



TRABAJO DE FIN DE GRADO

CASO CLÍNICO: SÍNDROME
CORNELIA DE LANGE
MUTACIÓN SMC1A

TUTOR: JUAN PIÉ JUSTE



Rivera Pinillos, Jaime
6º Grado de Medicina
Grupo II

Índice:

1. Resumen

2. Introducción

2.1 Bases moleculares del SCdL

2.2 Manifestaciones clínicas del SCdL

- Manifestaciones craneofaciales
- Alteraciones del crecimiento y la pubertad
- Discapacidad intelectual y fenotipo conductual
- Manifestaciones musculoesqueléticas
- Manifestaciones neurosensoriales
- Manifestaciones gastrointestinales
- Manifestaciones cardiovasculares
- Manifestaciones genitourinarias
- Manifestaciones cutáneas
- Hallazgos paraclínicos

2.3 Relaciones genotipo fenotipo

3. Objetivos

4. Material y métodos

4.1 Obtención de muestras

4.2 Métodos de laboratorio

- Obtención de ADN
- Diseño de primers
- Amplificación de exones
- Electroforesis en gel de agarosa
- Purificación
- Secuenciación Sanger

4.3 Métodos Clínicos

- Historia Clínica
- Clasificación de Gillis
- Clasificación de Kline

5. Resultados

6. Discusión

7. Conclusiones

8. Bibliografía

1. Resumen/Abstract

Los desórdenes causados por mutaciones en los genes codificantes de las subunidades y de las proteínas reguladoras del complejo de cohesinas, son llamados colectivamente cohesinopatías. La más conocida es el Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL), la cual es un desorden multisistémico del desarrollo caracterizado por dismorfia facial, malformaciones en las extremidades, alteraciones cognitivas y del crecimiento. Mutaciones en cinco genes, subunidades codificantes del complejo de cohesinas (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*) y sus reguladores (*NIPBL*, *HDAC8*), son responsables de aproximadamente el 70% de los casos de SCdL. Aquí, se describe un varón con dismorfia facial, sinofridia, retraso en el crecimiento, discapacidad intelectual, marcada ERGE y comunicación interauricular. El estudio se centra en el gen *SMC1A*, su diagnóstico clínico y el procedimiento para su diagnóstico molecular. En este sentido, se realiza una comparación clínica entre nuestro paciente y los previamente reportados con mutaciones *SMC1A* y *NIPBL* a fin de establecer el fenotipo característico de este gen, que facilite su diagnóstico clínico y molecular.

The disorders caused by mutations in genes encoding subunits and accessory proteins of cohesin complex are collectively termed as cohesinopathies. The best known cohesinopathy is Cornelia de Lange Syndrome (CdLS), which is a multisystem developmental disorder characterized by facial dysmorphism, limb malformations, growth and cognitive impairment. Mutations in five genes, encoding subunits of the cohesin complex (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*) and its regulators (*NIPBL*, *HDAC8*), are responsible for about 70% of CdLS cases. Here, we describe a male case with facial dysmorphism, synophrys, growth retardation, intellectual impairment, important GER and interatrial communication. The study focuses on gen *SMC1A*, its clinical diagnosis and the procedure to its molecular diagnosis. In this sense, a clinical comparison was made between our case and the ones previously reported with *SMC1A* and *NIPBL* mutations in order to establish the characteristic phenotype of this gene which would facilitate its clinical and molecular diagnosis.

2. Introducción

El Síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) es un raro trastorno genéticamente heterogéneo que afecta a múltiples órganos y sistemas. Los primeros casos, fueron documentados por los anatomistas holandeses Gerardus y Willem Vrolik en 1849, más tarde por el médico alemán Brachmann en 1916, seguido por el pediatra holandés Cornelia de Lange en 1933, a quien el síndrome debe su nombre, ya que fue el primero en describirlo como una entidad clínica (1-3).

El SCdL es un trastorno clínico variable, caracterizado principalmente por retraso psicomotor y discapacidad intelectual (con problemas de comportamiento y neurológicos), microcefalia, rasgos faciales distintivos, retraso del crecimiento pre y post natal, hirsutismo y malformaciones de los miembros superiores fundamentalmente (desde manos pequeñas a graves defectos de reducción de los antebrazos) (4). Adicionalmente, las manifestaciones sistémicas incluyen las cardíacas, gastrointestinales y del aparato locomotor, así como la pérdida de audición y anomalías genitourinarias. (Figura 1). (3)

La incidencia se estima en 1:10000 – 1:30000 nacidos vivos, pero la incidencia exacta se desconoce ya que los casos más leves son susceptibles de ser subdiagnosticados (3,5). Hasta la fecha, cinco genes (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*) se han asociado con SCdL.

2.1 Bases moleculares del síndrome

El SCdL se incluye dentro de un complejo conjunto de patologías que se conocen como cohesinopatías. Todas ellas tienen como base molecular alteraciones en el complejo cohesina o en alguno de sus factores reguladores. Éstas incluyen: el Síndrome de Roberts, el Síndrome de rotura cromosómica de Varsovia, el síndrome KBG y, el más importante de todos, el Síndrome Cornelia de Lange. (1)

El SCdL no sólo muestra clínica, sino también la heterogeneidad genética y, hasta ahora, se han identificado variaciones patogénicas de la secuencia de ADN que conducen al SCdL en cinco genes: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*. Las mutaciones en *NIPBL*, *SMC3* y *RAD21* llevan a la forma autosómica dominante del SCdL (AD-CdLS), mientras que los genes causantes de SCdL ligadas al cromosoma X son *SMC1A* y *HDAC8*. Entre los pacientes con una mutación de uno de estos cinco genes, *NIPBL* representa alrededor del 60% (Tabla 1) de los casos. Todas las mutaciones identificadas en el SCdL afectan a proteínas/enzimas del complejo cohesina. (2,3)

AUTOR, AÑO, PAÍS	Nº PACIENTES ESTUDIADOS	NIPBL (+)	SMC1A (+)	SMC3(+)
Gillis, 2004, EE.UU	120	47% (56)		
Bhuiyan, 2006, Holanda	39	56% (22)		
Yan, 2006, Polonia	28	46% (13)		
Musio, 2006, Italia	57	44% (24)	9% (5)	
Schoumans, 2007, Suecia(9), Turquía y Rumania	11	63% (7) (5 Suecia, 1 Rumania y 1 Turquía)	- (2 varones)	
Borck, 2004, 2006, 2007; Francia	30	43% (13)	7% (2) (11 varones)	
Deardorff, 2007, EE.UU	207		5% (10)	<1% (1)
Selicorni, 2007, Italia	62	42% (26)	8% (5)	
Pie, 2010, España	30	36% (11)	10% (3)	-

Tabla 1. Mutaciones halladas en estudios del SCdL en distintos estudios.

Se ha demostrado que el complejo cohesina está involucrado en la segregación cromosómica, la reparación del ADN (Figura 1) y la regulación de genes, pero se cree que el SCdL surge principalmente de la desregulación transcripcional. Los productos proteicos de tres de los genes conocidos del SCdL (*SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*) son componentes estructurales del anillo de cohesina (Figura 2). El producto proteico del *NIPBL* está implicado en la carga del anillo en los cromosomas en la metafase, mientras *HDAC8* es responsable de la desacetilación de *SMC3* para facilitar la renovación del complejo cohesina después de su disociación de la cromatina durante la profase o la anafase. (1,2)

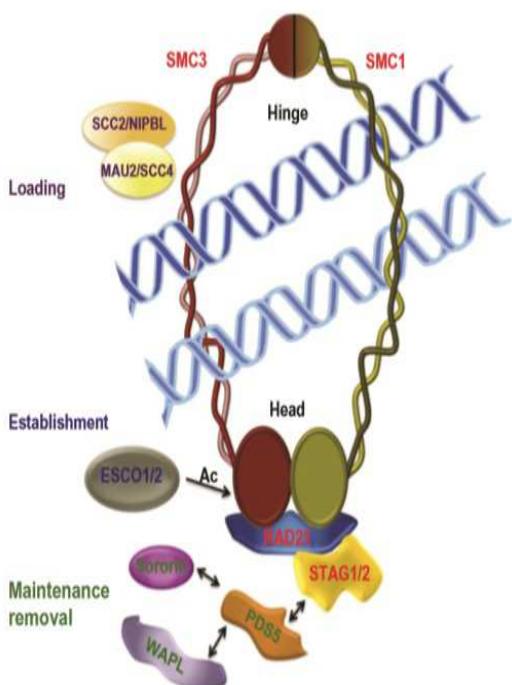


Figura 2. Estructura del complejo cohesina

Como se ha podido evidenciar estos genes codifican proteínas que forman parte del complejo Cohesina. Específicamente la proteína NIPBL es un regulador de proteínas asociados a la cohesina y las proteínas SMC1A y SMC3 son componentes de la estructura en anillo del complejo que participan en la cohesión de cromátides hermanas, y por tanto garantizan la adecuada unión y separación de las cromátidas hermanas durante el proceso de mitosis.

Una disminución de los niveles celulares de cohesina causa tanto la separación prematura de cromátidas hermanas como defectos en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica.

Durante la profase las cromátidas hermanas permanecen unidas gracias al complejo de cohesinas, y a la shugosina unida a la proteína PP2A, pero al iniciarse la anafase, el complejo que promueve la anafase degrada a la securina, ésta libera a la separasa, provocando la liberación de la shugosina, la proteína PP2A y las proteínas integrantes del complejo cohesinas, lo cual provoca la separación de las cromátidas hermanas. (1, 15, 16). Aunque esta maquinaria está conservada a través de la evolución, en vertebrados la mayor parte de las cohesinas se libera en profase, independientemente de la presencia de APC/C, en un proceso dependiente de kinasa (Figura 3).(8)

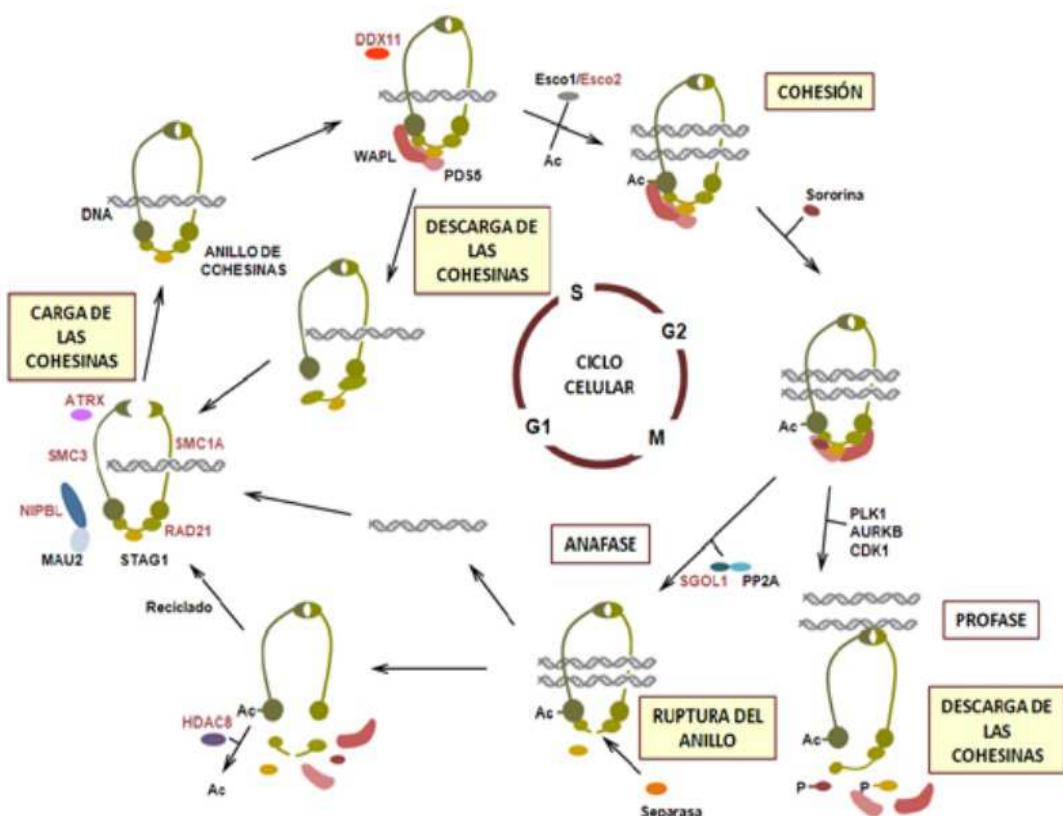


Figura 3. Ciclo cohesina durante la división celular.

Las últimas dos subunidades también se conocen como RAD21 (SCC1, kleisina) y STAG (SCC3). El complejo cohesina adopta una estructura en forma de anillo, que atrapa el ADN replicado y media la cohesión entre cromátidas hermanas. El complejo cohesina está regulado por múltiples cofactores, entre los que destaca el complejo adherina, formado por dos proteínas, NIPBL y MAU2. Para la correcta función cohesiva se requiere la participación de las acetiltransferasas ESCO1/2. El substrato de esta acetilación es la subunidad SMC3 del complejo cohesina. Otros cofactores son PDS5, WAPL y Sororina, implicados en el mantenimiento o eliminación de la unión cohesina-cromatina. (1)

Recientemente se ha descubierto la relación entre el complejo cohesina y CTCF, una proteína aislante que participa en el bloqueo de la interacción potenciador-promotor. Estos trabajos sugieren la participación de la cohesina en la regulación de la expresión génica. (1)

2.2 Manifestaciones clínicas del Síndrome Cornelia de Lange

Es un síndrome caracterizado por afectación sistémica y rasgos faciales y musculoesqueléticos especialmente distintivos y diagnósticos. Incluye:

- Manifestaciones craneofaciales

Las características craneofaciales típicas son patognomónicas de SCdL y conducen al diagnóstico inicial. En SCdL clásicos, con frecuencia se encuentra microcefalia, cuello corto y implantación del cabello baja tanto en la parte anterior como en la posterior. (2)

MANIFESTACIONES CRANEOFACIALES	
CEJAS BIEN DEFINIDAS Y ARQUEADAS	SINOFRIDIA
FISURAS PALPEBRALES ESTRECHAS	PESTAÑAS LARGAS Y RIZADAS
OÍDOS GRUESOS DISPLÁSICOS, DE BAJA IMPLANTACIÓN Y ROTADOS	CARA PLANA
NARIZ ANCHA Y CORTA CON PUENTE NASAL DEPRIMIDO	NARINAS ANTEVERTIDAS
PHILTRUM LARGO, LISO Y PROMINENTE	LABIOS DELGADOS
COMISURAS DE LA BOCA HACIA ABAJO	MICROGNATIA

El conducto auditivo externo es a menudo estrecho o estenótico, lo que predispone a la otitis media y sinusitis. El paladar es alto y puede haber una hendidura que es a menudo submucosa. También se observan anomalías dentales (6). Los rasgos faciales tienden a evolucionar a medida que los pacientes envejecen. La cara se alarga y aparece más gruesa. La mandíbula se vuelve más cuadrada y huesuda en su apariencia. En algunos casos, los rasgos faciales se hacen menos típicos con la edad y en casos leves pueden llegar a tener una apariencia facial casi normal en la vida adulta (6).

- Crecimiento y pubertad

Los pacientes con CdLS suelen tener retraso del crecimiento pre y post natal (percentiles inferiores al 3) y una baja estatura que persiste durante toda la vida. La obesidad troncal también es un hallazgo en adultos. Existen curvas de crecimiento específicas para la monitorización de pacientes SCdL (7). La edad media de aparición de la pubertad es de 13 y 15 años para las mujeres y los hombres, respectivamente. Sólo el 33% de los pacientes desarrollan vello axilar, mientras que el 90% desarrollan vello púbico. La menstruación ocurre en el 87% de las mujeres, pero es irregular en el 53%. Alrededor del 80% de las mujeres desarrollan mamas (6).

- Discapacidad intelectual y fenotipo conductual

El retraso psicomotor y la discapacidad intelectual van desde dificultades de aprendizaje leves a graves. Habla y lenguaje son las áreas de desarrollo más afectadas: cerca del 30-40% de pacientes empieza a hablar tarde, 20-25% están limitados, y un 25-30% no hablan, mientras que entre el 3 y el 4% realizan un desarrollo del habla normal o casi normal (2, 8-11).

MANIFESTACIONES INTELECTUALES Y CONDUCTUALES	
RETRASO PSICOMOTOR IMPORTANTE	DISCAPACIDAD INTELECTUAL MODERADA-GRAVE
HIPERACTIVIDAD	TDAH
AGRESIVIDAD	TIMIDEZ EXTREMA
DESAFÍO	PERSEVERACIÓN
TRASTORNOS OBSESIVO-COMPULSIVOS	DEPRESIÓN
TRASTORNOS DEL SUEÑO	AUTOLESIÓN

- Manifestaciones neurosensoriales

La pérdida de audición se observa en la mayoría de los pacientes con SCdL, tanto pérdida auditiva neurosensorial como conductora. Los canales auditivos son a menudo estrechos o estenóticos, lo que predispone a los pacientes a la otitis media y la sinusitis. Los hallazgos oftalmológicos más comunes son la alta miopía, ptosis y blefaritis. También se ha informado de la obstrucción del conducto nasolagrimal, nistagmus, cataratas y glaucoma (4). La epilepsia se encuentra en 20% de los pacientes. Los pacientes a menudo tienen una inusual alta tolerancia al dolor, que puede ser debido a la neuropatía periférica en algunos casos. Si logran caminar, la marcha es con una extensa base de sustentación con una posición ligeramente encorvada (8).

- Deformidades esqueléticas

En casi todos los pacientes se presentan malformaciones de las extremidades superiores. Las extremidades inferiores se ven menos afectadas. (4, 6).

MANIFESTACIONES MUSCULOESQUELÉTICAS Y COMPLICACIONES ORTOPÉDICAS	
MANOS PEQUEÑAS	PULGAR PEQUEÑO Y PROXIMALMENTE COLOCADO
CLINODACTILIA DEL 5º DEDO	AGENESIA DE ANTEBRAZOS CON DEDOS PRESENTES DISTALES AL CODO
LUXACIÓN DE CABEZA RADIAL CON SINOSTOSIS RADIOCUBITAL	PIES PEQUEÑOS
SINDACTILIA PARCIAL DEL 2º Y 3º DEDO	DISPLASIA/DISLOCACIÓN DE CADERA
ESCOLIOSOS	TENDONES DE AQUILES TENSOS
OSTEOPOROSIS PRECOZ	PECTUS EXCAVATUM

- Manifestaciones gastrointestinales

La ERGE es una de las manifestaciones más significativa, uno de los síntomas presentes en más del 90% de los pacientes. Los individuos con SCdL y ERGE a menudo presentan "signos atípicos" como hiperactividad, vómitos y agitación nocturna. La incidencia de la ERGE no es significativamente diferente en pacientes con SCdL clásicos frente a aquellos SCdL con fenotipos más leves, aunque existe una fuerte correlación entre el grado de la lesión en el esófago y el fenotipo clínico. El complejo Sandifer, que se caracteriza por causar un postura distónica paroxística incluyendo tortícolis y opistótonos, es también común en todos aquellos pacientes

afectos de ERGE. La ERGE a menudo persiste o empeora, y puede haber principios de secuelas a largo plazo, incluyendo el esófago de Barrett en el 10% (6). La neumonía por aspiración es una complicación frecuente. Los problemas de alimentación son frecuentes y típicamente vistos en la infancia y los adultos jóvenes. Pueden ser causadas por el paladar hendido, micrognatia, y disminución del tono muscular en la zona oral o la ERGE. La estenosis pilórica es la causa más frecuente de vómitos persistentes durante el período neonatal, observada en el 4% de los pacientes. Otras anomalías gastroesofágicas incluyen la malrotación intestinal (2%) y la hernia diafragmática congénita (1%) (4, 8).

- Manifestaciones cardiovasculares

La incidencia de las cardiopatías congénitas es de alrededor del 25 a 30%. Las anomalías más comunes son (en orden descendente): defectos septales ventriculares, defectos del tabique auricular, estenosis pulmonar, tetralogía de Fallot, y el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico (4).

- Manifestaciones genitourinarias

Hasta el 40% de los pacientes con SCdL tiene anomalías de la estructura renal y/o anomalías del tracto urinario, como reflujo vesicoureteral, dilatación de la pelvis y displasia renal. La función renal puede estar reducida. Hipoplasia genital y criptorquidia se presentan en el 57% y el 73% de los pacientes del sexo masculino, respectivamente. Otros hallazgos comunes son micropene e hipospadias. Pueden verse labios mayores pequeños y úteros anormalmente formados (4). Es probable que la fertilidad esté disminuida en los sujetos gravemente afectados. Sin embargo, se ha informado de la transmisión materna y paterna, junto con varios casos de padres levemente afectados con niños gravemente afectados.

- Manifestaciones cutáneas

Es frecuente el hirsutismo generalizado, más notable en la cara, la espalda y las extremidades y el 60% de los individuos tienen cutis marmorata. Pueden verse pezones y ombligo pequeños (4). Los pacientes muestran signos de envejecimiento prematuro, tales como arrugas, flacidez y el pelo gris y, por lo tanto, a menudo parecen más viejos de lo que a su edad cronológica corresponde (6).

- Hallazgos paraclínicos

Se han observado trombocitopenias transitorias y/o inmunes en el SCdL . Se pueden hallar daños en la población de células T, asociada con la deficiencia de anticuerpos.

2.3 Relaciones genotipo-fenotipo

A día de hoy sabemos que hay amplia variabilidad en la expresión fenotípica del SCdL. Además del fenotipo clásico clínicamente más severo, de forma constante se documentan casos de probandos más leves. (3, 4)

El gen *NIPBL* localizado en 5p13, está compuesto por 47 exones que codifican las delanginas A y B, de 2804 y 2697 aminoácidos respectivamente. Se trata de una de las proteínas reguladoras del complejo cohesina; es decir, interactúa con las SMC. Una mutación en *NIPBL* se encuentra en el 60% de los pacientes y suele asociarse a un fenotipo más grave con mucha afectación de extremidades.

El gen *SMC1A* está ubicado en la región cromosómica Xp11.22, compuesto por 25 exones que se extienden en 9,7 Kb. Apenas se ha informado de polimorfismos hasta el momento ya que existen muy pocos y constituye uno de los genes que escapa del proceso de inactivación del X. Se han reportado hasta el momento más de 20 mutaciones. El producto proteico del gen tiene 1233 aminoácidos, es un componente nuclear, formando un heterodímero con la proteína SMC3. (1-3) El fenotipo de estos pacientes se caracteriza por una afectación facial leve, ausencia de reducción en las extremidades y ERGE.

Son pocos los pacientes conocidos con mutación en el gen *SMC3*, localizado en el cromosoma 10q25 (15). Las mutaciones de este gen están asociadas al fenotipo más leve del síndrome. Los pacientes destacan por su simpatía y falta de sinofridia, la ausencia de defectos graves en extremidades y los problemas cardíacos.

Recientemente se han encontrado mutaciones en el gen de *HDAC8* localizado en el cromosoma Xq13.1 y codifica una histona deacetilasa. (5, 6) Las mutaciones de este gen se encuentran en el 4% de los pacientes afectados (15) y genera la clínica más grave tras el gen *NIPBL*. Se caracteriza por una facies con nariz de base amplia y bulbosa, defectos de extremidades que pueden ser graves y retraso del crecimiento y psicomotor.

Por último, las mutaciones en *RAD21* causan una cohesinopatía que se caracteriza por retraso del crecimiento, anomalías esqueléticas menores, implicación cognitiva leve y rasgos faciales que se superponen a los hallados en individuos con SCdL.

3. Objetivos

Diagnosticar a nivel molecular un paciente con manifestaciones clínicas moderadas o leves del Síndrome Cornelia de Lange

Ampliar la información clínica disponible sobre pacientes con SCdL y mutación en *SMC1A* que ayude a definir el fenotipo característico de este gen.

4. Material y métodos

Este trabajo se centra en un caso de un paciente afecto de Síndrome Cornelia de Lange. Para acometer el principal objetivo del trabajo, que es el diagnóstico del mismo, se han hecho uso de tres herramientas fundamentalmente: historia clínica, diagnóstico clínico según criterios de Gillis y Kline (2007) y diagnóstico genético mediante PCR.

4.1 Historia clínica

Se hace uso de una historia clínica estándar-básica en la que nos detendremos más en una serie de puntos:

- Antecedentes familiares (con árbol genealógico).
- Datos del embarazo (tóxicos, infecciones...)
- Datos perinatales (Apgar, hitos del desarrollo...)
- Exploración física exhaustiva
 - Facies
 - Ojos
 - Nariz
 - Orejas
 - Boca
 - Extremidades
 - Auscultación cardiopulmonar
 - Exploración abdominal
 - Toma de una foto para seguimiento
 - Interconsultas y pruebas diagnósticas

4.2 Obtención de muestras

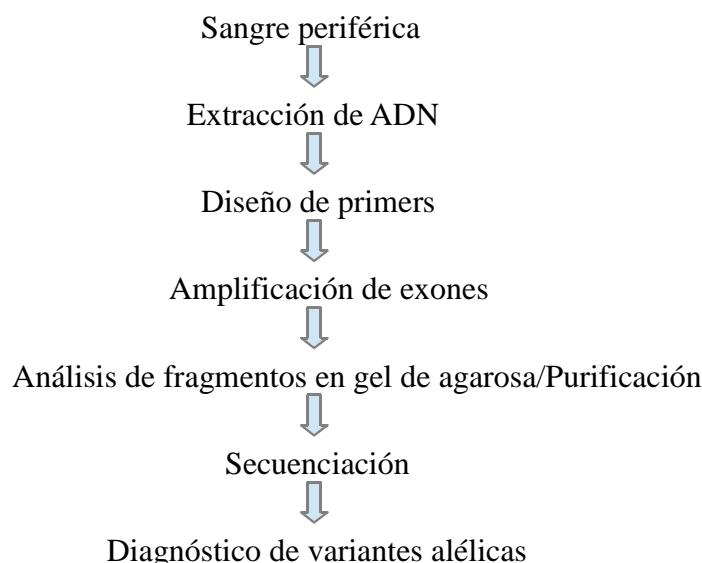
Se realizará por punción venosa en la extracción de sangre en la flexura del codo. También se pueden obtener fibroblastos y células de la mucosa oral.

4.3 Métodos de laboratorio

El diagnóstico genético se realizará mediante técnicas de amplificación de ADN, del gen que se cree sospechoso. La técnica más empleada será la PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original.

El proceso a seguir será el siguiente:



4.3.1 Obtención de ADN

- Recepción de tubos falcon de 50 ml. Rotulación con el código del paciente
- Homogeneizar la sangre por inversión. Extracción de 4 ml de cada tubo.
- Adición de 10 volúmenes de “Tritón sucrosa” hasta alcanzar 40 ml.

PARA 2 litros de TRITÓN SUCROSA	VOLUMEN/CANTIDAD
TRITON X-100	20 ml
SACAROSA	219'07 g
TRIS HCl 1M	20 ml
MgCl ₂	10 ml

- Centrifugación de la muestra a 2000 rpm durante 10 minutos a 0 °C.
- Eliminación del sobrenadante por decantación y resuspensión del pellet en 6 ml de tampón SE .

PARA 100 ml de TAMPÓN SE	VOLUMEN/CANTIDAD
SDS (DODECILSULFATO SÓDICO)	0'1 g
NaCl 0'5 M	15 ml
EDTA 0'5 M	5 ml
AGUA DESTILADA	80 ml

- Adición de la proteinasa K
- Incubación de la muestra (2-3 horas en baño a 55 °C o toda la noche en estufa a 37 °C).
- Adición de 2 ml de NaCl 6M y agitar.
- Adición de 8 ml de cloroformo.
- Agitar en el rotor durante 30 minutos.
- Centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos.
- Obtención del sobrenadante (6-7 ml)
- Adición de isopropanol en proporción 1:1
- Extracción del ADN recién visualizado con micropipeta a un eppendorf.
- Adición de etanol al 70%.
- Agitar en el rotor 30 minutos y centrifugar a 12000 rpm durante 5 minutos.
- Extracción del etanol y dejar secar a T° ambiente durante 2 horas.
- Adición de 300 µl de buffer TE y dejar en la estufa a 37 °C hasta dilución.

PARA 100 ml de TAMPÓN TE	CANTIDAD/VOLUMEN
TRIS HCl 1M	1 ml
EDTA 0'5 M	0'2 ml
AGUA DESTILADA	98'8 ml

- Medición de concentración mediante nanodrop o espectrofotómetro.

4.3.2 Diseño de primers

Un primer es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN. Es una secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma pares de bases complementarios a una hebra molde y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde. Se necesitan dos para la reacción de PCR, uno en el extremo 3' y el otro complementario para la otra hebra. Para poder amplificar todos los exones susceptibles de estar mutados, hace falta crear primers para cada uno de ellos. (Tabla 2)

El diseño de los primers se realiza con la ayuda de programas informáticos o de forma manual mediante ecuaciones teniendo en cuenta los siguientes factores:

- La longitud del primer: óptima entre los 18 y los 30 nucleótidos.
- Los primers no deben diferir en más de 3 bases entre si.
- Se requiere una distribución homogénea de los cuatro nucleótidos en la secuencia, evitando los poliT/A/G/C.
- La temperatura de disociación o melting (Tm): la temperatura a la cual el 50% de esa misma especie de molécula de ADN forma una doble hélice estable y el otro 50% se separa en moléculas de un solo filamento; es decir, aquella en la que el 50% del primer se encuentra disociado.
- Dado que la temperatura óptima de hibridación de PCR es de 2-4 °C por debajo de su media, los primers de la pareja deben tener Tm similares o próximas.
- Aproximadamente el 40-60% de la secuencia del primer deben ser GC. Hay que evitar que en el extremo 3' se acumulen más de 3 Gs o Cs y la complementariedad entre los dos extremos.

4.3.3 Amplificación de exones

Es lo que se conoce como PCR. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis. Su objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento original. Para la reacción se necesita: (2)

Componentes	Concentraciones
Buffer	10x
dNTPs	0'5 mM
MgCl ₂	50 mM
Eco Taq Polimerasa	5U/ µl
Primer Forward y Primer Reverse	20 pmol/µl de cada uno
ADN	100 ng/µl
Agua	c.p.s. 40 µl

La reacción tiene lugar en un termociclador que nos permite poner ciclos de 3 temperaturas diferentes. Los ciclos, con alguna variación respecto a la temperatura de annealing o hibridación, son:

	Tiempo	Temperatura	
Inicio	2-10 minutos	98 °C	
Desnaturalización	30 segundos	96 °C	
Hibridación	30 segundos	54-60 °C	
Extensión	30 segundos	72 °C	
Extensión final	7 minutos	72°C	

30-35 ciclos

4.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de ADN previsto, se emplean técnicas de electroforesis en gel de agarosa, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su tamaño. El tamaño del producto de la PCR queda determinado por un marcado de peso molecular de ADN. Éste contiene fragmentos de ADN de tamaño conocido y se corre en el gel de igual forma que los productos de PCR, sirviendo así de referencia. (3) (Imagen 1)

Para poder ver los fragmentos de ADN hay que añadir a este gel bromuro de etidio. Este producto se intercala entre las hebras de ADN y permite visualizarlo al exponerlo a luz UV. Es altamente tóxico.

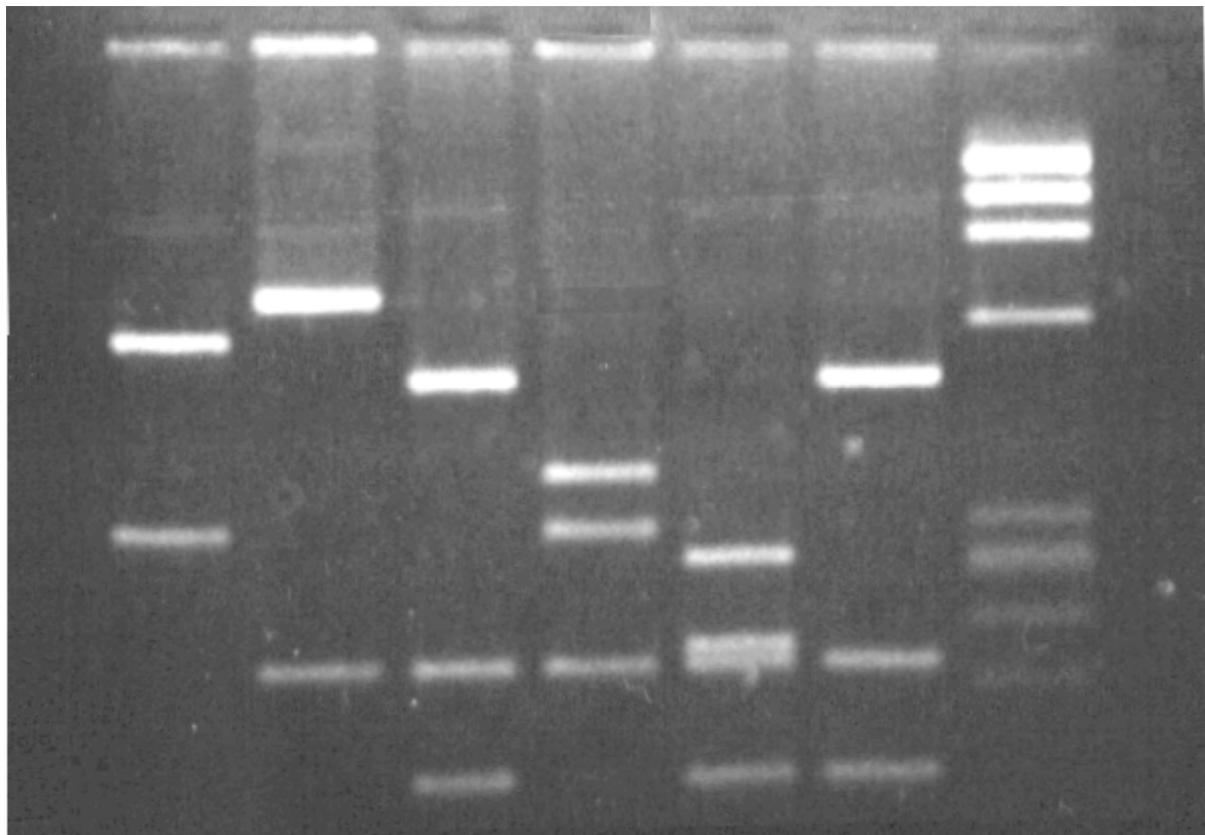


Imagen 1. Electroforesis en gel de agarosa y visualización UV.

4.3.5 Purificación

Los fragmentos de ADN se purifican para ser secuenciados después. Para purificarlos emplearemos “ExoSAP-IT”, que permite la purificación de fragmentos de PCR entre 100pb y 20kb. Su función consiste en la eliminación de los primers y de los dNTPs mediante la degradación enzimática con Exonucleasa I y Shrimp Alkaline fosfatasa, respectivamente.

Para su uso se sigue el protocolo indicado por la casa comercial:

1. Colocar el tubo de ExoSAP-IT en un baño de hielo
2. Mezclar 5 µl de producto de PCR con 2 µl de ExoSAP-IT
3. Incubar a 37 °C durante 15 minutos (degradación de primers y nucleótidos)
4. Incubar a 80 °C durante 15 minutos (inactivación del ExoSAP-IT)
5. Guardar el producto de PCR purificado a -20 °C

4.3.6 Secuenciación Sanger

El método de secuenciación por dideoxinucleótidos, mejor conocido como el método Sanger se basa en el proceso biológico de la replicación del DNA. El método comienza una vez se aísla y se clona el DNA que se desea secuenciar. Este DNA se desnaturaliza y se emplea una sola hebra para la secuenciación. En la secuenciación se utiliza un cebador o “primer” que se encarga de suministrar el terminal 3’OH que necesita la DNA polimerasa para comenzar a elongar. A cada tubo se le añade una pequeña proporción de un dideoxinucleótido trifosfato; un tubo con ddATP, otro con ddTTP, el tercero con ddGTP y el cuarto con ddCTP. En cada uno de estos tubos se producen cadenas de DNA de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el dideoxinucleótido correspondiente añadido al tubo. Los productos de las 4 reacciones, cada una conteniendo una pequeña cantidad de uno de los cuatro dideoxinucleótidos, son cargados en un gel de agarosa y sometidos a electroforesis. Así, obtendremos un patrón de bandas en orden, del cual es posible deducir la secuencia del ADN introducido.

4.4 Métodos clínicos

Es la primera forma de diagnóstico además de la más asequible. Solo observando las características fenotípicas y algunas de las manifestaciones clínicas podemos llegar a establecer el diagnóstico de SCdL y la gravedad del mismo.

4.4.1 Clasificación de Gillis

La clasificación de Gillis es más breve y se basa en la valoración de tres parámetros fenotípicos: el grado de reducción de las extremidades, el nivel de desarrollo y de las habilidades cognitivas y el percentil de crecimiento. En función de los hallazgos le otorga un índice de gravedad. (5)

PARÁMETROS	CLASE I (Leve)	CLASE II (Moderada)	CLASE III (Grave)
Reducción en las extremidades	No reducción	Alteraciones parciales, oligodactilia (>2 dedos en cada mano)	Alteraciones graves ≤ 2 dedos en manos
Desarrollo y habilidades cognitivas	Retraso motor <2 años Presentan capacidad de habla y comunicación	Retraso motor >2 años, habla y comunicación limitada	Retraso motor profundo, pérdida significativa de la comunicación
Crecimiento*	$>$ percentil 75	Entre el percentil 25-75	$<$ percentil 25

* Los percentiles de la talla, el peso y el perímetrocefálico están referidos a las curvas estándar específicas del SCdL.

4.4.2 Clasificación de Kline

En 2007, Kline propuso un sistema de diagnóstico basado en unos criterios clínicos mínimos, en el que se considera que un individuo se considera que tiene SCdL si presenta:

Sinofridia (criterio principal de la categoría craneofacial) más 3 criterios secundarios de esta categoría más los criterios necesarios de dos de las categorías de crecimiento, de desarrollo físico o de comportamiento.

Sinofridia (criterio principal de la categoría craneofacial) más 3 criterios secundarios de esta categoría más los criterios necesarios de 3 de las otras 6 categorías, teniendo en cuenta que una de ellas tiene que ser de la categoría crecimiento, desarrollo físico o comportamiento. (5)

CATEGORÍA	nº	CRITERIO PRINCIPAL	CON	CRITERIO SECUNDARIO
Craneofacial		Sinofridia (cejas finas y arqueadas)	y 23 de	Pestañas largas Nariz pequeña y narinas antevertidas Filtrum largo y prominente Puente nasal ancho y deprimido Barilla pequeña y cuadrada Labios finos y comisuras hacia abajo Paladar elevado Diastema
Crecimiento	≥ 2de	Peso < del 5 ^o percentil según la edad Altura o talla < del 5 ^o percentil según la edad Perímetrocefálico por debajo < del 5 ^o percentil según la edad		
Desarrollo	≥ 1de	Retraso del desarrollo o mental Dificultades de aprendizaje		
Comportamiento	≥ 2de	Déficit de atención ± hiperactividad Comportamiento obsesivo-compulsivo Ansiedad Agresividad Comportamiento autolesivo Timidez extrema Rasgos autistas		
Extremidades	0	Defectos de reducción con ausencia de antebrazos Manos y/o pies pequeños (por debajo del percentil 3) u oligodactilia Ninguna de las anteriores	Sólo	
	0		y ≥ 2 de y ≥ 3 de	Clinodactilia 5 ^o dedo Línea palmar anormal Extensión anormal de codo 1 ^o metacarpiano corto/localización proximal de los pulgares Deformidades en los dedos de los pies Sindactilia en el 2 ^o y 3 ^o dedo del pie Escoliosis Pectus excavatum Displasia o dislocación de cadera
Neurosensorial/piel	≥ 3 de	Ptosis Malformaciones en el conducto lacrimal o blefaritis Miopía ≥ 6,00 D Malformaciones oculares mayores o pigmentación peripapilar Sordera o pérdida de audición Epilepsia Cutis marmorata Hirsutismo generalizado Mamas y/u ombligo pequeños Malrotación/malformación intestinal		
Otras sistemas	≥ 3 de	Hernia diafragmática Reflujo gastroesofágico Fisura palatina Defectos cardíacos congénitos Micropene Hipospadias Criptorquidismo Malformaciones en el tracto renal o urinario		

5. Resultados

Siguiendo el orden establecido en materiales y métodos, comenzamos el caso por la historia clínica y la exploración. Entrevistando a los padres, de procedencia rumana, supimos que el embarazo había transcurrido con normalidad, controlado, (en las ecografías no se objetivó ninguna alteración) que el parto fue a término (39 semanas), eutócico, que su peso al nacer fue de 2770 gramos, su talla de 46 cm y su perímetrocefálico de 32 cm (todos ellos entre los percentiles 10-25) con un Apgar 9/10. Nadie en la familia había sido diagnosticado de ningún síndrome ni presentaba

rasgos dismórficos o típicos de alguno. Durante el embarazo no hubo hábitos tóxicos ni infecciones. Durante el período neonatal se evidencia un retraso psicomotor y un cuadro dismórfico, motivo por el que acuden a consulta.

La exploración a nivel de todos los aparatos y sistemas evidenció los siguientes hallazgos:

	HALLAZGOS CLINICOS	
	FECHA DE NACIMIENTO	02/02/2001
CRANEOFACIAL	MICROCEFALIA	Sí
	BRAQUICEFALIA	Sí
	SINOFRIDIA	Sí
	LINEA DE INSERCIÓN DEL CABELLO ANTERIOR BAJA	No
	PESTAÑAS GRUESAS Y LARGAS	Sí
	NARIZ CORTA CON PUENTE NASAL DEPRIMIDO O BASE ANCHA	Sí
	NARINAS ANTEVERTIDAS	Sí
	PHILTRUM LARGO, LISO Y PROMINENTE	Sí
	CEJAS ARQUEADAS	Sí
	EDAD DE CIERRE DE LA FONTANELA ANTERIOR	No figura
	OTRAS	No
OJOS	PTOSIS	Sí
	MIOPIA	No
	OBSTRUCCIÓN DEL CONDUCTO LACRIMAL	No
	OTROS	No
BOCA	LABIO SUPERIOR DELGADO	Sí
	BOCA EN CARPA	Sí
	PALADAR ALTO	Sí
	PALADAR HENDIDO	No
	ANOMALIAS DENTALES	No
	MICROGNATIA	No
	OTROS	No
ORL	HIPOACUSIA/ SORDERA	No
	OTITIS/ SINUSITIS/ AMIGDALITIS A REPETICIÓN	No
CUELLO	LINEA DE INSERCIÓN DE CABELLO POSTERIOR BAJA	No
CARDIOVASCULAR	CARDIOPATIA CONGENITA	Sí, CIA tipo OS con bloqueo de rama derecha, el cual persiste. CIA cerrada espontáneamente.
PULMONAR	APNEAS	No
	INFECCIONES RESPIRATORIAS RECURRENTES	No
	OTRAS	No

GASTROINTESTINAL	REFLUJO GASTROESOFAGICO	Sí (pHmetría: Imagen 2)
	PROBLEMAS CON LA ALIMENTACION/SUCCION	Sí, vómitos y regurgitaciones frecuentes, sin causa clara (unas dos veces por semana)
	MALFORMACIONES DIGESTIVAS	No
GENITOURINARIO	MALFORMACIONES RENALES	No
	REFLUJO VESICOURETERAL	No
	MALFORMACIONES UTERINAS/OVARIOS	No procede
	CRIPTORQUIDIA	No
	HIPO/EPISPADIAS	No
	OTROS	No
EXTREMIDADES	MANOS PEQUEÑAS	No
	INSERCIÓN PROXIMAL DEL PULGAR	No
	CLINODACTILIA DEL 5º DEDO	Sí, bilateral
	PLIEGUE PALMAR UNICO	No
	BRAQUIDACTILIA	Sí
	PIES PEQUEÑOS	No
	SINDACTILIA DE LOS DEDOS DEL PIE	No
	DEFECTOS DE REDUCCION DE EXTREMIDADES	No
	LIMITACION PARA EL MOVIMIENTO DE LOS CODOS	No
	OTROS	No
PIEL	HIRSUTISMO	No
	CUTIS MARMORATA	Sí
	OTROS	Nevus melanocíticos (2) en espalda.
	HEMANGIOMAS O MARCAS DE NACIMIENTO	No
SNC	ANOMALIAS ESTRUCTURALES EN SNC (ECO, TAC, RNM)	No
	CONVULSIONES	No
	TONO MUSCULAR ANORMAL	No
	REFLEJOS OSTEOTENDINOSOS	Normales
	OTRAS	EEG anormal
MENTAL / COGNITIVO	DISCAPACIDAD INTELECTUAL	Sí, de moderada a severa
	ALTERACIONES DE COMPORTAMIENTO Y/O PERSONALIDAD	TDAH (COMENTAR TRATAMIENTO??)
DESARROLLO	DESARROLLO DEL LENGUAJE	Retrasado
	EDAD PRIMERA PALABRA	7 meses
	DESARROLLO MOTOR	Retrasado
	EDAD SENTARSE SOLO	12 meses
	EDAD CAMINAR SOLO	2 años y 6 meses
DATOS ANTROPOMETRICOS	EDAD GESTACIONAL	39 semanas

NACIMIENTO	PESO AL NACER (g)	2770 gr (P10-25)
	LONGITUD AL NACER (cm)	46 cm (P10-25)
	PERIMETRO CEFALICO (cm)	32 cm (P10-25)
SEVERIDAD CLINICA		Leve

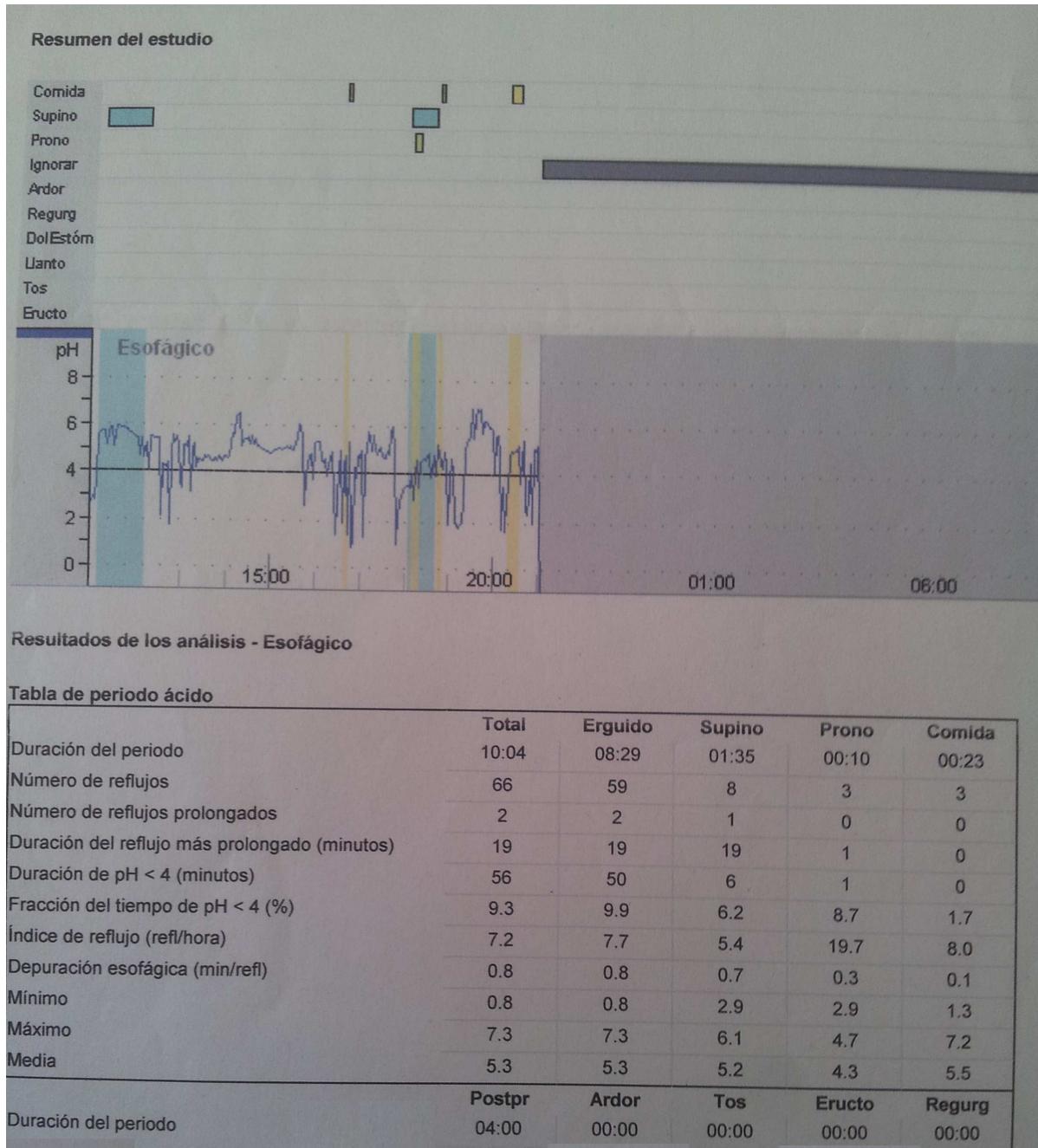


Imagen 3. pHmetría.

No se evidenció ninguna alteración a nivel hematológico o inmunológico.

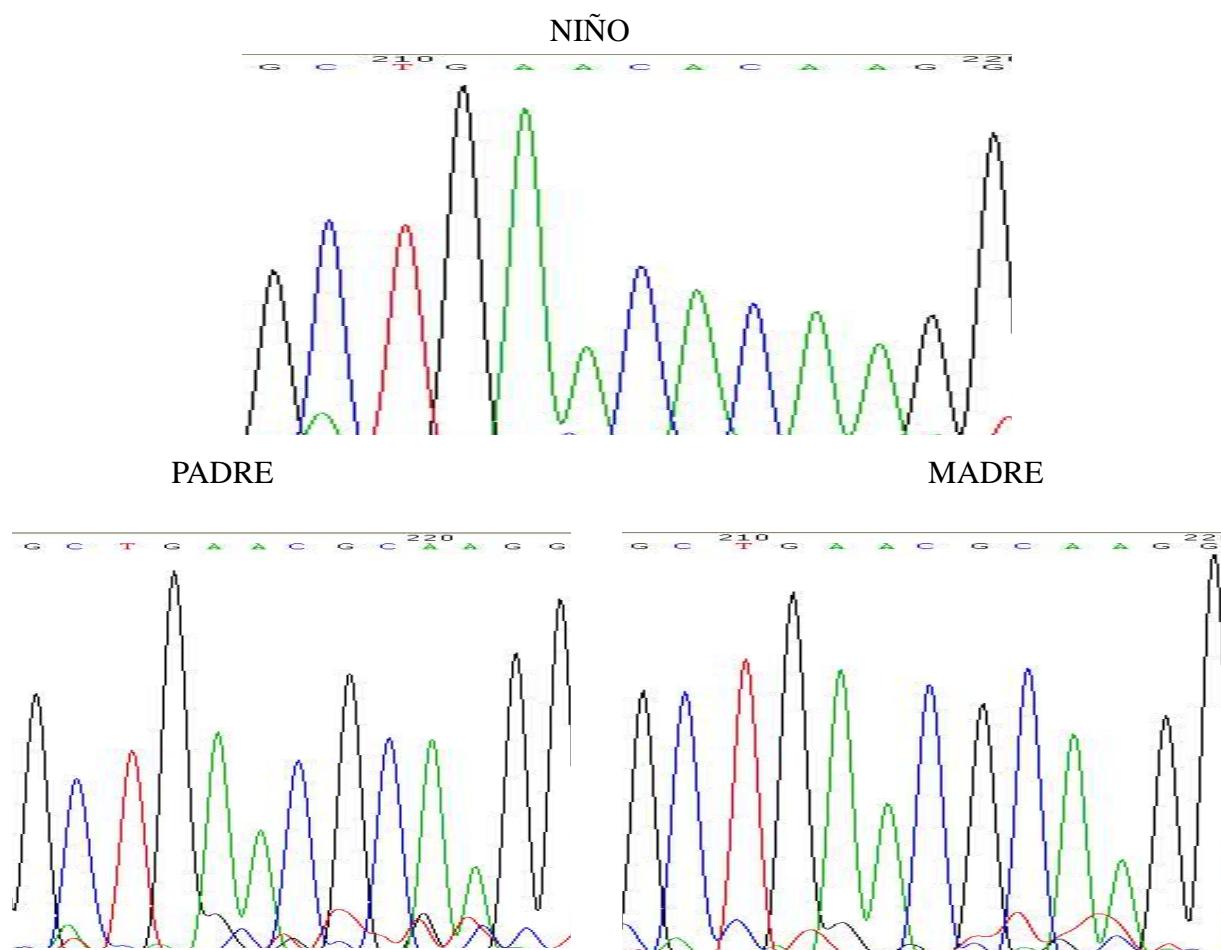
Atendiendo a estos resultados, la clasificación de Kline no deja lugar a dudas: el paciente presenta el rasgo principal que es la sinofridia además de muchos otros de categorías secundarias como son: retraso psicomotor e intelectual, reflujo gastroesofágico (Figura 6), braquidactilia y clinodactilia del 5º dedo, ptosis, pestañas largas y gruesas, philtrum alargado y narinas antevertidas entre otros, pudiendo ser diagnosticado de SCdL.

Por otro lado, de acuerdo a la clasificación más simplificada de Gillis, el fenotipo del paciente podría ser clasificado entre grado leve y moderado, como suele ser habitual en los casos de mutación en SMC1A.

Para conocer el diagnóstico genético del paciente es necesario realizar una PCR de cada exón, utilizando los primers específicos que se indican en la tabla 2 de los Anexos. Posteriormente, el resultado de la amplificación se comprueba mediante siembra en gel de agarosa y posteriormente se secuencia por técnica Sanger. Una vez localizada la mutación se comprueba su existencia en los progenitores para confirmar que se trata de una mutación de novo.

A continuación se indica el resultado de la secuenciación:

EXÓN	F	R	MUTACIÓN	OBSERVACIONES
1				
2/3	SI		NO	
4/5	SI		SI	c. 587 G>A; R196H (mutación presente en el paciente, pero ausente en los padres) Exón 4
6/7	SI	SI	NO	
8/9	SI	SI		Polimorfismo 1418-32 C→A (Ex 9)
10/11				
12/13	SI		NO	
14/15	SI	SI	NO	
16	SI	SI	NO	
17/18	SI	SI	NO	
19	SI	SI	NO	
20	SI	SI	NO	
21/22				
23/24	SI	SI	NO	
25	SI	SI	NO	



El paciente presenta la mutación missense c. 587 G>A en el exón 4 que provoca el cambio de la arginina 196 por una histidina (R196H). Esta mutación está localizada en la coiled-coil, cerca del dominio N-terminal.

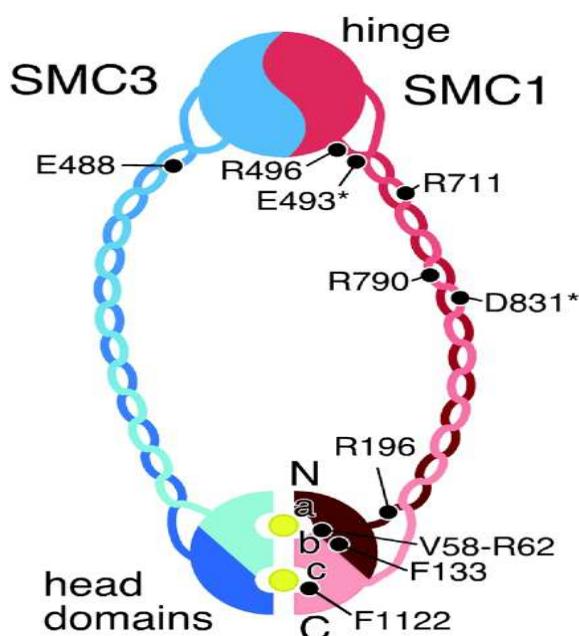


Figura 4.
Localización de la mutación R196H.

Esta mutación modifica las interacciones de los aminoácidos de la cadena al cambiar su posición en la coiled-coil alterando la relación de los dominios SMC. Todo ello da lugar a una afinidad aumentada por la cromatina, afectando a su división.

6. Discusión

Aunque *SMC1A* [Musio et al. 2006] fue descrito como gen causal del SCdL hace ya más de 9 años, el número de pacientes diagnosticados es todavía reducido [Deardoff et al. 2007, Liu et al. 2009, Pie et al. 2010]. Su baja frecuencia, afecta a no más del 4%, de los casos, obliga todavía a recoger la clínica con detalle, por si pudieran aparecer rasgos fenotípicos distintivos no descritos hasta la fecha. Este trabajo intenta aportar nuevos detalles sobre la clínica del SCdL en pacientes que sufre una mutación en el gen *SMC1A* (11, 15).

Como en otras ocasiones, el hallazgo de un paciente con SCdL de fenotipo moderado planteó la posibilidad de que el gen afectado fuera el *SMC1A*. La búsqueda de mutaciones en este gen permitió descubrir el cambio de la guanina 587 por un adenina (c. 587 G>A) que provocaba en la proteína la sustitución de la arginina 196 por una histidina (R196). El hecho de que esta mutación no estuviera presente en los padres sugería la aparición de una “mutación de novo” que podía ser responsable de la clínica del paciente. Por ahora, solo se han descrito mutaciones missense o delecciones de tripletes de bases en este gen. Se piensa que las mutaciones más graves deben ser incompatibles con la vida. Sin embargo también podría ocurrir que mutaciones de codón de stop produjeran otro tipo de patologías (12). En todo caso, la mutación encontrada responde a un tipo de mutación típica de este gen. La sustitución de las argininas complica la relación de los aa de la coiled coil de SMC1A, en concreto producen un cambio de polaridades que desestabiliza la hélice. Esta alteración, por tanto, dificulta la función estructural de SMC1A pero no la impide y es, probablemente, la causa de la aparición del síndrome.

Tan interesante como conocer el tipo de mutación, es la descripción detallada de la clínica del paciente. Habitualmente tanto los pacientes *NIPBL* como *SMC1A* presentan características clásicas comunes como: la incapacidad intelectual, el retraso psicomotor, el de crecimiento pre y postnatal, la sinofridia, la pérdida auditiva, las alteraciones genitourinarias, los paladares ojivales y hendidos, la miopía etc..., que son los que nos hacen pensar en el diagnóstico de SCdL y en los que se basa la clasificación de Kline. No obstante, algunos de estos rasgos son más típicos en *NIPBL*.

que en *SMC1A* y viceversa. Son precisamente estos detalles los que intentamos clarificar con el estudio de nuestro paciente.

Existe la tendencia a clasificar los fenotipos de *NIPBL* como más severos (Imagen 3) que los de *SMC1A*, este criterio estaría basado en la abundancia de las alteraciones esqueléticas de extremidades en los primeros. Sería frecuente encontrar desde oligodactilias hasta hipoplasias o agenesias del antebrazo con los dedos situados en el codo. Pero además, las mutaciones de *NIPBL* irían acompañadas frecuentemente de una sinofridia marcada, de alteraciones dentarias importantes, de defectos cardiovasculares congénitos y de alteraciones del sistema nervioso central como la hiperecogenicidad de la sustancia blanca periventricular. Por el contrario los pacientes de *SMC1A* apenas presentarían afectación de las extremidades y su facies sería mucho más normal [Pie et al. 2010] (Tabla 3). El caso que nos ocupa respondería perfectamente a este esquema, y sin embargo podría no ser adecuado considerar a este paciente y por extensión a los pacientes con mutación en este gen como moderados. De hecho, el máximo índice de mortalidad en el grupo de pacientes con SCdL estudiado por la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza, lo tienen los *SMC1A* positivos. El motivo hay que buscarlo en la enfermedad por reflujo gastroesofágico (ERGE), que es especialmente intensa en estos pacientes. Otra característica que los acompaña es la incapacidad intelectual severa y el retraso psicomotor que puede llegar a ser más intenso que en los pacientes *NIPBL* positivos. Nuestro paciente responde exactamente a este esquema y hay que decir que nos preocupa más su supervivencia que la de otros pacientes más clásicos.

Este estudio y otros que seguirán, deberán permitir mejorar la definición fenotípica de los pacientes de *SMC1A* y facilitar un adecuado pronóstico y diagnóstico genético (Imagen 2). (11, 15).

7. Conclusiones

Se confirma que el paciente con clínica leve-moderada (ampliar) del SCdL tiene una mutación en el gen *SMC1A*. La mutación produce el cambio de la arginina 196 por una histina que altera la relación de los aminoácidos de la “coiled coil” y es, probablemente, la causa del síndrome.

El diagnóstico positivo de *SMC1A* en un paciente con manifestaciones clínicas leves del SCdL, sugiere que puede ser adecuado priorizar el estudio de este gen sobre *NIPBL* en los pacientes con este tipo de fenotipo aunque nuevos estudios serán necesarios para terminar de definir las principales características clínicas de este gen.

8. Bibliografía

1. Barbero JL. 2013. Genetic basis of cohesinopathies. *The Application of Clinical Genetics*.
2. Boyle, M.I., Jespersgaard, C., Brøndum-Nielsen, K., Bisgaard, A.-M. and Tümer, Z. 2014. Cornelia de Lange syndrome. *Clinical Genetics*.
3. Mannini, L., Cucco, F., Quarantotti, V., Krantz, I. D. and Musio, A. (2013), Mutation Spectrum and Genotype–Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum. Mutat.*, 34:1589–1596.
4. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Félix V, Jiménez N, Gómez-Ullate J, López JA, Aparicio P, Ayala A, Gairi JM, Galán E, Suárez ME, Peñas A, de Tapia JM, Nieto C, de la Serna E. 2014. Síndrome de Brachmann de Lange en nuestro medio: Características clínicas y epidemiológicas.
5. Gil MC, Ribate MP, Ramos FJ. Síndrome de Cornelia de Lange. *Protoc diagn ter pediatr.* 2010;1:1-12
6. Rohatgi, S., Clark, D., Kline, A. D., Jackson, L. G., Pie, J., Siu, V., Ramos, F. J., Krantz, I. D. and Deardorff, M. A. 2010, Facial diagnosis of mild and variant CdLS: Insights from a dysmorphologist survey. *Am. J. Med. Genet.*, 152A:1641–1653.
7. Deardorff MA, Clark DM, Krantz ID. Cornelia de Lange Syndrome. 2005 Sep 16. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1104/>
8. Ferrer RL, Escobar MD, Campos AT. 2013. *Rev Cubana Genet Comunit.* 2011;5(2-3):133-138
9. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, Krantz ID, Musio A. Mutation Spectrum and Genotype–Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Human mutation.* 2013;34(12):10.
10. Gervasini C, Russo S, Cereda A, Parenti I, Masciadri M, Azzollini J, et al. 2013. Cornelia de Lange individuals with new and recurrent SMC1A mutations enhance delineation of mutation repertoire and phenotypic spectrum. *Am J Med Genet Part A* 161A:2909-2919
11. Pie J. 2014. Discurso de recepción pública como académico. <http://www.ramz.es/WebRAMZ/archivos/Discurso%20PIE.pdf>
12. Pie J, Gil-Rodríguez MC, Ciero M, Lopez-Viñas E, Ribate MP, Arnedo M, Deardorff MA, Puisac B, Legarreta J, de Karam JC, Rubio E, Bueno I, Baldellou A, Calvo MaT, Casals N, Olivares JL, Losada A, Hegardt FG, Krantz ID, Gomez-Puertas P, RamosFJ. 2010. Mutations and variants in the cohesion factor genes NIPBL, SMC1A, and SMC3 in a cohort

- of 30 unrelated patients with Cornelia de Lange syndrome. Am J Med Genet Part A 152A:924–929.
13. Liu, J., Feldman, R., Zhang, Z., Deardorff, M. A., Haverfield, E. V., Kaur, M., Li, J. R., Clark, D., Kline, A. D., Waggoner, D. J., Das, S., Jackson, L. G. and Krantz, I. D. 2009. *SMC1A* expression and mechanism of pathogenicity in probands with X-Linked Cornelia de Lange syndrome. Hum. Mutat., 30: 1535–1542
 14. Mannini, L., Liu, J., Krantz, I. D. and Musio, A. 2010. Spectrum and consequences of *SMC1A* mutations: The unexpected involvement of a core component of cohesin in human disease. Hum. Mutat., 31: 5–10
 15. Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeys B, Kline AD, Wilson M, Lillquist K, Siu V, Ramos FJ, Musio A, Jackson LS, Dorsett D, Krantz ID. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. 2007. Am J Hum Genet., Mar; 80 (3): 485-494.
 16. Mathews, C. K.; Van Holde, K.E et Ahern, K.G (2003). «6». Bioquímica (3 edición). pp. 204 y ss. ISBN 84-7892-053-2.
 17. Bartlett & Stirling (2003)—A Short History of the Polymerase Chain Reaction. In: Methods Mol Biol. 226:3-6

ANEXO

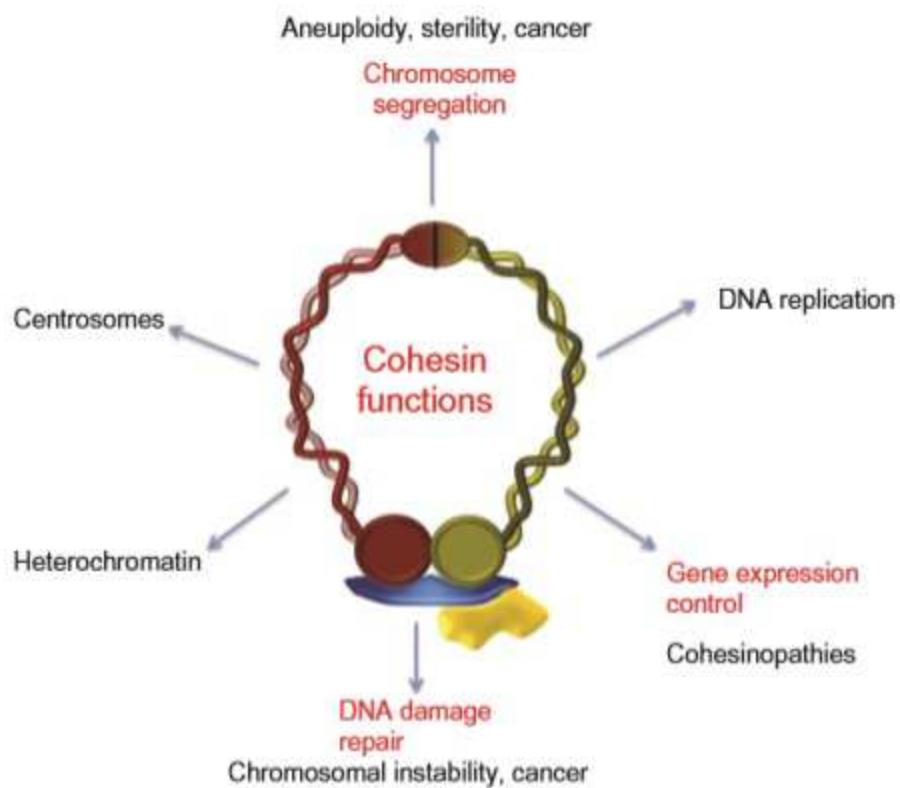


Figura 1. Funciones de la cohesina.

EXONES	Tamaño / pb	PRIMERS	Secuencia 5' → 3'	[MgCl ₂]/mM	T° annealing/°C	%G+C	L primer	T° m CNIO
SMC1 1	399	SMC1 F1	CGTATACCAACATCAGYCC	MM	58	52,5	20	60,78
		SMC1 R1	CGCGACGTTTCAGGTACAT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 2 y 3	597	SMC1 F2/3	GAGTACTGAGTGATTAGGG	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R2/3	TGAGATGGAGCAGACAGAGT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 4 y 5	652	SMC1 F4/5	AATGGGTAAGGTGAAGTGGG	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R4/5	AAACAGCACGGCTTGGGT	MM	58	55	20	61,80
SMC1 6 y 7	642	SMC1 F6/7	CTCCTTGGGTGAAAAGCT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R6/7	GGATTTGGGTGCTAACCT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 8 y 9	586	SMC1 F8/9	ATGGTCTTGGCGTAAACTCG	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R8/9	GATGGCAACCCGTCTTA	MM	58	50	20	59,75
SMC1 10 y 11	580	SMC1 F10/11	ATTAGGATTCCCTGAGCCAGC	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R10/11	AATCTCCAGTACTGAGCCTG	MM	58	50	20	59,75
SMC1 12 y 13	489	SMC1 F12/13	CAGGCTCAGTACTGGAGATT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R12/13	AACTAGGCCAGGAATGTGT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 14 y 15	456	SMC1 F14/15	CCAATGCAGTCAGGTAGCT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R14/15	GATGTCAAGCTAGAGGCTCA	MM	58	50	20	59,75
SMC1 16	324	SMC1 F16	CCTGGGTCTAGTTCCCTT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R16	GACATTATCCTCTGTCTGCG	MM	58	45,5	22	60,97
SMC1 17 y 18	562	SMC1 F17/18	AACTGCCTAGTAGGAAGGGT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R17/18	CCTTCCTGGTCACTTCACT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 19	240	SMC1 F19	CCTATAGAGGTGCACTCTCA	MM	54	50	20	59,75
		SMC1 R19	GACAACCTAGGAAGATACTCCC	MM	54	47,6	20	58,77
SMC1 20	299	SMC1 F20	CCACACTCAGTCAGTCATCT	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R20	TGGCATACCTTAGCCTCTT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 21 y 22	600	SMC1 F21/22	TGTTCCCTGCTCTGGATTGTC	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R21/22	TCACCTTCGCAGATCTGT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 23 y 24	737	SMC1 F23/24	TCAGGCAACTTGAGACCTG	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R23/24	TGGCCATTTCAGGACCTGATT	MM	58	50	20	59,75
SMC1 25	288	SMC1 F25	AGCATATCCTCTCACACCCA	MM	58	50	20	59,75
		SMC1 R25	ATTGGGAGAGGGACAGCTTA	MM	58	50	20	59,75

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de exones de SMC1A.

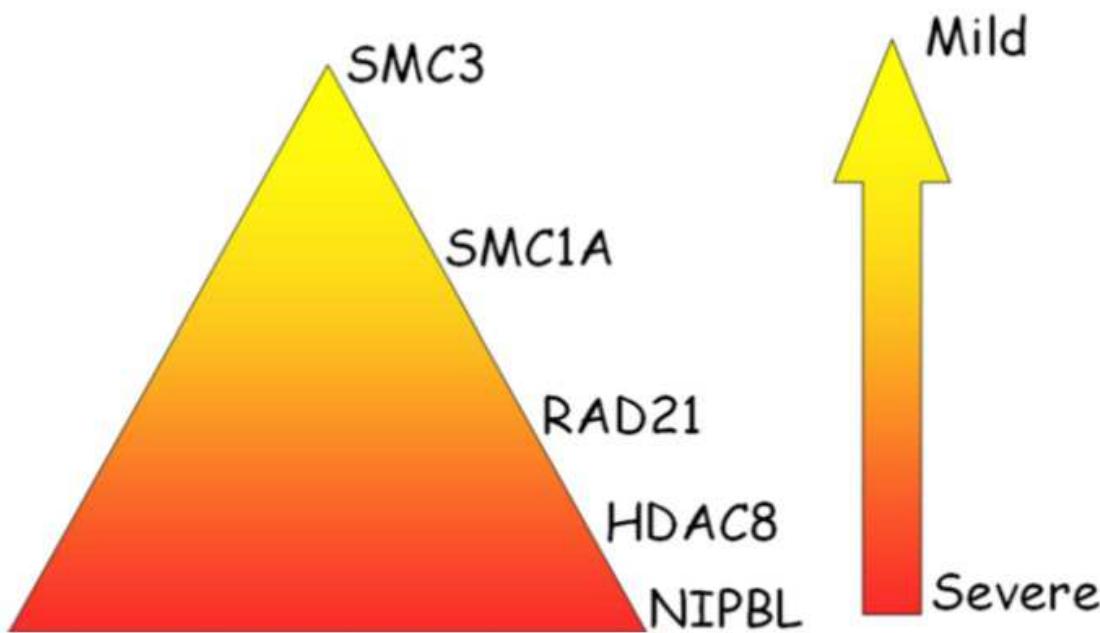


Imagen 3. Relaciones fenotipo-mutación.

Tabla 3. Características clínicas y moleculares de 14 pacientes SCdL.

Paciente	1	2	3	4	5	6	7
Gen mutado	N/PBL 10	N/PBL 30	N/PBL 40	N/PBL 44	N/PBL Intron 19	N/PBL 33	SMC1A 13
Exón	<u>c.2479_2480delAG^G</u>	<u>c.5689_5691delAT</u>	c.6880C→T	c.7438_7439delAG ^G	c.4320+5G→C	<u>c.8269G→T</u>	<u>c.2132G→A</u>
CDNA mutación	p.R827GfsX2	p.N1897del	p.Q2294X	p.R2480KfsX5	Skipping of exon 19 p.V1414_A1440 del	p.S2090I	p.R711Q
Efecto sobre el RNA/proteína							
Tipo de mutación	Frameshift	Delección In-frame	Nonsense	Frameshift	Splice site	Missense	Missense
Género	M	V	M	M	V	M	V
Año de nacimiento	1998	1997	2000	2000	2008	2007	2005
Peso al nacer (g)	1.150	2.855	1.750	1.800	1.425	1.530	2.940
Talla al nacer (cm)	35,5	48	39,5	42	42	40	48
PC al nacer (cm)	25,5	31	30,5	N/A	27,7	28	33
APGAR (1/5)	4/8	9/10	5/7	N/A	8/8	5/10	9/10
CR	+	-	+	+	+	+	+
Retrasode crecimiento postnatal	+	-	+	+	+	+	+
Malformaciones en extremidades	Hipoplasia bilateral, sindactilia en pie	Clinodactilia	5º dedo situado distalmente (ilateral)	Monodactilia en la izquierda y braquidactilia en la derecha	Oligodactilia, sindactilia, clinodactilia, braquidactilia	Campylopedicilia, braquidactilia, pulgares situados proximalmente	Sindactilia en pie
Retraso psicomotor	+	Retraso en el lenguaje	+	+	+	+	+
Retraso mental	+	+	+	+	N/A	N/A	+
Microcefalia	+	+	+	-	+	+	+
Hirsutismo	-	+	-	+	-	+	-
Anomalías cardiovasculares	Defecto septo atrial, forame oval persistente. Murmullo cardíaco, cardiomegalia	Murmullo cardíaco	Murmullo cardíaco	Murmullo cardíaco	Murmullo cardíaco	Murmullo cardíaco	-
Reflujo gástrico	+	+	-	+	-	+	+(severo)
Alteraciones ORL o auditivas	Pérdida auditiva	Hipertrofia adenoides	Estructuras auditivas internas malformadas	Pérdida auditiva, estenosis de ICAE	Pérdida auditiva	Pérdida auditiva	
Problemas genitourinarios	-	Criptorquidia, quiste renal, hidronefrosis	Riñón en herradura	Criptorquidia	Hipoplásia de labios menores	Ectasia renal, criptorquidia	
Malformaciones craneofaciles	+	+	+	Paladar hendido	Paladar hendido	Paladar ojival	
Alteraciones del SNC	Hiperecogenicidad de sustancia blanca periventricular	-	Hipotonía (leve)	-	Marcada hiperecogenicidad peritrigonal	-	
Problemas alimentarios en la infancia	+	-	-	+	-	+	-
Convulsiones	-	-	-	-	-	-	+
Otros hallazgos	-	-	Estenosis pulmonar, codo limitado	Movilidad del codo limitada	Movilidad del codo limitada, obstrucción del conducto lacrimonasal	Angioma plano en el cuello	Hernia umbilical

Paciente	7	9	10	11	12	13	14
Gen mutado	SMC1A	NIPBL	NIPBL	SMC1A	NIPBL	NIPBL	NIPBL
Exón	4	20	35	5	10	10	37
CDNA mutación ^r	c.587G→A [*]	c.4321G→T	c.6242G→C	c.230+1G→A	c.802_804delAAG	c.2146C→T	c.6449T→C
Efecto sobre el RNA/proteína	p.R196H	Skipping of exon 20, p.F1442KfsX3 p.V1441L	p.G2081A	Skipping of exon 3, p.L22QfsX3	p.K268del	p.Q716X	p.L2150P
Tipo de mutación	Missense	Splice site/missense	Missense	Splice site	Detección In-frame	Non sense	Missense
Género	V	M	V	V	M	M	M
Año de nacimiento	2001	2005	2001	2004	1988	2003	2003
Peso al nacer (g)	2.770	1.700	2.650	1.860	1.850	1.650	1.980
Talla al nacer (cm)	46	40	47	42	43	40	43,5
PC al nacer (cm)	32	29	N/A	27	29	24	29
APGAR (1'/5')	9/10	8/9	9/10	9/9	5/10	N/A	8/10
CIR	-	+	-	+	+	+	+
Retraso de crecimiento postnatal	+	+	+	+	-	+	+
Malformaciones en extremidades	Braquidactilia. clinodactilia	Manos pequeñas	Sindactilia	Braquidactilia, sindactilia en pies	Dedos cortos, cubitus valgus, pies planos	Clinodactilia, sindactilia en pies, manos pequeñas	Hipoplasia de extremidades
Retraso psicomotor	+	+	+	+	+	+	+
Retraso mental	+	+	+	+	+	N/A	N/A
Microcefalia	+	+	+	-	+	+	+
Hirsutismo	+	-	+	+	-	+	+
Anomalías cardiovasculares	Defecto del <u>septo</u> <u>atrio</u> <u>ostium</u> <u>secundum</u>	-	Defecto ventricular septal	Murmullo cardiaco	-	Estenosis pulmonar	-
Reflujo gastroesofágico	-	-	-	-	+	-	+
Alteraciones ORL o auditivas	-	-	-	-	Pérdida auditiva	Pérdida auditiva	Pérdida auditiva
Problemas genitourinarios	-	-	-	-	Ovario poliquístico	-	Anteriormente posicionado
Malformaciones craneofaciles	Paladar arqueado	+	+	+	Paladar hendido	+	Paladar hendido
Alteraciones del SNC	-	-	-	-	-	-	-
Problemas alimentarios en la infancia	-	-	-	-	-	-	-
Convulsiones	-	+	-	-	-	-	-
Otros hallazgos	Articulaciones hiperextensibles,	-	Hiperactividad	-	-	-	Hiperandrogenismo, resistencia a la insulina, Atelektasia

Tabla 4. Nuevos polimorfismos de NIPBL, SMC1A y SMC3 y variantes de significado desconocido identificadas.

Gen	Cambio de nucleótido	Localización	db SNP (frecuencia)	Estado de portador de otros familiares	Alelos control encontrados	Frecuencia alélica estimada
NIPBL:						
	c.3305-85delT	Intrón 11		p	-	-
	c.4421+7A→G [#]	Intrón 20		p	0/100	0.00
	c.4561-85C→T	Intrón 21		p	-	-
	c.5011-62T→C	Intrón 25	rs16903455	-	-	0.052
	c.5575-168A→T	Intrón 29	rs3100685	-	-	0.024
	c.6108+7A→T [#]	Intrón 34		de novo	0/100	0.00
	c.7263+153A→T	Intrón 42	rs300059	-	-	0.152
SMC1A:						
	c.2197-5T→C [#]	Intrón 13	rs2297104	p,m	0/100	0.00
	c.*14C→T [#]	3'UTR		m	0/98	0.00
SMC3:						
	c.92-193G→A	Intrón 2	rs7083749	p,m	100/100	1.00
	c.92-128_127insGTT	Intrón 2	rs10658641	p,m	96/100	0.96
	c.804+55C→G	Intrón 10	-	-	6/100	0.06
	c.1092-64_62delATT	Intrón 12	-	*	1/100	0.01
	c.1305+136A→T [#]	Intrón 13	-	m	0/100	0.00
	c.1305+166_167insTC	Intrón 13	-	p	11/100	0.11
	c.1306-159A→G	Intrón 13	rs2419572	-	-	0.57
	c.3105+83G→T	Intrón 25	rs2039874	p,m	94/98	0.96

p= padre, m= madre, - = no datos, * = no hay padres (niño adoptado), [#] = variantes de significado desconocido.