



## Trabajo Fin de Grado

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
ETIOPATOGENICOS EN UN CASO FAMILIAR DE  
SINDROME CORNELIA DE LANGE

INVESTIGATION OF PATHOGENETIC  
MECHANISMS IN A FAMILIAR CASE OF CORNELIA  
DE LANGE SYNDROME

Autor

María Ascensión Sanromán Guerrero

6ºMEDICINA (GRADO)

Director

Juan Pié Juste

Facultad Medicina 2015-2016

# ÍNDICE

---

1- RESUMEN.....	2
2- INTRODUCCIÓN .....	4
3- OBJETIVOS.....	12
4- MATERIAL Y MÉTODOS	
4.1 CLÍNICOS .....	13
4.2. LABORATORIO .....	16
4.3. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS.....	23
5- RESULTADOS	
5.1: CLÍNICOS .....	24
5.2 LABORATORIO .....	30
5.3. BIOINFORMÁTICOS.....	31
6- DISCUSIÓN.....	34
7- CONCLUSIONES .....	36
8- BIBLIOGRAFÍA.....	37
9- APÉNDICE.....	40

## 1-RESUMEN

---

El síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno del desarrollo hereditario que cursa con: facies característica, retraso del crecimiento y psicomotor, discapacidad intelectual, malformaciones de las extremidades sobre todo superiores y afectación multisistémica. En la actualidad se conocen cinco genes implicados en la patogenia de la enfermedad, que codifican proteínas del complejo de cohesinas: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21*, y *HDAC8*, aunque alrededor del 80 % de los pacientes tienen el gen *NIPBL* afectado.

En este trabajo se describe un caso familiar de SCdL con una madre y una hija afectadas, con fenotipo leve, y mutación missense: c.7553 A>G (p-Asp2518 Gly), en el exón 44 del gen *NIPBL*. La ampliación del estudio genético al resto de la familia localiza dos tíos con la misma mutación pero sin clínica aparente. Los estudios bioinformáticos de predicción de patogenicidad “Predict SNP”, de afectación de la zona HEAT-repeat y de reconocimiento de SNIPs, parecen reforzar la patogenicidad de la mutación encontrada. Por otro lado, los estudios de pirosecuenciación muestran un patrón de distribución de la mutación en la paciente, la madre y los tíos afectos, compatible con un mosaicismo somático.

Se plantean dos grandes cuestiones: ¿Es la mutación p-Asp2518 Gly la causal del síndrome? e independientemente de esta ¿Cómo puede la madre y la hija tener la misma mutación en mosaicismo somático con un patrón de distribución similar por tejidos?

**Palabras clave:** Síndrome Cornelia de Lange (SCdL), *NIPBL*, mutaciones, mosaicismo somático.

## 1-ABSTRACT

---

Cornelia de Lange syndrome (CdLS) is a congenital development disorder which presents a high grade of phenotypic and genotypic variability.

Nowadays, five genes have been associated with CdLS: *NIPBL* *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* and *HDAC8*. About 80% of patients who suffer from this syndrome present a mutation in *NIPBL* gene.

In this work, it is described a familiar case of CdLS with a mother and daughter affected who have a light phenotype and missense mutation: c.7553 A>G (p-Asp 2518Gly), in exón 44 of *NIPBL* gene.

The Broadening of the genetic study to the rest of the family locates one uncle and one aunt with the same mutation but without apparent clinical. Bioinformatic prediction studies of pathogenicity “Predict SNP”, of affectation of HEAT-repeat place and SNIPs recognition,

support the theory of the pathogenicity found. On the other hand, pyrosequencing studies show a distribution of the mutation in the child, mother and aunt and uncle compatible with somatic mosaicism.

In consequence, we have two dilemmas: Is the mutation p-Asp2518 Gly the cause of the syndrome? and independently of this, how can the mother and child have the same mutation in somatic mosaicism with a similar distribution in tissues?.

**Key words:** Cornelia de Lange syndrome (CdLS), *NIPBL*, mutations, somatic mosaicism.

## 2- INTRODUCCIÓN

---

El síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es un trastorno multisistémico caracterizado por una dismorfia facial, hirsutismo, anomalías en las extremidades superiores, retraso en el crecimiento pre y postnatal y retraso psicomotor e intelectual.

Presenta un patrón de herencia autosómica dominante o ligada al X, aunque la mayor parte de los casos son esporádicos o debidos a una mutación de novo.

La primera referencia del síndrome data del 1849 cuando Willem Vrolick describió un caso de un paciente que presentaba oligodactilia<sup>(1, 2, 3)</sup>.

Fue comunicado por primera vez por Winfried Brachmann et al en 1916 tras describir a un paciente con monodactilia grave, facies dismórfica y retraso psicomotor y de crecimiento.

Posteriormente, Cornelia Catharina de Lange, que da nombre al síndrome, describió dos niñas con esta patología en el año 1933.

En 1963, Opitz y colaboradores publicaron el caso descrito por Brachmann anteriormente en la revista Lancet proponiendo denominar a la enfermedad “Brachmann de Lange”. Sin embargo, el nuevo nombre no obtuvo la aceptación de la comunidad científica.

Se estima una prevalencia de la enfermedad de 0.5-10:100.000, sin apenas diferencias encontradas entre las diferentes etnias. Debido a su baja prevalencia podemos considerarla como una enfermedad rara<sup>(1,2)</sup>.

En la actualidad las investigaciones acerca de esta patología han avanzado enormemente, conociéndose en mayor profundidad las bases moleculares de la misma.

A continuación podemos ver fenotipos característicos de SCdL producidos tanto por el gen *NIPBL* como por el *SMC1A* (Ver figuras 1 y 3).

Figura 1: Fenotipo SCdL(SMC1A+).



Figura 2: Fenotipo SCdL (NIPBL+).



## **CLÍNICA DEL SINDROME CORNELIA DE LANGE**

Los pacientes con síndrome Cornelia de Lange presentan un fenotipo caracterizado por una facies peculiar, anomalías en las extremidades y retraso tanto del desarrollo pre y postnatal como físico e intelectual. Además, es frecuente que las alteraciones congénitas afecten a diversos órganos de la economía<sup>3</sup>.

### **Rasgos Craneofaciales**

El fenotipo clásico de SCdL se caracteriza por microcefalia, sinofridia con cejas arqueadas, pestañas largas y finas, nariz pequeña con puente nasal ancho y deprimido, narinas antevertidas así como un filtrum alargado y prominente. Presentan igualmente un labio superior fino con comisuras bucales orientadas hacia abajo, diastema dentario, paladar elevado y micrognatia.

Se caracterizan por unos pabellones auriculares de implantación baja y rotados hacia atrás, así como, un cuello corto con implantación baja del cabello.

A nivel dermatológico destaca un hirsutismo generalizado con predominio en determinados lugares como la espalda, las extremidades y la cara<sup>(2)</sup>.

### **Alteraciones en las extremidades**

Éstas son muy frecuentes por lo que nos pueden ayudar a realizar el diagnóstico. Se caracterizan por manos y pies pequeños así como sindactilia del 5º dedo y acortamiento del 1º metacarpo.

Hasta un tercio de los pacientes afectos de este síndrome presentan alteraciones graves de las extremidades superiores como: oligodactilia e hipoplasia del cúbito, que puede llegar a provocar la ausencia completa del antebrazo con una implantación de los dedos a nivel del codo.

Las extremidades inferiores se encuentran afectadas en menor proporción, siendo una alteración típica la sindactilia entre el 2º y el 3º dedo<sup>(2)</sup>.

### **Crecimiento y desarrollo intelectual**

Los pacientes afectados presentan un retraso de crecimiento pre y postnatal, que ha obligado al desarrollo de curvas específicas para el síndrome. Además, es frecuente la discapacidad intelectual que abarca un amplio espectro desde un CI leve o borderline hasta una deficiencia intelectual profunda<sup>(1, 2)</sup>.

### **Manifestaciones neurosensoriales**

Hasta un 23% de los pacientes desarrollan crisis epilépticas recurrentes que permanecen bien controladas bajo tratamiento adecuado. La tendencia a la hipotonía así como a la ventriculomegalia es característica. Otros hallazgos menos frecuentes son hipoplasia del troncoencéfalo y atrofia de la sustancia blanca.

La estenosis auditiva que tienden a presentar estos pacientes, predispone a una mayor probabilidad de sufrir tanto otitis media agudas de repetición, como episodios frecuentes de sinusitis.

Alrededor de un 60% de todos ellos pueden manifestar hipoacusia de transmisión o neurosensorial por lo que es importante realizar revisiones periódicas a estos pacientes<sup>(2)</sup>.

### **Clínica oftalmológica**

Las manifestaciones más comunes son la miopía, ptosis y blefaritis. Menos frecuentes son la estenosis del conducto lacrimal, la microcórnea y el nistagmus<sup>(2)</sup>.

### **Manifestaciones cardiovasculares**

En torno a un 25 % de los pacientes presentan malformaciones cardíacas siendo típicas la estenosis de la válvula pulmonar y la comunicación interventricular. Menos frecuentes son la coartación de aorta, la tetralogía de Fallot o los defectos en el canal atrioventricular<sup>(2)</sup>.

### **Manifestaciones digestivas**

Dentro del espectro de enfermedades del aparato digestivo, el reflujo gastroesofágico (RGE) es la más frecuente manifestándose hasta en un 90 % de los pacientes y llegando a requerir con frecuencia intervención quirúrgica. Todo ello provoca que estos enfermos presenten comorbilidades como esófago de Barrett o estenosis pilórica. Es importante la correlación clínica encontrada entre RGE con cambios inexplicables en el comportamiento y humor del niño.

Además pueden hallarse anomalías estructurales como válvulos gástricos, malrotación o hernia diafragmática<sup>(1,2)</sup>.

### **Malformaciones genitourinarias**

Se manifiestan con una frecuencia del 40% destacando el reflujo vesico-ureteral y la dilatación de los cálices renales. En varones puede haber criotorquidia, hipospadía y micropene, mientras que las niñas pueden presentar hipoplasia de los labios menores<sup>(1, 2, 5)</sup>.

## MÉTODOS DE CLASIFICACIÓN CLÍNICA

Actualmente se dispone de diversos métodos para clasificar a los pacientes afectados en función de su gravedad. El primero fue desarrollado por la doctora Lynette Gillis en el año 2004, el cuál valora la gravedad de la clínica en función de una serie de parámetros como la malformación de las extremidades, el desarrollo físico y las capacidades cognitivas.

En función de los resultados se establecen tres grupos: Clase I (leve), Clase II (moderado) y clase III (grave)<sup>(2)</sup>.

Posteriormente, la doctora Kline desarrolló una nueva escala de valoración que utiliza nuevos parámetros (peso al nacer, malformaciones, adquisición de habilidades) que llevan asociados una determinada puntuación en función de la gravedad y tiempo de adquisición. Una vez evaluados se obtiene una puntuación final.

Leve (menor de 15 puntos), moderado (15-22 puntos), grave (mayor de 22 puntos)<sup>(2,6)</sup>.

## BASES GENÉTICAS

Actualmente se reconoce la participación de cinco genes en la patogenia SCdL: *NIPBL* (5p13.2), *SMC3* (10q25.2), *RAD21* (8q24.11), *HDA C8* (Xq13.1) y *SMC1A* (Xp11.22-p11.21)<sup>(7)</sup>.

El gen *NIPBL* y *HDAC8* codifican factores reguladores del complejo de cohesinas, mientras que los genes *SMC1A*, *SMC3* y *RAD 21* codifican subunidades estructurales del complejo<sup>(7)</sup>.

Dicho complejo está constituido por dos grandes componentes: *SMC3* y *SMC1A* y dos proteínas de cierre de menor tamaño: *RAD 21* (Kleisina)/*REC8* y *STAG1/STAG2/STAG3*.

En la actualidad, sabemos que son multitud las proteínas encargadas de la regulación del complejo de cohesinas predominando en número sobre los componentes estructurales. Sin embargo, solo son dos los factores reguladores que han demostrado intervenir en la patogenia del síndrome, las proteínas *NIPBL* y *HDAC8*.

La función de las cohesinas es junto a la de las condensinas asegurar el mantenimiento de los cromosomas en las células eucariotas durante las fases de mitosis y meiosis<sup>(7)</sup>.

De este modo, forma un anillo alrededor de la cromatina interviniendo en la regulación de la cohesión de las cromátidas hermanas durante la mitosis y en la reparación tanto homóloga como no homóloga del DNA. Todos estos hallazgos parecen indicar que SCdL podría ser el resultado de un defecto en la cohesión de las cromátidas debido a un fallo en el funcionamiento del complejo<sup>(7,8)</sup>.

Sin embargo, la mayor parte de los pacientes que han sido sometidos a estudio no presentan defectos en la cohesión y si en otras funciones de vital importancia como la regulación de la expresión génica<sup>(9, 10)</sup>.

Experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina demuestran que el complejo de cohesinas se asocia al homodímero CTCF (una proteína de dedo Zinc) impidiendo que el potenciador (enhancer) se una al promotor, reprimiendo de este modo la expresión génica. Además, también pueden unirse al complejo proteico *mediator* estimulando la transcripción<sup>(11, 12)</sup>.

Aunque los estudios revelan que el principal mecanismo etiopatogénico de la enfermedad es la alteración de la expresión génica, nuevas investigaciones sobre fibroblastos demuestran que estos pacientes podrían presentar también alteraciones en la reparación del DNA.

En base a todos estos datos podríamos definir los síndromes como primarios, si se afectan los componentes estructurales del complejo de cohesinas, o secundarios, cuando el complejo se encuentra intacto pero no puede desarrollar su función, afectación de *NIPBL*.

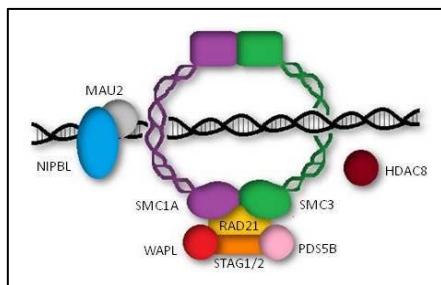


Figura 3: Complejo de cohesinas<sup>(15)</sup>.

A fecha de hoy, en torno a un 23% de los pacientes diagnosticados de SCdL presentarían un mosaicismo somático, lo que ha introducido, cada vez más, el uso de la pirosecuenciación para analizar el porcentaje de alelo mutado<sup>(6)</sup>.

Aunque la mayoría de los pacientes afectados debutan con mutaciones de *novo*, es posible encontrar casos de herencia familiar. Los genes mayormente afectados son *NIPBL*, *SMC3*, *RAD21*, *SMC1A* y *HDAC8*. Los tres primeros presentan una herencia autosómica dominante, mientras que los dos últimos tienen una herencia ligada al cromosoma X.

### **GEN NIPBL**

Fue Descrito por primera vez en el año 2004 y constituye el principal gen implicado en SCdL.

Se encuentra localizado en el cromosoma 5 (5p13.2) y se compone de 47 exones<sup>(6)</sup>.

Se han descrito alrededor de 300 mutaciones diferentes del gen, entre las que destacan las 49 localizadas en el exón 10, probablemente debido a su gran tamaño.

En torno a un 80 % de los pacientes presentan una mutación en el gen *NIPBL* y un 23% de ellos en mosaicismo somático. Se han descrito todo tipo de mutaciones, en orden decreciente de prevalencia tendríamos: *alteraciones del marco de lectura/frameshift* (34,5%), *cambio de aminoácido/missense* (23,6%), *codones de Stop* (18,8%), *splicing* (16%) y el 6,2 % restante que incluiría a mutaciones como translocaciones balanceadas o grandes delecciones<sup>(10,13)</sup>.

Es reseñable que las mutaciones tienden a seguir una distribución característica de manera que las *missense* suelen localizarse en el extremo carboxi-terminal (zonas *Heat-Repeat*), mientras que las más graves, asociadas a truncamiento de la proteína y pérdida de función se encuentran en el extremo N- terminal<sup>(10)</sup>.

Actualmente no han sido descritas mutaciones en los exones 13 y 16, hecho que sugiere la posibilidad de que una mutación en dicha localización produzca un defecto funcional grave incompatible con la vida.

### **PROTEÍNA NIPBL**

La proteína NIPBL es una adherina que estimula la hidrólisis del ATP de la cabeza de los dominios de SMC, permitiendo la apertura del complejo de cohesinas y facilitando la carga del ADN. Recientemente, se ha demostrado la interacción de NIPBL con las deacetilasas HDAC1 y HDAC3 y su relación con la deacetilación de los nucleosomas de la cromatina<sup>(12,13)</sup>.

Los nucleosomas acetilados facilitan la expansión de la cromatina mientras que los deacetilados hacen el efecto contrario. Por ello se sugiere su intervención en la compactación de la cromatina y la inhibición de la expresión génica<sup>(5,10)</sup>.

### **OTROS GENES IMPLICADOS**

*SMC1A* es el segundo gen causal más frecuente del SCdL y está localizado en el cromosoma Xp11.2. Su patrón de mutaciones es diferente al del gen *NIPBL* ya que solo han sido descritas de tipo *missense*, esto apoya fuertemente la teoría de que las mutaciones más graves podrían ser incompatibles con la vida, aunque también podría ser que produjesen un síndrome diferente.

En el año 2007, revisando muestras de pacientes con ausencia de alteraciones genéticas en *SMC1A* y *NIPBL* se descubrió la presencia de mutaciones en el gen *SMC3*, localizado en el cromosoma 10q25<sup>(1)</sup>. Su afectación de baja frecuencia es similar a la del gen *SMC1A* describiéndose sobre todo mutaciones de tipo missense.

#### **RELACIONES GENOTIPO-FENOTIPO**

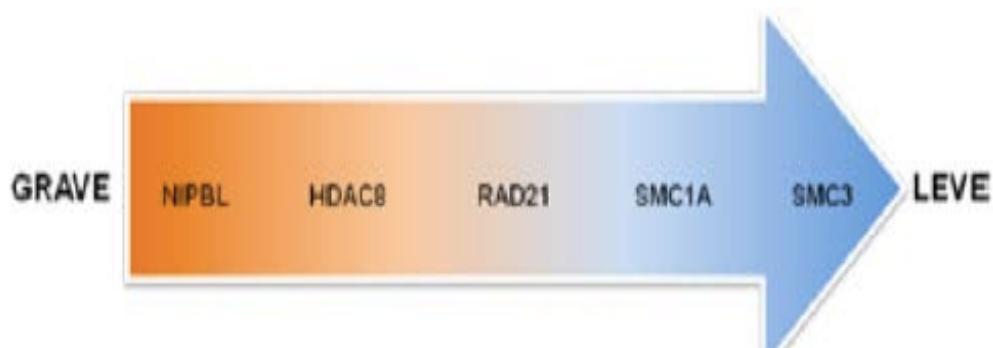
Esta patología presenta una gran heterogeneidad clínica y genética, pero suele existir una relación entre gravedad de la mutación y fenotipo severo.

Las mutaciones *missense*, cambio de aminoácido, se relacionarían con fenotipos leves caracterizados por un retraso menor del crecimiento, RGE y ausencia de alteraciones en las extremidades<sup>(11)</sup>. Una excepción sería la mutación *missense* (Ieu2150Pro) localizado en plena zona de dominios *Heat-repeat* que producía un fenotipo con monodactilia bilateral<sup>(13)</sup>.

Las mutaciones de *Splicing* se asocian a un fenotipo intermedio de la enfermedad, presentando retraso moderado tanto en el crecimiento como de la capacidad cognitiva, RGE, malformaciones de las extremidades, así como anomalías en algunos órganos principales.

En último lugar, las mutaciones *frameshift* y *nonsense* que producen ruptura de la proteína, se asocian a los fenotipos más graves, presentando retrasos severos en el desarrollo cognitivo y crecimiento, RGE, alteraciones graves en las extremidades y malformaciones en órganos principales<sup>(14)</sup>.

Las diferencias de fenotipo en función del tipo de gen afectado serían de menor a mayor gravedad: *SMC3* seguido de *SMC1A*, *RAD21*, *HDAC8* y *NIPBL*. Sin embargo, el 80% de los pacientes afectos tienen mutación en el gen *NIPBL*<sup>(14)</sup>.



**Figura 4:** Escala de gravedad clínica de acuerdo al gen afectado<sup>(6)</sup>.

Las mutaciones en los genes *SMC1A* y *SMC3* se asocian generalmente a fenotipos más leves con respecto a *NIPBL* en cuestión de crecimiento y anomalías en las extremidades. Si la mutación se encuentra en *RAD21*, los pacientes suelen presentar generalmente retraso del crecimiento, moderadas anomalías esqueléticas y un fenotipo clásico de SCdL<sup>(14)</sup>.

Mutaciones en el gen *HDAC8* presentarían un fenotipo clásico de SCdL y rasgos típicos como puente nasal amplio, párpados caídos así como un aumento de la fontanela anterior<sup>(14, 15,16,17,18)</sup>.

Por último, mutaciones en el gen *NIPBL*, especialmente las del tipo “ruptura del marco de lectura”, son las que se asocian a un fenotipo más grave.

Paradójicamente, pacientes afectados por la misma mutación manifiestan un fenotipo diferente, a veces incluso, con ausencia de clínica, sugiriendo fuertemente la posibilidad de intervención de otros factores, genéticos o no, en la etiología del síndrome<sup>(5)</sup>.

Actualmente, entre el 25 y el 30 % de los pacientes quedan sin diagnóstico genético. Ello plantea la posibilidad de que nuevos genes causales puedan ser descubiertos en los próximos años. La presencia de un mosaicismo somático debe ser siempre descartada, para lo que se recomienda los estudios en DNA de células de mucosa oral y la utilización de técnicas de secuenciación masiva, que se han demostrado más sensibles que la tradicional de Sanger. Aunque la incidencia de casos familiares es baja, se recomienda el diagnóstico prenatal si la pareja ha tenido un hijo afectado previamente<sup>(4,17,18)</sup>.

### **3- OBJETIVOS**

---

El objetivo principal de este trabajo es analizar los mecanismos etiopatogénicos del Síndrome Cornelia de Lange en una familia con varios miembros afectos.

Se perseguirán los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar y validar la mutación causal de una familia con Síndrome Cornelia de Lange.
2. Estudiar por pirosecuenciación la posible existencia de un mosaicismo somático en los diferentes miembros de la familia.
3. Intentar establecer relaciones genotipo-fenotipo en los familiares afectados

## 4- MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 CLÍNICOS

#### 4.1.1 Historia clínica estándar

A la hora de estudiar a un paciente la Unidad de Genética Clínica y Genómica Funcional utiliza una historia clínica estándar.

ESTUDIO MOLECULAR DEL SÍNDROME DE CORNELIA DE LANGE Facultad de Medicina – Universidad de Zaragoza HOJA DE DATOS CLÍNICO-EPIDEMIOLOGICOS					
PACIENTE:	Apellidos:	Nombre:	Edad:	Sexo:	Teléfono:
Fecha nacimiento:	Dirección:				E-mail:
Grupo étnico:	Edad de diagnóstico del síndrome:				
Profesional remitente:	Teléfono:	Centro procedencia:	E-mail:		
<i>(Incluir informes médicos previos disponibles)</i>					
<u>Historia personal:</u> Embarazo: Parto: Periodo neonatal: Desarrollo psicomotor:					
<u>Historia familiar:</u> (Preferible árbol genealógico)					
<u>Manifestaciones clínicas:</u> <ul style="list-style-type: none"><li>- CRANEO: microcefalia; braquicefalia; línea de inserción del cabello anterior baja; edad de cierre de la fontanella anterior; otros.</li><li>- OJOS: cejas arqueadas; sinofridia; pestañas largas; ptosis; miopía; obstrucción del conducto lacrimal; otros.</li><li>- NARIZ: puente nasal deprimido; narinas antevertidas; philtrum largo y liso.</li><li>- BOCA: labio superior delgado; boca en carpa; paladar alto/paladar hendido; anomalías dentales; micrognatia; otros.</li><li>- ORL: hipoacusia; sordera; otitis/ sinusitis/ amigdalitis de repetición.</li><li>- CUELLO: línea de inserción de cabello posterior baja.</li><li>- CARDIOVASCULAR: cardiopatía congénita.</li><li>- PULMONAR: apneas; infecciones respiratorias recurrentes; otras.</li><li>- GASTROINTESTINAL: reflujo gastroesofágico; problemas con la alimentación/succión.</li><li>- GENITOURINARIO: malformaciones renales; reflujo vesicoureteral; malformaciones uterinas/ovarios; criotorquidia; hipo/epispadias; otros.</li><li>- EXTREMIDADES: manos pequeñas; inserción proximal del pulgar; clinodactilia del 5º dedo; pliegue palmar único; pies pequeños; sindactilia de los dedos del pie; defectos de reducción de extremidades; limitación para el movimiento de los codos; otros.</li><li>- PIEL: hirsutismo; cutis mammorata; otros.</li><li>- SNC: anomalías estructurales en SNC (eco, TAC, RMN); convulsiones; otras.</li><li>- MENTAL/COGNITIVO: discapacidad intelectual; alteraciones de comportamiento/personalidad.</li><li>- DESARROLLO: desarrollo del lenguaje; edad primera palabra; desarrollo motor; edad sentarse solo; edad caminar solo.</li><li>- DATOS ANTROPOMÉTRICOS: edad gestacional; peso al nacer (g); longitud al nacer (cm); perímetrocefálico (cm). Datos actuales: peso (kg); talla (cm); perímetrocefálico (cm).</li><li>- DATOS GENÉTICOS: gen afectado; mutación/ variante; efecto en la proteína.</li></ul>					
SEVERIDAD CLÍNICA: Leve/Moderada/Grave					

**Tabla 1:** Historia clínica estándar utilizada.

#### **4.1.2. Métodos de clasificación**

##### **Clasificación de gravedad según Gillis<sup>11</sup>**

El laboratorio de genética dispone de una tabla estandarizada que permite clasificar a los pacientes en una serie de categorías de acuerdo a una serie de criterios.

**Tabla 2:** Método de clasificación de Gillis<sup>(11)</sup>.

	<b>TIPO 1 (leve)</b>	<b>TIPO 2 (medio)</b>	<b>TIPO 3 (grave)</b>
<b>Anomalías extremidades</b>	No presenta	Oligodactilia (>2 dedos en cada mano)	Afectación severa (<2 dedos en cada mano)
<b>Desarrollo y actividades cognitivas</b>	<2 años de retraso en capacidad motora	Limitado desarrollo del lenguaje	Retraso motor profundo.
<b>Crecimiento</b>	Percentil >75	Percentil (25-75)	percentil <25

Los percentiles de la anterior tabla están adaptados a las curvas estándar específicas para el SCdL.

##### **Clasificación de Kline<sup>(1)</sup>**

Según Kline, un individuo se considera afectado de SCdL si presenta:

1- Sinofridia (criterio principal de la categoría craneofacial) más tres criterios secundarios de esta categoría y más los criterios necesarios de la categoría de crecimiento, de desarrollo físico o de comportamiento.

2- Sinofridia (criterio principal de la categoría craneofacial), más tres criterios de esta categoría, y más los criterios necesarios de tres de las otras seis categorías, contando con que al menos una de ellas tiene que ser de la categoría de crecimiento, desarrollo físico o comportamiento<sup>(1)</sup>

**Tabla 3:** (Criterios diagnósticos de Kline)

		<b>Criterio Principal</b>		<b>Criterio secundario</b>
<b>Craneofacial</b>		Sinofridia (cejas finas y arqueadas)	<b>&gt;3</b>	Pestañas largas Nariz pequeña y narinas antevertidas Filtrum ancho y prominente Puente ancho y deprimido Barbilla pequeña y cuadrada Labios finos con comisuras hacia abajo Paladar elevado Diastema
<b>Crecimiento</b>	<b>≥2</b>	Peso < percentil 5 Altura < percentil 5 Perímetro cefálico < percentil 5		
<b>Desarrollo</b>	<b>≥1</b>	Retraso del desarrollo o mental Dificultades de aprendizaje		
<b>Comportamiento</b>	<b>≥2</b>	Déficit de atención/hiperactividad Agresividad Ansiedad Comportamiento obsesivo-compulsivo Comportamiento autolesivo Autismo Timidez extrema		
<b>Extremidades</b>	<b>≥1</b>	-Defectos de reducción con ausencia de antebrazos ó -Manos o pies <percentil 3 u oligodactilia ó -Ninguna de las anteriores	<b>+0</b> <b>+2</b> <b>+3</b>	Clinodactilia del 5º dedo Línea palmar anormal Extensión anormal del codo 1º metacarpiano corto/localización proximal de pulgares Deformidad en los dedos de los pies Sindactilia en 2º o 3º dedo del pie Escoliosis Pectus excavatum Displasia o dislocación de cadera
<b>Neurosensorial/piel</b>	<b>≥3</b>	Ptosis Malformaciones del lagrimal o blefaritis Miopía ≥6D Malformaciones oculares mayores o pigmentación peripapilar Sordera o pérdida de audición Epilepsia Cutis marmorata		

		Hirsutismo generalizado Mama y/u ombligo pequeño Malrotación/malformación intestinal		
<b>Otros sistemas</b>	<b>≥3</b>	Hernia diafragmática Reflujo gastroesofágico Fisura palatina Defectos cardiacos congénitos Micropene Hipospadias Criptorquidia Malformaciones del tracto renal o urinario		

## 4.2. LABORATORIO

### 4.2.1: Obtención de la muestra

El DNA se obtiene de dos tipos celulares:

Leucocitos de sangre periférica y células de la mucosa oral.

#### DNA de células de mucosa oral

- 1- Mezclar la muestra en el kit de DNA Genotek y agitar durante unos segundos.
- 2- Incubar la muestra a 50°C en una incubadora de agua 1 hora.
- 3- Transferir 500µl de la muestra mezclada a un tubo de microcentrifuga.
- 4- Añadir 20µl de PT-L2P y mezclar en vortex.
- 5- Incubar en hielo durante 10 min.
- 6- Posteriormente centrifugar a temperatura ambiente 5 min a 15.000xg.
- 7- Transferir el sobrenadante claro con una pipeta a un tubo de microcentrifuga limpio.
- 8- Añadir 600 µl de etanol al 100% a temperatura ambiente al sobrenadante claro y mezclar invirtiéndola 10 veces.
- 9- Dejamos la muestra a temperatura ambiente 10 min para permitir la precipitación completa del ADN.
- 10- Centrifugar a temperatura ambiente durante 2 min a 15.000xg.
- 11- Retirar cuidadosamente el sobrenadante y añadir 250µl de etanol al 70% y dejar a temperatura ambiente un minuto. Posteriormente retirar completamente el etanol.
- 12- En último lugar, añadimos 100µl de solución TE, mezclamos en vortex durante 5 segundos e incubamos toda la noche a temperatura ambiente.

#### DNA de leucocitos de sangre periférica

- 1- Rotular los tubos Falcón con el código de la paciente.
- 2- Homogeneizar los tubos de sangre por inversión.
- 3- Separar 4 ml de sangre por cada tubo FALCON de 50 ml.
- 4- Añadir 10 volúmenes de Tritón Sucrosa.
- 5- Centrifugar 10 min 2000rpm a 0°C.
- 6- Añadir Proteinasa K.
- 7- Incubar la muestra durante la noche.

- 8- Añadir 2 ml NaCl 6M y disolver.
- 9- Añadir Cloroformo
- 10- Centrifugar 15 min a 2500rpm.
- 11- Recoger sobrenadante.
- 12- Añadir Isopropanol 1:1 y mezclar hasta aparición de ovillo DNA.
- 13- Mediante micropipeta, absorber el ovillo y pasar a tubo eppendorf.
- 14- Añadir etanol al 70 % y agitar durante 30 min.
- 15- Añadir Buffer TE y dejar en estufa 37°C hasta disolución.
- 16- Medir DNA en espectrofotómetro.

#### 4.2.2: Diseño de Primers

Para llevar a cabo una PCR es necesario diseñar unos “*Primers*”, que son dos cebadores complementarios a las secuencias de ADN situadas en ambos extremos del fragmento que se desea amplificar.

Para su diseño se siguen una serie de indicaciones:

- 1- Longitud óptima de 18-22 nucleótidos.
- 2- La temperatura meeting (TM) o de disociación es aquella en la que el primer se encuentra disociado en un 50%.
- 3- Los “*Primers*” de la pareja deben tener TM parecidas ya que la temperatura óptima de hibridación de la PCR es de 2 a 4º por debajo de su media.
- 4- En la secuencia del “*Primer*” debe haber un contenido de bases de G y C de un 40-60%. Es importante evitar la complementariedad entre los dos extremos para evitar la formación de dímeros.

**Tabla 4:** Primers realizados para exón 44 del gen *NIPBL*.

Primer Forward	CAAGCTGTTGAATGGAGCATA
Primer Reverse	<i>GCTGGGTGTGGTGGCTCATG</i>

#### 4.2.3: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se amplificarán las regiones a estudio mediante la técnica PCR (reacción en cadena de polimerasa). Para la realización de la técnica usamos los siguientes componentes ( [Ver Tabla 5](#)).

**Tabla 5:** Componentes de PCR

PCR	CONCENTRACIÓN FINAL
Buffer 10x	1x
dNTPs 0,5mM	0.05 mM
MgCl <sub>2</sub> 50mM	1-2mM
Primer forward(20pmol/ µl)	0,5(20pmol/ µl)
Primer reverse(20pmol/ µl)	0,5(20pmol/ µl)
DNA 100 ng/ µl	50 ng
Eco Taq Polimerasa(5U/ µl)	2-3U
H <sub>2</sub> O	c.p.s 40 µl

A continuación se describen las fases de la PCR que se repiten entre 20 y 35 veces.

#### **FASES:**

- 1- Desnaturalización del DNA a 94-95°C.
- 2- Unión del *Primer* diseñado a su secuencia complementaria a una T<sub>a</sub> de 50-65°C. La polimerasa une el *Primer* a la hebra molde y comienza a sintetizar el DNA.
- 3- Extensión de la cadena de DNA. La DNA polimerasa sintetiza la cadena complementaria partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de DNA. Para ello va añadiendo dNTPs complementarios en sentido 5'-3'. La temperatura usada en este ciclo depende de la DNA polimerasa usada. Para la Taq polimerasa, la temperatura de máxima actividad está entre 75-80°C.

Una vez hemos completado 25 ciclos compuestos por cada una de las fases anteriormente explicadas, se realiza una fase de elongación final a 70-74°C durante 10-15 min.

Finalmente se conserva a 4-15°C durante el tiempo requerido.

A continuación se muestran en la [tabla 6](#) las fases de la PCR así como su duración.

Tabla 6: Fases PCR

Fase	Temperatura	Tiempo
Inicialización	98°C	3 min
Desnaturalización	96°C	30s
Hibridación	58-60°C	30 s
Extensión	72°C	40s
Extensión final	72°C	5min
Conservación	4°C	5min

#### 4.2.4: Electroforesis en gel agarosa

Para verificar que la PCR ha generado el fragmento de DNA previsto se emplea electroforesis en gel de agarosa para separar por tamaños los productos de PCR.

Dependiendo del tamaño del gel y del porcentaje de agarosa del mismo las cantidades de agarosa a añadir serán las siguientes ( Ver tabla 7 )

Tabla 7

Gel agarosa (%)	Cama pequeña 35 ml	Cama grande 50 ml
	TBE (g agarosa)	TBE ( g agarosa)
0,8%	0,28	0,4
1%	0,35	0,5
1,5%	0,525	0,75
2%	0,7	1

A estos geles se les debe añadir Bromuro de Etilio (BrEt) para la visualización del DNA. Éste se añade cuando la agarosa está caliente y no se ha solidificado todavía. Una vez añadido el BrEt, se añade la agarosa a la cama con los peines para que se solidifique con la forma del gel. Una vez realizado el paso anterior se realiza la electrofóresis cubriendo el gel con una solución de TBE (Tris-Borato-Edta).

A continuación se cargará 20μl de la muestra junto a tampón de carga en cada pocillo y 6μl de marcador de peso molecular, realizándose posteriormente una electroforesis en un campo a 75V hasta que el frente alcance los 2/3 del gel. Una vez finalizado el proceso se realiza una comprobación de los fragmentos de DNA con un transiluminador con luz UV.

Tras el análisis de los geles podemos encontrar 3 situaciones posibles:

- 1- Aparece una única banda cuyo peso molecular se corresponde con el exón amplificado.
- 2- Observamos una doble banda, lo que significa que la PCR no ha sido lo suficientemente restrictiva, por lo que hay que repetir el proceso aumentando la temperatura.
- 3- Podemos observar un *smear*, que es la presencia de varias bandas, lo que significa de igual manera que la PCR no ha sido suficientemente restrictiva y que hay que repetir el proceso aumentando la temperatura.

#### 4.2.5: Purificación de la muestra

Antes de proceder a la secuenciación debemos purificar los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR para eliminar los componentes de la mezcla de la reacción.

Existen diferentes kits disponibles, pero nuestro laboratorio usa “EXOSAP-IT”, que permite la purificación del producto. De este modo se eliminan los Primers y dNTPs gracias a las enzimas Exonucleasa I y Shrimp Alkaline fosfatasa.

**Protocolo que sigue nuestro laboratorio**

- 1- Colocar la EXOSAP-IT en hielo y posteriormente mezclar 5μl del producto de PCR con 2μl del reactivo “EXOSAP-IT”.
- 2- Incubar la mezcla a 37°C durante 15 min (degradación primers y nucleótidos).
- 3- Incubar a 80°C otros 15 min (Inactivación “EXOSAP-IT”).
- 4- Conservar el producto PCR purificado a -20°C.

#### 4.2.6: Secuenciación del exón

Procederemos a la secuenciación de nucleótidos mediante la técnica Sanger (cualitativa) y Pirosecuenciación (cuantitativa). Éste método se realiza en un laboratorio externo (CIBA).

#### Método enzimático de Sanger

- 1- Desnaturalización de la doble cadena de DNA en una monohebra sencilla.
- 2- Se diseña un oligonucleótido de unos 17-20 pares de bases complementario a la cadena de DNA que se quiere secuenciar y situado a unos 20 o 30 pares de bases de distancia del comienzo de la secuencia que se quiere leer.

De esta manera se forma un dúplex entre el oligonucleótido y la cadena simple de DNA que sirve de sustrato a la DNA polimerasa I, que va a extender la cadena desde el grupo OH libre del extremo 3' del oligonucleótido, incorporando dNTPs y copiando el molde de DNA al sintetizar la cadena complementaria.

3-Posteriormente se forman 4 tubos donde se añade la cadena de DNA desnaturalizada, los 4 tipos de dNTPs, el oligonucleótido que hemos diseñado previamente y en cada tubo un tipo diferente de ddNTP.

4- Durante la secuenciación se llevan a cabo cuatro reacciones de síntesis separadas, incluyendo en cada una de ellas pequeñas cantidades de didesoxinucleótidos, que carecen del extremo OH libre y que al incorporarse a la cadena que se está sintetizando acaba con la elongación de la misma.

5- La incorporación al azar de un ddNTP en lugar del dNTP correspondiente da lugar a la formación de cadenas de distintas longitudes.

6- La sustitución de los dNTPs por los ddNTPs permite la visualización de las bandas de distinta longitud en un gel de poliacrilamida, donde cada una de las reacciones se carga en un carril. En el gel la separación de las distintas bases se produce en función de su tamaño y la secuencia puede determinarse leyendo las bandas de los 4 carriles.

### **Pirosecuenciación**

Es un método de secuenciación de DNA en tiempo real basado en la liberación de pirofosfatos (PPi) que tiene lugar en la polimerización del DNA a partir de sus dNTPs.

En primer lugar se requiere la preparación de una hebra monocatenaria de DNA a la cual se le añade un cebador. A medida que se sintetice la cadena complementaria se irán obteniendo una serie de picos de señal en el pirograma, que nos permitirá identificar la secuencia.

### **PROTOCOLO:**

- 1- Una vez se han amplificado los fragmentos de DNA que queremos, procedemos a realizar la pirosecuenciación.
- 2- Fragmentamos el DNA a secuenciar mediante un proceso conocido como nebulización.
- 3- En segundo lugar procedemos al diseño de unos Primers específicos a través del servicio de secuenciación y genómica funcional del centro de investigación biomédica de Aragón (CIBA) mediante el software específico PSQ Assay design, diseñándose en F o R dependiendo de cómo queramos secuenciar.
- 4- Ligación de oligonucleótidos (adaptadores) en cada uno de los extremos. Estos oligonucleótidos sirven tanto para fijar los fragmentos del DNA a las esferas como de cebador para la PCR. En nuestro caso se diseñó un *Primer Forward* específico. Importante señalar que éste *primer* se encuentra marcado con Biotina, molécula que posteriormente se usará para purificar.

Nombre	Sentido	Secuencia	Exón
SEQ c.7553A>G	Forward	AGATTGAGATTGAGAAG	44

5- Posteriormente se ligan los adaptadores a las beads, que son esferas que contienen la secuencia complementaria de dichos adaptadores. De este modo se pretende tener un fragmento en cada esfera. Una vez unidos a las beads, la población de esferas se incorpora a una emulsión de aceite y agua obteniendo micelas de aceite diferentes, cada uno con una única esfera y los reactivos necesarios para realizar la PCR. .

6- Amplificación clonal (mediante PCR en emulsión). Permite realizar en un único tubo miles de reacciones independientes

7- Las beads son depositadas en la placa de secuenciación (pico titer plate). Ésta tiene 1,6 millones de pocillos donde solo puede entrar un bead llevándose en cada uno de ellos una secuenciación.

8- La reacción de secuenciación se compone de una serie de ciclos en cada pocillo de manera que se va ofreciendo una base por vez secuencialmente.

**8.1-** Un cebador específico (*Primer Forward*) se une a la cadena de DNA sencilla en presencia de dNTPs, DNA polimerasa, ATP sulfurlasa, luciferasa y aspirasa así como de los sustratos APS y luciferina.

**8.2-** Un dNTP se añade a la reacción. La DNA polimerasa cataliza su incorporación a la cadena liberándose PPi en cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado.

**8.3-** La ATP sulfurlasa convierte el PPi en presencia del APS en ATP. Esta luz es captada por la cámara CCD y se visualiza en el pirograma como un pico, siendo la altura proporcional al número de nucleótidos incorporados.

**8.4-** La aspirasa degrada tanto el ATP como los dNTPs no utilizados apagando de esta forma la emisión de luz y regenerando las condiciones para que pueda ser añadido un nuevo nucleótido a la reacción.

**8. 5-** La adición de nucleótidos ocurre de uno en uno.

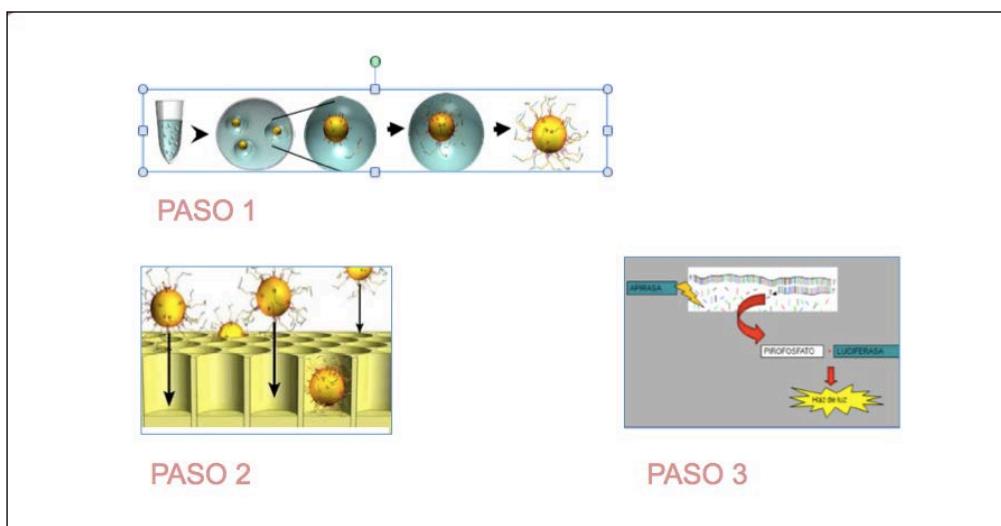


Figura 5: Reacción enzimática clave en el proceso de la pirosecuenciación <sup>(19)</sup>.

#### **4.2.7- Diagnóstico de variantes alélicas mediante BLAST**

Nuestro último paso es comparar la secuencia de nucleótidos obtenida con la secuencia patrón esperada para ese exón mediante un programa informático (BLAST) de alineamiento de secuencias. De este modo podemos detectar las mutaciones en la secuencia estudiada.

### **4.3. MÉTODOS BIOINFORMÁTICOS**

#### **4.3.1 Análisis de Patogenicidad de la mutación**

Una vez detectada la mutación introducimos los datos en el programa “*Predict SNP*” que incluye seis de los mejores programas bioinformáticos predictivos de patogenicidad de mutaciones.

#### **4.3.2: Modelado tridimensional de la proteína mutada**

Nuestro último paso, es analizar si la mutación *missense* provoca un cambio de aminoácido de la proteína que repercuta en su estructura final. Para ello, se cuenta con la colaboración del bioinformático Paulino Gómez Puertas del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa de Madrid que realizará el modelado tridimensional de la proteína.

## 5- RESULTADOS

### 5.1: CLÍNICOS

#### 5.1.1: ARBOL GENEALÓGICO

Además, del árbol genealógico familiar se indican los cromatogramas positivos de los familiares afectos.

C0208 es el caso índice, C0208b es la madre, C0208T1 es el tío, C0208T2 y C0208T3 son las dos tías y C0208D es la abuela.

La madre (C0208b), una tía (C0208T3) y el tío (C0208T1) son positivos para la mutación, aunque estos dos últimos no presentan clínica de la enfermedad.

La abuela y una tía (C0208T2) son negativas para la mutación.

En el árbol aparecen representadas tres generaciones de las que se han obtenido muestras de leucocitos de sangre periférica, para realizar el estudio genético del gen *NIPBL* mediante técnica *Sanger*.

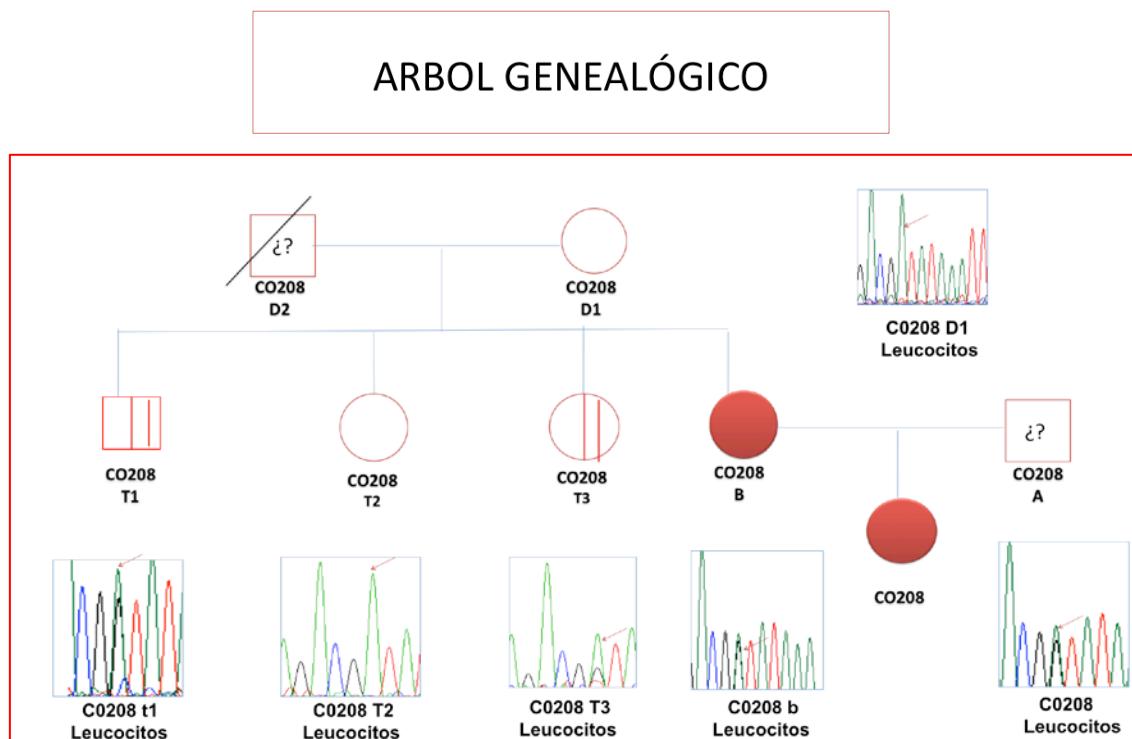


Figura 6: Representación del árbol genealógico de la familia afectada con los cromatogramas.

**Mutación en NIPBL, exón 44 c.7553 A>G; p(Asp 2518 Gly)**

¿? NO MUESTRA

 AFECTADO

 NO AFECTADO

 PORTADOR ASINTOMÁTICO

### **5.1.2: HISTORIAS CLÍNICAS**

#### **PACIENTE C0208:**

Paciente mujer, de raza caucásica diagnosticada de SCdL a los 18 meses. Primera hija de padres no consanguíneos .

#### **ANTECEDENTES FAMILIARES**

Padre español con patología tiroidea de origen no aclarado.

La madre es de origen ecuatoriano y presenta fenotipo compatible con SCdL. Como antecedentes relevantes destaca retraso psicomotor con inicio de la deambulación a los 2 años, hipoacusia neurosensorial derecha, bronquitis en la infancia y depresión secundaria a dis regulación hormonal.

Embarazo controlado sin antecedentes relevantes.

#### **HISTORIA CLÍNICA**

Nacimiento a las 37 semanas de gestación mediante cesárea. Su peso a la hora de nacer fue de 2680 gramos, longitud: 47,2 cm, perímetrocefálico: 34 cm y Apgar 9/10.

La prueba del talón no demostró patología pero el screening de otoemisiones acústicas estaba alterado.

A los 3 años es estudiada en el servicio de pediatría por presentar un fenotipo compatible con SCdL.

Durante la infancia presentó un retraso psicomotor leve con aparición de la sedestación a los 10 meses, inicio de la marcha a los 14 años y deambulación sin ayuda a los 22 meses.

#### **EXPLORACIÓN FÍSICA**

Fallo de medro con un peso de 12 kg (p5) y una talla de 94 cm (p7).

La paciente fue evaluada por los diferentes pediatras especialistas en la enfermedad, sometiéndose a un exhaustivo estudio por aparatos y sistemas.

Los hallazgos encontrados quedan recogidos en la siguiente tabla (ver tabla 8).

Tabla 8

<u>PACIENTE CASO</u>	<u>Hallazgo clínico</u>
<b>SEXO</b>	Femenino.
<b>RAZA</b>	Caucásica.
<b>NARIZ</b>	Puente nasal deprimido y narinas antevertidas .
<b>OJOS</b>	Pestañas largas, sinofridia, cejas hiperpobladas.
<b>BOCA</b>	Labios normales.
<b>CABEZA</b>	Línea de inserción del cabello baja.
<b>OREJAS</b>	Baja implantación e hipoacusia neurosensorial.
<b>RESPIRATORIO</b>	No signos de dificultad respiratoria. Tórax simétrico.
<b>CARDIOVASCULAR</b>	Leve IM y lentificación de fondo en ECG.
<b>GASTROINTESTINAL</b>	RGE.
<b>GENITOURINARIO</b>	Tanner 1.
<b>EXTREMIDADES</b>	Braquiclinodactilia del 5º dedo de ambas manos.
<b>PIEL</b>	Mancha de café con leche en región lumbar izquierda, hipertricosis, tricomegalia en espalda y cutis marmorata.
<b>SNC</b>	Hiperreflexia, retraso motor y ventrículos en límite alto de la normalidad.
<b>MENTAL/COGNITIVO</b>	Retraso cognitivo leve.

#### **5.1.3: Gravedad del fenotipo según la clasificación de Gillis**

Aplicando la tabla de clasificación de Gillis (ver apartado 4.1 Material y métodos), la paciente puede clasificarse de fenotipo leve, porque no presenta oligodactilia, el retraso motor es inferior a 2 años y el percentil de crecimiento se encuentra por encima del percentil 75 de las curvas estándar adaptadas al SCdL.

Tabla 9: Clasificación de nuestra paciente (C0208) según tabla de Gillis <sup>(4)</sup>.

<u>PARÁMETROS</u>	<u>Paciente (C0208)</u>
Reducción en las extremidades	Braquiclinodactilia
Desarrollo y habilidades cognitivas	Retraso motor inferior a 2 años
Crecimiento	Mayor del percentil 75
<u>CLASE</u>	<u>Fenotipo leve</u>

#### 5.1.4. Criterios diagnósticos de Kline

Atendiendo a los criterios de clasificación propuestos por Kline ( Ver apartado 4.1: Material y métodos), se procede a comprobar si nuestra paciente cumple los criterios para ser diagnosticada de SCdL ( [Ver tabla 10](#)).

Figura 7: Paciente C0208



A los 3 años

Figura 8: Paciente C0208b



(madre del caso índice)

Figura 9: Paciente C0208



Paciente a los 6 años.

**Tabla 10** : Aplicación de los criterios de Kline a la paciente C0208

<b>DIAGNÓSTICO DE SCdL</b>	<b>C0208</b>
Identificación de mutación CdLS	+
Fenotipo facial y 2 criterios mayores:	+
Fenotipo facial y 1 criterio mayor y 2+(mayor o menor)	+
<b>FENOTIPO FACIAL</b>	
Sinofridia y 3 o más de los siguientes:	+
Pestañas alargadas y finas	+
Nariz pequeña con narinas antevertidas	+
Filtrum alargado, prominente y liso.	-
Puente nasal ancho o deprimido	+
Micrognatia	+
Labio superior fino y comisuras hacia abajo	+
Paladar alto	-
Anomalías dentales	-
<b>CRITERIOS MAYORES</b>	
<b>CRECIMIENTO (2 O MÁS DE LOS SIGUIENTES)</b>	
Peso menor P5	+
Altura menor P5	+
Perímetrocefálico menor P5	-
<b>DESARROLLO (1 O MÁS DE LOS SIGUIENTES)</b>	
Déficit intelectual, afectación habla, retraso del desarrollo.	+
Dificultades en el lenguaje.	-
<b>COMPORTAMIENTO (2 O MÁS DE LOS SIGUIENTES)</b>	
TDAH	+
Síndrome obsesivo-compulsivo	-
Ansiedad	-
Depresión	-
Agresividad	-
Autoagresividad	-
Rasgos autistas	-

Timidez extrema.	-
<b><u>CRITERIOS MENORES</u></b>	
<b>Manifestaciones musculoesqueléticas</b>	
( >1)	
Ausencia de brazos/antebrazos	-
≥3 de los siguientes o manos/pies pequeños y /o ausencia de dedos con ≥2 de los siguientes.	-
Clinodactilia del 5º dedo	+
Pliegue palmar único	-
Codo dislocado	-
Inserción proximal del pulgar	-
Hallux valgus	-
Sindactilia entre 2º y 3º dedo del pie.	-
Escoliosis	-
Malformaciones en pecho	-
Displasia o dislocación cadera	-
<b>MANIFESTACIONES NEUROSENSORIALES/DERMATOLÓGICAS (3 O MÁS)</b>	
Párpados caídos	-
Ptosis palpebral y malformación conducto lacrimal	-
Miopía	-
Malformaciones oculares	-
Sordera o pérdida de audición	+
Convulsiones	-
Piel moteada,Cutis marmorata	+
Hirsutismo	+
Pezones u ombligo de pequeño tamaño	-
<b>OTRAS MANIFESTACIONES</b>	
<b>( 3 O MÁS DE LAS SIGUIENTES)</b>	
Malformaciones gastrointestinales	-
Hernia diafragmática	-
Paladar hendido	-
Cardiopatía congénita	+
Micropene	-

Anomalías en aparato genitourinario	+
Criptorquidia	-

Nuestra paciente (C0208) cumple los criterios suficientes de Kline para ser diagnosticada de SCdL.

## 5.2 LABORATORIO

### 5.2.1 Comprobación de la mutación en DNA genómico

Mediante secuenciación Sanger de DNA amplificado de leucocitos de sangre periférica, se ha localizado en la paciente la mutación *missense* c.7553A>G en el exón 44 del gen *NIPBL* en heterocigosis. Esta mutación provoca el cambio en la proteína del aminoácido aspártico 2518 por una Glicina.

La mutación es también confirmada en la madre, un tío y una tía.

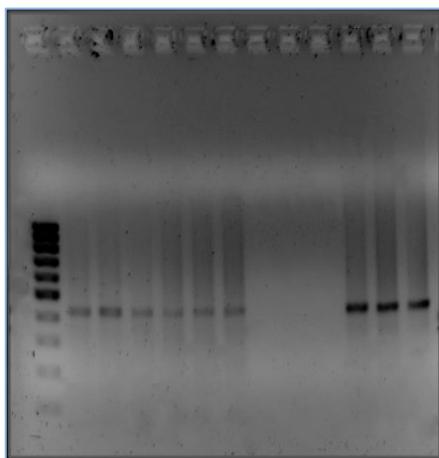


Figura 10: Electrofóresis en gel agarosa.

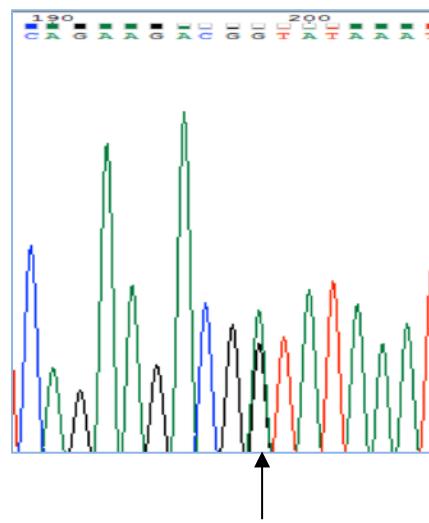


Figura 11: Mutación *missense* c.7553 A>G

### 5.2.2: Determinación cuantitativa mediante pirosecuenciación

En la tabla 11 se muestran los resultados de pirosecuenciación de la paciente y familiares, realizados a partir de DNA de leucocitos de sangre periférica y de células de la mucosa oral. Con la A se indica el alelo no mutado y con la G el que tiene la mutación.

**Tabla 11 Resultados por tejidos de la pirosecuenciación**

PACIENTES	C0208 (PACIENTE)	C0208 B (MADRE)	C0208 T1 (TÍO PORTADOR ASINTOMÁTICO)	C0208 T2 (TÍA SANA)	C0208 T3 (TÍA PORTADORA ASINTOMÁTICA)	C0208 D1 (ABUELA)
<b>SANGRE</b>	<u>G:43,9% A:56,1%</u> <u>G:43,9% A:56,1&amp;</u> <u>G:44,1% A:55,9%</u> <u>G:45,8% A:54,2%</u>	<u>G:52% A:48%</u> <u>G:51% A:49%</u> <u>G:50% A:50%</u>	<u>G:40,6% A:56,4%</u> <u>G:38,7% A:61,3%</u> <u>G:38,9% A:61,1%</u> <u>G:40,7% A:59,3%</u>	<u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u>	<u>G:12,4% A:87,3%</u> <u>G:12,8% A:87,2%</u>	<u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u>
<b>SALIVA</b>	<u>G:21,5% A:78,5%</u> <u>G:25,2% A:74,8%</u> <u>G:19,4% A:80,6%</u>	<u>G:27,9% A:72,1%</u> <u>G: 29% A:71%</u> <u>G: 35,8% A:64,2%</u>	No obtenidos	<u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u>	<u>G:35% A:65%</u> <u>G:26,7% A:73,3%</u> <u>G:31,3% A:68,7%</u>	<u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u> <u>G:0% A:100%</u>
<b>MEDIAS</b>	<u><b>Sangre:</b></u> <u><b>G: 44,5% A: 55,5%</b></u> <u><b>Saliva:</b></u> <u>G.22% A: 78%</u>	<u><b>Sangre:</b></u> <u>G: 51% A: 49%</u> <u><b>Saliva:</b></u> <u>G.31% A: 60%</u>	<u><b>Sangre:</b></u> <u>G:39,7% A: 59,5%</u> <u><b>Saliva:</b></u> <u>No obtenidos</u>	<u><b>Sangre:</b></u> <u>G: 0% A: 100%</u> <u><b>Saliva:</b></u> <u>G: 0% A: 100%</u>	<u><b>Sangre:</b></u> <u><b>G: 12,6% A: 87,2%</b></u> <u><b>Saliva:</b></u> <u><b>G: 31% A: 69%</b></u>	<u><b>Sangre</b></u> <u>G:0% A: 100%</u> <u><b>Saliva</b></u> <u>G:0% A: 100%</u>

C0208 T1 y C0208T3 presentan un mayor porcentaje de alelo WT en la muestra de DNA de leucocitos que C0208 y C0208b.

C0208, C0208b, C0208 T1 y C0208 T3 poseen un mosaicismo somático, ya que el porcentaje alélico varía de una estirpe celular a otra.

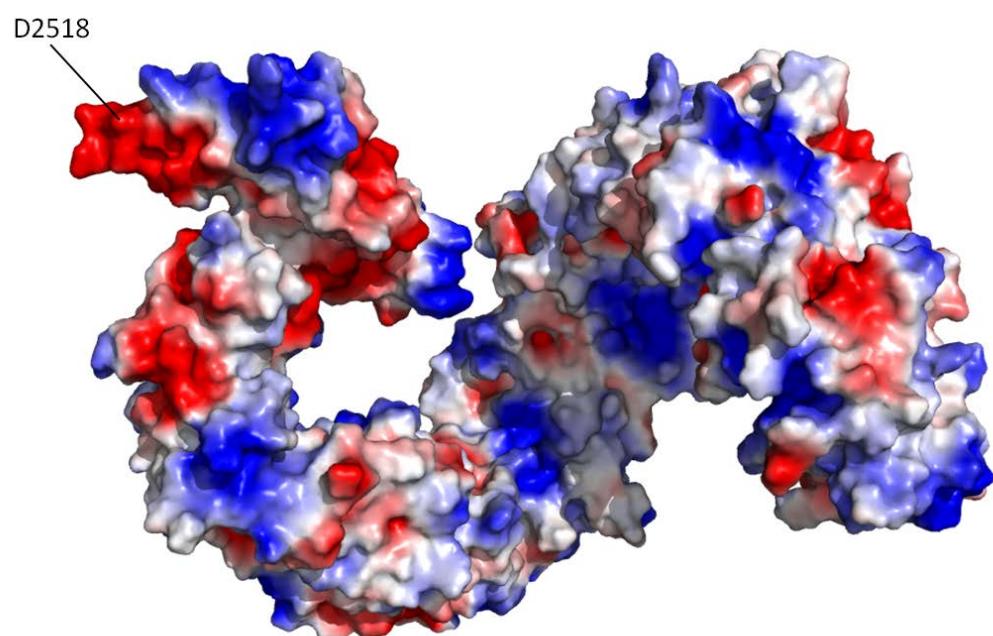
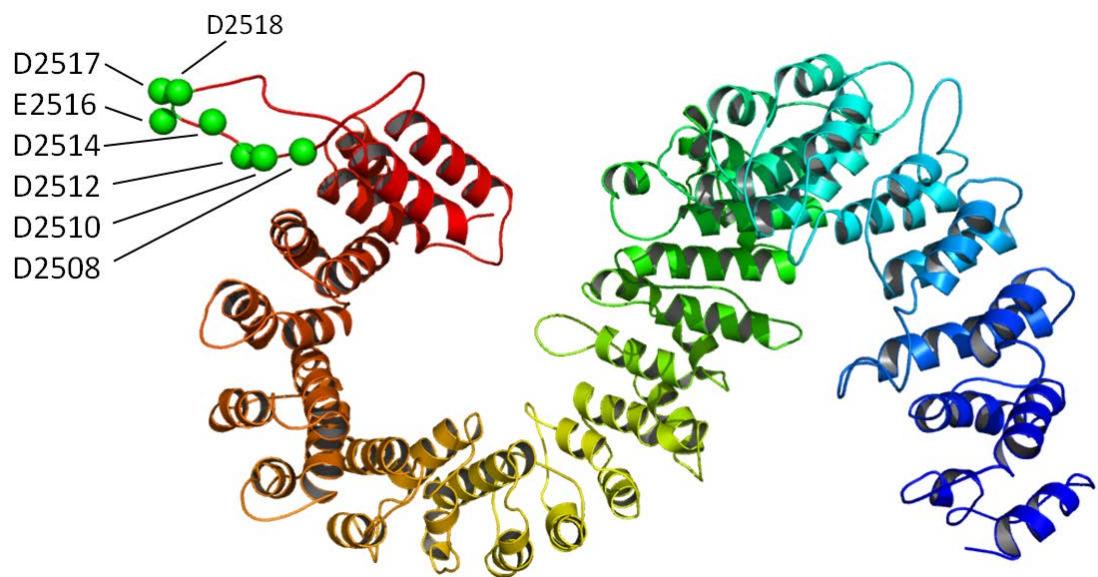
### 5.3. BIOINFORMÁTICOS

#### 5.3.1 Análisis de afectación de la zona HEAT-repeat por la mutación

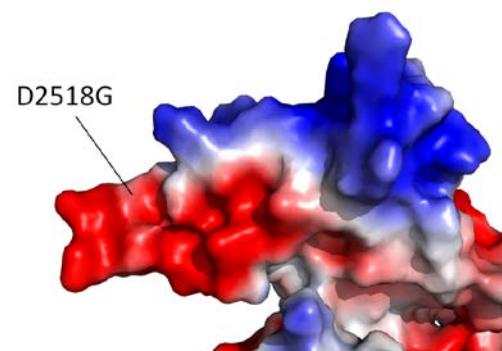
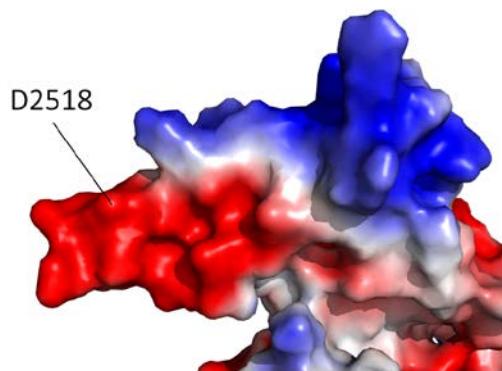
La mutación está localizada al final de la región HEAT-repeat.

## ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEÍNA NIPBL

### ZONA HEAT-REPEAT Extendida



### AMPIACIÓN DE LA ZONA MUTADA D2518G



#### 5.3.2: Análisis de patogenicidad de la mutación

Los datos de la mutación introducidos en el programa “Predict SNP” son ambivalentes aunque se inclinan más por la patogenicidad de la mutación.

## 6- DISCUSIÓN

---

Cuando la paciente llegó a la consulta por retraso en el crecimiento fue evaluada por diferentes especialistas en pediatría siendo diagnosticada finalmente de un SCdL con rasgos leves. Sin embargo, su aspecto cráneo facial con una sinofridia marcada, unas narinas antevertidas y un philtrum largo sugería una afectación del gen *NIPBL*. Pronto los estudios moleculares, demostraron la existencia de la mutación missense c.7553 A>G en el exón 44 de este gen, que provocaba el cambio del aminoácido asparragina 2518 por una glicina.

La observación de que la madre presentaba un fenotipo similar nos empujó a ampliar el estudio. La constatación de un cierto retraso psicomotor junto con su aspecto facial distintivo, sugería que también padecía una clínica leve del síndrome, por lo que empezamos a sospechar la posibilidad de estar ante un caso familiar. El estudio genético rápidamente confirmó la presencia de la mutación en la madre.

Con estos resultados planteamos un estudio familiar completo. Aunque la abuela materna y una hermana de la madre fueron negativas, un tío y una tía de la paciente resultaron ser portadores de la mutación. El problema se planteó cuando ninguno de ellos parecía tener clínica del síndrome. Ni siquiera se observaba una disminución de la capacidad intelectual. En vista de los datos nos planteamos la posibilidad de que otra mutación pudiera ser responsable del cuadro, pero el estudio molecular de otros genes causales (*SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*) resultó negativo.

Llegados a este punto, nos planteamos realizar un estudio bioinformático exhaustivo de la mutación. El cambio de una asparragina por una glicina, inicialmente no parecía un gran cambio, sin embargo la localización del aminoácido problema era en una de las zonas más sensibles de la proteína, la región HEAT-repeat de interacción proteica. Se habían descrito como mutaciones mínimas en esta zona generaban fenotipos graves. Por otro lado, la aplicación del programa de patogenicidad “Predict SNP”, y la ausencia de la mutación en las bases de SNIPs, también sugerían que esta podía ser la mutación causal.

Si admitíamos que la mutación era patogénica, ¿Por qué no tenían clínica los tíos afectados? La respuesta podía ser que la mutación estaba en forma de mosaicismo somático. Por todo ello, decidimos realizar un estudio de pirosecuenciación en leucocitos y células de la mucosa oral.<sup>(20)</sup> Los resultados fueron diversos, ya que en leucocitos se mostraba que la cantidad de alelo WT en los tíos era significativamente mayor que en la madre y en la hija. Esto podía justificar las diferencias fenotípicas encontradas. Sin embargo, esta teoría no se acababa de

cumplir en la muestra obtenida de células de la mucosa oral, donde los porcentajes del alelo WT de la paciente eran algo mayores que en la tía portadora de la mutación sin clínica.

Pero los resultados de esta prueba generaron todavía más confusión. La comparación de cantidad de alelo salvaje y mutado de la madre y de la hija eran muy parecidos. ¿Cómo podían tener ambas un patrón similar de distribución de mosaicismo somático? No había problema en admitir el mosaicismo de la madre, pero la transferencia a la hija de la mutación debería haberse producido por una célula germinal afectada. Si esto era así, la hija debería tener todas las células afectadas y no sufrir un mosaicismo. Quizás la explicación podría estar en un quimerismo de la hija pero esto es extraordinariamente raro. Por otro lado, ¿Por qué y cómo la madre y hermanos compartían mosaicismo somático? El mosaicismo somático implica un evento que actúa después de la formación del huevo o cigoto. Si esto era así, porque todos los tíos tenían un patrón mosaico similar. Por último, aunque la mutación no fuera la causa del síndrome, los patrones de transmisión hereditaria seguirían siendo difíciles de explicar.

## 7- CONCLUSIONES

---

El trabajo experimental que hemos realizado nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- 1- Se identifica en la paciente y la madre con fenotipo leve de SCdL la mutación c.7553 A>G (p-Asp2518 Gly) en el exón 44 del gen *NIPBL*. El estudio genético se amplía al resto de los familiares encontrándose que dos de los tíos presentan la misma mutación pero en ausencia de clínica.
- 2- Los estudios bioinformáticos de predicción de patogenicidad “Predict SNP”, de afectación de la zona HEAT-repeat y de reconocimiento de SNIPs no son concluyentes, aunque sugieren la posible patogenicidad de la mutación.
- 3- Los estudios de pirosecuenciación muestran un patrón de distribución de la mutación en la paciente, la madre y los dos tíos compatible con un mosaicismo somático.
- 4- Se plantean dos grandes cuestiones: ¿La mutación p-Asp2518 Gly es la causal del síndrome? e independientemente de esta ¿Cómo puede la madre y la hija tener la misma mutación en mosaicismo somático con un patrón de distribución similar por tejidos?

## 8- BIBLIOGRAFÍA

---

- 1- Kline AD, Krantz ID, Sommer A, Kliewer M, Jackson LG, Fitz Patrick DR et al. Cornelia de Lange syndrome. Clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am J Med Genet A*. 2007;143: 1287-1296.
- 2- Ramos FJ, Puisac B, Baquero-Montoya C, Gil-Rodríguez MC, Bueno I, Deardorff MA et al. Clinical utility gene card for: Cornelia de Lange syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2014;23: 270.
- 3- Opitz JM, Segal AT, Lehrke R, Nadler H. Brachmann de Lange syndrome. *Lancet*. 1964;2: 1019.
- 4- Gil MC, Ribate MP, Ramos FJ. Síndrome de Cornelia de Lange. *Protoc diagn ter pediatr*. 2010;1: 1-12.
- 5- Enervold E, Du L, Visnes T, Bjorkman A, Lindgren E, Wincent J, Borck G, et al. A regulatory role for the cohesin loader *NIPBL* in non homologous end joining during immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*. 2013;210: 2503-2513.
- 6- Solomon DA, Kim JS, Waldman T. Cohesin gene mutations in tumorigenesis: From discovery to clinical significance. *BMB Rep*. 2014;47: 299–310.
- 7- Strachan T. Cornelia de Lange Syndrome and the link between chromosomal function, DNA repair and developmental gene regulation. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15: 258–264.
- 8- Kagey MH, Newman JJ, Bilodeau S, Zhan Y, Orlando DA, Van Berkum NL, et.al. Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*. 2010;467: 430–435.
- 9- Boyle MI, Jespersgaard C, Brondum-Nielsen K, Bisgaard AM, T. & Z. Cornelia de Lange syndrome. *Clin Genet*. 2015; 88:1-12.
- 10- Barbero Jl. Genetic basis of cohesinopathies. *Appl Clin Genet*. 2013; 6:15-23.

- 11- Jackson L, Kline AD, Barr MA, Koch S. De Lange syndrome: a clinical review of 310 individuals. *Am J Med Genet.* 1993;47: 940-946.
- 12- Jahnke P, Xu W, Wulling M, Albrecht M, Gabriel H, Gillessen-Kaesbach G et al. The Cohesin loading factor NIPBL recruits histone deacetylases to mediate local chromatin modifications. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: 6450-6458.
- 13- Tonkin ET, Wang TJ, Lisgo S, Bamshad MJ, Strachan T. *NIPBL* encoding a homolog of fungal Scc2-type sister chromatid cohesion proteins and fly nipped-B, is mutated in cornelia de Lange syndrome. *Nat genet.* 2004;36: 636-641.
- 14- Mannini L, Cucco F, Quarantotti V, Krantz ID, and Musio A. Mutation Spectrum and Genotype–Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat.* 2013; 34: 1589-1596.
- 15- Deardorff M, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, et al. Mutations in cohesin complex members SMC3 and SMC1A cause a mild variant of cornelia de Lange syndrome with predominant mental retardation. *Am J Hum Genet.* 2007;80: 485–494.
- 16- Gillis L, McCallum J, Kaur M , DeScipio C, Yaeger D, Mariani A, et al. NIPBL mutational analysis in 120 individuals with Cornelia de Lange syndrome and evaluation of genotype-phenotype correlations. *Am J Hum Genet.* 2004; 75:610–623.
- 17- Kaiser FJ, Ansari M, Braunhoiz D, Gil-Rodriguez MC, Decroos C, Wilde JJ, et al. Loss of Function *HDAC8* mutations cause a Phenotypic Spectrum of cornelia de lange Syndrome-like Features, Ocular Hypertelorism, large Fontanelle and X-linked inheritance. *Hum Mol Genet.* 2014;23: 2888-2900.
- 18- Pié J, Gil-Rodríguez MC, Ciero M, López-Viñas E, Ribate MP, Arnedo M, et al. 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 A.* 2010; 152A: 924-929.
- 19- Colvema.org (internet). Madrid; 2011 (actualizado 1 En 2016; citado en 29 Mayo 2016)  
Disponible en: [www.colvema.org/WV\\_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf](http://www.colvema.org/WV_descargas/metagenweb-15022012152421.pdf).
- 20- Carmignac V , Thevenon J, Ades L, Callewaert B, Julia S, Thauvin-Robinet C, et al. In-frame

mutations in exon 1 of SKI cause dominant Shprintzen-Goldberg syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012; 9; 950–957.

## 9- APÉNDICE

---

- A Adenina
- BrET Bromuro de Etidio
- BM Biología molecular
- cDNA ADN codificante
- CI Coeficiente intelectual
- CTCF Proteína en dedo de Zinc 11
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- dNTP Desoxirribonucleótidos –trifosfato
- EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid
- EtOH Alcohol etílico
- epp Tubo eppendorf
- g Gramo
- IM Insuficiencia mitral
- mA Miliamperio
- $\mu$ l Microlitro
- mM milimolar
- pB Pares de bases
- Primer F Primer forward
- Primer R Primer reverse
- PCR Reacción en cadena de la polimerasa
- PPi Pirofosfato
- RGE Reflujo gastroesofágico
- Rpm Revoluciones por minuto
- Tº Temperatura
- T Timina
- TBE Tris, borato y EDTA
- Tm Temperatura de disociación
- Tris Tris(hidroximetil)aminometano
- UV Ultravioleta
- V Voltio
- WT Wild type

- $Xg$  Fuerza centrífuga
- $^{\circ}\text{C}$  Grados centígrados