

# Duplicación de todos los exones del gen *TBX5* en una familia española con síndrome de Holt-Oram

Antonio Martínez-Cañamero<sup>1</sup>, Juan Francisco Expósito Montes<sup>1</sup>, Moisés Natividad Pedreño<sup>1</sup>, Ada Tarabini Castellani Rizzo<sup>1</sup>, Eduardo Martínez Molina<sup>2</sup>, Esther Ocaña Pérez<sup>1</sup>.

1. Complejo Hospitalario de Jaén
2. Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.

*Autor de correspondencia:*

Antonio Martínez-Cañamero  
Complejo Hospitalario de Jaén  
Correo electrónico: jaenetica@gmail.com

## RESUMEN

El Síndrome de Holt-Oram es una enfermedad ultra rara que asocia trastornos durante la embriogénesis del corazón y miembros superiores debido a alteraciones genéticas. En la mayoría de los casos estas alteraciones aparecen espontáneamente pero también pueden heredarse. Mayoritariamente son debidas a mutaciones del gen *TBX5* aunque también se han descrito deleciones y duplicaciones de algunos exones del gen, en el contexto de un fenotipo compatible. Nuestro estudio consiste en la descripción de una duplicación completa, detectada por MLPA o *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, en tres miembros de una misma familia (abuela, madre e hija) con una expresividad creciente en cada generación, hasta llegar a una comunicación interauricular e hipoplasia de ambos pulgares. Por ello, si tras una exhaustiva exploración física del paciente sospechamos del síndrome, y este no presenta mutación alguna, deberemos ampliar buscando deleciones o duplicaciones del gen. El síndrome de Holt-Oram presenta un patrón de herencia autosómico dominante por lo que tiene implicaciones hereditarias y familiares. Ya que la paciente puede transmitir con un 50% de probabilidad esta alteración a sus futuros descendientes es necesario dar un adecuado asesoramiento genético.

Palabras clave: *síndrome de Holt-Oram, gen TBX5, amplificación de sondas dependiente de ligandos, autosómica dominante, asesoramiento genético*

## INTRODUCCIÓN

La displasia atriodigital, también conocida como síndrome corazón-mano, se refiere a un grupo de trastornos congénitos que se caracterizan por malformaciones de las extremidades superiores y el corazón. El Síndrome de Holt-Oram, en adelante SHO (OMIM 142900/ORPHA392), es una de las formas más frecuentes y mejor conocidas de estos síndromes (Zaragoza, 2016). Fue descrito por Mary Clayton Holt y Samuel Oram en 1960 (Holt-Oram, 1960) y se caracteriza por una disfunción del desarrollo embrionario con malformaciones en las extremidades superiores, implicando a huesos radiales, tenares o hipotenares (Iwanicka-Pronicka, 2016), junto con un historial familiar de malformación cardíaca congénita, principalmente defecto atrial septal de tipo ostium

secundum (Su W, 2016). Se han descrito anomalías en el sistema de conducción, como la fibrilación auricular paroxística (Guo, 2016), a veces asociada con trastornos de la frecuencia cardíaca así como varios grados de bloqueo auriculoventricular. Rara vez asocia otro tipo de malformaciones, como las orales y maxilofaciales (Arslanoglu, 2016) entre otras.

El SHO es una enfermedad ultra rara, se estima una prevalencia de 1 por cada 100.000 nacidos vivos (Ali, 2016), siendo esta similar en la población española, y está causado por mutaciones en el gen *TBX5*, localizado en 1966 en el cromosoma 12 (12q24.1). El gen *TBX5* codifica el factor de transcripción T-box5 (D'Aurizio 2016) que regula la cardiogénesis, mediante la expresión de otros genes implicados en el desarrollo cardíaco y de las extremidades durante la em-

biogénesis. Hasta la fecha se han encontrado pacientes con SHO con casi un centenar de mutaciones del gen *TBX5*, la mayoría de los cuales causan un truncamiento prematuro de la transcripción primaria produciendo haploinsuficiencia (Steimle, 2016), una situación en la cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal no es suficiente para garantizar una función normal.

Se ha de tener en cuenta que la mayoría (90%) de las alteraciones genéticas que producen cambios en el gen *TBX5* son producidas de novo pero, una vez producida la alteración, el SHO se hereda de forma autosómica dominante, y tiene una elevada penetrancia con una expresividad variable (Barisic, 2014). Más del 85% de los individuos diagnosticados clínicamente son portadores de una mutación *TBX5*. Sin embargo en el resto de casos desconocemos la causa, existiendo algunas publicaciones que hablan de la duplicación de algunos exones del *TBX5* (Kimura, 2015).

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se realiza interconsulta desde Cardiología a la Unidad de Genética Médica de nuestro hospital de una paciente de 33 años, con una malformación cardíaca conocida y que ha comenzado con trastornos del rit-

mo. Se trata de una mujer adulta, operada en la infancia de una comunicación interauricular tipo seno venoso, que asocia una hipoplasia de la eminencia tenar y que, en la actualidad, padece de una fibrilación auricular persistente con PR corto.

Al realizar el genograma (ver figura 1) se evidencia una posible herencia autosómica dominante de una malformación cardíaca congénita. La madre de la paciente presenta hipertensión arterial y se objetiva una aurícula izquierda levemente dilatada, sin otra patología asociada. La única hermana de la paciente falleció de muerte súbita a los 27 años por una cardiopatía no aclarada y la única hija de la paciente, de 9 años, está intervenida de una comunicación interauricular tipo seno venoso también. Valoramos estudiar el gen *TBX5* entre otros y se cita a la familia a revisión.

Al cabo de un mes recibimos en consulta de Genética a la paciente, a la madre y a la hija de la primera. La abuela solo presenta hipertensión arterial, no existiendo en su historial pruebas de imagen de miembros superiores. Sin embargo la nieta presenta ambos antebrazos cortos, presentando dificultades para extender los codos, no así las muñecas. Por esta clínica se contacta con el traumatólogo y se cursa una interconsulta urgente a Traumatología Infantil de

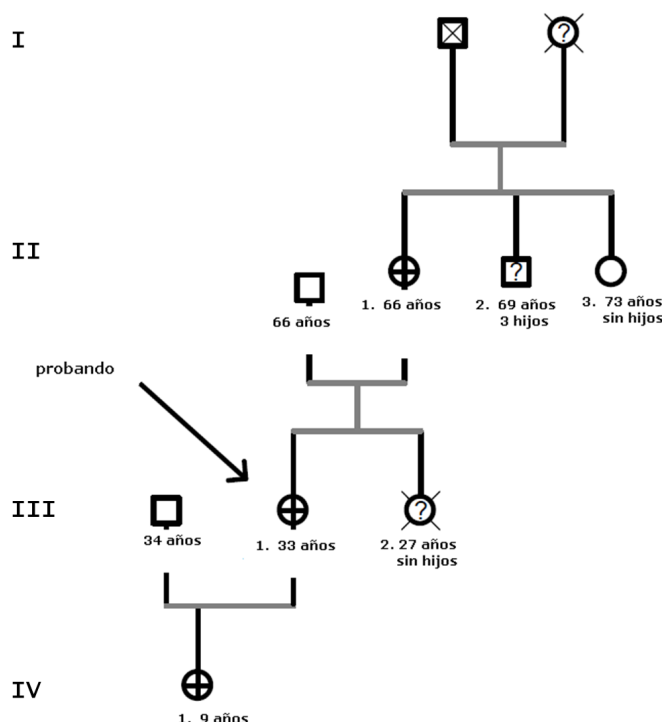


Fig. 1. Genograma.



Figura 2. Hipoplasia bilateral.

nuestro hospital.

Se le plantea estudio genético y, una vez obtenido el correspondiente consentimiento informado, la metodología empleada en nuestro laboratorio externo fue la siguiente:

- Extracción del ADN utilizando el kit comercial *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen).
- Cuantificación del ADN obtenido mediante la visualización del mismo en geles de agarosa al 0.8%.
- Análisis de deleciones/duplicaciones de los genes relacionados con la enfermedad congénita cardíaca: hibridación con sondas específicas para cada uno de los exones que contienen los genes *GATA4*, *NKX2-5*, *TBX5*, *BMP4* y *CRELD1* y posterior amplificación por PCR de las regiones hibridadas, mediante la técnica MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*), con marcaje fluorescente y detección mediante electroforesis capilar en condiciones desnaturalizantes en un *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer*, de los fragmentos ligados y amplificados.
- Secuenciación completa del gen *TBX5*: para la amplificación del gen se empleó el sistema *VariantSeq* de *Applied Biosystems* utilizando un set de primers específicos para la amplificación por PCR y posterior secuenciación de las regiones codificantes y regiones intrónicas adyacentes del gen *TBX5*. Una vez purificado el producto de PCR

mediante la enzima *exonuclease ExoSAP-IT*, éste fue secuenciado usando el kit comercial *BigDye 3.1* de *Applied Biosystems* y posterior purificación de la secuenciación mediante columnas de purificación.

- El proceso de electroforesis capilar se llevó a cabo en un analizador genético *ABI 3130* y las secuencias obtenidas fueron analizadas con un software específico: *SeqScape* de *Applied Biosystems*.

## RESULTADOS

La muestra analizada de la paciente mediante MLPA (*Multiple Ligation-dependent Probe Amplification*) no presentaba deleciones ni duplicaciones en ninguno de los exones de los diferentes genes analizados con el ensayo de MLPA (*GATA4*, *NKX2-5*, *BMP4* y *CRELD1*). El cuadro clínico de la paciente no era debido pues a deleciones ni duplicaciones en los cuatro genes estudiados.

Tampoco el cuadro clínico de la paciente era debido a la presencia de mutaciones puntuales en ninguno de los exones codificantes analizados, ni en las regiones intrónicas adyacentes estudiadas, para el gen *TBX5*. Sin embargo la muestra analizada si presentaba una duplicación para todos los exones del gen *TBX5*. Este resultado podría ser compatible con el cuadro clínico de la paciente y posible causa del SHO.

Una vez estudiada a su hija en la Consulta de Traumatología Infantil se evidencia luxación congénita de cabeza radial bilateral, mano zamba cubital bilateral por acortamiento de cúbito, e hipoplasia a nivel de pulgar bilateral pero con eminencia tenar útil (figura 2) que apoyan el diagnóstico del SHO atípico también en la hija. Es importante resaltar que nos encontramos ante un síndrome de Holt Oram atípico, puesto que en este síndrome las manifestaciones esqueléticas son típicamente radiales y en menor grado y menos intensas en el lado cubital. En la paciente, como se ve en las RX hay una angulación del radio, con un acortamiento de cúbito que recuerda mucho la deformidad de Madelung, mientras que las anomalías del lado radial es fundamentalmente un acortamiento del 1º metacarpiano. Ante estos datos se de-

cide estudio familiar del *TBX5* en abuela y nieta, con idéntico resultado. No así el estudio traumatológico al no disponer de imágenes radiológicas de la madre de la paciente.

## DISCUSIÓN

Las mutaciones en el gen *TBX5* son la principal causa (85%) del síndrome atriodigital descrito por Holt y Oram. Es un gen que se compone de 10 exones y está situado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q24.1) (Nourzad, 2011). El *TBX5* es un miembro de una familia de factores de transcripción T-box que codifican los factores de transcripción implicados en el desarrollo celular embrionario, la regulación del desarrollo de estructuras extraembrionarias, así como en muchos aspectos de la organogénesis (Dreßen, 2016). Dentro de la familia T-box la expresión del *TBX5* es muy importante para la iniciación de la extremidad superior y el desarrollo del tabique y el sistema eléctrico cardíaco, no existiendo antecedentes de malformaciones en la extremidad inferior.

Pero la relación entre las alteraciones del gen *TBX5* y la aparición del SHO es variable (Sinha, 2015). De este modo hay estudios que hablan de un tercio de los pacientes con fenotipo de SHO que asocien dichas alteraciones, por lo que el estudio únicamente del gen *TBX5* en estos casos sería insuficiente. Sin embargo esta proporción aumenta significativamente en caso de hacer un diagnóstico exhaustivo que evalúe los signos del síndrome, de este modo la consulta de genética se hace casi imprescindible a la hora de aglutinar todos estos signos en un síndrome heredofamiliar.

En este caso la variación en las alteraciones del gen es amplio siendo, la mayoría de estas, mutaciones que inhabilitan la funcionalidad de la proteína *TBX5*. Se han encontrado pacientes con SHO con más de 90 mutaciones del gen *TBX5* (Basson, 1999), la mayoría de los cuales causan un truncamiento prematuro de la transcripción *TBX5* primaria produciendo haploinsuficiencia (Steimle, 2016), una situación en la cual la proteína producida por una sola copia de un gen normal no es suficiente para garantizar una función normal. Por otra parte un aumento de la dosificación del gen *TBX5*, tal y como se produciría en una duplica-

ción del cromosoma 12, de la región que contiene el gen, también daría lugar a anomalías cardíacas (Hatcher, 2001), por lo que la sobreexpresión de *TBX5* afectaría a la cardiogénesis. Por el contrario una pérdida de la dosificación del gen, como por ejemplo una delección del cromosoma 12, de la región que contiene el gen, daría lugar a anomalías esqueléticas y cardíacas al provocar una expresión incompleta de la proteína *TBX5* (Shamseldin, 2016).

Diversos estudios hablan de deleciones del gen *TBX5* en familias con SHO pero sin mutaciones que lo expliquen, sin embargo muy pocos estudios hablan de duplicaciones en este gen. La duplicación de *TBX5* ha sido identificada en una familia japonesa (Kimura, 2015) y otra británica (Patel 2012); sin embargo, el fenotipo de la primera familia fue incompleto y el de la segunda fue atípico. En nuestro estudio, que abarca una duplicación de todos los exones, se confirmó en una persona con el fenotipo del SHO. La madre de la paciente no presentaba características clínicas destacables y la paciente sólo presentaba una cardiopatía congénita intervenida, con una fibrilación auricular (Wang, 2016), junto a una pequeña hipoplasia tenar. Es la hija de la paciente la única que presenta un fenotipo clínico característico de SHO, cardíaco (Naik, 2016) y atípico de miembros superiores, mientras que las tres presentan la duplicación de todos los exones del *TBX5*. Esto nos hace pensar que, además de una variabilidad evidente (Barisic, 2014), también podríamos sospechar de una sobreexpresión con cada generación, que deberá ser confirmado. Esta variabilidad intrafamiliar tan amplia, unido al aumento de los signos en cada generación, nos lleva a la conclusión de que debemos ampliar estudios.

Si el gen *TBX5* está formado por 10 exones no todos ellos tienen la misma importancia. Mientras que los exones 3 a 10 son la región codificante del gen los dos primeros exones no son traducidos. Sin embargo, para la normal expresividad de dicho gen, todos los exones son relevantes. Muchos estudios abundan en la importancia de los exones 1 y 2, y su funcionamiento normal, para la aparición del síndrome (Patel, 2012) aunque, a priori, no sean traducidos. Creemos que nuestro estudio es el único que habla de una duplicación total del *TBX5* que causa un SHO en un miembro de una familia mientras que, en un familiar

de primer grado, no existe suficiente información. Se necesitan más estudios funcionales para establecer los efectos de la duplicación y el mecanismo patogénico pensando, incluso, en la epigenética.

Para avanzar en la comprensión de la correlación fenotipo-genotipo entre las mutaciones *TBX5* y el SHO hacemos hincapié en que, además de las mutaciones del gen *TBX5* implicadas (Heinritz, 2005), la detección de duplicaciones debe ser una parte rutinaria del análisis molecular de los pacientes. De este modo, si tras una exhaustiva exploración física del paciente sospechamos de un SHO, y este no presenta mutación alguna, deberemos ampliar estudios mediante la técnica MLPA, buscando deleciones o duplicaciones del gen.

## CONCLUSIONES

El síndrome de Holt-Oram, presenta un patrón de herencia autosómico dominante (Rodagi, 2016). Estos resultados tienen implicaciones hereditarias y familiares. Sería recomendable poder estudiar la presencia o no de esta mutación en los familiares directos así como en los hermanos de la progenitora de la paciente. Así mismo es importante reseñar que faltan estudios radiológicos de imagen a la madre de la paciente.

Conviene recordar que los descendientes de la paciente tienen el 50% de probabilidad de contraer dicha alteración genética. Se ha de tener en cuenta que la mayoría de las alteraciones genéticas que producen cambios en el gen *TBX5* son producidas de novo (Dreßen, 2016), por tanto sería normal que los progenitores de la madre de la paciente no hubiesen presentado esta alteración. En cualquier caso es importante realizar un estudio a los tíos maternos de la paciente para descartar segregación familiar.

Todo esto no excluye que la paciente pueda transmitir con un 50% de probabilidad esta alteración a sus futuros descendientes (Rodagi, 2016), por lo que necesario dar un adecuado asesoramiento genético a la paciente y a su hija cuando esta alcance su mayoría de edad o inicio de la edad reproductiva.

## CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran la ausencia total de conflictos de intereses en este trabajo.

## REFERENCIAS

Ali TA et al. *Coexisting urogenital anomaly and duodenal atresia in two atypical Holt-Oram syndrome*. Journal of Indian Association of Pediatric Surgeons. 2016;21(4):193-5. doi:10.4103/0971-9261.186552.

Arslanoglu Z, et al. *Evaluation of patient with Holt-Oram syndrome in terms of oral and maxillofacial findings*. J Pediatr Dent. 2016;4:24-8.

Barisic L, et al. *Holt Oram syndrome: a registry-based study in Europe*. Orphanet J Rare Dis. 2014;9:156.

Basson CT, et al. *Different *TBX5* interactions in heart and limb defined by Holt-Oram syndrome mutations*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96:2919-24.

D'Aurizio R, et al. *Discovering mRNA Regulatory Networks in Holt-Oram Syndrome Using a Zebrafish Model*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2016;4:60. doi:10.3389/fbioe.2016.00060.

Dreßen M, et al. *A novel de novo *TBX5* mutation in a patient with Holt-Oram syndrome leading to a dramatically reduced biological function*. Molecular Genetics & Genomic Medicine. 2016;4(5):557-67. doi:10.1002/mgg3.234.

Guo D, et al. **TBX5* loss-of-function mutation contributes to atrial fibrillation and atypical Holt-Oram syndrome*. Molecular Medicine Reports. 2016;13:4349-56. doi:10.3892/mmr.2016.5043.

Hatcher CJ, et al. **TBX5* transcription factor regulates cell proliferation during cardiogenesis*. Dev Biol. 2001;230(2):177-188.

Heinritz W, et al. *Identification of new mutations in the *TBX5* gene in patients with Holt-Oram syndrome*. Heart. 2005;91(3):383-4. doi:10.1136/hrt.2004.036855.

Holt M, Oram S. *Familial heart disease with skeletal malformations*. Br Heart J. 1960;22:236-42.

Iwanicka-Pronicka K, et al. *Life-threatening cardiac episode in a Polish patient carrying contiguous gene microdeletion of the *TBX5* and the *TBX3* genes*. SpringerPlus. 2016;5:1638. doi:10.1186/s40064-016-3275-

1. Kimura M, et al. *Novel TBX5 Duplication in a Japanese Family with Holt–Oram Syndrome*. *Pediatr Cardiol*. 2015;36:244. doi:10.1007/s00246-014-1028-x.
- Naik N, et al. *The Classical Holt Oram Syndrome*. *Journal of Cardiovascular Disease Research*. 2016;7(1):53-5. doi:10.5530/jcdr.2016.1.11.
- Nourzad G, Baghershiroodi M. *A case report on Holt-Oram syndrome (heart-hand)*. *ARYA Atherosclerosis* 2011;7(2):87-92.
- Patel C, et al. *TBX5 intragenic duplication: a family with an atypical Holt–Oram syndrome phenotype*. *European Journal of Human Genetics*. 2012;20(8):863-9. doi:10.1038/ejhg.2012.16.
- Rodagi SB, et al. *Holt-Oram Syndrome Associated with Aortic Atresia: A Rare Association*. *Heart Views: The Official Journal of the Gulf Heart Association*. 2016;17(1):27-9. doi:10.4103/1995-705X.182644.
- Shamseldin H, et al. *Novel copy number variants and major limb reduction malformation: Report of three cases*. *Am J Med Genet*. 2016;170a:1245–50.
- Sinha P, et al. *Holt-Oram syndrome: a rare case report*. *Int J Res Med Sci*. 2015; 3(1): 312-3. doi:10.5455/2320-6012.ijrms20150158.
- Steimle JD, Moskowitz IP. *TBX5: A Key Regulator of Heart Development*. *Current Topics in Developmental Biology*. 2016. doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.08.008.
- Su W, et al. *Congenital heart diseases and their association with the variant distribution features on susceptibility genes*. *Clin Genet*. 2016. doi:10.1111/cge.12835.
- Wang ZC, et al. *Prevalence and Spectrum of TBX5 Mutation in Patients with Lone Atrial Fibrillation*. *International Journal of Medical Sciences*. 2016;13(1):60-7. doi:10.7150/ijms.13264.
- Zaragoza MV, et al. *Heart-hand syndrome IV: a second family with LMNA-related cardiomyopathy and brachydactyly*. *Clin Genet* 2016. doi:10.1111/cge.12870.

Artículo recibido: 13 noviembre 2016

Artículo aceptado: 6 de marzo de 2017

Artículo publicado online: 14 de marzo 2017

## ABSTRACT

Holt-Oram syndrome is an ultra rare disease that associates disorders during embryogenesis of the heart and upper limbs due to genetic alterations. In most cases these alterations appear spontaneously but can also be inherited. Most are due to mutations of the TBX5 gene also deletions and duplications of some exons of the gene have been described. Our study consists of the description of a complete duplication, detected by MLPA, in three members of the same family (grandmother, mother and daughter) with increasing expressiveness in each generation, until atrial septal defect and hypoplasia of both thumbs. Therefore, if after exhaustive physical examination of the patient we suspect the syndrome, and it does not present any mutation, we should expand looking for deletions or duplications of the gene. Holt-Oram syndrome has a pattern of autosomal dominant inheritance and therefore has hereditary and familial implications. Since the patient can transmit this alteration with a 50% probability to their future offspring, it is necessary to give adequate genetic counseling.