., R. A. Pagon and M. G. Pepin (1985). "Reevaluation of Russell-Silver syndrome." *The Journal of pediatrics* **107**(5): 733-737.

Saenger, P., K. A. Wikland, G. Conway, M. Davenport, C. H. Gravholt, R. Hintz, O. Hovatta, M. Hultcrantz, K. Landin-Wilhelmsen and A. Lin (2001). "Recommendations for the Diagnosis and Management of Turner Syndrome 1." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **86**(7): 3061-3069.

Salerno, M., G. Amabile, C. Mandato, S. Di Maio, M. Lecora, E. Avvedimento and G. Andria (2003). "Growth retardation, developmental delay, distinctive face, multiple endocrine abnormalities, and adenylyl cyclase dysfunction: A new syndrome?" *American Journal of Medical Genetics Part A* **120**(3): 389-394.

Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." *Journal of molecular biology* **94**(3): 441-448.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**(12): 5463-5467.

Sauk, J. J., R. Litt, C. E. Espiritu and J. R. Delaney (1973). "Familial bird-headed dwarfism (Seckel's syndrome)." Journal of medical genetics **10**(2): 196-198.

Saul, R. A. and W. G. Wilson (1990). "A "new" skeletal dysplasia in two unrelated boys." American journal of medical genetics **35**(3): 388-393.

Savage, M. O., C. P. Burren and R. G. Rosenfeld (2010). "The continuum of growth hormone–IGF-I axis defects causing short stature: diagnostic and therapeutic challenges." Clinical endocrinology **72**(6): 721-728.

Sawyer, S. L., J. Schwartzentruber, C. L. Beaulieu, D. Dymont, A. Smith, J. W. Chardon, G. Yoon, G. A. Rouleau, O. Suchowersky and V. Siu (2014). "Exome sequencing as a diagnostic tool for pediatric-onset ataxia." Human mutation **35**(1): 45-49.

Scott, C. (1969). "Low birth weight dwarfism in two brothers." Birth Defects Orig Artic Ser **5**: 241-244.

Schmidts, M. (2014). "Clinical genetics and pathobiology of ciliary chondrodysplasias." Journal of pediatric genetics **3**(2): 46.

Schmidts, M., H. H. Arts, E. M. Bongers, Z. Yap, M. M. Oud, D. Antony, L. Duijkers, R. D. Emes, J. Stalker and J.-B. L. Yntema (2013). "Exome sequencing identifies DYNC2H1 mutations as a common cause of asphyxiating thoracic dystrophy (Jeune syndrome) without major polydactyly, renal or retinal involvement." Journal of medical genetics: jmedgenet-2012-101284.

Schoenwolf, G. C., S. B. Bleyl, P. R. Brauer and P. H. Francis-West (2012). Larsen's Human Embryology: with STUDENT CONSULT Online Access, Elsevier Health Sciences.

Schönenberg, H. (1976). "[Seckel syndrom (author's transl)]." Klinische Padiatrie **188**(5): 449-454.

Schrier, S. A., J. N. Bodurtha, B. Burton, A. E. Chudley, M. A. D. Chiong, M. G. D'Avanzo, S. A. Lynch, A. Musio, D. M. Nyazov and P. A. Sanchez-Lara (2012). "The Coffin–Siris syndrome: A proposed diagnostic approach and assessment of 15 overlapping cases." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(8): 1865-1876.

Schrier Vergano, S., G. Santen and D. Wieczorek (2014). "Coffin-Siris Syndrome. 2013 Apr 4 [Updated 2013 Jul 11]." GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle.

Schubbert, S., M. Zenker, S. L. Rowe, S. Böll, C. Klein, G. Bollag, I. van der Burgt, L. Musante, V. Kalscheuer and L.-E. Wehner (2006). "Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome." Nature genetics **38**(3): 331-336.

Seckel, H. P. G. (1960). Bird-headed dwarfs: studies in developmental anthropology including human proportions, CC Thomas.

Selby, M. J., A. Barta, J. D. Baxter, G. I. Bell and N. Eberhardt (1984). "Analysis of a major human chorionic somatomammotropin gene. Evidence for two functional promoter elements." Journal of Biological Chemistry **259**(21): 13131-13138.

SenGupta, D. J. and B. T. Cookson (2010). "SeqSharp: A general approach for improving cycle-sequencing that facilitates a robust one-step combined amplification and sequencing method." The Journal of molecular diagnostics **12**(3): 272-277.

Shaheen, R., E. Faqeih, S. Ansari, G. Abdel-Salam, Z. N. Al-Hassnan, T. Al-Shidi, R. Alomar, S. Sogaty and F. S. Alkuraya (2014). "Genomic analysis of primordial dwarfism reveals novel disease genes." Genome research **24**(2): 291-299.

Shalev, S. A. and J. G. Hall (2003). "Another adult with Meier-Gorlin syndrome-insights into the natural history." Clinical dysmorphology **12**(3): 167-169.

Shanske, A., D. G. Caride, L. Menasse-Palmer, A. Bogdanow and R. W. Marion (1997). "Central nervous system anomalies in Seckel syndrome: report of a new family and review of the literature." American journal of medical genetics **70**(2): 155-158.

Sharp, P. A. and C. B. Burge (1997). "Classification of introns: U2-type or U12-type." Cell **91**(7): 875-879.

Shebib, S., C. Hugosson, N. Sakati and W. L. Nyhan (1991). "Osteodysplastic variant of primordial dwarfism." American journal of medical genetics **40**(2): 146-150.

Shen, Z., A. Chakraborty, A. Jain, S. Giri, T. Ha, K. V. Prasanth and S. G. Prasanth (2012). "Dynamic association of ORCA with prereplicative complex components regulates DNA replication initiation." Molecular and cellular biology **32**(15): 3107-3120.

Shendure, J. and H. Ji (2008). "Next-generation DNA sequencing." Nature biotechnology **26**(10): 1135-1145.

Sherr, C. J. (1994). "G1 phase progression: cycling on cue." Cell **79**(4): 551-555.

Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1995). "Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases." Genes and development **9**(10): 1149-1163.

Shokralla, S., J. L. Spall, J. F. Gibson and M. Hajibabaei (2012). "Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research." Molecular ecology **21**(8): 1794-1805.

Sigaudy, S., A. Toutain, A. Moncla, C. Fredouille, B. Bourliere, S. Ayme and N. Philip (1998). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism Taybi-Linder type: Report of four cases and review of the literature." American journal of medical genetics **80**(1): 16-24.

Sillence, D., K. Barlow, W. Cole, S. Dietrich, A. Garber, D. Rimoin, J. M. Opitz and J. F. Reynolds (1986). "Osteogenesis imperfecta type III. Delineation of the phenotype with reference to genetic heterogeneity." American journal of medical genetics **23**(3): 821-832.

Sillence, D. O., A. Senn and D. Danks (1979). "Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta." Journal of medical genetics **16**(2): 101-116.

Sillibourne, J. E., B. Delaval, S. Redick, M. Sinha and S. J. Doxsey (2007). "Chromatin remodeling proteins interact with pericentrin to regulate centrosome integrity." Molecular biology of the cell **18**(9): 3667-3680.

Singhmar, P. and A. Kumar (2011). "Angelman syndrome protein UBE3A interacts with primary microcephaly protein ASPM, localizes to centrosomes and regulates chromosome segregation." PloS one **6**(5): e20397.

Sir, J.-H., A. R. Barr, A. K. Nicholas, O. P. Carvalho, M. Khurshid, A. Sossick, S. Reichelt, C. D'Santos, C. G. Woods and F. Gergely (2011). "A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles." Nature genetics **43**(11): 1147-1153.

Smith, D. W. (1977). "Growth and its disorders: basics and standards, approach and classifications, growth deficiency disorders, growth excess disorders, obesity." Major problems in clinical pediatrics **15**: 1.

Smith, L. M., J. Z. Sanders, R. J. Kaiser, P. Hughes, C. Dodd, C. R. Connell, C. Heiner, S. B. Kent and L. E. Hood (1986). "Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis."

Smits, P., A. D. Bolton, V. Funari, M. Hong, E. D. Boyden, L. Lu, D. K. Manning, N. D. Dwyer, J. L. Moran and M. Prysak (2010). "Lethal skeletal dysplasia in mice and humans lacking the golgin GMAP-210." New England Journal of Medicine **362**(3): 206-216.

Soliman, A., V. De Sanctis, R. Elalaily and S. Bedair (2014). "Advances in pubertal growth and factors influencing it: Can we increase pubertal growth?" Indian journal of endocrinology and metabolism **18**(Suppl 1): S53.

Song, S. H., G. C. E. Balce, M. V. Agashe, H. Lee, S. J. Hong, Y. E. Park, S. G. Kim and H. R. Song (2012). "New proposed clinico-radiologic and molecular criteria in hypochondroplasia: FGFR 3 gene mutations are not the only cause of hypochondroplasia." American Journal of Medical Genetics Part A **158**(10): 2456-2462.

Sonnen, K. F., A.-M. Gabryjonczyk, E. Anselm, Y.-D. Stierhof and E. A. Nigg (2013). "Human Cep192 and Cep152 cooperate in Plk4 recruitment and centriole duplication." Journal of cell science **126**(14): 3223-3233.

Sotos, J. F., P. R. Dodge, D. Muirhead, J. D. Crawford and N. B. Talbot (1964). "Cerebral gigantism in childhood: a syndrome of excessively rapid growth with acromegalic features and a nonprogressive neurologic disorder." New England Journal of Medicine **271**(3): 109-116.

Spennati, F. and B. Persichetti (1974). "Nanismo di Seckel. Descrizione di un caso." Minerva Pediatr **26**: 851-855.

Spranger, J. (1984). "Pattern recognition in bone dysplasias." Progress in clinical and biological research **200**: 315-342.

Spranger, S., G. Tariverdian, F. Albert, D. Sontheimer, J. Zöller, M. Weber and J. Tröger (1996). "Case report." European journal of pediatrics **155**(9): 796-799.

Stiff, T., M. Alagoz, D. Alcantara, E. Outwin, H. G. Brunner, E. Bongers, M. O'Driscoll, P. A. Jeggo and S. K. Dutcher (2013). "Deficiency in origin licensing proteins impairs cilia formation: implications for the aetiology of Meier-Gorlin syndrome." PLoS Genet **9**(3): e1003360.

Stothard, K. J., P. W. Tennant, R. Bell and J. Rankin (2009). "Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis." Jama **301**(6): 636-650.

Sugio, Y., M. Tsukahara and T. Kajii (1993). "Two Japanese cases with microcephalic primordial dwarfism: classical Seckel syndrome and osteodysplastic primordial dwarfism type II." Japanese Journal of Human Genetics **38**(2): 209-217.

Sugita, K., J.-i. Takanashi, M. Ishii and H. Niimi (1992). "Comparison of MRI white matter changes with neuropsychologic impairment in Cockayne syndrome." Pediatric neurology **8**(4): 295-298.

Superti-Furga, A., L. Bonafé and D. L. Rimoin (2001). "Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton." American journal of medical genetics **106**(4): 282-293.

Swartz, K. R., D. Resnick, B. J. Iskandar, D. Wargowski, D. Brockmeyer and J. Opitz (2003). "Cranio-cervical anomalies in Dubowitz syndrome. Three cases and a literature review." Pediatric neurosurgery **38**(5): 238-243.

Szalay, G. (1974). "Letter: Seckel syndrome." Journal of medical genetics **11**(2): 216.

Szalay, G. C. (1964). "Intrauterine growth retardation versus Silver's syndrome." The Journal of pediatrics **64**(2): 234-240.

Takahashi, M., A. Yamagiwa, T. Nishimura, H. Mukai and Y. Ono (2002). "Centrosomal proteins CG-NAP and kendrin provide microtubule nucleation sites by anchoring  $\gamma$ -tubulin ring complex." Molecular biology of the cell **13**(9): 3235-3245.

Tanaka, A., S. Weinel, N. Nagy, M. O'Driscoll, J. E. Lai-Cheong, C. L. Kulp-Shorten, A. Knable, G. Carpenter, S. A. Fisher and M. Hiragun (2012). "Germline mutation in ATR in autosomal-dominant oropharyngeal cancer syndrome." The American Journal of Human Genetics **90**(3): 511-517.

Tang, C.-J. C., R.-H. Fu, K.-S. Wu, W.-B. Hsu and T. K. Tang (2009). "CPAP is a cell-cycle regulated protein that controls centriole length." Nature Cell Biology **11**(7): 825-831.

Tapon, N., K. F. Harvey, D. W. Bell, D. C. Wahrer, T. A. Schiripo, D. A. Haber and I. K. Hariharan (2002). "salvador Promotes both cell cycle exit and apoptosis in Drosophila and is mutated in human cancer cell lines." Cell **110**(4): 467-478.

Tartaglia, M., E. L. Mehler, R. Goldberg, G. Zampino, H. G. Brunner, H. Kremer, I. van der Burgt, A. H. Crosby, A. Ion and S. Jeffery (2001). "Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome." Nature genetics **29**(4): 465-468.

Tartaglia, M., C. M. Niemeyer, A. Fragale, X. Song, J. Buechner, A. Jung, K. Hählen, H. Hasle, J. D. Licht and B. D. Gelb (2003). "Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia." Nature genetics **34**(2): 148-150.

Taybi, H. (1992). "Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism and cephalo-skeletal dysplasia (Taybi-Linder syndrome)." American journal of medical genetics **43**(3): 628-628.

Taybi, H. and D. Linder (1967). "Congenital Familial Dwarfism with Cephaloskeletal Dysplasia 1." Radiology **89**(2): 275-281.

Tekin, M., J. Ng and J. Bodurtha (2000). "A 17-month-old with extreme prenatal-onset growth delay." European journal of pediatrics **159**(12): 926-928.

Terhal, P., M. Ausems, Y. Van Bever, L. Ten Kate, P. Dijkstra and G. Kuijpers (2000). "Breast hypoplasia and disproportionate short stature in the ear, patella, short stature syndrome: expansion of the phenotype?" Journal of medical genetics **37**(9): 719-721.

Théau, D. and P. Maroteaux (1993). Nanisme microcéphalique primordial de type II: à propos d'un cas ayant terminé sa croissance. Annales de pédiatrie, Expansion scientifique publications.

Thomas, G. and M. N. Hall (1997). "TOR signalling and control of cell growth." Current opinion in cell biology **9**(6): 782-787.

Thomas, N. S., J. F. Harvey, D. J. Bunyan, J. Rankin, G. Grigelioniene, D. L. Bruno, T. Y. Tan, S. Tomkins and R. Hastings (2009). "Clinical and molecular characterization of duplications encompassing the human SHOX gene reveal a variable effect on stature." American Journal of Medical Genetics Part A **149**(7): 1407-1414.

Thomas, P. and N. Nevin (1976). Congenital familial dwarfism with cephalo-skeletal dysplasia. Annales de radiologie.

Thompson, E. and M. Pembrey (1985). "Seckel syndrome: an overdiagnosed syndrome." Journal of medical genetics **22**(3): 192-201.

Tibelius, A., J. Marhold, H. Zentgraf, C. E. Heilig, H. Neitzel, B. Ducommun, A. Rauch, A. D. Ho, J. Bartek and A. Krämer (2009). "Microcephalin and pericentrin regulate mitotic entry via centrosome-associated Chk1." The Journal of cell biology **185**(7): 1149-1157.

Tolmie, J. E. A. and P. Rimoin (1996). "Principles and practice of medical genetics." Churchill Livingstone: 2152.

Torres, T. T., M. Metta, B. Ottenwälder and C. Schlötterer (2008). "Gene expression profiling by massively parallel sequencing." Genome research **18**(1): 172-177.

Toudic, L., P. Maroteaux, Y. Castel, H. Guedard and P. Parent (1983). Hétérogénéité du syndrome de Seckel: à propos d'un cas. Annales de pédiatrie, Expansion scientifique publications.

Toudic, L., J. Roche and D. Alix (1977). "Nanisme intra-utérin majeur avec dysmorphies et encéphalopathie profonde de type nanisme à tête d'oiseau." Ann Pediatr **24**: 653-656.

Tsuchiya, H., S. Kobayashi, J. Cervenka, H. Mori and A. Oguro (1981). "Analysis of the dentition and orofacial skeleton in Seckel's bird-headed dwarfism." Journal of maxillofacial surgery **9**: 170-175.

Tsukahara, M. and J. M. Opitz (1996). "Dubowitz syndrome: review of 141 cases including 36 previously unreported patients." American journal of medical genetics **63**(1): 277-289.

Tsurusaki, Y., N. Okamoto, H. Ohashi, T. Kosho, Y. Imai, Y. Hibi-Ko, T. Kaname, K. Naritomi, H. Kawame and K. Wakui (2012). "Mutations affecting components of the SWI/SNF complex cause Coffin-Siris syndrome." Nature genetics **44**(4): 376-378.

Tufan, F., K. Cefle, S. Türkmen, A. Türkmen, U. Zorba, M. Dursun, S. Oztürk, S. Palandüz, T. Ecdar and S. Mundlos (2005). "Clinical and molecular characterization of two adults with autosomal recessive Robinow syndrome." American Journal of Medical Genetics Part A **136**(2): 185-189.

Uysal, S., A. Kalayci and K. Baysal (1999). "Cardiac functions in children with vitamin D deficiency rickets." Pediatric cardiology **20**(4): 283-286.

Vaara, P., E. Marttinen and J. Peltonen (1997). "Ultrasonography of the patellofemoral joint in diastrophic dysplasia." Journal of pediatric orthopaedics **17**(4): 512-515.

Van der Burgt, I. (2007). "Noonan syndrome." Orphanet journal of rare diseases **2**(1): 1.

van der Lelij, P., K. H. Chrzanowska, B. C. Godthelp, M. A. Rooimans, A. B. Oostra, M. Stumm, M. Z. Zdzienicka, H. Joenje and J. P. de Winter (2010). "Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChIR1." The American Journal of Human Genetics **86**(2): 262-266.

Van Dijk, F. and D. Silience (2014). "Osteogenesis imperfecta: clinical diagnosis, nomenclature and severity assessment." American Journal of Medical Genetics Part A **164**(6): 1470-1481.

van Dijk, F. S., J. M. Cobben, A. Kariminejad, A. Maugeri, P. G. Nikkels, R. R. van Rijn and G. Pals (2011). "Osteogenesis imperfecta: a review with clinical examples." Molecular syndromology **2**(1): 1-20.

Varelas, X., B. W. Miller, R. Sopko, S. Song, A. Gregorieff, F. A. Fellouse, R. Sakuma, T. Pawson, W. Hunziker and H. McNeill (2010). "The Hippo pathway regulates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling." Developmental cell **18**(4): 579-591.

Vasa-Nicotera, M., S. Brouillette, M. Mangino, J. R. Thompson, P. Braund, J.-R. Clemitson, A. Mason, C. L. Bodycote, S. M. Raleigh and E. Louis (2005). "Mapping of a major locus that determines telomere length in humans." The American Journal of Human Genetics **76**(1): 147-151.

Vatin, M., S. Bouvier, L. Bellazi, X. Montagutelli, P. Laissue, A. Ziyat, C. Serres, P. De Mazancourt, M.-N. Dieudonné and E. Mornet (2014). "Polymorphisms of human placental alkaline phosphatase are associated with in vitro fertilization success and recurrent pregnancy loss." The American journal of pathology **184**(2): 362-368.

Vatin, M., G. Burgio, G. Renault, P. Laissue, V. Firlej, F. Mondon, X. Montagutelli, D. Vaiman, C. Serres and A. Ziyat (2012). "Refined mapping of a quantitative trait locus on chromosome 1 responsible for mouse embryonic death." PloS one **7**(8): e43356.

Verloes, A., L. Lambrechts, J. Senterre and C. Lambotte (1987). "Microcephalic osteodysplastic dwarfism (Type II-like) in siblings." Clinical genetics **32**(2): 88-94.

Vichi, G., G. Currarino, R. Wasserman, P. Duvina and L. Filippi (2000). "Cephaloskeletal dysplasia (Taybi-Linder syndrome; osteodysplastic primordial dwarfism type III): report of two cases and review of the literature." Pediatric radiology **30**(9): 644-652.

Waldron, J. S., S. W. Hetts, J. Armstrong-Wells, C. F. Dowd, H. J. Fullerton, N. Gupta and M. T. Lawton (2009). "Multiple intracranial aneurysms and moyamoya disease associated with microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type II: surgical considerations: Report of 3 cases." Journal of Neurosurgery: Pediatrics **4**(5): 439-444.

Warcoin, M., J. Lespinasse, G. Despouy, C. Dubois d'Enghien, A. Laugé, M. F. Portnoï, S. Christin-Maitre, D. Stoppa-Lyonnet and M. Henri Stern (2009). "Fertility defects revealing germline biallelic nonsense NBN mutations." Human mutation **30**(3): 424-430.

Warman, M. L., V. Cormier-Daire, C. Hall, D. Krakow, R. Lachman, M. LeMerrer, G. Mortier, S. Mundlos, G. Nishimura and D. L. Rimoïn (2011). "Nosology and classification of genetic skeletal disorders: 2010 revision." American journal of medical genetics Part A **155**(5): 943-968.

Wegner, R.-D., K. Chrzanowska, K. Sperling and M. Stumm (1999). "Ataxia-telangiectasia variants (Nijmegen breakage syndrome)." Primary Immunodeficiency Diseases, a Molecular and Genetic Approach, Ochs HD, Smith CIE, Puck JM (eds) pp: 324-334.

Weigmann, K., S. M. Cohen and C. F. Lehner (1997). "Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* Cdc2 kinase." Development **124**(18): 3555-3563.

Weiner, D. S., D. Jonah and S. Kopits (2008). "The 3-dimensional configuration of the typical foot and ankle in diastrophic dysplasia." Journal of Pediatric Orthopaedics **28**(1): 60-67.

Weiner, D. S., D. Jonah and S. Kopits (2010). "The 3-dimensional configuration of the typical hip and knee in diastrophic dysplasia." Journal of Pediatric Orthopaedics **30**(4): 403-410.

Wellik, D. M. and M. R. Capecchi (2003). "Hox10 and Hox11 genes are required to globally pattern the mammalian skeleton." Science **301**(5631): 363-367.

Westman, J., E. Stover and C. Singley (1999). Microcephalic osteodysplastic primordial dwarfism type I in the Amish. AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, UNIV CHICAGO PRESS 5720 SOUTH WOODLAWN AVE, CHICAGO, IL 60637-1603 USA.

Wharton, B. and N. Bishop (2003). "Rickets." The Lancet **362**(9393): 1389-1400.

White, J., J. F. Mazzeu, A. Hoischen, S. N. Jhangiani, T. Gambin, M. C. Alcino, S. Penney, J. M. Saraiva, H. Hove and F. Skovby (2015). "DVL1 frameshift mutations clustering in the penultimate exon cause autosomal-dominant Robinow syndrome." The American Journal of Human Genetics **96**(4): 612-622.

Whittaker, A. J., I. Royzman and T. L. Orr-Weaver (2000). "Drosophila double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts." Genes & Development **14**(14): 1765-1776.

Wilcox, D., F. Quinn, C. Ng, C. Mireaux-Dicks and P. Mouriquand (1997). "Redefining the genital abnormality in the Robinow syndrome." The Journal of urology **157**(6): 2312-2314.

Willems, M., D. Genevieve, G. Borck, G. Baujat, M. Gerard, D. Heron, B. Leheup, M. Le Merrer, A. Verloes and L. Colleaux (2008). Pericentrin molecular analysis in 22 Seckel/MOPDII patients. 58th Annual Meeting, American Society of Human Genetics, Philadelphia, PA.

Willems, M., D. Genevieve, G. Borck, C. Baumann, G. Baujat, E. Bieth, P. Edery, C. Farra, M. Gerard and D. Héron (2009). "Molecular analysis of Pericentrin gene (PCNT) in a series of 24 Seckel/MOPD II families." Journal of medical genetics: jmg. 2009.067298.

Willems, P. J., C. Rouwé, G. P. A. Smit, J. M. Opitz and J. F. Reynolds (1987). "A new case of the osteodysplastic primordial dwarfism type II." American journal of medical genetics **26**(4): 819-824.

Winter, R., J. Wigglesworth, B. Harding, J. M. Opitz and J. F. Reynolds (1985). "Osteodysplastic primordial dwarfism: report of a further patient with manifestations similar to those seen in patients with types I and III." American journal of medical genetics **21**(3): 569-574.

Wohlschlegel, J. A., B. T. Dwyer, S. K. Dhar, C. Cvetic, J. C. Walter and A. Dutta (2000). "Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1." Science **290**(5500): 2309-2312.

Wollmann, H., T. Kirchner, H. Enders, M. Preece and M. Ranke (1995). "Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients." European journal of pediatrics **154**(12): 958-968.

Wong, A., P. A. Ormonde, R. Pero, Y. Chen, L. Lian, G. Salada, S. Berry, Q. Lawrence, P. Dayananth and P. Ha (1998). "Characterization of a carboxy-terminal BRCA1 interacting protein." Oncogene **17**(18): 2279-2285.

Wong, C. C., K. E. Loewke, N. L. Bossert, B. Behr, C. J. De Jonge, T. M. Baer and R. A. R. Pera (2010). "Non-invasive imaging of human embryos before embryonic genome activation predicts development to the blastocyst stage." Nature biotechnology **28**(10): 1115-1121.

Wood, J. W., K. G. Johnson and Y. Omori (1967). "IN UTERO EXPOSURE TO THE HIROSHIMA ATOMIC BOMB An Evaluation of Head Size and Mental Retardation: Twenty Years Later." Pediatrics **39**(3): 385-392.

Woods, C. G., J. Bond and W. Enard (2005). "Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): a review of clinical, molecular, and evolutionary findings." The American Journal of Human Genetics **76**(5): 717-728.

Wullschlegel, S., R. Loewith and M. N. Hall (2006). "TOR signaling in growth and metabolism." Cell **124**(3): 471-484.

Wynn, J., T. M. King, M. J. Gambello, D. K. Waller and J. T. Hecht (2007). "Mortality in achondroplasia study: A 42-year follow-up." American Journal of Medical Genetics Part A **143**(21): 2502-2511.

Wynne-Davies, R. and M. Patton (1991). "The frequency of mental retardation in hypochondroplasia." Journal of medical genetics **28**(9): 644.

Yamamoto, T., M. Ebisuya, F. Ashida, K. Okamoto, S. Yonehara and E. Nishida (2006). "Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression." Current Biology **16**(12): 1171-1182.

Yamatogi, Y. and S. Ohtahara (2002). "Early-infantile epileptic encephalopathy with suppression-bursts, Ohtahara syndrome; its overview referring to our 16 cases." Brain and Development **24**(1): 13-23.

Yan, Z., J. DeGregori, R. Shohet, G. Leone, B. Stillman, J. R. Nevins and R. S. Williams (1998). "Cdc6 is regulated by E2F and is essential for DNA replication in mammalian cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(7): 3603-3608.

Yu, X. and R. Baer (2000). "Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor." Journal of Biological Chemistry **275**(24): 18541-18549.

Zetterberg, A., W. Engström and E. Dafgård (1984). "The relative effects of different types of growth factors on DNA replication, mitosis, and cellular enlargement." Cytometry **5**(4): 368-375.

Zhao, B., L. Li and K.-L. Guan (2010). "Hippo signaling at a glance." Journal of cell science **123**(23): 4001-4006.

Zhao, L., C. Jin, Y. Chu, C. Varghese, S. Hua, F. Yan, Y. Miao, J. Liu, D. Mann and X. Ding (2010). "Dimerization of CPAP orchestrates centrosome cohesion plasticity." Journal of Biological Chemistry **285**(4): 2488-2497.

Zimmerman, W. C., J. Sillibourne, J. Rosa and S. J. Doxey (2004). "Mitosis-specific anchoring of  $\gamma$  tubulin complexes by pericentrin controls spindle organization and mitotic entry." Molecular biology of the cell **15**(8): 3642-3657.

Zinn, A. R., F. Wei, L. Zhang, F. F. Elder, C. I. Scott, P. Marttila and J. L. Ross (2002). "Complete SHOX deficiency causes Langer mesomelic dysplasia." American journal of medical genetics **110**(2): 158-163.

Ziosi, M., L. A. Baena-López, D. Grifoni, F. Froidi, A. Pession, F. Garoia, V. Trotta, P. Bellosta, S. Cavicchi and A. Pession (2010). "dMyc functions downstream of Yorkie to promote the supercompetitive behavior of hippo pathway mutant cells."

Zou, L. and S. J. Elledge (2003). "Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes." Science **300**(5625): 1542-1548.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1. *Primers de amplificación del gen PCNT*

Exón/Tamaño del amplicón	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i>
Exón 1 (704 pb)	Forward-HuPCNTex1-1F	5'GCTGTCCTGGTGGACACAAAGC3'
Exón 1 (704 pb)	Reverse-HuPCNTex1-1R	5'GCCGCTGATTGGCTGTGG3'
Exón 2 (807 pb)	Forward-HuPCNTex2-1F	5'TCAGCCGTATGGTTTTCTTTACCA3'
Exón 2 (807 pb)	Reverse-HuPCNTex2-1R	5'CCTCTGCCTCACAAAGTTGAAGCTA3'
Exón 3 (838 pb)	Forward-HuPCNTex3-1F	5'GAGATTGCAGTGAGCTGAGATTGT3'
Exón 3 (838 pb)	Reverse-HuPCNTex3-1R	5'CCATTCACAGGCAACACTAAGAAC3'
Exón 4 (530 pb)	Forward-HuPCNTex4-1F	5'TGATGTAAACGGAACCTCACCATA3'
Exón 4 (530 pb)	Reverse-HuPCNTex4-1R	5'AGAACGTGGAAACAGACAACTCAG3'
Exón 5 (654 pb)	Forward-HuPCNTex5-1F	5'CCACATGAATGACACACTGACCT3'
Exón 5 (654 pb)	Reverse-HuPCNTex5-1R	5'CAAGAGGGAACAGGCACTAGAATG3'
Exón 6 (422 pb)	Forward-HuPCNTex6-1F	5'ATTAAGCCAAGCATCATCACAGA3'
Exón 6 (422 pb)	Reverse-HuPCNTex6-1R	5'ATGCAAGTCAATGTGAAACAACAA3'
Exón 7 (537 pb)	Forward-HuPCNTex7-1F	5'CTCTCAAAGTGCTGGGATTAGAGG3'
Exón 7 (537 pb)	Reverse-HuPCNTex7-1R	5'CAACTGAACATGCCAAGAAAAATC3'
Exón 8 (508 pb)	Forward-HuPCNTex8-1F	5'CATTATTGTCACTGAGGTCGCTGT3'
Exón 8 (508 pb)	Reverse-HuPCNTex8-1R	5'AACCTCCACCTCCTAGGTTCAAG3'
Exón 9 (612 pb)	Forward-HuPCNTex9-1F	5'TATGTATGACCCTAAACCGAAGCA3'
Exón 9 (612 pb)	Reverse-HuPCNTex9-1R	5'CACTTTCAAACCAGACACCTCAAC3'

Exón 10 (725 pb)	Forward-HuPCNTex10-1F	5'CAACCTGATGAGCCTGCTTCTG3'
Exón 10 (725 pb)	Reverse-HuPCNTex10-1R	5'TGCCTGTGTCATCTTTTAAATCTGG3'
Exón 11 (613 pb)	Forward-HuPCNTex11-1F	5'GAGAGAGACAGAGAGAGAGTCAGTG3'
Exón 11 (613 pb)	Reverse-HuPCNTex11-1R	5'ACTGTCAAGTCTGACGAATGCAG3'
Exón 12 (571 pb)	Forward-HuPCNTex12-1F	5'TGCCACCAATTCTTGTATGTCTTC3'
Exón 12 (571 pb)	Reverse-HuPCNTex12-1R	5'CATCAGGACACACTCTGTTGAGGT3'
Exón 13 (572 pb)	Forward-HuPCNTex13-1F	5'AAAGGGAGGGGAGACTTGAGAG3'
Exón 13 (572 pb)	Reverse-HuPCNTex13-1R	5'CATTGCCAGGAATAGTTTCAAGAAT3'
Exón 14 (564 pb)	Forward-HuPCNTex14-1F	5'CTTCCATTAGCGTCTTTCCTCCTA3'
Exón 14 (564 pb)	Reverse-HuPCNTex14-1R	5'ACCTTCTACCCTCCAAGGTGTCT3'
Exón 15 (850 pb)	Forward-HuPCNTex15-1F	5'GAAACGATGACCTGAACAGTTGAA3'
Exón 15 (850 pb)	Reverse-HuPCNTex15-1R	5'AAAAAGCCCAGTTCACAAAGAGAC3'
Exón 16 (562 pb)	Forward-HuPCNTex16-1F	5'CCTTGATGGTGAACCTTCTTAGTGTG3'
Exón 16 (562 pb)	Reverse-HuPCNTex16-1R	5'CCACTGAACTGTGCACTGAAATAA3'
Exón 17 (606 pb)	Forward-HuPCNTex17-1F	5'ACTTTAATCAGCACCTCGTTCAC3'
Exón 17 (606 pb)	Reverse-HuPCNTex17-1R	5'CCCGGTGCTTACAATCTTTCTAAC3'
Exón 18 (477 pb)	Forward-HuPCNTex18-1F	5'TGTGATGCCTTTTACACATCAGAA3'
Exón 18 (477 pb)	Reverse-HuPCNTex18-1R	5'AGAGAGCTCCAGGACCACAGAG3'
Exón 19 (602 pb)	Forward-HuPCNTex19-1F	5'TGCTAGTTTCCGCACTTACAGAAG3'
Exón 19 (602 pb)	Reverse-HuPCNTex19-1R	5'CAGATTCTCTCATTCGTAGCAAGC3'
Exón 20 (506 pb)	Forward-HuPCNTex20-1F	5'GAGTGTCTGGAGGAAGGGAGAG3'
Exón 20 (506 pb)	Reverse-HuPCNTex20-1R	5'AAAACCCTATTCTGAAGGCTTCCT3'
Exón 21 (604 pb)	Forward-HuPCNTex21-1F	5'CTCTTAGCTCTGCTGCTCTCAGG3'

Exón 21 (604 pb)	Reverse-HuPCNTex21-1R	5'GTTGGACTCAGAGCCCCTCTTAT3'
Exón 22 (605 pb)	Forward-HuPCNTex22-1F	5'GCTTAGTCGTGTGTTTCTGTCTGG3'
Exón 22 (605 pb)	Reverse-HuPCNTex22-1R	5'GCCCTCTTCAACATCCTACTGC3'
Exón 23/24 (577 pb)	Forward-HuPCNTex2324-1F	5'AGTCTCAGACGTTTCTCTGTGTTC3'
Exón 23/24 (577 pb)	Reverse-HuPCNTex2324-1R	5'CAAACAAGAGCAAGAAAAGCGAGT3'
Exón 25 (740 pb)	Forward-HuPCNTex25-1F	5'TAGGTCTCCCTTTGGGTCTAGG3'
Exón 25 (740 pb)	Reverse-HuPCNTex25-1R	5'GGATAAATTCAGAGTTCTTGAGACA3'
Exón 26 (646 pb)	Forward-HuPCNTex26-1F	5'TTTGGCAAGTTCTTGTCAGTTTTG3'
Exón 26 (646 pb)	Reverse-HuPCNTex26-1R	5'GAGCAAAACTCTGTCTCAAACAACA3'
Exón 27 (483 pb)	Forward-HuPCNTex27-1F	5'CTCTCAAAGTGCTGGGATTACAGG3'
Exón 27 (483 pb)	Reverse-HuPCNTex27-1R	5'CGTCTGTGAAGACCAGAGACTCG3'
Exón 28 (1068 pb)	Forward-HuPCNTex28-1F	5'TGTTTTTCACGCTATGGAGTCTTC3'
Exón 28 (1068 pb)	Reverse-HuPCNTex28-1R	5'TCATTGACATCAAAGGAGAAAAGG3'
Exón 29 (379 pb)	Forward-HuPCNTex29-1F	5'GCTCTGTGGGGTCGTCCTGG3'
Exón 29 (379 pb)	Reverse-HuPCNTex29-1R	5'CTTGCCGCGTCCTCCAGAC3'
Exón 30 (1029 pb)	Forward-HuPCNTex30-1F	5'GAAACTCCCTGAAATCCACTCATT3'
Exón 30 (1029 pb)	Reverse-HuPCNTex30-1R	5'AAATAATCTAAATGCGCCCATGAT3'
Exón 31 (421 pb)	Forward-HuPCNTex31-1F	5'CCATATACTATCATTTTCATGCAAAACAA3
Exón 31 (421 pb)	Reverse-HuPCNTex31-1R	5'TTCTGTGCTAGGAAACCACTGAAA3'
Exón 32 (550 pb)	Forward-HuPCNTex32-1F	5'AATCAGGGACTCAGGTGATGTTCT3'
Exón 32 (550 pb)	Reverse-HuPCNTex32-1R	5'GTGAGTCATTAATAATGCAGGTGCT3'
Exón 33 (457 pb)	Forward-HuPCNTex33-1F	5'GCCATCTTTGGAGTGGCTATAGA3'
Exón 33 (457 pb)	Reverse-HuPCNTex33-1R	5'ACCACAAGCTCCTTAAATCCTTTG3'

Exón 34 (531 pb)	Forward-HuPCNTex34-1F	5'CAGACATTGATTTACCTGTTGTG3'
Exón 34 (531 pb)	Reverse-HuPCNTex34-1R	5'AAACAGTCTGTGTCACCCTCTCTG3'
Exón 35 (651 pb)	Forward-HuPCNTex35-1F	5'GAAACGTTCTCCATTCCAAGTAGC3'
Exón 35 (651 pb)	Reverse-HuPCNTex35-1R	5'CTTGACTAGATGATGCCCTGTCAC3'
Exón 36/37 (970 pb)	Forward-HuPCNTex3637-1F	5'GCAGTGAAAGCTTCTAGTCCACAG3'
Exón 36/37 (970 pb)	Reverse-HuPCNTex3637-1R	5'CCACTACACCAAGGTGCAATTTTA3'
Exón 38 (996 pb)	Forward-HuPCNTex38-1F	5'AATGTTGTCCCTACATGTGGCTAA3'
Exón 38 (996 pb)	Reverse-HuPCNTex38-1R	5'CACCACACTGCTGTTACTGTAGCTT3'
Exón 39 (608 pb)	Forward-HuPCNTex39-1F	5'ATCCTCTCGAGTAGCTGGGACTAC3'
Exón 39 (608 pb)	Reverse-HuPCNTex39-1R	5'AGCGTTAAGTGCAAAGGAGCAG3'
Exón 40 (475 pb)	Forward-HuPCNTex40-1F	5'AAATCATTCATTCCAGAGGAAAGC3'
Exón 40 (475 pb)	Reverse-HuPCNTex40-1R	5'AAGCGTGAAAAAGAACCACAAAG3'
Exón 41 (598 pb)	Forward-HuPCNTex41-1F	5'CCACCTGTTAATTTTCAGTGCTGTT3'
Exón 41 (598 pb)	Reverse-HuPCNTex41-1R	5'CATTTAGCAAGGCTTCAGACAGAG3'
Exón 42 (483 pb)	Forward-HuPCNTex42-1F	5'TGAATTTGGGGTGATTTTACAAAG3'
Exón 42 (483 pb)	Reverse-HuPCNTex42-1R	5'AATTTGCAAACCCAGGACTTAAAA3'
Exón 43 (611 pb)	Forward-HuPCNTex43-1F	5'CTTACCTAAGGGGTGAAATGCAAG3'
Exón 43 (611 pb)	Reverse-HuPCNTex43-1R	5'TGGAGTTTCAAGGAATAAAATGACC3'
Exón 44 (611 pb)	Forward-HuPCNTex44-1F	5'CTGACTTTGAACTGGAGTCGTCCT3'
Exón 44 (611 pb)	Reverse-HuPCNTex44-1R	5'CCCTGTGACCTGTGTTTCATAGC3'
Exón 45 (560 pb)	Forward-HuPCNTex45-1F	5'CAGCTCCTCAGAGCGGATAGAG3'
Exón 45 (560 pb)	Reverse-HuPCNTex45-1R	5'GACTCACGCTGGAGAGTTTCCT3'
Exón 46 (606 pb)	Forward-HuPCNTex46-1F	5'TCGAAGATGTAGCAAGCAAAGTAA3'

Exón 46 (606 pb)	Reverse-HuPCNTex46-1R	5'CCAGACGGTGATTAAGTCAAACCTG3'
Exón 47 (367 pb)	Forward-HuPCNTex47-1F	5'CATGAATTCAGTGATAGTGTTTCAA3'
Exón 47 (367 pb)	Reverse-HuPCNTex47-1R	5'GAAGGTCATGGGCCTAAAACATA3'

**9.2. Anexo 2. Programas de PCR para la amplificación de todos los exones del gen *PCNT***

**Tabla 7.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 32, 34, 35, 41, 43, 44, 45 y 46

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 30</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	61°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	45 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 8.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 6, 18, 29, 31, 33, 40, 42 y 47

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 30</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	61°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	35 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 9.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 2, 15, 28, 30, 36, 37, 38

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 30</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	61°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	70 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 10.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 14 y 22

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 30</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	55°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	45 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 11.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 1 y 8

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 35</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	65°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	45 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 12.** Programa de PCR para la amplificación de los exones 7 y 39

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 35</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	67°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	45 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 13.** Programa de PCR para la amplificación del exón 3

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 35</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	67°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	70 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 minutos

**Tabla 14.** Programa de PCR para la amplificación del exón 27

<b>Programa Termociclador: MJ Research PTC-100®</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	10 minutos
<b>Número de ciclos: 35</b>		
<b>Desnaturalización</b>	95°C	40 segundos
<b>Anillamiento</b>	63°C	40 segundos
<b>Elongación</b>	72°C	35 segundos
<b>Elongación final</b>	72°C	10 inutos

### 9.3. Anexo 3. *Primers* de secuenciación del gen *PCNT*

<b>Exón</b>	<b>Nombre del <i>primer</i></b>	<b>Secuencia del <i>primer</i></b>
Exón 1	Forward-HuPCNTex1-Seq1F	5'CTTACTGGTCCTGCCGTAGGAG3'
Exón 2	Forward-HuPCNTex2-Seq1F	5'GTCCTCATTGTTAGACCCCTTGG3'
Exón 3	Forward-HuPCNTex3-Seq1F	5'GAGAGAAGAGAGAGAGACTTGGAA3'
Exón 3	Reverse-HuPCNTex3-Seq1R	5'GCTGGGTGGTCACTGATTGTGAAG3'
Exón 4	Forward-HuPCNTex4-Seq1F	5'CGTTTGTTC AACCATT CATCCC3'
Exón 5	Forward-HuPCNTex5-Seq1F	5'CTCAGTGGCATCCGGGCCTCTG3'
Exón 5	Reverse-HuPCNTex5-Seq1R	5'CACCGAGCCCACACGCTGCCCGTG3'
Exón 6	Reverse-HuPCNTex6-Seq1R	5'CAAAGAACGCAATACACTTTC AAC3'
Exón 7	Reverse-HuPCNTex7-Seq1R	5'CCTGTGACCCATGACGGCCACC3'
Exón 8	Reverse-HuPCNTex8-Seq1R	5'CCTCCCAAAGTGATAGAGTTACAG3'

Exón 9	Forward-HuPCNTex9-Seq1F	5'CGGTCTCTGCTGTGGCTGGCTTTC3'
Exón 10	Forward-HuPCNTex10-Seq1F	5'CGAGTGCTGCTTTTGCTCCCAGC3'
Exón 10	Reverse-HuPCNTex10-Seq1R	5'CTTCCACAGAGTCCAGAAGAGC3'
Exón 11	Forward-HuPCNTex11-Seq1F	5'GTGACTGCCACGGCTCCCCGCAC3'
Exón 12	Forward-HuPCNTex12-Seq1F	5'CACGCCAGTGGGCTGGCGGGGTTC3'
Exón 13	Forward-HuPCNTex13-Seq1F	5'GAGCTTGAAAATCCACAGTGTCTG3'
Exón 14	Forward-HuPCNTex14-Seq1F	5'CGGGAAGCTGAGGAGAAGTTAAC3'
Exón 14	Forward-HuPCNTex14-Seq2F	5'GGACCAACAGGCAGCCCAGATCC3'
Exón 14	Reverse-HuPCNTex14-Seq1R	5'CAGGGCGTCGTCTGAAGTGAGGTC3'
Exón 15	Forward-HuPCNTex15-Seq1F	5'GCTGCAGCTCCTCCAGGAGAGAC3'
Exón 15	Forward-HuPCNTex15-Seq2F	5'GCTCTGGAGACCAGACATCTGTC3'
Exón 15	Reverse-HuPCNTex15-Seq1R	5'CTGGTCTCCAGAGCGCCGAGGTC3'
Exón 16	Forward-HuPCNTex16-Seq1F	5'GATGGGGGCTGTGGTCTGGCTC3'
Exón 17	Forward-HuPCNTex17-Seq1F	5'GCCTGCTCCTTTTGCCCCATCAC3'
Exón 18	Forward-HuPCNTex18-Seq1F	5'CTGTGGCCTCAGCTTCCTGTGCTC3'
Exón 19	Forward-HuPCNTex19-Seq1F	5'GGGTTTGGGCTAAATTTGTCAGC3'
Exón 20	Forward-HuPCNTex20-Seq1F	5'GACTGTGGCCACAGTGTCTCGGAG3'
Exón 21	Reverse-HuPCNTex21-Seq1R	5'GCAGGACCGACAGACAACCCGC3'
Exón 22	Forward-HuPCNTex22-Seq1F	5'CAATGTTGTTTTAAAAGATGGGCG3'
Exón 23/24	Forward-HuPCNTex2324- Seq1F	5'CTCCATTTTACAAAGTGAAGTGTG3'
Exón 25	Forward-HuPCNTex25-Seq1F	5'CTCCCTTTGGGTCTAGGGGAGG3'
Exón 26	Forward-HuPCNTex26-Seq1F	5'GAGCAAAACTCTGTCTCAAACAACA3'

Exón 27	Forward-HuPCNTex27-Seq1F	5'GACCACTGTGTATTCTTTGCAG3'
Exón 28	Forward-HuPCNTex28-Seq1F	5'CAGAAGTTCTGAGATTGAAGAG3'
Exón 28	Forward-HuPCNTex28-Seq2F	5'GCCCTACAGGGCGAGCTCGAGGC3'
Exón 28	Forward-HuPCNTex28-Seq3F	5'GACGATTGCCGAGAGAAATTTAG3'
Exón 28	Forward-HuPCNTex28-Seq4F	5'GCCTCAGCCGCCAGCTGCAGGTG3'
Exón 28	Reverse-HuPCNTex28-Seq1R	5'GGGCCTCCAGGGCCTGGCTGTGC3'
Exón 29	Reverse-HuPCNTex29-Seq1R	5'CATGTGGCCTGCTGTGGACC3'
Exón 30	Forward-HuPCNTex30-Seq1F	5'GAAAAAGTACTGGAAGATTGTC3'
Exón 30	Forward-HuPCNTex30-Seq2F	5'GTGATGATTCCTGTGACGGAG3'
Exón 30	Forward-HuPCNTex30-Seq3F	5'CCGACCAGCGTACTTGGTGGCTC3'
Exón 30	Forward-HuPCNTex30-Seq4F	5'CTGAGCCTGTGCAGTGCCGACAC3'
Exón 30	Reverse-HuPCNTex30-Seq1R	5'CATCAGTTACACCCCCGTGGC3'
Exón 31	Forward-HuPCNTex31-Seq1F	5'GTTGGAAGCATTTCGACCTGTGTG3'
Exón 32	Forward-HuPCNTex32-Seq1F	5'GTTTTTATGAAGCATTTTTGGG3'
Exón 33	Forward-HuPCNTex33-Seq1F	5'GAGAAGTGGGTGCCGCCTGTAC3'
Exón 34	Forward-HuPCNTex34-Seq1F	5'GCGGACAGCGTCTCCGTGCTGTG3'
Exón 35	Forward-HuPCNTex35-Seq1F	5'GCCCAGCCCTGACGCCTGCAGGC3'
Exón 36	Reverse-HuPCNTex36-Seq1R	5'CACACGTGTGCTTCACCCCCAC3'
Exón 37	Forward-HuPCNTex37-Seq1F	5'CTGCTGTCCCTGGGTTGATAATC3'
Exón 38	Forward-HuPCNTex38-Seq1F	5'GTCTTTGGAGACACAGCGTGCTC3'
Exón 38	Forward-HuPCNTex38-Seq2F	5'GAGCCGCACCCTGGAGCTGTCAG3'
Exón 38	Forward-HuPCNTex38-Seq3F	5'GGTGCAGCAGCAAGCCCTGCATTC3'
Exón 38	Forward-HuPCNTex38-Seq4F	5'GCACACCCAAAAACGAGAGCTG3'

Exón 38	Reverse-HuPCNTex38-Seq1R	5'GTGTCCTCTGGCTCAGCTGCTC3'
Exón 39	Forward-HuPCNTex39-Seq1F	5'GGTCTCAATCTCCTGACCTCATG3'
Exón 40	Forward-HuPCNTex40-Seq1F	5'GCCCCCGTGGGCCCTGGCTCTG3'
Exón 41	Forward-HuPCNTex41-Seq1F	5'CGTGCAAAGTCTGTGATTCAATG3'
Exón 42	Forward-HuPCNTex42-Seq1F	5'CAGCACGGCGTAACCTAGGCC3'
Exón 43	Forward-HuPCNTex43-Seq1F	5'GTTGTTTCTGGCCACAGATACTG3'
Exón 44	Forward-HuPCNTex44-Seq1F	5'CGAGTCAACAGACTGGCCGACCTTG3'
Exón 45	Forward-HuPCNTex45-Seq1F	5'GTACCTTGAGCACTTTAAAAATG3'
Exón 46	Reverse-HuPCNTex46-Seq1R	5'CAGCACGTATCACTGAGTACACTG3'
Exón 47	Reverse-HuPCNTex47-Seq1R	5'GCTCCAGCTGGCTTTGCAGTCAT3'

#### 9.4. Anexo 4 – Tabla de resumen de los genes evaluados según revisión

##### **bibliográfica y paneles descritos para microcefalia y síndromes asociados con enanismo esencial**

Microcefalia primaria autosómica recesiva (MCPH) (Woods, Bond et al. 2005)	<i>ASPM, CDK5RAP2, CDK6, CEP135, KNLI, MCPH1, STIL, WDR62</i>
Síndrome de Seckel o fenotipos intermedios con MCPH (Willems, Genevieve et al. 2008, Willems, Genevieve et al. 2009, Pagon, Adam et al. 2013)	<i>ATR, ATRIP, CENPJ, CEP63, CEP152, NIN, PHC1, RBBP8</i>
Nuevos genes asociados con enanismo esencial (Shaheen, Faqeih et al. 2014)	<i>BRCA2, CRIPT, CUL7, DNA2, IGF1, XRCC4</i>
Paneles para MCPH (Bioscientia, Biotecgen, CAGT, CeGaT, Centogene, CGC Genetics, Emory, LabGenetics, Sistemas genómicos, UChicago)	<i>AGMO, ARFGEF2, ASPM, ASXL3, ATR, ATRX, CASC5, CASK, CDC6, CDK5RAP2, CDK6, CDKL5, CDT1, CENPE, CENPF, CENPJ, CEP135, CEP152, CEP63, CIT, CRIPT, CTNNB1, DIAPH1, DYRK1A, EFTUD2, EIF2S3, FOXG1, IER3IP1, KATNB1, KIAA1279, KIF11, LIG4, MCPH1, MECP2, MED17, MFSD2A, NBN, NDE1, NHEJ1, NIN, ORC1, ORC4, ORC6, PCNT, PHC1, PLK4, PNKP, PPP1R15B, PQBP1,</i>

	<i>PYCR2, QARS, RAB18, RAB3GAP1, RAB3GAP2, RBBP8, SASS6, SLC1A4, SLC25A19, SLC2A1, SLC9A6, SOX11, SPATA5, STAMBP, STIL, TBC1D20, TCF4, TRAPPC9, TRMT10A, TSEN2, TSEN34, TSEN54, TUBGCP4, TUBGCP6, UBE3A, USP18, WDR62, WWOX, ZEB2, ZNF335</i>
Paneles para enanismo esencial (Bioscientia, Biotecgen, CAGT, CeGaT, Centogene, CGC Genetics, Emory, LabGenetics, Sistemas genómicos, UChicago)	<i>ATR, CCDC8, CDC6, CDK5RAP2, CDT1, CENPJ, CEP152, CEP63, CRIPT, CUL7, DNA2, GMNN, LARP7, LIG4, NIN, OBSL1, ORC1, ORC4, ORC6, PCNT, PLK4, POC1A, RBBP8, RNU4ATAC, RTTN, TRAI, TRIM37, XRCC4</i>
Síndrome 3M (Huber, Delezoide et al. 2009)	<i>CCDC8, CUL7, OBSL1</i>
Paneles para microcefalia (Bioscientia, Biotecgen, CAGT, CeGaT, Centogene, CGC Genetics, Emory, LabGenetics, Sistemas genómicos, UChicago)	<i>AKT3, BUB1B, CASK, CDK5RAP2, CENPJ, CEP135, CEP152, CEP63, DNM1L, EFTUD2, IER3IP1, KIF11, LIG4, MCPHI, MED17, MRE11, MSMO1, NDE1, NHEJ1, NR2E1, PAFAH1B1, PCNT, PNKP, POMT1, PQBP1, RARS2, SLC25A19, STIL, TSEN2, TSEN34, TSEN54, TUBB2B, TUBGCP6, VRK1, WDR62</i>
Genes que participan en la vía de falla en el crecimiento del enanismo esencial (Klingseisen and Jackson 2011).	<i>ATR, CDC6, CDT1, CEP152, CPAP, ORC1, ORC4, ORC6, PCNT, U4ATAC</i>
Genes esenciales para la división celular en células humanas (Neumann, Walter et al. 2010).	<i>AD024, AP1S1, ATP6VID, CASP8AP2, CDC16, CENPE, CKLFSF4, CLDN16, DDX48, DDX5, DDX11, DHX8, DKFZP564M082, EIF3S3, EIF3S10, FLJ10290, FLJ20311, FLJ30851, FLJ38663, GALNT5, HRI, ITPR1, KIAA0056, KIF11, KPNB1, LSM6, MFAP1, MGC2603, MGC3248, PSCD3, RRM2, SART1, SNRPA1, SNRPB, SNW1, VCP, ZDHHC5</i>