

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DE PACIENTES CON iPPSD Y APROXIMACIÓN A LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ORINA MEDIANTE NIOSOMAS CATIÓNICOS

TESIS DOCTORAL

Yerai Vado Ranedo

Vitoria-Gasteiz, 2022

CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DE PACIENTES CON iPPSD Y APROXIMACIÓN A LA TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE ORINA MEDIANTE NIOSOMAS CATIÓNICOS



Yerai Vado Ranedo

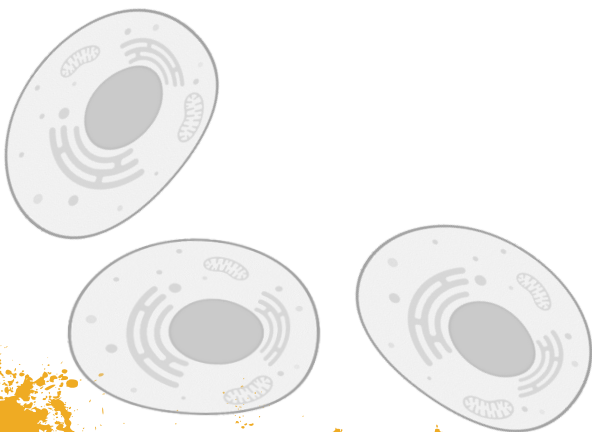
Vitoria-Gasteiz, 2022

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido subvencionado por el maratón solidario EITB Maratoia (BIO16/ER/005) y por la Universidad del País Vasco UPV/EHU (PIF17/29).

Una experiencia nunca es un fracaso, pues siempre viene a demostrar algo.

(Thomas Alva Edison)

Todo esfuerzo tiene su recompensa, nunca te rindas. Tú puedes.

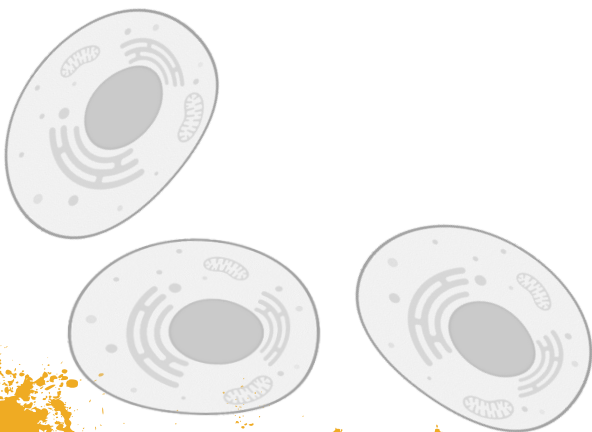


AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Tan breves van a ser estas palabras como inmensas las gracias que tengo que dar. Gracias a todas aquellas personas que de una manera u otra me han ayudado durante todo este proceso. Sin vosotros y vosotras nada hubiera sido posible.

Gracias de todo corazón.



GLOSARIO

GLOSARIO

AAV	<i>Adeno-Associated Virus</i>	Virus adenoasociado
AC	<i>Adenylyl Cyclase</i>	Adenilato ciclasa
aCGH	<i>Comparative Genomic Hybridization array</i>	Matriz de hibridación genómica comparativa
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>	Colegio Americano de Genética Médica
ACRDYS1	<i>Acrodysostosis type 1</i>	Acrodisostosis tipo 1
ACRDYS2	<i>Acrodysostosis type 2</i>	Acrodisostosis tipo 2
ADH	<i>Antidiuretic Hormone</i>	Hormona antidiurética
AD-iPPSD3	<i>Autosomal Dominant iPPSD3</i>	iPPSD3 autosómico dominante
ADN		Ácido desoxirribonucleico
ADNc		Ácido desoxirribonucleico complementario
AD-PHP1B	<i>Autosomal Dominant Pseudohypoparathyroidism type 1B</i>	Pseudohipoparatiroidismo tipo 1B autosómico dominante
AHO	<i>Albright's Hereditary Osteodystrophy</i>	Osteodistrofia hereditaria de Albright
AMP	<i>Adenosine-5'-monophosphate</i>	Adenosín-5'-monofosfato
AMPc	<i>Cyclic adenosine-5'-monophosphate</i>	Adenosín-5'-monofosfato cíclico
APC	<i>Allophycocyanin</i>	<i>Aloficocianina</i>
ARN		Ácido ribonucleico
ARNasa		Ribonucleasa
ARNm		Ácido ribonucleico mensajero
ART	<i>Assisted Reproductive Technology</i>	Técnica de reproducción asistida
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>	Adenosín-5'-trifosfato
BDA1	<i>Brachydactyly type A1</i>	Braquidactilia de tipo A1
BDA2	<i>Brachydactyly type A2</i>	Braquidactilia de tipo A2
BDB	<i>Brachydactyly type B</i>	Braquidactilia de tipo B
BDC	<i>Brachydactyly type C</i>	Braquidactilia de tipo C
BDE	<i>Brachydactyly type E</i>	Braquidactilia de tipo E
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	Herramienta de búsqueda de alineamiento básico
BOCD	<i>Blomstrand Osteochondrodysplasia</i>	Osteocondrodisplasia de Blomstrand
Ca		Calcio
CCF	<i>Cross-Correlation Function</i>	Función de correlación cruzada
CD	<i>Clusters of Differentiation</i>	Grupos de diferenciación
CME	<i>Clatrin-Mediated Endocytosis</i>	Endocitosis mediada por clatrin
CNV	<i>Copy Number Variation</i>	Variación en el número de copia

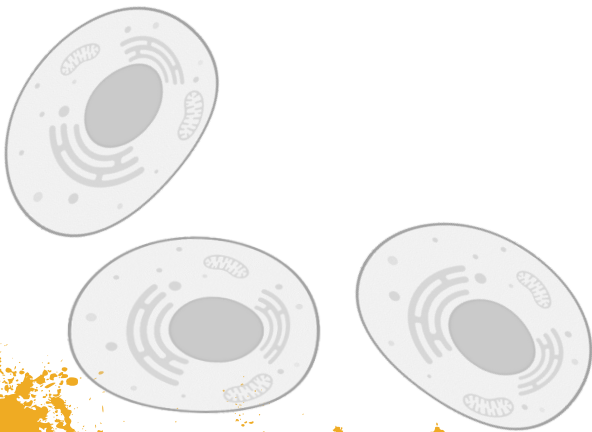
GLOSARIO

CpG	<i>CpG islands</i>	Islas citosina-fosfato-guanosina
CRE	<i>CREB binding site</i>	Elemento de unión de CREB
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>	Elementos de respuesta a AMPc
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>	Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente espaciadas
CvME	<i>Caveolae Mediated Endocytosis</i>	Endocitosis mediada por caveolas
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>	Deoxyadenosina-5'-trifosfato
DCM	<i>Dichloromethane</i>	Diclorometano
ddNTP	<i>Dideoxynucleotide-5'-triphosphate</i>	Dideoxinucleótido-5'-trifosfato
DE		Desviación estándar
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>	Dispersión dinámica de luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMR	<i>Differentially Methylated Region</i>	Región diferencialmente metilada
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>	Dimetilsulfóxido
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>	Deoxinucleótido-5'-trifosfato
DOTAP	<i>N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium methyl-sulfate</i>	<i>N</i> -[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]- <i>N,N,N</i> -trimetilamonio metilsulfato
DOTMA	<i>1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane</i>	1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano
DP	<i>Deep coverage</i>	Profundidad de lectura
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	Proteína verde fluorescente mejorada
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Agencia Europea del Medicamento
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>	Suero bovino fetal
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	Isotiocianato de fluoresceína
GDP	<i>Guanosine-5'-diphosphate</i>	Guanosín-5'-difosfato
GH	<i>Growth hormone</i>	Hormona de crecimiento
GHRH	<i>Growth hormone-releasing hormone</i>	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
Gn	<i>Gonadotropins</i>	Gonadotropinas
GNAS	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Stimulating</i>	Proteína de unión del nucleótido guanina, alfa estimuladora
GNAS-AS	<i>Guanine Nucleotide Binding Protein, Alpha Stimulating-Antisense transcript</i>	Transcrito antisentido de GNAS
GOM	<i>Gain of Methylation</i>	Ganancia de metilación
GPCR	<i>G Protein Coupled Receptor</i>	Receptor acoplado a proteína G
G_s	<i>Stimulating G protein</i>	Proteína G estimuladora

G_sα	<i>Alpha-subunit of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein</i>	Subunidad alfa de la proteína G estimuladora
GTP	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>	Guanosín-5'-trifosfato
GTPasa		Hidrolasa GTP
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293 cells</i>	Células embrionarias de riñón humano 293
HTNB	<i>Hypertension and Brachydactyly Syndrome</i>	Síndrome de Hipertensión y Braquidactilia
hUSC	<i>Human Urine derived mesenchymal Stem Cell</i>	Célula madre mesenquimal humana derivada de orina
ICR	<i>Imprinting Control Region</i>	Región controladora de la impronta
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>	Visor integrado genómico
iPPSD	<i>Inactivating PTH/PTHrP Signalling Disorder</i>	Desórdenes inactivantes de la señalización en la cascada PTH/PTHrP
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cell</i>	Célula madre pluripotente inducida
ISCT	<i>International Society of Cellular Therapy</i>	Sociedad Internacional de Terapia Celular
iupd	<i>Uniparental isodisomy</i>	Isodisomía uniparental
LDV	<i>Laser Doppler Velocimetry</i>	Velocimetría por láser Doppler
LOM	<i>Loss of Methylation</i>	Pérdida de metilación
Mg²⁺		Ion de magnesio
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Complejo mayor de histocompatibilidad
MLID	<i>Multilocus Imprinting Disorder</i>	Alteración multilocus de la impronta
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación
MSC	<i>Mesenchymal Stem Cell</i>	Célula madre mesenquimal
MS-MLPA	<i>Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>	Amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación metilación específica
NaCl	<i>Sodium chloride</i>	Cloruro sódico
NESP55	<i>Neuroendocrine secretory protein 55</i>	Proteína neuroendocrina secretora 55
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>	Secuenciación de Nueva Generación
NSIAD	<i>Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis</i>	Síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada.
P		Fósforo
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>	Tampón fosfato salino
PCC	<i>Pearson's Correlation Coefficient</i>	Coeficiente de correlación de Pearson
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción de polimerasa en cadena
PDE3A	<i>Phosphodiesterase 3A</i>	Fosfodiesterasa 3A
PDE4D	<i>Phosphodiesterase 4D</i>	Fosfodiesterasa 4D

GLOSARIO

PE	<i>R-phycoerythrin</i>	R-ficoeritrina
PFA	<i>Paraformaldehyde</i>	Paraformaldehído
PHP	<i>Pseudohypoparathyroidism</i>	Pseudohipoparatiroidismo
PHP1A	<i>Pseudohypoparathyroidism type 1A</i>	Pseudohipoparatiroidismo tipo 1A
PHP1B	<i>Pseudohypoparathyroidism type 1B</i>	Pseudohipoparatiroidismo tipo 1B
PKA	<i>Protein kinase A</i>	Proteína quinasa A
POH	<i>Progressive osseous heteroplasia</i>	Heteroplasia ósea progresiva
PPHP	<i>Pseudopseudohypoparathyroidism</i>	Pseudopseudohipoparatiroidismo
PTH	<i>Parathyroid hormone</i>	Hormona paratiroidea
PTHr1	<i>Parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor</i>	Receptor PTH/PTHrP tipo 1
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>	Proteína relacionado con PTH
RCIU		Retraso del crecimiento intrauterino
RCPN		Retraso del crecimiento postnatal
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	Polimorfismo de base única
spor-iPPSD3	<i>Sporadic iPPSD3</i>	iPPSD3 esporádico
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>	Repetición corta en tándem
STX16	<i>Syntaxin 16</i>	Sintaxina 16
TAE	<i>Tris-acetate-EDTA buffer</i>	Tampón tris, acetato, EDTA
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i>	Microscopía electrónica de transmisión
TF	<i>Transcription Factor</i>	Factor de transcripción
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	Tris(hidroximetil)aminometano
TSH	<i>Thyroid-stimulating hormone</i>	Hormona estimulante de tiroides
UPD	<i>Uniparental Disomy</i>	Disomía uniparental
UTR	<i>Untranslated Region</i>	Región no traducida
VCF	<i>Variant Call Format</i>	Formato de llamado de variantes
VUS	<i>Variant of Uncertain Significance</i>	Variante de significado incierto
XLα_s	<i>Extra large G$_s$$\alpha$</i>	G $_s$ α extra larga

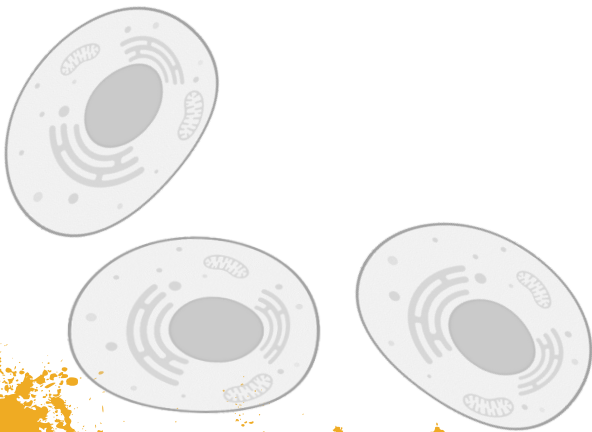


RESUMEN

El término iPPSD (*inactivating PTH/PTHrP Signalling Disorder*) hace referencia a un grupo de enfermedades (epi)genéticas raras caracterizadas todas ellas por una disfunción en la cascada de señalización de PTH/PTHrP. En la presente tesis, se ha trabajado con diferentes cohortes de pacientes para identificar alteraciones en los genes asociados a iPPSD y establecer el origen parental de las mismas, pero también para identificar nuevos mecanismos causales mediante la tecnología de secuenciación masiva (NGS). Recientemente, se han propuesto unos criterios para proceder al diagnóstico clínico de iPPSD. En nuestra investigación, también se ha intentado validar esa clasificación mediante estudios de correlación genotipo-fenotipo, basándonos en los resultados obtenidos de los estudios (epi)genéticos y la clínica presente en los y las pacientes.

Una vez identificadas las alteraciones (epi)genéticas, si las variantes no habían sido descritas previamente, es necesario realizar estudios funcionales para validar la patogenicidad de dicha variante. Por tanto, es interesante encontrar un buen tipo celular al que poder acceder fácilmente para utilizarlo como modelo de la enfermedad (pudiendo hacer modificaciones en su genoma). Con ese fin, se han conseguido aislar células madre mesenquimales derivadas de orina (hUSC), cuya obtención es sencilla, económica y no invasiva. Además, la fuente es en teoría ilimitada. Asimismo, el fácil acceso a la muestra ayuda a poder aplicar el protocolo desarrollado en pacientes sensibles, como podrían ser los pacientes pediátricos, cuyo porcentaje es alto en las enfermedades iPPSD. La caracterización de las hUSCs ha permitido determinar que son un tipo celular adecuado para su aislamiento, mantenimiento y transporte. Finalmente, se ha analizado en las hUSC la eficiencia de transfección de los vectores no virales conocidos como niosomas catiónicos. Los niosomas catiónicos son unas vesículas lipídicas bicapa. Son parecidos a los liposomas, pero con la diferencia de que en la composición se sustituyen los fosfolípidos por surfactantes no iónicos. Además, al incluir lípidos catiónicos, estos vectores son prometedores para el transporte de material genético al interior celular. Añadido a esto, su fabricación es simple y económica, no presentan problemas de inmunogenicidad y tienen muy buenas características físico-químicas.

En definitiva, se han dado unos primeros pasos a la hora de desarrollar una estrategia de transfección en hUSCs mediante niosomas catiónicos, que podrá ser utilizada con diferentes fines, como por ejemplo terapia génica en enfermedades monogénicas o modelado de enfermedades.

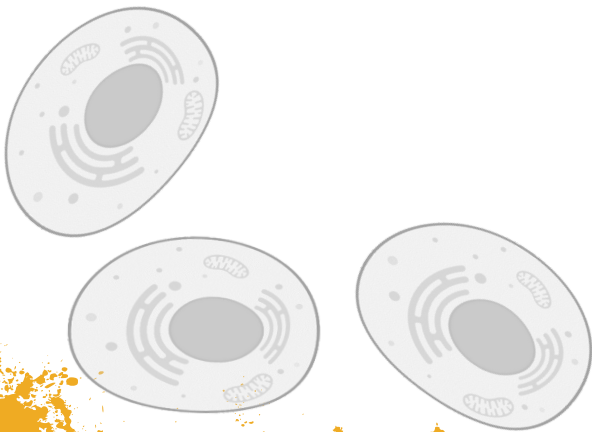


ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA PARATIROIDEA (PTH) Y PROTEÍNA RELACIONADA CON PTH (PTHrP).....	3
2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CASCADA PTH/PTHrP.....	4
2.1. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A PTHR1.....	5
2.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A GNAS.....	5
2.2.1. LOCUS GNAS.....	6
2.2.2. ALTERACIONES EN EL GEN GNAS.....	9
2.2.2.1. Mutaciones activantes en el gen GNAS.....	9
2.2.2.2. Pseudohipoparatiroidismo tipo 1A (PHP1A).....	10
2.2.2.3. Pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP).....	10
2.2.2.4. Heteroplasia ósea progresiva (POH).....	10
2.2.3. ALTERACIONES DEL PATRÓN DE IMPRONTA EN EL LOCUS GNAS.....	11
2.2.3.1. PHP1B autosómico dominante (AD-PHP1B).....	11
2.2.3.2. PHP1B esporádico.....	12
2.3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A PRKAR1A.....	12
2.4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A PDE4D.....	13
2.5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A PDE3A.....	13
3. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CASCADA PTH/PTHrP.....	13
4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC).....	16
4.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE ORINA (hUSC).....	17
5. TERAPIA GÉNICA.....	21
5.1. VECTORES NO VIRALES.....	21
5.1.1. NIOSOMAS.....	22
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
1. HIPÓTESIS.....	27
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1. PACIENTES.....	31
2. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DESDE SANGRE PERIFÉRICA.....	31
3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	32
4. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE LOS GENES.....	32
4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	32
4.2. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	33
4.3. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA.....	34
4.4. SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS).....	35
4.5. HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS IN SILICO.....	36

5. ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA IMPRONTA.....	36
5.1. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MS-MLPA).....	36
5.2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES	37
6. ALTERACIONES ESTRUCTURALES.....	38
6.1. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN (MLPA)	38
6.2. MATRIZ DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (aCGH).....	38
6.3. ARRAY DE SNP.....	38
7. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO PATOGENICO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS	39
7.1. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN PARENTAL DE LA VARIANTE	39
7.1.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRAS RETROTRANSCRIPCIÓN (RT-PCR).....	39
7.1.1.1. PCR anidada	39
7.1.1.2. Extracción y purificación del ADNc amplificado desde gel de agarosa	40
7.1.2. RT-PCR ESPECÍFICA DE ALELO	40
7.1.3. PCR ESPECÍFICA DE ALELO.....	40
8. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR A PARTIR DE URINA	41
8.1. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR.....	41
8.2. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR.....	41
8.2.1. ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO	41
8.2.2. DIFERENCIACIÓN HACIA LÍNEA OSTEOGÉNICA	42
8.2.3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL (EPI)GENÉTICO DE LAS CÉLULAS	43
8.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRIOPRESERVACIÓN	43
8.2.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	44
9. REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO	45
10. FORMULACIÓN DE LOS NIOSOMAS CATIÓNICOS.....	45
11. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS CATIÓNICOS	47
12. EXPERIMENTOS DE TRANSFECCIÓN, INTERNALIZACIÓN Y TRÁFICO CELULAR.....	48
12.1. TRANSFECCIÓN CELULAR	48
12.2. CAPTACIÓN CELULAR	48
12.3. TRÁFICO CELULAR	49
4. RESULTADOS.....	51
1. (EPI)GENÉTICA DE LOS PACIENTES.....	53
1.1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE LOS GENES.....	53
1.2. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN PARENTAL DE LAS VARIANTES EN GNAS	61
1.3. DETECCIÓN DE VARIANTES EN MOSAICO	62
1.4. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE IMPRONTA.....	68
2. CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DE LOS PACIENTES.....	70
3. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR.....	80

4. CARACTERIZACIÓN CELULAR.....	82
5. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS NIOPLEXOS Y VIABILIDAD CELULAR	85
6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS/NIOPLEXOS.....	86
7. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN CELULAR	87
8. ESTUDIOS DE TRÁFICO DE LOS NIOPLEXOS	88
<u>5. DISCUSIÓN.....</u>	91
1. ESTUDIO MOLECULAR	94
1.1. ANÁLISIS DE LAS CAUSAS (EPI)GENÉTICAS CONOCIDAS	94
1.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO	97
1.3. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS CAUSAS GENÉTICAS.....	101
1.3.1. MOSAICISMO COMO CAUSA SUBYACENTE	103
1.3.2. NUEVOS GENES ASOCIADOS A iPPSD/iPPSD-LIKE	104
2. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR.....	107
2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRIOPRESERVACIÓN.....	108
2.2. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA	109
3. CARACTERIZACIÓN CELULAR.....	109
3.1. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	110
3.2. DIFERENCIACIÓN HACIA LÍNEA OSTEOGÉNICA	110
3.3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL (EPI)GENÉTICO DE LAS CÉLULAS	111
4. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS NIOPLEXOS Y VIABILIDAD CELULAR	112
5. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS/NIOPLEXOS.....	113
6. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN CELULAR	114
7. ESTUDIOS DE TRÁFICO CELULAR DE LOS NIOPLEXOS	115
<u>6. CONCLUSIONES.....</u>	117
<u>7. BIBLIOGRAFÍA.....</u>	121
<u>ANEXOS.....</u>	145
<u>PUBLICACIONES.....</u>	161
PUBLICACIONES GENERADAS A PARTIR DE LA TESIS.....	163
PUBLICACIONES DERIVADAS A PARTIR DEL DESARROLLO TECNOLÓGICO DE LA TESIS	187



1. INTRODUCCIÓN

1. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE LA HORMONA PARATIROIDEA (PTH) Y PROTEÍNA RELACIONADA CON PTH (PTHrP)

La resistencia de los órganos a ciertas hormonas, generalmente está causada por alteraciones en el receptor. Las características patológicas son consecuencia de la ausencia de activación de su vía de señalización por la falta de activación de los diferentes efectores¹. En el amplio campo de las proteínas de membrana, existe un tipo de receptores conocido como receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCR), los cuales participan en una gran variedad de procesos fisiológicos. Su función es la transducción de la señal desde el exterior de la célula hacia su interior². A pesar de ser una de las familias de proteínas más diversa y extensa, como característica común todas ellas presentan siete hélices transmembrana². Estos GPCR activan una superfamilia de efectores llamados proteínas G heterotriméricas, a las que se las conoce así por estar constituidas por tres subunidades diferentes: alfa (α), beta (β) y gamma (γ). La especificidad de las proteínas G depende de la subunidad alfa³. Los GPCR inducen la activación de efectores en la cascada de señalización que finalmente producen efectos a corto plazo como la secreción de hormonas, neurotransmisión o contracción muscular, o efectos a largo plazo como la transcripción génica¹.

El receptor de tipo 1 de PTH y de PTHrP (PTHr1) pertenece al grupo de los GPCR y se expresa preferencialmente en hueso y riñón, aunque también está presente en otros tejidos. Este receptor participa en la regulación del desarrollo esquelético, el recambio óseo y es necesario para mantener niveles adecuados de calcio, fosfato y vitamina D tanto en sangre como en los fluidos extracelulares. La hormona paratiroidea (PTH) se produce en las glándulas paratiroideas y es una importante reguladora de la homeostasis de los iones minerales. En el riñón, estimula la producción de la 1,25-dihidroxi vitamina D₃ e inhibe la reabsorción del fosfato en el túbulo proximal, mientras que aumenta la reabsorción de calcio en la nefrona distal. Por lo tanto, una deficiencia de la PTH provoca hipocalcemia e hiperfosfatemia en el organismo. Por lo que a la placa de crecimiento respecta, la PTHrP (proteína relacionada con la PTH) promueve la osificación endocondral. Por otro lado, la PTH y la PTHrP están involucrados en la remodelación ósea, mediante procesos tanto anabólicos como catabólicos (revisado en Elli y cols¹ y Sutkeviciute y cols³).

Cuando al receptor PTHr1 se une cualquiera de sus dos ligandos (tanto la hormona PTH como la proteína PTHrP), su proteína G estimuladora (G_s) heterotrimérica asociada intercambia el guanósín-5'-difosfato (GDP) que tenía unido por guanósín-5'-trifosfato (GTP). En este momento, el heterotrímico se disocia y por consiguiente se activa. De esta manera, la subunidad alfa de la proteína G estimuladora ($G_s\alpha$) activa la adenilato ciclasa (AC), la cual produce el

segundo mensajero conocido como adenosín-5'-monofosfato cíclico (AMPc). A continuación, el AMPc se une a la subunidad reguladora 1A (R) de la proteína quinasa A (PKA). Después de la unión del AMPc, las subunidades catalíticas (C) de la PKA se disocian de las subunidades R y fosforilan diversas proteínas. Entre las dianas de la PKA se encuentran los elementos de unión de respuesta a AMPc (CREB) y diferentes fosfodiesterasas (PDE), tales como PDE3A o PDE4D. Por un lado, CREB activa diferentes genes de respuesta a AMPc y por otro lado, las fosfodiesterasas degradan el AMPc en adenosín-5'-monofosfato (AMP), inactivando de esta manera su función⁴ (**Figura 1.1**).

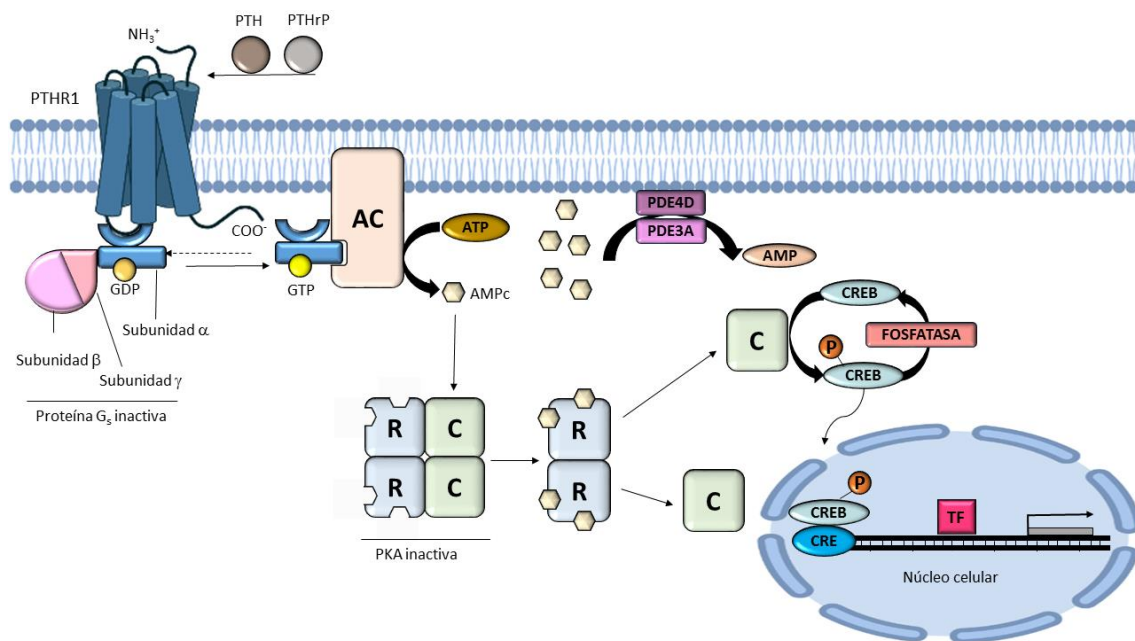


Figura 1.1. Esquema representativo de la cascada PTH/PTHrP. La unión de PTH o PTHrP pone en marcha la cascada de señalización de PTH/PTHrP, conllevando la transcripción de genes específicos. TF: factor de transcripción.

2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CASCADA PTH/PTHrP

Se han identificado variantes (epi)genéticas patogénicas en diferentes niveles de la cascada de señalización de PTH/PTHrP. A pesar de que el Colegio Americano de Genética Médica (ACMG) recomienda el uso del término variante para referirse a las alteraciones genéticas⁵, a lo largo del texto se utilizarán indistintamente las nomenclaturas variante patogénica y mutación. Si bien las mutaciones en esta cascada de señalización pueden ser activantes y en otros casos inactivantes, durante la presente tesis me voy a centrar en las mutaciones inactivantes de la señalización, aunque mencionaré sucintamente las patologías asociadas a mutaciones activantes.

2.1. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A *PTHRI*

Las patologías asociadas a alteraciones inactivantes en *PTHRI*, codificante del receptor 1 de la PTH y PTHrP, son la Osteocondrodisplasia de Blomstrand (BOCD, OMIM #215045) y el Síndrome de Eiken (OMIM #600002).

La Osteocondrodisplasia de Blomstrand es una forma rara y letal de enanismo que fue descrita por primera vez en 1985 por Blomstrand y colaboradores⁶. Se caracteriza por una osificación avanzada y prematura en todos los elementos esqueléticos⁷. Las manifestaciones clínicas principales son extremidades sumamente cortas, un tórax estrecho, rasgos faciales característicos (tales como macroglosia o micrognatia) y polihidramnios⁸.

Las variantes patogénicas se encuentran en heterocigosis compuesta u homocigosis y la enfermedad cumple una herencia autosómica recesiva⁹. Algunos de los casos descritos son fetos con progenitores consanguíneos^{6,10,11}. Las mutaciones encontradas hasta el momento son de diversos tipos atendiendo al tipo de efecto que tienen a nivel de proteína: *nonsense*^{7,12}, *missense*^{7,13}, variante intrónica⁷, alteración en el marco de lectura (*frameshift*)¹⁴ y delección de 10 kb (comunicación personal).

Por su parte, el Síndrome de Eiken se trata de una displasia esquelética que solamente se ha descrito en tres familias. Los individuos afectados presentaban la alteración en homocigosis, lo que sugiere una herencia autosómica recesiva^{9,15,16}. Hay que remarcar que de las tres familias encontradas, dos de ellas eran consanguíneas^{9,16}. Los rasgos de los pacientes afectados por este síndrome incluyen múltiples displasias epifisarias con un retardo extremo de la osificación, alteración en la forma de los huesos en manos y pies y un leve retraso del crecimiento¹⁷. También se han incluido a la lista de los síntomas braquidactilia del tipo A1 (BDA1), epífisis de las falanges proximales y metacarpianos extras y fallo en la erupción de los dientes¹⁵.

2.2. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A *GNAS*

En el locus *GNAS* se han descrito tanto variantes genéticas a nivel del gen *GNAS* (proteína de unión del nucleótido guanina, alfa estimuladora) como alteraciones de la impronta a nivel de locus, asociadas a diferentes manifestaciones clínicas conocidas como pseudohipoparatiroidismo (PHP)^{18,19} (**Tabla 1.1**). El PHP se trata de un grupo heterogéneo y raro de enfermedades caracterizadas por la resistencia a la PTH que generalmente comparten características bioquímicas como la hipocalcemia y la hiperfosfatemia, encontrándose en algunos casos resistencia a otras hormonas que también señalizan por $G_s\alpha$, como la hormona estimulante de tiroides (TSH o tirotropina), hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH) o gonadotropinas (Gn)²⁰.

Tabla 1.1. Clasificación de los diferentes tipos de PHP. Se resumen los diferentes tipos de PHP y sus características clínicas y moleculares más importantes.

TIPO PHP	ALTERACIÓN MOLECULAR	PTH SÉRICA	CALCEMIA	FOSFATEMIA	RESISTENCIA HORMONAL	AHO
PHP1A	Mutación inactivante en el alelo materno	Elevada	Hipocalcemia	Hiperfosfatemia	PTH/TSH/Gn	Sí
PPHP	Mutación inactivante en el alelo paterno	Normal	Normal	Normal	No (raramente PTH y TSH)	Sí
POH	Mutación inactivante en el alelo paterno	Normal	Normal	Normal	No	No
PHP1B	Alteración del patrón de impronta	Elevada	Hipocalcemia	Hiperfosfatemia	PTH/TSH	No / leve

2.2.1. LOCUS GNAS

El locus *GNAS* se encuentra en la zona telomérica del brazo largo del cromosoma 20 (20q13.2-20q13.3) y es un locus de una gran complejidad.

Una de las razones por la que este locus es complejo es la cantidad de productos a los que da lugar. Por un lado, hay transcritos que codifican para proteína, como el transcrito para la subunidad alfa de la proteína G estimuladora ($G_s\alpha$), que se produce a partir de los exones 1-13 del gen *GNAS*. La proteína generada se compone de cuatro dominios funcionales: el dominio de actividad hidrolasa de GTP (GTPasa, exones 1 y 2), el dominio de actividad de adenilato ciclasa (exones 4 y 5), el dominio de cambio conformacional dependiente de GTP (exón 9) y el dominio de interacción con el receptor (exones 12 y 13)²¹. Debido al corte y empalme (*splicing*) alternativo, se sintetizan diferentes transcritos a partir de este gen (**Figura 1.2**). Hay dos formas largas que incluyen el exón 3 ($G_s\alpha$ -1 y $G_s\alpha$ -2) y otras dos formas que lo excluyen ($G_s\alpha$ -3 y $G_s\alpha$ -4). A su vez, al principio del exón 4 está el codón CAG, el cual lo contienen solo las formas $G_s\alpha$ -2 y $G_s\alpha$ -4 (**Figura 1.2**).



Figura 1.2. Isoformas de $G_{s\alpha}$ codificadas por el gen *GNAS*. Por el proceso de corte y empalme alternativo del exón 3 del gen, se generan dos formas largas ($G_{s\alpha-1}$ y $G_{s\alpha-2}$) y dos cortas ($G_{s\alpha-3}$ y $G_{s\alpha-4}$) de $G_{s\alpha}$. Además, utilizando un sitio aceptor alternativo del corte y empalme, $G_{s\alpha-2}$ y $G_{s\alpha-4}$ tienen un triplete (CAG) añadido. Los cuadrados blancos numerados representan los diferentes exones; los cuadros negros las zonas no traducidas (UTRs); las líneas discontinuas simbolizan los intrones; las rayas sólidas son los diferentes patrones de corte y empalme; el hexágono hace referencia al triplete CAG, que codifica para una glutamina.

Los otros transcritos codificantes en el locus *GNAS* son la $G_{s\alpha}$ extra larga ($XL\alpha_s$)²² y la proteína neuroendocrina secretora 55 (*NESP55*)²³ (**Figura 1.3**).

Además, se generan dos transcritos no codificantes que son el denominado A/B²⁴ y el transcrito antisentido de *GNAS* (*GNAS-AS*)²⁵. Exceptuando el transcrito AS, que se obtiene desde la hebra antisentido²⁵, el resto utilizan primeros exones alternativos que se empalman con el exón común 2 del gen *GNAS*^{22,23,26} (**Figura 1.3**).

En segundo lugar, el patrón de impronta también le confiere gran complejidad a este locus. La impronta genómica es un proceso de regulación epigenética, por lo general debido a la metilación, mediante el cual la expresión de los genes es diferente dependiendo del origen parental de los mismos²⁷. El locus *GNAS* está bajo los efectos de este mecanismo porque los primeros exones de los diferentes transcritos están regulados por regiones diferencialmente metiladas (DMRs) (**Figura 1.3**). Estas regiones son susceptibles de metilación debido a que se encuentran en zonas ricas en citosina-fosfato-guanina (islas CpG) y las citosinas de estas zonas son propensas a ser metiladas. Por un lado, la impronta de *GNAS-NESP:TSS-DMR* se establece de manera post-fertilización en el alelo paterno, por lo que su expresión ocurre desde el alelo materno. Por el contrario, en los DMRs *GNAS-AS1:TSS-DMR* y *GNAS-XL:Ex1-DMR* la metilación ocurre durante la gametogénesis en el alelo materno y por lo tanto el que se expresa es el paterno^{25,28-31}. El DMR *GNAS A/B:TSS-DMR* también presenta la metilación en el alelo materno. En este caso, se observa una metilación parcial en los ovocitos³². Por el contrario, el exón 1 de

$G_s\alpha$ no presenta patrón de impronta, y al no estar metilado, su expresión es bialélica en la mayoría de los tejidos. Sin embargo, hay ciertos tejidos en los que la expresión es predominantemente materna, como ocurre en el túbulo renal proximal, tejido adiposo pardo, tiroides, gónadas, núcleo paraventricular del hipotálamo e hipófisis³³⁻³⁶. Algunas investigaciones además apuntan a que en los tejidos en los que la expresión es bialélica, el alelo materno también se expresa de manera preferencial^{36,37}.

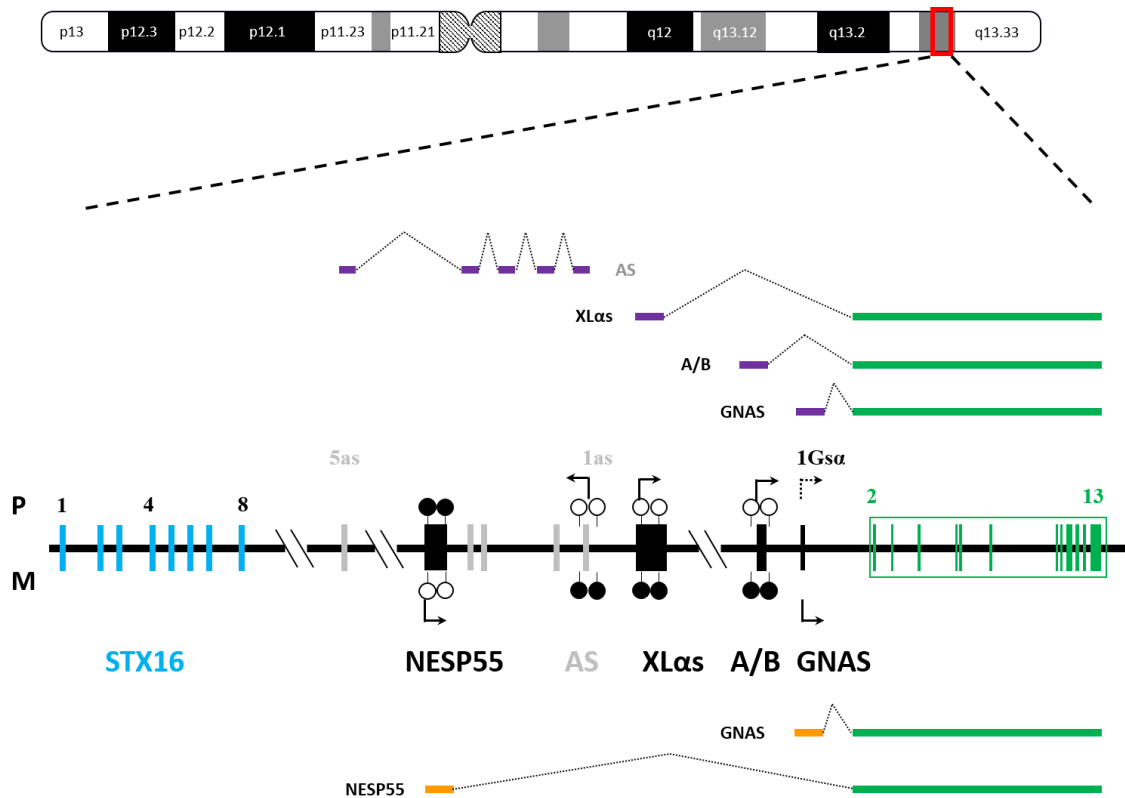


Figura 1.3. Estructura y patrón de impronta del locus *GNAS*. Se representa esquemáticamente la organización del locus *GNAS* en los alelos paterno (superior, P) y materno (inferior, M). Los primeros exones alternativos de la hebra sentido (*NESP55*, *XL α s*, *A/B* y *GNAS*) aparecen como recuadros negros y todos los exones de la hebra antisentido (*GNAS-AS*) como recuadros grises. Los exones comunes 2-13 se resaltan en verde. Los DMR aparecen como piruletas, siendo las rellenas metiladas y las vacías no metiladas. Las flechas indican el sentido de la transcripción. La flecha punteada hace referencia a que el transcrito $G_s\alpha$ paterno se genera en la mayoría de tejidos, pero no en todos. Los transcritos generados a partir del alelo paterno se presentan en morado y los conseguidos a partir del alelo materno en naranja. En azul se representan los diferentes exones del gen de la sintaxina 16 (*STX16*) que está aguas arriba del locus *GNAS*. Este gen se ha descrito como un regulador de la impronta del locus *GNAS*. Figura adaptada desde el Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología³⁸.

Teniendo en cuenta la gran complejidad y variedad de transcritos obtenidos del locus *GNAS*, las alteraciones que se pueden encontrar en él pueden afectar tanto a la secuencia como a la metilación. Además, debido al fenómeno de impronta y la consiguiente expresión diferencial en función del origen parental, las patologías pueden ser diferentes.

2.2.2. ALTERACIONES EN EL GEN GNAS

En el gen *GNAS* se han descrito variantes tanto a nivel germinal como somático y también mutaciones activantes e inactivantes.

2.2.2.1. Mutaciones activantes en el gen *GNAS*

Brevemente, respecto a las mutaciones activantes en el gen *GNAS*, principalmente se han descrito dos enfermedades asociadas a variantes somáticas: el Síndrome de McCune-Albright y tumores tanto endocrinos como no endocrinos. En el primero, los pacientes presentan mosaicismo genético porque las mutaciones ocurren en el desarrollo temprano³⁹. Clínicamente, en este síndrome es característica una tríada de síntomas: afectación cutánea (manchas café con leche), afectación ósea (displasia fibrosa del hueso) y pubertad precoz⁴⁰. En el segundo caso, a la proteína $G_s\alpha$ se la conoce como oncogén *gsp* y actúa generando tumores tras la aparición de mutaciones⁴¹.

Hasta hace pocos años, no se habían visto variantes germinales activantes, por lo que se infería que éstas eran letales⁴². Sin embargo, estudios recientes muestran que, aunque raramente, hay casos de mutaciones activantes germinales, las cuales son causantes de la patología conocida como Síndrome Nefrogénico de Antidiuresis Inapropiada (NSIAD, OMIM #300539)^{42,43}. Éste se caracteriza por la alteración de la capacidad renal de liberar agua en la orina⁴⁴. Además, los pacientes con NSIAD también presentan hiponatremia, problemas en el desarrollo esquelético y pubertad precoz⁴⁵.

No obstante, y como ya se ha mencionado, el presente trabajo se va a centrar en las mutaciones inactivantes del gen *GNAS*. Hasta el momento se han descrito alrededor de 380 variantes⁴⁶. Entre ellas, se han identificado de todos los tipos: *missense*, *nonsense*, inserciones, inversiones, deleciones, variantes intrónicas, variantes que afectan en el corte y empalme y alteraciones en el marco de lectura (<https://databases.lovd.nl/shared/genes/GNAS>)⁴⁶. Aunque las mutaciones pueden encontrarse en cualquiera de los exones codificantes del gen, se ha visto que suelen hallarse con mayor frecuencia en los exones 1 y 7^{47,48}. El exón que se encuentra afectado mayoritariamente sería el exón 1 y únicamente se ha considerado como punto caliente (*hotspot*) mutacional una deleción de 4 pares de bases en el exón 7 (c.568_571del, variante nombrada sobre el código de transcrito NM_001077488)⁴⁹. Como se ha mencionado anteriormente, debido al fenómeno de impronta, las patologías son diferentes dependiendo del alelo que presente la mutación^{50,51}.

2.2.2.2. Pseudohipoparatiroidismo tipo 1A (PHP1A)

Los pacientes con mutaciones inactivantes en heterocigosis en los exones codificantes del gen *GNAS* del alelo materno cursan con PHP1A (OMIM #103580). Esta patología se describió en 1942 por Albright y colaboradores como el primer síndrome de resistencia hormonal⁵². Además de la resistencia a la PTH, los pacientes con PHP1A también presentan un fenotipo característico denominado Osteodistrofia Hereditaria de Albright (AHO), caracterizado por braquidactilia, talla baja, cara redondeada, osificaciones ectópicas y grado variable de discapacidad intelectual⁵³. De todo lo mencionado, los rasgos más característicos de AHO son la braquidactilia tipo E (BDE), en la que principalmente los metacarpianos IV y V y la I falange distal están acortados, y las osificaciones subcutáneas⁵².

Además, los pacientes pueden presentar resistencia a múltiples hormonas que cumplen su función señalizando a través de receptores acoplados a proteínas G, como la TSH, la GHRH y las gonadotropinas, además de la PTH^{20,52}. El hecho de que los pacientes presenten resistencia hormonal al tener la alteración en su alelo materno, se debe a la mencionada expresión preferencial de $G_s\alpha$ (detallado en el apartado 2.2.1.) en determinados tejidos como el túbulo renal³⁴, la hipófisis³⁶, las gónadas³³ o el tiroides^{33,54}. La haploinsuficiencia en el resto de los tejidos sería la responsable del fenotipo AHO⁵⁵.

2.2.2.3. Pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP)

Cuando las mutaciones inactivantes ocurren en el alelo paterno del gen *GNAS*, la enfermedad que se manifiesta es el PPHP (OMIM #612463). Al igual que el PHP1A, el PPHP también se hereda de manera autosómica dominante y las variantes patogénicas se observan en heterocigosis⁵⁶. Tal y como describieron Albright y colaboradores⁵⁷, el fenotipo AHO está presente en estos pacientes, pero generalmente no cursan con resistencia a la PTH. Sin embargo, investigaciones más recientes apuntan a que en algunos casos el PPHP también puede ir asociado con resistencia a la PTH⁵⁸ e incluso con una resistencia moderada a la TSH⁵⁹⁻⁶¹.

2.2.2.4. Heteroplasia ósea progresiva (POH)

La POH (OMIM #166350) también está causada por alteraciones en el alelo paterno y al igual que en los dos casos anteriores, también se hereda de manera autosómica dominante^{20,62}. En este caso, las osificaciones ectópicas progresan hacia tejidos más profundos, como tejido conectivo o músculo esquelético⁶³. Sin embargo, los pacientes con POH suelen carecer del resto de características de AHO²⁰. Siendo en ambos casos las mutaciones inactivantes en el alelo paterno del gen *GNAS* las causantes, aún no se ha conseguido esclarecer por qué algunos

pacientes desarrollan PPHP y otros POH⁶³. Excepcionalmente, se han descrito algunos pacientes con características similares a POH que presentaban mutación en el alelo materno⁶⁴.

2.2.3. ALTERACIONES DEL PATRÓN DE IMPRONTA EN EL LOCUS *GNAS*

Cuando el defecto que se encuentra en el locus es epigenético, se afecta el patrón de impronta y genera pseudohipoparatiroidismo de tipo 1B (PHP1B, OMIM #603233). Las alteraciones que se pueden encontrar son pérdida de metilación (LOM, *Loss of Methylation*) en los DMR *GNAS-AS1:TSS-DMR*, *GNAS-XL:Ex1-DMR* y *GNAS A/B:TSS-DMR* y ganancia de la metilación (GOM, *Gain of Methylation*) en *GNAS-NESP:TSS-DMR*. Las variaciones en el estado de metilación pueden ocurrir en uno o varios DMRs (siempre incluyendo *GNAS A/B:TSS-DMR*) y ser totales o parciales^{65,66}.

El PHP1B cursa con resistencia a la PTH y, en ocasiones, a la TSH en ausencia de resistencia a otras hormonas y del fenotipo AHO^{4,20,51}. Hasta la fecha no se ha observado que los pacientes con PHP1B-MLID presenten características distintas a los que la epimutación se circunscribe al locus *GNAS*²⁰.

Tomando como punto de partida el tipo de herencia, el PHP1B se puede subclasificar en dos categorías.

2.2.3.1. PHP1B autosómico dominante (AD-PHP1B)

Se trata de la forma familiar de PHP1B y se asocia, principalmente, con la pérdida de metilación exclusiva de *GNAS A/B:TSS-DMR*. Esta LOM ocurre a consecuencia de deleciones en el gen *STX16*, que se encuentra unas 220 kb aguas arriba del locus *GNAS*. En la literatura se han descrito diferentes deleciones, pero entre ellas la más común es la de 3 kb⁶⁷⁻⁶⁹. Otras deleciones identificadas son la de 4,4 kb⁶⁹ y de 24,6 kb⁶⁸. Como se ha visto que alteraciones en el gen *STX16* producen variaciones de la metilación en el locus *GNAS*, el primero se ha propuesto como una región reguladora para el mantenimiento de la impronta (ICR, *Imprinting Control Region*) del segundo⁶⁸. Esta enfermedad se transmite por vía materna siguiendo una herencia autosómica dominante⁶⁵.

En algunas familias con modificación del patrón de metilación afectando a varios DMRs, se han identificado deleciones en el alelo materno de *AS1* y de *NESP55*⁷⁰⁻⁷³. Añadido a eso, también se han encontrado otro tipo de reorganizaciones cromosómicas asociadas a AD-PHP1B, como son duplicaciones en el locus *GNAS*⁷⁴⁻⁷⁶.

2.2.3.2. PHP1B esporádico

La mayoría de los casos de PHP1B son de tipo esporádico. En este caso, el patrón de metilación se ve alterado en varios DMRs, sin que aún se conozca una causa genética subyacente⁵¹. Es por eso que probablemente los defectos en la metilación estén causados por errores estocásticos o por factores medioambientales, que finalmente influyen en el mantenimiento de la impronta en los estadíos pre o post-implantacionales⁵¹.

En un porcentaje pequeño de estas formas, *a priori* esporádicas, se ha identificado la disomía uniparental paterna de parte o todo el brazo largo del cromosoma 20 (upd(20q)pat) como causa de la alteración en la metilación⁷⁷⁻⁸³. Además, se ha propuesto que pudiera existir una herencia autosómica recesiva en algunos de los pacientes estudiados con PHP1B esporádico⁸⁴, aunque por el momento no se ha identificado ningún gen responsable.

2.3. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A *PRKAR1A*

Mutaciones de ganancia de función en heterocigosis en el gen *PRKAR1A* dan lugar a acrodisostosis de tipo 1 (ACRDYS1, OMIM #101800). El término acrodisostosis hace referencia a un grupo de displasias esqueléticas muy raras que cumplen una herencia autosómica dominante^{85,86}, caracterizadas por braquidactilia severa, disostosis facial, baja estatura e hipoplasia nasal. También es frecuente encontrarse maduración ósea avanzada y obesidad y en algunos casos discapacidad intelectual^{85,87,88}.

Hasta el momento se han identificado mutaciones de tipo *missense*⁸⁹⁻⁹⁶ y *nonsense*^{89,91,94,96-99}, siendo la más recurrente la p.R368* (variante nombrada sobre el código de proteína NP_002725 generada a partir del transcrito NM_002734.5). Estas alteraciones conllevan una ganancia de función en la subunidad reguladora, impidiendo la liberación de la subunidad catalítica y, por tanto, inactivando la señalización⁹⁷. De esta manera, una mutación de ganancia de función en *PRKAR1A* disminuye la sensibilidad de la PKA al AMPc⁹⁷.

Por lo que respecta a la bioquímica, se ha encontrado resistencia a diversas hormonas en el 60-70% de los pacientes, incluyendo la PTH, tirotropina, calcitonina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento y gonadotropinas^{4,97}.

Por otra parte, cuando hay una sobreactivación de la señalización de la PKA, como se ha visto que ocurre con deleciones de la región cromosómica 17q24.2-q24.3 que incluyen el gen *PRKAR1A*, se manifiesta la patología conocida como complejo de Carney^{100,101}, que también puede ser causada por variantes puntuales^{102,103}. El complejo de Carney es un síndrome de

múltiples neoplasias endocrinas, que se caracteriza por manchas en la piel, diferentes tipos de mixomas y varios tipos de tumores endocrinos¹⁰¹.

2.4. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A *PDE4D*

Variantes patogénicas en heterocigosis en la secuencia del gen *PDE4D* producen la enfermedad conocida como acrodisostosis de tipo 2 (ACRDYS2, OMIM #614613). Todas las variantes patogénicas descritas hasta el momento son del tipo *missense*^{89,90,108,109,91,92,96,99,104-107} y asocian una mayor capacidad hidrolítica del AMPc, lo que inactiva la señalización de la cascada¹¹⁰.

A diferencia de lo que ocurre en la acrodisostosis de tipo 1, en ACRDYS2, por lo general, no hay resistencia hormonal, solamente se observa en el 10-20% de los pacientes⁴. No obstante, sí que tienen las características faciales típicas y también discapacidad intelectual. Curiosamente, estos individuos suelen tener ojos azules y pelo rubio o pelirrojo¹⁰⁸.

Deleciones y duplicaciones en la región cromosómica 5q12.1 que incluyen el gen *PDE4D* se han asociado con un nuevo síndrome de discapacidad intelectual (OMIM #615668). Sin embargo, estos pacientes no presentan acrodisostosis y su fenotipo difiere de aquellos que presentan mutaciones puntuales; de hecho, se tratan de fenotipos espejo¹⁰⁸. Los pacientes con alteraciones estructurales en las que está involucrado el gen *PDE4D*, tienen un índice de masa corporal bajo, dedos y brazos largos, nariz prominente y barbilla pequeña¹⁰⁸.

2.5. PATOLOGÍAS ASOCIADAS A *PDE3A*

Las variantes en este gen se asocian con el Síndrome de Hipertensión y Braquidactilia (HTNB, OMIM #112410). Las mutaciones encontradas hasta el momento se han descrito como variantes de ganancia de función, es decir, ocurre un aumento de la hidrólisis del AMPc, inactivando la transducción de la señal. Todas las variantes están concentradas en el exón codificante 4 del gen, y siguen una herencia autosómica dominante¹¹¹⁻¹¹⁸.

Como su nombre indica, este síndrome cursa con braquidactilia, concretamente de tipo E, e hipertensión, ésta última independiente de sal y de edad. Los pacientes con HTNB también tienen talla baja^{112,113}.

3. NUEVA CLASIFICACIÓN DE LAS PATOLOGÍAS ASOCIADAS A LA CASCADA PTH/PTHrP

Como se observa en los apartados anteriores, hay ciertas características clínicas que están presentes entre las diferentes enfermedades relacionadas con la señalización de la vía PTH/PTHrP: rasgos fenotípicos relacionados con el AHO, anomalías musculoesqueléticas,

retraso del crecimiento intrauterino y postnatal, problemas en el desarrollo neurocognitivo o cierre temprano de la placa de crecimiento¹. Debido al solapamiento de características y a la dificultad de realizar un diagnóstico diferencial, en 2016 se propuso una nueva clasificación para englobar a todas esas patologías: desórdenes inactivantes de la señalización en la cascada PTH/PTHrP (*inactivating PTH/PTHrP Signalling Disorder*), abreviado como iPPSD⁴. Por lo tanto, las iPPSDs están causadas por alteraciones (epi)genéticas heterogéneas pero muy relacionadas entre sí¹. Dentro de este concepto general, se hace una subclasificación numérica en base al defecto (epi)genético encontrado. De esta manera, las patologías pasarían a nombrarse como se resume en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2. Nueva nomenclatura asociada a iPPSD. Se resumen los nuevos nombres dados a las enfermedades asociadas a los defectos de señalización en la ruta PTH/PTHrP, debidos a mutaciones inactivantes de la señalización, teniendo en cuenta los criterios propuestos por Thiele y colaboradores⁴, en comparación con la terminología previa. También se presentan los defectos (epi)genéticos causantes de las mismas.

NOMENCLATURA ANTIGUA	NUEVA NOMENCLATURA	DEFECTO (EPI)GENÉTICO
Osteocondrodisplasia de Blomstrand	iPPSD1	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en el gen <i>PTHR1</i>
PHP1A	iPPSD2mat	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en los exones codificantes del gen <i>GNAS</i> en el alelo materno
PPHP/POH	iPPSD2pat	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en los exones codificantes del gen <i>GNAS</i> en el alelo paterno
PHP1B	iPPSD3	Alteraciones en el estado de metilación en el locus <i>GNAS</i>
Acrodisostosis tipo 1	iPPSD4	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en el gen <i>PRKAR1A</i>
Acrodisostosis tipo 2	iPPSD5	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en el gen <i>PDE4D</i>
Síndrome de hipertensión con braquidactilia	iPPSD6	Mutaciones inactivantes en heterocigosis en el gen <i>PDE3A</i>

En caso de realizar un estudio molecular a los pacientes y no haberse identificado un defecto (epi)genético, habría que nombrarlo como iPPSDx.

Para el diagnóstico clínico de iPPSDs, se han propuestos unos criterios mayores y otros menores⁴:

- Criterios mayores: son aquellos que presentan un solapamiento nulo o mínimo con otros síndromes. Estos criterios son la resistencia a la PTH, osificaciones ectópicas y braquidactilia.
- Criterios menores: entre estos se encontrarían la resistencia a la TSH y otras hormonas, retraso motor o cognitivo, retraso del crecimiento intrauterino y/o postnatal, obesidad/sobrepeso y puente nasal plano y/o hipoplasia maxilar y/o cara redondeada. Al ser rasgos menos específicos de los iPPSDs, tienen que combinarse con los criterios mayores.

Hay dos maneras para poder proceder al diagnóstico clínico de iPPSD⁴:

1. Presencia de resistencia a la PTH u osificaciones ectópicas, con o sin presencia de criterios menores.
2. Presencia de braquidactilia en combinación con otro criterio mayor o dos criterios menores.

Gracias a esta nueva clasificación, se consigue englobar en el mismo grupo a las diferentes patologías descritas hasta el momento. Todas ellas tienen como característica común que se tratan de enfermedades raras. Este tipo de enfermedades son aquellas que tienen una baja prevalencia en la población. En Europa, se le denomina enfermedad rara a aquella que afecta a menos de una persona de cada 2.000 (<https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

Se estima que más del 80% de las enfermedades raras están causadas por un defecto genético¹¹⁹. No obstante, mediante las técnicas utilizadas de rutina no siempre se encuentran las alteraciones genéticas responsables, por lo que a veces hay que recurrir a técnicas más potentes como la secuenciación masiva (NGS, *Next Generation Sequencing*), de la cual se extrae una gran cantidad de datos y permite acelerar el proceso de identificación de genes causantes de las enfermedades raras¹²⁰.

Al tratarse de condiciones de las que hay muy pocos casos, no se han podido estudiar en profundidad. Como consecuencia de esto, no se conoce lo suficiente la fisiopatología de la enfermedad y por lo tanto no se puede desarrollar un tratamiento efectivo¹²⁰. Es por ello que se necesitan modelos celulares o animales para poder validar las variantes identificadas y/o sus

posibles tratamientos, aproximación que ya se ha utilizado en diferentes patologías como el Síndrome de San Filippo¹²¹, Síndrome de Angelman y Síndrome de Prader-Willi¹²² o la enfermedad de Niemann-Pick de tipo 1A¹²³.

4. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSC)

Las células madre mesenquimales (MSC) son un grupo de células madre adultas multipotentes que se encuentran en diferentes localizaciones (nichos) en el cuerpo humano¹²⁴ (**Figura 1.4**). Por definición, las MSC tienen capacidad de diferenciarse a tipos celulares que provienen del mesodermo, como osteocitos o adipocitos¹²⁴, pero algunos estudios demuestran que también pueden dar origen a células de las otras capas embrionarias¹²⁵.

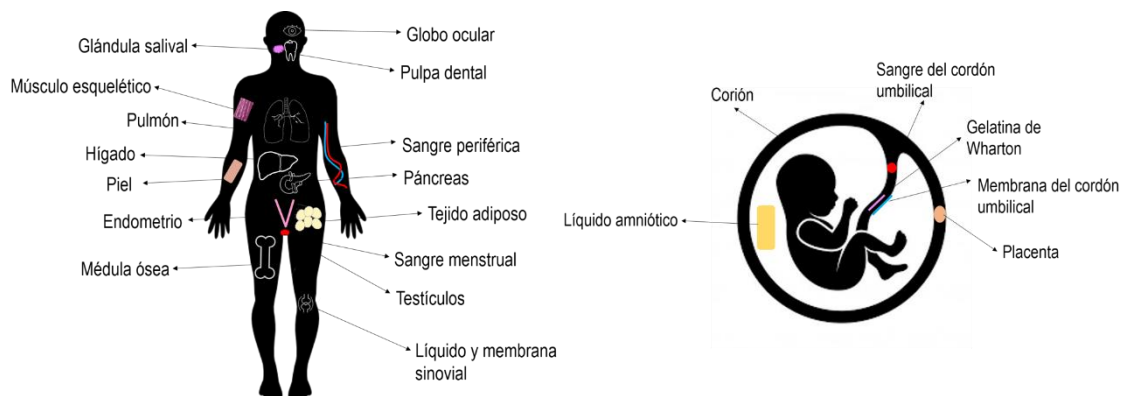


Figura 1.4. Nichos de las MSC. Diversos nichos en los que se encuentran células madre mesenquimales en un cuerpo adulto o en un feto.

Originalmente, las MSC se describieron como un tipo celular de morfología fibroblastoide¹²⁴, pero estudios posteriores han sugerido que la forma puede cambiar dependiendo de la fuente de obtención. En algunos casos se observan células con un aspecto más ovoide o de “grano de arroz”¹²⁶, mientras que en otros se mantiene la comentada forma fibroblastoide¹²⁷. Las MSC tienen un papel importante en la reparación y en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos dañados¹²⁸. Asimismo, las MSC tienen capacidad inmunomoduladora, es decir, pueden modular la respuesta inmune, debido a la baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHCI) y la ausencia de expresión del tipo II (MHCII)¹²⁹.

Este tipo celular es una importante opción a tener en cuenta a la hora de trabajar con cultivos celulares, ya que se consiguen fácilmente y su uso no genera grandes debates éticos. Además, tienen capacidad de auto-renovación, son multipotentes y se pueden mantener y expandir en cultivo conservando una excelente estabilidad genómica¹³⁰. Asimismo, las células se pueden obtener del propio paciente, es decir, tienen un origen autólogo, y por lo tanto, no

promueven ningún tipo de respuesta inmune y tampoco producen rechazo en caso de usarlas como terapia^{131,132}.

Como se ha mencionado anteriormente, las MSC se encuentran en diversos tejidos adultos en el cuerpo humano. Hasta la fecha, se han identificado abundantes nichos desde los cuales se han conseguido aislar MSCs: endometrio^{133,134}, Gelatina de Wharton^{135,136}, glándula salival¹³⁷, líquido y membrana amnióticos^{138,139}, líquido sinovial^{140,141}, médula ósea¹⁴²⁻¹⁴⁴, membrana que recubre el cordón umbilical¹⁴⁵⁻¹⁴⁷, muñones de extremidades¹⁴⁸, piel¹⁴⁹⁻¹⁵¹, placenta y membrana fetal^{152,153}, pulpa dental^{154,155}, sangre periférica¹⁵⁶ y tejido adiposo^{157,158}. Entre todos los orígenes descritos, los tejidos desde los cuales más se ha trabajado son la médula ósea, la sangre de cordón umbilical y el tejido adiposo.

Para poder clasificar unas células como mesenquimales, éstas tienen que cumplir una serie de requisitos, establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT¹⁵⁹:

1. En cultivo celular, estas células tienen que crecer adheridas al plástico.
2. En un ensayo *in vitro* tienen que poder diferenciarse a osteocito, a adipocito y a condrocito.
3. Al analizar los marcadores de superficie por citometría de flujo, tienen que presentar los conocidos como grupos de diferenciación o *Clusters of Differentiation* CD73, CD90 y CD105, pero tiene que haber ausencia de expresión de CD14, CD34 y CD45.

4.1. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE ORINA (hUSC)

A pesar de que las MSC mencionadas hasta el momento son adecuadas para trabajar con ellas, su obtención se realiza de manera invasiva y la fuente de donde se extraen es limitada^{131,160}. Es por ello que, de cara a intentar aplicarlas para patologías que afectan a niños y niñas como ocurre con las iPPSD, es necesario encontrar un origen celular fácilmente accesible. En el año 2008, Zhang y colaboradores describieron por primera vez un cultivo de células madre mesenquimales aisladas desde orina¹⁶¹. Desde ese momento y gracias a las grandes ventajas que las mismas pueden conllevar, investigadores e investigadoras han centrado su atención en este tipo celular. Al igual que el resto de MSCs, las hUSCs muestran una alta capacidad de proliferación y auto-renovación, pudiendo generar grandes cantidades de células desde un único clon. Del mismo modo, mantienen una alta capacidad proliferativa debido a la alta actividad de la telomerasa. Además, mantienen el potencial de diferenciación hacia diferentes linajes celulares^{160,162}. Bajo unas condiciones adecuadas de cultivo y siendo inducidas, las hUSCs han demostrado diferenciarse *in vitro* hacia diferentes tipos celulares de las líneas osteogénica,

condrogénica, adipogénica, miogénica, neurogénica y endotelial, entre otras¹⁶³. Después de su diferenciación y con un correcto manejo, al implantarlas *in vivo* pueden formar hueso, cartílago, grasa, músculo, endotelio y tejido del urotelio¹⁶². En definitiva, las hUSCs tienen un gran potencial para ser utilizadas como células de origen autólogo, provenientes de cada uno de los pacientes, para el tratamiento de diferentes enfermedades¹⁶⁴. Que sean células somáticas autólogas extraídas directamente desde el paciente les confiere la ventaja de no producir rechazo inmunológico¹³².

En comparación con las MSC obtenidas desde otros nichos, las hUSCs se pueden aislar de manera no invasiva, fácil, simple y segura. Se pueden conseguir con una metodología de bajo coste y además se pueden cultivar y expandir de manera sencilla y es aplicable a cualquier paciente, incluidos grupos más vulnerables como los paciente pediátricos¹⁶³⁻¹⁶⁵. Otra de las ventajas que presentan es que al obtenerse desde la orina, su fuente es ilimitada y la obtención no es dolorosa^{161,163,166}.

Aunque no está del todo esclarecido cuál es el origen de las células madre mesenquimales derivadas de orina, hay bastantes evidencias que hacen pensar que lo más probable es que provengan del tracto urinario superior, más bien del riñón, y principalmente del túbulo renal^{162,164}. Más concretamente, el origen de las hUSCs podría ser glomerular. Hay pruebas que sostienen que provienen de las células epiteliales parietales del glomérulo^{128,129,162}.

Con todo lo mencionado hasta ahora, se puede concluir que las hUSCs son una buena opción para utilizarlas en clínica. De hecho, es posible encontrar diferentes aplicaciones clínicas asociadas a estas células (**Figura 1.5**):

- Por un lado, se pueden reprogramar hacia células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Las iPSCs son células adultas diferenciadas que al tratarlas con unos factores concretos se desdiferencian y recuperan la pluripotencialidad¹⁶⁷. De esta manera, pueden ser utilizadas como modelos de diferentes enfermedades, ya que en el ámbito de la investigación con animales *in vivo* se encuentran algunas limitaciones. En cambio, las iPSCs pueden ser una buena alternativa para modelar enfermedades humanas ya que no presentan controversias éticas, son un modelo más preciso que los animales y al obtenerlas desde orina, no sería necesario conseguir tejido adulto de manera invasiva^{128,132,164,165}. No obstante, hay que mencionar que puede haber problemas con la inestabilidad genómica y la alteración del patrón epigenético al reprogramar las células hacia iPSCs¹²⁸. Además, concretamente las iPSC derivadas desde hUSCs han demostrado ventajas frente a aquellas reprogramadas desde otras fuentes^{168,169}. La

estrategia de usar iPSCs derivadas desde hUSCs ya ha sido probada por algunos investigadores e investigadoras, entre otras finalidades para la neuroregeneración¹⁷⁰ o la reconstrucción dental¹⁷¹. Tal y como se ha mencionado, también se han utilizado para el modelado de enfermedades, algunas de ellas tan conocidas como el Síndrome de Down¹⁷² o la distrofia muscular¹⁷³.

- Para conseguir modelos celulares de enfermedades también se pueden reprogramar directamente las hUSCs, evitando de esta manera el paso intermedio de conseguir iPSCs. No obstante, aún hay que optimizar los procesos de diferenciación desde hUSC, ya que no se conoce mucho la capacidad que tienen y son necesarios más estudios^{128,174}.
- En algunos casos se ha descrito este tipo celular como una nueva fuente biológica para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos¹⁶⁵.
- Aunque en menor medida, también se han utilizado como modelos para farmacología y toxicología y con propósitos de cribados masivos en los dos campos mencionados, ya que las células presentan las condiciones fisiológicas necesarias para el estudio de las vías de señalización. Ésta es un área en auge y que probablemente vaya a desarrollarse en los próximos años¹⁶⁵.
- Las hUSCs también se están probando en el ámbito de la terapia celular. Ésta tiene como objetivo revertir enfermedades o tejidos dañados, reemplazando las células dañadas o ausentes por aquellas con una función correcta. La terapia celular requiere de millones de células para ser inyectadas, por lo que es de vital importancia la elección de un buen tipo celular¹⁶⁴. Las líneas de investigación en las que se han aplicado o podrían aplicarse las hUSCs en terapia celular e ingeniería de tejidos son de diferente índole: ingeniería del tejido urológico¹⁷⁵, regeneración de hueso^{176,177}, reconstrucción renal¹⁶⁴, reparación cardíaca¹⁶⁴, reconstrucción hepática¹⁶⁴, tratamiento de la diabetes¹⁷⁸, neuroregeneración^{160,179} o ingeniería del tejido muscular^{166,180}. Ahora bien, hay que decir que aún hay ciertos parámetros que no se controlan del todo y que requieren de un proceso de optimización, como pueden ser la vía de administración o la dosis o el tiempo necesario para la inyección. También quedan pendientes estudios de cómo ocurre la diferenciación de estas células *in vivo*, ya que la capacidad ha sido principalmente estudiada *in vitro*¹⁶³.
- Al tratarse de células de origen autólogo, dejan la puerta abierta a llevar a cabo una medicina personalizada¹⁶⁵.
- A parte de las células en sí, también se ha visto que los componentes que éstas secretan (conocido como secretoma) son de gran interés, ya que a través de ellos median un

efecto paracrino. Estos productos derivados desde las hUSCs son importantes en la comunicación celular y presentan propiedades proliferativas y angiogénicas¹⁸¹. Además, hay estudios que demuestran que promueven la reparación de tejidos^{182,183}. Entre los productos más estudiados se encuentran los exosomas, los cuales son unas pequeñas vesículas de doble membrana^{183,184}.

- Como es posible extraer el material genético de las hUSCs, se pueden utilizar para encontrar alteraciones genéticas y proceder de esta manera al diagnóstico de la enfermedad¹⁶⁵.
- Por último, se han utilizado con el propósito de realizar terapia génica en diversos ámbitos como patologías neurológicas o de la sangre, enfermedades vasculares y musculoesqueléticas e incluso para remitir el crecimiento tumoral¹⁸⁵. Entre las posibles técnicas aplicables, se encuentra la reconocida CRISPR/Cas9, que ya se ha aplicado en alguna investigación¹⁸⁶.

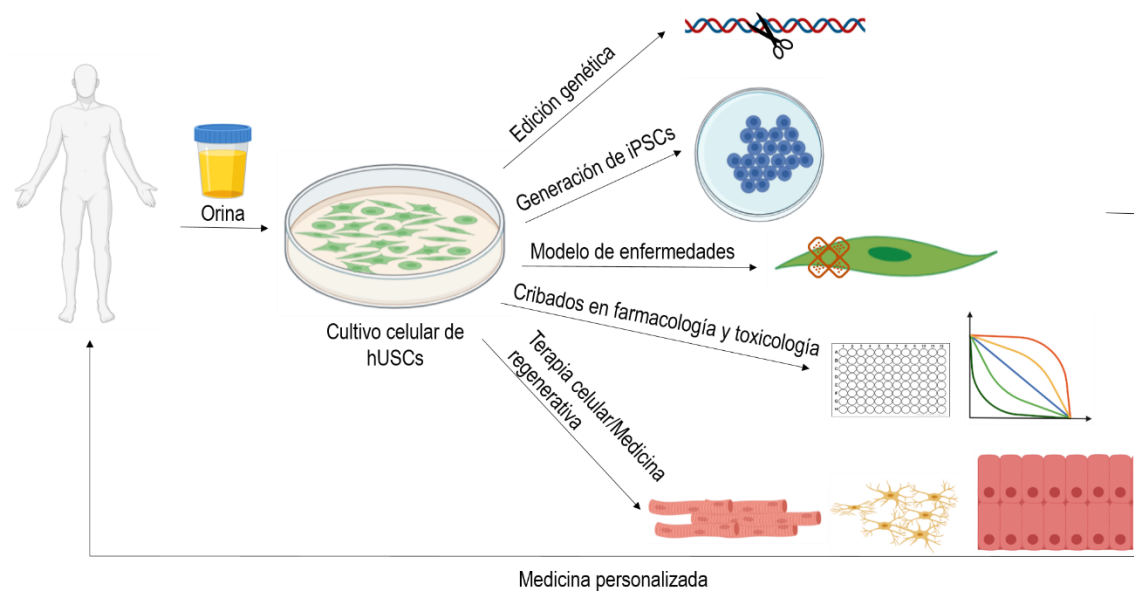


Figura 1.5. Aplicaciones de las hUSCs. A través de esta imagen se esquematizan las diferentes aplicaciones que pueden tener las hUSCs después de su cultivo a partir de la orina.

5. TERAPIA GÉNICA

La terapia génica se define como el proceso por el cual se incorpora un material genético exógeno en una célula, un tejido o incluso en un órgano completo para modificar o controlar la expresión de las proteínas. El objetivo de la terapia génica es curar una enfermedad o mejorar el estado clínico de un paciente^{187,188}. Según la Agencia Europea del Medicamento (EMA, www.ema.europa.eu), la terapia génica incluye aquellos productos médicos biológicos que cumplen dos criterios:

1. El principio activo contiene o consiste en un ácido nucleico que se aplica a los seres humanos con el fin de regular, reparar, sustituir o eliminar una secuencia genética.
2. El efecto beneficioso es consecuencia directa de la secuencia del ácido nucleico recombinante o de la expresión de la misma.

Por todo ello, en los últimos tiempos está recibiendo una atención especial por parte de los grupos de investigación¹⁸⁹. Los ácidos nucleicos se están convirtiendo en una herramienta esencial para ser utilizados como elemento terapéutico^{188,190}.

Los vectores virales son los más utilizados para transferir material genético dentro de las células, siendo entre ellos los más usados los virus adenoasociados (AAV), que ya se han utilizado de manera satisfactoria en diferentes ensayos clínicos¹⁹¹. La mayor ventaja que presentan es su alta tasa de transfección debido a su habilidad natural de introducir material genético en las células^{192,193}. Sin embargo, se ha visto que los vectores virales presentan problemas de carcinogénesis¹⁹⁴ e inmunogenicidad¹⁹⁵, el tamaño del material genético que pueden transportar es limitado¹⁹³ y su producción es tediosa y cara¹⁹⁶. Por lo tanto, queda claro que los virus son una herramienta importante para introducir material genético en la célula, pero presentan grandes inconvenientes a la hora de trasladarlos a la clínica¹⁸⁸.

5.1. VECTORES NO VIRALES

En los últimos años se han venido utilizando vectores no virales como alternativa a los vectores virales. En comparación, los primeros son más fáciles y más económicos de fabricar, y a su vez tienen la ventaja de poder transportar material genético de tamaño presumiblemente ilimitado. Además, son más seguros ya que no generan respuesta inmune^{197,198}. En contrapartida, no tienen una gran tasa de transfección y el tiempo de expresión del material genético exógeno es breve^{188,199}. Entre los vectores no virales, los más estudiados y utilizados son las nanopartículas lipídicas, por su capacidad de proteger el material a transportar y su elevada tasa de eficiencia a la hora de transportar el material genético al interior celular²⁰⁰. Además, mediante estos vectores lipídicos se mejora la farmacocinética de los agentes

terapéuticos y su biodistribución. También se aumenta el potencial terapéutico, ya que prolongan la retención del fármaco en el interior celular o en el torrente sanguíneo²⁰¹. Dentro de las nanopartículas lipídicas, las más usadas para la transfección de ácidos nucleicos son los liposomas, los cuales están constituidos por una gran variedad de fosfolípidos¹⁹⁰. Algunas de las utilidades que se les ha asignado, es su uso para el transporte de moléculas en la industria farmacéutica y la cosmética²⁰². Entre los aspectos positivos de los liposomas, se encuentra el hecho de que reducen la toxicidad del agente que encapsulan, son biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y no producen reacciones inmunológicas adversas. Por el contrario, no son muy solubles en disoluciones acuosas, no son muy estables y por lo tanto tienen una vida media corta y el coste de su producción es alto²⁰². Uno de los liposomas que más se ha utilizado para ensayos *in vitro* de modificación génica es el comercializado como LipofectaminaTM, ya que ha demostrado tener una alta tasa de transfección²⁰³. Actualmente, debido a las ventajas que presentan frente a los liposomas, hay un nuevo tipo de vector lipídico que está adquiriendo gran popularidad y se está utilizando en numerosos ensayos para vehicular ácidos nucleicos: los niosomas.

5.1.1. NIOSOMAS

Los niosomas son unas vesículas lipídicas bicapa y esféricas que se pueden utilizar como alternativa a los liposomas²⁰⁴. Debido a su estructura, pueden transportar materiales tanto hidrofílicos como lipofílicos²⁰¹. En los niosomas se han sustituido los fosfolípidos que componen los liposomas por surfactantes no iónicos^{205,206}, pero las propiedades tanto estructurales como físicas son parecidas entre ambos²⁰⁰. En comparación con los liposomas, los niosomas son menos tóxicos para la célula, su producción es más sencilla y económica, su manejo es más seguro y además son químicamente más estables, por lo que se pueden almacenar durante largos periodos de tiempo sin que su efectividad se vea afectada^{200,207}. A esto se le suma el hecho de que los niosomas son nanomateriales, es decir, se encuentran en la escala nanométrica, como también ocurre con los liposomas. Al reducir un vector a ese tamaño, se mejora la farmacocinética y la biodistribución de los agentes terapéuticos. De esta manera también se facilita su liberación al interior celular²⁰¹.

Cuando el objetivo es introducir material genético a la célula (para revertir una mutación, silenciar un gen, ...), los niosomas se pueden elaborar con lípidos catiónicos, para que con simples interacciones electrostáticas el ácido nucleico se una a la vesícula²⁰⁸. A este tipo de formulaciones se les denomina niosomas catiónicos y están atrayendo una gran atención por parte de la comunidad científica. Principalmente constan de tres componentes (**Figura 1.6**):

1. Surfactantes no iónicos: son los componentes básicos del niosoma, ya que son los que le confieren estabilidad y previenen la agregación de las partículas^{201,209}. Los surfactantes son moléculas anfifílicas, es decir, tienen un grupo hidrófilo (grupo polar) que es soluble en agua y un grupo hidrófobo (grupo apolar) que es soluble en fases orgánicas. En el caso concreto de los surfactantes no iónicos, el grupo polar no tiene ningún tipo de carga²⁰¹. Para conseguir una estabilidad termodinámica, la bicapa se pliega como una membrana continua, consiguiendo así la estructura esférica²⁰⁵. Un ejemplo de los surfactantes no iónicos son los polisorbatos, también denominados Tween®.
2. Lípidos conocidos como *helper lipids*: son los encargados de mejorar las propiedades físico-químicas de la emulsión lipídica, ya que pueden modificar la morfología, permeabilidad, fluidez, tiempo de almacenamiento y estabilidad del niosoma. De esta manera también mejora su actividad biológica. Los más utilizados son el colesterol o el escualeno^{201,210}.
3. Lípidos catiónicos: estos componentes son los que permiten la interacción electrostática entre el ácido nucleico negativamente cargado y el niosoma, para formar de esta manera los nioplexos. Además, las propiedades de los lípidos catiónicos influyen en la eficiencia de transfección y la toxicidad de la formulación^{201,208}. El hecho de que los niosomas presenten carga también ayuda a que haya repulsión electrostática entre ellos y por lo tanto se evita la agregación de partículas. Se ha descrito que potenciales zeta (ζ) superiores a $|30|$ mV son necesarios para conseguir una estabilidad electrostática²⁰⁰. Algunos lípidos catiónicos conocidos son el 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA) o el *N*-[1-(2,3-Dioleoiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamonio metilsulfato (DOTAP), con los cuales trabaja y tiene experiencia nuestro grupo de investigación.

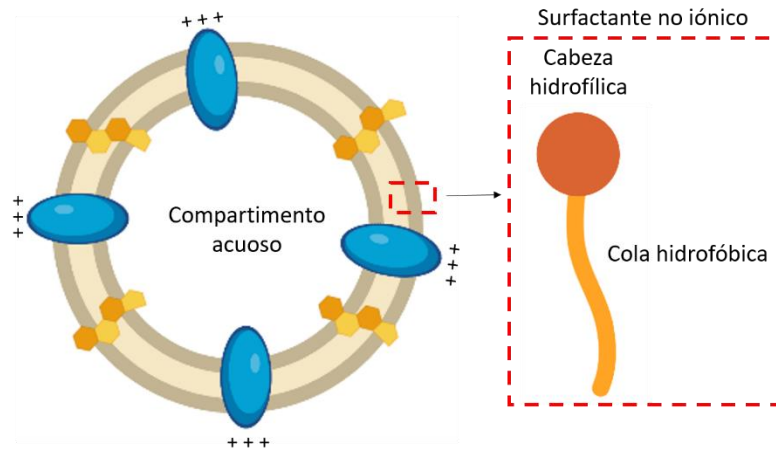
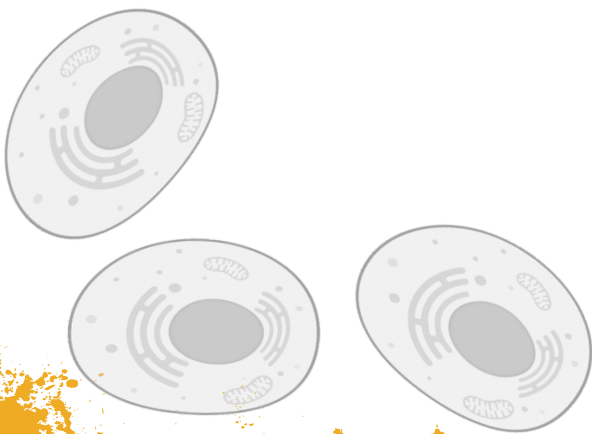


Figura 1.6. Esquema general de un niosoma. Se representa de manera gráfica la estructura general de un niosoma, en la que se aprecia una bicapa formada por los surfactantes no iónicos. Debido a la disposición de los mismos, en el niosoma se generan un compartimento acuoso en el interior y una zona hidrófoba entre las dos capas. Las figuras amarillas/naranjas que atraviesan la membrana hacen referencia a los *helper lipid* y los cilindros azules a los lípidos catiónicos. El símbolo "+" representa la carga positiva que le confiere el lípido catiónico al niosoma. También se muestra de manera simple la estructura de un surfactante no iónico, el cual está compuesto por una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica.

A pesar de que esos son los componentes generales, se pueden añadir otros tipos de compuestos, según la finalidad para la que sea elaborada la formulación. La cantidad relativa de los diferentes componentes se ajusta durante el proceso de elaboración de los niosomas¹⁹⁰.



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

Desde la descripción en 1942 del pseudohipoparatiroidismo (PHP), se han hecho grandes avances en la investigación de esta enfermedad, permitiendo la identificación de los diferentes subtipos de PHP y enfermedades relacionadas, así como del mecanismo fisiopatológico subyacente: alteraciones moleculares en los genes de la vía de señalización de PTH/PTHrP. En 2016, el consorcio EuroPHP propuso una nueva clasificación para estas enfermedades basada en las manifestaciones clínicas e integrando los hallazgos moleculares: enfermedades por alteraciones inactivantes en la vía de señalización de PTH/PTHrP (iPPSD). En alrededor del 10-20% de pacientes con estas características aún no se ha identificado la causa genética. Por tanto, pueden existir nuevas variantes o nuevos genes causantes de patologías relacionadas con la cascada de PTH/PTHrP.

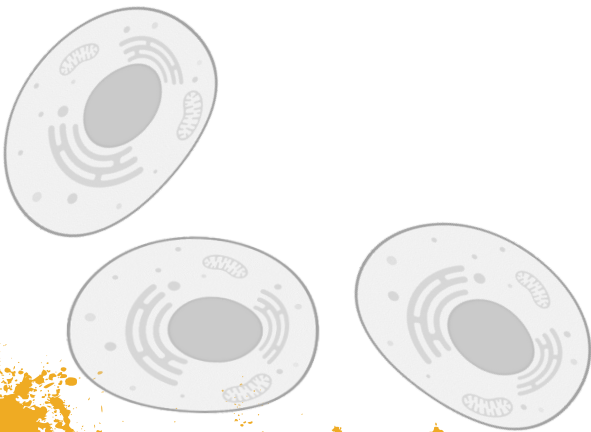
Las células madre mesenquimales, diferenciables a osteocitos, condrocitos y adipocitos, y concretamente las derivadas de orina, de fácil acceso, pueden emplearse como modelo celular para validar variantes posiblemente patogénicas o de significado incierto identificadas en genes candidatos.

La terapia génica puede ser aplicable al tratamiento de enfermedades monogénicas siendo los vectores no virales, concretamente los niosomas catiónicos, una forma más segura para vehicular el material genético, aunque hay que mejorar su tasa de transfección.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de este trabajo son los siguientes:

1. En pacientes con sospecha clínica de iPPSD, identificar alteraciones en genes asociados con la cascada de señalización de PTH/PTHrP.
2. En ausencia de alteraciones en genes iPPSD, diseñar y validar una tecnología basada en secuenciación masiva (NGS) para identificar nuevas causas genéticas o genes implicados en estas patologías.
3. Validar la nueva clasificación de iPPSD mediante estudio de correlaciones genotipo-fenotipo.
4. Desarrollar un procedimiento de obtención de células mesenquimales desde orina.
5. Determinar la capacidad de transfección y caracterizar los mecanismos de internalización de los vectores no virales en las células mesenquimales obtenidas.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PACIENTES

Se incluyeron en este proyecto aquellos pacientes con sospecha de iPPSD cuya muestra fue remitida al Laboratorio de (Epi)Genética Molecular del Instituto de Investigación Sanitaria Bioaraba - Hospital Universitario Araba para realización de estudio molecular. Se estudiaron los pacientes recibidos a partir de octubre del año 2017 hasta final del año 2020 y los procedentes de la cohorte del equipo de investigación, anterior a la fecha indicada y que, o bien la causa genética no había sido aún esclarecida o bien presentaban en el gen *GNAS* una mutación *de novo* o de origen desconocida (por falta de muestra parental).

El principal criterio de inclusión en el estudio fue que el paciente cumpliera los criterios de sospecha clínica de iPPSD (descritos por Thiele y colaboradores⁴) según su médico de referencia y/o que presentara braquidactilia bilateral y firmar el consentimiento para ser incluido en el proyecto.

Criterios de exclusión: no cumplir los criterios de inclusión necesarios mencionados anteriormente.

En total se incluyeron 123 familias en el estudio, divididas en tres grupos diferentes:

1. De todas las familias, 19 se englobaban a la cohorte de pacientes con resultado genético negativo, anterior a octubre del año 2017.
2. Los pacientes reclutados a partir de octubre del 2017 corresponden a 75 familias.
3. 40 familias presentaban alteración en *GNAS* de origen no filiado. De ellas, 29 no pertenecen a ninguno de los grupos anteriores (son los pacientes con alteración en *GNAS* de la cohorte histórica) y 11 se englobarían también en el segundo grupo.

El proyecto fue aprobado por el CEIC-E (PI2017018). Los pacientes y sus familiares fueron informados sobre este estudio y firmaron el consentimiento para participar en el mismo.

2. AISLAMIENTO DE LINFOCITOS DESDE SANGRE PERIFÉRICA

Para realizar este procedimiento, es necesario trabajar en unas condiciones y en una zona libres de ribonucleasas (ARNasa). Se partió de 1,5 mL de sangre periférica en acetato y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) obtenida de los pacientes y sus familiares. A ese volumen se le añadieron 7 mL del reactivo EL (Qiagen, Düren, Alemania) y se incubó en hielo durante 15 minutos con agitaciones mecánicas cada dos minutos. Finalizado ese tiempo, se centrifugó a 400 xg durante 10 minutos a 4° C. Se desechó el sobrenadante y al *pellet* se le añadieron 3 mL del tampón EL y se disolvió con agitación mecánica. A continuación, durante 10 minutos se mantuvo la suspensión en hielo, agitando cada dos minutos. Después, se volvió a centrifugar a 400 xg

durante 10 minutos a 4° C. Se volvió a descartar el sobrenadante y el *pellet* se disolvió en 2 mL del *buffer* EL, para posteriormente incubar durante 10 minutos en hielo agitando cada dos minutos y centrifugar a 400 xg durante 10 minutos a 4° C. Esta vez ya se consiguió un *pellet* blanquecino (sin restos de eritrocitos). En esta ocasión, para resuspenderlo se le añadieron 600 µL de una disolución al 1% (v/v) de β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) en *buffer* RLT (Qiagen). Hasta su uso, se almacenaron las suspensiones de linfocitos a -80° C.

3. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Para realizar los estudios moleculares pertinentes, fue necesaria la extracción de los ácidos nucleicos desde las células de los pacientes. El ácido desoxirribonucleico (ADN) se extrajo de sangre periférica, de saliva o de células en cultivo. Para ello, se utilizó el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ácido ribonucleico (ARN) se aisló desde sangre periférica, *pellet* de linfocitos o células en cultivo utilizando QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen). En algún caso también se realizó con PAXgene Blood RNA Kit (Qiagen). En resumen, el proceso trata de romper las membranas plasmática y nuclear para libera el ADN y el ARN al medio, seguido de una purificación de los mismos.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se hizo tanto con el espectrofotómetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Estados Unidos) como con el fluorómetro Qubit 3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

4. ANÁLISIS DE ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE LOS GENES

4.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la PCR consiste en una amplificación enzimática *in vitro* de manera específica y exponencial de los ácidos nucleicos. A partir de una sola o unas pocas copias de ADN finalmente se consiguen entre miles y millones de copias²¹¹. Como en su propio nombre se hace referencia, para la PCR se usa el enzima ADN polimerasa, la cual es capaz de sintetizar una hebra de ADN en sentido 5'→3' complementaria a otra que se utiliza como molde. Además del enzima, para esta reacción también se necesitan el ADN que se va a utilizar como molde, un tampón que va a funcionar como medio de reacción, el Mg²⁺ que la polimerasa utiliza como cofactor, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) que son la materia necesaria para la síntesis del ADN y una pareja de cebadores (también denominados *primers*). Los cebadores son oligonucleótidos que se colocan en los extremos de la secuencia que se quiere amplificar y son complementarios de la misma. El método se basa en ciclos de temperatura, por los cuales el ADN se desnaturaliza,

los cebadores se hibridan y el enzima amplifica. Según la PCR va avanzando, el ADN que se va generando se va utilizando como molde para ciclos posteriores²¹¹.

Se estudiaron tanto los exones como las zonas de corte y empalme de los intrones. En general se amplificaron únicamente exones codificantes, pero en algunos casos también regiones 5' o 3' no traducidas (UTR). A todos los *primers* se les añadió en su extremo 5' la secuencia universal del bacteriófago M13 (**Tabla 3.1**). De esta manera, en el paso de secuenciación se pueden eliminar los cebadores específicos y utilizar únicamente los que se hibridan con M13. Los cebadores (anexos) fueron diseñados manualmente y su calidad fue validada mediante los *software* BLAST^{®212} y Fast PCR by Ruslan Kalendar (Instituto de Biotecnología, Universidad de Helsinki, versión 3.3.67). El programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 95° C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 s de desnaturalización a 95° C, la hibridación de los *primers* a la temperatura específica de cada uno durante 30 s y una elongación a 72° C durante 30 s. Finalmente, se añadió una elongación de 72° C durante 7 min.

Tabla 3.1. Secuencia genética universal del bacteriófago M13. Se muestra la secuencia de ADN perteneciente al bacteriófago M13 y que se une a los extremos de los cebadores de PCR para su posterior uso en la secuenciación, tanto la del sentido *forward* como del *reverse*.

CEBADOR	SECUENCIA (5'→3')
<i>Forward</i>	TGTAAAACGACGGCCAGT
<i>Reverse</i>	CAGGAACACGCTATGACC

Para la comprobación de la correcta amplificación por PCR, los fragmentos se migraron en una electroforesis horizontal a 120 V durante 15 minutos en gel de agarosa D1 baja EEO (Condalab, Madrid, España) al 1,5% con tampón trisaminometano (TRIS), EDTA (TAE, Bio-Rad Laboratories, California, Estados Unidos) 1x y el intercalante RedSafe™ 20.000x (iNtRON Biotechnology, Corea del Sur). Al aplicar una corriente eléctrica, como los ácidos nucleicos poseen carga negativa debido al grupo fosfato, migran hacia el ánodo. En el proceso de electroforesis el RedSafe™ se intercala entre las moléculas de ADN, emitiendo luz fluorescente al ser excitado con luz ultravioleta en el transiluminador ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories).

4.2. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Previo a la reacción de secuenciación, es necesario realizar una limpieza del producto obtenido de la PCR para eliminar los cebadores de hebra sencilla y los dNTPs no incorporados. Para ello, se utilizó el reactivo ExoSAP-IT® (ThermoFisher Scientific), el cual contiene dos enzimas

diferentes. Por un lado, la Exonucleasa I degrada los cebadores sobrantes que han quedado de la PCR. Por otro lado, la fosfatasa alcalina de gamba se encarga de eliminar los dNTP restantes. Para cada una de las muestras se utilizaron 2 μL de ExoSAP-IT® y 5 μL del producto de PCR y se mantuvieron en un termociclador durante 15 min a 37° C para que los enzimas llevaran a cabo la reacción y durante otros 15 min a 85° C para la inactivación de los mismos.

4.3. SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

La secuenciación automática tiene su base en la técnica de terminación de cadena desarrollada por Sanger²¹³. En este proceso aparte de los dNTPs se utilizan también didesoxirribonucleótidos trifosfato (ddNTPs). Estos últimos son análogos de los primeros, pero carecen del grupo 3'-hidroxilo, el cual es necesario para la formación de enlaces fosfodiéster. La ausencia de ese grupo conlleva el fin de la síntesis del ADN cuando un ddNTP es incluido en la hebra. Es importante recalcar que cada uno de los ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP) está marcado con un fluoróforo diferente.

Para la reacción de secuenciación son necesarios los dNTP y ddNTP mencionados anteriormente, el ADN amplificado por PCR y posteriormente purificado, la ADN polimerasa, los *primers* de secuenciación M13 (que se hibridan a la secuencia M13 incluida en los cebadores de la PCR) y el tampón de reacción. Para proceder con esta reacción, se utilizó el sistema BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) siguiendo las indicaciones del fabricante, pero adaptadas a un volumen final de 10 μl . El programa de termociclado consistió en una desnaturalización inicial a 96° C durante 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 10 s de desnaturalización a 96° C, la hibridación de los *primers* a 50° C durante 5 s y una elongación a 60° C durante 75 s.

Después de la reacción de secuenciación, el producto se purificó con una precipitación por etanol/EDTA/acetato de sodio utilizando el protocolo de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, adaptando los volúmenes al volumen final de la secuenciación. Una vez terminada la purificación, los fragmentos se separaron por electroforesis capilar en un analizador genético ABI3500 (Applied Biosystems). La separación de los fragmentos se hizo en capilares de poliacrilamida aplicando voltaje. Según van avanzando por el capilar, los ddNTPs se excitan con un láser y la fluorescencia emitida es recogida por un detector del analizador genético. La velocidad a la que migran los fragmentos es inversamente proporcional a su tamaño y la resolución de separación es de una única base. Los electroferogramas fueron analizados con el *software* Sequencing Analysis (Applied Biosystems, versión 5.4) y las variantes se detectaron con Variant Reporter™ (Applied Biosystems, versión 1.1)

4.4. SECUENCIACIÓN MASIVA (NGS)

Los paneles de diseño propio PHP-like_v1 e iPPSD_v1 permitieron el análisis de secuencias codificantes y transiciones intrón/exón de genes relacionados con la cascada PTH/PTHrP y diagnósticos diferenciales. En total se estudiaron 43 genes (119.748 pb) y 92 genes (189.772 pb) respectivamente (anexos). Para la captura, en el primer caso se hizo utilizando el protocolo Nextera Flex library enrichment (Illumina Inc, San Diego, California, Estados Unidos) y en el segundo con Standard Hybridization and Wash Kit (Twist Bioscience, San Francisco, California, Estados Unidos). Ambos protocolos están basados en fragmentación enzimática y se hicieron siguiendo las instrucciones del fabricante. La secuenciación se hizo en una plataforma MiniSeq Mid o High Output con 2x150 ciclos, 2,4 Gb (Illumina Inc). También se utilizó un panel de diseño propio de un laboratorio externo (INGEMM) sobre displasias esqueléticas. El panel se denominaba SkeletalSeq y se utilizaron varias versiones diferentes: v7, v8, v11 y v12, en los que se estudiaron entre 385 y 480 genes (anexos).

Para el procesamiento de los datos se utilizó la *pipeline* integrada en el MiniSeq, BaseSpace BWA Enrichment (Illumina Inc.), que emplea BWA 0.7.7, para el alineamiento contra el constructo genómico GRCh37/hg19, y GATK Variant Caller v1.6-23 y SAMtools v0.1.19 para la obtención de los archivos VCF (*Variant Call Format*) y bam/bai, respectivamente. El análisis bioinformático posterior de los archivos VCF (anotación, filtración y priorización) y de los archivos bam (para la detección de variaciones en el número de copia (CNV) se realizó con el *software* comercial VarSeq V2.2.1 (Golden Helix, Bozeman, Montana, Estados Unidos). Los parámetros utilizados para filtrar y priorizar las variantes encontradas fueron los siguientes:

- Calidad de la lectura: Q>30 con una lectura media mayor de 50X.
- Frecuencia poblacional: la frecuencia del alelo minoritario tiene que ser menor del 1% en las bases de datos poblacionales ExAC, gnomAD, 1000G o ESP6500.
- Efecto de la variante: *missense*, *nonsense*, *frameshift* o efecto en el *splicing*.
- Predicción de la patogenicidad *in silico*: el valor CADD_1.4 tiene que ser mayor que 14²¹⁴.

Las variantes conseguidas después de aplicar los parámetros mencionados anteriormente se clasificaron en base a los criterios del ACMG⁵.

Además, para la visualización de las regiones de interés en los archivos .bam, se empleó el *software Integrative Genomics Viewer* (IGV, versión 2.4.10) (Broad Institute y Universidad de California, Estados Unidos)²¹⁵.

4.5. HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS *IN SILICO*

Para comprobar si las variantes encontradas habían sido descritas previamente, se utilizaron diferentes bases de datos. Las que se consultaron fueron Ensembl (<https://www.ensembl.org/>), ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) y LOVD (<https://www.lovd.nl/>).

El posible efecto patogénico de las variantes encontradas fue evaluado *in silico* con diferentes *software*. Por un lado, se utilizó el predictor Varsome (<https://varsome.com/>). Ésta es una plataforma que engloba más de 70 bases de datos poblacionales, como lo son gnomAD genomes, SIFT o UniProt Genes entre otros. Además, cuando la mutación se encontró en la zona de *splicing*, el efecto de la misma también fue analizado con la herramienta en línea Human Splice Finder v3.1 (<http://umd.be/Redirect.html>).

5. ESTUDIO DE ALTERACIONES EN LA IMPRONTA

5.1. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MS-MLPA)

La técnica MS-MLPA es utilizada para el estudio simultáneo de la dosis génica y el estado de la metilación de hasta 40 secuencias diferentes de ADN²¹⁶ (MRC-Holland, Amsterdam, Países Bajos). Esta metodología se basa en el principio de la PCR semi cuantitativa²¹⁷. En el ensayo se utilizan una serie de diferentes sondas de oligonucleótidos diseñados por pares. Cada par de sondas está compuesto por diferentes fragmentos:

- Secuencia de hibridación: es la parte de la secuencia que hibrida con el ADN y cada una de las sondas de la pareja queda hibridada junto a la otra. En algunas de las secuencias se encuentran sitios de restricción para el enzima HhaI.
- Secuencia de cebadores: es una secuencia universal y se utiliza para la amplificación de las sondas.
- Secuencia *stuffer*: solamente se encuentra en una de las dos sondas de la pareja. Su finalidad es conseguir un tamaño de amplificado específico para cada una de las parejas.

Para este ensayo se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, el ADN se desnaturalizó y se le añadieron las sondas para que hibridasen. A continuación, se separó la muestra en dos: en la parte utilizada para estudiar el número de copia solo ocurrió una reacción de ligación y en la parte correspondiente al análisis de metilación, aparte de la ligación, se añadió una endonucleasa sensible a metilación, concretamente el enzima HhaI, el cual digiere el ADN que no está metilado²¹⁶. Finalmente se realizó una PCR, en la cual uno de los cebadores estaba marcado fluorescentemente y se sometió el producto amplificado a una electroforesis capilar

con GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) como marcador de talla molecular. Los electroferogramas fueron visualizados con GeneMapper Software 5 (Applied Biosystems) y se normalizaron los datos con una hoja de cálculo Excel realizada por el grupo (MetHUA v1.1) siguiendo las especificaciones de MRC-Holland. El kit utilizado para estudiar el locus *GNAS* fue el ME031 (MRC-Holland).

5.2. ANÁLISIS DE MICROSATÉLITES

Los microsatélites, también denominados *Short Tandem Repeats* (STRs), son secuencias que se encuentran a lo largo del ADN y presentan un alto grado de polimorfismo²¹⁸. Debido a su polidiversidad, son marcadores con una elevada tasa de heterocigosidad. En este proyecto los microsatélites se utilizaron para confirmar las relaciones de parentesco en los casos de alteraciones *de novo* o disomías uniparentales (UPD).

Para el estudio de los STRs, se marcó fluorescentemente uno de los cebadores de la pareja en el extremo 5' (anexos **Tabla VIII**) y se realizó una amplificación por PCR en condiciones estándar, sumando al final un paso a 60° C durante una hora. Por lo tanto, las condiciones de PCR quedarían de la siguiente manera:

- Un paso inicial de desnaturalización a 95° C durante 5 minutos.
- 35 ciclos de: 95° C a 30 s, 55° C a 30 s y 72° C a 30 s.
- Una extensión final durante 7 min a 72° C.
- El paso final de una hora a 60° C.

La ADN polimerasa termoestable utilizada añade por defecto una desoxiadenosina (dATP) al extremo 3' de cada fragmento, y el paso de incubación final a 60° C permitió que el enzima añadiese el nucleótido a todos los productos amplificados. Con esta adición del dATP se evitan los errores en la interpretación del tamaño de los STRs²¹⁹. Finalizado el proceso de amplificación de los microsatélites, se comprobó el resultado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% con tampón TAE 1x. En base a la imagen obtenida con el transiluminador, se decidieron las diluciones necesarias con el objetivo de no saturar la señal de fluorescencia en la electroforesis capilar.

La información específica de cada microsatélite (tamaño, secuencia del cebador para amplificarlo, posición cromosómica) se obtuvo de la literatura o desde buscadores genómicos como Ensembl (<http://www.ensembl.org>) o UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>). La determinación del tamaño de los fragmentos se hizo con el analizador genético ABI3500 y el análisis con

GeneMapper Software 5 empleando como marcador de talla molecular GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard.

6. ALTERACIONES ESTRUCTURALES

6.1. AMPLIFICACIÓN MÚLTIPLE DE SONDAS DEPENDIENTE DE LIGACIÓN (MLPA)

El MLPA es una variante del MS-MLPA, pero en este caso no se estudia el estado de metilación de la muestra, solamente se analiza el número de copia. Se prepararon unos ensayos personalizados, en los que se estudiaron los genes *GDF5*, *IHH* y *PTHLH*. Para el diseño del MLPA se siguieron las recomendaciones del fabricante (MRC-Holland).

6.2. MATRIZ DE HIBRIDACIÓN GENÓMICA COMPARATIVA (aCGH)

Es una técnica utilizada para hacer un cariotipo molecular y sirve para identificar todas las posibles variaciones en el número de copias del genoma en una única hibridación. Para ello, se utilizan fluoróforos diferentes para marcar el ADN de interés y un ADN control y se comparan sus intensidades de fluorescencia²²⁰.

En este caso se subcontrató el servicio y se solicitó la hibridación de un 400K (NIMGenetics, Madrid, España).

6.3. ARRAY DE SNP

Mediante este procedimiento se estudian aproximadamente 300.000 polimorfismos de base única (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) a lo largo del genoma, los cuales son importantes en el desarrollo de diferentes enfermedades. De esta manera, permite detectar variaciones en la secuencia, alteraciones estructurales e isodisomías. Es una tecnología que se basa en microesferas de sílice, las cuales tienen unidas en su superficie diferentes oligonucleótidos para el genotipado de las muestras. Por la complementariedad de bases, el ADN a testar se une a esos oligonucleótidos, hasta la base anterior al SNP. Posteriormente, utilizando nucleótidos marcados fluorescentemente, ocurre una extensión de una sola base. Al ser la muestra expuesta al láser, el nucleótido excitado emitirá una señal. De esta manera, se podrá establecer la proporción entre las diferentes bases.

Para ello se utilizó la tecnología HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip Kit (Illumina Inc). Si bien el procesamiento de la muestra fue subcontratado, el análisis de los datos lo realizamos mediante el *software* BlueFuse Multi (Illumina Inc, versión 4.5).

7. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO PATOGENICO DE LAS VARIANTES IDENTIFICADAS

7.1. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN PARENTAL DE LA VARIANTE

7.1.1. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRAS RETROTRANSCRIPCIÓN (RT-PCR)

La RT-PCR tiene la misma base que una PCR convencional, con la diferencia de que en este caso se utiliza una transcriptasa inversa y el ácido nucleico molde es un ARN mensajero (ARNm). A raíz de utilizar ese molde, el producto que se va a conseguir es un ADN complementario (ADNc), el cual carece de intrones.

Se utilizó para determinar el origen parental de las mutaciones en el gen *GNAS*. Se utilizaron los reactivos de One-Step RT-PCR kit (Qiagen) y One-step NZYSpeedy RT-qPCR Probe kit (NZYTech, Lisboa, Portugal) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se diseñaron manualmente cebadores exónicos específicos (anexos **Tabla IX**). Para amplificar el alelo paterno, se utilizó como *primer forward* un cebador específico del transcrito A/B, mientras que para amplificar el alelo proveniente de la madre se diseñó un cebador para NESP55. Los ciclos utilizados fueron los siguientes:

50° C (30 min); 95° C (15 min); 40x {94° C (1 min); 62° C (1 min); 72° C (1min)}; 72°C (10 min); 4° C (∞)

Para la comprobación del producto amplificado, se realizó como se describe en el apartado 4.2. En algunos casos se sigue el proceso de ExoSAP-IT® y secuenciación Sanger, como se señala en el apartado 4.3. En caso de obtener muy poco producto (determinado como una intensidad baja o nula señal del amplicón en el gel), se realizaron procesos adicionales.

7.1.1.1. PCR anidada

Cuando no se consiguió suficiente producto amplificado, probablemente asociado a la calidad del material genético de origen, fue necesario realizar una segunda PCR sobre la primera, lo que se denomina PCR anidada (*nested PCR*). Básicamente se trata de una PCR convencional en la que se usa como molde el amplificado de una PCR anterior. Los *primers* para esta reacción no fueron los mismos que se utilizaron para la RT-PCR, sino que se utilizaron unos más interiores, es decir, se consiguieron productos más cortos. El programa de temperaturas usado fue el siguiente:

95° C (5 min); 40x {95° C (45 s); 60° C (45 s); 72° C (1 min)}; 72°C (10 min); 4° C (∞)

7.1.1.2. Extracción y purificación del ADNc amplificado desde gel de agarosa

Para aislar el ADNc amplificado desde el gel de agarosa en el que se migró, se utilizó el protocolo QIAquick Gel Extraction® (Qiagen). Gracias a esto, se consiguió extraer y purificar a la vez ácidos nucleicos de máximo 10.000 pb.

7.1.2. RT-PCR ESPECÍFICA DE ALELO

Es una variante de la RT-PCR convencional, diseñada sobre el SNP denominado rs7121 del gen *GNAS*, que se encuentra en el exón 5. En este caso, se diseñan dos opciones de uno de los *primers* de la pareja, el que se unirá sobre la región polimórfica para discernir entre los diferentes alelos posibles del genotipo. En las condiciones adecuadas, el cebador que no se hibrida correctamente debido a la disparidad de bases (*mismatch*) no se amplificará el ADN molde, mientras que el cebador que se une adecuadamente sí que lo hará²²¹. Por lo tanto, la obtención de producto amplificado indica la asociación del genotipo con el alelo correspondiente a esa pareja de cebadores. Para una amplificación más específica, aparte del *mismatch* de la última base en el extremo 3' (la cual es la base polimórfica), en la base anterior se añadió un segundo *mismatch*, igual en las dos parejas de cebadores. Por un lado, se diseñaron dos cebadores *forward* para ese SNP, con el cual se podrían comprobar las mutaciones ocurridas aguas debajo de ese punto. Como cebador *reverse* se utilizó el mismo R13 del apartado 7.1.1. Por otro lado, se diseñaron dos *primer reverse*, con los cuales se estudiaron únicamente las mutaciones en el exón 1 del gen *GNAS*. En este último caso, además, se diseñó un cebador *forward* ubicado en el exón 1, de tal manera que se pudiera obtener información del mayor número de bases posibles (anexos **Tabla X**).

Esta técnica se utilizó para determinar el origen parental de los pacientes con mutaciones *de novo*, en los que se podía acceder a la muestra de los progenitores para ser tipados. Para que el SNP fuera informativo, el paciente tenía que presentar un genotipo heterocigoto, siendo, por lo menos, uno de los progenitores homocigoto. Para asegurar que solo se amplificaba el ADNc, los cebadores fueron diseñados sobre secuencia exónica.

7.1.3. PCR ESPECÍFICA DE ALELO

Este procedimiento se realizó para aquellos pacientes con mutación en el exón 1 del gen *GNAS*. Se usó como alternativa a la técnica descrita en 7.1.2., cuando con ésta no se pudo esclarecer cuál era el alelo mutado debido a que el SNP rs7121 no era informativo.

Tiene la misma base que el apartado anterior, con la diferencia de que en este caso los *primers* se diseñaron sobre los intrones (anexos **Tabla XI**) y por lo tanto en vez de hacer una RT-

PCR se realizó una PCR convencional. Las posiciones del genoma sobre las que se diseñaron los cebadores para ser específicos de alelo, fueron la rs9679845 y la rs6123837.

8. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR A PARTIR DE ORINA

8.1. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR

Para conseguir el cultivo celular y hacer subcultivos o pases, se siguió el protocolo de Chen C-Y et. al¹⁸¹. Una vez aisladas las células, se probaron diferentes medios de congelación y la influencia del medio de cultivo en la estabilidad de los ácidos nucleicos del cultivo. Además, también se comprobaron distintos métodos de mantenimiento y procesamiento de la orina para la obtención de las células. Todo ello se mencionará más adelante.

8.2. CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO CELULAR

8.2.1. ANÁLISIS DE MARCADORES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para analizar los marcadores de superficie se realizó un marcaje fluorescente de las células y una posterior citometría de flujo utilizando el citómetro de flujo CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos). Brevemente, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo y se dejaron en cultivo hasta llegar a una confluencia aproximada del 80%. El día en el que se realizó el experimento se fijaron las células con 200 μ L de paraformaldehído al 4% (PFA, PanReac AppliChem, Barcelona, España) durante 10 minutos. Una vez fijadas, se levantaron con un rascador celular y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 50 μ L de solución de bloqueo, la cual es una disolución de suero bovino fetal (FBS, Gibco-ThermoFisher Scientific) al 5% en tampón fosfato salino 1x (PBS, Gibco-ThermoFisher Scientific). En este punto se incubaron las células durante media hora a temperatura ambiente y sin agitación. Pasado ese tiempo, se añadieron los anticuerpos fluorescentes (**Tabla 3.2**) para que estuvieran a una concentración final de 1/100. Una vez en contacto con los anticuerpos, se dejaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

Una vez finalizado el tiempo de incubación con los anticuerpos, se centrifugaron las células para posteriormente retirar el sobrenadante. De esta manera, se eliminó todo el anticuerpo no unido. Se resuspendió el *pellet* en 200 μ L de PBS para pasar la muestra por el citómetro de flujo. Se utilizaron como controles negativos células que no fueron marcadas fluorescentemente y también los diferentes isotipos para cada uno de los fluoróforos usados en el ensayo (Sigma-Aldrich).

Tabla 3.2. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las células obtenidas a partir de la orina. Se utilizaron marcadores específicos de células mesenquimales y otros marcadores ausentes en ese tipo celular. Todos los anticuerpos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich. Se especifican los fluoróforos con los que se marcaron los diferentes anticuerpos. APC: alofocianina, PE: ficoeritrina, FITC: isotiocianato de fluoresceína.

MARCADOR DE SUPERFICIE	FLUORÓFORO
ESPECÍFICOS DE MESENQUIMALES	
CD73	Alexa Fluor 488
CD90	APC
CD105	PE
NO MESENQUIMALES	
CD14	FITC
CD34	APC
CD45	PE

Durante el proceso se utilizaron diferentes tipos celulares:

- Las células de interés obtenidas a partir de la orina, tanto a países bajos como a países altos, con el fin de controlar si el marcaje cambiaba.
- Células madre mesenquimales comerciales, las cuales al ser obtenidas desde una casa comercial habían pasado todos los exámenes de calidad, incluida la caracterización.
- Células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293), las cuales, al ser epiteliales, pudieron ser utilizadas como control negativo en las condiciones probadas.

Los resultados fueron analizados con el *software* CytExpert versión 2.3.0.84 (Beckman Coulter).

8.2.2. DIFERENCIACIÓN HACIA LÍNEA OSTEOGÉNICA

Se sembraron $7,5 \times 10^3$ células/cm² en tres pocillos de una placa de 12 pocillos. Se cultivaron en medio de crecimiento durante dos días hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 80%. A continuación, se reemplazó el medio de expansión por el medio de diferenciación osteogénica, StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco-ThermoFisher Scientific). La inducción osteogénica se mantuvo durante tres semanas siguiendo las instrucciones del fabricante. Como control negativo se utilizaron células cultivada con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 2 mM de L-glutamina y bajo en glucosa (Gibco-ThermoFisher Scientific), suplementado con 10% de FBS.

Después de tres semanas de cultivo en el medio de diferenciación hacia osteocitos, se evaluó la mineralización de la matriz utilizando la Tinción Alizarin Red para depósitos de calcio. En primer lugar, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. A continuación, las células se fijaron con 700 μ L de PFA durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con agua destilada y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con 450 μ L de 2% Alizarin Red S (Merck KGAA, Darmstadt, Alemania). Después, las células se lavaron una vez con PBS y dos con agua destilada. Las imágenes se tomaron utilizando un microscopio invertido NIKON Eclipse TS 100 (Nikon, Tokio, Japón) equipado con una cámara ICD-879P (Ikegami, Tokio, Japón).

Para cuantificar el contenido relativo de calcio, en primer lugar, se retiró el agua completamente, dejando secar bien la placa de cultivo. A continuación, se congeló la misma durante 20 minutos. Seguidamente se disolvieron las regiones mineralizadas con 450 μ L ácido acético (PanReac AppliChem) al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió cada muestra a un tubo de 1,5 mL. Después de agitar las muestras mecánicamente durante 30 segundos, se calentaron a 85° C durante 10 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se dejaron en hielo por 5 minutos. Seguidamente se centrifugaron los tubos a 15.000 rpm durante 20 minutos y los sobrenadantes se pasaron a tubos nuevos. Para neutralizar el ácido se añadieron 450 μ L de hidróxido de amonio (PanReac AppliChem) al 10%. Finalmente se midió la absorbancia de la muestra a 405 nm. Las medidas se hicieron por triplicado.

8.2.3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL (EPI)GENÉTICO DE LAS CÉLULAS

Como los cultivos celulares se mantienen en unas condiciones no fisiológicas, fue necesario controlar que tanto el medio de cultivo como los pasos no afectaran a la secuencia de los ácidos nucleicos ni al mantenimiento de la impronta. Para ello, se extrajeron tanto el ADN como el ARN. Posteriormente se realizó un MS-MLPA para la comprobación del estado de metilación de diferentes locus a lo largo del genoma y el número de copias. También se amplificaron el ADN y el ARN y se secuenciaron. Con esto se podría demostrar que los ácidos nucleicos conseguidos eran de buena calidad.

8.2.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRIOPRESERVACIÓN

Tal y como está descrito en la bibliografía, hay diferentes métodos de criopreservación de los cultivos celulares, pero lo más habitual es utilizar algún agente crioprotector, como lo es el dimetilsulfóxido (DMSO), junto con el medio de cultivo²²².

En esta investigación se probaron dos métodos diferentes. En uno se usó DMSO al 5% (v/v) y en el otro DMSO al 10% (v/v). Las células se mantuvieron congeladas a -80°C durante dos semanas y pasado ese tiempo se volvieron a cultivar. Para comprobar el efecto de la congelación en las condiciones anteriormente mencionadas, se descongelaron las células y tras cultivarlas se calculó cuantas células se consiguieron y se estudió su viabilidad, utilizando el reactivo Trypan Blue 0,4% 0,85% NaCl (Lonza Group, Basilea, Suiza) y el contador celular automático TC20™ (Bio-Rad Laboratories).

8.2.5. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

Con el fin de comprobar hasta qué punto se pueden obtener células desde la orina, se intentó aislar el cultivo en diferentes momentos desde la toma de la muestra. Después de la recogida de la muestra, se probó a aislar células a 1 hora, 3 horas y 24 horas. En primer lugar, como control, en el mismo momento de la toma, a partir de 50 mL de orina se realizó el aislamiento de células con el protocolo normal (véase el apartado 8.1.). Posteriormente, por cada uno de los tiempos a testar, se centrifugaron 50 mL de orina (primer paso del protocolo del apartado 8.1.), el *pellet* se resuspendió en 10 mL de PBS y a continuación se conservó a 4°C . A esa temperatura se mantuvieron también 50 mL de orina por cada uno de los tiempos. Seguidamente, en cada tiempo establecido se sembraron las células del tubo con PBS y del tubo que contenía orina (**Figura 3.1**). Para comprobar si se obtenían células, el cultivo se observaba periódicamente con el visualizador ZOE Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad Laboratories). Además, dos semanas después se hizo el conteo celular y se analizó la viabilidad con el contador celular automático TC20™. En el momento que se contaron las células obtenidas en todas las condiciones, por cada una de ellas se sembraron 2×10^5 células en sendos *flask* de cultivo de 25 cm^2 (Corning, Nueva York, Estados Unidos). Una semana después de la siembra, se volvió a contar y medir la viabilidad celular, con el objetivo de concluir si en todos los tiempos se conseguía un número parecido de células.

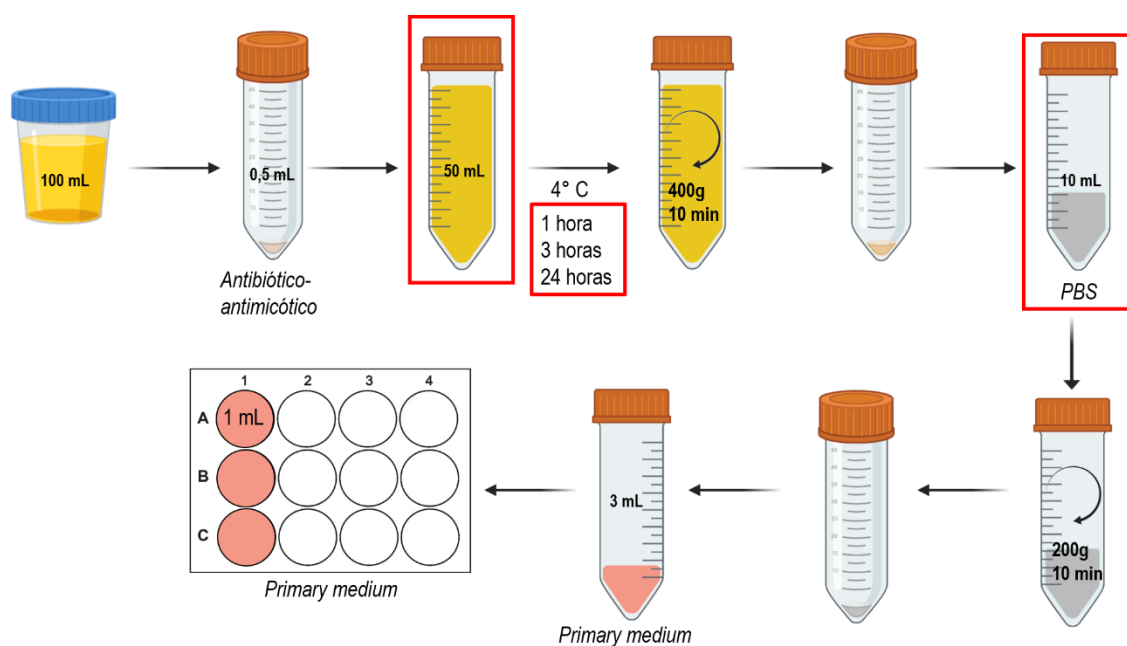


Figura 3.1. Prueba de la estabilidad de las células en la muestra. Se representa de manera gráfica del proceso seguido para establecer cuánto tiempo permaneces las hUSCs en la muestra para poder proceder su cultivo.

9. REPLICACIÓN DEL PLÁSMIDO

El plásmido de la proteína verde fluorescente mejorada (pCMS-EGFP, 5541 pb) se obtuvo de Plasmid Factory (Bielefeld, Alemania). Se replicó utilizando la cepa *Escherichia coli* DH5- α y se purificó con Qiagen Endotoxin-free Plasmid Purification Maxi Prep Kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para calcular la concentración del producto obtenido, se cuantificó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (ThermoFisher Scientific).

10. FORMULACIÓN DE LOS NIOSOMAS CATIONICOS

Para poder elegir la formulación más idónea para los ensayos de transfección en las hUSCs, se hizo un cribado previo con diferentes formulaciones. Para ello, se sintetizaron cuatro distintas que previamente habían dado buen resultado en el laboratorio^{223,224}. Los niosomas se elaboraron mediante la técnica de evaporación en fase reversa. En el proceso de elaboración se utilizaron una fase acuosa y una fase orgánica, cuyos componentes vienen resumidos en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Composición de las diferentes fases de la mezcla de niosomas catiónicos. Se resumen los reactivos y sus concentraciones y volúmenes utilizados en cada una de las fases usadas en la síntesis de los niosomas catiónicos.

DENOMINACIÓN DE LA FORMULACIÓN (NIOSOMA CATIÓNICO)	FASE ACUOSA	FASE ORGÁNICA
GPxT-CQ	2,5 mg (0,05% masa/volumen) de cloroquina difosfato (Sigma-Aldrich) disuelto en agua milliQ.	5 mg (0,1 % masa/volumen) del lípido catiónico conocido como Gly-2, 12,5 mg (0,25 % masa/volumen) de Poloxamer® 407 (Sigma-Aldrich) y 12,5 mg (0,25% masa/volumen) polisorbato 80 (Sigma-Aldrich). Todo ello disuelto en 1 mL de diclorometano (DCM, PanReac).
DLT60	5 mL de agua milliQ.	5 mg de DOTMA (Avanti, Alabama, Estados Unidos), 26 mg de polisorbato 60 (Sigma-Aldrich) y 1 mg de Licopeno-L (Sigma-Aldrich), todo ello disuelto en 1 mL de DCM.
DST20	5 mL (0,49% masa/volumen) polisorbato 20 (Sigma-Aldrich) en agua.	6,7 mg de DOTMA y 19 µL de escualeno (Sigma-Aldrich) disueltos en 1 mL de DCM.
N4	25 mg de polisorbato 80 disueltos en 50 mL de agua milliQ.	5 mg del lípido catiónico denominada Gly-2 y 20 µL de escualeno disueltos en 1 mL de DCM.

Una vez preparadas cada una de las fases, la acuosa se añadió sobre la orgánica y la emulsión obtenida se sonicó durante 30 segundos a 50 W utilizando un sonicador Branson Sonifier 250®, (Danbury, Connecticut, Estados Unidos). A continuación, se evaporó el disolvente orgánico bajo agitación magnética durante 45 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, los niosomas catiónicos quedaron disueltos en un medio acuoso. El resultado de los niosomas catiónicos fue una disolución a una concentración de 1 mg lípido catiónico/mL.

A los niosomas acomplejados con el ADN se les denomina nioplexos¹⁹². Para generar estos nioplexos, se mezclaron los volúmenes adecuados de la solución *stock* del plásmido pCMS-EGFP (que se encontraba a una concentración de 0,5 mg/mL) y la suspensión del niosoma (con una concentración de 1 mg/mL). Utilizando diferentes volúmenes de la suspensión del niosoma se consiguieron distintos ratios de niosoma/ADN (masa/masa). Para mejorar la interacción electrostática entre el niosoma catiónico y el ADN con carga negativa, la mezcla se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente.

11. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS CATIÓNICOS

Para asegurarse de que tanto los niosomas como los nioplexos elaborados tenían las características físico-químicas adecuadas para los experimentos posteriores, fue necesario realizar una caracterización físico-química de los mismos.

En primer lugar, se determinó el tamaño de partícula y su índice de polidispersión (PDI), el cual hace referencia a la homogeneidad del tamaño de partícula de la muestra. La técnica utilizada para ello fue la dispersión dinámica de luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*). El tamaño de partícula se determinó mediante análisis acumulativo del diámetro hidrodinámico registrado. También se calculó el potencial zeta de las partículas, utilizando la velocimetría por láser Doppler (LDV, *Laser Doppler Velocimetry*).

Para todas las medidas, se dispersaron 50 µL de la muestra en 950 µL de una solución de 0,1 mM NaCl. Todas las medidas se hicieron por triplicado usando el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido).

La morfología de los niosomas fue determinada por microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission Electron Microscopy*). Para realizar la tinción negativa, se adhirieron 5 µL de la muestra durante 90 s en rejillas recubiertas con carbón. Después, se fijó durante otros 90 s con una gota de acetato de uranilo al 1%. Las muestras se observaron en TEM, JEOL JEM 1400-Plus (JEOL Ltd. Akishima, Tokio, Japón), en campo claro y utilizando un voltaje de aceleración de 120 kV.

12. EXPERIMENTOS DE TRANSFECCIÓN, INTERNALIZACIÓN Y TRÁFICO CELULAR

12.1. TRANSFECCIÓN CELULAR

Con los experimentos de transfección se consigue ver cuántas células han producido la proteína codificada en el plásmido vehiculizado por el niosoma y cuánta proteína ha expresado cada célula.

Las células hUSCs se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo y 300 μ L de medio completo sin antibióticos. 24 horas después de la siembra, cuando las células estaban a una confluencia aproximada del 70-80%, se retiró el medio y se hizo un lavado de las células con medio sin suero Opti-MEM[®] (Gibco-ThermoFisher Scientific). A continuación, se les añadió a las células 250 μ L de la solución de los nioplexos (1,25 μ g ADN) en los ratios niosoma/ADN deseados. Para elaborar las diluciones de los nioplexos también se utilizó Opti-MEM[®]. Una vez en contacto con la disolución de nioplexos, se incubaron las células durante 4 horas a 37° C. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio con los nioplexos y directamente se añadieron 250 μ L de medio completo sin antibióticos. En este punto, se incubaron las células por 48 horas. Finalizado el tiempo, se determinó la eficiencia de transfección cualitativa y cuantitativamente.

Por un lado, el análisis cualitativo se realizó utilizando un microscopio invertido equipado con el accesorio EclipseTE2000-S (Nikon) para visualizar fluorescencia. Por otro lado, la determinación cuantitativa se hizo con el citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, California, Estados Unidos).

Para el estudio de la viabilidad celular por citometría de flujo, las células se tiñeron con propidio de yodo (Sigma-Aldrich). El detector FL₁ (530/30) se utilizó para detectar las células transfectadas que expresaban EGFP y el FL₃ (670) se usó para detectar las células muertas o en proceso de muerte. Como control negativo del ensayo se utilizaron células sin transfectar, mientras que como control positivo se usó la Lipofectamina[™] 2000 (Invitrogen, California, Estados Unidos). Como mínimo, se recogieron y analizaron 10.000 eventos dentro de la población celular de interés, todo ello con el *software* BD CellQuest[™] Pro (Becton Dickinson Biosciences). Con el fin de tener robustez estadística, cada condición se analizó por triplicado.

12.2. CAPTACIÓN CELULAR

Para los ensayos de captación se utilizó un plásmido pCMS-EGFP marcado con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, DareBio, Madrid, España). Gracias a que el

plásmido va marcado fluorescentemente, se puede hacer un seguimiento y comprobar si entra a la célula o no.

En este experimento las células se transfectaron tal y como se ha explicado en el apartado anterior, con la diferencia del plásmido utilizado. Después de las 4 horas de incubación con los vectores a 37° C, el medio se retiró y las células se lavaron con PBS, se despegaron de la placa y se analizaron con el citómetro de flujo FACSCalibur utilizando el canal FL₁. Para cada una de las muestras se analizaron 10.000 eventos. Como control negativo se utilizaron células sin transfectar. Cada una de las condiciones se midió por triplicado.

12.3. TRÁFICO CELULAR

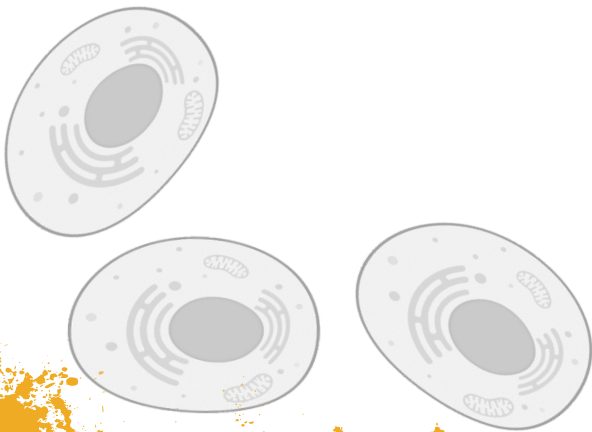
Una vez comprobado si las células internalizaban el vector, se estudiaron las diferentes vías de entrada a la célula y concluir por cuál de ellas entra nuestro nioplex de interés.

Los mecanismos de endocitosis implicados en la captación de las vesículas fueron evaluados por la colocalización entre los nioplexos (preparados con FITC-pCMS-EGFP) y diferentes marcadores endocíticos fluorescentes, todos ellos obtenidos de Invitrogen (Invitrogen). Las hUSC se sembraron en cubreobjetos en placas de 24 pocillos a una densidad de 80.0000 células por cada uno de los cubreobjetos. De esta manera, las células se transfectaron con los nioplexos que contenían el plásmido marcado con FITC durante 3 horas. Acabo ese tiempo, se añadieron al medio los diferentes marcadores de las vías de entrada y se incubaron las células durante una hora más. Los marcadores utilizados se detallan en la **Tabla 3.4**.

Tabla 3.4. Marcadores usados para ver las vías de internalización celular. Se resumen los distintos marcadores fluorescentes utilizados en el ensayo de tráfico y se detalla tanto la concentración final en cada pocillo como la vía de entrada para la que se utiliza.

FLUORÓFORO	VÍA DE ENTRADA QUE MARCA	CONCENTRACIÓN FINAL EN EL POCILLO
<i>AlexaFluor® 594-Cholera Toxin</i>	Endocitosis mediada por clatrin (CME)	10 µg/mL
<i>AlexaFluor® 568-Transferrin</i>	Endocitosis mediada por balsas de caveolas (CvME)	50 µg/mL
<i>AlexaFluor® 568-Dextran</i>	Macropinocitosis	8,33 µM
<i>Lysotracker</i>	Compartimento endosomal tardío	140 nM

Transcurrido el tiempo total de incubación, las células se fijaron con PFA al 4%. Para poder observar las muestras por microscopio, se montaron sobre portaobjetos utilizando Fluoroshield™ con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAP, Sigma-Aldrich). Las muestras se visualizaron mediante microscopía confocal utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un sistema de iluminación estructurada Apotome 2 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). En las imágenes obtenidas, la colocación de los nioplexos (señal verde) y la vía de entrada (señal roja) se representó como señal amarilla. El análisis de dichas imágenes se realizó con el *software* Fiji ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos, versión 1.52p). El estudio de las imágenes se realizó con la función de correlación cruzada (CCF). Esta función trata de desplazar la imagen roja sobre la verde en distancias cortas en la dirección x y calculando el coeficiente de Pearson, el cual se representa como la función de δx . Si originalmente las fluorescencias roja y verde colocan, la señal CCF disminuiría al desplazar las imágenes una respecto al a otra.



4. RESULTADOS

1. (EPI)GENÉTICA DE LOS PACIENTES

Se realizaron los estudios (epi)genéticos sobre los pacientes índice de cada familia. En caso de encontrar alguna variante, se hicieron estudios de cosegregación tanto para establecer el origen *de novo* o heredado como para confirmar la patogenicidad de las mismas en caso de las variantes novel. Con este fin también se llevaron a cabo estudios *in silico*.

En total, se estudiaron tres grupos diferentes de pacientes. Por un lado, había familias pertenecientes a una cohorte histórica, anterior a octubre del año 2017, en las cuales no se había identificado ninguna alteración genética en los genes asociados a iPPSD. Por otro lado, se trabajó desde cero con los pacientes recibidos a partir de octubre del 2017. Finalmente, en el último grupo se incluyeron las familias de toda la cohorte que presentaron alteración en el gen *GNAS* *de novo* o de origen parental desconocido. En la **Figura 4.1** se muestran las cohortes estudiadas y los resultados obtenidos, que se irán desglosando a lo largo de los siguientes apartados.

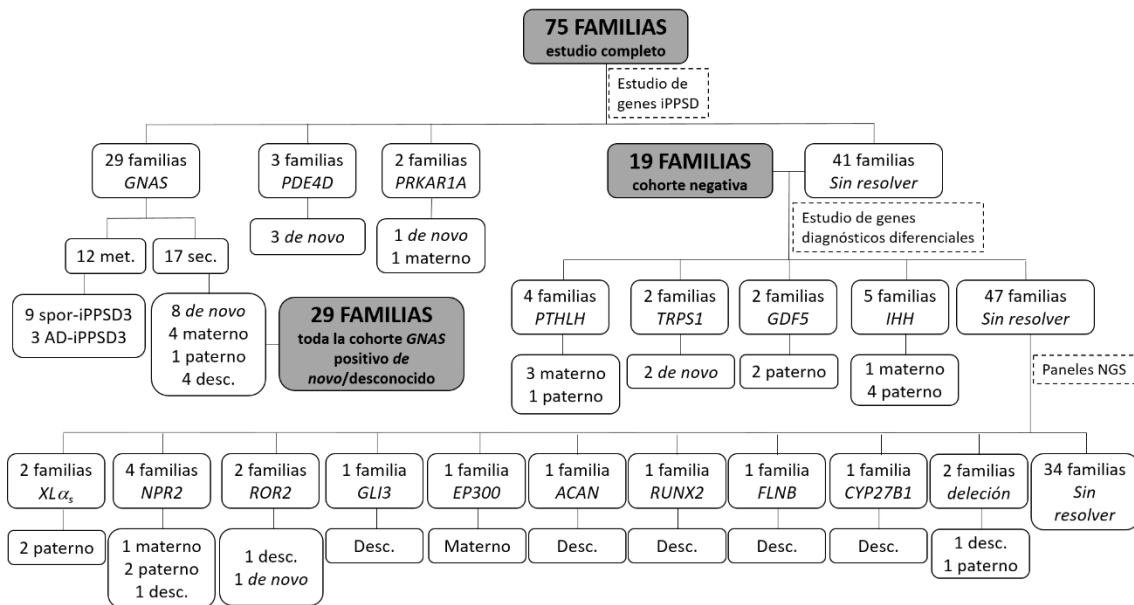


Figura 4.1. Cohortes estudiadas y resultados obtenidos. Se presentan las tres cohortes estudiadas a lo largo de la investigación y los resultados obtenidos después de realizar los ensayos pertinentes. También se indica el origen parental de las variantes encontradas. Los nombres en cursiva hacen referencia a los genes en los que se han encontrado las alteraciones: met: alteración en la metilación, sec: alteraciones en la secuencia, desc: origen parental desconocido. Las dos deleciones encontradas a partir de los paneles de NGS incluyen varios genes, una del cromosoma 1 (*HFE2*, *TXNIP*, *POLR3GL*, *RBM8A*, *PEX11B*, *ITGA10*, *PIAS3*, *POLR3C*, *CD160*, *PDZK1*, *GPR89A*) y otra del cromosoma 5 (*NIPBL*, *CPLANE1*).

1.1. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN LA SECUENCIA DE LOS GENES

En primer lugar, se estudiaron mediante secuenciación Sanger los genes asociados a iPPSD2, iPPSD4 e iPPSD5. De los 75 pacientes analizados, en 17 de ellos se encontraron alteraciones en el gen *GNAS* (**Figura 4.1**). De todas estas variantes encontradas, ocho presentaban un origen *de*

novo, cuatro fueron heredadas de la madre, una del padre y en cuatro no pudo establecerse el origen parental (por falta de muestra de uno o ambos progenitores). Respecto al tipo de mutación, tres correspondían a grandes deleciones que incluían, al menos, el gen *GNAS* en uno de los pacientes y en los otros dos el locus *GNAS* completo; dos pertenecían a variantes en el *splicing*; cinco implicaban alteraciones en la pauta de lectura (*frameshift*), cinco eran *missense* y dos *nonsense*. Sin tener en cuenta las grandes deleciones, se identificaron trece variantes diferentes. De ellas, cinco ya habían sido previamente descritas, y ocho se clasificaron como variantes noveles. (Figura 4.2 y Tabla 4.1). De las ocho variantes noveles encontradas, cinco generaban proteína truncada (dos de herencia desconocida, una de herencia materna y dos *de novo*). Al utilizar los predictores de patogenicidad, todas ellas se clasificaban como patogénicas, principalmente por cumplir dos criterios: (i) producir una proteína truncada en un gen en el que se conoce que la pérdida de función es causa de enfermedad, y (ii) no se encuentran en la base de datos gnomAD. Respecto a las alteraciones *missense*, las tres (dos de herencia materna y una *de novo*) se clasificaron como probablemente patogénicas. Todas ellas cumplían los siguientes criterios: (i) encontrarse en un sitio funcional crítico en el que no se han encontrado variantes benignas, (ii) no se encuentran en la base de datos gnomAD, (iii) ser alteraciones *missense* en un gen que tiene una tasa baja de variantes *missense* benignas y las cuales son un mecanismo común que genera enfermedad y (iv) diferentes líneas computacionales apoyan un efecto nocivo.

En los estudios de cosegregación, pudo encontrarse la variante en dos de las madres que eran enfermas. La madre de la paciente PHP1242 tenía braquidactilia y osificaciones subcutáneas en extremidades. Por su parte, la madre de la PHP1267 presentaba talla baja e hipotiroidismo autoinmune. Sin embargo, la madre de la paciente PHP1283 también tenía la variante y había sido reportada como sana.

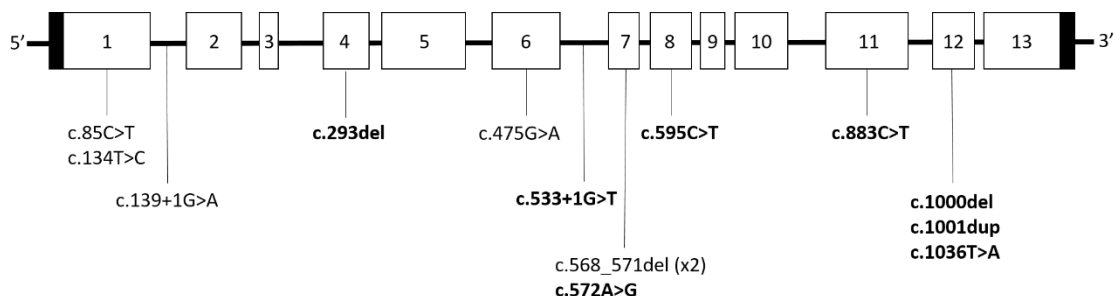


Figura 4.2. Distribución de las mutaciones puntuales encontradas en el gen *GNAS*. Los recuadros negros corresponden a las regiones no traducidas (UTR), los cuadrados blancos representan los diferentes exones indicando mediante un número a cuál corresponden y la línea negra que los une representan los intrones. El transcrito utilizado como referencia para nombrar las variantes es el NM_001077488. En negrita se resaltan las variantes noveles. La variante *hotspot* del exón 7 fue encontrada en dos pacientes de familias independientes.

Respecto a los genes causantes de acrodisostosis, se identificaron variantes *missense* probablemente patogénicas en *PDE4D* en tres pacientes (todas ellas noveles) y, en otros dos, variantes en el gen *PRKAR1A*, una *missense* (novel) y la otra *nonsense*, concretamente la mutación más recurrente (p.R368*) (**Tabla 4.1**).

En el caso de *PDE4D*, las tres variantes encontradas eran *de novo*. En *PRKAR1A*, la paciente PHP1260 había heredado la mutación de su madre. Todas ellas fueron clasificadas como probablemente patogénicas en base a los criterios de ACMG. Los que se cumplían en estos pacientes eran los siguientes: (i) son alteraciones en dominios proteicos que presentan un elevado porcentaje de patogenicidad, (ii) no se encuentran en la base de datos gnomAD, y (iii) la mayoría de variantes *missense* presentes en esos genes son patogénicas y se clasifican como patogénicas en varios predictores de patogenicidad. No se tienen datos de la madre de la paciente cuya mutación fue heredada (PHP1260).

En los 41 casos en los que no se detectaron variantes en los genes relacionados con iPPSDs, junto con 19 pacientes de la cohorte histórica, se estudiaron diferentes genes relacionados con diagnósticos diferenciales²²⁵⁻²²⁷. Así, se identificaron cuatro pacientes con variantes en *PTHLH*, dos en *TRPS1*, dos en *GDF5* y cinco en *IHH* (**Tabla 4.1**).

En total, fueron nueve las variantes noveles encontradas (dos para *PTHLH*, una para *TRPS1*, dos para *GDF5* y cuatro para *IHH*). De ellas, cuatro generaban proteína truncada (una en *PTHLH*, una en *TRPS1* y dos en *GDF5*) y por lo tanto los predictores las clasificaban como patogénicas en base a los siguientes criterios: (i) producir una proteína truncada en un gen en el que se conoce que la pérdida de función es causa de enfermedad y (ii) no se encuentran en la base de datos gnomAD. El resto eran *missense* y se predijeron como probablemente patogénicas o variantes de significado incierto (VUS), generalmente por cumplir tres criterios: (i) no se encuentran en la base de datos gnomAD, (ii) ser alteraciones *missense* en un gen que tiene una tasa baja de variantes *missense* benignas y las cuales son un mecanismo común que genera enfermedad y (iii) diferentes líneas computacionales apoyan un efecto nocivo.

En cuanto a los estudios de cosegregación de las variantes noveles, se vio que todos los progenitores que presentaban la variante tenían fenotipo asociado al gen con la alteración, excepto en el padre de PHP1168 que no parecía presentar clínica. Generalmente, el fenotipo estaba representado por talla baja y braquidactilia.

Tabla 4.1. Variantes encontradas en los distintos pacientes e información asociada. Se recogen todas las variantes identificadas en las secuencias de los genes en los diferentes pacientes. Las variantes que aparecen subrayadas tanto en la columna de mutación en ADN como mutación en proteína corresponden a las variantes noveles. En los casos de variantes de tipo *splicing* o deleción de varios exones o genes no se nombra la variante a nivel proteico al carecer de estudios sobre ARN. Los transcritos utilizados para nombrar las mutaciones en los diferentes genes son: *GNAS* (NM_001077488), *PDE4D* (NM_001104631.2), *PRKAR1A* (NM_212471.2), *PTHLH* (NM_198965.2), *TRPS1* (NM_014112.5), *GDF5* (NM_000557.5), *IHH* (NM_002181.4), *XL α s* (NM_080425), *NPR2* (NM_003995.3), *CYP27B1* (NM_000785.4), *ROR2* (NM_004560.4), *FLNB* (NM_001457), *RUNX2* (NM_001024630), *ACAN* (NM_001135), *EP300* (NM_001429), *GLI3* (NM_000168). # los genes que se encuentran en esa región delecionada son: *HFE2*, *TXNIP*, *POLR3GL*, *RBM8A*, *PEX11B*, *ITGA10*, *PIAS3*, *POLR3C*, *CD160*, *PDZK1*, *GPR89A*.

CÓDIGO DE FAMILIA	GEN IMPLICADO	MUTACIÓN EN ADN	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIANTE SEGÚN ACMG	TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN/ INTRÓN	HERENCIA	SOSPECHA CLÍNICA	DIAGNÓSTICO FINAL
PHP1203	<i>GNAS</i>	<u>c.533+1G>T</u>	-	Patogénica	Variante en el <i>splicing</i>	i6	Desconocida	PHP1A	iPPSD2
PHP1204	<i>GNAS</i>	arr[hg19] 20q13.32(57.446.889_57.518.112)x1	-	Patogénica	Deleción	Del gen <i>GNAS</i> completo	Desconocida	PHP1A	iPPSD2
PHP1206	<i>GNAS</i>	c.568_571del	p.Asp190Metfs*14	Patogénica	<i>Frameshift</i>	7	<i>De novo</i>	PHP	iPPSD2
PHP1215	<i>GNAS</i>	c.475G>A	p.Val159Met	Patogénica	<i>Missense</i>	6	Materna	PHP1A	iPPSD2mat
PHP1217	<i>GNAS</i>	c.568_571del	p.Asp190Metfs*14	Patogénica	<i>Frameshift</i>	7	<i>De novo</i>	PPHP/POH	iPPSD2pat
PHP1220	<i>GNAS</i>	Chr20.hg19:g.(?_58.651.251)_(58.911.150_?)del	-	Patogénica	Deleción	Del locus <i>GNAS</i> completo	<i>De novo</i>	PHP1A	iPPSD2mat
PHP1223	<i>GNAS</i>	c.139+1G>A	-	Probablemente patogénica	Variante en el <i>splicing</i>	i1	Desconocido	PHP1A	iPPSD2
PHP1237	<i>GNAS</i>	c.134T>C	p.Leu45Pro	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	1	<i>De novo</i>	PHP1A/PPHP	iPPSD2pat
PHP1242	<i>GNAS</i>	<u>c.1000del</u>	p.(Arg334Alafs*2)	Patogénica	<i>Frameshift</i>	12	Materna	PHP1A	iPPSD2mat
PHP1244	<i>GNAS</i>	<u>c.293del</u>	p.(Asn98Thrfs*3)	Patogénica	<i>Frameshift</i>	4	<i>De novo</i>	PHP1A	iPPSD2

CÓDIGO DE FAMILIA	GEN IMPLICADO	MUTACIÓN EN ADN	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIANTE SEGÚN ACMG	TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN/ INTRÓN	HERENCIA	SOSPECHA CLÍNICA	DIAGNÓSTICO FINAL
PHP1249	GNAS	<u>c.572A>G</u>	p.(Tyr191Cys)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	7	<i>De novo</i>	PHP1A	iPPSD2mat
PHP1251	GNAS	[hg19]g.(?_58.651.419)_(58.981.345_?)del	-	Patogénica	Delección	Del locus GNAS completo	Paterna	Talla baja y braquidactilia	iPPSD2pat
PHP1267	GNAS	<u>c.1036T>A</u>	p.(Phe346Ile)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	12	Materna	PHP1A	iPPSD2mat
PHP1283	GNAS	<u>c.595C>T</u>	p.(Leu199Phe)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	8	Materna	NSIAD y PHP1A	iPPSD2mat + NSIAD
PHP1288	GNAS	<u>c.1001dup</u>	p.(Val335Argfs*11)	Patogénica	<i>Frameshift</i>	12	<i>De novo</i>	PHP1A	iPPSD2
PHP1289	GNAS	<u>c.85C>T</u>	p.Gln29*	Patogénica	<i>Nonsense</i>	1	<i>De novo</i>	PHP1A	iPPSD2
PHP1299	GNAS	<u>c.883C>T</u>	p.(Gln294*)	Patogénica	<i>Nonsense</i>	11	Desconocida	PHP1A	iPPSD2
PHP1211	PDE4D	<u>c.2029T>C</u>	p.(Tyr677His)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	15	<i>De novo</i>	ACRDYS	iPPSD5
PHP1291	PDE4D	<u>c.2033T>C</u>	p.(Ile678Thr)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	15	<i>De novo</i>	ACRDYS2	iPPSD5
PHP1300	PDE4D	<u>c.1762A>G</u>	p.(Met527Val)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	13	<i>De novo</i>	PPHP	iPPSD5
PHP1260	PRKAR1A	<u>c.586G>A</u>	p.(Glu196Lys)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	8	Materna	BDE2 - PTHLH	iPPSD4
PHP1296	PRKAR1A	<u>c.1102C>T</u>	p.Arg368*	Patogénica	<i>Nonsense</i>	11	<i>De novo</i>	PHP1A/PPHP	iPPSD4

CÓDIGO DE FAMILIA	GEN IMPLICADO	MUTACIÓN EN ADN	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIANTE SEGÚN ACMG	TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN/ INTRÓN	HERENCIA	SOSPECHA CLÍNICA	DIAGNÓSTICO FINAL
PHP1205	<i>PTHLH</i>	arr[hg19] 12p11.13p11.22(27.399.373_30.130.505)x1	-	Patogénica	Delección	Del <i>PTHLH</i> completo	Paterna	PHP1A	Talla baja BDE
PHP1210	<i>PTHLH</i>	<u>c.155A>C</u>	p.(Gln52Pro)	VUS	<i>Missense</i>	5	Materna	Talla baja y BDE	Talla baja y BDE
PHP1230	<i>PTHLH</i>	<u>c.114_115del</u>	p.(Ser39*)	Patogénica	<i>Nonsense</i>	3	Materna	PPHP	Talla baja y BDE
PHP1247	<i>PTHLH</i>	c.102-3A>G	-	Patogénica	Variante en el <i>splicing</i>	i2	Materna	Talla baja y braquidactilia	Talla baja y BDE
PHP1195	<i>TRPS1</i>	c.1870C>T	p.Arg624*	Patogénica	<i>Nonsense</i>	4	<i>De novo</i>	Síndrome tricorriofalángico	Síndrome tricorriofalángico tipo 1
PHP1261	<i>TRPS1</i>	<u>c.620dup</u>	p.(Val208Cysfs*5)	Patogénica	<i>Frameshift</i>	3	<i>De novo</i>	Síndrome tricorriofalángico tipo 1	Síndrome tricorriofalángico tipo 1
PHP1168	<i>GDF5</i>	<u>c.1313del</u>	p.(Arg438Profs*15)	Patogénica	<i>Frameshift</i>	2	Paterna	PPHP	BDA2 + BDE
PHP1169	<i>GDF5</i>	<u>c.1462A>T</u>	p.(Lys488*)	Patogénica	<i>Nonsense</i>	2	Paterna	Talla baja y BDC	Talla baja y BDC
PHP1149	<i>IHH</i>	c.283_285del	p.Glu95del	Patogénica	<i>Indel</i>	1	Paterna	BDA1	Talla baja y BDA1 + BDC

CÓDIGO DE FAMILIA	GEN IMPLICADO	MUTACIÓN EN ADN	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIANTE SEGÚN ACMG	TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN/ INTRÓN	HERENCIA	SOSPECHA CLÍNICA	DIAGNÓSTICO FINAL
PHP1177	IHH	<u>c.228_229delinsAA</u>	p.(Arg77Ser)	VUS	Missense	1	Paterna	PPHP	Talla baja y BDA2 + BDB + BDE
PHP1184	IHH	<u>c.568G>A</u>	p.(Val190Ile)	Probablemente patogénica	Missense	2	Paterna	PPHP	Talla baja BDB+ BDE
PHP1239	IHH	<u>c.446G>A</u>	p.(Arg149His)	Probablemente patogénica	Missense	2	Paterna	PPHP	Talla baja y BDA2 + BDB+ BDE
PHP1243	IHH	<u>c.391G>C</u>	p.(Glu131Gln)	Probablemente patogénica	Missense	2	Materna	Talla baja y BDA + BDE	Talla baja y BDA2 + BDB+ BDE
PHP1181	$XL\alpha_s$	<u>c.1343A>C</u>	p.Asp448Ala	Probablemente benigna	Missense	1	Paterna	Talla baja y braquidactilia	
PHP1246	$XL\alpha_s$	<u>c.79G>A</u>	p.(Glu27Lys)	VUS	Missense	1	Paterna	PHP1A/PPHP	
PHP1083	NPR2	<u>c.2953A>T</u>	p.(Asn985Tyr)	Probablemente patogénica	Missense	20	Paterna	PPHP	
PHP1121	NPR2	<u>c.2927G>T</u>	p.(Arg976Leu)	Probablemente patogénica	Missense	20	Materna	Talla baja y BDE	
PHP1194	NPR2	<u>c.1033A>G</u>	p.(His678Arg)	Probablemente patogénica	Missense	13	Desconocida	Talla baja y braquidactilia	

CÓDIGO DE FAMILIA	GEN IMPLICADO	MUTACIÓN EN ADN	MUTACIÓN EN PROTEÍNA	CLASIFICACIÓN DE LA VARIANTE SEGÚN ACMG	TIPO DE MUTACIÓN	EXÓN/ INTRÓN	HERENCIA	SOSPECHA CLÍNICA	DIAGNÓSTICO FINAL
PHP1269	NPR2	<u>c.1636A>T</u>	p.(Asn546Tyr)	Probablemente patogénica	<i>Missense</i>	10	Paterna	Síndrome tricorriñofalá- ngico	
PHP1131	ROR2	<u>c.731G>C</u>	p.(Arg244Pro)	Probablemente benigna	<i>Missense</i>	6	Desconocida	PPHP/POH	
PHP1302	ROR2	c.1398dup	p.Glu467Argfs*58	Patogénica	<i>Frameshift</i>	9	<i>De novo</i>	Braquidactilia	
PHP1131	GLI3	<u>c.3278C>T</u>	p.(Pro1093Leu)	Probablemente benigna	<i>Missense</i>	15	Desconocida	PPHP/POH	
PHP1145	#	arr[hg19] 1q21.1(145.387.74 5_145.818.902)x1	-	VUS	Delección	-	Paterna	Braquidactilia	
PHP1145	EP300	<u>c.901A>G</u>	p.(Asn301Asp)	VUS	<i>Missense</i>	3	Materna	Braquidactilia	
PHP1159	ACAN	<u>c.5248T>C</u>	p.(Ser1750Pro)	Probablemente benigna	<i>Missense</i>	12	Desconocida	Braquidactilia	
PHP1212	RUNX2	<u>c.151C>A</u>	p.(Gln51Lys)	Benigna	<i>Missense</i>	3	Desconocida	ACRDYS	
PHP1212	FLNB	<u>c.6866_6868del</u>	p.(Arg2288_Arg2289del)	VUS	<i>Inframe</i>	41	Desconocida	ACRDYS	
PHP1284	CYP27B1	<u>c.103_104delinsA</u>	p.(Ser36Aafs*42)	Probablemente patogénica	<i>Frameshift</i>	1	Desconocida	PHP1A	
PHP1264	NIPBL CPLANE1	Chr5.hg19:g.(?_37. 063.790)_(37.105.6 28_?)dup	-	Probablemente patogénica	Duplicación	-	Desconocida	BDB1	

Posteriormente, las muestras de los pacientes en los que no se habían encontrado alteraciones, se analizaron mediante los paneles de NGS de diseño propio PHP-like_v1 e iPPSD_v1 y también con los de displasias esqueléticas. Estos estudios permitieron la detección de variantes en trece pacientes (**Tabla 4.1**). En este caso, algunas de las alteraciones sí que se clasificaron como patogénicas o probablemente patogénicas, pero también se encontraron VUS y probablemente benignas. Esas variantes se encuentran en proceso de estudios de cosegregación y/o estudios funcionales para determinar su patogenicidad.

Para delimitar la extensión de las CNVs encontradas con las técnicas anteriores, a los pacientes se les realizó aCGH o array de SNP. Se consiguió delimitar la delección encontrada por el MLPA de diseño propio para el paciente PHP1205, obteniendo el resultado: arr[hg19] 12p11.13p11.22(27.399.373_30.130.505)x1. Asimismo, se pudo concretar el tamaño de la delección del paciente PHP1204, previamente detectada por MS-MLPA del locus *GNAS* (arr[hg19] 20q13.32(57.446.889_57.518.112)x1).

1.2. DETERMINACIÓN DEL ORIGEN PARENTAL DE LAS VARIANTES EN *GNAS*

Sesenta y dos familias de la cohorte total (histórica y del presente trabajo) presentaban alteración genética en el gen *GNAS* de origen desconocido o *de novo*. En 22 (21 de la cohorte histórica y uno de la actual), no se disponía de muestra o estaba en mal estado.

Dos de las familias presentaban grandes delecciones que incluían al locus *GNAS* completo, por lo que el patrón de alteración de la metilación obtenido de los estudios de MS-MLPA permitieron inferir el origen parental. Así, en la paciente PHP1204, a pesar de carecer de muestra parental, el estudio reveló que la delección se había producido en el alelo paterno. Por su parte, en el paciente PHP1220, si bien la delección era *de novo*, se pudo concluir que estaba en el alelo materno.

Por lo tanto, se estudiaron 38 familias mediante RT-PCR para esclarecer el origen parental de las variantes (**Figura 4.3**). De esos 38 pacientes, en 27 se sabía que la herencia era *de novo* y en 11 se consideró de herencia desconocida por falta de muestra parental. Cinco de los pacientes (cuatro *de novo*) tenían la alteración genética en el exón 1.

Tras los análisis para la caracterización del alelo parental mediante RT-PCR, en 11 pacientes pudo determinarse la presencia de las variantes en el alelo paterno, en dos se identificó en el alelo materno y en 16 no se detectó en el alelo paterno (por lo que se infiere que estaba en el materno, pero no pudo confirmarse). En nueve pacientes el origen parental quedó sin resolver (**Figura 4.3**); seis de ellos no se pudieron estudiar por falta de muestra o ser el material genético

de baja calidad; los otros tres, tenían la alteración en el exón 1. De esos tres últimos, en dos de las familias, a pesar de tener muestra de ambos progenitores, los SNPs no eran informativos para resolver el origen parental de las variantes. En el otro, no se pudo estudiar por falta de material genético de los progenitores, imprescindibles en este caso para saber si los SNPs eran informativos o no.

1.3. DETECCIÓN DE VARIANTES EN MOSAICO

De las 38 familias con alteración puntual en el gen *GNAS*, con herencia *de novo* o desconocida, se estudiaron mediante secuenciación masiva en busca de mosaicismo genético los padres y madres de 29 familias (por falta de material genético del resto de progenitores candidatos). El progenitor a estudiar por NGS se eligió basándose en los resultados del origen parental de las variantes descrito en el apartado anterior (**Figura 4.3**). Cuando el origen parental no había podido ser determinado, se estudiaron ambos progenitores.

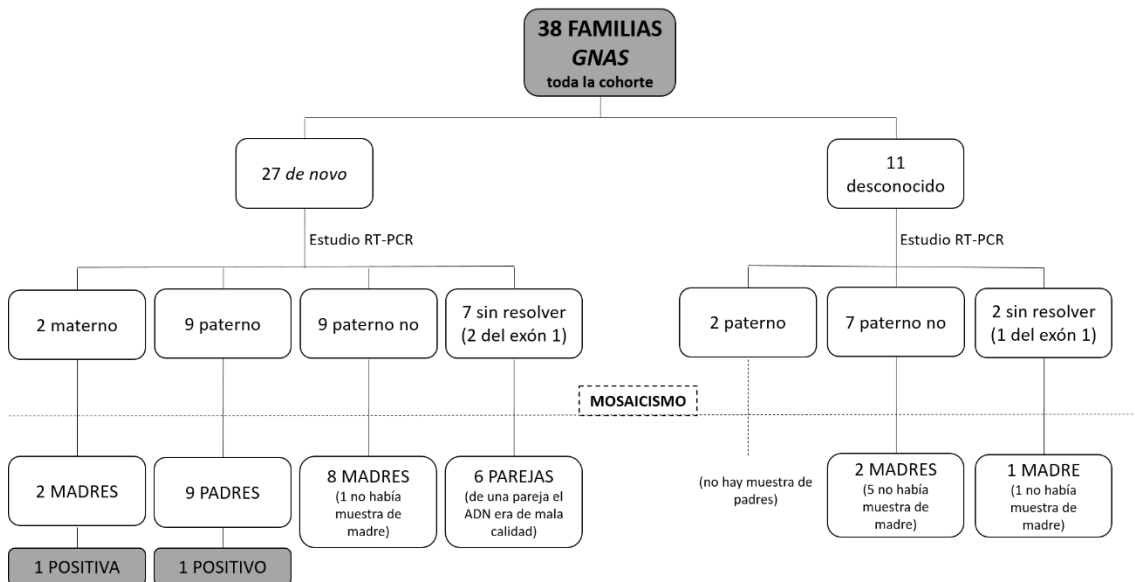


Figura 4.3. Diagrama de las muestras utilizadas para la determinación del origen parental mediante RT-PCR y de la presencia de mosaicismo en el progenitor candidato mediante NGS, así como los resultados conseguidos. Se presenta un esquema que resume las muestras utilizadas para hacer estudios de RT-PCR y así identificar en qué alelo estaba presente la mutación y las muestras disponibles para la detección de posible mosaicismo en el progenitor candidato. En los casos que no pudieron resolverse mediante RT-PCR, se estudiaron con NGS los progenitores disponibles.

Los estudios mediante secuenciación masiva revelaron la presencia de la alteración en mosaico en dos de los progenitores estudiados. Concretamente fueron el padre del paciente PHP1191 (c.659T>C) y la madre del PHP1125 (c.973+1G>T) (**Figura 4.4**).

Tabla 4.2. Estudios de RT-PCR y análisis de mosaïcismo por NGS para los pacientes con variantes en GNAS y herencia de novo o desconocida. Se presentan los resultados de los estudios en los pacientes con alteraciones en el gen GNAS cuya herencia fue *de novo* o de origen no filiado. Se muestra la variante identificada a nivel de ADN y el exón en el que se localiza. Si ha sido posible identificarla a nivel de ARN, se nombra también a este nivel. Los casos en los que la alteración no se encontró en el alelo paterno se nombran como “paterno no” y se infirió que estaría en el alelo materno. Los tres rs que aparecen hacen referencia a los diferentes SNPs que podrían ayudar a resolver el origen parental en los pacientes con alteraciones en el exón 1 o en los que no se han podido resolver con la técnica RT-PCR convencional (utilizando los cebadores que abarcan desde el exón A/B hasta el exón 13). El transcrito utilizado para nombrar las mutaciones fue el NM_001077488. En la columna de mosaïcismo se indica el progenitor o progenitores a los que se les ha realizado la técnica y si se ha observado la presencia del mismo. El * en esta columna refleja la ausencia de muestra parental para los estudios. Además, entre paréntesis se muestra la profundidad de lectura obtenida en el experimento. DP = *Deep coverage*.

CÓDIGO DE FAMILIA	MUTACIÓN ADN	EXÓN/INTRÓN	MUTACIÓN ARN	rs7121	rs6123837	rs9679845	ALELO MUTADO	MOSAICISMO
PHP0085	c.568_571del	7	-	-	-	-	Paterno no	*
PHP0115	c.694C>T	9	-	-	-	-	Paterno no	Madre: no mosaïcismo (DP: 623)
PHP1003	c.568_571del	7	-	-	-	-	Paterno no	Madre: no mosaïcismo (DP: 667)
PHP1015	c.626_627del	8	-	-	-	-	No hay ARN	Madre: no mosaïcismo (DP: 587) Padre: no mosaïcismo (DP: 622)
PHP1021	c.568_571del	7	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaïcismo (DP: 803)
PHP1022	c.568_571del	7	-	-	-	-	No hay ARN	Madre: no mosaïcismo (DP: 655)

CÓDIGO DE FAMILIA	MUTACIÓN ADN	EXÓN/INTRÓN	MUTACIÓN ARN	rs7121	rs6123837	rs9679845	ALELO MUTADO	MOSAICISMO
								Padre: no mosaicismo (DP: 720)
PHP1025	c.671A>C	9	r.671a>c	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 1567)
PHP1046	c.258-9A>G	i3	-	-	-	-	No funciona	*
PHP1047	c.886G>C	11	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 381)
PHP1049	c.734T>C	10	r.734u>c	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 915)
PHP1051	c.722-7G>A	i9	-	No informativo	-	-	No funciona	Madre: no mosaicismo (DP: 662) Padre: no mosaicismo (DP: 635)
PHP1078	c.589-1G>A	i7	-	-	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 990)
PHP1089	c.568_571del	7	r.568_571del	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 1085)
PHP1097	c.665T>C	9	-	No informativo	-	-	Paterno no	*

CÓDIGO DE FAMILIA	MUTACIÓN ADN	EXÓN/INTRÓN	MUTACIÓN ARN	rs7121	rs6123837	rs9679845	ALELO MUTADO	MOSAICISMO
PHP1108	c.568_571del	7	-	-	-	-	No hay ARN	Madre: no mosaicismo (DP: 583) Padre: no mosaicismo (DP: 684)
PHP1114	c.568_571del	7	-	Informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 1010)
PHP1124	c.568_571del	7	-	Informativo	-	-	Paterno no	*
PHP1125	c.973+1G>T	11	r.973+1_973+4insuugu	-	-	-	Materno	Madre: mosaicismo (DP: 483, T: 10%)
PHP1126	c.568_571del	7	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 1075)
PHP1129	c.351del	5	-	-	-	-	Paterno no	*
PHP1151	c.568_571del	7	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 860)
PHP1155	c.34C>T	1	-	No informativo	No informativo	No informativo	No se resuelve	Madre: no mosaicismo (DP: 248) Padre: no mosaicismo (DP: 284)

CÓDIGO DE FAMILIA	MUTACIÓN ADN	EXÓN/INTRÓN	MUTACIÓN ARN	rs7121	rs6123837	rs9679845	ALELO MUTADO	MOSAICISMO
PHP1156	c.697C>T	9	-	-	-	-	No hay ARN	Madre: no mosaicismo (DP: 712)
PHP1170	c.880A>G	11	r.880a>g	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 978)
PHP1179	c.103C>T	1	r.104_143del	Informativo	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 328)
PHP1183	c.572A>C	7	r.572a>c	Informativo	-	-	Paterno	*
PHP1188	c.769A>T	10	r.769a>u	-	-	-	Paterno	*
PHP1191	c.659T>C	8	r.659u>c	-	-	-	Paterno	Padre: mosaicismo (DP: 553, C: 10%)
PHP1196	c.435+1G>A	i5	r.316_435del	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 345)
PHP1203	c.533+1G>C	i6	-	-	-	-	Paterno no	*
PHP1206	c.568_571del	7	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 500)
PHP1217	c.568_571del	7	r.568_571del	-	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 750)
PHP1223	c.139+1G>A	1	-	-	-	-	No se resuelve	*

CÓDIGO DE FAMILIA	MUTACIÓN ADN	EXÓN/INTRÓN	MUTACIÓN ARN	rs7121	rs6123837	rs9679845	ALELO MUTADO	MOSAICISMO
PHP1237	c.134T>C	1	r.134u>c	Informativo	-	-	Paterno	Padre: no mosaicismo (DP: 140)
PHP1244	c.293del	4	-	No informativo	-	-	Paterno no	Madre: no mosaicismo (DP: 789)
PHP1249	c.572A>G	7	r.572a>g	-	-	-	Materno	Madre: no mosaicismo (DP:767)
PHP1289	c.85C>T	1	-	No informativo	No informativo	No informativo	No se resuelve	Madre: no mosaicismo (DP: 225) Padre: no mosaicismo (DP: 232)
PHP1299	c.880C>T	11	-	No informativo	-	-	Paterno no	*

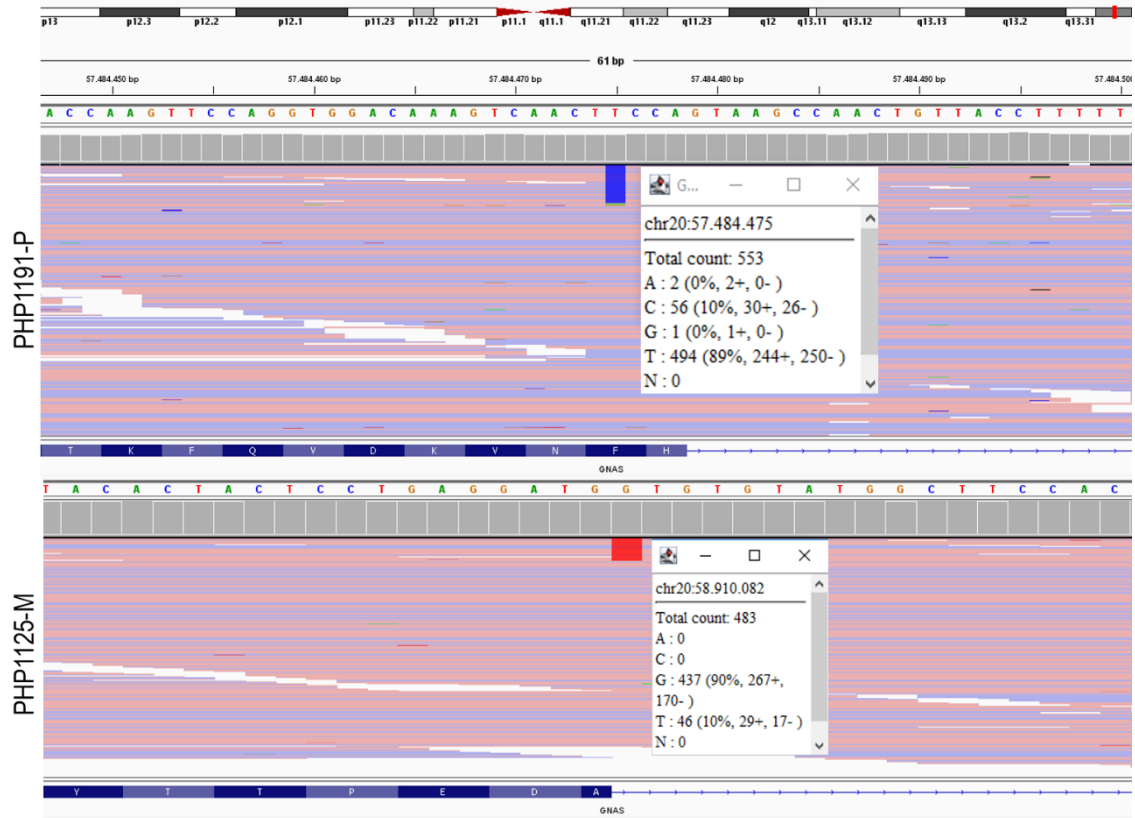


Figura 4.4. Captura de los resultados de NGS visualizadas en IGV. Las mutaciones se encontraron con un panel personalizado de NGS. Los rectángulos verticales grises representan la profundidad de lectura de cada una de las bases. Cuanto más alto es el rectángulo, mayor es la profundidad de lectura. Las letras de colores que aparecen encima de los rectángulos grises corresponden a la secuencia consenso contra la que se alinea. Las líneas horizontales rojas y azules representan los dos sentidos de lectura. El recuadro azul del panel superior y el recuadro rojo del panel inferior que aparecen en la parte alta de las lecturas, hacen referencia al nucleótido minoritario en esa posición. La parte final de cada uno de los paneles es una representación de la proteína. Los recuadros en diferente tono de azul/morado son los aminoácidos y las líneas con las flechas corresponderían a la parte intrónica del ADN. En los cuadros blancos se resalta información sobre las bases en las que se ha detectado mosaicismos. Panel superior: el porcentaje del alelo mutado (C) en el padre del paciente PHP1191 es del 10% con una cobertura del 553X (el número de lecturas en cada una de las hebras puede apreciarse en la imagen). Panel inferior: el porcentaje del alelo mutado (T) de la madre del PHP1125 es del 10%, con una cobertura del 483X (el número de lecturas en cada una de las hebras puede apreciarse en la imagen). El transcrito utilizado para nombrar las variantes fue el NM_001077488.

1.4. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DE IMPRONTA

En total fueron 17 pacientes los que tenían sospecha de iPPSD3 (teniendo en cuenta como criterio la resistencia a la PTH) sin presentar alteraciones de la secuencia en el gen *GNAS*. Se les estudió el estado de metilación del locus *GNAS* y doce presentaban alteración en el patrón de la impronta (**Tabla 4.3**). De esos, cuatro presentaban pérdida de metilación afectando exclusivamente a *GNAS A/B:TSS-DMR*, y en tres de los casos se identificó la deleción de 3,3 kb en *STX16*, clasificándose clínicamente como AD-iPPSD3. Los otros nueve presentaron alteración afectando a las cuatro DMRs del locus *GNAS*, causando iPPSD3 esporádico (**Figura 4.1** y **Tabla 4.3**). A los pacientes con alteración completa de la metilación en los cuatro DMRs (PHP1199, PHP1219, PHP1226 y PHP1256) se les realizó estudio de microsatélites para descartar presencia

de UPD. Solo uno de estos pacientes, concretamente el PHP1256, presentó isodisomía uniparental paterna del cromosoma 20 (iupd(20)pat) como causa subyacente a la alteración de la metilación.

Tabla 4.3. Resumen de las alteraciones de impronta encontradas en la cohorte de pacientes. Se recogen los defectos epigenéticos encontrados en los diferentes pacientes, así como las alteraciones genéticas subyacentes causantes de los mismos. En el caso de haberse encontrado una alteración genética, entre paréntesis se indica la herencia. También se indica el diagnóstico final, ofrecido una vez detectada la alteración de la impronta.

CÓDIGO DE FAMILIA	DEFECTO EPIGENÉTICO	ALTERACIÓN GENÉTICA SUBYACENTE (herencia)	DIAGNÓSTICO
PHP1199	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> y ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	No	spor-iPPSD3
PHP1200	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i>	Delección de 3,3 kb en <i>STX16</i> (desconocida)	AD-iPPSD3
PHP1219	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> y ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	No	spor-iPPSD3
PHP1226	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> y ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	No	spor-iPPSD3
PHP1231	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y pérdida parcial en <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> . Ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	No	spor-iPPSD3
PHP1250	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i>	Delección de 3,3 kb en <i>STX16</i> (materna)	AD-iPPSD3
PHP1256	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> . Ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	iupd(20)pat	spor-iPPSD3
PHP1257	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B:TSS-DMR</i> , <i>GNAS-AS1:TSS-DMR</i> y pérdida parcial en <i>GNAS-XL:Ex1-DMR</i> . Ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP:TSS-DMR</i>	No	spor-iPPSD3

CÓDIGO DE FAMILIA	DEFECTO EPIGENÉTICO	ALTERACIÓN GENÉTICA SUBYACENTE (herencia)	DIAGNÓSTICO
PHP1275	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B</i> :TSS-DMR, <i>GNAS-AS1</i> :TSS-DMR y pérdida parcial en <i>GNAS-XL</i> :Ex1-DMR. Ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP</i> :TSS-DMR	No	spor-iPPSD3
PHP1286	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B</i> :TSS-DMR	Delección de 3,3 kb en <i>STX16</i> (materna)	AD-iPPSD3
PHP1294	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B</i> :TSS-DMR, <i>GNAS-AS1</i> :TSS-DMR y pérdida parcial en <i>GNAS-XL</i> :Ex1-DMR. Ganancia completa de metilación en <i>GNAS-NESP</i> :TSS-DMR	No	spor-iPPSD3
PHP1301	Pérdida de metilación completa <i>GNAS A/B</i> :TSS-DMR	No	spor-iPPSD3

2. CORRELACIÓN CLÍNICO-GENÉTICA DE LOS PACIENTES

Al analizar los criterios mayores de iPPSD en los 46 pacientes con alteraciones de la secuencia en el gen *GNAS* (Tabla 4.4), observamos que la resistencia a PTH estaba presente en 33 (22 con alteración en el alelo materno, 2 con alteración en el alelo paterno y 9 sin haber identificado el alelo parental). Hay que resaltar el hecho de que encontrar resistencia a la PTH en pacientes con iPPSD2pat es realmente infrecuente. Respecto a la braquidactilia, eran 34 los pacientes que la tenían, 16 de ellos con la alteración en el alelo materno, 11 en el alelo paterno y 7 en los cuales no se había identificado el origen parental de la variante. La edad media al diagnóstico de los pacientes que no tenían braquidactilia era de 4 años, sin incluir a un paciente cuya edad de diagnóstico fue 27 años. Las personas que sí la tenían fueron diagnosticadas de iPPSD2 a una edad media de 8,7 años. Finalmente, 25 pacientes presentaban osificaciones ectópicas, 13 con alteración en el alelo materno, 5 con la alteración en el paterno y 7 en los que no se esclareció el alelo parental. Todos los pacientes de los que se disponían datos cumplían los criterios de iPPSD.

En cuanto a los criterios menores de iPPSD, 33 pacientes tenían resistencia a la TSH o a otras hormonas, 30 de los cuales, también la tenían a la PTH. Por otro lado, 22 tenían talla baja, 26 obesidad, 21 retraso motor y/o cognitivo y 24 presentaban rasgos faciales característicos. Algunos de los pacientes presentaban simultáneamente varias de estas características. Cabe resaltar el caso de la paciente PHP1283, en la cual la clínica sugería un diagnóstico combinado

de PHP y síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada (NSIAD). Por un lado, la niña tenía resistencia a la PTH, obesidad y cara redondeada, todo ello sugestivo de iPPSD2mat. Por otro lado, también tenía hiponatremia y niveles bajos de hormona antidiurética, lo que hace sospechar NSIAD.

En el caso de los iPPSD3, todos los pacientes (tanto esporádicos como familiares) presentaron resistencia a la PTH. Solamente la paciente PHP1219 tenía braquidactilia y únicamente tenía osificaciones subcutáneas la paciente PHP1250. Asimismo, seis pacientes tenían resistencia a la TSH u otras hormonas (un caso familiar y cinco esporádicos), de hecho, cinco cursaban con hipotiroidismo y, curiosamente, el caso PHP1286 presentaba hipertiroidismo. Respecto a otras manifestaciones clínicas relacionadas con los iPPSDs, el caso esporádico PHP1199 tenía obesidad y el caso esporádico PHP1257 tenía retraso motor y/o cognitivo. Por su parte, la paciente PHP1226 tenía cara redondeada (**Tabla 4.4**). Bioquímicamente, todos los pacientes (excepto uno porque no se ha podido recoger ese dato) tenían hipocalcemia e hiperfosfatemia. De los nueve casos esporádicos, en seis se midió la vitamina D. En tres sus valores se encontraban dentro de la normalidad y en los otros tres se encontraba ligeramente disminuida, sin embargo, no lo suficiente como para explicar la elevación de la PTH. Entre los tres AD-iPPSD3, solamente en uno se midió la vitamina D, y sus valores entraban dentro de los rangos de normalidad. Destacar el caso del paciente PHP1256, el cual tiene la *iupd(20)pat*. Este paciente presentaba hipogonadismo, siendo esta característica infrecuente en pacientes con iPPSD3. La edad media de diagnóstico de los pacientes con AD-iPPSD3 estudiados se encontraba en 28,91 años, mientras que los spor-iPPSD3 se diagnosticaron a una edad media de 19,07 años, diez años antes que en los casos familiares. Tomando todos los iPPSD3 en cómputo, la edad media de diagnóstico fue de 21,53 años y para los iPPSD2 9,12 años.

En cuanto a los pacientes con iPPSD4 e iPPSD5, todos presentaron braquidactilia (en uno se desconoce el dato). Curiosamente solamente uno de los pacientes (PHP1296) presentaba resistencia a la PTH. Los pacientes con variantes en *PDE4D* presentaron, además cara redondeada. La paciente con la variante c.1579A>G (PHP1300) presentaba, asimismo obesidad y retraso motor o cognitivo. En el que presentaba la variante c.2029T>C (PHP1211) además de la cara redondeada también se encuentra retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) y postnatal (RCPN).

Como otras características, se describen en dos de los pacientes obesidad, retraso motor o cognitivo y RCIU y RCPN.

En cuanto a las edades de diagnóstico, la edad media para los iPPSD4 fue de 17 años mientras que para los iPPSD5 era de 6,56 años.

En el caso de los pacientes con mutaciones en los genes de diagnósticos diferenciales (*GDF5*, *IHH*, *PTHLH* y *TRPS1*), presentaban menos características clínicas asociadas a iPPSD que los anteriores. De hecho, únicamente tres de ellos (PHP1168, PHP1184 y PHP1230) cumplían criterios clínicos para sospechar iPPSD (**Tabla 4.4**). Todos presentaban braquidactilia bilateral, pero ninguno tenía resistencia a hormonas ni osificaciones ectópicas. Entre los cuatro pacientes con alteración en *PTHLH*, además de la braquidactilia (todos ellos de tipo E), tres de ellos tenían talla baja, siendo el paciente PHP1247 el único que no, aunque sí era de estatura baja o inferior a la talla diana. Más allá de las características clínicas relacionadas con iPPSD, el paciente PHP1230 presentaba leve retrognatia, paladar ojival, frente prominente, hipertelorismo, fisuras palpebrales descendentes, labio superior fino y pabellones auriculares de implantación baja. En el caso de las variantes en *TRPS1*, a pesar de que se desconocía muchos datos clínicos, los dos pacientes tenían braquidactilia y talla baja. No se disponía de radiografías del paciente PHP1261, pero en la PHP1195 se veía braquidactilia de tipo E y A1 y las epífisis en cono. Esta última, además tenía cabello fino y escaso, pestañas finas y cejas escasas en la parte lateral. También tenía nariz bulbosa. Los dos pacientes con mutación en *GDF5* presentaban un patrón de braquidactilia diferente: mientras que una tenía braquidactilia combinada E y A2, el otro presentaba braquidactilia de tipo C. Respecto al resto de características, también se diferenciaban: el PHP1169 tenía talla baja mientras que la PHP1168 no. En cambio, esta última tenía obesidad y cara redondeada. En los y las pacientes cuyo gen alterado era *IHH*, el patrón de braquidactilia que presentaban era combinado y además variado. Aunque la mayoría tenían braquidactilia de tipo A2, B y/o E, en la paciente PHP1149 también se veía de tipo C. En el caso de la talla baja, tres sí que la padecían, una no y en la última se desconoce ese dato. Para finalizar, dos tenían obesidad (una además cara redondeada).

Finalmente, y después de realizar los estudios pertinentes, en 34 pacientes no se encontró alteración alguna. De todos ellos, 23 cumplían los criterios clínicos para ser diagnosticados como iPPSD.

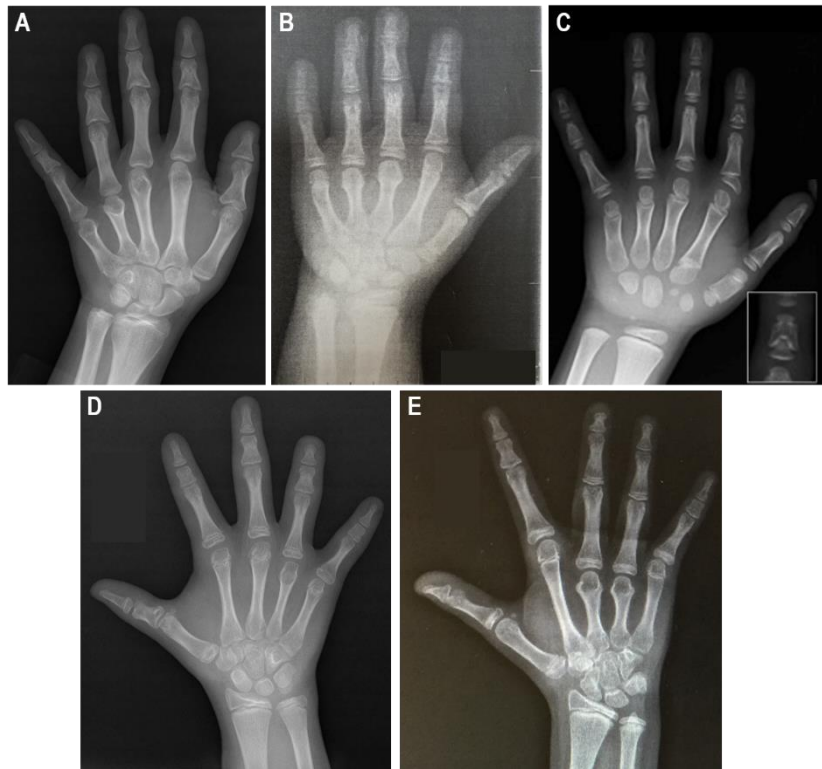


Figura 4.5. Ejemplos de radiografías de manos con diferentes patrones de braquidactilia. (A) Ejemplo de BDA1, en la que se aprecia acortamiento de todas falanges medias. El tercer, cuarto y quinto metacarpianos también están afectados (BDE). Se ven las epífisis en cono características del síndrome tricorriofalángico tipo 1. (B) Se observa el patrón característico de la BDA2, en la que las falanges medias de los dedos segundo y quinto están acortadas. También se ve acortamiento del primer, tercer, cuarto y quinto metacarpianos, patrón correspondiente a BDE. (C) Acortamiento de un primer metacarpiano anómalo (doble epífisis, proximal y distal) y de falanges medias del segundo, tercer y quinto dedos. Las epífisis proximales de las falanges proximales del segundo y tercer dedo son displásicas, y llama la atención la forma de ángel de la falange media del segundo dedo (detalle en recuadro). (D) Todas las falanges medias están acortadas, por lo que se trata de BDA1. También se aprecia BDE, dado el acortamiento del tercer, cuarto y quinto metacarpianos. (E) Se aprecian tres tipos de braquidactilia diferentes. Por un lado, BDA2, en la que las falanges medias de los dedos segundo y quinto están acortadas. Por otro lado, todas las falanges distales se ven acortadas, característico de BDB. Finalmente, el tercer y cuarto metacarpianos están alterados, típico de BDE.

Tabla 4.4. Criterios clínicos mayores y menores de iPPSD y edad al diagnóstico de los pacientes estudiados. Se recogen los resultados del análisis de la presencia de los criterios mayores y menores asociados al diagnóstico clínico de iPPSD para cada uno de los pacientes estudiados. 1 hace referencia a que el paciente presenta el criterio, 0 a que el criterio está ausente y 9 significa que se desconoce el dato. La última columna resume las edades del diagnóstico clínico de los pacientes.

CÓDIGO DE FAMILIA	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						Edad de diagnóstico (años)
	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	
PHP1203	1	9	1	1	9	1	9	9	9	30,00
PHP1204	0	1	9	9	9	9	1	1	9	-
PHP1206	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-
PHP1215	1	9	9	1	9	1	1	9	9	7,00
PHP1217	0	1	0	0	0	9	9	0	0	1,00
PHP1220	1	1	9	9	9	9	9	1	1	3,33
PHP1223	1	9	1	1	1	0	9	1	9	31,78
PHP1237	0	1	1	1	0	0	0	0	0	12,14
PHP1242	1	1	1	1	9	1	0	1	9	2,25
PHP1244	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1,65
PHP1249	1	9	1	1	0	1	9	1	9	2,60
PHP1251	0	0	1	1	9	1	9	0	9	2,71
PHP1267	1	0	1	1	0	1	0	1	1	2,97
PHP1283	1	9	0	0	9	9	9	1	1	1,88
PHP1288	1	1	1	0	1	9	9	1	9	11,31
PHP1289	1	1	0	1	9	1	0	1	9	4,43
PHP1299	1	1	1	1	9	9	0	9	0	11,00
PHP0085	1	1	1	1	9	9	9	1	1	3,12

	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						
CÓDIGO DE FAMILIA	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	Edad de diagnóstico (años)
PHP0115	1	9	1	1	1	1	1	1	1	5,00
PHP1003	1	1	0	1	1	0	0	0	0	27,00
PHP1015	1	1	1	1	0	1	1	0	1	11,00
PHP1021	1	1	1	1	0	9	1	9	9	9,00
PHP1022	1	1	9	1	0	9	0	1	1	16,00
PHP1025	1	9	1	1	0	1	1	1	1	6,30
PHP1046	1	1	1	1	0	9	0	1	1	4,00
PHP1047	1	1	1	1	0	1	1	1	1	11,00
PHP1049	0	0	1	0	0	0	1	0	9	2,67
PHP1051	1	9	1	1	0	0	1	0	1	9,00
PHP1078	1	1	9	1	1	9	9	9	9	30,00
PHP1089	0	1	1	0	0	0	1	0	0	3,25
PHP1097	1	9	1	1	0	9	0	1	1	3,00
PHP1108	1	9	1	1	9	1	1	1	1	6,00
PHP1114	1	1	1	1	0	1	1	1	1	11,00
PHP1124	1	0	1	0	1	0	1	9	9	13,00
PHP1125	1	1	1	1	0	1	1	1	1	3,00
PHP1126	1	1	1	1	0	9	1	1	1	12,00
PHP1129	1	9	1	1	9	1	9	1	1	9,00
PHP1151	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2,25
PHP1155	0	1	0	0	0	0	1	0	0	11,00

CÓDIGO DE FAMILIA	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						Edad de diagnóstico (años)
	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	
PHP1156	1	0	1	1	1	1	9	1	1	6,00
PHP1170	1	1	1	9	0	9	1	1	1	9,00
PHP1179	0	1	1	0	0	9	0	1	1	11,08
PHP1183	0	9	1	0	0	1	1	0	1	6,00
PHP1188	0	9	1	0	0	9	1	0	9	10,40
PHP1191	0	9	1	1	0	1	1	0	1	10,00
PHP1196	0	9	1	9	9	1	1	9	9	15,00
PHP1199	1	9	0	0	0	0	0	1	9	38,00
PHP1200	1	9	9	9	9	9	9	0	0	35,00
PHP1219	1	0	1	1	0	9	9	0	0	30,00
PHP1226	1	0	0	1	0	0	0	0	0	6,41
PHP1231	1	0	0	9	9	0	9	0	9	13,30
PHP1250	1	1	0	1	1	0	9	0	9	31,86
PHP1256	1	0	0	1	1	0	0	9	9	20,92
PHP1257	1	0	0	0	0	1	0	0	9	14,34
PHP1275	1	0	0	0	0	0	9	0	0	25,94
PHP1286	1	0	0	0	9	0	9	0	0	19,86
PHP1294	1	0	0	1	9	0	9	0	0	11,82
PHP1301	1	9	0	1	9	9	0	9	9	10,90
PHP1211	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0,08
PHP1260	0	9	1	0	0	9	9	9	9	23,00

	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						
CÓDIGO DE FAMILIA	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	Edad de diagnóstico (años)
PHP1291	0	0	1	0	0	1	1	1	1	12,71
PHP1296	1	0	1	9	9	1	1	1	0	11,00
PHP1300	0	0	1	0	0	1	0	1	1	6,90
PHP1149	9	9	1	9	9	9	1	9	9	10,58
PHP1168	0	9	1	0	0	0	0	1	1	7,00
PHP1169	0	0	1	0	0	0	1	0	0	7,00
PHP1177	0	0	1	0	0	9	1	0	9	12,42
PHP1184	0	9	1	0	9	9	1	1	1	22,00
PHP1195	9	9	1	9	9	9	1	9	0	14,67
PHP1205	0	9	1	0	9	9	1	9	9	31,00
PHP1210	9	9	1	9	9	9	1	9	9	13,41
PHP1230	0	0	1	0	0	0	1	0	1	10,00
PHP1239	0	0	1	0	0	0	0	1	9	11,96
PHP1243	0	9	1	0	0	9	1	0	9	11,25
PHP1247	0	9	1	0	0	9	0	0	9	9,00
PHP1261	9	9	1	0	9	9	1	0	9	6,00
PHP1083	0	9	1	0	0	9	1	1	9	15,42
PHP1121	0	9	1	0	0	9	1	0	0	14,00
PHP1131	0	9	1	0	0	1	1	1	0	13,00
PHP1145	9	9	1	9	9	0	0	9	0	12,00
PHP1159	0	9	1	0	9	1	0	0	9	13,00

CÓDIGO DE FAMILIA	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						Edad de diagnóstico (años)
	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	
PHP1181	9	9	1	0	0	0	1	0	9	7,67
PHP1194	0	9	1	0	0	9	1	9	9	14,75
PHP1212	0	0	1	0	0	9	1	9	9	39,00
PHP1246	0	0	1	0	0	0	1	1	0	13,51
PHP1264	9	9	1	9	9	9	9	9	9	19,29
PHP1269	9	9	1	9	9	1	1	0	9	14,51
PHP1284	1	0	0	0	0	9	9	0	9	58,23
PHP1302	0	0	1	0	0	9	9	9	9	0,00
PHP1085	0	9	1	0	0	9	0	0	9	10,00
PHP1096	0	1	1	0	9	0	0	1	1	13,58
PHP1104	0	9	1	0	9	1	0	1	1	5,00
PHP1123	0	9	1	9	9	1	0	0	1	23,00
PHP1171	0	9	1	0	0	9	9	9	9	13,58
PHP1186	9	9	1	0	9	9	1	9	9	8,67
PHP1207	0	9	1	0	0	1	9	1	1	3,67
PHP1208	9	9	1	9	9	1	0	0	1	12,00
PHP1213	0	9	1	0	9	0	0	0	9	10,83
PHP1227	0	9	1	9	9	1	1	1	9	14,93
PHP1229	0	0	1	0	0	0	1	0	1	10,78
PHP1232	0	0	1	0	9	0	0	0	0	16,27
PHP1233	9	9	1	9	9	1	0	0	9	7,16

	CRITERIOS MAYORES			CRITERIOS MENORES						
CÓDIGO DE FAMILIA	Resistencia a PTH	Osificaciones ectópicas	Braquidactilia	Resistencia a la TSH	Resistencia a otras hormonas	Retraso motor o cognitivo	RCIU/RCPN	Obesidad/sobrepeso	Puente nasal plano y/o Hipoplasia maxilar y/o Cara redondeada	Edad de diagnóstico (años)
PHP1235	0	0	1	0	0	0	1	1	1	13,40
PHP1236	0	1	1	0	0	0	1	1	0	63,23
PHP1245	0	9	1	0	9	0	0	9	9	9,72
PHP1248	0	0	1	0	0	1	0	1	1	13,75
PHP1253	0	0	1	0	0	0	1	0	9	13,00
PHP1254	1	9	0	1	9	9	0	1	9	4,00
PHP1259	0	0	1	0	9	1	1	0	9	15,41
PHP1262	0	0	1	0	0	0	1	0	0	14,85
PHP1265	1	0	1	1	1	0	0	1	1	13,25
PHP1266	0	9	1	9	9	1	1	0	9	13,23
PHP1268	0	9	1	0	9	1	1	9	9	14,83
PHP1270	0	0	1	0	0	1	1	0	0	11,89
PHP1274	9	1	1	0	1	0	1	1	1	11,52
PHP1276	1	9	1	1	9	9	1	1	1	13,54
PHP1280	0	0	1	0	0	0	0	1	0	10,01
PHP1290	0	0	1	0	0	9	1	0	0	9,61
PHP1292	0	9	1	0	9	9	1	1	9	13,02
PHP1293	0	9	1	0	9	9	0	1	1	10,69
PHP1295	0	9	1	9	9	1	1	1	0	7,67
PHP1298	0	9	1	9	9	1	1	1	9	15,99
PHP1303	0	0	1	0	0	0	0	0	0	18,83

3. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR

La orina recogida se sembró inicialmente en placas de 12 pocillos y para el aislamiento de las hUSCs se utilizaron el medio primario para el aislamiento y el medio de proliferación para su mantenimiento y expansión. Aproximadamente tres días después de la siembra de la orina, empezaban a verse algunas células a lo largo de la superficie de los pocillos (**Figura 4.6 A**). Pasadas dos semanas, ya eran visibles grupos de células que cubrían los pocillos. En este punto se realizó un pase a *flasks* de cultivo y se obtuvieron poblaciones homogéneas. Las células aisladas presentaban una forma fibroblastoide de un tamaño de unos 100 μm (**Figura 4.6 B**).

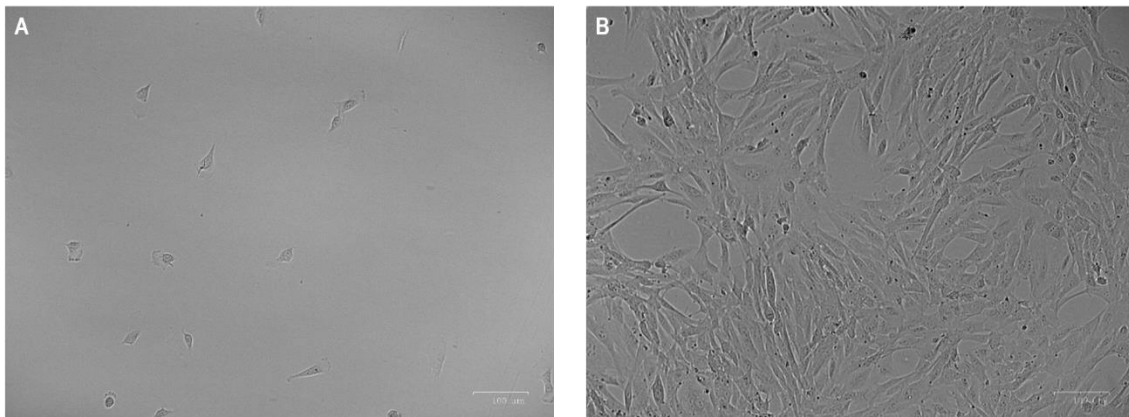


Figura 4.6. Imágenes del cultivo obtenido de orina, tomadas con el ZOE™ Fluorescent Cell Imager. (A) Fotografía tomada el cuarto día después de la siembra de la muestra. Se aprecian células aisladas. (B) Imagen del cultivo de hUSCs en pase 2. Se observa un cultivo homogéneo de células alargadas. Barra de escala: 100 μm .

De cara a establecer un protocolo que permitiera trabajar con células obtenidas en centros diferentes a nuestro laboratorio, se analizaron algunos factores que pudieran influir sobre la estabilidad de las muestras, como pudiera ser la criopreservación (si el aislamiento se realizara en el centro de origen), o el tiempo que podría transcurrir desde la recogida de la muestra hasta la obtención del cultivo celular.

Conocido el uso del DMSO en la criopreservación de células madre mesenquimales²²⁸, se evaluó el efecto de dos concentraciones diferentes de este reactivo sobre la viabilidad celular. Para ello, se sembró el mismo número de células congeladas con las distintas concentraciones de DMSO, y posteriormente se hizo un nuevo pase tras cuantificar las células. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.5**.

Tabla 4.5. Número de células y viabilidad obtenida en diferentes métodos de criopreservación. Se recogen los datos conseguidos con el contador celular automático TC20™ después de haber congelado con DMSO al 10% y DMSO al 5%.

	Contaje total (cel/mL)	Contaje vivas (cel/mL)	Vivas (%)
DMSO 10%	2,43x10 ⁶	2,43x10 ⁶	100
DMSO 5%	2,40x10 ⁶	2,38x10 ⁶	99

Aunque no se encontraban grandes diferencias entre ambas condiciones, tanto el número de células total como la viabilidad obtenida es algo mayor en las células tratadas con DMSO al 10%.

En cuanto a la estabilidad de la muestra a lo largo del tiempo (bien manteniendo la orina tal cual o bien centrifugándola y manteniendo el *pellet* en PBS), se realizaron aislamientos celulares en distintos tiempos tras la obtención de la orina (**Tabla 4.6**). Para ver que el experimento funcionaba correctamente, se utilizaron controles de aislamiento de las células. Para ello, se procesaron las muestras de orina nada más tomar la muestra (que previamente ya se había visto que daban resultados satisfactorios). En el ensayo se utilizaron dos controles diferentes, ya que a partir de una única recogida no se conseguía volumen suficiente para hacer controles de 1 hora, 3 horas y 24 horas. Por lo tanto, la orina de una de las tomas se utilizó como control para las muestras conservadas durante 1 y 3 horas y la segunda toma se usó para ejercer de control de las muestras conservadas durante 24 horas. Como era de esperar, en los controles se consiguió aislar células. Por otro lado, se observó que mantener la orina 24 horas no permite aislar células, ya que se consigue un número bajo de células totales con una viabilidad del 4%. Respecto al mantenimiento durante 1 hora en PBS, los resultados que se consiguieron tampoco fueron muy prometedores. En relación al resto de condiciones, se obtuvieron células sin problema, del orden de 10⁶ y con viabilidades superiores al 80%.

Tabla 4.6. Resumen de los datos conseguidos después de conservar la muestra a diferentes tiempos. Se presentan los datos de las células conseguidas y su viabilidad después de haber mantenido la orina o el *pellet* en PBS durante diferentes horas. Los controles hacen referencia a la orina tratada en el mismo momento de la toma. Se hicieron dos controles distintos: uno para las muestras que se mantuvieron durante 1 y 3 horas y otro para la orina que se conservó durante 24 horas. Los datos fueron recogidos dos semanas después de la siembra de la muestra, contando las células presentes en las placas de 12 pocillos.

	Contaje total (cel/mL)	Contaje vivas (cel/mL)	Vivas (%)
Control (1 h, 3 h)	1,45x10 ⁶	1,12x10 ⁶	77
1 h orina	2,14x10 ⁶	1,77x10 ⁶	83
1 h PBS	5,25x10 ⁵	2,13x10 ⁵	41
3 h orina	2,77x10 ⁶	2,41x10 ⁶	87
3 h PBS	2,83x10 ⁶	2,43x10 ⁶	86
Control (24 h)	1,18x10 ⁶	7,71x10 ⁵	65
24 h orina	2,79x10 ⁵	1,09x10 ⁴	4
24 h PBS	1,76x10 ⁶	1,46x10 ⁶	86

4. CARACTERIZACIÓN CELULAR

Una vez obtenidas las células, era necesario comprobar que se trataban de células madre mesenquimales. Para ello, tenían que cumplir tres criterios según la ISCT¹⁵⁹. En primer lugar, las células deberían crecer adheridas al plástico, condición que ha quedado demostrada en el apartado anterior (**Figura 4.6**). En segundo lugar, el patrón de expresión de marcadores de superficie debería mostrar positividad para CD73, CD90 y CD105 y ser negativo para CD14, CD34 y CD45, comprobado por citometría de flujo.

Por tanto, se analizaron mediante citometría de flujo las células hUSC obtenidas en el laboratorio, comparadas con células mesenquimales comerciales como control positivo y células HEK293 como control negativo. En el caso de las células madre obtenidas en el laboratorio, se estudiaron tanto a pases bajos como a pases altos. El patrón de expresión de antígenos de superficie para los distintos tipos celulares se resume en la **Tabla 4.7**. Por un lado, para los tres marcadores que deberían ser positivos (CD73, CD90 y CD105), las células hUSC (tanto a pases bajos como altos) mostraron altos niveles de fluorescencia. Por otro lado, para los marcadores que deberían ser negativos (CD14, CD34 y CD45) no hubo casi respuesta a los anticuerpos, a excepción del CD45. Hay que destacar que el anticuerpo antiCD45-PE producía más señal de la esperada, tanto en las células comerciales como en las aisladas en el laboratorio, aunque sin alcanzar los niveles de los positivos. Finalmente, las células HEK293 no dieron señal positiva para los marcadores específicos de MSC.

Tabla 4.7. Porcentaje de células positivas dentro de la población para los marcadores estudiados por citometría de flujo. CD73, CD90 y CD105 corresponden a los antígenos que se presentan específicamente en MSCs. No obstante, CD14, CD34 y CD45 son moléculas ausentes en MSCs. FITC, APC, PE y AlexaFluor488 son los diferentes fluoróforos utilizados. Las células de pase bajo están a pase 3 y las de pase alto en el 8.

	CD73- AlexaFluor488	CD90- APC	CD105- PE	CD14- FITC	CD34- APC	CD45-PE
Células madre mesenquimales comerciales	63,4%	81,7%	70,1%	0,8%	1,3%	20,5%
hUSCs pase bajo	78,6%	86,4%	66,1%	6,8%	13,4%	52,4%
hUSCs pase alto	81,7%	43,9%	78,5%	4,5%	2,7%	48,4%
HEK293	36,5%	0,9%	3,5%	2,8%	0,8%	11,3%

La tercera de las características que debe satisfacer una célula para considerarse célula madre mesenquimal, es su capacidad de diferenciarse *in vitro* a osteocito, adipocito y condrocito.

Así, después de realizar una tinción con Alizarin Red para comprobar la diferenciación hacia línea osteogénica, se observó la presencia de depósitos de calcio (rojo) en las células tratadas con medio de diferenciación, pero no en las células control (**Figura 4.7 A-D**). La cuantificación de la cantidad de calcio medida por absorbancia mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) entre las células control y las células diferenciadas (**Figura 4.7 E**) al aplicar el test estadístico de Mann-Whitney.

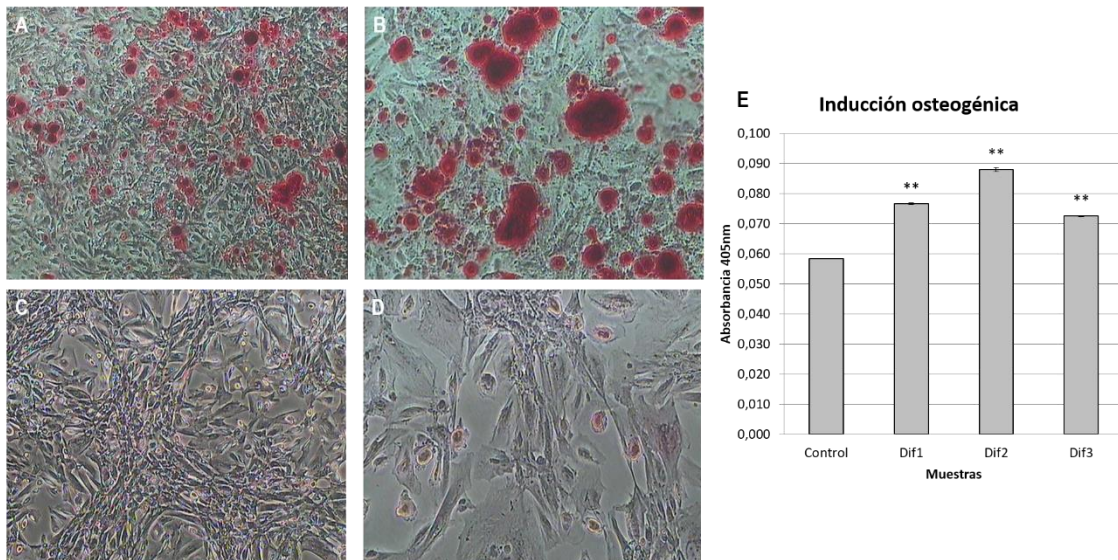


Figura 4.7. Tinción Alizarin Red y cuantificación del calcio presente en las muestras para la observación de la diferenciación del cultivo celular hacia línea osteogénica. (A-D) Fotografías tomadas con un microscopio de fase reversa para células diferenciadas (A: 4X, B: 10X) y control negativo (C: 4X, D: 10X). Teñido en rojo se observan acumulaciones de calcio en las imágenes A y B, pero no en C y D. **(E)** Cuantificación de la producción de calcio, midiendo la absorbancia a 405 nm, en las células control respecto a tres réplicas de células diferenciadas. Las tres muestras diferenciadas presentaban una absorbancia de 0,077, 0,088 y 0,073 mientras que el control negativo tenía un valor de 0,058. ** $p < 0,01$ en relación a las células control.

Teniendo en cuenta el efecto que el medio de cultivo parece tener sobre el perfil epigenético de las células²²⁹ y que el interés de obtener estas células incluye el análisis de nuevas variantes en genes improntados, el siguiente paso consistió en comprobar si el cultivo *in vitro* afectaba de alguna manera al material genético. Mediante un gel de agarosa se evaluó la integridad de los ácidos nucleicos en diferentes pases del cultivo celular concluyendo que había una cantidad adecuada y además mantenían su integridad (**Figura 4.8 A**). Con las técnicas PCR y secuenciación Sanger se comprobó que el material genético era de buena calidad en todas las muestras analizadas. Utilizando el MS-MLPA, no se identificaron alteraciones en el estado de metilación de diferentes loci improntados ni en el número de copias del genoma en la mayoría de los pases. Sin embargo, para los pases 4 y 5 se observaba hipometilación en la sonda correspondiente a *GNAS A/B:TSS-DMR* (**Figura 4.8 B1**). Por ello, se estudió más en profundidad el patrón de metilación del locus *GNAS*. Se pudo observar que no había alteración en ninguna de las regiones analizadas (incluyendo las sondas para *GNAS A/B:TSS-DMR*) (**Figura 4.8 B2**). En conclusión, el medio de cultivo que empleamos no parecía afectar al perfil epigenético de las células, al menos en los pases analizados.

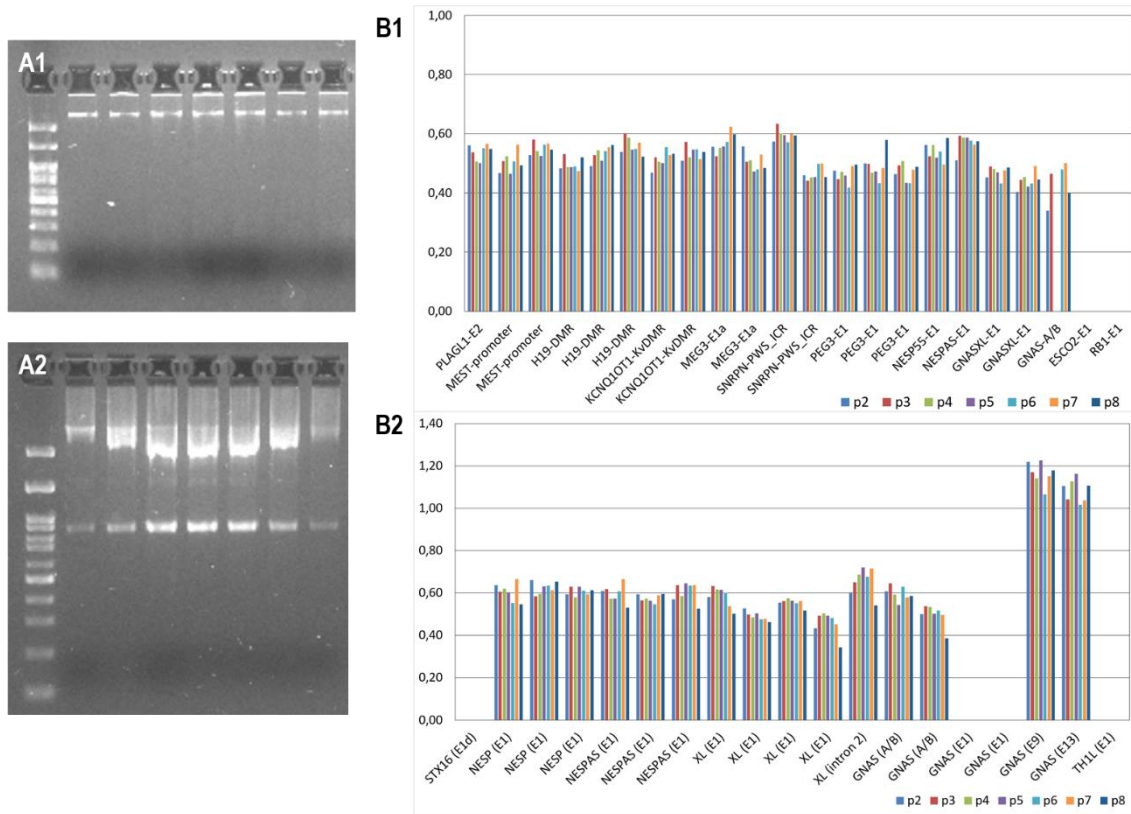


Figura 4.8. Integridad de los ácidos nucleicos y estado de la metilación del cultivo celular. (A1) Electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico y **(A2)** ARN total en diferentes pases (p) celulares. En el caso del ADN, la banda brillante en la parte superior del gel demuestra que el ADN genómico no está degradado. En el caso del ARN, las diferentes bandas que se observan pertenecen al ARN ribosómico. **(B1)** Resultados de MS-MLPA para desórdenes de impronta multilocus. **(B2)** Resultados de MS-MLPA para el locus *GNAS*. Las células se analizaron en diferentes pases para diversos loci improntados.

5. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS NIOPLEXOS Y VIABILIDAD CELULAR

De cara a seleccionar el niosoma con mayor capacidad de transfección en las hUSCs sin comprometer la viabilidad de las células, se hizo un cribado con diferentes formulaciones a diferentes ratios de lípido catiónico/ADN. La formulación con mejores resultados fue la denominada como GPxT-CQ, a una ratio de lípido catiónico/ADN de 5/1. La eficiencia de transfección fue de $6,81 \pm 0,80\%$ y la viabilidad celular de $77,50 \pm 4,70\%$ (**Figura 4.9**). Si bien alguna de las formulaciones presentaba mejor viabilidad (DLT60, por ejemplo), no compensaba su baja tasa de transfección. Por lo tanto, para experimentos posteriores, fue la formulación GPxT-CQ la utilizada. En el caso de la lipofectamina, usada como control positivo, la tasa de transfección fue mucho menor ($0,33 \pm 0,06\%$) con una viabilidad similar ($83,80 \pm 2,11\%$).

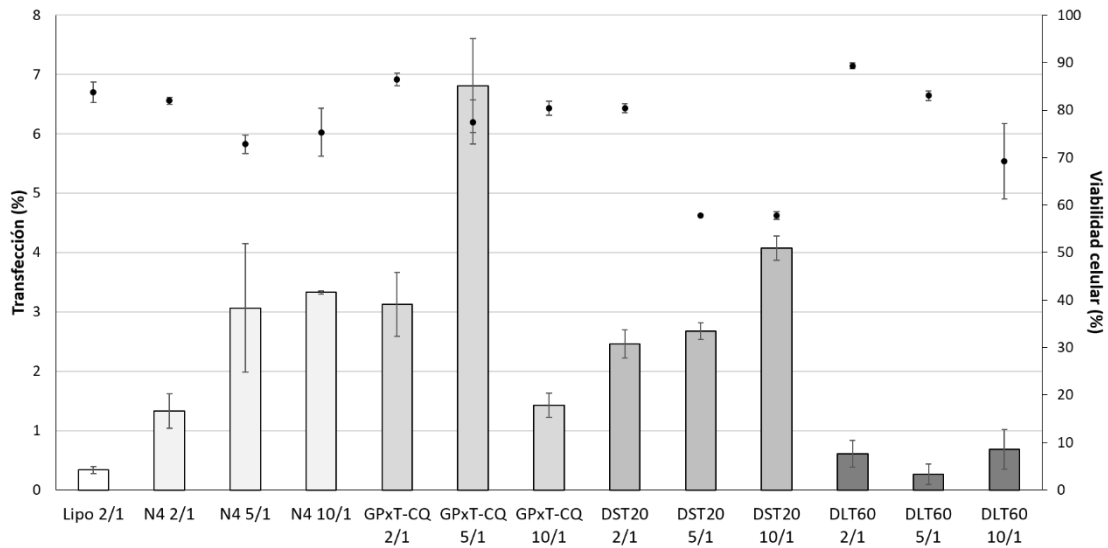


Figura 4.9. Cribado de diferentes niosomas y nioplexos. Se testaron diversos niosomas (N4, GPxT-CQ, DST20 and DLT20) a diferentes relaciones de lípido catiónico/ADN. Las barras representan el porcentaje de transfección medido por citometría de flujo. Los puntos sobre éstas representan la viabilidad. Cada valor representa la media \pm desviación estándar (DE), indicada ésta mediante las líneas negras verticales (n=3).

Estos experimentos se repitieron en varios ensayos posteriores, obteniendo resultados similares, con una baja variabilidad interensayo.

6. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS/NIOPLEXOS

Una vez se estableció los niosoma y nioplexo que se iban a utilizar para experimentos posteriores, fue necesaria su caracterización físico-química para comprobar que cumplieran con los criterios de calidad suficientes respecto a tamaño, carga, forma y homogeneidad. El análisis físico-químico del niosoma nombrado como GPxT-CQ y su nioplexo a una ratio de lípido catiónico/ADN de 5/1, reveló los resultados resumidos en la **Tabla 4.8**. Cuando se incorporó el ADN al niosoma, el tamaño de la partícula se incrementó de 110 nm a 162 nm. Por lo que al potencial ζ respecta, cuando se acomplejó el ADN a la nanopartícula lipídica, éste pasó de $33,4 \pm 5,70$ mV a $21,2 \pm 2,40$ mV. Las medidas tanto del niosoma desacomplejado como del nioplexo, presentaron valores bajos en el índice de polidispersión (Pdl), $0,13 \pm 0,01$ y $0,31 \pm 0,04$, respectivamente.

Tabla 4.8. Caracterización físico-química del niosoma GPxT-CQ y su nioplexo. Se muestran los parámetros obtenidos con el Z-sizer para el niosoma GPx-T-CQ y el nioplexo a una ratio 5/1. Cada valor representa la media \pm la DE (n=3).

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Pdl
GPxT-CQ	109,80 \pm 1,01	33,40 \pm 5,70	0,13 \pm 0,01
GPxT-CQ/DNA (5/1)	162,30 \pm 2,60	21,20 \pm 2,40	0,31 \pm 0,04

Respecto a su estructura, tal y como se ilustra en la **Figura 4.10**, la formulación GPxT-CQ tenía una morfología esférica y multilamelar al ser estudiada con el TEM. Además, no se observaban agregados en la muestra.

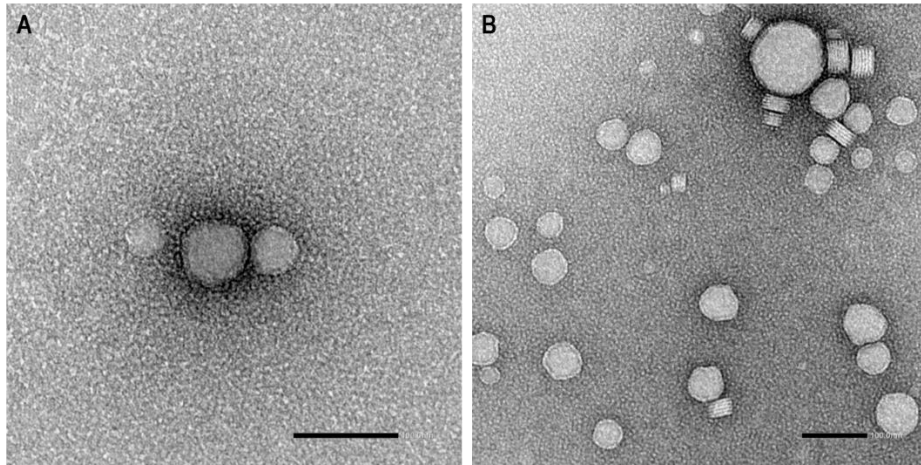


Figura 4.10. Imágenes obtenidas a partir del TEM del niosoma GPxT-CQ. Se muestran dos fotografías diferentes de una suspensión del niosoma. Barra de escala: 100 nm. Aumento de (A) 80.000X y (B) 50.000X.

7. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN CELULAR

Si bien es sabido que la tasa de transfección en cultivos primarios no suele ser muy alta²³⁰, nos interesaba saber a qué podía deberse en el caso de nuestras células. Para evaluar la captación del niosoma GPxT-CQ, se conjugó con ADN (marcado fluorescentemente con FITC) en una ratio 5/1. Tal y como se muestra en la **Figura 4.11**, GPxT-CQ presentaba un porcentaje de captación del $15,16 \pm 1,07\%$, menor que en el caso de la lipofectamina, con la que se conseguía un $31,26 \pm 1,76\%$. Sin embargo, a pesar de tener una menor eficiencia de captación, la formulación fue menos tóxica que la lipofectamina, ya que las viabilidades fueron $64,20 \pm 1,05\%$ y $39,56 \pm 1,82\%$ respectivamente. Como se observa en las fotografías tomadas con el microscopio en la **Figura 4.11**, las células tratadas con GPxT-CQ mantenían su morfología y tenían un aspecto más sano.

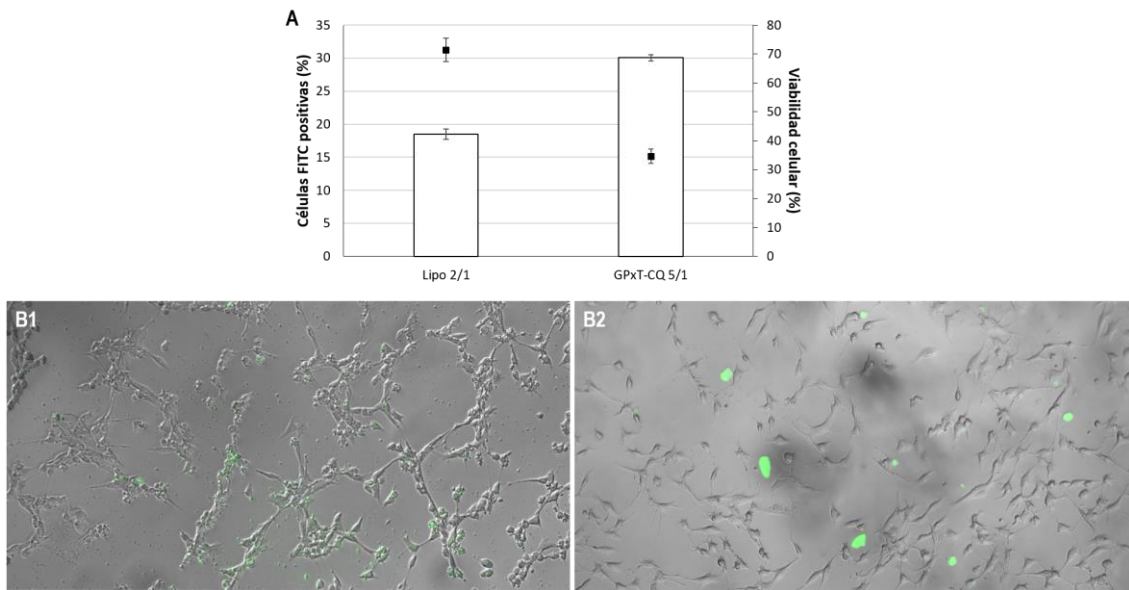


Figura 4.11. Captación de nioplexos acoplados con FITC en células hUSC. La lipofectamina se añadió en una reacción de masa 2/1 y GPxT-CQ a 5/1. **(A)** Porcentaje de células positivas para FITC y su viabilidad. Los datos representan la media \pm DE (n=3). **(B)** Microfotografías de fluorescencia de células hUSC incubadas durante 4 h con nioplexos etiquetados con FITC (verde). **(B1)** Células tratadas con lipofectamina, **(B2)** Células tratadas con GPxT-CQ.

8. ESTUDIOS DE TRÁFICO DE LOS NIOPLEXOS

La eficiencia de la transfección puede estar directamente influenciada por la vía de internalización por la cual acceden las formulaciones al interior celular y también por su transporte intracelular hasta el núcleo²³¹. Por lo tanto, con el fin de aclarar el proceso de transfección del vector no viral GPxT-CQ en las hUSCs y entender por qué la eficiencia de transfección es baja, aun habiendo captación, se realizaron estudios de tráfico celular.

Los análisis de internalización celular del nioplexos GPxT-CQ/DNA 5/1 se resumen en la **Figura 4.12**. Inicialmente, con el Coeficiente de Correlación Cruzada (CCF) se midió la colocalización de las imágenes roja y verde al desplazarlas una respecto a la otra. A continuación, se representó la función de ese desplazamiento (δx) mediante el Coeficiente de Correlación de Pearson (PCC). Principalmente, la colocalización entre la endocitosis y la formulación acoplada con el ADN ocurrió con la CvME (vía de las caveolas). En ese caso, el valor del PCC se encontraba en $0,36 \pm 0,004\%$. La macropinocitosis también parecía ser una vía de entrada del nioplexos analizado, ya que el valor de PCC fue de $0,24 \pm 0,005\%$. Eso se traduce en que existe una correlación moderada en la colocalización de la toxina colérica B (caveolas) y el pCMS-EGPF unido a FITC y el dextrano (macropinocitosis) y pCMS-EGPF unido a FITC, lo cual indica que el nioplexos utiliza sobre todo estas vías para penetrar en la célula. Por el contrario, el valor de PCC fue prácticamente nulo con la transferrina (clatrin) y el *lysotracker* (lisosomas), por lo tanto,

se puede interpretar que el nioplexo no utiliza las clatrin como vía de internalización y no circula a través de los lisosomas.

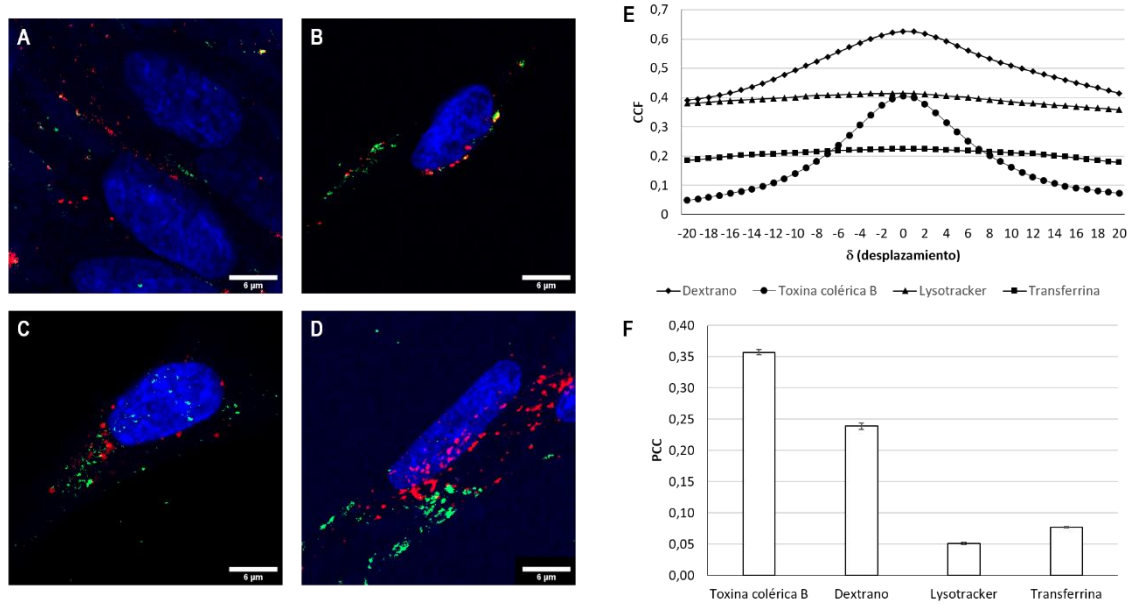
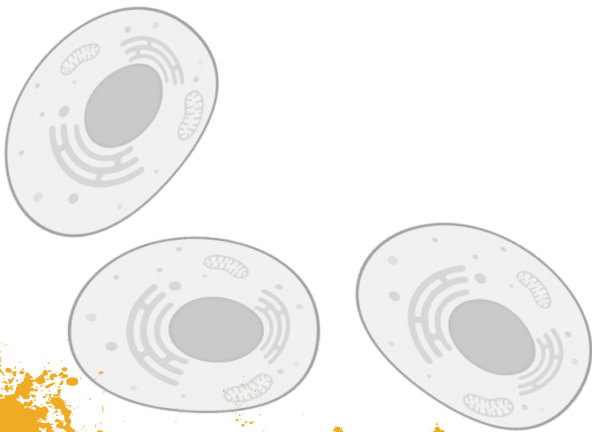


Figura 4.12. Imágenes de microscopía confocal de hUSCs mostrando diferentes vías endocíticas y cuantificación de la colocalización. En verde se muestra el plásmido pCMS-EGPF unido a FITC y en rojo los marcadores de las vías endocíticas. **(A)** endocitosis por caveolas (toxina colérica B), **(B)** macropinocitosis (dextrano), **(C)** lisosomas (*lysotracker*), **(D)** endocitosis por clatrin (transferrina). Barra de escala: 6 μ m. **(E)** Se muestra el valor CCF de la colocalización entre las imágenes rojas y verdes obtenidas a partir de la microscopía confocal. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3). **(F)** Se resume el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) de las señales roja y verde determinadas por la CCF en cada caso. Los datos se representan como la media \pm DE (n=3).



5. DISCUSIÓN

El término pseudohipoparatiroidismo (PHP) hace referencia a un grupo heterogéneo de enfermedades raras, relacionadas entre sí por presentar defectos genéticos y epigenéticos en la región codificante de la subunidad alfa de la proteína G estimuladora ($G_s\alpha$)¹⁸. La identificación de síndromes con características clínicas comunes y la observación de que éstos estaban causados por alteraciones en la misma vía metabólica¹, generó la propuesta de agruparlos todos bajo un mismo término. Así, se conoce como iPPSD a los desórdenes causados por la inactivación de la vía de señalización de PTH/PTHrP (*inactivating PTH/PTHrP Signalling Disorders*)⁴. Para proceder al diagnóstico clínico de iPPSD, se han propuesto diferentes criterios, unos mayores (resistencia a la PTH, osificaciones ectópicas y braquidactilia) y otros menores (resistencia a la TSH, resistencia a otras hormonas, retraso del crecimiento intrauterino o postnatal, obesidad/sobrepeso, puente nasal plano y/o hipoplasia maxilar y/o cara redondeada)⁴. La validez de estos criterios fue evaluada en una cohorte retrospectiva de pacientes, demostrando que permitían identificar como iPPSD al 98% de los probandos analizados²³². Además, esta clasificación se subdivide añadiendo al término iPPSD un número en función del defecto molecular que presente el paciente. Así, iPPSD1 está causado por una variante de pérdida de función en el gen *PTHR1*, iPPSD2 en el gen *GNAS*, iPPSD3 se asocia con defectos en la metilación del locus *GNAS*, iPPSD4 está relacionado con variantes patogénicas en *PRKR1A*, iPPSD5 en *PDE4D* e iPPSD6 en *PDE3A*. Si tras el estudio molecular no se identificara ninguna alteración en el paciente, se clasificaría como iPPSDx⁴. Si se identificasen y validasen nuevos genes llevarían los números consecutivos.

Si bien aún no hay datos de prevalencia de iPPSDx en series grandes dado que la clasificación es relativamente reciente y se carece de estudios prospectivos, estudios previos sugerían que en aproximadamente el 10-20% de los pacientes con sospecha clínica de pseudohipoparatiroidismo y enfermedades relacionadas no se identificaba una causa genética^{20,47,48,233}. Sin embargo, es importante tener presente algunos aspectos que podrían afectar a ese porcentaje: (i) es posible establecer la combinación de braquidactilia con dos criterios menores, y clasificarse por tanto como iPPSD, y tratarse de alguno de los diagnósticos diferenciales (como el síndrome de *AHO-like* o braquidactilia asociada a discapacidad intelectual^{234,235}), (ii) dada la deficiencia de vitamina D observada frecuentemente en nuestro entorno²³⁶, tiende a ser un analito no solicitado en los análisis del metabolismo fosfocálcico, con sus implicaciones en la valoración de PTH elevada, (iii) algunas de las características clínicas asociadas a iPPSD aparecen con el tiempo²⁰, (iv) dada la infrecuencia de estas patologías, no suelen ser muy conocidas por los clínicos, ni tampoco sus diagnósticos diferenciales^{20,225,237}.

Durante el desarrollo del presente trabajo se ha intentado identificar nuevos mecanismos o genes responsables de la enfermedad en pacientes referidos por clínica compatible con iPPSD o braquidactilia bilateral, considerada ésta como el criterio fenotípico más objetivo y con la intención de profundizar en los criterios menores a los que debe asociarse principalmente para satisfacer las características de iPPSD. Asimismo, se ha desarrollado un modelo celular que permitirá realizar estudios funcionales para validar la patogenicidad de nuevas variantes, así como abrir nuevas líneas hacia la terapia génica aplicada a estas patologías.

1. ESTUDIO MOLECULAR

1.1. ANÁLISIS DE LAS CAUSAS (EPI)GENÉTICAS CONOCIDAS

De los 75 pacientes reclutados, se identificó alteración en la secuencia de GNAS en 17 familias, clasificándolos como iPPSD2. La mayoría de los defectos genéticos encontrados son mutaciones privadas y se limitan a un único paciente, a excepción de la variante c.568_571del, descrita como el único *hotspot*⁴⁹, que estaba presente en dos pacientes de la serie actual. Si bien el número de variantes identificadas no es muy alto, la distribución de las mismas es distinta a lo descrito en la cohorte europea más amplia publicada⁴⁷. Según los estudios previos, los exones donde más frecuentemente se encuentran variantes son el 1 y el 7. En nuestra cohorte el exón 7 fue el que más alteraciones sumaba (3 en total, suponiendo un 21,4%). El exón 1 también presentaba un alto porcentaje de mutaciones (14,2%). Sin embargo, por encima del exón 1 y a la par del 7 (21,4%), sorprendía la tasa de mutación del exón 12. Según los estudios de Elli et al.⁴⁷, el exón 12 entra en el grupo de los exones en los que se encuentran pocas variantes, llegando a sumar únicamente el 3%. Aunque en menor medida, también sorprenden los casos de los exones 8 y 11, que también se ven más alterados que las prevalencias previamente descritas y el caso del exón 5, que en nuestra cohorte no se ha visto alterado.

En el caso de las alteraciones noveles (ocho), se hizo el estudio de cosegregación y se encontraron las variantes en tres de las madres. Tras el diagnóstico, las mujeres fueron reevaluadas clínicamente y las PHP1242-M y PHP1267-M presentaban clínica compatible. La primera de ellas tenía talla baja, braquidactilia y calcificaciones subcutáneas. La segunda presentaba talla baja. Por el contrario, la PHP1283-M se consideraba sana, ya que no parecía presentar ninguna característica relacionada con iPPSD2. Probablemente, si se le realizaran más estudios, se le encontraría acortamiento de los huesos de la mano, dado que es una de las características más predominante en estos casos^{232,238} y que en determinados casos solo es detectable al realizarse radiografías. Se estudió el origen parental de la variante a partir de ARN en las tres y se encontró que todas ellas tenían la alteración en el alelo paterno, por lo que se

clasificaron como iPPSD2pat. A pesar de que en dos de las madres se les encontró un fenotipo compatible después de identificar la variante en las descendientes, estos rasgos pasaron desapercibidos previamente. De hecho, los iPPSD2pat habitualmente pasan desapercibidos y se les diagnostica a raíz de caracterizar a sus descendientes²³². También hay que resaltar el hecho de que los casos de iPPSD2pat son poco frecuentes, se sitúan en un 4%⁴⁷. Esto puede ser debido, como en el caso de las dos madres de esta serie, porque hay rasgos y características que a veces se pasan por alto ya que, al tratarse de enfermedades raras, hay gran desconocimiento por parte de los clínicos. Por tanto, es posible que los pacientes con iPPSD2pat estén infradiagnosticados.

Respecto al tipo de mutación, de las catorce variantes encontradas, nueve producían proteína truncada (cinco *frameshift*, dos *nonsense* y dos alteraciones en el *splicing*) y, por lo tanto, era probable que la mayoría de los pacientes presentaran una haploinsuficiencia completa de $G_s\alpha$. Estudios previos sugieren que las mutaciones que producen proteína truncada en el gen *GNAS* son el 66%⁴⁷, porcentaje muy similar al obtenido tras estudiar nuestra cohorte.

Trabajos más recientes en busca de nuevas causas genéticas que pudieran explicar el porcentaje de pacientes con sospecha clínica de PHP1A/PPHP/POH demostraban la existencia de deleciones intragénicas o intralocus²³⁹. Así, en el presente trabajo se identificaron tres deleciones. En la deleción de los tres pacientes se incluía, como mínimo, el gen *GNAS* completo. En el caso de PHP1204, se delecionó el gen completo, desde el exón A/B hasta el exón 13 del gen *GNAS*. Por su parte, en los pacientes PHP1220 y PHP1251 se perdió el locus completo en heterocigosis. Además del locus *GNAS*, la deleción también incluía el gen *STX16* en ambos casos.

De acuerdo con la literatura, los pacientes con PHP1B/iPPSD3 presentan defectos epigenéticos del locus *GNAS* que involucran algunos o todos los DMR^{65,240}, con cambios de metilación completos o parciales²⁴¹; sin embargo, *GNAS A/B:TSS-DMR* siempre se ve afectado⁴⁷. En la serie actual se han identificado 12 pacientes con alteración de la metilación. Entre los que tenían alterado completamente el patrón de metilación en varios DMR, a la mayoría (siete pacientes) no se les identificó una alteración molecular subyacente. Sin embargo, a uno de los pacientes se le encontró una iupd(20)pat. En estos casos, como el individuo tiene la dotación cromosómica de un único progenitor, el patrón de metilación es el específico del progenitor del cual se hereda⁸³, en este caso, el cromosoma 20 presentaba el patrón correspondiente al cromosoma paterno. Trabajos previos han establecido la frecuencia de disomía uniparental para pacientes con spor-iPPSD3 entre el 10%⁴⁷, el 18%⁸³ o el 24%⁸³, en función de cómo se realiza la selección de la serie sobre el que calcularla. En nuestra cohorte estudiada, ese porcentaje fue parecido, situándose en un 12,5%. En cuatro casos, se identificó pérdida de la metilación

afectando únicamente *GNAS A/B:TSS-DMR*. En tres de ellos se observó la delección clásica en el gen *STX16*⁶⁷. En base a estudios realizados previamente, se sugiere que esta delección interrumpe un elemento regulador en *cis* para la metilación de *GNAS A/B:TSS-DMR* cuando es heredado por vía materna²⁴². En nuestra cohorte, en dos de los pacientes se encontró la delección también en la madre. En el tercer caso, no se disponía de la muestra de la madre. Por otra parte, en la paciente PHP1301, se observa una pérdida de metilación aislada en *GNAS A/B:TSS-DMR* pero sin delección asociada. A pesar de que la pérdida de metilación aislada en *GNAS A/B:TSS-DMR* sin delección asociada se ha descrito previamente⁴⁷, en esos casos se trataban de pérdidas parciales de la metilación, hipotetizando con la posibilidad de que este tipo de pérdida de metilación pudiera ser debida a alteraciones puntuales en el gen *STX16*⁴⁷. Sin embargo, la paciente PHP1301 presentaba una pérdida completa de la metilación en dicha región. En algún caso, se ha visto que la causa de la pérdida de metilación en *GNAS A/B:TSS-DMR* ha sido debida a una inversión en el locus *GNAS*²⁴³. Delecciones que incluyen *GNAS-NESP:TSS-DMR*⁷¹ o *GNAS-AS1:TSS-DMR*⁷² también pueden resultar en AD-iPPSD3 en los que se ven alterados todos los DMR, pero los estudios por NGS descartan esas posibilidades en esta paciente. Es posible que, en el caso de esta paciente, su pérdida en la metilación pudiera deberse a algún gen localizado en otro cromosoma como se ha propuesto en pacientes con pérdida de la metilación de toda la región⁸⁴. Un trabajo relativamente reciente propone también el estudio de la región *GNAS-AS2:TSS-DMR* para diferenciar los pacientes con AD-iPPSD3 debido a alteraciones en *STX16* o en nuevos defectos genéticos subyacentes²⁴⁴. Estos estudios están en nuestro grupo pendientes de realización, junto con análisis de exoma y/o genoma.

Si nos fijamos en los defectos moleculares identificados en todo el locus *GNAS*, de los 29 pacientes 12 correspondían a defectos epigenéticos (41,4%) y 17 a alteraciones en la secuencia (58,6%). Al desglosarlo, el 13,8% eran pacientes con pérdida de metilación aislada en *GNAS A/B:TSS-DMR*, el 27,6% tenían alterados más DMRs, el 48,3% presentaban alteraciones puntuales en la secuencia y el 10,3% restante tenían reordenamientos estructurales. Al compararlo con investigaciones previas⁴⁷, el porcentaje de pérdida de metilación aislada en *GNAS A/B:TSS-DMR* y el de las variantes puntuales era bastante similar. Sin embargo, en nuestra cohorte se vio un porcentaje más elevado de reordenamientos estructurales, probablemente porque tras su descripción en 2015²³⁹, en nuestro grupo de investigación se analizan sistemáticamente este tipo de alteraciones y el artículo de Elli y colaboradores recoge una serie retrospectiva publicada en 2016⁴⁷, por lo que es posible que en algunos paciente no se analizara esta posibilidad. Por su parte, el porcentaje de alteración en el patrón de metilación afectando a varios DMR es más bajo que el descrito.

El hecho de que algunos datos no concuerden con lo publicado previamente en la bibliografía puede deberse a que los pacientes reclutados para este trabajo son parte de una cohorte pequeña que, si bien no tiene ningún sesgo en su selección, no es *a priori* comparable con series mucho más amplias.

La acrodisostosis (ACRDYS) engloba un grupo de displasias esqueléticas raras que fue descrita inicialmente por Maroteaux y Malamut²⁴⁵. Esta patología se asocia con braquidactilia severa, talla baja, disostosis facial, edad ósea acelerada y retraso en el desarrollo, entre otras manifestaciones⁸⁸. Algunas características clínicas, bioquímicas y radiológicas se solapan con aquellas de iPPSD2²⁰. Respecto a los genes causantes de acrodisostosis, en la presente serie se identificaron dos variantes en el gen *PRKAR1A*, una *missense* (novedad y probablemente patogénica) y la otra *nonsense*, concretamente la mutación más recurrente (p.R368*) ya descrita como patogénica. Asimismo, se encontraron variantes *missense* o probablemente patogénicas en *PDE4D* en tres pacientes (todas ellas noveles) (**Tabla 4.1**). Por tanto, al igual que lo descrito en la literatura, el perfil de mutaciones más frecuentemente observado en pacientes con *PDE4D* fue el de mutaciones *missense de novo*^{89,108,246}.

1.2. CORRELACIÓN GENOTIPO-FENOTIPO

Clásicamente, los pacientes con PHP se describen por presentar hipocalcemia e hiperfosfatemia debida fundamentalmente a resistencia a la PTH⁵². En esta serie, todos los pacientes con diagnóstico de iPPSD2mat cursaban con resistencia a la PTH. Asimismo, en concordancia con lo que ya había sido descrito previamente⁵⁷, la mayoría de pacientes con iPPSD2pat no tenían resistencia a la PTH, pero sí diferentes rasgos del fenotipo AHO. Sin embargo, es de reseñar el caso de dos pacientes con diagnóstico de iPPSD2pat que presentaron resistencia a la PTH (PHP1025 y PHP1170). Además, el PHP1025 también presentaba resistencia a la TSH. En el año 2015 ya se describió en la literatura el caso de un paciente iPPSD2pat con resistencia hormonal⁵⁸, y se mencionan otros pacientes también con valores de PTH elevada, aunque no siempre pueda definirse una resistencia^{59-61,247,248} debido a la falta de datos sobre los niveles de vitamina D, como también es el caso de estos pacientes. Curiosamente en todos estos casos de iPPSD2pat con valores de hormona sugestivos de resistencia a la PTH, se observaron valores normales de calcio y fósforo^{58-61,247,248}, al igual que ocurría con nuestros dos pacientes. Por lo tanto, aunque son casos muy puntuales, no podemos obviar que los pacientes con iPPSD2pat también pueden presentar resistencia a la PTH (probablemente con valores normales de calcio y fósforo) y a la TSH, e incluso deficiencia de hormona de crecimiento (GH)^{58-61,247,248}, aunque es necesario realizar estudios en series más amplias para conocer su evolución. Además, como ya indicaban Turan y colaboradores⁵⁸, parece posible que el iPPSD2pat a veces se

diagnostique erróneamente como iPPSD2mat, ya que hay varios casos reportados como iPPSD2mat que podrían ser iPPSD2pat, puesto que no se confirmó el origen paterno del defecto genético y el calcio sérico fue normal²⁴⁹⁻²⁵². En el caso concreto de PHP1025 y PHP1170, dado que además de PTH elevada también presentaban retraso cognitivo el primero y obesidad el segundo, se valoró la sospecha clínica de iPPSD2mat. Un posible valor clínico discriminativo entre ambos podría ser la presencia de retraso del crecimiento intrauterino, más marcado en los pacientes con iPPSD2pat²⁵³, rasgo presente, de hecho, en ambos pacientes.

El solapamiento clínico entre iPPSD2pat e iPPSD2mat no se queda ahí, ya que, aunque en nuestra cohorte no se vio, estudios previos han descrito un paciente con una variante en el gen *GNAS* heredada por vía materna en la que se apreciaba AHO sin resistencia hormonal, lo que inicialmente sugeriría un diagnóstico de iPPSD2pat⁴⁷. Esto podría ser debido a que la resistencia a la PTH, así como algunas características típicas de AHO como la braquidactilia aparecen con la edad²⁰. En el trabajo de Elli y colaboradores no se indica la edad del paciente.

De hecho, al analizar la presencia o ausencia de braquidactilia en los pacientes con iPPSD2, se observaba que aquellos que la presentaban, tenían una edad media de 8,76 años, mientras que aquellos a los que no se les detectó braquidactilia (o se desconocía ese dato) tenían una edad media de 4 años. Como se ha mencionado, esto puede explicarse ya que la braquidactilia es un rasgo que no se suele apreciar en una infancia temprana, sino que se va haciendo más visible según va avanzando la edad y normalmente se evidencia antes de la adolescencia^{237,254,255}. Lo mismo ocurre con las alteraciones bioquímicas y otros rasgos, que pueden pasar desapercibidos en una primera evaluación al ser jóvenes y desarrollarse con la edad. Otros síntomas aislados durante la infancia, como pudieran ser los criterios considerados menores en la clasificación iPPSD, también se consideran poco específicos para poder proceder al diagnóstico de iPPSD. Por ello, es muy importante el papel de los pediatras a la hora de identificar casos sugestivos de iPPSD²³².

Los pacientes con iPPSD2 pueden presentar osificaciones ectópicas. La osificación ectópica no es una calcificación y no está relacionada con los niveles séricos de calcio y fósforo, sino una manifestación de la deficiencia de $G_s\alpha$ en las células madre mesenquimatosas, con formación *de novo* de osteoblastos extraesqueléticos que forman islas de hueso ectópico en la dermis y la grasa subcutánea²⁰. En la serie actual, 5 de los pacientes iPPSD2pat (41,7%) y 13 de los iPPSD2mat (56,5%) las presentaban, porcentajes similares a los descritos en series más amplias y recogidos en el consenso internacional²⁰. Es habitual encontrar este rasgo en los pacientes ya que es uno de los más característicos del fenotipo AHO⁵². De hecho, según el mencionado

consenso, las osificaciones ectópicas deben considerarse como un signo específico de mutaciones *GNAS* (específicamente cuando se observan al nacer o en la primera infancia)²⁰.

Dentro de los pacientes con alteraciones en el gen *GNAS*, cabe destacar el caso de la paciente PHP1283. Ésta tenía un diagnóstico clínico combinado de iPPSD2mat y síndrome nefrogénico de antidiuresis inapropiada (NSIAD, *Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis*). El NSIAD se caracteriza por la presencia de hiponatremia debida a un fallo en la excreción de agua libre y niveles bajos o indetectables de hormona antidiurética (ADH) en plasma⁴⁵, hormona que también ejerce su función a través de un receptor acoplado a proteína G²⁵⁶. Si bien el iPPSD2 está causado por mutaciones inactivantes en el gen *GNAS*^{52,56}, en la bibliografía se ha descrito que las variantes en *GNAS* que cursan con NSIAD son activantes^{44,45}. Por tanto, lo más probable es que la variante p.Leu199Phe identificada en esta paciente tenga una actividad mixta, activante e inactivante, al igual que se ha descrito para pacientes con testotoxicosis^{257,258} y con diarrea neonatal transitoria²⁵⁹. En la actualidad estamos desarrollando estudios funcionales para confirmar esta hipótesis.

Satisfaciendo el diagnóstico clásico de PHP⁵², todos los pacientes con iPPSD3 de nuestra cohorte presentaron resistencia a la PTH, tal y como se ha descrito en la bibliografía^{4,20,51}. Además, seis de ellos (50%) tenían resistencia a la TSH, característica también descrita previamente⁴. Esta patología también se ha asociado en casos aislados con resistencia a otras hormonas⁴ y en nuestra cohorte dos de los pacientes tenían resistencia a hormonas aparte de la PTH y la TSH. Uno de esos dos pacientes fue el PHP1256, que tenía isodisomía uniparental paterna del cromosoma 20 (iupd(20)pat), lo que podría poner de manifiesto enfermedades de herencia recesiva que quizá explicaran alguna de esas otras resistencias²⁶⁰.

Si bien la mayoría de los pacientes con defectos epigenéticos presentaba resistencia hormonal (limitada a la PTH o resistencia a múltiples hormonas), tres pacientes presentaban junto a la resistencia hormonal algunos signos de sugestivos de AHO, como se ha descrito previamente^{47,53,261}: la paciente PHP1199 padecía obesidad, la PHP1219 braquidactilia y la PHP1250 osificaciones subcutáneas. Si bien la obesidad y la braquidactilia ya habían sido descritas en las series previas, caracterizándolas como más leves de las que presentan los pacientes con alteraciones estructurales en el gen *GNAS*²⁶¹, son muy pocos los casos de iPPSD3 en los que se hayan identificado osificaciones subcutáneas²⁰.

A los pacientes con spor-iPPSD3 se les diagnosticó a una edad media de 19,07 años y a los AD-iPPSD3 a los 28,91 años. Es decir, los casos spor-iPPSD3 se diagnosticaron una media de aproximadamente 10 años antes que los casos AD-iPPSD3. No obstante, estos datos podrían ser

consecuencia del bajo número de pacientes analizados, ya que en principio, las edades en las que aparecen las manifestaciones clínicas son parecidas tanto en los casos esporádicos como en los familiares^{47,262}.

En cuanto la edad al diagnóstico de pacientes con alteraciones en *GNAS*, trabajos previos señalaban que la edad de diagnóstico de los pacientes con iPPSD2 era menor que la de los pacientes con iPPSD3^{53,261}. Al analizar las edades de diagnóstico de la presente serie, la media era efectivamente más alta en los pacientes con iPPSD3 (21,53 años) que en los iPPSD2 (9,12 años). Esto puede deberse al hecho de que el diagnóstico se realiza de manera más temprana cuando hay fenotipo de AHO⁴⁷, característica generalmente ausente en iPPSD3. Es por eso que los pacientes diagnosticados en la infancia (normalmente por presentar fenotipo AHO) suelen tener mutaciones puntuales en el gen *GNAS*. Sin embargo, cuando se diagnostican en la etapa adulta, normalmente por síntomas de hipocalcemia, suelen verse alteraciones en el patrón de metilación del locus *GNAS*²⁶³. Se ha sugerido que esto podría explicarse por el hecho de que la expresión de proteína G es menor en la hipófisis, túbulo renal proximal, glándulas tiroideas y gónadas en pacientes con mutaciones en *GNAS* que en aquellos con pérdida de metilación, como se comprobó cuando se comparó la actividad funcional de $G_s\alpha$ ²⁶⁴, y eso explicaría la diferente gravedad de la sintomatología asociada a los distintos mecanismos moleculares²⁶¹. Por otra parte, al comparar el porcentaje de casos de iPPSD2 e iPPSD3 en la serie completa de alteraciones en *GNAS*, se aprecia cómo la proporción en ambos diagnósticos es parecida, como también se había observado en otros estudios^{47,261} en los que también se recibían pacientes tanto de consultas de endocrinología pediátrica como de adultos.

Clásicamente, se describe que los pacientes con acrodisostosis presentan rasgos óseos más marcados, como una braquidactilia más severa^{265–267} o talla más baja^{20,267}, que los iPPSD2. Además, la hipoplasia facial también es más marcada en los pacientes con iPPSD4 o iPPSD5²⁰. En general, asocian un fenotipo más complejo y dismórfico²³². A pesar de esto, la paciente PHP1300 que llegó al laboratorio con sospecha de iPPSD2pat porque únicamente presentaba talla baja y una leve braquidactilia, sin resistencia hormonal, finalmente presentó una alteración en *PDE4D*, lo que la clasificó como iPPSD5. Esta es una nueva prueba del solapamiento clínico en estas entidades. Por otra parte, está descrito que el inicio de la clínica en los pacientes con iPPSD4 e iPPSD5 es más temprano que en aquellos con iPPSD2mat²⁶⁷, principalmente porque los primeros presentan un retraso del crecimiento intrauterino más marcado y una braquidactilia que se diagnostica en los primeros años de vida²⁰. Sin embargo, en nuestra cohorte se observó que la edad media del diagnóstico para los pacientes con iPPSD4 fue de 17 años, 6,56 años para iPPSD5 y para iPPSD2mat de 9,14 años. Por lo tanto, esas diferencias en la edad al diagnóstico no

siempre son tan evidentes como lo descrito anteriormente. Nuevamente, esto puede deberse a que el tamaño de nuestra muestra era muy pequeño y además teníamos muy pocos casos de iPPSD4 e iPPSD5 al compararlos con los iPPSD2mat. También hemos de tener en cuenta que el gen *GNAS* se asoció con PHP1A/PPHP/POH/iPPSD2 en el año 1990^{268,269}, mientras que los genes responsables de iPPSD4 y 5 se han descrito en los años 2011⁹⁷ y 2012⁸⁹⁻⁹¹ respectivamente, lo que también podría explicar que pacientes con sospecha clínica de acrodisostosis en su infancia no hayan tenido un diagnóstico molecular hasta más recientemente. O también a que las braquidactilias presentes en varios de los pacientes de la presente serie no fueron tan marcadas como lo descrito en la literatura.

Es curiosa esa diferencia en edad al diagnóstico de los pacientes con iPPSD4 e iPPSD5, dado que no es lo descrito previamente⁹². Es especialmente llamativo la edad tan alta de diagnóstico para iPPSD4, aunque pudiera deberse al diagnóstico tardío de la paciente PHP1260, que no presentaba el patrón de braquidactilia tan marcado como cabría esperar, ni resistencia a la PTH. La resistencia hormonal en acrodisostosis es una característica inicialmente específica de iPPSD4^{4,97}, aunque en la literatura científica también ha sido descrito el caso de un paciente con BDE y alteración en *PRKAR1A* sin resistencia a la PTH⁹⁴. Se trataba de una variante en la que no se pudo establecer la patogenicidad (se predecía *in silico* como probablemente patogénica), ya que no se pudo esclarecer el efecto sobre la proteína por falta de estudios funcionales. Por lo tanto, se concluyó con la posibilidad de que la mutación encontrada no fuera la responsable del fenotipo. En nuestro caso, la alteración novel c.586G>A de la paciente PHP1260 también se predijo *in silico* como probablemente patogénica. Al estudiar a los familiares, se vio que la alteración estaba presente en varios de ellos, cosegregando con el fenotipo. En conclusión, aunque pudieran requerirse estudios funcionales para confirmar la patogenicidad de la variante, los estudios *in silico* y de cosegregación apuntaban a considerarla como posiblemente patogénica. Bien es cierto que la resistencia a la PTH es menos marcada en iPPSD4 que en iPPSD2mat, lo que podría incluso llevar a la necesidad de analizar no solo los niveles de PTH basales, sino también post-estímulo en algunos pacientes²⁶⁷. Y tampoco podemos cerrar la puerta a la posibilidad de que, de igual manera que es posible identificar pacientes iPPSD2pat con resistencia hormonal, sea posible la existencia de pacientes iPPSD4 sin ella.

1.3. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS CAUSAS GENÉTICAS

En humanos se estima que, en cada replicación del ADN, se produce un error cada 100 Mb, generando entre 30-100 mutaciones *de novo* a lo largo del genoma en cada generación²⁷⁰. Afortunadamente, muchas de estas variantes son sinónimas o en regiones no codificantes, pero otras muchas son causa de enfermedad. Por otra parte, se presupone que estas mutaciones *de*

de novo ocurren en las células germinales, por lo que generan un embrión con una mutación constitutiva. Sin embargo, estas mutaciones pueden ocurrir post-zigóticamente, dando lugar a mosaicismo embrionario^{271,272}.

Las enfermedades raras, por su infrecuencia, se enfrentan a varios problemas debido a su heterogeneidad clínica y genética: pasan desapercibidas o no siempre son correctamente diagnosticadas y, en los estudios familiares, *a priori*, esperamos que los padres sanos sean no portadores. Esta situación conlleva decisiones apresuradas en la interpretación de los estudios genéticos. Más si éstos se ven limitados por su resolución técnica²⁷³. Así, nos enfrentamos a diferentes escenarios:

- Las mutaciones con un bajo grado de mosaicismo están por debajo de los niveles de sensibilidad y especificidad de las técnicas de secuenciación y (MS)-MLPA clásicas. Si se trata del caso índice, podremos emitir un diagnóstico genético de normalidad, no confirmando la sospecha clínica. Si se trata de un estudio familiar, podremos indicar que la mutación ha ocurrido *de novo* y que el riesgo de recurrencia es muy bajo. Ambas interpretaciones serían erróneas.

En el ámbito de las enfermedades de impronta, como en iPPSD2, se han descrito pacientes en los que se han observado cualquiera de estas situaciones: resultado negativo con técnicas convencionales^{274,275}, mosaicismo restringido a determinados tejidos²⁷⁶, progenitores portadores en mosaico inicialmente no identificado^{261,277}.

- Algunas características de las enfermedades raras están presentes en muchos cuadros clínicos: retraso en el desarrollo, obesidad, talla baja, ... lo que implica que la ausencia de confirmación molecular pueda interpretarse como error en el diagnóstico clínico y no como una falta de detección de la alteración genética por limitación técnica.

Si bien, como hemos mencionado, las mutaciones pueden ocurrir *de novo*, las tecnologías de nueva o segunda generación (NGS) están permitiendo identificar alteraciones en mosaico en los progenitores de esos pacientes^{278,279} o mutaciones *de novo* en nuevos genes previamente no asociados a dicha sospecha clínica^{280,281}.

1.3.1. MOSAICISMO COMO CAUSA SUBYACENTE

Para poder estimar la presencia de mosaicismos en el gen *GNAS*, decidimos abordarlo desde el análisis de progenitores supuestamente no portadores. Para ello, en este estudio se incluyeron no solo las 12 familias de la presente cohorte sino también 29 familias reclutadas a lo largo del tiempo en los distintos proyectos de investigación del grupo, todos ellos con alteración en el gen *GNAS de novo* o de origen parental desconocido. Previo al estudio por NGS se seleccionó el progenitor candidato en base a los estudios de RT-PCR que nos permitieron identificar que 11 pacientes presentaban la variante en el alelo paterno, dos en el alelo materno, en 16 no se detectó en el alelo paterno (infiriendo que estaba en el materno) y en nueve pacientes no pudo determinarse el origen parental. Tuvimos acceso a muestra de progenitores de 29 familias y se estudió el que correspondía en base a los resultados de RT-PCR (**Figura 4.3**).

El mosaicismo en bajo grado que se detecta por NGS no es siempre detectable por secuenciación Sanger²⁸². Hay estudios que reportan la necesidad de una profundidad de lectura mínima de 50X para poder detectar mosaicismos por NGS. Sin embargo, si el mosaicismo es representado en un porcentaje muy bajo, se recomienda utilizar lecturas mayores para asegurarse de que se trata de un mosaico real²⁸². Otros grupos basan sus resultados en profundidades de lectura de aproximadamente 800X, asegurando que a mayor número de lecturas, mayor es la sensibilidad para la detección y cuantificación del mosaico²⁸³. En nuestro caso, la cobertura media de todos los experimentos de NGS fue de 659X para el gen *GNAS*. Esto nos permitió la detección de la variante en mosaicismo en dos progenitores. En ambos casos la variante tenía una frecuencia del 10%, y las profundidades de lectura fueron de 553X y 483X.

Como el mosaicismo se suele encontrar en porcentajes bajos, las lecturas que se ven del alelo alterado por NGS suelen ser pocas. Por eso, muchas veces el mosaicismo puede confundirse con artefactos de secuenciación, y viceversa. Una manera de saber si nos encontramos ante un artefacto o una variante real, es analizar el número de lecturas en ambos sentidos²⁸⁴. En los dos progenitores portadores de alteración en mosaico, el número de lecturas en ambos sentidos del nucleótido que aparece en menor medida son parecidas (30 y 26 en el caso PHP1191-P y 29 y 17 en PHP1125-M), confirmando que no se trataba de un artefacto sino de una variante real. Además, en los dos casos la alteración en mosaico coincidía con la variante identificada en los descendientes. Por lo tanto, en base a los resultados de nuestra cohorte (en total se estudiaron 34 progenitores, de los cuales dos resultaron presentar la variante en mosaico) puede establecerse la tasa de mosaicismo en progenitores con alteración en el gen *GNAS* en un 5,88%.

A pesar de que se ha visto en un porcentaje muy bajo, se puede decir que existe el mosaicismo en los progenitores como causa de la enfermedad en los pacientes. Es por ello que se sugiere valorar hacer NGS a los padres y madres de aquellos pacientes en los que se haya determinado que la variante ha ocurrido *de novo* en el sujeto a estudio. Además, el manejo clínico de los pacientes con iPPSD2mat o iPPSD2pat es diferente⁴⁹. Es por ello que la determinación del origen parental de la alteración genética en las formas *de novo* o desconocida es determinante.

Asimismo, el hecho de que existan portadores de la variante en mosaico que presentan clínica, como el caso de la PHP1125-M, nos sugiere que es posible que algunos pacientes con sospecha de iPPSD en los que no se ha identificado alteración mediante técnicas convencionales pudieran presentar la variante en mosaico.

1.3.2. NUEVOS GENES ASOCIADOS A iPPSD/iPPSD-LIKE

Además de los 41 pacientes sin causa genética identificada procedentes de la cohorte iniciada en la presente tesis, se estudiaron 19 pacientes procedentes de una cohorte histórica (reclutada antes de octubre de 2017) a los que no se les había identificado ninguna alteración patogénica en los genes conocidos asociados a iPPSD.

A todos ellos se les realizó el estudio de genes relacionados con diagnósticos diferenciales^{225,237}. De los 60 probandos, 58 de ellos tenían braquidactilia bilateral. Entre los 58 pacientes que presentaban braquidactilia se encontró que cuatro de ellos presentaban alteración en el gen *PTHLH*. Según la literatura, variantes en este gen se asocian con braquidactilia y (o no) talla baja²²⁵. En nuestra cohorte los cuatro pacientes presentaron braquidactilia de tipo E y tres de los cuatro además presentaban talla baja. Por otra parte, en dos pacientes con braquidactilia y talla baja se encontraron alteraciones en *TRPS1*, gen asociado con un fenotipo característico: punta de nariz bulbosa, labio superior fino, pelo escaso y epífisis con forma de cono²⁸⁵. Se desconocían muchos de los rasgos fenotípicos del PHP1261, pero en la PHP1195 podía apreciarse cabello fino y escaso, pestañas finas y cejas escasas en la parte lateral. También tenía nariz bulbosa. Además, presentaba las epífisis en cono, rasgo muy característico del Síndrome tricorinofalángico tipo 1. Por otro lado, en dos pacientes se identificaron alteraciones en *GDF5*. Se ha descrito que mutaciones en heterocigosis en el gen *GDF5* dan lugar a braquidactilia de tipo C²⁸⁵⁻²⁸⁷, tipo A1²⁸⁸ y tipo A2²⁸⁹. En nuestros pacientes se observaba la braquidactilia de tipo A1 y tipo C. Además, la PHP1168 también cursaba con BDE, algo que no se ha descrito por el momento en la bibliografía. Algunos estudios también han relacionado el gen *GDF5* con talla baja²⁹⁰, presente en PHP1169. Finalmente, se identificó alteración en *IHH* en cinco

pacientes. Por lo general, los pacientes con mutación en *IHH* presentan talla baja, braquidactilia tipo A1 y anomalías esqueléticas moderadas en pies y manos²²⁶. En los pacientes de nuestra cohorte podía apreciarse un patrón de braquidactilia bastante variado. Aunque la mayoría tenían braquidactilia de tipo A2, B y/o E, en la paciente PHP1149 también se apreciaba de tipo C. Respecto a la talla baja, de los cinco pacientes con alteración cuatro sí que la presentaban y una no.

Finalmente, después de estudiar las 47 muestras restantes por NGS, se encontraron cuatro mutaciones en el gen *NPR2*, dos en *ROR2*, una en *EP300*, una en *GLI3*, una en *ACAN*, dos en *XL α s*, una en *RUNX2*, una en *FLNB* y una en *CYP27B1*, además de dos deleciones que incluían diferentes genes. Al consultar la bibliografía, se encontró que estos genes han sido descritos como causales de enfermedad, las cuales comparten características clínicas con iPPSD, como la braquidactilia o la talla baja^{289,291-297}. De los trece pacientes con alteraciones identificadas por secuenciación masiva, doce tenían braquidactilia, el cual es el rasgo fenotípico físico más objetivo. La paciente PHP1284, a pesar de no tener braquidactilia, presentaba resistencia a la PTH, lo que en un inicio hizo sospechar de iPPSD. De hecho, tras la identificación de alteración en *CYP27B1*, se re-historió tanto a la paciente como a la familia y pudo determinarse que presentaban raquitismo hipocalcémico dependiente de vitamina D, siendo los valores elevados de PTH secundarios a su déficit de vitamina D²⁹⁸. Además, ocho de ellos también tenían talla baja. Cabe destacar entre esos pacientes el hecho de que los cuatro pacientes con alteración en *NPR2* y los dos con alteración en *XL α s* estaban por debajo de la talla diana, algo que ya se ha descrito previamente²⁹¹. Aunque, como se ha mencionado anteriormente, se ha demostrado que esos genes son causales de enfermedad, se necesita validar mediante estudios funcionales la patogenicidad de las variantes encontradas. Algunos de ellos están en marcha actualmente.

Tras terminar con los estudios genéticos mencionados, en 34 pacientes no se pudo identificar la alteración molecular subyacente (**Tabla 4.4**). De esos, 22 cumplían los criterios clínicos suficientes como para ser diagnosticados como iPPSD. Concretamente, en tres pacientes se describían valores altos de PTH, asumiendo que presentaban resistencia a dicha hormona. Excepto en la paciente PHP1276, en la que se desconoce el dato, los pacientes PHP1254 y PHP1265 tenían unos valores de vitamina D bajos. Por lo tanto, el aumento de la PTH podía ser debido a un déficit de vitamina D más que a una resistencia a la PTH^{298,299} y, por tanto, no presentarían iPPSD. También hay otros diagnósticos diferenciales para tener presente ante valores elevados de la hormona PTH, que son el raquitismo³⁰⁰, como el mencionado caso de la presente serie (PHP1284), y el hipoparatiroidismo debido a una mutación en el gen *PTH*³⁰¹,

descartado por panel de NGS. Sin embargo, las pacientes PHP1265 y PHP1276 también presentaban braquidactilia.

Por otro lado, en dos de los pacientes sin alteración genética se describía que presentaban osificaciones subcutáneas. En el caso de PHP1236, se describía la presencia de una única calcificación en el hombro izquierdo, la cual no pudo encontrarse al realizar una serie ósea tras el estudio genético. En la PHP1274, se detectó una lesión dura pequeña en el brazo izquierdo compatible con una calcificación de las partes blandas. Pudo ocurrir un error en el diagnóstico y que no se trataran de osificaciones subcutáneas, sino una fibrosis osificante progresiva²⁰, calcinosis tumoral²⁰ o exostosis⁴. Ambos pacientes presentaban asimismo braquidactilia.

En total eran 21 los pacientes que tenían braquidactilia y dos criterios menores asociados, pero que, sin embargo, no presentaban ninguna alteración en los genes estudiados. De los criterios menores asociados a la braquidactilia, la resistencia a la TSH u otras hormonas se encontraba en dos pacientes, el retraso motor o cognitivo en 12, retraso del crecimiento intrauterino o posnatal en 13, obesidad/sobrepeso en 14 y puente nasal plano y/o hipoplasia maxilar y/o cara redondeada en 12. Ya se ha descrito previamente que la braquidactilia no es una característica limitada a iPPSD²⁰, de ahí la importancia de asociarla con dos criterios menores. Sin embargo, se hace necesario profundizar más tanto en los tipos de braquidactilia como en los criterios menores a asociar de cara a mejorar la especificidad de este criterio.

Por lo tanto, en estos dos casos (resistencia a la PTH u osificaciones ectópicas), podría ser que el paciente estuviera mal diagnosticado, que realmente no se tratara de alguno de esos dos rasgos, y eso explicaría que no se hubiera encontrado mutación en ninguno de los genes asociados con iPPSD. O, por el contrario, en algún caso podría tratarse de un iPPSDx o que las técnicas realizadas no hubieran permitido identificar variante en los genes estudiados, bien por posible mosaicismo (en teoría descartado tras el estudio de NGS), o bien por encontrarse en regiones no analizadas de los genes (como regiones promotoras o regiones intrónicas profundas).

El resto de pacientes que no cumplían criterios para ser diagnosticados como iPPSD presentaban braquidactilia bilateral, criterio de inclusión de esta tesis, pero no de iPPSD si es aislado. Por ello, en esos 12 casos no es sorprendente no haber encontrado alteraciones en los genes relacionados con iPPSD, dado que no cumplían la presencia de dos criterios menores asociados. Sin embargo, sí que llama la atención que tampoco se hubiera encontrado nada a partir de los paneles de NGS, ya que en ellos se estudiaron los genes más comúnmente asociados a braquidactilia. Esto nos hace pensar que probablemente existan genes que estén asociados a

braquidactilia pero que aún no se conocen. Por lo tanto, se necesitarían más estudios para poder llegar a detectarlos. Una de las posibilidades sería realizar un estudio del exoma al trío (índice y progenitores) para identificar dichos genes. Además, tal y como se ha ido mencionando a lo largo de la presente tesis, también serían necesarios estudios funcionales posteriores para poder establecer la patogenicidad de las variantes encontradas (en el supuesto caso de encontrarlas).

Es importante tener el mayor número de datos posible para proceder a un diagnóstico correcto, ya que, según la literatura, basarse en criterios clínicos para proceder al diagnóstico de iPPSD ha demostrado una tasa de detección del 98,3% en una cohorte retrospectiva²³². Nuestros datos sugieren que la tasa de detección en una cohorte prospectiva será menor. Sin embargo, es importante profundizar en los casos negativos para valorar si efectivamente cumplían criterios.

2. OBTENCIÓN DEL CULTIVO CELULAR

Como ha podido leerse, a lo largo de esta tesis se han identificado variantes claramente patogénicas y variantes cuya patogenicidad tendría que ser validada. Para ello, son necesarios modelos celulares que mimeticen la enfermedad. En los últimos años, se ha descrito la utilidad de las células madre mesenquimales (MSCs) como buenos modelos de enfermedades³⁰². Más concretamente, también se ha demostrado la importancia de las células madre mesenquimales derivadas de orina (hUSCs), cuya obtención puede realizarse de manera sencilla y no invasiva¹⁶⁵. Como trabajamos con muestras de pacientes con patologías raras, las muestras de orina podrían venir desde lugares muy lejanos, lo que pondría en riesgo la viabilidad de las células. En ese caso, se podrían usar los vectores para generar mutaciones en células sanas y obtener de esta forma los modelos celulares de la enfermedad. Dentro de la gran gama de vectores que hay para introducir material genético a las células¹⁸⁸, últimamente los vectores no virales están atrayendo el interés de la comunidad científica. Frente a los vectores virales, los no virales son más fáciles y económicos de producir, pueden almacenar material genético de tamaño ilimitado y son menos inmunoreactivos^{197,198}. Entre los diferentes vectores no virales, caben destacar aquellos denominados como niosomas. Éstos son unas vesículas lipídicas elaboradas con lípidos que se usan como alternativa a liposomas²⁰⁴. La ventaja que presentan es que son menos tóxicos para las células²⁰⁰. Dentro de los niosomas se encuentran los denominados niosomas catiónicos, en cuya formulación se utilizan lípidos catiónicos. Éstos presentan ventajas al querer acomplejar el vector con material genético.

Además de para crear modelos celulares de enfermedades, los vectores no virales también se podrían usar para la terapia génica en caso de poder acceder a la muestra (en buenas condiciones) de los pacientes con la alteración genética.

En la segunda parte de este trabajo se pretendió diseñar y validar un procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales derivadas de orina y su posterior transfección con niosomas.

Para la puesta a punto del protocolo de aislamiento de las células y posterior obtención del cultivo celular, se recogió la orina de personas control. Es importante tener presente que, a la hora de conseguir las células, hay varios factores que pueden afectar. Los más importantes son la edad y el estado de salud del donante, el método de recogida de la muestra y las condiciones de transporte³⁰³, por lo que en la puesta a punto se trabajó exclusivamente con orina de varón joven.

Después de tratar la muestra tal y como se ha descrito previamente¹⁸¹, se sembró en placas de 12 pocillos. Aproximadamente a los tres días después de la siembra de la muestra se empezaron a ver células en el cultivo. Éstas crecían adheridas al plástico y tenían una forma fibroblastoide, algo que ya había sido descrito para las células madre mesenquimales derivadas de orina¹⁶⁰. El tamaño de las células (aproximadamente 100 μm) también coincidía con lo previamente expuesto por diferentes grupos^{131,160,177}. Estos datos sugerían que las células obtenidas podrían tratarse de hUSCs, pero era necesaria una caracterización más en profundidad para poder decir con certeza que se trataban de las células de interés.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CRIOPRESERVACIÓN

El tiempo de vida útil de los cultivos primarios es corto, su dificultad de hacer subcultivos hace que los experimentos se completen en tiempo relativamente breve, de varios días después de realizado el cultivo. Por tanto, aún quedan algunos desafíos por resolver, como la optimización de protocolos de mantenimiento de células *in vitro*, para así lograr desarrollos que sean económicamente sustentables, y que sean accesibles a cualquier grupo de investigación.

Por tanto, uno de los aspectos importantes que necesitábamos resolver eran las condiciones en las que preservar las células, ya que hay momentos en los que es necesario congelar células para posteriormente volver a trabajar con ellas. Para congelar las células suele emplearse el dimetilsulfóxido (DMSO) como agente que reduce el punto de congelación de los medios y ralentiza la velocidad de enfriamiento permitiendo reducir el riesgo de formación de cristales de hielo que pueden dañar las células y causar la muerte celular³⁰⁴. De modo que se probaron dos

condiciones diferentes de criopreservación (DMSO al 5% y al 10%), obteniendo un número parecido de células en ambas tras la descongelación posterior. Sin embargo, el número de células y también la viabilidad fueron un poco más altos con DMSO 10%. Así, se decidió utilizar la condición de criopreservación con DMSO al 10%. De hecho, es la más común a la hora de congelar células eucariotas³⁰⁵. Más concretamente, a la hora de hablar de células madre mesenquimales, el DMSO al 10% ha demostrado dar buenos resultados^{222,306}.

2.2. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

La mayoría de las pruebas realizadas con las hUSCs fueron realizadas con células aisladas de orina fresca. Es decir, la orina a estudio se recogió y se procesó al momento. No obstante, no todas las muestras de los y las pacientes van a estar disponibles para ser tratadas al momento. De hecho, nuestro grupo recibe muestras para estudio genético de todo el Estado e, incluso, de regiones de Europa, Estados Unidos y Australia. Por eso, se intentó dilucidar durante cuánto tiempo se podría conservar la orina, bien tal y como se obtendría desde el o la paciente o bien generando por centrifugación un *pellet* que pudiera resuspenderse en un *buffer* de uso común en los laboratorios como es el PBS, y obtener, posteriormente, células hUSC.

Los resultados obtenidos sugieren que, en caso de obtenerse la muestra y ser procesada en 24 horas, la orina debería ser centrifugada y resuspendida en PBS para que las células obtenidas se mantengan viables. El mantenimiento de la muestra de orina sin procesamiento posterior implicaría un gran descenso en la viabilidad celular, probablemente debido al pH ligeramente ácido de la misma, que pudiera tener su efecto sobre el crecimiento celular³⁰⁷. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar que los resultados son repetitivos. Sería interesante también testar la conservación de la muestra a un tiempo mayor a las 24 horas ensayadas en nuestro estudio para casos de pacientes en los que el traslado de la muestra hasta nuestro laboratorio implicara una mayor distancia y, por tanto, mayor tiempo necesario para su desplazamiento. Además, también podría considerarse probar otros métodos que incluyeran reactivos de preservación como solución de histidina-triptófano-cetoglutarato o medio de fibroblastos embrionarios, tal y como describen Lang et al.³⁰⁸ en un trabajo donde consiguieron conservar hUSCs viables tras mantener la orina durante más de 24 horas.

3. CARACTERIZACIÓN CELULAR

Según la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT), para poder decir que un cultivo se trata de un cultivo de células madre mesenquimales¹⁵⁹, no solo deben crecer las células pegadas al plástico de cultivo, sino que, además requieren presentar determinados antígenos de

superficie medidos por citometría de flujo y diferenciar hacia línea osteogénica, adipogénica y condrogénica.

3.1. CITOMETRÍA DE FLUJO

Cada tipo celular presenta un patrón de antígenos de superficie diferente^{309,310}. Lo mismo ocurre con las células madre mesenquimales, que al ser estudiadas por citometría de flujo tienen que tener unos marcadores de superficie y carecer de otros.

Las poblaciones analizadas por citometría de flujo mostraron el patrón de antígenos de superficie descrito en la **Tabla 4.7**. Concretamente, para los tres marcadores que deberían ser positivos (CD73, CD90 y CD105)¹⁵⁹, las células mostraron niveles de fluorescencia bastante altos. Por otro lado, para los marcadores negativos (CD14, CD34 y CD45), que deberían ser negativos¹⁵⁹, no hubo respuesta a los anticuerpos. Tal y como se sospechaba, las células HEK293, empleadas como control negativo, no fueron positivas para los marcadores de MSC.

Comparando con los valores de referencia propuestos por la ISCT¹⁵⁹, este cultivo no cumpliría, *sensu stricto*, los requisitos para ser considerado de MSCs. No obstante, este no es un hecho sorprendente, ya que en la literatura se ha demostrado que la caracterización de este tipo celular requiere estudios más en profundidad¹⁶⁵. Además, los resultados conseguidos entre diferentes grupos de investigación no son concordantes entre ellos (revisado por Bento y cols.¹⁶⁵) y no siempre alcanzaban los niveles establecidos por la ISCT¹⁵⁹. Es más, las células comerciales, en las que se presupone que se cumplen los criterios de calidad y que ciertamente se venden como MSCs, tampoco llegaban a los niveles mínimos de fluorescencia para los marcadores positivos y los porcentajes eran parecidos a los vistos en las hUSCs obtenidas en nuestro laboratorio. Por consiguiente, podríamos concluir que las células hUSC obtenidas cumplirían el segundo criterio de confirmación exigido por la ISCT y, en consecuencia, serían células madre mesenquimales. Sin embargo, queda pendiente una mejora del protocolo de caracterización de este tipo celular mediante citometría de flujo, tanto en nuestro grupo de investigación como en los que se describen en la literatura.

3.2. DIFERENCIACIÓN HACIA LÍNEA OSTEOGÉNICA

Junto con el crecimiento en plástico y los marcadores de superficie analizados por citometría de flujo, la diferenciación osteogénica es una característica para definir las MSCs¹⁵⁹. La capacidad de osteogénesis se determinó al cuarto pase (p4) según lo descrito por Bernardo y cols³¹¹. La diferenciación a osteocitos se determinó por tinción de los depósitos de calcio con rojo de alizarina. Tras la tinción Alizarin Red, se hicieron visibles las acumulaciones de calcio en las células tratadas con medio de diferenciación, pero no en los controles negativos (**Figura 4.7**).

Aparte de teñir las muestras, también se cuantificó el calcio midiendo la absorbancia por espectrofotometría a 405 nm (**Figura 4.7**). En esta cuantificación, cada medida de las células diferenciadas mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) respecto al control negativo. Teniendo todo esto en cuenta, se puede concluir que la diferenciación hacia osteocito ocurrió en las células tratadas, pero no en los controles. Esta es una evidencia más para clasificar las células aisladas como MSCs.

Así, en base a los resultados obtenidos en su conjunto, se puede decir que las células aisladas a partir de la orina son de células madre mesenquimales. Aun así, habría que complementar con algún otro estudio (diferenciación hacia adipocitos y condrocitos)¹⁵⁹ y hay aspectos que requieren optimización (como el protocolo de análisis de marcadores de superficie por citometría de flujo). También es importante el hecho de que se cree un protocolo estandarizado y que genere resultados repetitivos para toda la comunidad científica.

3.3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE EL PERFIL (EPI)GENÉTICO DE LAS CÉLULAS

Se han publicado varios trabajos que demuestran cómo surgen anomalías genéticas (que afectan al ADN) y alteraciones epigenéticas (que no afectan directamente el ADN) durante la reprogramación o en el cultivo celular posterior³¹²⁻³¹⁴. Por otra parte, la literatura científica actual documenta cada vez más una correlación entre las tecnologías de reproducción asistida (ART) y los errores epigenéticos en los niños y niñas nacidos, atribuidos a errores de metilación que afectan al genoma embrionario³¹⁵ y, aunque los estudios son en ocasiones contradictorios, el consenso mayoritario sugiere que el origen de estos trastornos puede estar en el período inmediatamente posterior a la fertilización, en las condiciones de cultivo utilizadas actualmente³¹⁵⁻³¹⁸.

Por tanto, dado que el objetivo final de obtener estas hUSCs es poder emplearlas bien para el estudio funcional de variantes novedades, bien para su uso futuro en terapia génica, todo ello en humanos, consideramos imprescindible evaluar si las condiciones de cultivo *in vitro*, en unas condiciones que no son las fisiológicas, podrían tener algún efecto sobre el material (epi)genético de las células aisladas.

En nuestros experimentos mediante la técnica MS-MLPA se pudo observar una metilación estable a lo largo de los países en los principales DMRs, cuyas alteraciones se asocian con enfermedad de impronta³¹⁹. Esto es, se puede concluir que las condiciones artificiales del cultivo no afectaron al patrón de impronta establecido en el genoma para estas regiones. Además, los diferentes ácidos nucleicos obtenidos a los distintos países se pudieron amplificar por PCR (o RT-PCR) y secuenciar por Sanger, obteniendo una secuencia de buena calidad. De modo que, en las

condiciones experimentadas durante esta tesis, se puede decir que el material genético se encontraba en buenas condiciones para trabajar con él y que el medio de cultivo tampoco interfería en su estabilidad ni en el correcto mantenimiento de la metilación.

4. EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN DE LOS NIOPLEXOS Y VIABILIDAD CELULAR

Los niosomas son vesículas de surfactantes no iónicos sintéticas y biocompatibles que forman una bicapa lipídica cerrada^{320,321}. Están constituidas por tres componentes principales: (i) el lípido catiónico, responsable de la interacción electrostática con las moléculas de ADN de carga negativa, (ii) el lípido *helper*, para mejorar las características de la suspensión, y (iii) el surfactante no iónico capaz de aumentar la estabilidad de la formulación y evitar la formación de agregados²⁰⁹. Las propiedades físico-químicas globales de estos componentes tienen gran influencia sobre las características de los niosomas como, por ejemplo, el tamaño de las partículas, la carga superficial o la morfología. A su vez, esas propiedades determinarán la habilidad de los niosomas para penetrar en las células, seguir una ruta endocítica en particular, liberar la carga de ADN en el núcleo y, por tanto, su eficiencia de transfección^{209,322}.

Así, después de realizar un *screening* previo con diferentes formulaciones de niosomas para comprobar cuál era la que mejor funcionaba (mayor tasa de transfección con menor letalidad asociada), se decidió utilizar aquella nombrada como GPxT-CQ, que en su composición contenía cloroquina. Como se aprecia en los resultados (**Figura 4.9**), los porcentajes de transfección que se consiguieron no fueron demasiado altos. Esto se podría explicar por el hecho de que los cultivos primarios de células madre mesenquimales son difíciles de transfectar y, además, todavía no se ha descrito un método eficiente para introducir material genético a estas células³²³⁻³²⁵. De todas maneras, aunque sería posible mejorar la eficiencia de transfección, dependiendo del objetivo a alcanzar, quizás no se necesitarían valores altos. Hay estudios en los que se presentan porcentajes de transfección parecidos a los conseguidos en nuestro trabajo³²⁶. Además, la tasa de transfección para GPxT-CQ es mayor que la obtenida con la lipofectamina, reactivo por excelencia empleado en este procedimiento. Así que, en este aspecto, la formulación sintetizada en el laboratorio presentaba una mejora. En caso de necesitar mejorar la eficiencia del proceso de transfección, en algunos casos se ha conseguido aumentar acomplejando el material genético con quitosanos de bajo peso molecular³²⁷. Los grupos polares de los lípidos catiónicos también se han señalado como factores clave que afectan en la eficacia de transfección³²⁸.

Algunos ensayos han señalado que la cloroquina puede presentar toxicidad que limitaría la viabilidad celular y por lo tanto pondría en riesgo su aplicación en la clínica³²⁹. Sin embargo, en

nuestro caso la viabilidad no se vio muy comprometida, ya que en las células tratadas con GPxT-CQ el porcentaje de células vivas rondaba el 77%.

5. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS NIOSOMAS/NIOPLEXOS

Teniendo en cuenta que el tamaño de las partículas, la carga superficial y la morfología juegan un papel esencial en la habilidad de los niosomas para penetrar en las células, consideramos importante determinar estas características en el niosoma elegido, GPxT-CQ. Además, después de realizar el cribado con diferentes tipos de nioplexos fue el que mejores resultados de transfección ofrecía sin comprometer la viabilidad celular, en una ratio de lípido catiónico/ADN de 5/1.

Tanto el niosoma aislado, como el nioplexo (con el material genético, pCMS-EGFP, ya unido), presentaban valores en la escala nanométrica, lo que es adecuado para transportar material genético a la célula³³⁰. Como era de esperar, el tamaño del nioplexo era mayor al del niosoma al incluir el material genético.

En cuanto a la carga, la alta carga positiva del niosoma GPxT-CQ, que contiene lípidos catiónicos ($> +25$ mV, **Tabla 4.8**), lo convertía en un buen candidato para acomplejarse con el ADN, de carga negativa, antes de la internalización celular³³¹. Gracias al *z-sizer* se apreció como la carga positiva del niosoma se veía parcialmente neutralizada por la carga negativa del ácido nucleico, demostrando la interacción entre los grupos amino del lípido catiónico y los grupos fosfato del ADN, que neutralizaba parcialmente la carga superficial³³². Aun así, se mantuvieron valores positivos ($< +25$ mV, **Tabla 4.8**). Teniendo esto en cuenta, se podría decir que la interacción entre el plásmido pCMS-EGFP y el niosoma GPxT-CQ estaba asegurada. Mantener un potencial positivo ayuda en la interacción entre la nanopartícula y la membrana celular, que presenta carga negativa³³³.

El índice de polidispersión es una representación de la heterogeneidad de una muestra basada en el tamaño. El valor numérico del Pdl va desde el 0 (una población perfectamente uniforme) hasta el 1 (para una muestra altamente polidispersa, es decir, que tiene poblaciones de varios tamaños diferentes)³³⁴. Asimismo, valores bajos de polidispersión generalmente mejoran el transporte celular del material genético con vectores³³⁵. Para vectores basados en nanopartículas lipídicas, valores de 0,3 o inferiores se consideran aceptables e indican una población homogénea. Sin embargo, algunos expertos opinan que para cada una de las aplicaciones debería haber una regulación específica para el Pdl establecida por las autoridades competentes³³⁴. En cuanto al índice de polidispersión de nuestra nanopartícula, fue óptimo para el niosoma ($0,13 \pm 0,01$), y un poco más elevado para el nioplexo ($0,31 \pm 0,04$), aunque también

podría considerarse un valor adecuado. Como hemos mencionado, la carga positiva de los niosomas sin acomplejarlos con el ADN era bastante alta, con un potencial ζ menos positivo en el caso de los nioplexos. Por lo tanto, las fuerzas de repulsión no eran demasiado grandes y algunos nioplexos podían tender a agregarse debido a la interacción entre partículas, por ejemplo, con enlaces de van der Waals o enlaces de hidrógeno³³⁶, lo que explicaría su mayor Pdl.

Al visualizar los niosomas por microscopía electrónica de transmisión (TEM), éstos presentaban una morfología esférica, como suele ocurrir con las nanopartículas lipídicas³³⁷. Además, se observaron estructuras lamelares (**Figura 4.10**) como se ha descrito en otras formulaciones de niosomas catiónicos que se utilizan para terapia génica cuando éstos se acomplejan con el ADN³³⁸. La estructura lamelar o no lamelar puede afectar en la introducción del material genético a la célula³³⁹. De hecho, algunos estudios han demostrado que nanopartículas lipídicas con estructura multilamelar muestran una mayor eficiencia de transfección. Teniendo en cuenta todo lo descrito hasta ahora, la formulación elegida para este estudio presentaba características físico-químicas prometedoras para una transfección eficiente en células madre mesenquimales. Conocida la estructura ácido nucleico-nanopartícula, se podría hacer un diseño racional para conseguir un mejor transporte celular del plásmido y alcanzar el núcleo³⁴⁰.

6. EXPERIMENTOS DE CAPTACIÓN CELULAR

Dado que, como se ha mencionado, los porcentajes de transfección fueron bastante bajos ($6,81 \pm 0,8\%$), se procedió a realizar estudios de captación, con el objetivo de comprobar en qué medida los nioplexos eran captados por la célula y relacionarlo o no como posible causa de la baja transfección obtenida. Además, en el caso de futura aplicación en terapia génica, el material transportado tiene que llegar a un compartimento celular concreto (el núcleo en el caso del ADN) y por lo tanto, los vectores no virales tienen que superar barreras para llegar específicamente a sus lugares de destino³⁴¹.

Al analizar los resultados obtenidos (**Figura 4.11**), se apreció que el porcentaje de captación era casi el doble para la lipofectamina que para nuestro nioplexo. No obstante, el GPxT-CQ sintetizado en el laboratorio presentaba una viabilidad bastante mayor. Esto quedaba confirmado al observar las células por el microscopio, ya que aquellas tratadas con GPxT-CQ mantenían su morfología y se veían más sanas que aquellas en las que se había utilizado lipofectamina (**Figura 4.11**). Aunque este último dato sea esperanzador, el porcentaje de captación no era muy alto, lo que sugiere que no se llega a internalizar gran parte de la

suspensión de nioplexo utilizada. A pesar de que la internalización se considerara baja, hay que recordar que es bastante complejo conseguir transfectar células de cultivos primarios³²³⁻³²⁵.

7. ESTUDIOS DE TRÁFICO CELULAR DE LOS NIOPLEXOS

Con el fin de entender el proceso de transfección y el bajo porcentaje obtenido, analizamos los mecanismos de internalización celular. Las células generalmente utilizan vías endocíticas para la internalización de los vectores no virales, principalmente, la endocitosis mediada por clatrin (CME), endocitosis mediada por caveolas (CvME) y macropinocitosis^{342,343}. Además, cada vía afecta en la efectividad de la liberación del ADN y su desempeño dentro de las células³⁴⁴. La ruta CvME es considerada no acídica y no digestiva, mientras que las vesículas endocíticas formadas en la ruta CME suelen fusionarse con los lisosomas^{345,346}. Sin embargo, existe cierta controversia en este sentido ya que algunos autores afirman que las vesículas de la ruta CvME o caveosomas también se fusionan con los lisosomas en ciertos casos^{347,348}. Además, tampoco está claro si la fusión con el lisosoma favorece o no la transfección. Según algunos investigadores e investigadoras, la fusión con el lisosoma permite que el ADN se libere del vector, facilitando así su llegada al núcleo y, por tanto, favoreciendo la eficiencia de transfección³⁴⁹. Por el contrario, otros autores sostienen que la fusión con el lisosoma conlleva la degradación del ADN, impidiendo así que ocurra la transferencia génica³⁵⁰.

En nuestro estudio, observamos que la principal vía de entrada del niosoma GPxT-CQ fue la vía de las caveolas, aunque también utilizaba la macropinocitosis. Además, los resultados negativos de colocalización con los lisosomas eran concordantes con la teoría que postula que la vía de las caveolas evita entrar en contacto con los lisosomas y por lo tanto no se integran en endosomas tardíos. También se cree que la macropinocitosis sigue las rutas no digestivas^{351,352}. Asimismo, hay estudios que demuestran que la cloroquina inhibe los enzimas lisosomales³⁵³. Estos resultados sugieren que el diseño de nanovectores con características similares a los diseñados en nuestro trabajo utilizan vías de entrada en la célula favorables a conseguir el objetivo final de alcanzar el núcleo. Pero cabe destacar que todo ello no solo depende de la formulación, sino también del tipo celular utilizado en cada ensayo.

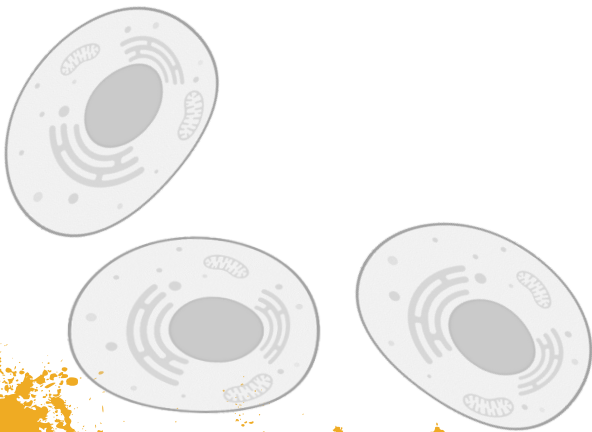
En resumen, el niosoma GPxT-CQ y su nioplexo a una ratio de lípido catiónico/ADN de 5/1 presentaban unas características físico-químicas adecuadas para ser un buen vector para la transferencia de material genético en células hUSC. Tanto la carga, como el tamaño y la forma parecían asegurar el éxito en la transfección. De los estudios de captación se concluía que el nioplexo conseguía entrar a la célula, aunque la cantidad no era especialmente alta (esto puede

estar debido a la dificultad intrínseca que supone trabajar con cultivos de células primarias). Además, gracias a los experimentos de tráfico, se observaba que la ruta de internalización era principalmente la endocitosis mediada por caveolas, por lo que se evitaba la ruta lisosomal, y por tanto, el vector no se degradaba al entrar a la célula. Sin embargo, la tasa de transfección, calculada como la cantidad de proteína producida que se obtiene tras la internalización, era relativamente baja. Es decir, parece ser que el problema en todo el proceso se encuentra después de haberse internalizado el nioplex y haberse distribuido por la célula. Como hipótesis se pueden plantear dos escenarios:

- A pesar de que los nioplexos evitan los lisosomas, puede ser que se degraden en procesos posteriores. Por ejemplo, cabe la posibilidad de que una vez llegado al núcleo, el material genético sea destruido ahí. En este caso, habría que trabajar en la composición de los nioplexos, de manera que éstos protejan el ADN de las nucleasas.
- Recordemos que el ADN va unido al niosoma. Podría ser que, aunque el nioplex alcance su objetivo, el ADN no llegue a liberarse del todo y por ello no haya suficiente cantidad como para producir proteína. Si así fuera, habría que trabajar en la formulación teniendo en cuenta el aspecto de la liberación del material genético.

Dado que las hUSCs son unas células prometedoras gracias a su fácil obtención desde el propio paciente vía procedimientos no invasivos y que la fuente en principio es inagotable, si se quiere optimizar el proceso de transfección, habría que centrar la atención en las nanopartículas.

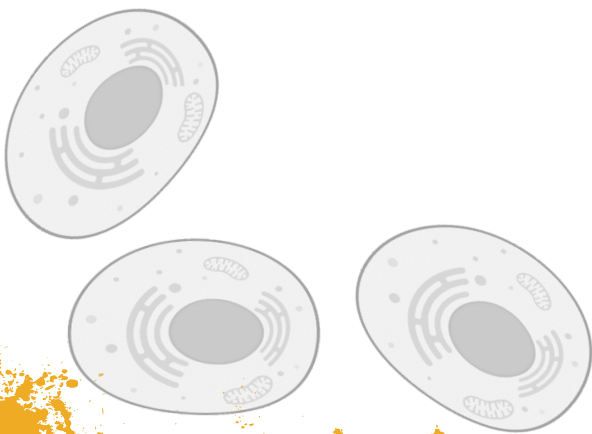
A pesar de encontrarnos en unos estadios iniciales, se ha dado un gran paso en el conocimiento de la transfección de células madre mesenquimales derivadas de orina con niosomas catiónicos, asentando las bases para trabajos futuros, que, en el mejor de los casos, podrían llegar incluso a aplicarse en la clínica.



6. CONCLUSIONES

1. Debido a que algunas manifestaciones clínicas de iPPSD2 aparecen con la edad, es necesario esclarecer el origen parental de la variante patogénica identificada en el gen *GNAS* para una intervención precoz y correcto manejo clínico. En caso de identificarse una variante *de novo* o no disponer de material genético de los progenitores, la RT-PCR es una técnica adecuada para establecer el alelo portador.
2. El estudio de los genes conocidos asociados a iPPSD, ha permitido la identificación de alteración patogénica o probablemente patogénica en 45,3% de los pacientes analizados. Cuando se emplean como criterios de inclusión la resistencia a la PTH o la presencia de osificaciones, ese porcentaje es mayor (86,2% para los casos con resistencia a la PTH y 83,3% para aquellos con osificaciones ectópicas) y, los casos negativos pueden deberse, en algunos casos, a errores en el diagnóstico clínico (por asociación con déficit de vitamina D, o endurecimientos en la piel de origen no óseo, por ejemplo).
3. En los pacientes con braquidactilia bilateral y dos criterios menores, la tasa de identificación de portadores de alteración patogénica en los genes iPPSD es menor (18,2%). Se necesitan estudios más amplios para determinar el patrón de braquidactilia asociado a estos genes y/o los criterios menores más específicos a los que ésta debería asociarse para tener una sospecha clínica de iPPSD.
4. La detección de variantes en mosaico en progenitores de pacientes con iPPSD2 y mutación supuestamente *de novo* permite un correcto asesoramiento genético. Asimismo, dado que en ocasiones los portadores de variantes en mosaico presentan clínica, existe la posibilidad de que ese sea el mecanismo causal en algunos casos de iPPSDx. Sería importante estudiar mediante secuenciación masiva (NGS) las regiones candidatas en los casos probandos en los que no se ha encontrado mutación por secuenciación Sanger.
5. La tecnología de NGS permite el análisis de múltiples genes en un único ensayo, facilitando la identificación de variantes en genes potencialmente candidatos de causar iPPSD tras haber descartado los genes conocidos. La infrecuencia de alteración en estos nuevos genes implica que para la determinación de la patogenicidad de las variantes identificadas sea necesario, en ocasiones, realizar estudios funcionales.
6. Se ha desarrollado un protocolo que permite obtener, cultivar, mantener y caracterizar células madre mesenquimales derivadas de orina (hUSCs). Estas células pueden obtenerse de una manera sencilla, económica y no invasiva. Este procedimiento permite aislar las células en laboratorios externos y posteriormente transportarlas al laboratorio de destino para su cultivo y ensayos posteriores.

7. Los niosomas catiónicos, concretamente el denominado GPxT-CQ, son unos vectores no virales adecuados para la transfección de las hUSCs. Su facilidad y bajo coste de producción, baja inmunogenicidad y posibilidad de transportar material genético de tamaño ilimitado, los hacen prometedores para estudios funcionales de variantes noveles, así como su futura aplicación en terapia génica.
8. Aunque aún hay margen para la mejora, el niosoma catiónico GPxT-CQ consigue transfectar el cultivo primario de hUSCs, consiguiéndose los mejores resultados con el nioplex con una ratio de lípido catiónico/ADN de 5/1. Los estudios realizados demuestran que este nioplex es captado por las células hUSC principalmente a través de la vía de las caveolas, aunque también mediante la macropinocitosis. Estas vías evitan los lisosomas, lo que implica que no se degrada nada más internalizarse.



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Elli, F. M., Pereda, A., Linglart, A., Perez de Nanclares, G. & Mantovani, G. Parathyroid hormone resistance syndromes – Inactivating PTH/PTHrP signaling disorders (iPPSDs). *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **32**, 941–954 (2018).
2. Kroeze, W. K. G-protein-coupled receptors at a glance. *J. Cell Sci.* **116**, 4867–4869 (2003).
3. Sutkeviciute, I., Clark, L. J., White, A. D., Gardella, T. J. & Vilardaga, J.-P. PTH/PTHrP Receptor Signaling, Allostery, and Structures. *Trends Endocrinol. Metab.* **30**, 860–874 (2019).
4. Thiele, S. *et al.* From pseudohypoparathyroidism to inactivating PTH/PTHrP signalling disorder (iPPSD), a novel classification proposed by the EuroPHP network. *Eur. J. Endocrinol.* **175**, P1–P17 (2016).
5. Richards, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–24 (2015).
6. Blomstrand, S., Claesson, I. & Säve-Söderbergh, J. A case of lethal congenital dwarfism with accelerated skeletal maturation. *Pediatr. Radiol.* **15**, 141–143 (1985).
7. Hoogendam, J. *et al.* Novel Mutations in the Parathyroid Hormone (PTH)/PTH-Related Peptide Receptor Type 1 Causing Blomstrand Osteochondrodysplasia Types I and II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 1088–1095 (2007).
8. Loshkajian, A. *et al.* Familial blomstrand chondrodysplasia with advanced skeletal maturation: Further delineation. *Am. J. Med. Genet.* **71**, 283–288 (1997).
9. Duchatelet, S., Ostergaard, E., Cortes, D., Lemainque, A. & Julier, C. Recessive mutations in PTHR1 cause contrasting skeletal dysplasias in Eiken and Blomstrand syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1–5 (2005).
10. Spranger, J. & Maroteaux, P. The lethal osteochondrodysplasias. *Adv. Hum. Genet.* **19**, 1–103, 331–2 (1990).
11. Young, I. D., Zuccollo, J. M. & Broderick, N. J. A lethal skeletal dysplasia with generalised sclerosis and advanced skeletal maturation: Blomstrand chondrodysplasia? *J. Med. Genet.* **30**, 155–7 (1993).
12. Jobert, A. S. *et al.* Absence of functional receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Invest.* **102**, 34–40 (1998).
13. Zhang, P., Jobert, A. S., Couvineau, A. & Silve, C. A homozygous inactivating mutation in the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor causing Blomstrand chondrodysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3365–8 (1998).
14. Karperien, M. *et al.* A frame-shift mutation in the type I parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor causing Blomstrand lethal osteochondrodysplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84**, 3713–20 (1999).
15. Jacob, P., Soni, J. P., Mortier, G. & Girisha, K. M. The third family with Eiken syndrome. *Clin. Genet.* **96**, 378–379 (2019).
16. Moirangthem, A. *et al.* Report of second case and clinical and molecular characterization of Eiken syndrome. *Clin. Genet.* **94**, 457–460 (2018).
17. Eiken, M., Prag, J., Petersen, K. E. & Kaufmann, H. J. A new familial skeletal dysplasia with

- severely retarded ossification and abnormal modeling of bones especially of the epiphyses, the hands, and feet. *Eur. J. Pediatr.* **141**, 231–235 (1984).
18. Mantovani, G. Clinical review: Pseudohypoparathyroidism: diagnosis and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* **96**, 3020–3030 (2011).
 19. Turan, S. & Bastepe, M. The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene. *Horm. Res. Paediatr.* **80**, 229–41 (2013).
 20. Mantovani, G. *et al.* Diagnosis and management of pseudohypoparathyroidism and related disorders: first international Consensus Statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **14**, 476–500 (2018).
 21. Lania, A., Mantovani, G. & Spada, A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur. J. Endocrinol.* **145**, 543–59 (2001).
 22. Kehlenbach, R. H., Matthey, J. & Huttner, W. B. XL alpha s is a new type of G protein. *Nature* **372**, 804–9.
 23. Ischia, R. *et al.* Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 11657–62 (1997).
 24. Puzhko, S. *et al.* Parathyroid hormone signaling via G α s is selectively inhibited by an NH(2)-terminally truncated G α s: implications for pseudohypoparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 2473–85 (2011).
 25. Hayward, B. E. & Bonthron, D. T. An imprinted antisense transcript at the human GNAS1 locus. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 835–41 (2000).
 26. Swaroop, A., Agarwal, N., Gruen, J. R., Bick, D. & Weissman, S. M. Differential expression of novel Gs alpha signal transduction protein cDNA species. *Nucleic Acids Res.* **19**, 4725–9 (1991).
 27. Reik, W. & Walter, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 21–32 (2001).
 28. Bastepe, M. The GNAS Locus: Quintessential Complex Gene Encoding G α alpha, XL α alphas, and other Imprinted Transcripts. *Curr. Genomics* **8**, 398–414 (2007).
 29. Hayward, B. E., Moran, V., Strain, L. & Bonthron, D. T. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 15475–80 (1998).
 30. Turan, S. & Bastepe, M. GNAS Spectrum of Disorders. *Curr. Osteoporos. Rep.* **13**, 146–58 (2015).
 31. Hayward, B. E. *et al.* The human GNAS1 gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 10038–43 (1998).
 32. Sanchez-Delgado, M. *et al.* Human Oocyte-Derived Methylation Differences Persist in the Placenta Revealing Widespread Transient Imprinting. *PLoS Genet.* **12**, e1006427 (2016).
 33. Mantovani, G., Ballare, E., Giammona, E., Beck-Peccoz, P. & Spada, A. The g α alpha gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 4736–40 (2002).
 34. Yu, S. *et al.* Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein

- alpha-subunit (G α) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the g α gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 8715–20 (1998).
35. Tafaj, O., Hann, S., Ayturk, U., Warman, M. L. & Jüppner, H. Mice maintain predominantly maternal G α s expression throughout life in brown fat tissue (BAT), but not other tissues. *Bone* **103**, 177–187 (2017).
 36. Hayward, B. E. *et al.* Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J. Clin. Invest.* **107**, R31-6 (2001).
 37. Klenke, S., Siffert, W. & Frey, U. H. A novel aspect of GNAS imprinting: higher maternal expression of G α s in human lymphoblasts, peripheral blood mononuclear cells, mammary adipose tissue, and heart. *Mol. Cell. Endocrinol.* **341**, 63–70 (2011).
 38. Pérez, de N. G., Mantovani, G. & Fernandez-Rebollo, E. GNAS (GNAS complex locus). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* (2013) doi:10.4267/2042/48758.
 39. Happle, R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin. Genet.* **29**, 321–4 (1986).
 40. Dumitrescu, C. E. & Collins, M. T. McCune-Albright syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 12 (2008).
 41. Landis, C. A. *et al.* GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* **340**, 692–6 (1989).
 42. Miyado, M. *et al.* Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Gs α -Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 877–889 (2019).
 43. Biebermann, H. *et al.* A new multisystem disorder caused by the G α s mutation p.F376V. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**, 1079–1089 (2019).
 44. Miyado, M. *et al.* Germline-Derived Gain-of-Function Variants of Gs α -Coding GNAS Gene Identified in Nephrogenic Syndrome of Inappropriate Antidiuresis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **30**, 877–889 (2019).
 45. Biebermann, H. *et al.* A New Multisystem Disorder Caused by the G α s Mutation p.F376V. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **104**, 1079–1089 (2019).
 46. Fokkema, I. F. A. C. *et al.* LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum. Mutat.* **32**, 557–563 (2011).
 47. Elli, F. M. *et al.* The Prevalence of GNAS Deficiency-Related Diseases in a Large Cohort of Patients Characterized by the EuroPHP Network. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 3657–3668 (2016).
 48. Elli, F. M. *et al.* Pseudohypoparathyroidism type Ia and pseudo-pseudohypoparathyroidism: the growing spectrum of GNAS inactivating mutations. *Hum. Mutat.* **34**, 411–6 (2013).
 49. Mantovani, G., Spada, A. & Elli, F. M. Pseudohypoparathyroidism and Gs α -cAMP-linked disorders: current view and open issues. *Nat. Rev. Endocrinol.* **12**, 347–56 (2016).
 50. Mantovani, G. Clinical review: Pseudohypoparathyroidism: diagnosis and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, 3020–30 (2011).
 51. Liu, J., Nealon, J. G. & Weinstein, L. S. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type IB. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 95–102

- (2005).
52. Albright, F., Burnett, C. H., Smith, P. H. & Parson, W. Pseudohypoparathyroidism - an example of 'Seabright-Bantam syndrome'. *Endocrinology* **30**, 922–932 (1942).
 53. Mantovani, G. *et al.* Pseudohypoparathyroidism and GNAS epigenetic defects: clinical evaluation of albright hereditary osteodystrophy and molecular analysis in 40 patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 651–8 (2010).
 54. Germain-Lee, E. L. *et al.* Paternal imprinting of Galpha(s) in the human thyroid as the basis of TSH resistance in pseudohypoparathyroidism type 1a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 67–72 (2002).
 55. Perez de Nanclares, G. & Pereda, A. Manifestaciones clínicas causadas por alteraciones en la vía de señalización de la proteína G. in *IV Symposium Nacional de Endocrinología Pediátrica* (eds. Yturriaga, R., Argente, J. & Garagorri, J. M.) 49–64 (Momento Medico, SRL, 2014).
 56. Davies, S. J. & Hughes, H. E. Imprinting in Albright's hereditary osteodystrophy. *J. Med. Genet.* **30**, 101–103 (1993).
 57. Albright, F., Forbes, A. P. & Henneman, P. H. Pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Trans. Assoc. Am. Physicians* **65**, 337–50 (1952).
 58. Turan, S. *et al.* Evidence of hormone resistance in a pseudo-pseudohypoparathyroidism patient with a novel paternal mutation in GNAS. *Bone* **71**, 53–57 (2015).
 59. Lau, K., Willig, R. P., Hiort, O. & Hoeger, P. H. Linear skin atrophy preceding calcinosis cutis in pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Clin. Exp. Dermatol.* **37**, 646–8 (2012).
 60. Lebrun, M. *et al.* Progressive osseous heteroplasia: a model for the imprinting effects of GNAS inactivating mutations in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 3028–38 (2010).
 61. Schuster, V., Kress, W. & Kruse, K. Paternal and maternal transmission of pseudohypoparathyroidism type Ia in a family with Albright hereditary osteodystrophy: no evidence of genomic imprinting. *J. Med. Genet.* **31**, 84 (1994).
 62. Urtizbera, J. A. *et al.* Progressive osseous heteroplasia. Report of a family. *J. Bone Joint Surg. Br.* **80**, 768–71 (1998).
 63. Kaplan, F. S. *et al.* Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *J. Bone Joint Surg. Am.* **76**, 425–36 (1994).
 64. Adegbite, N. S., Xu, M., Kaplan, F. S., Shore, E. M. & Pignolo, R. J. Diagnostic and mutational spectrum of progressive osseous heteroplasia (POH) and other forms of GNAS-based heterotopic ossification. *Am. J. Med. Genet. A* **146A**, 1788–96 (2008).
 65. Liu, J. *et al.* A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J. Clin. Invest.* **106**, 1167–74 (2000).
 66. Linglart, A., Levine, M. A. & Jüppner, H. Pseudohypoparathyroidism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **47**, 865–888 (2018).
 67. Bastepe, M. *et al.* Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J. Clin. Invest.* **112**, 1255–63 (2003).
 68. Elli, F. M. *et al.* Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib: a novel

- inherited deletion ablating STX16 causes loss of imprinting at the A/B DMR. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E724-8 (2014).
69. Linglart, A., Gensure, R. C., Olney, R. C., Jüppner, H. & Bastepe, M. A novel STX16 deletion in autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b redefines the boundaries of a cis-acting imprinting control element of GNAS. *Am. J. Hum. Genet.* **76**, 804–14 (2005).
70. Richard, N. *et al.* A new deletion ablating NESP55 causes loss of maternal imprint of A/B GNAS and autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E863-7 (2012).
71. Bastepe, M. *et al.* Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type 1b. *Nat. Genet.* **37**, 25–7 (2005).
72. Chillambhi, S. *et al.* Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type 1b and biparental defects of GNAS methylation in cis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 3993–4002 (2010).
73. Rezwan, F. I. *et al.* Very small deletions within the NESP55 gene in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 494–9 (2015).
74. Nakamura, A. *et al.* Complex Genomic Rearrangement Within the GNAS Region Associated With Familial Pseudohypoparathyroidism Type 1b. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **101**, 2623–7 (2016).
75. Perez-Nanclares, G., Velayos, T., Vela, A., Muñoz-Torres, M. & Castaño, L. Pseudohypoparathyroidism type 1b associated with novel duplications in the GNAS locus. *PLoS One* **10**, e0117691 (2015).
76. Reyes, M. *et al.* A novel GNAS duplication associated with loss-of-methylation restricted to exon A/B causes pseudohypoparathyroidism type 1b (PHP1B). *J. Bone Miner. Res.* (2020) doi:10.1002/jbmr.4209.
77. Lecumberri, B. *et al.* Coexistence of two different pseudohypoparathyroidism subtypes (1a and 1b) in the same kindred with independent Gs{alpha} coding mutations and GNAS imprinting defects. *J. Med. Genet.* **47**, 276–80 (2010).
78. Bastepe, M., Lane, A. H. & Jüppner, H. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q--and the resulting changes in GNAS1 methylation--as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 1283–9 (2001).
79. Bastepe, M. *et al.* Paternal uniparental isodisomy of the entire chromosome 20 as a molecular cause of pseudohypoparathyroidism type 1b (PHP-1b). *Bone* **48**, 659–62 (2011).
80. Fernández-Rebollo, E. *et al.* New mechanisms involved in paternal 20q disomy associated with pseudohypoparathyroidism. *Eur. J. Endocrinol.* **163**, 953–62 (2010).
81. Maupetit-Méhouas, S. *et al.* Simultaneous hyper- and hypomethylation at imprinted loci in a subset of patients with GNAS epimutations underlies a complex and different mechanism of multilocus methylation defect in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Hum. Mutat.* **34**, 1172–80 (2013).
82. Dixit, A. *et al.* Pseudohypoparathyroidism type 1b due to paternal uniparental disomy of chromosome 20q. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E103-8 (2013).
83. Colson, C. *et al.* High frequency of paternal iso or heterodisomy at chromosome 20 associated with sporadic pseudohypoparathyroidism 1B. *Bone* **123**, 145–152 (2019).

84. Fernández-Rebollo, E. *et al.* Exclusion of the GNAS locus in PHP-1b patients with broad GNAS methylation changes: evidence for an autosomal recessive form of PHP-1b? *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1854–63 (2011).
85. Robinow, M. *et al.* Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am. J. Dis. Child.* **121**, 195–203 (1971).
86. Hernández, R. M., Miranda, A. & Kofman-Alfaro, S. Acrodysostosis in two generations: an autosomal dominant syndrome. *Clin. Genet.* **39**, 376–82 (1991).
87. Ablow, R. C., Hsia, Y. E. & Brandt, I. K. Acrodysostosis coinciding with pseudohypoparathyroidism and pseudo-pseudohypoparathyroidism. *AJR. Am. J. Roentgenol.* **128**, 95–9 (1977).
88. Graham, J. M., Krakow, D., Tolo, V. T., Smith, A. K. & Lachman, R. S. Radiographic findings and Gs-alpha bioactivity studies and mutation screening in acrodysostosis indicate a different etiology from pseudohypoparathyroidism. *Pediatr. Radiol.* **31**, 2–9 (2001).
89. Michot, C. *et al.* Exome sequencing identifies PDE4D mutations as another cause of acrodysostosis. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 740–5 (2012).
90. Lee, H. *et al.* Exome sequencing identifies PDE4D mutations in acrodysostosis. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 746–51 (2012).
91. Linglart, A. *et al.* PRKAR1A and PDE4D mutations cause acrodysostosis but two distinct syndromes with or without GPCR-signaling hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E2328-38 (2012).
92. Elli, F. M. *et al.* Screening of PRKAR1A and PDE4D in a Large Italian Series of Patients Clinically Diagnosed With Albright Hereditary Osteodystrophy and/or Pseudohypoparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.* **31**, 1215–24 (2016).
93. Li, N. *et al.* The first mutation identified in a Chinese acrodysostosis patient confirms a p.G289E variation of PRKAR1A causes acrodysostosis. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 13267–74 (2014).
94. Muhn, F. *et al.* Novel mutations of the PRKAR1A gene in patients with acrodysostosis. *Clin. Genet.* **84**, 531–8 (2013).
95. Nagasaki, K. *et al.* PRKAR1A mutation affecting cAMP-mediated G protein-coupled receptor signaling in a patient with acrodysostosis and hormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, E1808-13 (2012).
96. Michot, C. *et al.* Expanding the phenotypic spectrum of variants in PDE4D/PRKAR1A: from acrodysostosis to acroscaphodysplasia. *Eur. J. Hum. Genet.* **26**, 1611–1622 (2018).
97. Linglart, A. *et al.* Recurrent PRKAR1A mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *N. Engl. J. Med.* **364**, 2218–26 (2011).
98. Ueyama, K. *et al.* Endocrinological and phenotype evaluation in a patient with acrodysostosis. *Clin. Pediatr. Endocrinol. case reports Clin. Investig. Off. J. Japanese Soc. Pediatr. Endocrinol.* **26**, 177–182 (2017).
99. Kaname, T. *et al.* Heterozygous mutations in cyclic AMP phosphodiesterase-4D (PDE4D) and protein kinase A (PKA) provide new insights into the molecular pathology of acrodysostosis. *Cell. Signal.* **26**, 2446–59 (2014).
100. Salpea, P. *et al.* Deletions of the PRKAR1A locus at 17q24.2-q24.3 in Carney complex:

- genotype-phenotype correlations and implications for genetic testing. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, E183-8 (2014).
101. Horvath, A. *et al.* Large deletions of the PRKAR1A gene in Carney complex. *Clin. Cancer Res.* **14**, 388–95 (2008).
 102. Yang, M. *et al.* Clinical Manifestations and Molecular Biology of One Case of Carney Complex: A Case Report. *Iran. J. Public Health* **47**, 597–602 (2018).
 103. Anselmo, J. *et al.* A large family with Carney complex caused by the S147G PRKAR1A mutation shows a unique spectrum of disease including adrenocortical cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **97**, 351–9 (2012).
 104. Wang, L. *et al.* [Genetic analysis of a child with acrodysostosis type 2]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* **37**, 1128–1131 (2020).
 105. Zhan, Y. *et al.* A novel de novo PDE4D gene mutation identified in a Chinese patient with acrodysostosis. *Genesis* **57**, e23336 (2019).
 106. Hoppmann, J. *et al.* Phenotypic Variability in a Family with Acrodysostosis Type 2 Caused by a Novel PDE4D Mutation Affecting the Serine Target of Protein Kinase-A Phosphorylation. *J. Clin. Res. Pediatr. Endocrinol.* **9**, 360–365 (2017).
 107. Mitsui, T. *et al.* Acroscyphodysplasia as a phenotypic variation of pseudohypoparathyroidism and acrodysostosis type 2. *Am. J. Med. Genet. A* **164A**, 2529–34 (2014).
 108. Lindstrand, A. *et al.* Different mutations in PDE4D associated with developmental disorders with mirror phenotypes. *J. Med. Genet.* **51**, 45–54 (2014).
 109. Lynch, D. C. *et al.* Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Hum. Mutat.* **34**, 97–102 (2013).
 110. Briet, C. *et al.* Mutations causing acrodysostosis-2 facilitate activation of phosphodiesterase 4D3. *Hum. Mol. Genet.* **26**, 3883–3894 (2017).
 111. Maass, P. G. *et al.* PDE3A mutations cause autosomal dominant hypertension with brachydactyly. *Nat. Genet.* **47**, 647–53 (2015).
 112. Bilginturan, N., Zileli, S., Karacadag, S. & Pirnar, T. Hereditary brachydactyly associated with hypertension. *J. Med. Genet.* **10**, 253–9 (1973).
 113. Boda, H. *et al.* A PDE3A mutation in familial hypertension and brachydactyly syndrome. *J. Hum. Genet.* **61**, 701–3 (2016).
 114. Fan, P. *et al.* Hypertension and Brachydactyly Syndrome Associated With Vertebral Artery Malformation Caused by a PDE3A Missense Mutation. *Am. J. Hypertens.* **33**, 190–197 (2020).
 115. Lee, C. G., Kang, K., Yoon, R. G., Seo, J. Y. & Park, J.-M. PDE3A variant associated with hypertension and brachydactyly syndrome in a patient with ischemic stroke caused by spontaneous intracranial artery dissection: A review of the clinical and molecular genetic features. *Eur. J. Med. Genet.* **63**, 103781 (2020).
 116. Renkema, K. Y. *et al.* PDE3A gene screening improves diagnostics for patients with Bilginturan syndrome (hypertension and brachydactyly syndrome). *Hypertens. Res.* **41**, 981–988 (2018).
 117. van den Born, B.-J. H. *et al.* The Case | A handful of hypertension. *Kidney Int.* **90**, 911–3

- (2016).
118. Hauer, N. N. *et al.* Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genet. Med.* **20**, 630–638 (2018).
 119. Anderson, R. H. & Francis, K. R. Modeling rare diseases with induced pluripotent stem cell technology. *Mol. Cell. Probes* **40**, 52–59 (2018).
 120. Adamson, K. I., Sheridan, E. & Grierson, A. J. Use of zebrafish models to investigate rare human disease. *J. Med. Genet.* **55**, 641–649 (2018).
 121. Benetó, N. *et al.* Neuronal and Astrocytic Differentiation from Sanfilippo C Syndrome iPSCs for Disease Modeling and Drug Development. *J. Clin. Med.* **9**, 644 (2020).
 122. Chamberlain, S. J. *et al.* Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17668–73 (2010).
 123. Long, Y. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells for Disease Modeling and Evaluation of Therapeutics for Niemann-Pick Disease Type A. *Stem Cells Transl. Med.* **5**, 1644–1655 (2016).
 124. Friedenstein, A. J. *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **2**, 83–92 (1974).
 125. Jeon, B.-G. *et al.* Differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues into non-mesodermal lineage. *Animal Cells Syst. (Seoul)*. **19**, 321–331 (2015).
 126. Chang, Y.-J., Tseng, C.-P., Hsu, L.-F., Hsieh, T.-B. & Hwang, S.-M. Characterization of two populations of mesenchymal progenitor cells in umbilical cord blood. *Cell Biol. Int.* **30**, 495–9 (2006).
 127. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B. & Middleton, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **25**, 2739–49 (2007).
 128. Sato, M. *et al.* Application of Urine-Derived Stem Cells to Cellular Modeling in Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, (2019).
 129. Bochon, B. *et al.* Mesenchymal Stem Cells—Potential Applications in Kidney Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2462 (2019).
 130. Horwitz, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **7**, 393–5 (2005).
 131. Chen, L. *et al.* Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects. *Stem Cells Int.* **2018**, 4686259 (2018).
 132. Ji, X., Wang, M., Chen, F. & Zhou, J. Urine-Derived Stem Cells: The Present and the Future. *Stem Cells Int.* **2017**, 4378947 (2017).
 133. Schüring, A. N. *et al.* Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertil. Steril.* **95**, 423–6 (2011).
 134. Lucciola, R. *et al.* Impact of Sustained Transforming Growth Factor- β Receptor Inhibition on Chromatin Accessibility and Gene Expression in Cultured Human Endometrial MSC.

- Front. cell Dev. Biol.* **8**, 567610 (2020).
135. Hou, T. *et al.* Umbilical cord Wharton's Jelly: a new potential cell source of mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. *Tissue Eng. Part A* **15**, 2325–34 (2009).
 136. Wang, A. Y. L. *et al.* Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Mediated Sciatic Nerve Recovery Is Associated with the Upregulation of Regulatory T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 137. Rotter, N. *et al.* Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem Cells Dev.* **17**, 509–18 (2008).
 138. In 't Anker, P. S. *et al.* Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* **102**, 1548–9 (2003).
 139. Tsai, M.-S., Lee, J.-L., Chang, Y.-J. & Hwang, S.-M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum. Reprod.* **19**, 1450–6 (2004).
 140. Morito, T. *et al.* Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)*. **47**, 1137–43 (2008).
 141. Watanabe, N. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Synovial Fluid Increase in Knees with Degenerative Meniscus Injury after Arthroscopic Procedures through the Endogenous Effects of CGRP and HGF. *Stem cell Rev. reports* (2020) doi:10.1007/s12015-020-10047-0.
 142. Pittenger, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143–7 (1999).
 143. Otsuru, S., Hofmann, T. J., Olson, T. S., Dominici, M. & Horwitz, E. M. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device. *Cytotherapy* **15**, 146–53 (2013).
 144. Alonso-Garcia, V. *et al.* High Mannose N-Glycans Promote Migration of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
 145. Kita, K., Gauglitz, G. G., Phan, T. T., Herndon, D. N. & Jeschke, M. G. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev.* **19**, 491–502 (2010).
 146. Moretti, P. *et al.* Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **123**, 29–54 (2010).
 147. Coccini, T. *et al.* In vitro toxicity screening of magnetite nanoparticles by applying mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord lining. *J. Appl. Toxicol.* **39**, 1320–1336 (2019).
 148. Jiao, F. *et al.* Human mesenchymal stem cells derived from limb bud can differentiate into all three embryonic germ layers lineages. *Cell. Reprogram.* **14**, 324–33 (2012).
 149. Bartsch, G. *et al.* Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells Dev.* **14**, 337–48 (2005).
 150. Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I. & Ancans, J. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology* **58**, 153–62 (2008).

151. Orciani, M., Mariggiò, M. A., Morabito, C., Di Benedetto, G. & Di Primio, R. Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells. *Skin Pharmacol. Physiol.* **23**, 124–32 (2010).
152. Raynaud, C. M. *et al.* Comprehensive characterization of mesenchymal stem cells from human placenta and fetal membrane and their response to osteoactivin stimulation. *Stem Cells Int.* **2012**, 658356 (2012).
153. Koh, K. *et al.* UBA2 activates Wnt/ β -catenin signaling pathway during protection of R28 retinal precursor cells from hypoxia by extracellular vesicles derived from placental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **11**, 428 (2020).
154. Seifrtová, M. *et al.* The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *Int. Endod. J.* **45**, 401–12 (2012).
155. Gan, L. *et al.* Dental Tissue-Derived Human Mesenchymal Stem Cells and Their Potential in Therapeutic Application. *Stem Cells Int.* **2020**, 8864572 (2020).
156. Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S. H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S. & Senafi, S. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *ScientificWorldJournal.* **2012**, 843843 (2012).
157. Gronthos, S. *et al.* Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.* **189**, 54–63 (2001).
158. Baglioni, S. *et al.* Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J.* **23**, 3494–505 (2009).
159. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).
160. Guan, J.-J. *et al.* Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology. *Tissue Eng. Part A* **20**, 1794–806 (2014).
161. Zhang, Y. *et al.* Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J. Urol.* **180**, 2226–33 (2008).
162. Zhang, D., Wei, G., Li, P., Zhou, X. & Zhang, Y. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis.* **1**, 8–17 (2014).
163. Burdeyron, P., Giraud, S., Hauet, T. & Steichen, C. Urine-derived stem/progenitor cells: A focus on their characterization and potential. *World J. Stem Cells* **12**, 1080–1096 (2020).
164. Pavathuparambil Abdul Manaph, N., Al-Hawwas, M., Bobrovskaya, L., Coates, P. T. & Zhou, X.-F. Urine-derived cells for human cell therapy. *Stem Cell Res. Ther.* **9**, 189 (2018).
165. Bento, G. *et al.* Urine-Derived Stem Cells: Applications in Regenerative and Predictive Medicine. *Cells* **9**, (2020).
166. Bharadwaj, S. *et al.* Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* **31**, 1840–56 (2013).
167. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72 (2007).
168. Zhou, T. *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat. Protoc.* **7**, 2080–2089 (2012).

169. Ousterout, D. G. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Commun.* **6**, 6244 (2015).
170. Liu, Y. *et al.* Human neural progenitors derived from integration-free iPSCs for SCI therapy. *Stem Cell Res.* **19**, 55–64 (2017).
171. Guan, J. *et al.* Bone morphogenetic protein 2 gene transduction enhances the osteogenic potential of human urine-derived stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 5 (2015).
172. M. Lee, Y., Zampieri, B. L., Scott-McKean, J. J., Johnson, M. W. & Costa, A. C. S. Generation of Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Urine-Derived Cells Isolated from Individuals with Down Syndrome. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 1465–1476 (2017).
173. Afzal, M. Z. & Strande, J. L. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Muscular Dystrophy Patients: Efficient Integration-free Reprogramming of Urine Derived Cells. *J. Vis. Exp.* (2015) doi:10.3791/52032.
174. Rowe, R. G. & Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 377–388 (2019).
175. Wu, S., Liu, Y., Bharadwaj, S., Atala, A. & Zhang, Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* **32**, 1317–26 (2011).
176. Qin, H. *et al.* Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations. *Int. J. Nanomedicine* **9**, 2469–78 (2014).
177. Guan, J. *et al.* Human Urine Derived Stem Cells in Combination with β -TCP Can Be Applied for Bone Regeneration. *PLoS One* **10**, e0125253 (2015).
178. Dong, X. *et al.* Beneficial effects of urine-derived stem cells on fibrosis and apoptosis of myocardial, glomerular and bladder cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **427**, 21–32 (2016).
179. Kim, J. Y. *et al.* Laminin and Platelet-Derived Growth Factor-BB Promote Neuronal Differentiation of Human Urine-Derived Stem Cells. *Tissue Eng. Regen. Med.* **15**, 195–209 (2018).
180. Chen, W. *et al.* Skeletal myogenic differentiation of human urine-derived cells as a potential source for skeletal muscle regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 334–341 (2017).
181. Chen, C.-Y. *et al.* Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis. *Theranostics* **8**, 1607–1623 (2018).
182. Chen, C.-Y. *et al.* Extracellular vesicles from human urine-derived stem cells prevent osteoporosis by transferring CTHRC1 and OPG. *Bone Res.* **7**, 18 (2019).
183. Ling, X. *et al.* Exosomes from human urine-derived stem cells enhanced neurogenesis via miR-26a/HDAC6 axis after ischaemic stroke. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 640–654 (2020).
184. Duan, Y.-R. *et al.* Exosomal microRNA-16-5p from human urine-derived stem cells ameliorates diabetic nephropathy through protection of podocyte. *J. Cell. Mol. Med.* (2019) doi:10.1111/jcmm.14558.
185. Reiser, J. *et al.* Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **5**, 1571–1584 (2005).

186. Park, C.-Y. *et al.* Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell* **17**, 213–220 (2015).
187. Verma, I. M. & Weitzman, M. D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 711–38 (2005).
188. Pezzoli, D., Chiesa, R., De Nardo, L. & Candiani, G. We still have a long way to go to effectively deliver genes! *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 82–91 (2012).
189. Yin, H. *et al.* Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 541–555 (2014).
190. Grijalvo, S. *et al.* Cationic Niosomes as Non-Viral Vehicles for Nucleic Acids: Challenges and Opportunities in Gene Delivery. *Pharmaceutics* **11**, (2019).
191. Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L. & Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs* **31**, 317–334 (2017).
192. Ojeda, E. *et al.* Niosomes based on synthetic cationic lipids for gene delivery: the influence of polar head-groups on the transfection efficiency in HEK-293, ARPE-19 and MSC-D1 cells. *Org. Biomol. Chem.* **13**, 1068–81 (2015).
193. Thomas, C. E., Ehrhardt, A. & Kay, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **4**, 346–58 (2003).
194. Baum, C., Kustikova, O., Modlich, U., Li, Z. & Fehse, B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* **17**, 253–63 (2006).
195. Bessis, N., GarciaCozar, F. J. & Boissier, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **11 Suppl 1**, S10-7 (2004).
196. Bouard, D., Alazard-Dany, D. & Cosset, F.-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* **157**, 153–65 (2009).
197. Mintzer, M. A. & Simanek, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **109**, 259–302 (2009).
198. Pack, D. W., Hoffman, A. S., Pun, S. & Stayton, P. S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 581–93 (2005).
199. Putnam, D. Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* **5**, 439–51 (2006).
200. Marianecchi, C. *et al.* Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Adv. Colloid Interface Sci.* **205**, 187–206 (2014).
201. Moghassemi, S. & Hadjizadeh, A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *J. Control. Release* **185**, 22–36 (2014).
202. Akbarzadeh, A. *et al.* Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res. Lett.* **8**, 102 (2013).
203. Cardarelli, F. *et al.* The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its implication for gene delivery. *Sci. Rep.* **6**, 25879 (2016).
204. Pezzoli, D., Kajaste-Rudnitski, A., Chiesa, R. & Candiani, G. Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors. in 269–279 (2013). doi:10.1007/978-1-62703-462-3_21.

205. Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S. K. & Mishra, D. N. Niosomes: a controlled and novel drug delivery system. *Biol. Pharm. Bull.* **34**, 945–53 (2011).
206. Kumar, G. P. & Rajeshwarrao, P. Nonionic surfactant vesicular systems for effective drug delivery—an overview. *Acta Pharm. Sin. B* **1**, 208–219 (2011).
207. Puras, G. *et al.* A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *J. Control. Release* **174**, 27–36 (2014).
208. Ma, B., Zhang, S., Jiang, H., Zhao, B. & Lv, H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release* **123**, 184–94 (2007).
209. Liu, F., Yang, J., Huang, L. & Liu, D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. *Pharm. Res.* **13**, 1642–6 (1996).
210. Chung, H., Kim, T. W., Kwon, M., Kwon, I. C. & Jeong, S. Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J. Control. Release* **71**, 339–50 (2001).
211. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt 1**, 263–73 (1986).
212. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–10 (1990).
213. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463–7 (1977).
214. Rentzsch, P., Witten, D., Cooper, G. M., Shendure, J. & Kircher, M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **47**, D886–D894 (2019).
215. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
216. Nygren, A. O. H. *et al.* Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* **33**, e128 (2005).
217. Schouten, J. P. *et al.* Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.* **30**, e57 (2002).
218. Adinolfi, M., Pertl, B. & Sherlock, J. Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction. *Prenat. Diagn.* **17**, 1299–311 (1997).
219. Smith, J. R. *et al.* Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by Taq DNA polymerase. *Genome Res.* **5**, 312–7 (1995).
220. Bejjani, B. A. & Shaffer, L. G. Application of array-based comparative genomic hybridization to clinical diagnostics. *J. Mol. Diagn.* **8**, 528–33 (2006).
221. Newton, C. R. *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503–16 (1989).
222. Phelan, K. & May, K. M. Basic Techniques in Mammalian Cell Tissue Culture. *Curr. Protoc. Toxicol.* **70**, A.3B.1-A.3B.22 (2016).
223. Gallego, I. *et al.* Non-viral vectors based on cationic niosomes and minicircle DNA

- technology enhance gene delivery efficiency for biomedical applications in retinal disorders. *Nanomedicine* **17**, 308–318 (2019).
224. Mashal, M. *et al.* Retinal gene delivery enhancement by lycopene incorporation into cationic niosomes based on DOTMA and polysorbate 60. *J. Control. Release* **254**, 55–64 (2017).
225. Pereda, A., Garin, I., Spanish Network for Imprinting Disorders & Perez de Nanclares, G. What to consider when pseudohypoparathyroidism is ruled out: iPPSD and differential diagnosis. *BMC Med. Genet.* **19**, 32 (2018).
226. Sentchordi-Montané, L. *et al.* Clinical and Molecular Description of 16 Families With Heterozygous IHH Variants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **105**, (2020).
227. Travieso-Suárez, L., Pereda, A., Pozo-Román, J., Pérez de Nanclares, G. & Argente, J. [Brachydactyly type C due to a nonsense mutation in the GDF5 gene]. *An. Pediatr.* **88**, 107–109 (2018).
228. Ock, S.-A. & Rho, G.-J. Effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on cryopreservation of porcine mesenchymal stem cells (pMSCs). *Cell Transplant.* **20**, 1231–9 (2011).
229. Mani, S. & Mainigi, M. Embryo Culture Conditions and the Epigenome. *Semin. Reprod. Med.* **36**, 211–220 (2018).
230. de Carvalho, T. G. *et al.* A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* **40**, 617–622 (2018).
231. Xiang, S. *et al.* Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release* **158**, 371–8 (2012).
232. Pereda, A. *et al.* Inactivating PTH/PTHrP signaling disorders (iPPSDs): evaluation of the new classification in a multicenter large series of 544 molecularly characterized patients. *Eur. J. Endocrinol.* **184**, 311–320 (2021).
233. Mantovani, G. *et al.* Clinical utility gene card for: pseudohypoparathyroidism. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, (2013).
234. Hacıhamdioğlu, B., Arslan, M., Sari, E., Kurtçu, K. & Yesilkaya, E. Brachydactyly mental retardation syndrome in differential diagnosis of pseudopseudohypoparathyroidism. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.* **26**, 793–5 (2013).
235. Williams, S. R. *et al.* Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am. J. Hum. Genet.* **87**, 219–28 (2010).
236. Díaz-López, A. *et al.* Vitamin D deficiency in primary health care users at risk in Spain. *Nutr. Hosp.* **38**, 1058–1067 (2021).
237. Pereda, A. *et al.* Brachydactyly E: isolated or as a feature of a syndrome. *Orphanet J. Rare Dis.* **8**, 141 (2013).
238. Csizmar, C. M. & Shah, M. Brachydactyly in Pseudopseudohypoparathyroidism. *Mayo Clin. Proc.* **96**, 2303–2304 (2021).
239. Garin, I. *et al.* Novel microdeletions affecting the GNAS locus in pseudohypoparathyroidism: characterization of the underlying mechanisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, E681-7 (2015).
240. Bastepe, M. *et al.* Positional dissociation between the genetic mutation responsible for

- pseudohypoparathyroidism type 1b and the associated methylation defect at exon A/B: evidence for a long-range regulatory element within the imprinted GNAS1 locus. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 1231–41 (2001).
241. Garin, I. *et al.* European guidance for the molecular diagnosis of pseudohypoparathyroidism not caused by point genetic variants at GNAS: an EQA study. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 438–44 (2015).
242. Liu, J., Yu, S., Litman, D., Chen, W. & Weinstein, L. S. Identification of a methylation imprint mark within the mouse Gnas locus. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5808–17 (2000).
243. Grigelioniene, G. *et al.* A Large Inversion Involving GNAS Exon A/B and All Exons Encoding Gs α Is Associated With Autosomal Dominant Pseudohypoparathyroidism Type 1b (PHP1B). *J. Bone Miner. Res.* **32**, 776–783 (2017).
244. Hanna, P., Francou, B., Delemer, B., Jüppner, H. & Linglart, A. A Novel Familial PHP1B Variant With Incomplete Loss of Methylation at GNAS-A/B and Enhanced Methylation at GNAS-AS2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **106**, 2779–2787 (2021).
245. Maroteaux, P. & Malamut, G. L'acrodysostose. *Presse Med.* **76**, 2189–92 (1968).
246. Petraitytė, G. *et al.* A novel variant in the PDE4D gene is the cause of Acrodysostosis type 2 in a Lithuanian patient: a case report. *BMC Endocr. Disord.* **21**, 71 (2021).
247. Aldred, M. A. *et al.* Constitutional deletion of chromosome 20q in two patients affected with albright hereditary osteodystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **113**, 167–72 (2002).
248. Ward, S., Sugo, E., Verge, C. F. & Wargon, O. Three cases of osteoma cutis occurring in infancy. A brief overview of osteoma cutis and its association with pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Australas. J. Dermatol.* **52**, 127–31 (2011).
249. Germain-Lee, E. L., Groman, J., Crane, J. L., Jan de Beur, S. M. & Levine, M. A. Growth hormone deficiency in pseudohypoparathyroidism type 1a: another manifestation of multihormone resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 4059–69 (2003).
250. Jin, H. Y. *et al.* Clinical characterization and identification of two novel mutations of the GNAS gene in patients with pseudohypoparathyroidism and pseudopseudohypoparathyroidism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **75**, 207–13 (2011).
251. Linglart, A. *et al.* GNAS1 lesions in pseudohypoparathyroidism 1a and 1c: genotype phenotype relationship and evidence of the maternal transmission of the hormonal resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**, 189–97 (2002).
252. Ahmed, S. F. *et al.* GNAS1 mutational analysis in pseudohypoparathyroidism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **49**, 525–31 (1998).
253. Hanna, P. *et al.* Genetic and Epigenetic Defects at the GNAS Locus Lead to Distinct Patterns of Skeletal Growth but Similar Early-Onset Obesity. *J. Bone Miner. Res.* **33**, 1480–1488 (2018).
254. Virágh, K. *et al.* Gradual development of brachydactyly in pseudohypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1945–6 (2014).
255. Gelfand, I. M., Eugster, E. A. & DiMeglio, L. A. Presentation and clinical progression of pseudohypoparathyroidism with multi-hormone resistance and Albright hereditary osteodystrophy: a case series. *J. Pediatr.* **149**, 877–880 (2006).
256. Holmes, C. L., Landry, D. W. & Granton, J. T. Science review: Vasopressin and the

- cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit. Care* **7**, 427–34 (2003).
257. Nakamoto, J. M. *et al.* Concurrent hormone resistance (pseudohypoparathyroidism type Ia) and hormone independence (testotoxicosis) caused by a unique mutation in the G alpha s gene. *Biochem. Mol. Med.* **58**, 18–24 (1996).
258. Iiri, T., Herzmark, P., Nakamoto, J. M., van Dop, C. & Bourne, H. R. Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature* **371**, 164–8 (1994).
259. Makita, N. *et al.* Human G(salpha) mutant causes pseudohypoparathyroidism type Ia/neonatal diarrhea, a potential cell-specific role of the palmitoylation cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17424–9 (2007).
260. Matsubara, K., Kagami, M. & Fukami, M. Uniparental disomy as a cause of pediatric endocrine disorders. *Clin. Pediatr. Endocrinol. case reports Clin. Investig. Off. J. Japanese Soc. Pediatr. Endocrinol.* **27**, 113–121 (2018).
261. de Nanclares, G. P. *et al.* Epigenetic defects of GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**, 2370–3 (2007).
262. Chu, X. *et al.* Clinical and genetic characteristics of Pseudohypoparathyroidism in the Chinese population. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **88**, 285–294 (2018).
263. Fernández-Rebollo, E. *et al.* Endocrine profile and phenotype-(epi)genotype correlation in Spanish patients with pseudohypoparathyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **98**, E996-1006 (2013).
264. Zazo, C. *et al.* Gsα activity is reduced in erythrocyte membranes of patients with pseudohypoparathyroidism due to epigenetic alterations at the GNAS locus. *J. Bone Miner. Res.* **26**, 1864–70 (2011).
265. Poznanski, A. K., Werder, E. A., Giedion, A., Martin, A. & Shaw, H. The pattern of shortening of the bones of the hand in PHP and PPHP--A comparison with brachydactyly E, Turner Syndrome, and acrodysostosis. *Radiology* **123**, 707–18 (1977).
266. Silve, C. *et al.* Acrodysostosis syndromes. *Bonekey Rep.* **1**, 225 (2012).
267. Silve, C., Clauser, E. & Linglart, A. Acrodysostosis. *Horm. Metab. Res.* **44**, 749–58 (2012).
268. Patten, J. L. *et al.* Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N. Engl. J. Med.* **322**, 1412–9 (1990).
269. Weinstein, L. S. *et al.* Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 8287–90 (1990).
270. Conrad, D. F. *et al.* Variation in genome-wide mutation rates within and between human families. *Nat. Genet.* **43**, 712–4 (2011).
271. Biesecker, L. G. & Spinner, N. B. A genomic view of mosaicism and human disease. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 307–20 (2013).
272. Lupski, J. R. Genetics. Genome mosaicism--one human, multiple genomes. *Science* **341**, 358–9 (2013).
273. Rohlin, A. *et al.* Parallel sequencing used in detection of mosaic mutations: comparison with four diagnostic DNA screening techniques. *Hum. Mutat.* **30**, 1012–20 (2009).

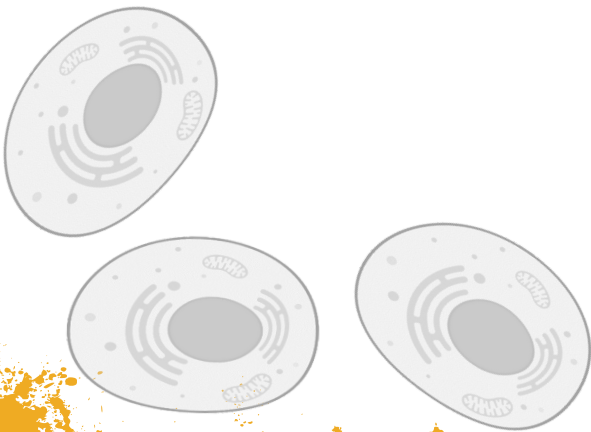
274. Morandi, A. *et al.* A girl with incomplete Prader-Willi syndrome and negative MS-PCR, found to have mosaic maternal UPD-15 at SNP array. *Am. J. Med. Genet. A* **167A**, 2720–6 (2015).
275. Sánchez, J. *et al.* Somatic and germ-line mosaicism of deletion 15q11.2-q13 in a mother of dizygotic twins with Angelman syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* **164A**, 370–6 (2014).
276. Alders, M. *et al.* Methylation analysis in tongue tissue of BWS patients identifies the (EPI)genetic cause in 3 patients with normal methylation levels in blood. *Eur. J. Med. Genet.* **57**, 293–7 (2014).
277. Fernandez-Rebollo, E. *et al.* Intragenic GNAS deletion involving exon A/B in pseudohypoparathyroidism type 1A resulting in an apparent loss of exon A/B methylation: potential for misdiagnosis of pseudohypoparathyroidism type 1B. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 765–71 (2010).
278. Campbell, I. M. *et al.* Parental somatic mosaicism is underrecognized and influences recurrence risk of genomic disorders. *Am. J. Hum. Genet.* **95**, 173–82 (2014).
279. van der Maarel, S. M. *et al.* De novo facioscapulohumeral muscular dystrophy: frequent somatic mosaicism, sex-dependent phenotype, and the role of mitotic transchromosomal repeat interaction between chromosomes 4 and 10. *Am. J. Hum. Genet.* **66**, 26–35 (2000).
280. Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H. G. & Veltman, J. A. Unlocking Mendelian disease using exome sequencing. *Genome Biol.* **12**, 228 (2011).
281. Lohmann, K. & Klein, C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics* **11**, 699–707 (2014).
282. Brewer, C. J. *et al.* The Value of Parental Testing by Next-Generation Sequencing Includes the Detection of Germline Mosaicism. *J. Mol. Diagn.* **22**, 670–678 (2020).
283. King, D. A. *et al.* Detection of structural mosaicism from targeted and whole-genome sequencing data. *Genome Res.* **27**, 1704–1714 (2017).
284. Li, H. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* **30**, 2843–51 (2014).
285. Ullah, A., Umair, M., Hussain, S., Jan, A. & Ahmad, W. Sequence variants in GDF5 and TRPS1 underlie brachydactyly and tricho-rhino-phalangeal syndrome type III. *Pediatr. Int.* **60**, 304–306 (2018).
286. Polinkovsky, A. *et al.* Mutations in CDMP1 cause autosomal dominant brachydactyly type C. *Nat. Genet.* **17**, 18–9 (1997).
287. Everman, D. B. *et al.* The mutational spectrum of brachydactyly type C. *Am. J. Med. Genet.* **112**, 291–6 (2002).
288. Racacho, L. *et al.* Two novel disease-causing variants in BMPR1B are associated with brachydactyly type A1. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 1640–5 (2015).
289. Temtamy, S. A. & Aglan, M. S. Brachydactyly. *Orphanet J. Rare Dis.* **3**, 15 (2008).
290. Lettre, G. The osteoarthritis and height GDF5 locus yields its secrets. *Nat. Genet.* **49**, 1165–1166 (2017).
291. Jacob, M., Menon, S., Botti, C. & Marshall, I. Heterozygous NPR2 Mutation in Two Family Members with Short Stature and Skeletal Dysplasia. *Case Rep. Endocrinol.* **2018**, 7658496

- (2018).
292. Gui, B. *et al.* Heterozygous Recurrent Mutations Inducing Dysfunction of ROR2 Gene in Patients With Short Stature. *Front. cell Dev. Biol.* **9**, 661747 (2021).
 293. Johnston, J. J. *et al.* Molecular analysis expands the spectrum of phenotypes associated with GLI3 mutations. *Hum. Mutat.* **31**, 1142–54 (2010).
 294. Dateki, S. ACAN mutations as a cause of familial short stature. *Clin. Pediatr. Endocrinol. case reports Clin. Investig. Off. J. Japanese Soc. Pediatr. Endocrinol.* **26**, 119–125 (2017).
 295. Gao, X. *et al.* Identification of RUNX2 variants associated with cleidocranial dysplasia. *Hereditas* **156**, 31 (2019).
 296. Yasin, S., Makitie, O. & Naz, S. Spondylocarpotarsal synostosis syndrome due to a novel loss of function FLNB variant: a case report. *BMC Musculoskelet. Disord.* **22**, 31 (2021).
 297. Meyer, M. B. & Pike, J. W. Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **196**, 105500 (2020).
 298. Rao, D. S., Parfitt, A. M., Kleerekoper, M., Pumo, B. S. & Frame, B. Dissociation between the effects of endogenous parathyroid hormone on adenosine 3',5'-monophosphate generation and phosphate reabsorption in hypocalcemia due to vitamin D depletion: an acquired disorder resembling pseudohypoparathyroidism type II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **61**, 285–90 (1985).
 299. Shoemaker, A. H. & Bremer, A. A. Two teenage males with hypocalcemia and elevated parathyroid hormone levels. *Pediatr. Ann.* **41**, e1-5 (2012).
 300. Kirel, B., Demiral, M., Bozdağ, Ö. & Karaer, K. A novel mutation in a case of pseudohypoparathyroidism type Ia. *Turk. J. Pediatr.* **58**, 101–105 (2016).
 301. Lee, S. *et al.* A Homozygous [Cys25]PTH(1-84) Mutation That Impairs PTH/PTHrP Receptor Activation Defines a Novel Form of Hypoparathyroidism. *J. Bone Miner. Res.* **30**, 1803–13 (2015).
 302. García-Castro, J. *et al.* Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. *J. Cell. Mol. Med.* **12**, 2552–65 (2008).
 303. Tayhan, S. E., Keleş, G. T., Topçu, İ., Mir, E. & Gürhan, S. İ. D. Isolation and in vitro cultivation of human urine-derived cells: an alternative stem cell source. *Turkish J. Urol.* **43**, 345–349 (2017).
 304. Meryman, H. T. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion* **47**, 935–45 (2007).
 305. Whaley, D. *et al.* Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant.* **30**, 963689721999617.
 306. Hunt, C. J. Cryopreservation of Human Stem Cells for Clinical Application: A Review. *Transfus. Med. Hemother.* **38**, 107–123 (2011).
 307. Kruse, C. R. *et al.* The effect of pH on cell viability, cell migration, cell proliferation, wound closure, and wound reepithelialization: In vitro and in vivo study. *Wound Repair Regen.* **25**, 260–269 (2017).
 308. Lang, R. *et al.* Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 hours. *PLoS One* **8**, e53980 (2013).

309. Cartwright, K. Abnormal Laboratory Results: Cell markers. *Aust. Prescr.* **30**, 128–129 (2007).
310. Goodwin, J., Laslett, A. L. & Rugg-Gunn, P. J. The application of cell surface markers to demarcate distinct human pluripotent states. *Exp. Cell Res.* **387**, 111749 (2020).
311. Bernardo, M. E. *et al.* Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J. Cell. Physiol.* **211**, 121–30 (2007).
312. Hussein, S. M. *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* **471**, 58–62 (2011).
313. Gore, A. *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 63–7 (2011).
314. Lister, R. *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 68–73 (2011).
315. Ménézo, Y. & Elder, K. Epigenetic remodeling of chromatin in human ART: addressing deficiencies in culture media. *J. Assist. Reprod. Genet.* **37**, 1781–1788 (2020).
316. Hiura, H. *et al.* Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.* **27**, 2541–8 (2012).
317. Hattori, H. *et al.* Association of four imprinting disorders and ART. *Clin. Epigenetics* **11**, 21 (2019).
318. Monk, D., Mackay, D. J. G., Eggermann, T., Maher, E. R. & Riccio, A. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 235–248 (2019).
319. Eggermann, T. *et al.* Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin. Epigenetics* **7**, 123 (2015).
320. Grimaldi, N. *et al.* Lipid-based nanovesicles for nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 6520–6545 (2016).
321. Choi, W.-J. *et al.* Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer. *Biomaterials* **25**, 5893–903 (2004).
322. Puras, G. *et al.* Protamine/DNA/Niosome Ternary Nonviral Vectors for Gene Delivery to the Retina: The Role of Protamine. *Mol. Pharm.* **12**, 3658–71 (2015).
323. de Carvalho, T. G. *et al.* A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* **40**, 617–622 (2018).
324. Santos, F. dos *et al.* Toward a Clinical-Grade Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Human Sources: A Microcarrier-Based Culture System Under Xeno-Free Conditions. *Tissue Eng. Part C Methods* **17**, 1201–1210 (2011).
325. Wang, W., Xu, X., Li, Z., Lendlein, A. & Ma, N. Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **58**, 19–48 (2014).
326. Villate-Beitia, I. *et al.* Non-viral vectors based on magnetoplexes, lipoplexes and polyplexes for VEGF gene delivery into central nervous system cells. *Int. J. Pharm.* **521**, 130–140 (2017).

327. Deshpande, P. P., Biswas, S. & Torchilin, V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond)*. **8**, 1509–28 (2013).
328. Ojeda, E. *et al.* The influence of the polar head-group of synthetic cationic lipids on the transfection efficiency mediated by niosomes in rat retina and brain. *Biomaterials* **77**, 267–79 (2016).
329. Zhang, X. *et al.* The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct. *J. Gene Med.* **5**, 209–218 (2003).
330. Andar, A. U., Hood, R. R., Vreeland, W. N., DeVoe, D. L. & Swaan, P. W. Microfluidic Preparation of Liposomes to Determine Particle Size Influence on Cellular Uptake Mechanisms. *Pharm. Res.* **31**, 401–413 (2014).
331. Hosseinkhani, H. & Tabata, Y. Self Assembly of DNA Nanoparticles with Polycations for the Delivery of Genetic Materials into Cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6**, 2320–2328 (2006).
332. Paecharoenchai, O. *et al.* Cationic niosomes composed of spermine-based cationic lipids mediate high gene transfection efficiency. *J. Drug Target.* **20**, 783–92 (2012).
333. Rezvani, A. Z., Rahimizadeh, M., Eshghi, H., Dehshahri, A. & Ramezani, M. The Effect of Cationic Charge Density Change on Transfection Efficiency of Polyethylenimine. *Iran J. basic Med. Sci.* **16**, 150–156 (2013).
334. Danaei, M. *et al.* Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **10**, (2018).
335. Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U. F. & Lehr, C.-M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **3**, 173–183 (2007).
336. Kumar, A. & Dixit, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. in *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* 43–58 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-08-100557-6.00003-1.
337. Naseri, N., Valizadeh, H. & Zakeri-Milani, P. Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv. Pharm. Bull.* **5**, 305–13 (2015).
338. Radler, J. O. Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science (80-)*. **275**, 810–814 (1997).
339. Pawlowska, D. *et al.* The Impact of Alkyl-Chain Purity on Lipid-Based Nucleic Acid Delivery Systems - Is the Utilization of Lipid Components with Technical Grade Justified? *Chemphyschem* **20**, 2110–2121 (2019).
340. Eygeris, Y., Patel, S., Jozic, A. & Sahay, G. Deconvoluting Lipid Nanoparticle Structure for Messenger RNA Delivery. *Nano Lett.* **20**, 4543–4549 (2020).
341. Durymanov, M. & Reineke, J. Non-viral Delivery of Nucleic Acids: Insight Into Mechanisms of Overcoming Intracellular Barriers. *Front. Pharmacol.* **9**, 971 (2018).
342. Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I. S. & Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **377**, 159–169 (2004).

343. Xiang, S. *et al.* Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release* **158**, 371–378 (2012).
344. Wasungu, L. & Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release* **116**, 255–264 (2006).
345. Nichols, B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 4707–14 (2003).
346. Luzio, J. P., Parkinson, M. D. J., Gray, S. R. & Bright, N. A. The delivery of endocytosed cargo to lysosomes. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 1019–21 (2009).
347. Kiss, A. L. & Botos, E. Endocytosis via caveolae: alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 1228–37 (2009).
348. Agirre, M. *et al.* New Insights into Gene Delivery to Human Neuronal Precursor NT2 Cells: A Comparative Study between Lipoplexes, Nioplexes, and Polyplexes. *Mol. Pharm.* **12**, 4056–66 (2015).
349. Delgado, D., del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. Á. & Rodríguez-Gascón, A. Understanding the mechanism of protamine in solid lipid nanoparticle-based lipofection: the importance of the entry pathway. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **79**, 495–502 (2011).
350. Khalil, I. A., Kogure, K., Akita, H. & Harashima, H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol. Rev.* **58**, 32–45 (2006).
351. Nichols, B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* **116**, 4707–4714 (2003).
352. Xiang, S. & Zhang, X. Cellular Uptake Mechanism of Non-Viral Gene Delivery and Means for Improving Transfection Efficiency. in *Gene Therapy - Tools and Potential Applications* (InTech, 2013). doi:10.5772/53353.
353. Mashal, M. *et al.* Gene delivery to the rat retina by non-viral vectors based on chloroquine-containing cationic niosomes. *J. Control. Release* **304**, 181–190 (2019).



ANEXOS

Tabla I. Cebadores para amplificar el gen GNAS. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen GNAS. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso. El asterisco (*) indica que de todo el volumen de la reacción, el 10% es DMSO.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A1	F: CGCGCTCCTTGCCGAGGAGCCGAG	334	65(*)
	R: CTGCGGGGCGCCCTTCGAG		
A2	F: ACAACAACAGCAGACCTCCCTGC	194	65
	R: CTGTTCCCTCTTACTTGGTGCC		
A3	F: GTTTGTGTGACACTGCGGTG	184	65
	R: TCTCTGGCCTCAGTTTCCAG		
A4+5	F: GGGATGTCTTTATGAAAGCA	399	58
	R: TATATGGACACTGTGCTCAGG		
A6	F: TGATTAGTTCAAGCTCTTGCC	251	58
	R: GGAATCATCAACAAGTAACT		
A7+10	F: GCGCTGTGAACACCCACGTGTCT	742	65
	R: AAACAGTGCAGACCAGGGCC		
A11	F: CCAGGAGGCCCTGGTCT	285	65
	R: CCACCGCAATGAACAGCCAGC		
A12+13	F: GGAGCTACAGAGATGCTAGCACCCC	638	58
	R: GTACAATTACGTTTCACT		

Tabla II. Cebadores para amplificar el gen *PDE4D*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *PDE4D*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso. El asterisco (*) indica que de todo el volumen de la reacción, el 10% es DMSO.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A1	F: TGTCTCTGCCATAGCCTCGG	761	65(*)
	R: TGGTGGTGATAAGCCGACTTAGATGG		
A2	F: GGTCAGTTAACAACAGTATCCA	560	60
	R: GCACTCAGGTAAATCTACCA		
A3	F: GGAACATGAAAGTGGAAGT	268	60
	R: GCTTGAATGAACCAAGAA		
A4	F: CCTCTCTGGATTTCGTGTGGA	351	60
	R: GCAACAACACAGAGAAGTCTAACA		
A5	F: GCTATATCTGAAATGACTCAGA	205	60
	R: GGTGTTATATTGACTCTTGGCAGA		
A6	F: CGAGCATGGCGGGTATGGCA	390	68(*)
	R: CGTACTAGGGGAGGCAAAGCA		
A7	F: CCTGTATCTCAGAGTATGCA	249	60
	R: GCACCCCAATCCTCCTACA		
A8	F: GCTGTCATGCTAAGTCTTGCA	617	60
	R: GCTTTATAAAATGCCTTCCCATCT		
A9	F: GGTTTCACCATGTTGGGCA	471	65
	R: CCTTCTGTATCTTTACTTGTCCCT		
A10	F: GCCATTTCCAGGTTATCCACTGGCA	379	60
	R: CCAATTATCTTCTCCATTGA		
A11	F: CCTTGACACATTGTAACACA	324	60
	R: GCTCTGGAAGACTCTGAGTTTATAAAGA		
A12	F: CTCTCCTGGATATTGTCAGGT	464	60
	R: CCTATTACAGAACATCACAGCCA		
A13	F: CCACTGTCATTAAGGCATAGTGT	344	60
	R: GGTGGGAGAAGGAAGAAATACA		
A14	F: GCTCTGAATCTAGTCAGCCATGCACA	573	60
	R: GGTGAAATTGAGCTTGTCA		
A15	F: CCAAATAAGTTTAGTAGTCT	626	60
	R: GGTGTGACCGTGGTTGTGGCA		
E1_PDE4D3	F: AGTGGAACCTAAATGGATGGACC	512	60
	R: TGCTTGAAGTATTTGGGGATGC		

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
E1_PDE4D5	F: ACAGGCTGCTTTGTAGCACG	785	60
	R: CCTCAACCACTCCTAGTACCA		
E2_PDE4D7	F: ACTGTCCCAGTCTAAGACAGC	321	60
	R: CGTTTCCCACAAGCCTAATCA		
E3_PDE4D7	F: ACACCTGGTGAACAAATTTGC	562	60(*)
	R: ACTCTAGAAACCCATTGTTCTCC		
E1_PDE4D8	F: TCAGGAGTGGCATGTGACTATGC	617	60
	R: ACTTCCTTCAACTTCTGCACGTACC		
E1_PDE4D9	F: AGGACAGGAGATGGACTCC	389	60
	R: TCAGCACCCATTGGTTAAAGC		

Tabla III. Cebadores para amplificar el gen *PRKAR1A*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *PRKAR1A*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A4	F: GCCAGATTGACATTTTGCT	345	60
	R: GTCAGATTCCTTTTCTTCCA		
A5	F: GGAACATGAGAGTGCCA	302	60
	R: GGAGACTAGATGACCA		
A6+7	F: GGTTTATGGAATTGTCA	448	60
	R: CCTCTAGTCTCGCCTCCT		
A8	F: CACTCTCACAGTACCA	216	60
	R: GCTCGGAAGCGATCAATACA		
A9	F: GGTTTGAGGGTTTTTAACA	301	60
	R: GGTAATATTCAAACATTAGT		
A10	F: CCATAGCATTATGTGGT	185	60
	R: CCAATTCTAATTCAGGGGT		
A11	F: GCATGGCTATTTGGT	302	60
	R: CCTCTTAGAGCGTACAAC		
A12	F: CCTGGGTTTGAGAGTGT	206	60
	R: GGAAGACTACAATATCT		
A13	F: GCACTGCTTTAAGGA	323	60
	R: GCGCTGCAAGTAGGGA		

Tabla IV. Cebadores para amplificar el gen *GDF5*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *GDF5*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso. El asterisco (*) indica que de todo el volumen de la reacción, el 10% es DMSO.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A1	F: AGTCCACTCCTTTTCATGG	837	62
	R: TGAGATATGTGTCAGTGTCC		
A2.1	F: AGCCACATCTTCAGGTGAACAC	863	68
	R: ACACAAGGGGTGCGATGATC		
A2.3	F: TGCCTGGAGCTGGAGGCC	649	57(*)
	R: TCTGTGATTCCAGGAGTGC		

Tabla V. Cebadores para amplificar el gen *IHH*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *IHH*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso. El asterisco (*) indica que de todo el volumen de la reacción, el 10% es DMSO.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A1	F: CCACCCGGACGCCTGA	511	65(*)
	R: CGTGCCAGCCAGTCGAGA		
A2	F: GCTGCGCCTACACCTGCA	412	65
	R: CCTTCTCGGCACTACTCCTCCT		
A3	F: GCTCTCTGGGAGCAAGAGGAGCT	833	55
	R: CCTGGCTGAGAGGCTTCTGGA		

Tabla VI. Cebadores para amplificar el gen *PTHLH*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *PTHLH*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A1	F: CAGGGTGTGTGGAATCAACT	234	60
	R: CGTCTCCCATAGCAATGTCTAATTAATCT		
A2	F: GGAGTAGTGCGGGGAGA	270	68
	R: GCAAGCCCTCGGCAGCATCCCA		
A3.1	F: GCTTGTGTCTTACGGT	404	60
	R: GCTTGCCTTTCTTTTTCTTCCCAGGT		
A3.2	F: GGTCTGATGATGAGGGCA	454	60
	R: CCTCTCTATGGTGCTGGAGGACA		
A4	F: GCTATGTTTGCCCTGCTTCT	248	60
	R: GGTGAATAGGTTCAAGGTCCCCT		
A5	F: CCTGAATCTCTTTCCATTGT	354	60
	R: CCAATGTGCAGTTTCATAGAGCA		

Tabla VII. Cebadores para amplificar el gen *TRPS1*. Cebadores utilizados para el estudio de los exones codificantes y zonas de corte y empalme del gen *TRPS1*. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
A2	F: GCATTAGCCTCCTGCTAGT	169	60
	R: GCACGATGTTTTACTGTGT		
A3.1	F: CCAGATTCAACTGTATCTCT	570	60
	R: GCTTGCCCTGTTTCCTCT		
A3.2	F: GGCAGATGACCCTCAAGA	637	60
	R: GGCTACCTGTCTGGTACT		
A4.1	F: CCATTGAATTAATGACACCT	628	60
	R: GCTCTTGTCTGTCTTGGTCA		
A4.2	F: CCAGGGGCTCTGTCATTAATCA	739	60
	R: CCAAGTCATTGGAATCACT		
A5.1	F: CCTTCAGAACGCTGTCTTTG	455	60
	R: GCTCTTGGGTGCCAGACA		
A5.2	F: CCTTCGCAATGTGACTTG	420	60
	R: CCAGATTGAGACAGATCA		
A6	F: CCACTGATCATGTGACTCA	254	60
	R: GGAATGGGACTTATCACA		
A7.1	F: GCAGAAAGCCTATCCCTGCT	605	60
	R: GGTACTTTTCAATAGGGCT		
A7.2	F: GAGACCTGCGAAACACCCA	690	60
	R: GCTATTGAATTCCCATCAAG		

Tabla VIII. Cebadores para amplificar STRs en el cromosoma 20. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los microsatélites del cromosoma 20. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido forward y R aquel utilizado en el sentido reverso. FAM: fluoróforo.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)
D20S88	F: FAM-TGACAGTGAGACTCTGTCAG	462
	R: ATCCATACAATTGTTTAGCCA	
D20S102	F: FAM-TTTTGGTAGTTTCAAGATGC	179
	R: AGGGCTGTGTATGAAGATGC	
D20S171	F: FAM-TATAGGTGAGGACCCTGAGG	139
	R: ACACCAAGCCATGTAACCTG	
D20S173	F: FAM-ATCCAACCTCCCCTTA	181
	R: CCAAAGACTCGTGACTCATCT	
D20S443	F: FAM-TTGCTCCAACCAGGAGGCA	144
	R: GAACCAAGGAAGTTGTTCAAC	
D20S459	F: FAM-AAGCATTTTGGGGGCTC	230
	R: GGGTGACATTTGGCAATGAC	
D20S496	F: FAM-GGCTGAACAGTTTGAAGATATGG	205
	R: TGCTGCCTGAAAAAGGAAGT	
D20S1063	F: FAM-CCTTGCCTCTCTTTTCTTCC	201
	R: CACTCTGCTGTTGTCCATGG	

Tabla IX. Cebadores para RT-PCR del locus GNAS. Secuencia de los cebadores utilizados para el estudio por RT-PCR del locus GNAS.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
FAB_cDNA	GCTGGAGCGAGCCCCTGT
FNESP55_cDNA	GAAGGAGCCCAAGGAGGAGAAGCAGCGGC
F2_cDNA	GATGAGGATCCTGCATGTT
F5_cDNA	CCTGACTTTGACTTCCCT
R6_cDNA	CCTTGGCATGCTCATAGAATTC
F6_cDNA	GCTCCAACGAGTACCAGCT
R7_cDNA	GCTCGGCACATAGTCAGCCT
R8_cDNA	GGAAGTTGACTTTGTCCA
R13_cDNA	GGTGAAATGAGGGTAGCAGT

Tabla X. Cebadores para RT-PCR alelo específica del gen GNAS. Secuencia de los cebadores utilizados para la RT-PCR alelo específica del gen GNAS utilizando el SNP rs7121.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')
FE1_rs7121	CTGCCTCGGGAACAGTAAG
RE1_rs7121C	GCACGTTTCATCACACTCATG
RE1_rs7121T	GCACGTTTCATCACACTCATA
F_rs7121C	CCAGTTCAGAGTGGACTACAGC
F_rs7121T	CCAGTTCAGAGTGGACTACAGT

Tabla XI. Cebadores para amplificar SNP intrónicos del gen GNAS. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los SNP intrónicos que se encuentran en el gen GNAS. F hace referencia al cebador utilizado en el sentido *forward* y R aquel utilizado en el sentido reverso. El asterisco (*) indica que de todo el volumen de la reacción, el 10% es DMSO.

NOMBRE	SECUENCIA (5'→3')	TAMAÑO (pb)	TEMPERATURA (° C)
rs6123837	F: GCGCGTTGGGGGCATCGTGT	194	61(*)
	R: ACACTCGGAAGCAGCAGGTCG		
rs9679845	F: ACAGACAAGGAGCGCAAGAAG	278	61(*)
	R: TCCGTGTCCCAGTCAGCCCAGG		

LISTADO DE GENES DE LOS DIFERENTES PANELES DE NGS

LISTADO DE GENES DE LOS DIFERENTES PANELES DE NGSPHP-LIKE

ACAN, ANKRD11, BMP2, BMPR1B, CHSY1, CNP, COMP, CREBBP, DNM3, DVL1, DVL3, EP300, FGFR2, FOXC1, FZD2, GDF5, GNAS, GPC4, HDAC4, HOXA13, HOXD13, IHH, ITGA10, MIR17HG, MIR199A2, MIR214, MIR3120, NOG, NPR2, NXN, PDE3A, PDE4D, POGZ, PRKAR1A, PRMT7, PTHLH, RAC3, RAI1, ROR2, SLC26A2, TRPS1, TRPV4, WNT5A

iPPSD

ACAN, AIP, AIRE, ALPL, ANKRD11, AP2S1, ATP6V1B1, ATP6V0A4, BMP2, BMPR1B, CASR, CDC73, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2B, CDKN2C, CHSY1, CLCN5, CLCNKB, CLDN16, CLDN19, CNP, COMP, CREBBP, CSF1R, CYP2R1, CYP24A1, CYP27B1, CYP3A4, DMP1, DNM3, DVL1, DVL3, ENPP1, EP300, FAM20C, FGF23, FGFR1, FGFR2, FOXC1, FZD2, GATA3, GCM2, GDF5, GNA11, GNAS, GPC4, HDAC4, HOXA13, HOXD13, IHH, ITGA10, MEN1, MIR17HG, MIR199A2, MIR214, MIR3120, MYCN, NEPRO, NHERF1, NKCC2, NOG, NPPC, NPR2, NXN, OCRL1, PDE3A, PDE4D, PHEX, POGZ, PRKAR1A, PRMT7, PTH, PTHLH, PTHR1, RAC3, RAI1, RET, ROMK, ROR2, SLC4A1, SLC9A3R1, SLC26A2, SLC34A1, SLC34A3, SOX3, TBCE, TBX1, TRPS1, TRPV4, VDR, WNT5A

SkeletalSeq v7

ABCC9, ABRAXAS2, ACAN, ACP5, ACVR1, ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS5, ADAMTSL1, ADAMTSL2, AGA, AGPS, ALG12, ALPL, ALX1, ALX3, ALX4, AMER1, ANKDD1A, ANKH, ANKRD11, ANO5, ANTXR2, ARHGAP31, ARSB, ARSE, ATP6V0A2, B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, BBOF1, BHLHA9, BMP1, BMP2, BMPER, BMPR1B, BTNL9, C2CD3, C3orf22, C5orf42, CA2, CANT1, CASR, CC2D2A, CCDC8, CCNQ, CDC6, CDH3, CDKN1C, CDT1, CDY1, CDY1B, CENPE, CEP120, CEP290, CHST14, CHST3, CHSY1, CKAP2L, CLCN5, CLCN7, COG1, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL4A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COLEC11, COMP, COPS3, CORO7-PAM16, CPA5, CREB3L1, CREBBP, CRTAP, CSPP1, CTSA, CTSK, CUL7, CYP27B1, CYP2R1, DDR2, DHCR24, DHODH, DLL3, DLX3, DLX5, DLX6, DMP1, DOCK6, DVL1, DVL3, DYM, DYNC2H1, DYNC2LI1, EBP, EFN1, EFTUD2, EIF2AK3, EIF4A3, ENPP1, EOGT, EP300, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EXT1, EXT2, FAM111A, FAM20C, FAT4, FBLN1, FBN1, FBN2, FBXW4, FERMT3, FGF10, FGF16, FGF23, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FIG4, FKBP10, FKBP14, FLNA, FLNB, FMN1, FUCA1, FZD2, GALNS, GALNT3, GDF3, GDF5, GDF5OS, GDF6, GJA1, GLB1, GLI3, GMNN, GNAI3, GNAS, GNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNS, GORAB, GPC6, GPX4, GREM1, GSC, GUSB, HDAC4, HDAC8, HES7, HGSNAT, HOXA11, HOXA13, HOXD1, HOXD10, HOXD11, HOXD12, HOXD13, HOXD3, HOXD4, HOXD8, HOXD9, HPGD, HSPA9, HSPG2, ICK, IDH1, IDH2, IDS, IDUA, IFITM5, IFT122, IFT140, IFT172, IFT43, IFT52, IFT57,

IFT80, IHH, IKBKG, IL11RA, IL1RN, ILVBL, IMPAD1, INPPL1, INSR, IRX5, JAG1, KAT6B, KIAA0586, KIF22, KIF24, KIF7, LAMA2, LBR, LEMD3, LFNG, LIFR, LMBR1, LMNA, LMX1B, LONP1, LPIN2, LRP2, LRP4, LRP5, LTBP2, LTBP3, MAFB, MAN2B1, MAP3K7, MAPKAPK5, MASP1, MATN3, MCTP2, MEGF8, MEOX1, MESP2, MET, MGP, MKS1, MMP13, MMP14, MMP2, MMP9, MNX1, MSX2, MTAP, MYCN, MYO18B, NAGLU, NEK1, NEU1, NIN, NIPBL, NKX3-2, NLRP3, NOG, NOTCH2, NPPC, NPR2, NSDHL, NTRK1, NUDT5, NUP210, OBSL1, OFD1, ORC1, ORC4, ORC6, OSTM1, P3H1, P4HB, PAM16, PAPSS2, PCNT, PCYT1A, PDE1B, PDE3A, PDE4B, PDE4D, PEX7, PGM3, PHEX, PHF21A, PIGV, PITX1, PITX3, PJA1, PLCB4, PLEKHM1, PLOD2, PLS3, POC1A, POLR1C, POLR1D, POP1, POR, PPIB, PRKAR1A, PTDSS1, PTHR1, PTHLH, PTPN11, PYCR1, RAB23, RAB33B, RAD21, RBM8A, RBPJ, RECQL4, RIPPLY2, ROR2, RPRG1, RSPRY1, RTTN, RUNX2, SALL1, SALL4, SBDS, SEC23A, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SF3B4, SGSH, SH3BP2, SH3PXD2B, SHH, SIX2, SKI, SLC12A7, SLC26A2, SLC29A3, SLC2A2, SLC34A3, SLC35D1, SLC39A13, SLC5A1, SMAD4, SMARCA1, SMC1A, SMC3, SNRPB, SNX10, SOST, SOX9, SP7, SPAG8, SPARC, SPIN2A, SRCAP, SRY, ST3GAL1, SULF1, SUMF1, TAB2, TAPT1, TBCE, TBX15, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6, TBXAS1, TCF12, TCIRG1, TCOF1, TCTEX1D2, TCTN3, TGDS, TGFB1, TGFB1, TGFB2, THPO, TMC1, TMEM165, TMEM185A, TMEM216, TMEM38B, TMEM67, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TP63, TRAPPC2, TREM2, TRIP11, TRPM1, TRPS1, TRPV4, TTC21B, TWIST1, TXNL4A, TYROBP, VDR, WASHC5, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WISP3, WNT1, WNT10B, WNT3, WNT5A, WNT7A, XYLT1, XYLT2, ZFY, ZIC1, ZMPSTE24, ZNF141, ZSWIM6

SkeletalSeq v8

ABCC9, ABRAXAS2, ACAN, ACP5, ACVR1, ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS5, ADAMTSL1, ADAMTSL2, AGA, AGPS, ALG12, ALPL, ALX1, ALX3, ALX4, AMER1, ANKDD1A, ANKH, ANKRD11, ANO5, ANTXR2, ARHGAP31, ARSB, ARSE, ATP6V0A2, B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, B9D1, B9D2, BBOF1, BGN, BHLHA9, BMP1, BMP2, BMPER, BMPR1B, BTNL9, C21orf2, C2CD3, C3orf22, C5orf42, CA2, CANT1, CASR, CC2D2A, CCDC8, CCNQ, CDC6, CDH3, CDKN1C, CDT1, CDY1, CDY1B, CENPE, CEP120, CEP290, CHRNG, CHST14, CHST3, CHSY1, CKAP2L, CLCN5, CLCN7, COG1, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL4A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COLEC11, COMP, COPS3, CORO7-PAM16, CPA5, CREB3L1, CREBBP, CRTAP, CSGALNACT1, CSPP1, CTSA, CTSK, CUL7, CYP26B1, CYP27B1, CYP2R1, DDR2, DDRGK1, DHCR24, DHODH, DLL3, DLL4, DLX3, DLX5, DLX6, DMP1, DNAH10, DOCK6, DONSON, DVL1, DVL3, DYM, DYNC2H1, DYNC2LI1, EBP, EFN1, EFTUD2, EIF2AK3, EIF4A3, ENPP1, EOGT, EP300, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EXT1, EXT2, EXTL3, FAM111A, FAM20C, FAM46A, FAT4, FBLN1, FBN1, FBN2, FBXW4, FERMT3, FGF10, FGF16, FGF23, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FIG4, FKBP10, FKBP14, FLNA, FLNB, FMN1, FN1, FREM1, FUCA1, FUZ, FZD2, GALNS, GALNT3, GDF3, GDF5, GDF5OS, GDF6, GJA1, GLB1, GLI1, GLI3, GMNN,

GNAI3, GNAS, GNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNS, GORAB, GPC4, GPC6, GPX4, GREM1, GSC, GUSB, GZF1, HDAC4, HDAC6, HDAC8, HES7, HGSNAT, HOXA11, HOXA13, HOXD10, HOXD13, HOXD8, HPGD, HSPA9, HSPG2, ICK, IDH1, IDH2, IDS, IDUA, IFITM5, IFT122, IFT140, IFT172, IFT43, IFT52, IFT57, IFT80, IHH, IKBKG, IL11RA, IL1RN, ILVBL, IMPAD1, INPPL1, INSRR, IRX5, JAG1, KAT6B, KIAA0586, KIF14, KIF22, KIF24, KIF7, LAMA2, LBR, LEMD3, LFNG, LIFR, LMBR1, LMNA, LMOD3, LMX1B, LONP1, LPIN2, LRP2, LRP4, LRP5, LTBP2, LTBP3, MAFB, MAN2B1, MAP3K7, MAPKAPK5, MASP1, MATN3, MCTP2, MEGF8, MEOX1, MESP2, MET, MGP, MKS1, MMP13, MMP14, MMP2, MMP9, MNX1, MSX2, MTAP, MYCN, MYH3, MYO18B, NAGLU, NANS, NBAS, NEK1, NEU1, NIN, NIPBL, NKX3-2, NLRP3, NOG, NOTCH1, NOTCH2, NPHP3, NPPC, NPR2, NSDHL, NTRK1, NUDT5, NUP210, NXN, OBSL1, OCRL, OFD1, ORC1, ORC4, ORC6, OSTM1, P3H1, P4HB, PAM16, PAPSS2, PCNT, PCYT1A, PDE1B, PDE3A, PDE4B, PDE4D, PEX7, PGM3, PHEX, PHF21A, PIGV, PITX1, PITX3, PJA1, PLCB3, PLCB4, PLEKHM1, PLOD2, PLS3, POC1A, POLR1C, POLR1D, POP1, POR, PPIB, PRKAR1A, PRKG2, PTSS1, PTHR1, PTHLH, PTPN11, PYCR1, RAB23, RAB33B, RAC3, RAD21, RBM8A, RBPJ, RECQL4, RIPPLY2, ROR2, RPGRIP1L, RSPRY1, RTTN, RUNX2, SALL1, SALL4, SBDS, SEC23A, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SF3B4, SGSH, SH3BP2, SH3PXD2B, SHH, SIX2, SKI, SLC12A7, SLC26A2, SLC29A3, SLC2A2, SLC34A1, SLC34A3, SLC35D1, SLC39A13, SLC9A3R1, SLC05A1, SMAD4, SMAD6, SMARCA1, SMC1A, SMC3, SNRPB, SNX10, SOST, SOX9, SP7, SPAG8, SPARC, SPIN2A, SRCAP, SRY, ST3GAL1, SULF1, SUMF1, TAB2, TAPT1, TBCE, TBX15, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6, TBXAS1, TCF12, TCIRG1, TCOF1, TCTEX1D2, TCTN2, TCTN3, TGDS, TGFB1, TGFB2, THPO, TMCO1, TMEM107, TMEM165, TMEM185A, TMEM216, TMEM231, TMEM38B, TMEM67, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TP63, TRAPPC2, TREM2, TRIP11, TRPM1, TRPS1, TRPV4, TTC21B, TWIST1, TXNL4A, TYROBP, VDR, WASHC5, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WISP3, WNT1, WNT10B, WNT3, WNT5A, WNT7A, XYLT1, XYLT2, ZFH2, ZFY, ZIC1, ZMPSTE24, ZNF141, ZSWIM6

SkeletalSeq v11

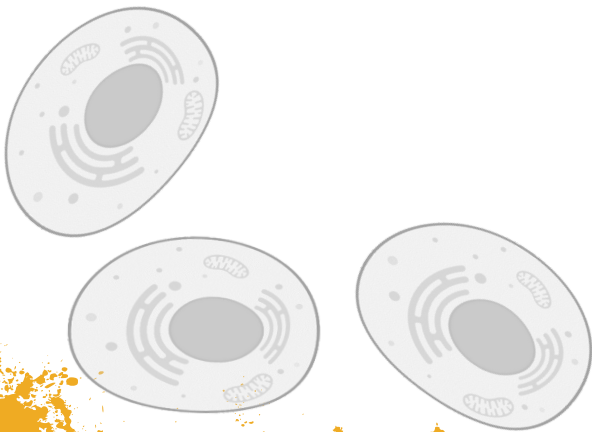
ABCC9, ABRAXAS2, ACAN, ACP5, ACVR1, ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS5, ADAMTSL1, ADAMTSL2, AGA, AGPS, ALDH6A1, ALG12, ALPL, ALX1, ALX3, ALX4, AMER1, ANKDD1A, ANKH, ANKRD11, ANO5, ANTXR2, ARHGAP31, ARSB, ARSE, ATP6V0A2, B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, B9D1, B9D2, BBOF1, BGN, BHLHA9, BMP1, BMP2, BMPER, BMPR1B, BTNL9, C2CD3, C3ORF22, CA2, CANT1, CASR, CC2D2A, CCDC8, CCNQ, CDC6, CDH3, CDKN1C, CDT1, CENPE, CEP120, CEP290, CFAP410, CHRNG, CHST14, CHST3, CHSY1, CKAP2L, CLCN5, CLCN7, COG1, COG4, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL4A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COLEC11, COMP, COPS3, CORO7-PAM16, CPA5, PLANE1, CREB3L1, CREBBP, CRTAP, CSF1R, CSGALNACT1, CSPP1, CTSA, CTSK, CUL7, CYP26B1, CYP26C1, CYP27B1, CYP2R1, DDR2, DDRGK1,

DES, DHCR24, DHODH, DIP2C, DLL3, DLL4, DLX3, DLX5, DLX6, DMP1, DMRT2, DNAH10, DOCK6, DONSON, DVL1, DVL3, DYM, DYNC2H1, DYNC2LI1, EBP, EFNB1, EFTUD2, EIF2AK3, EIF4A3, ENPP1, EOGT, EP300, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EXOC6B, EXT1, EXT2, EXTL3, FAM111A, FAM20C, FAT4, FBLN1, FBN1, FBN2, FBXW4, FERMT3, FGF10, FGF16, FGF23, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FIG4, FKBP10, FKBP14, FLNA, FLNB, FLNB-AS1, FMN1, FN1, FREM1, FUCA1, FUZ, FZD2, GALNS, GALNT3, GDF3, GDF5, GDF6, GJA1, GLB1, GLI1, GLI3, GMNN, GNAI3, GNAS, GNPAT, GNPTAB, GNPTG, GNS, GORAB, GPC4, GPC6, GPX4, GREM1, GSC, GUSB, GZF1, HDAC4, HDAC6, HDAC8, HES7, HGSNAT, HOXA11, HOXA13, HOXD10, HOXD13, HOXD8, HPGD, HSPA9, HSPG2, ICK, IDH1, IDH2, IDS, IDUA, IFITM5, IFT122, IFT140, IFT172, IFT43, IFT52, IFT57, IFT80, IFT81, IHH, IKBKG, IL11RA, IL1RN, IL6ST, ILVBL, IMPAD1, INPPL1, INSRR, IRX5, JAG1, KAT6B, KCNJ1, KDELR2, KIAA0586, KIAA0753, KIF14, KIF22, KIF24, KIF7, LAMA2, LBR, LEMD3, LFNG, LIFR, LMBR1, LMNA, LMOD3, LMX1B, LOC101928371, LOC102723692, LOC105370489, LONP1, LPIN2, LRP2, LRP4, LRP5, LTBP2, LTBP3, MAFB, MAN2B1, MAP3K7, MAPKAPK5, MASP1, MATN3, MBTPS2, MCTP2, MEGF8, MEOX1, MESD, MESP2, MET, MGP, MIR17, MIR17HG, MIR18A, MIR19A, MIR19B1, MIR20A, MIR4315-1, MIR92A1, MKS1, MMP13, MMP14, MMP2, MMP9, MNX1, MSX2, MTAP, MYCN, MYH3, MYO18B, NAGLU, NANS, NBAS, NEK1, NEU1, NIN, NIPBL, NKX3-2, NLRP3, NOG, NOTCH1, NOTCH2, NPHP3, NPHP3-ACAD11, NPHP3-AS1, NPPC, NPR2, NSDHL, NTRK1, NUDT5, NUP210, NXN, OBSL1, OCRL, OFD1, ORC1, ORC4, ORC6, OSTM1, P3H1, P4HB, PAM16, PAN2, PAPSS2, PCNT, PCYT1A, PDE1B, PDE3A, PDE4B, PDE4D, PEX7, PGM3, PHEX, PHF21A, PIGV, PISD, PITX1, PITX3, PJA1, PLCB3, PLCB4, PLEKHM1, PLOD2, PLS3, POC1A, POLR1C, POLR1D, POP1, POR, PPIB, PRKAR1A, PRKG2, PTCHD1-AS, PTDSS1, PTHR1, PTHLH, PTPN11, PYCR1, RAB23, RAB33B, RAC3, RAD21, RBM8A, RBPJ, RECQL4, RIN1, RIPPLY2, RMRP, RNU4ATAC, ROR2, RPGRIP1L, RSPRY1, RTTN, RUNX2, SALL1, SALL4, SBDS, SEC23A, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SF3B4, SFRP4, SGMS2, SGSH, SH3BP2, SH3PXD2B, SHH, SHOX, SIX2, SKI, SLC10A7, SLC12A7, SLC26A2, SLC29A3, SLC2A2, SLC34A1, SLC34A3, SLC35D1, SLC39A13, SLC9A3R1, SLCO5A1, SMAD4, SMAD6, SMARCAL1, SMC1A, SMC3, SNRPB, SNX10, SOST, SOX9, SP7, SPAG8, SPARC, SPIN2A, SRCAP, SRY, ST3GAL1, SUCO, SULF1, SUMF1, TAB2, TAPT1, TBC1D32, TBCE, TBX15, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6, TBXAS1, TCF12, TCIRG1, TCOF1, TCTEX1D2, TCTN2, TCTN3, TENT5A, TGDS, TGFB1, TGFB1, TGFB2, THBS1, THPO, TM4SF19, TM4SF19-TCTEX1D2, TMCO1, TMEM107, TMEM165, TMEM185A, TMEM216, TMEM231, TMEM38B, TMEM67, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TONSL, TONSL-AS1, TP63, TRAPPC2, TREM2, TRIP11, TRPM1, TRPS1, TRPV4, TTC21B, TWIST1, TXNL4A, TYROBP, UFSP2, VDR, WASHC5, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WISP3, WNT1, WNT10B, WNT3, WNT3A, WNT5A, WNT7A, XYLT1, XYLT2, ZFH2, ZFY, ZIC1, ZMPSTE24, ZNF141, ZSWIM6

SkeletalSeq v12

ABCC9, ACAN, ACP5, ACVR1, ADAMTS10, ADAMTS17, ADAMTS5, ADAMTSL1, ADAMTSL2, AGA, AGPS, ALG12, ALPL, ALX1, ALX3, ALX4, AMER1, ANAPC1, ANKH, ANKRD11, ANO5, ANTXR2, ARCN1, ARHGAP31, ARSB, ARSE, ATP6V0A2, B3GALT6, B3GAT3, B4GALT7, B9D1, B9D2, BGN, BHLHA9, BMP1, BMP2, BMPER, BMPR1B, C2CD3, C3ORF22, CA2, CANT1, CASR, CC2D2A, CCDC134, CCDC22, CCDC8, CCNQ, CD96, CDC45, CDC6, CDH3, CDKN1C, CDT1, CENPE, CEP120, CEP290, CFAP410, CHRNG, CHST14, CHST3, CHSY1, CKAP2L, CLCN5, CLCN7, COG1, COL10A1, COL11A1, COL11A2, COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL9A1, COL9A2, COL9A3, COLEC11, COMP, CORO7-PAM16, CPLANE1, CREB3L1, CREBBP, CRTAP, CSF1R, CSGALNACT1, CSPP1, CTSA, CTSK, CUL7, CYP26B1, CYP26C1, CYP27B1, CYP2R1, DACT1, DDR2, DDRGK1, DDX59, DHCR24, DHODH, DIP2C, DLL3, DLL4, DLX3, DLX5, DLX6, DMP1, DMRT2, DNAH10, DOCK6, DONSON, DVL1, DVL3, DYM, DYNC2H1, DYNC2LI1, EBP, EFN1, EFTUD2, EIF2AK3, EIF4A3, ENPP1, EOGT, EP300, ERF, ESCO2, EVC, EVC2, EXT1, EXT2, EXTL3, FAM111A, FAM20C, FAT4, FBLN1, FBN1, FBN2, FBXW4, FERMT3, FGF10, FGF16, FGF23, FGF9, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FIG4, FKBP10, FKBP14, FLNA, FLNB, FMN1, FN1, FREM1, FUCA1, FUZ, FZD2, GALNS, GALNT3, GDF3, GDF5, GDF6, GJA1, GLB1, GLI 1, GLI 3, GMNN, GNAI 3, GNAS, GNPAT, GNPAT1, GNPTAB, GNPTG, GNS, GORAB, GPC4, GPC6, GPX4, GREM1, GSC, GUSB, GZF1, HAAO, HDAC4, HDAC6, HDAC8, HES7, HGSNAT, HOXA11, HOXA13, HOXD10, HOXD13, HOXD8, HPGD, HSPA9, HSPG2, ICK, IDH1, IDH2, IDS, IDUA, IFITM5, IFT122, IFT140, IFT172, IFT43, IFT52, IFT57, IFT80, IFT81, IHH, IKBKG, IL11RA, IL1RN, IMPAD1, INPPL1, IQCE, IRX5, JAG1, KAT6B, KCNJ 1, KDELR2, KIAA0586, KIF14, KIF22, KIF24, KIF3B, KIF7, KYNU, LBR, LEMD3, LFNG, LIFR, LMBR1, LMNA, LMOD3, LMX1B, LONP1, LOXL3, LPIN2, LRP4, LRP5, LTBP2, LTBP3, MAFB, MAN2B1, MAP3K7, MAPKAPK5, MASP1, MATN3, MBTPS2, MEGF8, MEOX1, MESP2, MET, MGP, MIR17, MIR17HG, MIR18A, MIR19A, MIR19B1, MIR20A, MIR4315-1, MIR6808, MIR6857, MIR6893, MIR92A1, MKS1, MMP13, MMP14, MMP2, MMP9, MNX1, MSX2, MTAP, MYCN, MYH3, MYO18B, NADSYN1, NAGLU, NANS, NBAS, NEK1, NEU1, NIN, NIPBL, NKX3-2, NLRP3, NOG, NOTCH1, NOTCH2, NPHP3, NPHP3-ACAD11, NPPC, NPR2, NSDHL, NTRK1, NXN, OBSL1, OCRL, OFD1, ORC1, ORC4, ORC6, OSTM1, P3H1, P4HB, PAM16, PAN2, PAPSS2, PCNT, PCYT1A, PDE3A, PDE4D, PEX7, PGM3, PHEX, PHF21A, PIGV, PITX1, PKDCC, PLCB3, PLCB4, PLEKHM1, PLOD2, PLOD3, PLS3, POC1A, POLR1C, POLR1D, POP1, POR, PPIB, PRKAR1A, PRKG2, PTDSS1, PTHR1, PTHLH, PTPN11, PYCR1, RAB23, RAB33B, RAC3, RAD21, RBM8A, RBPJ, RECQL4, RIN1, RIPPLY2, RMRP, RNU4ATAC, ROR2, RPGRIP1L, RPL13, RSPRY1, RTTN, RUNX2, SALL1, SALL4, SBDS, SEC23A, SEC24D, SERPINF1, SERPINH1, SF3B4, SGMS2, SGSH, SH3BP2, SH3PXD2B, SHH, SHOX, SKI, SLC10A7, SLC26A2, SLC29A3, SLC2A2, SLC34A1, SLC34A3, SLC35D1, SLC39A13, SLC9A3R1, SLC05A1, SMAD4, SMAD6, SMARCAL1, SMC1A, SMC3, SNRPB, SNX10, SOST, SOX6,

SOX9, SP7, SPARC, SRCAP, SUCO, SULF1, SUMF1, TAB2, TAPT1, TBCE, TBX15, TBX3, TBX4, TBX5, TBX6, TBXAS1, TCF12, TCIRG1, TCOF1, TCTEX1D2, TCTN2, TCTN3, TENT5A, TFAP2B, TGDS, TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, THBS1, THPO, TM4SF19, TM4SF19-TCTEX1D2, TMCO1, TMEM107, TMEM165, TMEM185A, TMEM216, TMEM231, TMEM38B, TMEM67, TNFRSF11A, TNFRSF11B, TNFSF11, TONSL, TP63, TRAPPC2, TREM2, TRIP11, TRPS1, TRPV4, TTC21B, TWIST1, TXNL4A, TYROBP, UFSP2, VDR, VPS35L, WASHC5, WDR19, WDR34, WDR35, WDR60, WISP3, WNT1, WNT10B, WNT3, WNT3A, WNT5A, WNT7A, XYLT1, XYLT2, ZFHX2, ZIC1, ZMPSTE24, ZNF141, ZSWIM6



PUBLICACIONES

**PUBLICACIONES GENERADAS A
PARTIR DE LA TESIS**



Article

Design and Validation of a Process Based on Cationic Niosomes for Gene Delivery into Novel Urine-Derived Mesenchymal Stem Cells

Yerai Vado ^{1,2} , Gustavo Puras ¹ , Melania Rosique ³, Cesar Martin ⁴ , Jose Luis Pedraz ¹ , Shifa Jebari-Benslaiman ⁴, Marian M. de Pancorbo ³, Jon Zarate ¹ and Guiomar Perez de Nanclares ^{2,*}

- ¹ NanoBioCel Research Group, Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country UPV/EHU, 01006 Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain; yerai.vado@ehu.eus (Y.V.); gustavo.puras@ehu.eus (G.P.); joseluis.pedraz@ehu.eus (J.L.P.); jon.zarate@ehu.eus (J.Z.)
- ² Rare Diseases Research Group, Molecular (Epi) Genetics Laboratory, BioAraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, 01009 Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain
- ³ BIOMICs Research Group, Microfluidics Cluster UPV/EHU, Lascaray Research Center, University of the Basque Country UPV/EHU, 01009 Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain; melania.rosique@gmail.com (M.R.); marianpancorbo@gmail.com (M.M.d.P.)
- ⁴ Biofisika Institute (UPV/EHU, CSIC), Department Biochemistry and Molecular Biology, University of the Basque Country University (UPV/EHU), 48940 Leioa, Bizkaia, Spain; cesar.martin@ehu.eus (C.M.); shifa.jebari@ehu.eus (S.J.-B.)
- * Correspondence: gnanclares@osakidetza.eus; Tel.: +34-945007097



Citation: Vado, Y.; Puras, G.; Rosique, M.; Martin, C.; Pedraz, J.L.; Jebari-Benslaiman, S.; de Pancorbo, M.M.; Zarate, J.; Perez de Nanclares, G. Design and Validation of a Process Based on Cationic Niosomes for Gene Delivery into Novel Urine-Derived Mesenchymal Stem Cells.

Pharmaceutics **2021**, *13*, 696. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050696>

Academic Editor: Tom Anchordoquy

Received: 30 March 2021

Accepted: 6 May 2021

Published: 11 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background: Mesenchymal stem cells (MSCs) are stem cells present in adult tissues. They can be cultured, have great growth capacity, and can differentiate into several cell types. The isolation of urine-derived mesenchymal stem cells (hUSCs) was recently described. hUSCs present additional benefits in the fact that they can be easily obtained noninvasively. Regarding gene delivery, nonviral vectors based on cationic niosomes have been used and are more stable and have lower immunogenicity than viral vectors. However, their transfection efficiency is low and in need of improvement. Methods: We isolated hUSCs from urine, and the cell culture was tested and characterized. Different cationic niosomes were elaborated using reverse-phase evaporation, and they were physicochemically characterized. Then, they were screened into hUSCs for transfection efficiency, and their internalization was evaluated. Results: GPxT-CQ at a lipid/DNA ratio of 5:1 (*w/w*) had the best transfection efficiency. Intracellular localization studies confirmed that nioplexes entered mainly via caveolae-mediated endocytosis. Conclusions: In conclusion, we established a protocol for hUSC isolation and their transfection with cationic niosomes, which could have relevant clinical applications such as in gene therapy. This methodology could also be used for creating cellular models for studying and validating pathogenic genetic variants, and even for performing functional studies. Our study increases knowledge about the internalization of tested cationic niosomes in these previously unexplored cells.

Keywords: urine-derived mesenchymal stem cells; primary cell culture; nonviral vectors; cationic niosomes; gene therapy

1. Introduction

Gene therapy is defined as the process of transferring external genetic material into a cell, tissue, or whole organ with the aim of curing a disease or improving the clinical status of a patient [1]. It is a field of emerging importance for the research and treatment of various types of diseases [2].

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a pool of multipotent adult stem cells present in a variety of niches that can differentiate into mesoderm-derived cells, such as osteocytes or adipocytes [3]. Several studies have shown that MSCs can also differentiate into cells of

endodermal or ectodermal origin [4]. In addition to *in vitro* differentiation into osteocytes, adipocytes, and chondrocytes, MSCs in culture can attach to plastic and grow under standard culture conditions. Moreover, these cells must present CD73, CD90, and CD105 surface antigens and lack expression of CD14, CD34, and CD45 [5].

MSCs are beneficial to work with due to the ease of obtaining them and the few ethical issues they present. They are self-renewable and multipotent, and they can be expanded in culture with great genomic stability. Taking everything into account, mesenchymal stem cells are important in cell therapy, regenerative medicine, and tissue repair [6,7]. In addition, as cells are obtained from an autologous source, they do not promote an immune response or induce rejection [8,9].

MSCs can be isolated from a wide variety of adult tissues, but those that are most studied and used are derived from bone marrow [3], adipose tissue [10], and umbilical cord [11]. The disadvantage of obtaining the mentioned cells is that the sources are limited and the procedures to obtain them are invasive [8,12]. This is why a more convenient novel source of mesenchymal stem cells is needed. Zhang et al. described the first culture of MSCs isolated from human voided urine (hUSC) [13] and, since then, researchers have focused their attention on these cells. As other MSCs, hUSCs show an appropriate proliferation capacity and have multilineage differentiation potential [12]. Compared to other MSCs, hUSCs can be isolated in a noninvasive, simple, reliable, and safe way using a low-cost methodology. In addition, they have great potential to be used for clinical applications, and they can also be used as biological models for pharmacology and toxicology tests [14]. These human-derived cells can be used in a personalized way with high-throughput screening in predictive toxicology. hUSCs have the potential to be used in applications for regenerative (for example, in urological tissue engineering [15], bone regeneration [16], and induction of iPSCs with different purposes such as neuroregeneration [17] or dental reconstruction [18]) and personalized medicine. In addition, they can be used in gene therapy approaches for treating neurological and blood disorders or vascular and musculoskeletal diseases as well as to impact tumor growth [19]. Some authors also described these cells as a novel biological resource for the discovery of new drugs [14]. Using hUSCs as disease models overcomes the drawback that animal models are not always a precise model and present ethical issues [14]. Furthermore, they can be obtained easily and noninvasively [12,13,20,21]. For these reasons, we were interested in developing a protocol to isolate and characterize hUSCs and to transfect them with nioplexes for the purpose of application in gene editing.

In the same way as MSCs, nonviral vectors (especially niosomes) are gaining attention in gene therapy [7].

Viral vectors have been successfully used in numerous clinical trials, but their application has been linked to carcinogenesis [22] and immunogenicity problems [23], in addition to having limited DNA-packaging capacity [24] and being challenging to produce [25]. Nonviral vectors, on the other hand, present important advantages such as the size of the nucleic acid to transfect, which is theoretically unlimited, and they are easier and cheaper to produce [26,27]. However, the duration of gene expression is an issue that nonviral vectors have to face, as well as their low transfection efficiency [28]. Among the nonviral vectors, cationic liposomes are among those that are most employed and studied [29].

Niosomes are emerging nonviral drug delivery systems with a bilayer structure that can be used as an alternative to liposomes. While liposomes are composed of phospholipids, niosomes contain nonionic surfactants [30,31]. Some interesting properties of niosomes for gene delivery applications include, for instance, their low toxicity and cost, good chemical stability, and large DNA-packaging capacity [32]. In any case, such properties depend on both the composition of the niosome formulation and the method for their production.

Niosomes can incorporate cationic lipids for gene delivery purposes; thus, via simple electrostatic interactions, nucleic acids bind to the vesicle and form complexes known as nioplexes [33].

Essentially, niosomes have three main components: (1) nonionic surfactants, which increase the stability of niosomes [34,35], (2) helper lipids that enhance the physicochemical

properties of the lipid emulsion, as they can modify the morphology, permeability, storage time, nucleic acid release, and stability of the niosome [35,36], and (3) cationic lipids that interact electrostatically with the nucleic acid to form nioplexes and whose properties influence the transfection efficiency and toxicity [33,35].

In summary, the aim of this work was to isolate human urine-derived mesenchymal stem cells and to develop an easy protocol for transfecting them using nonviral vectors. Applications of this procedure could include its use in gene editing, functional studies of novel variants identified at candidate genes.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture Isolation

For isolation of the hUSCs, the protocol of Chen et al. [37] was followed. Once cells were isolated, various conservation methods were tested for posterior cell recovery. The influence of culture medium was also evaluated (see Supplementary Materials).

2.2. Cell Characterization

For cell characterization, cell surface markers were analyzed by flow cytometry. Briefly, 50,000 cells were grown in 24-well culture plates. For this assay, not only were cells isolated from urine examined but commercial mesenchymal stem cells (PCS-500-011™, ATCC, Manassas, VA, USA) were also used as a positive control while HEK293 cells (ATCC) were used as a negative control.

When cell confluence was approximately 80%, cells were fixed with 200 µL paraformaldehyde (PFA; PanReac AppliChem, Barcelona, Spain) for 10 min. Once fixed, cells were scraped and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 50 µL blocking solution, which was a solution of 5% inactive FBS (Gibco-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS. Cells were kept in this solution for 30 min at room temperature. Then, fluorescent antibodies were added at a final dilution of 1/100, and cells were incubated for 45 min at room temperature in the dark. The antibodies and their fluorophores are listed below, all of which were acquired from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA):

- Surface markers specific for mesenchymal stem cells: antiCD73-AlexaFluor488, antiCD90-APC, and antiCD105-PE;
- Surface markers that are absent in mesenchymal stem cells: antiCD14-FITC, antiCD34-APC, and antiCD45-PE.

For verifying the binding specificity of the antibodies, isotype controls for each fluorophore were also used. As the isotypes do not recognize any protein, every signal obtained from them would be due to unspecific binding. This way, background staining levels can be determined [38]. Once the incubation was completed, unbound antibody was removed by centrifugation of cells at 3000 rpm for 5 min, and the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in 200 µL of PBS and the sample was introduced to a CytoFLEX (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) flow cytometer. The results were analyzed using CytExpert software (Beckman Coulter, v. 2.3.0.84, Brea, CA, USA).

2.3. Plasmid Propagation and Elaboration of Nioplexes

Four different cationic niosomes, which presented the best results in previous studies carried out in the laboratory [39,40], were prepared using the reverse-phase evaporation. For the niosome named GPxT-CQ 2.5 mg (0.05% *w/v*), chloroquine diphosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in milliQ water in order to obtain the aqueous phase. In parallel, the organic phase was prepared as follows: 5 mg (0.1% *w/v*) lipid, 12.5 mg (0.25% *w/v*) Poloxamer® 407 (Sigma-Aldrich), and 12.5 mg polysorbate 80 (Sigma-Aldrich) were dissolved in 1 mL dichloromethane (PanReac). The DLT60 niosome was prepared as described by Mashal et al. [40]. The aqueous phase of the DST20 niosome was composed of a 5 mL solution of 0.49% polysorbate 20 (Sigma-Aldrich) in water. In the organic phase, 6.7 mg of 1,2-di-*O*-octadecenyl-3-trimethylammonium propane (DOTMA;

Avanti, Alabama, USA) and 19 μL of squalene (Sigma-Aldrich) were dissolved in 1 mL of dichloromethane. Lastly, a formulation named N4 was manufactured. For this niosome, in the aqueous phase, 25 mg of polysorbate 80 was dissolved in 5 mL of distilled water. In the organic phase, 5 mg of lipid and 20 μL of squalene were dissolved in 1 mL of dichloromethane. Once the different phases were prepared, the aqueous phase was added to the organic phase, and the emulsion was obtained via the sonication of the mixture for 30 s at 50 W (Branson Sonifier 250[®], Danbury, CT, USA). The organic solvent was then evaporated under magnetic stirring for 45 min at room temperature, leaving the cationic niosomes in the aqueous medium. The resulting niosomes were at a concentration of 1 mg cationic lipid/mL.

Previously described protocols (Mashal et al., 2017) were used for the propagation, purification, and quantification of pCMS-EGFP plasmid (5541 bp, Plasmid Factory, Bielefeld, Germany). The nioplexes were produced by mixing an appropriate volume of pCMS-EGFP plasmid stock solution (0.5 mg/mL) with different amounts of the cationic niosome suspension (1 mg/mL) to obtain different cationic niosome/DNA mass ratios (w/w). To improve the electrostatic interaction between the cationic niosome and the negatively charged DNA, the mixture was left for 30 min at room temperature.

2.4. Physicochemical Characterization of Cationic Niosomes/Nioplexes

First, 50 μL of the samples were dispersed in 950 μL of 0.1 mM NaCl solution, and all measurements were carried out in triplicate using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Dynamic light scattering (DLS) was used to determine the particle size and polydispersity index (PDI). Particle size was determined by cumulative analysis of the recorded hydrodynamic diameter. Laser Doppler Velocimetry (LDV) was used to calculate the zeta potential of particles.

The morphology of the cationic niosomes was assessed by transmission electron microscopy (TEM). Briefly, to perform negative staining, a 5 μL sample was adhered onto glow-discharged carbon-coated grids for 90 s, after which the grid with sample was settled onto a drop of 1% uranyl acetate for another 90 s. The samples were examined under TEM using a JEOL JEM 1400-Plus (JEOL Ltd. Akishima, Tokyo, Japan), in bright-field image mode using an accelerating voltage of 120 kV.

2.5. Cell Culture and In Vitro Transfection Assays

hUSCs were seeded in 24-well culture plates at a density of 50,000 cells/well with 300 μL complete medium without antibiotics. After 24 h (70–80% confluence), the medium was removed, and cells were washed with serum-free Opti-MEM[®] solution (Gibco-Thermo Fisher Scientific). Then, 250 μL nioplex solution (1.25 μg DNA) diluted in serum-free Opti-MEM[®] was added to the cells at different cationic lipid:DNA mass ratios (w/w). Cells were left for 4 h at 37 °C. After the incubation time, the transfection medium was removed, and complete medium without antibiotics was added. At this moment, cells were incubated for further 48 h. Following this incubation period, both transfection efficiency and cell viability were determined. Qualitative analysis was performed using an inverted microscope equipped with the EclipseTE2000-S attachment (Nikon, Tokyo, Japan) for fluorescent observation. For quantitative determination, FACSCalibur flow cytometer analysis (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) was performed.

To analyze cell viability by flow cytometry, cells were stained with propidium iodide (Sigma-Aldrich). The FL1 (530/30) detector was used to detect EGFP-expressing transfected cells, and the FL3 (670) detector was used to detect dead/dying cells. Experiments with untransfected cells were used as negative controls, and Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen, CA, USA) was used as a positive control. As a minimum, 10,000 gated events were collected and analyzed for each sample using the BD CellQuest[™] Pro Software (Becton Dickinson Biosciences). Each condition was analyzed in triplicate.

2.6. Cell Uptake and Intracellular Distribution of Nioplexes

For the cellular uptake assay, cells were transfected as described above; however, in this assay, FITC-labeled pCMS-EGFP (DareBio, Madrid, Spain) was used. After 4 h of incubation with the vectors at 37 °C, the transfection medium was removed and cells were washed with PBS, detached, and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences) with the FL1 channel. For each sample, 10,000 events were analyzed. Data are shown as the percentage of FITC-positive cells. Nontransfected cells were used as a negative control. Each condition was analyzed in triplicate.

2.7. Intracellular Trafficking Studies

The endocytosis mechanisms involved in the uptake of nioplexes were evaluated by the colocalization of nioplexes (prepared with FITC-pCMSEGF) with different fluorescently labeled endocytosis markers, all obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). hUSC cells were seeded on coverslips on 24-well culture plates at a density of 80,000 cells/coverslip and transfected with the nioplexes containing the FITC-labeled pCMS-EGFP plasmid for 3 h. After this time, different endocytic vesicle markers were added and incubated for an additional hour with either AlexaFluor® 594-Cholera Toxin (10 µg/mL), AlexaFluor® 568-Transferrin (50 µg/mL), 8.33 µM AlexaFluor® 568-labeled dextran, or LysoTracker (140 nM), which are markers for clathrin-mediated endocytosis (CME), caveolae raft-mediated endocytosis (CvME), the macropinocytosis pathway, and the late endosomal compartment, respectively [41,42]. Cells were fixed with 4% PFA and mounted with Fluoroshield™ with DAPI (Sigma-Aldrich) for examination by confocal laser scanning microscopy (CLSM) using a Zeiss Axio Observer with Apotome 2 (Zeiss, Oberkochen, Germany). In confocal micrographs, the colocalization of the nioplexes (green) and the endocytic pathway (red) was shown as a yellow signal. Fiji ImageJ software was used to analyze the images. The analysis of colocalization was performed using the cross-correlation function (CCF). The colocalization of the green and red signal was analyzed using the Fiji ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, 1.52p version) and quantified by cross-correlation analysis as described in previous reports [43]. Briefly, the green signal image was shifted in the x -direction pixel by pixel relative to the red signal image, and the respective Pearson's coefficient was calculated, which was then plotted as a function of the pixel shift (δx), thereby obtaining the cross-correlation function (CCF). Colocalizing structures peaked at $\delta x = 0$ and presented a bell-shaped curve.

3. Results and Discussion

3.1. Cell Culture Isolation

After 2 weeks of the initial seeding of the urine, groups of cells were present in the wells. They could be passed into a flask and, soon, a homogeneous population was obtained. As fibroblasts, hUSCs were spindle-shaped and had an approximate size of 100 µm (Figure 1).

3.2. Cell Characterization

Cell populations analyzed by flow cytometry showed the surface antigen expression pattern described in Table 1. On the one hand, for the three markers that should be present (CD73, CD90, and CD105), cells showed high fluorescence levels. On the other hand, for those that should be absent (CD14, CD34, and CD105), there was no observable signal due to the corresponding antibodies. It must be highlighted that the antiCD45-PE antibody displayed more fluorescence than expected. Nevertheless, it did not reach the values of the positive antigens. As suspected, HEK293 cells were not positive for MSC markers.

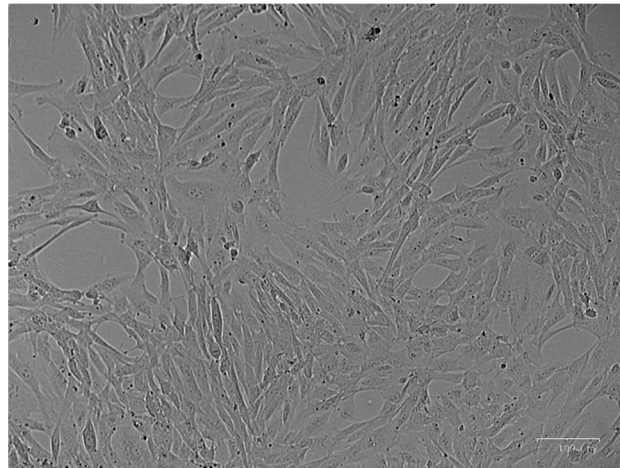


Figure 1. Image of the culture of hUSCs at passage 2 taken using a ZOE™ Fluorescent Cell Imager. Homogeneous spindle-shaped cells are shown. Scale bar: 100 μ m.

Table 1. Percentage of positive cells for each cell surface marker studied by flow cytometry. CD73, CD90, and CD105 correspond to antigens that are present specifically in mesenchymal stem cells. However, CD14, CD34, and CD45 are absent in MSCs. The different fluorophores used were FITC, APC, PE, and AlexaFluor488.

Cell Type	CD73-AlexaFluor488	CD90-APC	CD105-PE	CD14-FITC	CD34-APC	CD45-PE
Commercial mesenchymal stem cells	63.4%	81.7%	70.1%	0.8%	1.3%	20.5%
hUSCs	78.6%	86.4%	66.1%	6.8%	13.4%	52.4%
HEK293	36.5%	0.9%	3.5%	2.8%	0.8%	11.3%

Compared to the reference values proposed by the International Society for Cellular Therapy (ISCT) [5], this culture did not fulfill the hallmarks. However, this is not surprising as, in the literature, it has been demonstrated that conclusive characterization of this cell type requires more in-depth analysis. Moreover, results obtained from different groups are not concordant, and the expression levels established by the ISCT are not always obtained [14]. Moreover, commercial cells, which are supposed to meet quality criteria, did not reach the minimum required either, and their percentages were similar to those of hUSCs.

3.3. Physicochemical Characterization of Cationic Niosomes/Nioplexes

The results for analysis of the GPxT-CQ cationic niosome and the nioplex at a cationic lipid:DNA ratio of 5:1 are summarized in Table 2. When DNA was incorporated into the cationic niosome, the size of the particles increased from 110 to 162 nm. This was expected as the size must increase upon plasmid complexing in the formulation. The values in terms of nanoparticle size remained on the nanometric scale, making them adequate for gene delivery [44].

Table 2. Physicochemical characterization of GPxT-CQ cationic niosome and its corresponding nioplex at a cationic lipid:DNA (*w/w*) ratio of 5:1. Each value represents the mean \pm SD (*n* = 3).

Formulation	Size (nm)	Zeta Potential (mV)	PdI
GPxT-CQ	109.8 \pm 1.01	33.4 \pm 5.7	0.13 \pm 0.01
GPxT-CQ/DNA (5:1)	162.3 \pm 2.6	21.2 \pm 2.4	0.31 \pm 0.04

Regarding the zeta potential, when DNA was complexed to the cationic niosome, it decreased from 33.4 \pm 5.7 to 21.2 \pm 2.4 mV (Table 2). The high positive charge of GPxT-CQ (>+25 mV) makes it appropriate for complexing with a negatively charged nucleic acid prior to cellular internalization [45]. Furthermore, the positive charges of the cationic niosome, which has cationic lipids, are partially neutralized by the negative charge of the

nucleic acid. In addition, this positive zeta potential helps in the interaction between the formulation and the negatively charged cell membrane [46]. Taking all this into account, it remains clear that an interaction occurred between pCMS-EGPF and GPxT-CQ.

Measurements of both the naked cationic niosome and the nioplexes presented low values of polydispersity index (PDI) (0.13 ± 0.01 and 0.31 ± 0.04 , respectively). A higher value of PDI was observed in the nioplex than in the naked cationic niosome. As in the nioplexes the zeta potential was less positive due to the presence of DNA ($<+25$ mV), whereby the repulsion forces were not big enough, and some of the particles tended to aggregate due to interactions between particles, such as van der Waals or hydrogen bonding [47]. Moreover, small polydispersity values usually enhance gene delivery by vehicles [48].

As illustrated in Figure 2, the GPxT-CQ formulation showed a spherical morphology and multilamellar structure when studied by TEM, and no aggregates were present. Usually, lipidic nanoparticles are spherical [49]. However, many formulations with cationic lipids used for gene therapy form lamellar structures when complexed with DNA [50], as was the case with the nanoparticle used in this work (Figure 2).

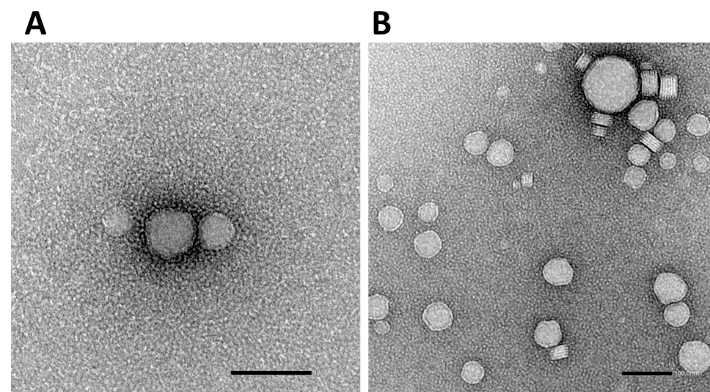


Figure 2. TEM images of GPxT-CQ cationic niosome. Scale bar: 100 nm. (A) 80,000 \times magnification; (B) 50,000 \times magnification.

The use of nonlamellar vesicles is not essential for delivering genetic material into the cell [51]. Moreover, in some studies, it has been demonstrated that lipidic nanoparticles with a multilamellar structure show enhanced gene transfection efficiency. In determining and analyzing the nucleic acid–nanoparticle structure, a rational approach to design could be employed to achieve better gene delivery [52]. Taking this into account, the formulation used in this work presents a promising physical structure for efficient gene delivery into mesenchymal stem cells.

3.4. Cell Viability and Transfection Efficiency of Nioplexes

The screening of different formulations at different cationic lipid:DNA ratios showed that the one with the best transfection efficiency without compromising viability was GPxT-CQ at a cationic lipid:DNA ratio of 5:1 (Figure 3). The transfection efficiency was $6.81\% \pm 0.8\%$ and the cell viability was $77.5\% \pm 4.7\%$. Compared to the commercially available Lipofectamine™ 2000 reagent, the GPxT-CQ cationic niosome formulation at a cationic lipid:DNA ratio of 5:1 showed a higher percentage of transfected cells (6.81% vs. 0.33%), with similar cell viability values (77.5% vs. 83.8%); thus, it was used for further experiments.

Cell transfection efficiency was not very high for GPxT-CQ or the positive control Lipofectamine ($6.81\% \pm 0.8\%$ vs. $0.33\% \pm 0.06\%$, respectively). This could be explained by the fact that primary mesenchymal stem cells are difficult to transfect and there is not yet an efficient method for delivering genetic material into them [53–55]. Even though transfection efficiency can be improved, a high value is not needed for every purpose, as there are studies in which transfection efficiencies were similar to those obtained in this

work [56]. Besides, the transfection efficiency for GPxT-CQ was better than that obtained with Lipofectamine; accordingly, the synthesized formulation is advantageous compared to Lipofectamine. Upgraded gene delivery was obtained in some cases by complexing the genetic material to low-molecular-weight chitosans [57]. The polar head groups of the cationic lipids have also been described as a key factor affecting the transfection efficiency [58].

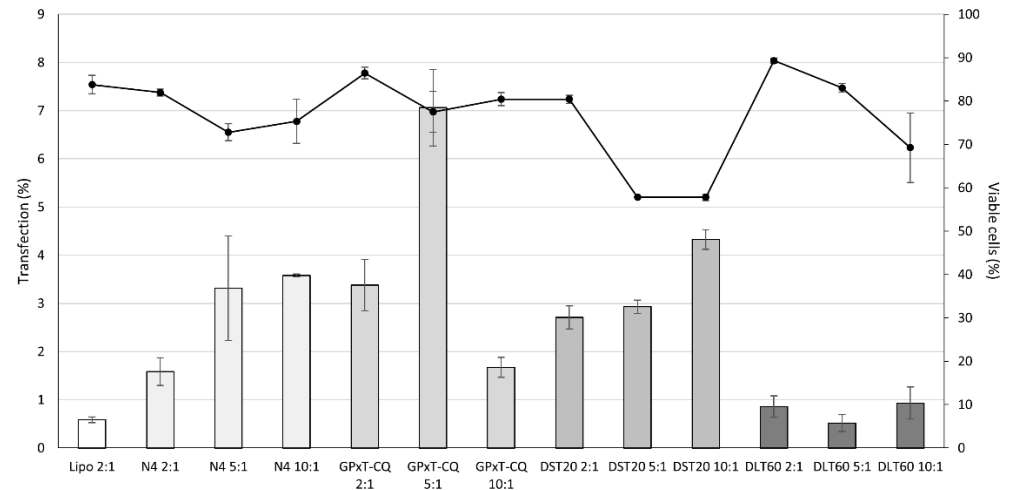


Figure 3. Screening of different nioplexes (N4, GPxT-CQ, DST20, and DLT20) at different cationic lipid/DNA ratios. The bars represent the transfection percentage measured by flow cytometry. Dots joined by the black line show cell viability. Each value represents the mean \pm SD ($n = 3$).

It has been described that chloroquine shows toxicity that could limit cell viability and, consequently, endanger clinical applications [59]. However, in our case, cell viability was not highly compromised as in cells transfected with GPxT-CQ, the percentage was around 77%, suggesting that the low transfection could be associated with cellular uptake of the nioplexes.

3.5. Cellular Uptake Studies

The GPxT-CQ cationic niosome conjugated with DNA at ratio 5:1 was used to assess uptake in hUSC cells. As shown in Figure 4, GPxT-CQ had an uptake percentage of $15.16\% \pm 1.07\%$, lower than that of Lipofectamine, which was $31.26\% \pm 1.76\%$. As can be seen in the microscopy images in Figure 4, cells treated with GPxT-CQ maintained their morphology and looked healthier.

3.6. Trafficking of the Nioplex

The transfection efficiency can be directly affected by the internalization pathway. Thus, trafficking studies were performed with the aim of clarifying the transfection process in hUSCs and to understand why the transfection efficiency was low despite cellular uptake. Cells generally use endocytic pathways to internalize nonviral vectors, primarily clathrin-mediated endocytosis (CME), caveolae-mediated endocytosis (CvME), and micropinocytosis [60,61]. Additionally, each pathway affects the effectiveness of DNA release and its performance inside cells [62]. The intracellular internalization of the selected nioplexes in hUSCs is represented in Figure 5. The main colocalization between the endocytosis pathway and the GPxT-CQ-based nioplexes occurred via caveolae-mediated endocytosis (CvME), where the mean CCF peak value was $0.36\% \pm 0.004\%$. Macropinocytosis was also an important pathway, as the CCF peak value was $0.24\% \pm 0.005\%$. The CCF value was almost zero with Lysotracker. These results are in accordance with the theory postulating that the CvME route avoids lysosomes and, thus, they do not integrate into late endosomes. Macropinocytosis is also believed to follow the nonacidic and nondigestive route [63,64]. Regarding the effect of chloroquine, it was previously reported that

chloroquine prevents endosomal acidification as well as inhibits lysosomal enzymes that could damage the genetic material [65,66], which could explain, at least in part, the results obtained in the screening process.

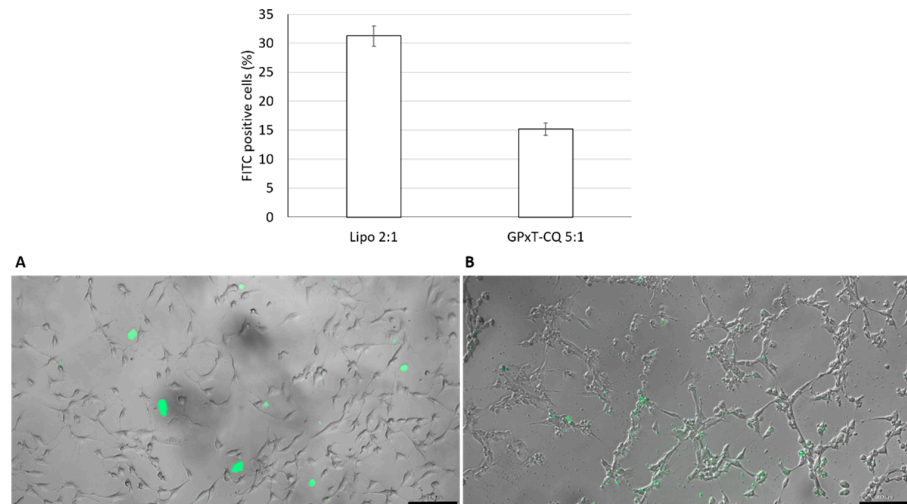


Figure 4. Uptake of FITC-labeled nioplexes in hUSC cells. Lipofectamine was added at a mass ratio of 2:1 and GPxT-CQ 5:1 (*w/w*). Upper panel: percentage of FITC-positive cells and viability. Data represent the mean \pm SD ($n = 3$). Lower panels: fluorescence micrographs of hUSC cells at 4 h of incubation with FITC-labeled nioplexes (Green). (A) Uptake of GPxT-CQ at a lipid/DNA ratio of 5:1 (*w/w*). 1.25 μ g of DNA and 6.25 μ g of GPxT-CQ cationic niosome were added to each well; (B) uptake with Lipofectamine at a lipid/DNA ratio of 2:1 (*w/w*) used as a positive control. 1.25 μ g of the plasmid and 2.5 μ g lipofectamine were used. Scale bar: 100 μ m.

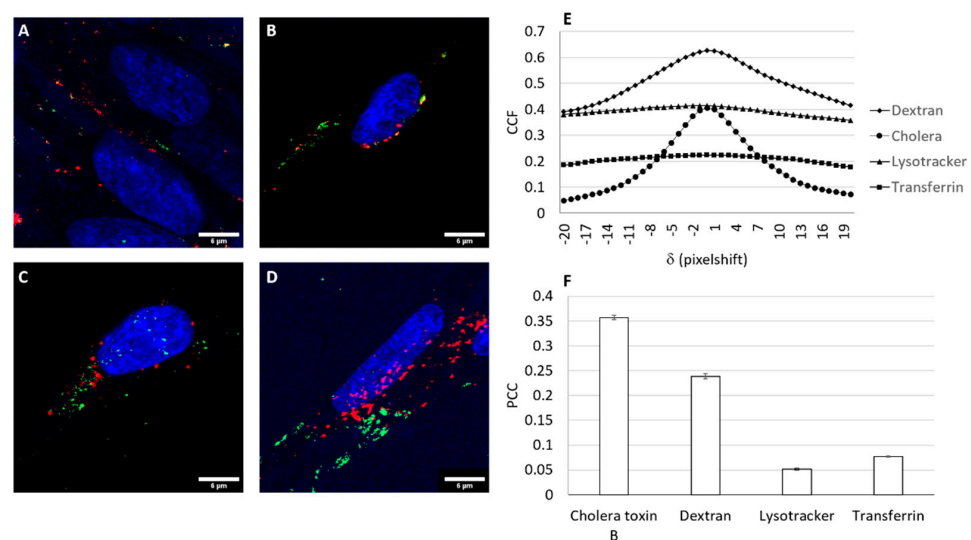


Figure 5. Endocytic and intracellular trafficking pathway detection assay of GPxT-CQ nioplexes in hUSCs. (A–D) Confocal microscopy merged images showing hUSCs co-incubated with GPxT-CQ nioplexes containing the FITC-labeled pCMS-EGFP plasmid (green) and the endocytic vesicle marker (red): (A) caveolae-mediated endocytosis (cholera toxin B), (B) macropinocytosis (dextran), (C) lysosomes (Lysotracker), and (D) clathrin-mediated endocytosis (transferrin). Scale bar: 6 μ m. (E) Cross-correlation function (CCF) of colocalization between red and green signals. Data are represented as the mean \pm SEM, $n = 3$. (F) Pearson correlation coefficient (PCC) of red and green signals determined by cross-correlation analysis in each case. Data are represented as the mean \pm SEM, $n = 3$. For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.

In any case, such results obtained with specific endocytosis markers could be further completed with the use of appropriate and specific inhibitors of main endocytosis pathways, such as genistein to inhibit the caveolae-mediated pathway, chlorpromazine to inhibit the clathrin-mediated pathway, methyl- β -cyclodextrin to inhibit both pathways, or wortmannin to inhibit macropinocytosis-mediated pathways [67–69].

4. Conclusions

In this work, we highlighted that urine can be used as an easily accessible source of mesenchymal stem cells. In addition, these cells can be used for nonviral gene delivery experiments for future clinical gene therapy purposes in genetic disorders by modifying the mutated genome with technologies such as CRISPR/Cas9. However, the process currently has low transfection efficiency due to the difficulty in transfecting mesenchymal stem cells and the lack of a standardized and efficient protocol.

Despite the transfection efficiency not being high, GPxT-CQ at a cationic lipid:DNA ratio of 5:1 was an adequate nioplex for gene therapy in hUSCs and gave promising results. Furthermore, depending on the use, high rates of transfection may not be necessary. Therefore, the clinical application of these nioplexes combined with hUSCs cannot be discarded. This formulation was integrated into the cell via CvME and it did not interact with lysosomes. In the future, further experiments should be carried out in order to obtain better uptake percentages and more effective internalization of the DNA into the cell nucleus, for example, following such strategies as the use of polymers such as oligochitosans. Despite primary cells being difficult to transfect, the process could also be optimized to achieve better transfection rates. Nevertheless, it must be reiterated that these results do not limit the clinical applicability of this process.

In summary, this study describes the first protocol for obtaining and transfecting urine-derived mesenchymal stem cells with nonviral vectors. Thus, it opens the door to using this gene delivery process for clinical purposes.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pharmaceutics13050696/s1>, Figure S1. Nucleic acid integrity and methylation status stability of the cell culture. (A) Agarose gel electrophoresis of (A1) genomic DNA, where the bright band in the upper part of the gel demonstrates that the genomic DNA is not degraded, and (A2) total RNA of the cells, where the different bands correspond to the pattern expected for ribosomal RNA. (B) MS-MLPA study of multilocus imprinting disorders. Cells were tested at different passages for different imprinted loci, Figure S2. Alizarin Red-stained hUSCs. Reverse-phase microscope photographs for differentiated cells (A: 4 \times , B: 10 \times) and negative controls (C: 4 \times , D: 10 \times) are shown. Stained in red, calcium ac-cumulations are observable in (A) and (B) but not in (C) and (D). (E) Osteogenic differentiation quantification. Absorbance data at 405 nm are presented. Mann–Whitney’s statistical test was performed, and significant differences (** $p < 0.05$) were obtained between the control and each group of differentiated cells. Taken altogether, this confirms that treated cells differentiated into osteocytes, whereas negative controls did not.

Author Contributions: Conceptualization, J.Z., C.M. and G.P.d.N.; provision of study material or patients, M.M.d.P., G.P., C.M. and G.P.d.N.; collection and/or assembly of data, Y.V., S.J.-B. and M.R.; methodology, Y.V., S.J.-B. and M.R.; formal analysis, Y.V., G.P., J.Z., G.P.d.N., C.M. and J.L.P.; writing—original draft preparation, Y.V., G.P.d.N. and J.Z.; writing—review and editing, G.P.d.N., J.Z., G.P., J.L.P. and C.M.; project administration, Y.V.; funding acquisition, G.P.d.N., J.L.P. and C.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by a grant from the EITB Maratoia to G.P.d.N., C.M., and J.L.P. (BIO16/ER/005), from the University of the Basque Country UPV/EHU to Y.V. (PIF17/29), and from the Basque Government to S.J.-B. (PRE_2017-1-0365).

Acknowledgments: The authors wish to thank the intellectual and technical assistance from ICTS “NANBIOSIS”, more specifically the Drug Formulation Unit (U10) of the CIBER in Bioengineering, Biomaterials, and Nanomedicine (CIBER-BBN) at the University of Basque Country (UPV/EHU). The authors also wish to thank Myriam Sainz-Ramos from NanoBioCel Research Group for her technical assistance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Verma, I.M.; Weitzman, M.D. Gene therapy: Twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 711–738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Yin, H.; Kanasty, R.L.; Eltoukhy, A.A.; Vegas, A.J.; Dorkin, J.R.; Anderson, D.G. Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 541–555. [[CrossRef](#)]
3. Friedenstein, A.J.; Deriglasova, U.F.; Kulagina, N.N.; Panasuk, A.F.; Rudakowa, S.F.; Luriá, E.A.; Ruadkow, I.A. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* **1974**, *2*, 83–92. [[PubMed](#)]
4. Jeon, B.-G.; Jang, S.-J.; Park, J.-S.; Subbarao, R.B.; Jeong, G.-J.; Park, B.-W.; Rho, G.-J. Differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from human dental tissues into non-mesodermal lineage. *Anim. Cells Syst.* **2015**, *19*, 321–331. [[CrossRef](#)]
5. Dominici, M.; Blanc, K.L.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317. [[CrossRef](#)]
6. Horwitz, E.M.; Blanc, K.L.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Deans, R.J.; Krause, D.S.; Keating, A. International Society for Cellular Therapy Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2005**, *7*, 393–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Attia, N.; Mashal, M.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Zárata, J.; Puras, G.; Pedraz, J.L. Stem cell-based gene delivery mediated by cationic niosomes for bone regeneration. *Nanomedicine* **2018**, *14*, 521–531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Chen, L.; Li, L.; Xing, F.; Peng, J.; Peng, K.; Wang, Y.; Xiang, Z. Human urine-derived stem cells: Potential for cell-based therapy of cartilage defects. *Stem Cells Int.* **2018**, *2018*, 4686259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Ji, X.; Wang, M.; Chen, F.; Zhou, J. Urine-derived stem cells: The present and the future. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 4378947. [[CrossRef](#)]
10. Zuk, P.A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J.W.; Katz, A.J.; Benhaim, P.; Lorenz, H.P.; Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **2001**, *7*, 211–228. [[CrossRef](#)]
11. Sarugaser, R.; Lickorish, D.; Baksh, D.; Hosseini, M.M.; Davies, J.E. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* **2005**, *23*, 220–229. [[CrossRef](#)]
12. Guan, J.-J.; Niu, X.; Gong, F.-X.; Hu, B.; Guo, S.-C.; Lou, Y.-L.; Zhang, C.-Q.; Deng, Z.-F.; Wang, Y. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: Potential for cell-based therapy in neurology. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20*, 1794–1806. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, Y.; McNeill, E.; Tian, H.; Soker, S.; Andersson, K.-E.; Yoo, J.J.; Atala, A. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction. *J. Urol.* **2008**, *180*, 2226–2233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bento, G.; Shafiqullina, A.K.; Rizvanov, A.A.; Sardão, V.A.; Macedo, M.P.; Oliveira, P.J. Urine-derived stem cells: Applications in regenerative and predictive medicine. *Cells* **2020**, *9*, 573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Wu, S.; Liu, Y.; Bharadwaj, S.; Atala, A.; Zhang, Y. Human urine-derived stem cells seeded in a modified 3D porous small intestinal submucosa scaffold for urethral tissue engineering. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1317–1326. [[CrossRef](#)]
16. Qin, H.; Zhu, C.; An, Z.; Jiang, Y.; Zhao, Y.; Wang, J.; Liu, X.; Hui, B.; Zhang, X.; Wang, Y. Silver nanoparticles promote osteogenic differentiation of human urine-derived stem cells at noncytotoxic concentrations. *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 2469–2478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Liu, Y.; Zheng, Y.; Li, S.; Xue, H.; Schmitt, K.; Hergenroeder, G.W.; Wu, J.; Zhang, Y.; Kim, D.H.; Cao, Q. Human neural progenitors derived from integration-free iPSCs for SCI therapy. *Stem Cell Res.* **2017**, *19*, 55–64. [[CrossRef](#)]
18. Guan, J.; Zhang, J.; Zhu, Z.; Niu, X.; Guo, S.; Wang, Y.; Zhang, C. Bone morphogenetic protein 2 gene transduction enhances the osteogenic potential of human urine-derived stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2015**, *6*, 5. [[CrossRef](#)]
19. Reiser, J.; Zhang, X.-Y.; Hemenway, C.S.; Mondal, D.; Pradhan, L.; Russa, V.F.L. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. *Expert Opin. Biol. Ther.* **2005**, *5*, 1571–1584. [[CrossRef](#)]
20. Bharadwaj, S.; Liu, G.; Shi, Y.; Wu, R.; Yang, B.; He, T.; Fan, Y.; Lu, X.; Zhou, X.; Liu, H.; et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: Potential for therapeutic applications in urology. *Stem Cells* **2013**, *31*, 1840–1856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Lang, R.; Liu, G.; Shi, Y.; Bharadwaj, S.; Leng, X.; Zhou, X.; Liu, H.; Atala, A.; Zhang, Y. Self-renewal and differentiation capacity of urine-derived stem cells after urine preservation for 24 h. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e53980. [[CrossRef](#)]
22. Baum, C.; Kustikova, O.; Modlich, U.; Li, Z.; Fehse, B. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum. Gene Ther.* **2006**, *17*, 253–263. [[CrossRef](#)]
23. Bessis, N.; GarciaCozar, F.J.; Boissier, M.-C. Immune responses to gene therapy vectors: Influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Ther.* **2004**, *11*, S10–S17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Thomas, C.E.; Ehrhardt, A.; Kay, M.A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* **2003**, *4*, 346–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bouard, D.; Alazard-Dany, D.; Cosset, F.-L. Viral vectors: From virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* **2009**, *157*, 153–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Pack, D.W.; Hoffman, A.S.; Pun, S.; Stayton, P.S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 581–593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Mintzer, M.A.; Simanek, E.E. Nonviral vectors for gene delivery. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 259–302. [[CrossRef](#)]
28. Putnam, D. Polymers for gene delivery across length scales. *Nat. Mater.* **2006**, *5*, 439–451. [[CrossRef](#)]
29. Pezzoli, D.; Kajaste-Rudnitski, A.; Chiesa, R.; Candiani, G. Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors. In *Nanomaterial Interfaces in Biology*; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2013; pp. 269–279.
30. Rajera, R.; Nagpal, K.; Singh, S.K.; Mishra, D.N. Niosomes: A controlled and novel drug delivery system. *Biol. Pharm. Bull.* **2011**, *34*, 945–953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Ojeda, E.; Agirre, M.; Villate-Beitia, I.; Mashal, M.; Puras, G.; Zarate, J.; Pedraz, J.L. Elaboration and physicochemical characterization of niosome-based nioplexes for gene delivery purposes. *Methods Mol. Biol.* **2016**, *1445*, 63–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Puras, G.; Mashal, M.; Zárata, J.; Agirre, M.; Ojeda, E.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Diaz-Tahoces, A.; Martínez Navarrete, G.; Avilés-Trigueros, M.; et al. A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *J. Control. Release* **2014**, *174*, 27–36. [[CrossRef](#)]
33. Ma, B.; Zhang, S.; Jiang, H.; Zhao, B.; Lv, H. Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery. *J. Control. Release* **2007**, *123*, 184–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Liu, F.; Yang, J.; Huang, L.; Liu, D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complexes and emulsion-mediated gene transfer. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1642–1646. [[CrossRef](#)]
35. Moghassemi, S.; Hadjizadeh, A. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *J. Control. Release* **2014**, *185*, 22–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chung, H.; Kim, T.W.; Kwon, M.; Kwon, I.C.; Jeong, S.Y. Oil components modulate physical characteristics and function of the natural oil emulsions as drug or gene delivery system. *J. Control. Release* **2001**, *71*, 339–350. [[CrossRef](#)]
37. Chen, C.-Y.; Rao, S.-S.; Ren, L.; Hu, X.-K.; Tan, Y.-J.; Hu, Y.; Luo, J.; Liu, Y.-W.; Yin, H.; Huang, J.; et al. Exosomal DMBT1 from human urine-derived stem cells facilitates diabetic wound repair by promoting angiogenesis. *Theranostics* **2018**, *8*, 1607–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hulspas, R.; O’Gorman, M.R.G.; Wood, B.L.; Gratama, J.W.; Sutherland, D.R. Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytom. B. Clin. Cytom.* **2009**, *76*, 355–364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Gallego, I.; Villate-Beitia, I.; Martínez-Navarrete, G.; Menéndez, M.; López-Méndez, T.; Soto-Sánchez, C.; Zárata, J.; Puras, G.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Non-viral vectors based on cationic niosomes and minicircle DNA technology enhance gene delivery efficiency for biomedical applications in retinal disorders. *Nanomedicine* **2019**, *17*, 308–318. [[CrossRef](#)]
40. Mashal, M.; Attia, N.; Puras, G.; Martínez-Navarrete, G.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Retinal gene delivery enhancement by lycopene incorporation into cationic niosomes based on DOTMA and polysorbate. *J. Control. Release* **2017**, *254*, 55–64. [[CrossRef](#)]
41. Ojeda, E.; Puras, G.; Agirre, M.; Zarate, J.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; DiGiacomo, L.; Caracciolo, G.; Pedraz, J.-L. The role of helper lipids in the intracellular disposition and transfection efficiency of niosome formulations for gene delivery to retinal pigment epithelial cells. *Int. J. Pharm.* **2016**, *503*, 115–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Villate-Beitia, I.; Gallego, I.; Martínez-Navarrete, G.; Zárata, J.; López-Méndez, T.; Soto-Sánchez, C.; Santos-Vizcaíno, E.; Puras, G.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Polysorbate 20 non-ionic surfactant enhances retinal gene delivery efficiency of cationic niosomes after intravitreal and subretinal administration. *Int. J. Pharm.* **2018**, *550*, 388–397. [[CrossRef](#)]
43. Van Steensel, B.; Van Binnendijk, E.P.; Hornsby, C.D.; Van der Voort, H.T.; Krozowski, Z.S.; Kloet, E.R.D.; Van Driel, R. Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons. *J. Cell Sci.* **1996**, *109*, 787–792. [[CrossRef](#)]
44. Andar, A.U.; Hood, R.R.; Vreeland, W.N.; DeVoe, D.L.; Swaan, P.W. Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. *Pharm. Res.* **2014**, *31*, 401–413. [[CrossRef](#)]
45. Hosseinkhani, H.; Tabata, Y. Self assembly of DNA nanoparticles with polycations for the delivery of genetic materials into cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, *6*, 2320–2328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Rezvani, A.Z.; Rahimizadeh, M.; Eshghi, H.; Dehshahri, A.; Ramezani, M. The effect of cationic charge density change on transfection efficiency of polyethylenimine. *Iran J. Basic Med. Sci.* **2013**, *16*, 150–156.
47. Kumar, A.; Dixit, C.K. Methods for characterization of nanoparticles. In *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 43–58.
48. Nafee, N.; Taetz, S.; Schneider, M.; Schaefer, U.F.; Lehr, C.-M. Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: Effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2007**, *3*, 173–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Naseri, N.; Valizadeh, H.; Zakeri-Milani, P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure, preparation and application. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5*, 305–313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Radler, J.O. Structure of DNA-cationic liposome complexes: DNA intercalation in multilamellar membranes in distinct interhelical packing regimes. *Science* **1997**, *275*, 810–814. [[CrossRef](#)]
51. Pawlowska, D.; Janich, C.; Langner, A.; Dobner, B.; Wölk, C.; Brezesinski, G. The impact of alkyl-chain purity on lipid-based nucleic acid delivery systems—Is the utilization of lipid components with technical grade justified? *Chemphyschem* **2019**, *20*, 2110–2121. [[CrossRef](#)]

52. Eygeris, Y.; Patel, S.; Jozic, A.; Sahay, G. Deconvoluting lipid nanoparticle structure for messenger RNA delivery. *Nano Lett.* **2020**, *20*, 4543–4549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Carvalho, T.G.D.; Pellenz, F.M.; Laureano, A.; Silla, L.M.R.D.; Giugliani, R.; Baldo, G.; Matte, U. A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.* **2018**, *40*, 617–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Santos, F.D.; Andrade, P.Z.; Abecasis, M.M.; Gimble, J.M.; Chase, L.G.; Campbell, A.M.; Boucher, S.; Vemuri, M.C.; Silva, C.L.D.; Cabral, J.M.S. Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: A microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng. Part C Methods* **2011**, *17*, 1201–1210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wang, W.; Xu, X.; Li, Z.; Lendlein, A.; Ma, N. Genetic engineering of mesenchymal stem cells by non-viral gene delivery. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **2014**, *58*, 19–48. [[CrossRef](#)]
56. Villate-Beitia, I.; Puras, G.; Soto-Sánchez, C.; Agirre, M.; Ojeda, E.; Zarate, J.; Fernández, E.; Pedraz, J.L. Non-viral vectors based on magnetoplexes, lipoplexes and polyplexes for VEGF gene delivery into central nervous system cells. *Int. J. Pharm.* **2017**, *521*, 130–140. [[CrossRef](#)]
57. Deshpande, P.P.; Biswas, S.; Torchilin, V.P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1509–1528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ojeda, E.; Puras, G.; Agirre, M.; Zarate, J.; Grijalvo, S.; Eritja, R.; Martínez-Navarrete, G.; Soto-Sánchez, C.; Diaz-Tahoces, A.; Aviles-Trigueros, M.; et al. The influence of the polar head-group of synthetic cationic lipids on the transfection efficiency mediated by niosomes in rat retina and brain. *Biomaterials* **2016**, *77*, 267–279. [[CrossRef](#)]
59. Zhang, X.; Sawyer, G.J.; Dong, X.; Qiu, Y.; Collins, L.; Fabre, J.W. The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct. *J. Gene Med.* **2003**, *5*, 209–218. [[CrossRef](#)]
60. Rejman, J.; Oberle, V.; Zuhorn, I.S.; Hoekstra, D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* **2004**, *377*, 159–169. [[CrossRef](#)]
61. Xiang, S.; Tong, H.; Shi, Q.; Fernandes, J.C.; Jin, T.; Dai, K.; Zhang, X. Uptake mechanisms of non-viral gene delivery. *J. Control. Release* **2012**, *158*, 371–378. [[CrossRef](#)]
62. Wasungu, L.; Hoekstra, D. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. *J. Control. Release* **2006**, *116*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nichols, B. Caveosomes and endocytosis of lipid rafts. *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 4707–4714. [[CrossRef](#)]
64. Xiang, S.; Zhang, X. Cellular Uptake Mechanism of Non-Viral Gene Delivery and Means for Improving Transfection Efficiency. In *Gene Therapy—Tools and Potential Applications*; InTech: London, UK, 2013.
65. Sanz, V.; Coley, H.M.; Silva, S.R.P.; McFadden, J. Protamine and chloroquine enhance gene delivery and expression mediated by RNA-wrapped single walled carbon nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2012**, *12*, 1739–1747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Cheng, J.; Zeidan, R.; Mishra, S.; Liu, A.; Pun, S.H.; Kulkarni, R.P.; Jensen, G.S.; Bellocq, N.C.; Davis, M.E. Structure-function correlation of chloroquine and analogues as transgene expression enhancers in nonviral gene delivery. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6522–6531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Mashal, M.; Attia, N.; Soto-Sánchez, C.; Martínez-Navarrete, G.; Fernández, E.; Puras, G.; Pedraz, J.L. Non-viral vectors based on cationic niosomes as efficient gene delivery vehicles to central nervous system cells into the brain. *Int. J. Pharm.* **2018**, *552*, 48–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Jiang, Z.; He, H.; Liu, H.; Thayumanavan, S. Cellular uptake evaluation of amphiphilic polymer assemblies: Importance of interplay between pharmacological and genetic approaches. *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 4407–4418. [[CrossRef](#)]
69. Ho, L.W.C.; Yung, W.-Y.; Sy, K.H.S.; Li, H.Y.; Choi, C.K.K.; Leung, K.C.-F.; Lee, T.W.Y.; Choi, C.H.J. Effect of alkylation on the cellular uptake of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles. *ACS Nano* **2017**, *11*, 6085–6101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Gernutik lortutako zelula ama mesenkimalak (hUSC) pseudohipoparatiroidismoaren (PHP) terapia geniko ez-biralerako

Vado Y^{1,2}, Pedraz JL¹, Perez de Nanclares G², Zarate J¹

¹NanoBioCel Ikerketa Taldea, Farmazia eta Elikagaien Zientziak Saila, Farmazia Fakultatea, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Networking Research Center of Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.

²Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea, (Epi)Genetika Molekularreko Laborategia, BioAraba Osasun Ikerketa Institutua, Arabako Unibertsitate Ospitalea-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Araba, Espainia.

yera.vado@ehu.eus

Laburpena

Zelula ama mesenkimalak (MSC) giza gorputzean hainbat nitxotan aurkitzen diren zelula ama heldu multipotentek dira. Gizakien gernutik lortutako MSCak (hUSC), ohiko MSCen abantaila biologiko guztiak mantentzeaz gain, era ez-inbaditzailean lortzen dira. Pseudohipoparatiroidismoa (PHP) gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da, hormona paratiroideoaren (PTH) aurkako erresistentziak ezaugarritzen dituena. Ikerketa honetan hUSCak isolatzeko protokoloa garatu dugu eta *niosoma* deritzan bektore ez-biral lipidikoekin transfektatzeko prozedura zehaztasunez aztertu dugu, etorkizunean PHP bezalako gaixotasunen terapia genikoan aplikatu ahal izateko.

Hitz gakoak: pseudohipoparatiroidismoa, hUSC, bektore ez-biralak, niosomak, terapia genikoa.

Abstract

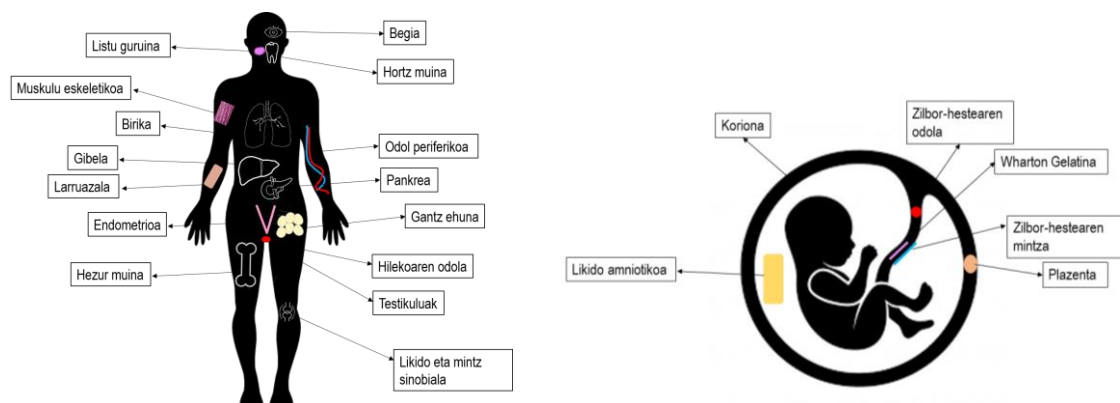
Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult multipotent stem cells that can be found in several niches. Human urine-derived mesenchymal stem cells (hUSCs) maintain the advantages of MSCs and in addition, they can be isolated in a non-invasive way from an easily accessible source. Pseudohypoparathyroidism (PHP) is an heterogeneous group of (epi)genetic disorders characterized by parathyroid hormone (PTH) resistance. In this research, we have developed and validated a protocol based on the non-viral vectors known as niosomes for transfecting hUSCs. This strategy could be used in the future with gene therapy purposes in genetic diseases such as PHP.

Keywords: pseudohypoparathyroidism, hUSC, non-viral vectors, niosomes, gene therapy

1. Sarrera eta motibazioa

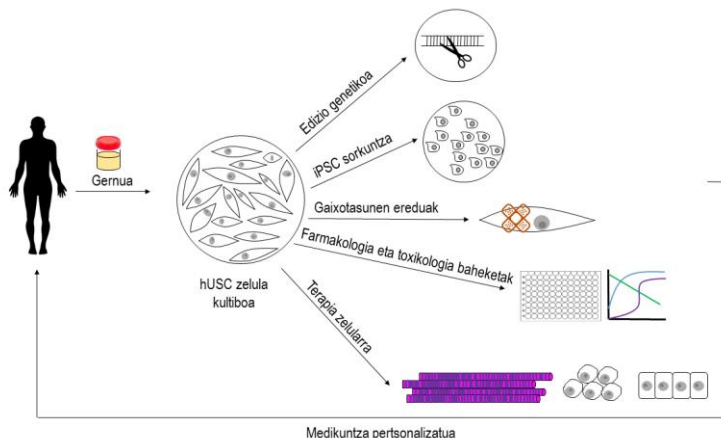
Zelula ama mesenkimalek (MSC) autoberriztapenerako gaitasuna dute, multipotentek dira eta egonkortasun genomiko bikaina mantenduz kultibatu daitezke (Horwitz et al., 2005). Era berean, zelulak pazientearengandik bertatik lor daitezke, hau da, jatorri autologoa izan dezakete, eta, kasu horietan, ez dute inolako erantzun immunerik sustatzen (Chen et al., 2018).

1. Irudia. MSCak aurkitu daitezkeen nitxoak, heldu baten gorputzean (ezkerra) eta fetu batean (eskuina).



2008an, Zhang eta kideek lehen aldiz deskribatu zuten giza gernutik isolatutako zelula ama mesenkimalen (hUSC) kultibo bat (Zhang et al., 2008). Gainerako MSCek bezala, hUSCek ugaltzeko eta autoberritzeko gaitasun handia dute eta hainbat zelula leinutan diferentziatzeko potentziala mantentzen dute (Guan et al., 2014). Era berean, beste nitxo batzuetatik lortutako MSCekin alderatuta, hUSCak modu ez-inbaditzaile, erraz eta seguruan isolatu daitezkeenez, jatorri autologoko zelula gisa hainbat gaixotasun tratatzeko potentzial handia dute (Pavathuparambil et al., 2018). Izan ere, hUSC zelulei lotutako hainbat aplikazio kliniko aurki daitezke (2. Irudia). Adibidez, hainbat esparrutan terapia genikorako erabili dira, hala nola patologia neurologikoetan eta baita tumore-hazkundera murrizteko ere (Reiser et al., 2005).

2. Irudia. hUSCen aplikazioak. Irudi honen bidez, hUSCek gernutik jaso eta kultibatu ondoren izan ditzaketan aplikazioak eskematizatzen dira.



Pseudohipoparatiroidismo (PHP) gisa ezagutzen diren adierazpen kliniko ezberdinetan, *GNAS* genearen mailako aldaera genetikoak zein locus mailako inprontaren alterazioak deskribatu dira (Turan eta Bastepe, 2013). PHPa hormona paratiroideoaren (PTH) aurkako erresistentziak eta hipokaltzemiak eta hiperfosfatemiak ezaugarritzen dituen gaixotasun (epi)genetiko talde heterogeneo eta arraroa da.

Azken urteotan gene-terapiari bektore ez-biralak erabili dira bektore biralen alternatiba gisa. Bektore ez-biralak fabrikatzeko errazagoak eta merkeagoak dira, eta printzipioz mugagabea den tamaina duen material genetikoak garraiatu dezakete. Gainera, seguruagoak dira, ez baitute erantzun immunerik sortzen (Mintzer eta Simanek, 2009). Bestalde, bektore ez-biralek duten desabantailarik handiena transfekzio-tasa baxua da, eta, aldi berean, material genetiko exogenoaren adierazpen-denbora laburra (Pezzoli et al., 2012). Bektore ez-biralen artean, gehien aztertu eta erabiltzen direnak nanopartikula lipidikoak dira, bereziki liposomak (Pezzoli et al., 2013).

Niosomak liposomen aurkako aukera bezala erabili daitezkeen bigeruz lipidikoko besikula esferikoak dira. Bere egitura dela eta, material hidrofiliakoak eta lipofiliakoak garraiatu ditzakete (Moghasssemi eta Hadjizadeh, 2014). Liposomekin alderatuta, niosomak ez dira hain toxikoak zelularentzat, hauen ekoizpena errazagoa eta merkeagoa da, maneiua seguruagoa da eta, gainera, kimikoki egonkorragoak dira (Marianecchi et al., 2014). Helburua zelulan material genetiko sartzea denean, niosoma kationikoak ekoiztu eta elkarrekintza elektrostatikoen bidez azido nukleikoak mintzeko besikuletara errazago batu daiteke (Ma et al., 2007).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gure ikerketa taldeak zenbait urte daramatza terapia genikorako bektore ez-biralak garatzen, bereziki niosoma kationikoak (Grijalvo et al., 2019). Bektore ez-biralak MSCen bidezko terapia genikoan erabiltzeko hautagai egokiak izan daitezke. Terapiarako hautagai diren geneak garraiatzaile ez-biralen laguntzarekin MSCetan transfektatu daitezke eta dagokion transgenea adierazi daiteke zelula hauetan. Nahiz eta MSCen bidezko terapia genikoa estrategia nahiko

berria izan, zenbait gaixotasun genetikoren tratamendurako aukera oso egokia izan daiteke (Mohammadian et al., 2016). MSCak are interesgarriagoak bihurtzen dira, hUSCen kasuan bezala, gaixoarengandik modu ez-inbaditzaile, erraz, simple eta seguruan isolatu daitezkeen.

2.1 Helburu nagusia

Ikerketa lan honetan arlo klinikoko eta unibertsitateko ikertzaileok bat egin dugu ondorengo helburu nagusia lortu nahian: PHP eragiten duten *GNAS* genearen mutazio ezagunak zuzentzea helburu duen hUSC zeluletan eta bektore ez biraletan oinarritutako terapia genikorako protokoloa diseinatzea eta balidatzea. Aukera ezberdinen artean, genetikoki manipulaturako hUSC zelula autoloakoak ex vivo transferitzeko estrategia daukagu begiz jota.

2.2 Azpichelburuak

- 1) Ospitaleko pazienteen gernetik hUSCak erauzi eta *in vitro* kultibatzeko prozedimendua garatzea.
- 2) Gernetik isolaturako zelulak benetan MSCak direla balidatzea.
- 3) hUSCak genetikoki manipulatzeko material genetikoaren bektore moduan erabiliko den niosoma diseinatzea eta fisikokimikoki karakterizatzea.
- 4) hUSCetan niosomaren bidezko genearen transfekzio prozesuaren ezagutza handitzea eta efizientzia neurtzea.

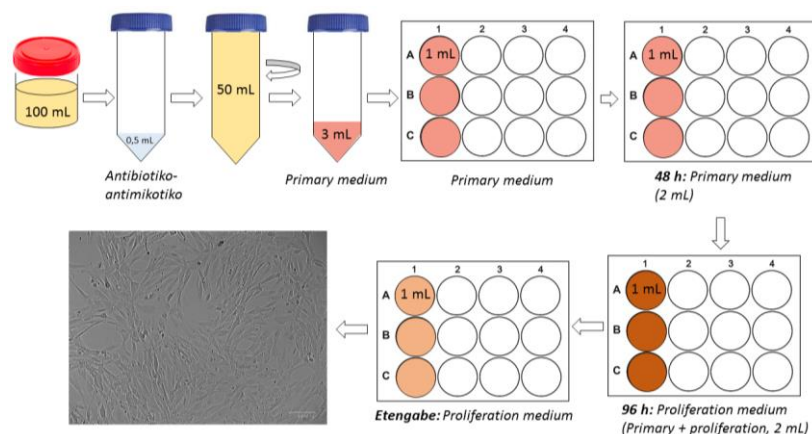
3. Ikerketaren muina

Atal honetan ikerketako helburuak betetzeko ospitalean eta laborategian buruturiko ekintzak edota entseguak eta lortutako emaitza nagusiak deskribatzen dira.

3.1 Pazienteen gernetik hUSCen erauzketa eta *in vitro* kultiboa

Zelulen isolaketarako, Chun-Yuan C. eta kideek (2018) garaturako protokoloa jarraitu da (3. Irudia).

3. Irudia. Gernetik hUSCak erauzteko prozesua. Prozesuaren amaieran lortutako kultiboaren argazki bat ageri da.



Pazienteengandik gertu jaso eta zentrifugazio eta garbiketa prozesuak egin dira. Lehenengo, zelulak *primary medium* deituriko medioarekin (konposaketa zehatza aurretik aipaturako erreferentzian dago) erein dira. Erein eta hiru egunetara, *proliferation medium* (Chun-Yuan C.-ren artikuluan deskribatuta) erabili da *primary medium*-ekin batera. Laugarren egunetik aurrera, zelulen hazkuntzarako *proliferation medium* bakarrik erabili da. Gutxi gorabehera, laugarren

egunean lehenengo zelulak ikusi dira. Zelula hauek luzangak dira eta populazio homogeneoa eratzten dute.

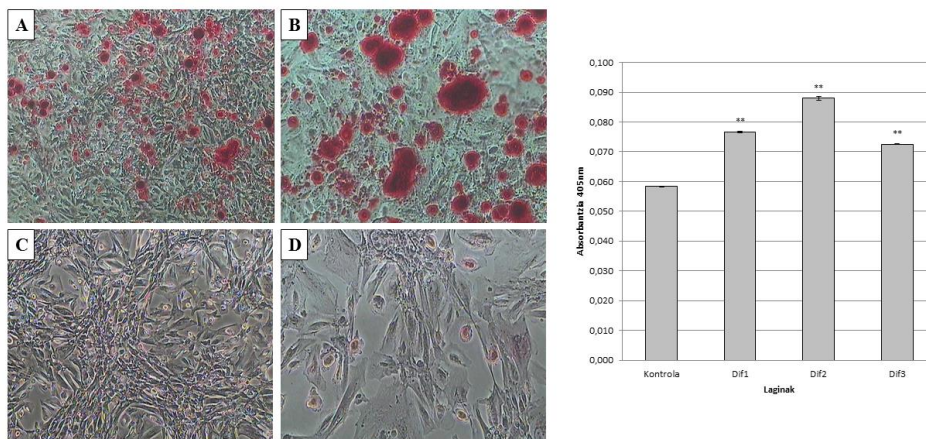
3.2 Isolatutako hUSCen balidazioa

Gernutik isolatutako zelulak benetan MSCak direla frogatzeko, bi entsegu egin dira.

3.2.1 Osteozitoetara diferentziatzeko gaitasuna frogatzeko entsegua

hUSCek osteozitoetara diferentziatzeko duten gaitasuna aztertu da “StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit” erabilita. Behin protokoloa burututa, *Alizarin red* tindaketarekin baieztatu da osteozitoetara diferentziazioa eman den edo ez. Gainera, mikroskopiorekin ikusteaz gain, kaltzioaren neurketa kuantitatiboa egin da, kontrol negatibo batekin konparatuz.

4. Irudia. Ezkerreko irudietan, *Alizarin red* tindaketa egin eta gero diferentziatutako zelulen (A: 4X, B: 10X) eta kontrol negatiboen (C: 4X, D: 10X) mikroskopioko argazkiak ikusi daitezke. Gorritz kaltzio pilaketak ikusten dira A eta B irudietan. Era honetan, bisualki frogatzen da tratatutako zelulak osteozitoetara diferentziatu direla. Eskuineko grafikan, kaltzioaren kuantifikazio kolorimetrikoa adierazten da (absorbantzia 405 nm). Mann-Whitney’s test estatistikoa egin da eta ezberdintasun esanguratsuak (**p<0,01) aurkitu dira tratatutako laginen (Dif1, Dif2 eta Dif3) eta kontrolaren artean.



3.2.2 Fluxu-zitometria

Terapia Zelularrerako Nazioarteko Elkarteak (ISCT) zehazten duenez, zelula kultibo batean zelula mesenkimalak daudela esan ahal izateko, fluxu-zitometria bidez mintzeko markatzaile batzuk ikusi behar dira (zelulak positiboak izan behar dira horietarako) eta beste batzuen gabezia egon behar da (zelulak negatiboak izan behar dira). Gure kasuan, markatzaile positiboak CD73, CD90 eta CD105 izan dira eta negatiboak CD14, CD34 eta CD45. Entsegurako, gernutik lortutako zelulez gain, kontrol positibo gisa zelula mesenkimal komertzialak erabili dira eta kontrol negatibo gisa HEK293 zelula epitelialak.

2. Taula. Mintzeko proteina bakoitzeko lortu diren zelula positiboen portzentajea adierazten da. CD73, CD90 eta CD105 antigenoak espezifikoki adierazten dira zelula mesenkimaletan eta CD14, CD34 eta CD45 ez dira adierazten. FITC, APC, PE eta AlexaFluor488 fluoroforoak erabili dira.

	Positiboak (>%95)			Negatiboak		
	CD73-AlexaFluor488	CD90-APC	CD105-PE	CD14-FITC	CD34-APC	CD45-PE
MSC komertzialak	%63,4	%81,7	%70,1	%0,8	%1,3	%20,5
hUSCak	%78,6	%86,4	%66,1	%6,8	%13,4	%52,4
HEK293	%36,5	%0,9	%3,5	%2,8	%0,8	%11,3

Zitometroko emaitzetan ez da ISCTak ezartzen duen balio minimoa lortu (%95 markatzaile positiboetarako). Hala ere, argi ikusten da markatzaile positiboetarako portzentaje altuak lortzen direla eta negatiboetarako ez dagoela ia seinalerik. Gainera, zelula komertzialak eta laborategian

isolatutako hUSCak antzeko emaitzak dituzte, batez ere markatzaile positiboetarako. Espero zen moduan, HEK293 zelulek ez dute seinalerik ematen MSC zelulen markatzaile espezifikoeekin.

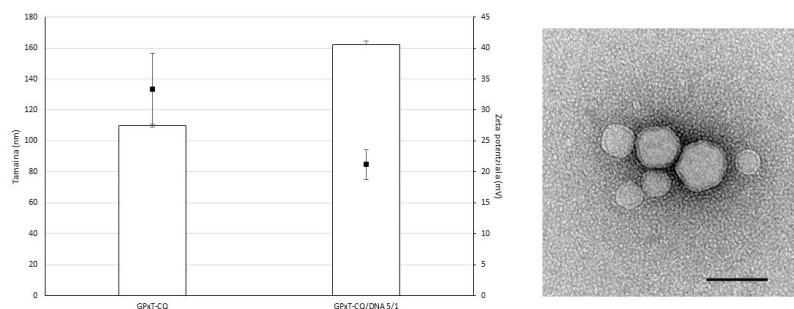
3.3 Niosomen diseinua eta karakterizazio fisikokimikoa

Niosomen sintesirako fase lurrunketa alderantzikaturik teknika erabili da. Alde batetik, disoluzio hidrofobikoa eta bestetik, disoluzio hidrofilikoa prestatu dira. Ondoren, bi disoluzioak batu eta sonikazio bidez emulSIONATU dira. Ondoren, irabiaketa mekanikoarekin disolbatzaile organikoa lurruntzen utzi eta niosomen esekidura lortu da, 1 mg/mL-ko kontzentrazioan.

Karakterizazio fisikokimikorako *Z-sizer*-arekin partikulen tamaina eta karga (zeta potentziala) neurtu dira. Bestalde, besikulen morfologia ezagutzeko, transmisiozko mikroskopia elektronikoa (TEM) erabili da. GPxT-CQ formulazioaren niosoma/DNA *ratio* desberdinak frogatu ostean, 5/1 erlazioa duten nioplexoek (niosomak eta DNA elkartzean sortzen diren konplexuak) erakutsi dituzte ezaugarri fisikokimiko onenak.

Tamainari dagokionez, espero zen moduan, tarte nanometrikoan aurkitzen dira. Niosomek biluzik 110 nm dituzte eta 162 nm-ra arte handitzen da DNA gehitzean. Niosomaren karga $+33,4 \pm 5,7$ mV-ekoa da. Karga hori $+25$ mV baino handiagoa denez, DNA arazorik gabe lotu dakioke (Hosseinkhani eta Tabata, 2006). Behin DNA gehituta, nioplexoaren zeta potentziala $+21,2 \pm 2,4$ mV-ekoa da. Mikroskopiotik behatzerakoan, besikulak forma esferikoa dute eta ez dute agregaturik erakusten. Gainera, baieztatzen da esperotako tamaina dutela (100 nm inguru).

5. Irudia. Bektore ez-biralen karakterizazio fisikokimikoa. Ezkerrean tamaina (zutabe zuria) eta zeta potentziala (lauki beltza) (n=3). Eskuinean TEM irudia (eskala barra 100 nm eta handipena 80.000X).



3.4 Transfekzio, zelulan barneratze eta banaketa *in vitro* entseguak

3.4.1 Transfekzio entseguak

Proteina berde fluoreszentea (GFP) duen plasmidoa erabili da *gene reporter* bezala. Esperimentu honetan, lipido kationiko/DNA erlazio desberdinak frogatu dira eta fluxuzitometria bidez transfekzioaren efizientzia eta zelulen bideragarritasuna neurtu dira. Transfekzioaren kontrol positibo gisa lipofektamina komertziala erabili da. Kontrol positiboarekin alderatuz, 5/1 erlazioan prestatutako GPxT-CQ nioplexoek (GPxT-CQ/DNA 5/1) izan dute emaitzarik onena: $6,81 \pm 0,8$ -ko transfekzio efizientzia eta $77,5 \pm 4,7$ -ko zelula-bideragarritasuna. Ez da oso transfekzio tasa altua, baina bibliografian deskribatu denez, zelula kultibo primarioak transfektatzea zaila da (de Carvalho et al., 2018).

3.4.2 Zelulan barneratze eta banaketa entseguak

Transfekzio maila baxua ikusita, barneratze entsegu burutu da niosomak zelula barrura sartzen direla ziurtatzeko. Horretarako, kasu honetan plasmidoa FITC fluoroforoa du atxikita, nioplexoaren jarraipena egin ahal izateko. Kasu honetan ere kontrol positibo gisa lipofektaminarekin osatutako lipoplexoa erabili da. GPxT-CQ/DNA 5/1 nioplexoaren barneratzea zelulara $15,16 \pm 1,07$ -koa izan da eta zelulen bideragarritasuna $64,2 \pm 1,05$ -koa. Beraz, esan daiteke prestatutako formulazioa zelulara sartzen dela eta gainera, lipofektaminak baino toxikotasun txikiagoa erakusten du.

Behin baieztatuta nioplexoak zelulan barneratzen direla, zelulan ze bidetik sartzen diren eta behin barruan nola banatzen diren ikertu da. Kasu honetan, zelulara sartzeko dauden bide desberdinak (kabeolak, klatrinak, makropinozitosia) eta lisosomak fluoreszentiarekin gorritz markatu dira. Ondoren, niosomaren fluoreszentzia berdea ze biderekin kolokalizatzen den begiratu da mikroskopio konfokalean. Mikroskopioan kolokalizazioa ikusteaz gain, kuantifikatu ere egin da CCF funtzioa (*cross-correlation function*) erabilita. Guzti hau eginda, ondorioztatu daiteke GPxT-CQ/DNA nioplexoa batez ere kabeolen bidetik sartzen dela zelulara. Alabaina, ez dago kolokalizaziorik lisosomekin. Honek esan nahi du nioplexoak ez direla elkartzen lisosomekin eta beraz, ez direla degradatuko zelulara sartu bezain pronto.

4. Ondorioak

Batetik, ikerketa honek hUSCak pazientetik modu ez-inbaditzaile, erraz, single eta seguruan isolatzeko lehen protokoloa deskribatzen du. Bestetik, ikerketa honetan garatutako nioplexoek hUSCetan trasfekzio-efizientzia txikia erakutsi duten arren, lortutako emaitzekin transfekzio prozesu konplexuaren ezagutza handitu da aurrera begira hobekuntza ekarriko duten estrategiak diseinatu ahal izateko. Azkenik, agerian gelditzen da hUSCak iturri oso interesgarria direla biralak ez diren bektoreekin burututako terapia genikorako edota aurrerantzen aztertu beharreko beste aplikazio kliniko batzuetarako.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Oraindik fase oso goiztiarrean dauden eta optimizazioa behar duten entseguak dira lan honetan aurkeztutakoak. Hala ere, zelula hauek pazientearengandik erraz lortzen direnez, medikuntza pertsonalizaturako gaixotasun eredu zehatzak garatzeko oso interesgarriak dira. Horrez gain, zelula hauek potentzial handia izan dezakete klinikaren beste alor batzuetan, terapia zelularrean esaterako.

6. Erreferentziak

- Chen, L. et al. (2018), Human Urine-Derived Stem Cells: Potential for Cell-Based Therapy of Cartilage Defects, *Stem Cells International*, 4686259.
- de Carvalho, T.-G. et al. (2018), A simple protocol for transfecting human mesenchymal stem cells, *Biotechnology Letters*, 40, 617-622.
- Grijalvo, S. et al. (2019), Cationic Niosomes as Non-Viral Vehicles for Nucleic Acids: Challenges and Opportunities in Gene Delivery, *Pharmaceutics*, 11(2), 50-73.
- Guan, J.-J. et al. (2014), Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology, *Tissue Engineering Part A*, 20, 1794-1806.
- Horwitz, E. M. et al. (2005), Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 7, 393-395.
- Hosseinkhani, H. eta Tabata, Y. (2006), Self Assembly of DNA Nanoparticles with Polycations for the Delivery of Genetic Materials into Cells, *Journal for Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2320-2328.
- Ma, B. (2007), Lipoplex morphologies and their influences on transfection efficiency in gene delivery, *Journal of Controlled Release*, 123, 184-194.
- Marianecci, C. et al. (2014), Niosomes from 80s to present: the state of the art, *Advances in Colloid and Interface Science*, 205, 187-206.
- Mintzer, M.-A. eta Simanek, E.-E. (2009), Nonviral vectors for gene delivery, *Chemical Reviews*, 109, 259-302.
- Moghassemi, S. eta Hadjizadeh, A. (2015), Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review, *Journal of Controlled Release*, 185, 22-36.
- Mohammadian, M. et al (2016), Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44(5), 1206-1211.
- Pavathuparambil, A.-M. et al. (2018), Urine-derived cells for human cell therapy, *Stem Cell Research & Therapy*, 9, 180-191.

- Pezzoli, D. (2012), We still have a long way to go to effectively deliver genes!, *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 10, 82-91.
- , (2013), Lipid-Based Nanoparticles as Nonviral Gene Delivery Vectors, *Methods in Molecular Biology*, 1025, 269-279.
- Reiser, J. et al. (2005), Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5, 1571-1584.
- Turan, S. eta Bastepe, M. (2013), The GNAS complex locus and human diseases associated with loss-of-function mutations or epimutations within this imprinted gene, *Hormone Research in Paediatrics*, 80, 229-2411.
- Zhang, Y. et al. (2008), Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction, *Journal of Urology*, 180, 2226-2233.

7. Eskerrak eta oharrak

- Lan hau hainbat dirulaguntzari esker burutu ahal izan da: EITB Maratoia (BIO16/ER/005), Euskal Herriko Unibertsitatea (PIF17/29) eta Eusko Jaurlaritza (PRE_2017-1-0365). Asistentzia tekniko eta intelektuala eskertuko nahiko genioke “NANBIOSIS” plataformari, zehazki, Bioingeniaritza, Biomaterial eta Nanomedikuntza CIBER (CIBER-BBN) medikamendu formulazio unitateari (U10), Euskal Herriko Unibertsitatean. Ikerketa aurrera eramateko, idatzi honen autoreaz gain beste pertsona batzuek hartu dute parte: Myriam Sainz-Ramos eta Gustavo Puras doktorea (NanoBioCel Ikerketa Taldea), Arrate Pereda doktorea (Gaixotasun Arraroen Ikerketa Taldea), Shifa Jebari-Benslaiman eta Cesar Martin doktorea (Biofisika institutua) eta Melania Rosique eta Marian Martinez de Pancorbo doktorea (BIOMICS Ikerketa Taldea).
- Lan hau Yeraí Vadoren tesirako ikerketaren atal bati dagokio. Gainera, aldizkari zientifiko batean argitaratzeko bidean dago.

**PUBLICACIONES DERIVADAS A
PARTIR DEL DESARROLLO
TECNOLÓGICO DE LA TESIS**

CASE REPORT

Open Access



Cri-du-chat syndrome mimics Silver-Russell syndrome depending on the size of the deletion: a case report

Yerai Vado^{1,2}, Javier Errea-Dorronsoro¹, Isabel Llano-Rivas³, Nerea Gorria⁴, Arrate Pereda¹, Blanca Gener³, Laura Garcia-Naveda³ and Guiomar Perez de Nanclares^{1*} 

Abstract

Background: Silver-Russell Syndrome (SRS) is a rare growth-related genetic disorder mainly characterized by prenatal and postnatal growth failure. Although molecular causes are not clear in all cases, the most common mechanisms involved in SRS are loss of methylation on chromosome 11p15 ($\approx 50\%$) and maternal uniparental disomy for chromosome 7 (upd(7)mat) ($\approx 10\%$).

Case presentation: We present a girl with clinical suspicion of SRS (intrauterine and postnatal growth retardation, prominent forehead, triangular face, mild psychomotor delay, transient neonatal hypoglycemia, mild hypotonia and single umbilical artery). Methylation and copy number variations at chromosomes 11 and 7 were studied by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification and as no alterations were found, molecular karyotyping was performed. A deletion at 5p15.33p15.2 was identified (arr[GRCh37] 5p15.33p15.2(25942–11644643)× 1), similar to those found in patients with Cri-du-chat Syndrome (CdCS). CdCS is a genetic disease resulting from a deletion of variable size occurring on the short arm of chromosome 5 (5p-), whose main feature is a high-pitched mewing cry in infancy, accompanied by multiple congenital anomalies, intellectual disability, microcephaly and facial dysmorphism.

Conclusions: The absence of some CdCS features in the current patient could be due to the fact that in her case the critical regions responsible do not lie within the identified deletion. In fact, a literature review revealed a high degree of concordance between the clinical manifestations of the two syndromes.

Keywords: Silver-Russell syndrome, Cri-du-chat syndrome, aCGH, Deletion

Background

Silver-Russell Syndrome (SRS, OMIM#180860) is a rare genetic imprinting disorder, initially described as an heterogeneous phenotype including intrauterine (IUGR) and postnatal growth retardation (PNGR) without catch-up growth, relative macrocephaly at birth, triangular face, body asymmetry, facial dysmorphic features and severe feeding difficulties [1, 2]. More recent case reports have led to the inclusion of low body mass index, hypoglycemia, motor and speech delay and psychosocial challenges as additional features (for a review, [3]). The incidence of the disease is not clear, reported estimates

varying from 1/100,000 to 30/100,000 [3, 4]. Most cases of SRS are sporadic, with a low rate of familial cases that have been suggested to follow an autosomal dominant transmission pattern [5].

The wide variability of the clinical manifestations of SRS has led to the international recommendation to use the Netchine-Harbison SRS clinical scoring system (NH-CSS) [6], both for determining when SRS genetic testing should be run and when a clinical diagnosis of SRS should be given [3]. Although studies have failed to determine the underlying molecular mechanism in some cases, approximately 50% of the clinically-diagnosed SRS patients present alterations at 11p15.5, mainly hypomethylation at *H19/IGF2:IG-DMR*, while 10% of them show maternal uniparental disomy of chromosome 7 (upd(7)mat) [3]. In addition, there have been reports of a

* Correspondence: gnanclares@osakidetza.eus

¹Rare Diseases Research Group, Molecular (Epi)Genetics Laboratory, BioAraba Health Research Institute, OSI Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain
Full list of author information is available at the end of the article



single maternally-transmitted *CDKN1C* activating mutation in five members of a four-generation family [7] and paternal *IGF2* inactivating mutations in another family and four unrelated patients [8–10]. Further, sequence variants of two non-imprinted genes (*HMGA2* and *PLAG1*) are also associated with SRS. Specifically, *HMGA2* variants have been described in one family and two sporadic cases [11, 12] and *PLAG1* mutations in a family and in one sporadic case [11]. For the remaining 40% of SRS patients who are negative for these alterations, molecular karyotyping is advised [3, 13, 14]. Two recent reviews have compiled all the reported chromosomal regions involved in SRS-like cases and suggested that the most frequently affected is 12q14, followed by 1q21, 4p16.3, 15q26, 17p13.3 and 22q11 [9, 15].

Case presentation

The CARE guidelines were followed in reporting this case.

Case report

We present the case of a girl who is the third child of healthy non-consanguineous parents. A prenatal ultrasound test revealed a single umbilical artery with no other malformations. She was born at term, by vaginal delivery after induction due to fetal hypomobility, with a birth weight of 2450 g ($p < 1$), birth length of 47 cm (p3), and cranial perimeter of 33 cm (p10). No perinatal diseases were detected, except for one episode of transient neonatal hypoglycemia. In the neonatal period, no abnormal cry was noticed. She was monitored closely because of postnatal growth retardation in the absence of familial short stature (father's height 180 cm, mother's height 158 cm). At 22 months of age, she was referred for brain magnetic resonance imaging because of neurodevelopmental delay, and Arnold Chiari malformation type I and corpus callosum hypoplasia with mild ventriculomegaly were identified. A peculiar face with triangular shape was observed and height (78.5 cm, p3) and

weight (9.7 kg, p7) were still delayed. Generalized hypotonia was still present. Surgery for Arnold Chiari I was performed, and subsequently, her motor development slightly improved. At the age of 4^{9/12}, she was referred for clinical genetic assessment and SRS was suspected with a score of 4/6 on the NH-CSS: including IUGR, PNGR, prominent forehead and triangular face (Fig. 1a). At this age, she had a weight of 14.4 kg (p7), a height of 99.5 cm (p2) and a cranial perimeter of 49 cm (p15). Phenotypically, she also presented craniofacial disproportion, wide normal set rotated ears, a triangular face, large eyes and narrow nasal bridge (Fig. 1a), as well as small feet and hands with quadrangular fingertips (Fig. 1b). The 5th finger on each hand was shortened without clinodactyly (Fig. 1b); the great toe of each foot was wide and she had bilateral diastasis between the first and second toes. She also had a very smooth non-nasal voice.

Molecular genetic studies

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using a commercial kit, following the manufacturer's instructions (QiaAmp Blood Mini, Qiagen, Düren, Germany). Dosage and methylation analyses for chromosomes 11 and 7 were carried out by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification using the ME030-C3 and ME032-A1 kits, respectively (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) following the manufacturer's recommendations. No alterations in methylation or copy number variations (CNV) were detected in either of these regions.

Subsequently, molecular karyotyping was performed using a 400 K microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) kit (G4448A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Slides were scanned on an Agilent SureScan C Microarray scanner and analyzed with Agilent CytoGenomics software, revealing a deletion on the short arm of chromosome 5, specifically at 5p15.33p15.2 (arr[GRCh37] 5p15.33p15.2(25942–11644643)× 1) (Fig. 2),

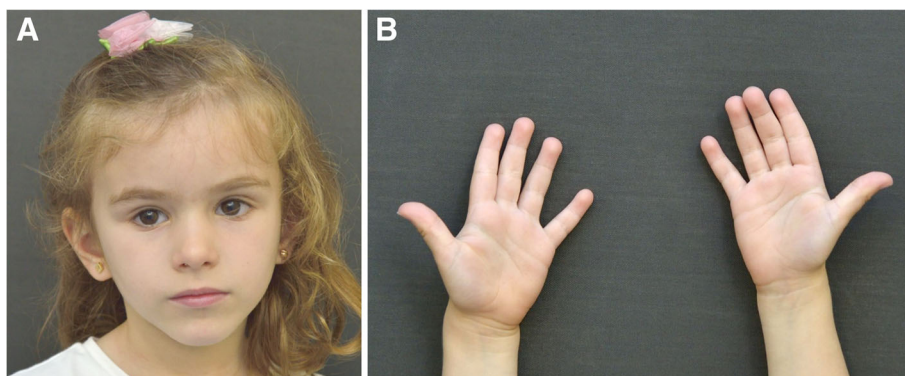
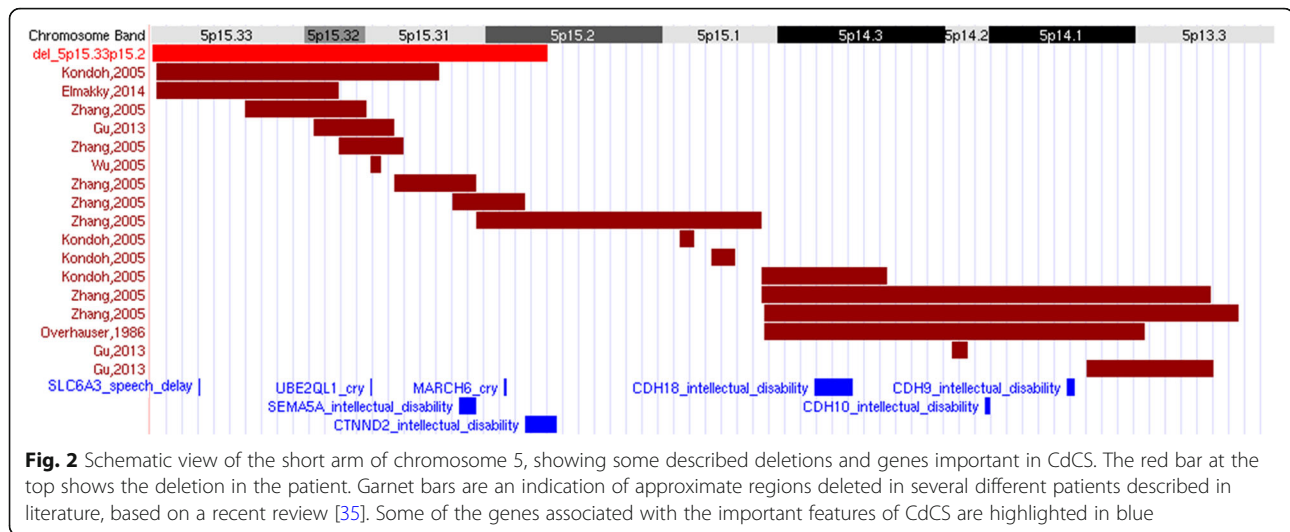


Fig. 1 Clinical photograph of the patient. **a:** Front view of the face. Note the prominent forehead, triangular face, large eyes and narrow nasal bridge. **b:** Palmar view of the hand showing the small size and quadrangular fingertips



within the region usually associated with Cri-du-chat syndrome (CdCS).

Fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses were performed on metaphase cells and interphase nuclei using a Vysis CSF1R/D5S23, D5S721 FISH Probe Kit to confirm the presence of the deletion and its origin. The results showed one green signal (5p15) and two red signals (CSF1R probe) in the metaphases and nuclei of the index corresponding to a deletion of the 5p15 region (Additional file 1 Figure S1A, B), confirming the aCGH results. In accordance with the 2016 edition of the International System for Human Cytogenomic Nomenclature, the patient's karyotype can be described as 46,XX,del(5)(p15.2).ish del(5)(p15.2)(D5S23-, D5S721-). The FISH pattern on chromosome 5 was normal in both parents (2G2R), confirming the de novo nature of the deletion (Additional file 1 Figure S1C-F).

Clinical re-evaluation

A literature review showed us that there are some clinical features which are common to CdCS and SRS (Table 1). Keeping the results of this review and the genetic analysis in mind, clinical re-evaluation at 5 years 6 months of age confirmed some features suggestive of SRS (failure to thrive, retarded postnatal growth [height 104.5 cm (p4), weight 15.2 kg (p9), cranial perimeter 49.2 cm (p12)], prominent forehead) and some others of CdCS (slightly prominent chin with micrognathia); however, she did not have lip, palatal or mouth alterations; small hands with thin and long fingers; sandal gap deformity; or clinodactyly. The neurodevelopmental study revealed that she has not achieved the milestones for her chronological age (sitting without support and crawling at 12 months; walking independently at 25 months; very poor speech and verbal development with just 5–10 words at 2 years; and at the time of writing she still has

neither bowel nor bladder control, is not able to read or write, and lacks fine motor skills). She is receiving psychological and learning support at school. She also has a high-pitched voice and dysphonia (possibly due to a defect in the larynx with vocal fold atrophy).

Discussion and conclusions

Sometimes, clinical diagnosis of patients with syndromic manifestations is challenging due to either an absence of cardinal features or an overlap of characteristics between different disorders or a combination of both.

It is known that CdCS (OMIM#123450) is caused by deletions of heterogeneous size in the short arm of chromosome 5 [16]. Even though it is considered a rare disease, CdCS is one of the most common chromosomal deletion syndromes with an incidence ranging from 1:15,000 [17] to 1:50,000 live births [18]. In more than 80% of cases, the deletion is found to be de novo [19] and its extension seems to be closely related to the presence of certain phenotypic features [20].

The main clinical features at birth are: plaintive high-pitched monochromatic cry similar to the mewing of a cat (95.9%), which disappears after the neonatal period; microcephaly (mean head circumference, 31.8 cm) and low weight (mean weight, 2614 g). Other notable characteristics are: rounded face (83.5%), broad nasal bridge (87.2%), hypertelorism (81.4%), epicanthal folds (90.2%), downslanting palpebral fissures (56.9%), low-set ears (69.8%), micrognathia (96.7%), abnormal dermatoglyphics (92%), hypotonia and down-turned corners of the mouth (81.0%) [21]. CdCS patients also show severe psychomotor and intellectual disability, high palatal arch [20], speech delay, prenatal and postnatal growth delay, and low-set and/or poorly formed pinnae [22].

Table 1 Clinical characteristics of Silver-Russell Syndrome (SRS) (Wakeling et al., 2017 [3]) and Cri-du-Chat Syndrome (CdCS) (Cerruti Mainardi, 2006 [21]; D M Church et al., 1995 [20]; D M Church et al., 1997 [22]) together with features observed in our patient

SRS	CdCS	Patient
<u>IUGR</u>	<u>IUGR</u>	IUGR
<u>PNGR</u>	<u>PNGR</u>	PNGR
Speech delay	Speech delay	Speech delay
Motor delay	<u>Motor delay</u>	Motor delay
Hypotonia	Hypotonia	Hypotonia
Mild intellectual delay	<u>Intellectual disability</u>	Intellectual disability
High pitched/squeaky voice	<u>High pitched cry</u>	High pitched voice
Micrognathia	<u>Micrognathia</u>	Micrognathia
Low set and/or posteriorly rotated ears	Low set ears	Normal set rotated ears
Down-turned corners of the mouth	Down-turned corners of the mouth	Normal mouth
Clinodactyly	Clinodactyly (rare cases)	No clinodactyly
Hypoglycaemia	No data	Hypoglycaemia
<u>Prominent forehead</u>	Normal forehead	Prominent forehead
Triangular face	<u>Round face</u>	Triangular face
<u>Feeding difficulties and/or low body mass index</u>	Normal feeding	Failure to thrive
<u>Relative macrocephaly</u>	<u>Microcephaly</u>	Microcephaly
<u>Body asymmetry</u>	No asymmetry	No asymmetry
Normal nose	<u>Broad nasal bridge with prominent nasal root</u>	Normal nose
No data	Abnormal dermatoglyphics	No data
No palatal alteration	High palatal arch	No palatal alteration
No hypertelorism	Hypertelorism	No hypertelorism
Normal eyelids	Epicanthal folds	Normal eyelids
Normal eyes	Downslanting palpebral fissures	Normal eyes
No data	Small hands with thin and long fingers	Short fingers
No sandal gap	Sandal gap in both feet	Normal feet

From darkest to lightest grey, the features are highlighted as follows: common features between (1) SRS, CdCS and the patient, (2) SRS and CdCS, (3) SRS and the patient and (4) CdCS and the patient. *IUGR* intrauterine growth retardation, *PNGR* post-natal growth retardation. Underlined features are those most specific to each syndrome

The majority of chromosome 5p deletions are associated with CdCS, but a del(5p) karyotype does not necessarily indicate CdCS [20, 23]. According to various different mapping studies using a strategy of “phenotype dissection”, some regions of the short arm of chromosome 5 have been associated with specific features which define certain aspects of the CdCS phenotype. Based on

those studies, the critical factor responsible for the CdCS phenotype is considered to be the deletion located at 5p15.2, as haploinsufficiency of genes in this region is assumed to be associated with changes in facial features and severe mental retardation, as well as general CdCS features [19, 20, 22, 24]. Patients presenting the characteristic cat-like cry, the origin of the name of the

syndrome, carry a deletion that includes a region proximal to 5p15.3 and distal to 5p15.2 [24, 25]. Different genes located within this region have been proposed to be responsible for the feature, namely, *UBE2QL1/FLJ28076* (5p15.31) and *MARCH6/TEB4* (5p15.2) [26]. Surprisingly, the deletion of the patient we report encompasses both candidate genes, but she did not have the classical cry, just a high-pitched voice. Coincidentally, there is another CdCS case described in the literature in which the patient did not have high pitched cry but did have a high-pitched voice. He had a 5p15.2 deletion, similar to our patient, and they share other clinical characteristics such as growth delay, slightly small chin, hypotonia and speech delay [22].

The most distal part of 5p, the 5p15.3 band, has been reported to be related to speech delay [27]. In that region, more precisely at 5p15.33, studies have located the *SLC6A3* gene, which encodes an amine transporter responsible for dopamine reuptake. Curiously, an excess of dopamine has been associated with problems in speech due to its major role in fine motor movements and the fact that speech requires very accurate coordination of very diverse small muscles [28]. The patient we describe has speech problems, probably because of a defect in the in the larynx with vocal fold atrophy. Notably, the *SLC6A3* gene lies within the patient's deletion, and that may explain the speech problems.

In addition, intellectual disability has been associated with a region at 5p15.2 [24], where the *CTNND2* gene is located [29]. This gene encodes a protein which plays a critical role in neural development, particularly in the formation and/or maintenance of dendritic spines and synapses [30]. In the same cytogenetic band, there is another region which seems to be responsible for the facial dysmorphism [19, 22, 31]. Further, alterations in *SEMA5A* (5p15.31) [32] and *CDH18* (5p14.3), *CDH10* (5p14.2) and *CDH9* (5p14.1) [33] also disrupt normal brain development; whereas autism spectrum and social communication disorders have been associated with the 5p14.1 cytogenetic band [34]. Like many other cases and as described above, our patient has intellectual disability, not having achieved the milestones for her age. Even though *CDH9*, *CDH10* and *CDH18* genes are supposed to be involved in intellectual disability, they may be not so critical because they do not lie within the region of the patient's deletion. On the contrary, *CTNND2* and *SEMA5A* are in the deleted region and in consequence they may be responsible for this feature. On the other hand, autism is not one of the girl's characteristics, perhaps due to the fact that the aforementioned region does not lie within the deletion. The *CDH9* gene is located in the band related to autism, and hence, it could be responsible for this feature apart from intellectual disability.

Some of these phenotypic features are in common with those of SRS (Table 1). In fact, the patient we describe has four out of the six cardinal characteristics [6] of SRS and lacks other important features of CdCS (high pitched cry, rounded face). What is more, the syndromes share some cardinal features, making it difficult to reach an accurate clinical diagnosis when they are present in a patient. On the other hand, according to the recent reviews [9, 15], ours is the first report of a patient with SRS carrying a deletion at 5q. As suggested above, the reason for the absence of these cardinal CdCS features could be that the chromosomal regions involved in these signs are not deleted in our patient. Nevertheless, as previously suggested by other authors [26], it is important to underline the great variability in each feature as each individual trait is not caused by alterations in a single gene. Detailed molecular analysis of more patients with well-established clinical features is necessary to identify the role of the genes responsible for the CdCS.

In brief, overlapping clinical manifestations of different disorders can lead to a misdiagnosis that could be avoided with more detailed molecular testing. Specifically, deletions at 5p should be considered in clinical SRS patients with negative results for chromosome 11 and 7 alterations.

On the other hand, given the importance of correlating the deleted regions at 5p and the clinical features associated with CdCS, some chromosomal maps have been developed. Nevertheless, more molecular karyotyping studies would help identify precise genomic coordinates responsible for each feature of the syndrome.

Additional file

Additional file 1: Figure S1. FISH images of the index, her father and her mother. DX0164-I code is for the patient, DX0164-P for the father and DX0164-M for the mother. A, C, E pictures are from interphase nuclei and B, D, F from chromosomes in metaphase. One green signal (5p15) and two red signals (CSF1R probe) are visible in the index, suggesting a deletion of the 5p15 region. Both parents presented a normal result (2G2R) for FISH on chromosome 5. (TIF 235 kb)

Abbreviations

5p-: Deletion on the short arm of chromosome 5; aCGH: Microarray-based Comparative Genomic Hybridization; CdCS: Cri-du-Chat Syndrome; CNV: Copy Number Variation; DMR: Differentially Methylated Region; FISH: Fluorescence In Situ Hybridization; IUGR: IntraUterine Growth Retardation; NH-CSS: Netchine-Harbitson SRS Clinical Scoring System; PNGR: PostNatal Growth Retardation; SD: Standard Deviation; SRS: Silver-Russell Syndrome; upd(7)mat: Maternal uniparental disomy for chromosome 7

Acknowledgements

We thank the patient and her parents for their participation in the study.

Funding

The costs of the publication and molecular analyses of this research were funded by grants from Instituto de Salud Carlos III (Institute of Health Carlos III) of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, co-financed by the European Regional Development Fund (PI16/00073), the Department of

Health of the Basque Government (GV2016111105; GV2017111040), and the University of the Basque Country UPV/EHU (PIF17/29).

Availability of data and materials

All data are available for the scientific community, including raw genetic data: requests should be sent directly to the corresponding author.

Authors' contributions

GPN conceived the project. AP designed the molecular approach. YV and JE-D performed the molecular studies of the syndromes. LG-N designed and carried out FISH analysis. GPN, AP, YV, JE-D and LG-N collaborated in the molecular analyses. IL, NG and BG participated in the recruitment, clinical information acquisition of the patient and parents and wrote the clinical description and discussion. YV and JE-D designed and wrote the first draft with molecular aspects in collaboration with LG-N. AP and GPN combined both clinical and molecular sections and prepared the first complete draft. All authors included modifications and suggestions to the initial version which were compiled by YV and GPN. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

All procedures followed met the ethical standards of the responsible committee. The present study was approved by the Basque ethics committee (PI2017018). Genetic analysis was performed after written informed consent from both parents.

Consent for publication

Consent to publish clinical data and photos of the patient was obtained from both parents of the minor.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Rare Diseases Research Group. Molecular (Epi)Genetics Laboratory, BioAraba Health Research Institute, OSI Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain.

²Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain. ³Service of Genetics, BioCruces Bizkaia Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain. ⁴Service of Pediatric Neurology, BioAraba Health Research Institute, Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Araba, Spain.

Received: 27 June 2018 Accepted: 3 December 2018

Published online: 27 December 2018

References

- Silver HK, Kiyasu W, George J, Deamer WC. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics*. 1953;12:368–76.
- Russell A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc R Soc Med*. 1954;47:1040–4.
- Wakeling EL, Brioude F, Lokulo-Sodiye O, O'Connell SM, Salem J, Bliet J, et al. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol Nature Publishing Group*. 2017;13:105–24.
- Toutain A. Silver-Russell syndrome [Internet]. 2007. Available from: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=EN&Expert=813
- Duncan PA, Hall JG, Shapiro LR, Vibert BK. Three-generation dominant transmission of the Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet*. 1990;35:245–50.
- Azzi S, Salem J, Thibaud N, Chantot-Bastaraud S, Lieber E, Netchine I, et al. A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet*. 2015;52:446–53.
- Brioude F, Oliver-Petit I, Blaise A, Praz F, Rossignol S, Le Jule M, et al. CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J Med Genet*. 2013;50:823–30.
- Begemann M, Zirn B, Santen G, Wirthgen E, Soellner L, Büttel H-M, et al. Paternally inherited IGF2 mutation and growth restriction. *N Engl J Med*. 2015;373:349–56.
- Tümer Z, López-Hernández JA, Netchine I, Elbracht M, Grønsvov K, Gede LB, et al. Structural and sequence variants in patients with Silver-Russell syndrome or similar features-curation of a disease database. *Hum Mutat*. 2018;39:345–64.
- Liu D, Wang Y, Yang X-A, Liu D. De novo mutation of paternal IGF2 gene causing Silver-Russell syndrome in a sporadic patient. *Front Genet*. 2017;8:105.
- Abi Habib W, Brioude F, Edouard T, Bennett JT, Lienhardt-Roussie A, Tixier F, et al. Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet Med*. 2017;20:250–8.
- De Crescenzo A, Citro V, Freschi A, Sparago A, Palumbo O, Cubellis MV, et al. A splicing mutation of the HMGA2 gene is associated with Silver-Russell syndrome phenotype. *J Hum Genet*. 2015;60:287–93.
- Eggermann T, Begemann M, Binder G, Spengler S. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:19.
- Giabicani E, Netchine I, Brioude F. New clinical and molecular insights into Silver-Russell syndrome. *Curr Opin Pediatr*. 2016;28:529–35.
- Fokstuen S, Kotzot D. Chromosomal rearrangements in patients with clinical features of Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2014;164:1595–605.
- Lejeune J, Gautier M, Lafourcade R, Berger R, Turpin R. Trois cas de délétion partielle du bras court d'un chromosome 5. *Ann Génétique*. 1963;7:7–12.
- Higurashi M, Oda M, Iijima K, Iijima S, Takeshita T, Watanabe N, et al. Livebirth prevalence and follow-up of malformation syndromes in 27,472 newborns. *Brain and Development*. 1990;12:770–3.
- Niebuhr E. The cri du chat syndrome: epidemiology, cytogenetics, and clinical features. *Hum Genet*. 1978;44:227–75.
- Mainardi PC, Perfumo C, Cali A, Coucourde G, Pastore G, Cavani S, et al. Clinical and molecular characterisation of 80 patients with 5p deletion: genotype-phenotype correlation. *J Med Genet*. 2001;38:151–8.
- Church DM, Bengtsson U, Nielsen KV, Wasmuth JJ, Niebuhr E. Molecular definition of deletions of different segments of distal 5p that result in distinct phenotypic features. *Am J Hum Genet*. 1995;56:1162–72.
- Cerruti MP. Cri du Chat syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:33.
- Church DM, Yang J, Bocian M, Shiang R, Wasmuth JJ. A high-resolution physical and transcript map of the cri du chat region of human chromosome 5p. *Genome Res*. 1997;7:787–801.
- Gu H, Jiang J, Li J, Zhang Y, Dong X, Huang Y, et al. A familial Cri-du-chat/5p deletion syndrome resulted from rare maternal complex chromosomal rearrangements (CCRs) and/or possible chromosome 5p chromothripsis. *PLoS One*. 2013;8:e76985.
- Overhauser J, Huang X, Gersh M, Wilson W, McMahon J, Bengtsson U, et al. Molecular and phenotypic mapping of the short arm of chromosome 5: Sublocalization of the critical region for the cri-du-chat syndrome. *Hum Mol Genet*. 1994;3:247–52.
- Gersh M, Goodart SA, Pasztor LM, Harris DJ, Weiss L, Overhauser J. Evidence for a distinct region causing a cat-like cry in patients with 5p deletions. *Am J Hum Genet*. 1995;56:1404–10.
- Wu Q, Niebuhr E, Yang H, Hansen L. Determination of the "critical region" for cat-like cry of Cri-du-chat syndrome and analysis of candidate genes by quantitative PCR. *Eur J Hum Genet*. 2005;13:475–85.
- Baccichetti C, Lenzini E, Artifoni L, Caufin D, Marangoni P. Terminal deletion of the short arm of chromosome 5. *Clin Genet*. 1988;34:219–23.
- Lan J, Song M, Pan C, Zhuang G, Wang Y, Ma W, et al. Association between dopaminergic genes (SLC6A3 and DRD2) and stuttering among Han Chinese. *J Hum Genet*. 2009;54:457–60.
- Medina M, Marinescu RC, Overhauser J, Kosik KS. Hemizyosity of delta-catenin (CTNND2) is associated with severe mental retardation in cri-du-chat syndrome. *Genomics*. 2000;63:157–64.
- Turner TN, Sharma K, Oh EC, Liu YP, Collins RL, Sosa MX, et al. Loss of δ -catenin function in severe autism. *Nature*. 2015;520:51–6.
- Rodríguez-Caballero A, Torres-Lagares D, Rodríguez-Pérez A, Serrera-Figallo M-A, Hernández-Guisado J-M, Machuca-Portillo G. Cri du chat syndrome: a critical review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15:473–8.

32. Simmons AD, Püschel AW, McPherson JD, Overhauser J, Lovett M. Molecular cloning and mapping of human semaphorin F from the Cri-du-chat candidate interval. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;242:685–91.
33. Barber JCK, Huang S, Bateman MS, Collins AL. Transmitted deletions of medial 5p and learning difficulties; does the cadherin cluster only become penetrant when flanking genes are deleted? *Am J Med Genet A.* 2011;155A:2807–15.
34. Espirito Santo LD, Moreira LMA, Riegel M. Cri-Du-chat syndrome: clinical profile and chromosomal microarray analysis in six patients. *Biomed Res Int.* 2016;2016:5467083.
35. Nguyen JM, Qualmann KJ, Okashah R, Reilly A, Alexeyev MF, Campbell DJ. 5p deletions: current knowledge and future directions. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2015;169:224–38.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Case Report

Novel Variant in *PLAG1* in a Familial Case with Silver–Russell Syndrome Suspicion

Yerai Vado ^{1,2} , Arrate Pereda ¹ , Isabel Llano-Rivas ³, Nerea Gorria-Redondo ⁴, Ignacio Díez ⁵  and Guimar Perez de Nanclares ^{1,*} 

- ¹ Rare Diseases Research Group, Molecular (Epi) Genetics Laboratory, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, 01009 Araba, Spain; yerai.vadoranedo@osakidetza.eus (Y.V.); arrate.peredaaguirre@osakidetza.eus (A.P.)
- ² NanoBioCel Research Group, Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, 01006 Araba, Spain
- ³ Service of Genetics, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, 48903 Bizkaia, Spain; isabel.llanorivas@osakidetza.eus
- ⁴ Service of Paediatric Neurology, Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, 01009 Araba, Spain; nerea.gorriaredondo@osakidetza.eus
- ⁵ Department of Pediatric Endocrinology, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, 01009 Vitoria-Gasteiz, Spain; IGNACIO.DIEZLOPEZ@osakidetza.eus
- * Correspondence: gnanclares@osakidetza.eus; Tel.: +34-945-007-097

Received: 2 November 2020; Accepted: 3 December 2020; Published: 5 December 2020



Abstract: Silver–Russell syndrome (SRS) is a rare growth-related genetic disorder that is mainly associated with prenatal and postnatal growth retardation. Molecular causes are not clear in all cases, the most common ones being loss of methylation on chromosome 11p15 ($\approx 50\%$) and maternal uniparental disomy for chromosome 7 (upd(7)mat) ($\approx 10\%$). However, pathogenic variants in genes such as *CDKN1C*, *HMGA2*, *IGF2*, or *PLAG1* have also been described. Previously, two families and one sporadic case have been reported with *PLAG1* alterations. Here, we present a case of a female with clinical suspicion of SRS (i.e., intrauterine and postnatal growth retardation, triangular face, psychomotor delay, speech delay, feeding difficulties). No alterations in methylation or copy number were detected at chromosomes 11p15 and 7 using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA). The custom panel study by next-generation sequencing (NGS) revealed a frameshift variant in the *PLAG1* gene (NM_002655.3:c.551delA; p.(Lys184Serfs *45)). Familial studies confirmed that the variant was inherited from the mother and it was also present in other family members. New evidence of pathogenic alterations in the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway suggest the importance of studying and taking into account these genes as alternative molecular causes of Silver–Russell syndrome.

Keywords: Silver–Russell syndrome; *PLAG1*; *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway

1. Introduction

Silver–Russell syndrome (SRS, OMIM#180860) is a rare imprinting genetic disorder that is mainly associated with intrauterine (IUGR) and postnatal growth retardation (PNGR) without catch-up. Initially, it was also defined by other features such as relative macrocephaly at birth, triangular face, body asymmetry, facial dysmorphic features, and severe feeding difficulties [1,2]. Subsequently, new case reports led to the inclusion of other signs, such as a low body mass index (BMI) or speech delay (for review, see Reference [3]). The incidence of the disease varies from 1/30,000 to 1/100,000 [3]. Most of SRS cases are sporadic, with few familial cases that suggest following an autosomal dominant inheritance pattern [4].

The wide variability of the clinical manifestations of SRS has led to the international recommendation about the use of the Netchine–Harbison clinical scoring system (NH-CSS) [5], both for determining when SRS genetic testing should be run and when a clinical diagnosis of SRS should be given (≥ 4 NH-CSS criteria, including both prominent forehead and relative macrocephaly) [3]. Although the molecular etiology cannot be determined in all cases, approximately 50% of the clinically diagnosed SRS patients present hypomethylation (Loss of Methylation, LOM) at 11p15.5 (*H19/IGF2:IG-DMR*), whereas 10% of them show maternal uniparental disomy for chromosome 7 (upd(7)mat) [3]. For the remaining 40% of patients, methylation-specific testing for 14q32 alterations, molecular karyotyping, and analysis of different tissues is advised [3,6–8], leading to the identification of underlying genetic alterations. However, in some cases, the underlying molecular mechanism is still unknown.

In addition, maternally transmitted *CDKN1C* activating variants in some families [9–11] and paternal *IGF2* inactivating alterations in some other cases [8,12–18] have been described. Moreover, sequence variants of two non-imprinted genes (*HMGA2* and *PLAG1*) have been associated with SRS. *HMGA2* variants have been described in three families and three sporadic cases [12,19,20] and *PLAG1* alterations in two families and in a sporadic case [12,21] (Supplementary Table S1).

PLAG1 is a transcription factor that contains seven canonical C_2H_2 zinc finger domains for the DNA binding (expanding from residue 34 to 236) and a C-terminus with a serine-rich region that has transcriptional activation activity (residues 385–500). *PLAG1* binds the P3 promoter of *IGF2*, thereby increasing its expression. *IGF2* is known to be an essential growth factor for the normal embryonic growth and its gene is maternally imprinted [22]. Its overexpression can also lead to uncontrolled cell proliferation [23].

Here, we describe a novel variant in *PLAG1* in a family with short stature and phenotypic manifestations compatible with SRS.

2. Materials and Methods

Informed consent for genetic analysis was obtained from patients or parents. The study protocol was approved by the ethical committee of the Basque Country (Code: PI2017018).

2.1. Case Report

We present the case of a 9-year-old-girl who is the first of two children of consanguineous parents (index's grandmothers are first cousins) referred because of significant proportionate short stature (height 115 cm (below first percentile (p); -2.31 SDS), weight 18.4 kg (p_5 ; -1.61 SDS), and head circumference (HC) 46.8 cm ($p < 1$)).

After spontaneous conception, intrauterine growth restriction, gestational hypertension, gestational diabetes (controlled by diet), and a small placenta were detected during pregnancy, so delivery was induced at 38 gestational weeks and she was born small for her gestational age (SGA) (birth weight 1600 g ($p < 1$; -4.24 SDS), birth length 41 cm ($p < 3$; -4.03 SDS), and HC 27 cm ($p < 1$; -5.61 SDS)).

In the postnatal period, growth restriction (PNGR) was also detected with weight and length under p_3 during her evolution (Figure 1). She was reviewed for short stature for the first time aged 7 years by our Pediatric Endocrinology team (weight: 14.9 kg (p_3 – 10 ; -1.38 SDS), length 107.2 cm (p_2 ; -1.99 SDS)). Within the clinical history, retarded psychomotor development was suspected because she did not crawl and started to walk at 18 months. She spoke her first words near her second year of age, and at school she had problems with language development. An intelligence quotient test at 5.5 years revealed a total value of 61 with 58 ($p < 3$; < -2 SDS) for verbal abilities, as well as 72 (p_3) for manual skills. She had no sleeping or behavioral problems, but she showed feeding difficulties.

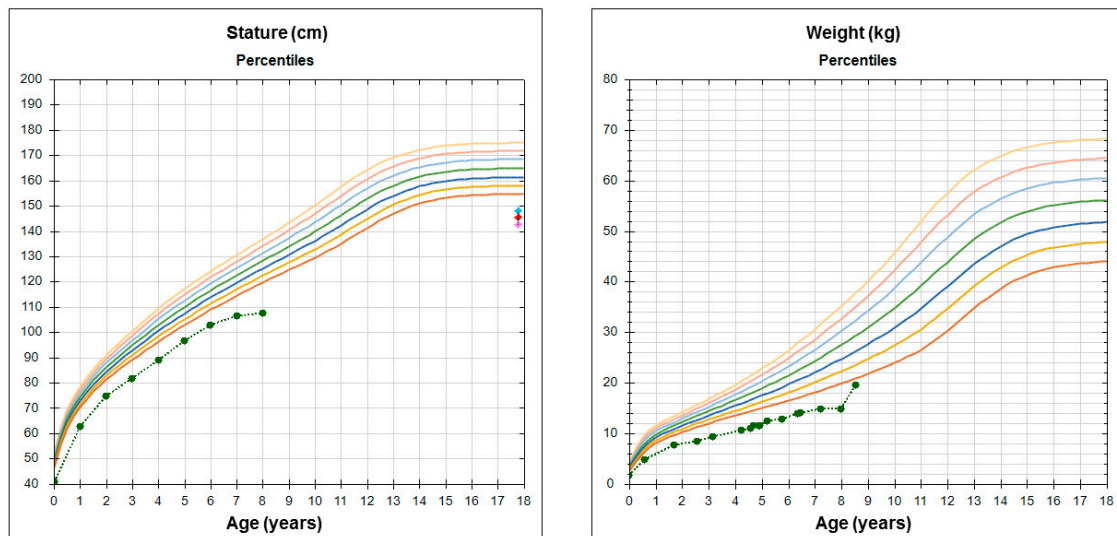


Figure 1. Height and weight charts. Green dots and dashed line represent the patient’s data.

She was referred to the clinical geneticist who observed the presence of a triangular face, subtle superficial hemangioma in the frontal midline, thin hair, long forehead, bulbous small nose, prominent chin, high arched palate with crowded teeth, and a fine voice. Neither asymmetry, organomegaly, hyperlaxity, nor other skin alterations were detected.

Her mother was 34 years old, with a height of 140 cm ($p < 3$; -2.64 SDS), and she mentioned having presented problems at school with learning difficulties. The mother has a narrow face, hypotelorism, thin hair, long forehead, crowded teeth, and clinodactyly of the fifth finger on both hands. When interviewed, she noted being short in stature all her life, yet she never associated with being low weight. Some of her siblings and her mother presented similar signs (Figure 2).

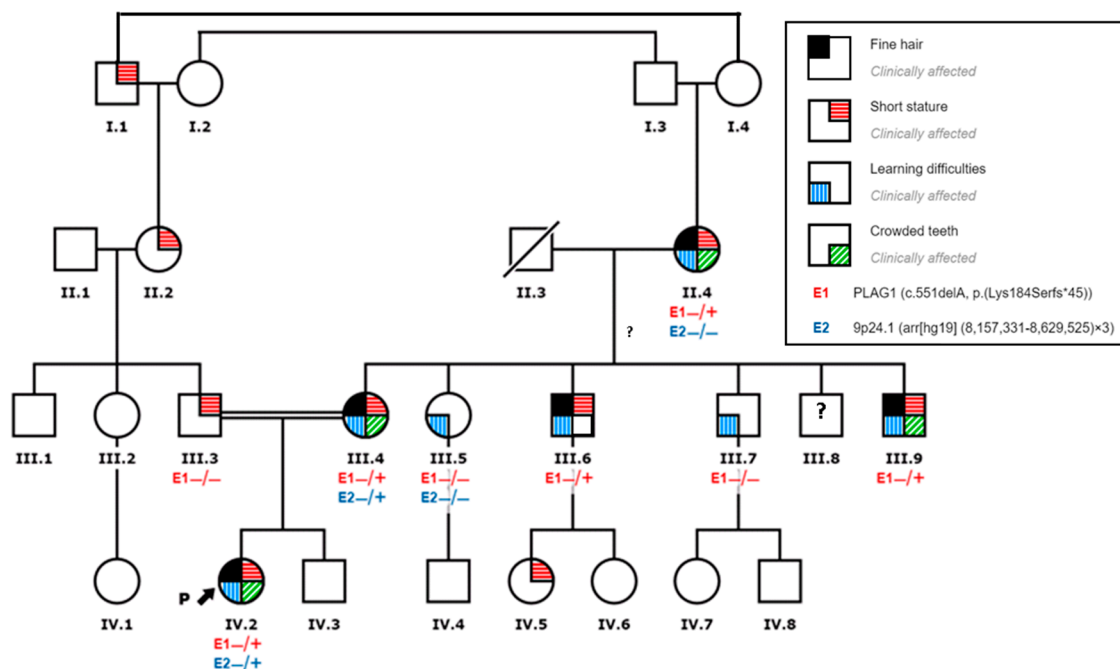


Figure 2. Family pedigree: the arrow points to the index case. The family members carrying the variant are represented as (+/-) versus non-carriers (-/-). The presence of each feature is represented by a colored square.

The father was also 34 years old and was 158 cm in height ($p < 3$; -2.15 SDS), with subtle rhizomelic shortening within the upper limbs and no dysmorphic features. No alterations were identified at the *SHOX* gene.

2.2. Molecular Genetic Studies

Genomic DNA of the patient and family members was extracted from peripheral blood or buccal swabs using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

Dosage and methylation analyses for chromosomes 11 (including *H19/IGF2:IG-DMR* and *KCNQ1OT1:TSS-DMR* loci), 6, 7, and 14 were carried out using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) with ME030-C3 and ME032-A1 kits (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) respectively, following the manufacturer's recommendations. Data was analyzed using Coffalyser.net version 9.4 software (MRC-Holland).

Subsequently, molecular karyotyping was performed using a 400 K microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH) kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Slides were scanned on an AgilentSureScan C Microarray scanner and analyzed with ADM-2 software.

For the screening of alterations in other differential diagnostic genes of SRS, our group designed and validated a custom panel of 26 genes/regions related to growth impairment. The study of this panel was conducted using Nextera Flex for the enrichment method (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) and sequenced on a MiniSeq Mid Output kit with 2×150 cycles, 2.4 Gb (Illumina Inc.). The BaseSpace BWA Enrichment (Illumina Inc.) was used to process data (alignment with BWA 0.7.7 on GRCh37/hg19 and VCF and bam/bai files were obtained with GATK Variant Caller v1.6-23 and SAMtools v0.1.19, respectively). Downstream bioinformatic analysis of VCF files (annotation, filtering, and variant prioritization) and bam files (for CNV detections) was performed with the help of commercial software VarSeq V2.2.1 (Golden Helix, Bozeman, MT, USA). The parameters used for the filtering and prioritization were as follows: quality assessment ($Q > 30$; mean coverage $> 50\times$), population frequency (minor allele frequency $< 1\%$ in ExAC, gnomAD, 1000 Genomes, or ESP6500 population databases), variant effect (missense, nonsense, frameshift, and splicing effect), and in silico pathogenicity prediction (Combined Annotation Dependent Depletion, CADD_1.4 score > 14). The resulting variants were classified in accordance with the American College of Medical Genetics and Genomics' (ACMG) criteria [24].

After filtering, variant confirmation, and co-segregation studies in other family members were carried out via Sanger sequencing using Bigdye Terminator version 3.1 kit and analyzed in an ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's protocols.

3. Results and Discussion

3.1. MS-MLPA Study

Methylation analysis of chromosome 11 showed that the patient did not present variations in the methylation status nor in the copy number of the studied region (loci *H19*, *KCNQ1*, and *CDKN1C*). Indirectly, it was also demonstrated that there was not a maternal disomy.

MS-MLPA analysis of chromosomes 6, 7, and 14 revealed no methylation alteration for chromosomes 7 and 14, excluding upd(7)mat, as well as Temple syndrome, which were also observed in some patients with clinical features suspicious of SRS [25,26]. Curiously, a partial LOM in *PLAGL1:alt-TSS-DMR* was identified in the proband (Figure 3A) without dosage alteration, but not in her parents. LOM at *PLAGL1:alt-TSS-DMR* is the cause of 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus [27] associated with fetal growth restriction [28]. *PLAGL1* plays an important role on the network of co-regulated imprinted genes involved in controlling fetal and post-natal development, hence variations in its expression may affect growth homeostasis. A study in a cohort of healthy subjects demonstrated that as *PLAGL1* expression is proportionally associated with its methylation status,

small variations in methylation in the DMR and its subsequent higher expression of *PLAGL1* correlated with smaller fetal (from the second semester of pregnancy), birth, and infant weight, and BMI, but not with length (only in TDNM when LOM is total) [29]. In this particular case, the mother presented normal weight throughout her life, which correlated with her normal methylation status. No glucose alterations were detected in the proband, neither during the neonatal period nor later in her life. Besides, the mother, with the same phenotype, did not carry the *PLAGL1* LOM, so it can be assumed that this alteration was not a direct cause of the clinical manifestations in the index, even if its influence in more severe manifestations, mainly during the prenatal and perinatal periods, cannot be excluded (lack of maternal data to compare).

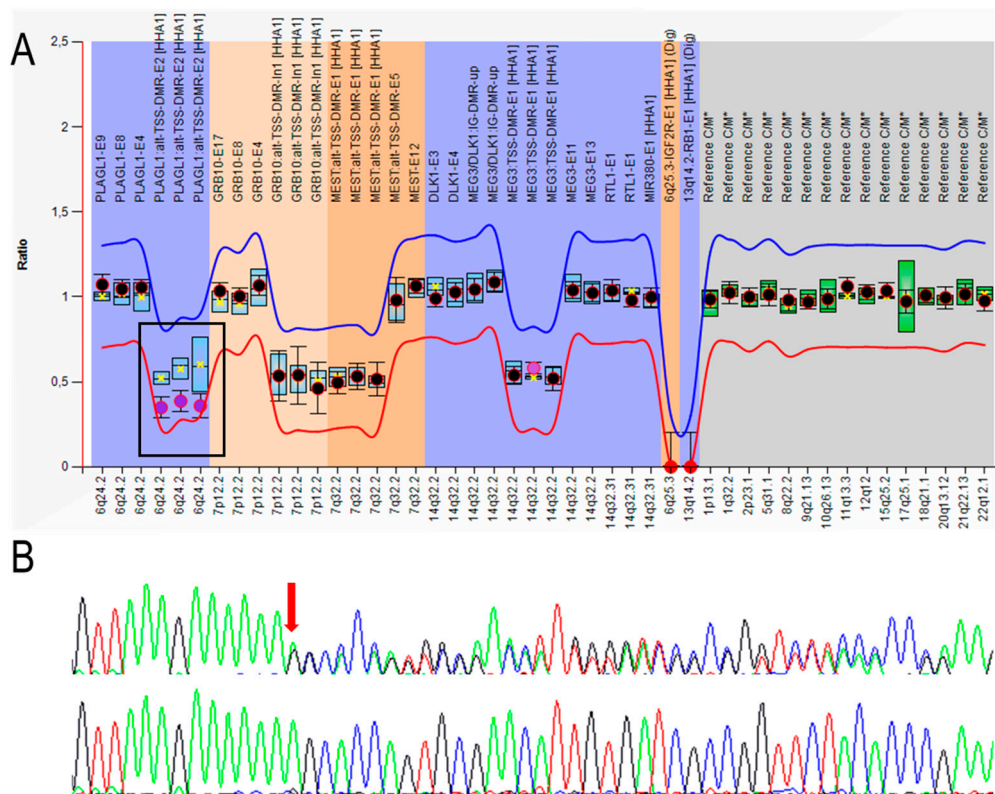


Figure 3. (A) Partial hypomethylation in *PLAGL1*:alt-TSS-DMR (framed) revealed in ME032-A1 kit analysis, represented with Coffalyser. Probe results indicate significantly decreased signals compared to the reference samples as a decrease of more than two standard deviations. The red and blue lines indicate the arbitrary borders for loss and gain, respectively (by default, the borders are placed ± 0.3 from the mean probe value of a probe over the reference samples). Black dots display the probe ratios of the patient's sample, and the error bars the 95% confidence ranges. The blue and green box plots in the background show the 95% confidence range of the used reference samples, the yellow star indicates the mean. When a probe ratio crosses the borders, it is indicative for a gain or loss (black dot surrounded in red) of methylation. Full red dots correspond to internal controls of *HhaI* digestion. (B) Electropherogram of the confirmatory direct sequencing of identified pathogenic variant in the *PLAG1* gene. Upper panel belongs to the proband, showing NM_002655: c.551delA; p.(Lys184Serfs *45) heterozygous variant (arrow) and the lower one is a wild-type sequence.

3.2. aCGH Array

The 400 K aCGH array revealed a duplication on the short arm of chromosome 9, at 9p24.1(arr(hg19) (8,157,331–8,629,525) $\times 3$), which involves *PTPRD* gene exons 10–43. This duplication was inherited from her mother. The *PTPRD* gene is involved in pre- and post-synaptic differentiation of neurons. There is no evidence correlating this alteration with any known syndrome or disease. Initially, we hypothesized that this alteration could co-segregate with learning difficulties in the family, but the grandmother (II-4)

and the aunt (III-5) were not carriers, disproving this hypothesis (Figure 2). It may be a previously undescribed polymorphism, even if according to ACMG guidelines [24] it was classified as a variant of unknown significance.

3.3. Next-Generation Sequencing

After filtering, only one potentially causative variant remained: a heterozygous pathogenic variant at exon 5 of the *PLAG1* gene (NM_002655: c.551delA; p.(Lys184Serfs *45)). In particular, ACMG criteria [24] evaluated this variant as a null variant in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease (LOUEF:0.19) (PVS1) absent in population databases (PM2), and in silico predictions support a deleterious effect (PP3). The presence of the variant was confirmed using Sanger sequencing (Figure 3B) and it was confirmed to be maternally inherited. This variant was also harbored by the grandmother and two of the aunts and uncles (Figure 2).

As previously reported in the literature, *PLAG1* pathogenic variants have only been described in three cases: two of them familial and the other one sporadic. In the three cases, the variants produced a truncated protein (two frameshift and a nonsense) and the disease followed a dominant transmission pattern [12,21], as was the case of our patient. All variants are located at the last coding exon of the gene, so a transcribed mutant mRNA will presumably not be degraded by a nonsense-mediated decay (NMD) pathway [30]. The aberrant proteins lead to a lack of zinc-fingers that could affect DNA binding. Specifically, in p.Lys184Serfs *45, as from residue 184, the protein frame is totally different, and the last two zinc fingers (F6 and F7) will disappear, as in the new protein, the C2H2-type motif [C-x(2,4)-C-x(3)-[LIVMFYWC]-x(8)-H-x(3,5)-H] [31] is totally lost. In fact, it has been demonstrated in vitro that when F6 and F7 are removed, the protein F1–F5 does not show any clear DNA binding, revealing the absolute requirement of the last two zinc fingers for the DNA binding [32]. Analysis of previously reported variants reveals that the p.(Ser147Valfs *82) [12] and p.(Arg197 *) [21] would probably have a similar effect because in both cases, F6 and F7 are removed. In p.(Gln455Serfs *16) [12], even if all the zinc fingers seem to be conserved, transcription activation could be affected as residues 385–500 are presumably important for this task. Furthermore, this region is conserved across species (Uniprot, Q6DJT9 entry).

It has been shown that there is a correlation between *PLAG1* and *IGF2* levels [12]. *IGF2* is a growth factor and its expression is regulated by several genes, one of them being *PLAG1*, so the important role of the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway in controlling growth has been demonstrated. On the other side, as described by Abi-Habib et al., silencing *PLAG1* resulted in lower levels of total *IGF2-P3* [12], which should be highly active in fetal tissues [24]. The putative low expression of *IGF2* during fetal development could explain the intrauterine growth restriction observed in these patients with *PLAG1* haploinsufficiency [12].

Keeping in mind the differences already pointed out by Abi-Habib et al. [12], we reviewed the SRS NH-CSS six key features in patients with alteration in the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway (see Supplementary Tables S1–S4). The characteristic SGA and PNGR were present in all patients, although *PLAG1* patients seem to be the less affected [12,21]. In fact, as Abi-Habib et al. and Inoue et al. observed, the birth length SDS of *PLAG1* patients is around -2.5 instead of -4 , which is the mean of SDS for patients with alterations in *HMGA2*, *IGF2*, or *CDKN1C* [12,21]. However, the index cases of the present report presented an SDS for birth length similar to that observed for *HMGA2*, *IGF2*, or *CDKN1C*. Further data are needed to obtain conclusive information. The relative macrocephaly at birth (defined as a difference in SDS of at least 1.5 between head circumference and length or weight at birth) seems to vary, even inside the same family, since some patients have been reported as showing microcephaly, as in the index of the present family [20]. The protruding forehead and feeding difficulties (and/or low body mass index) appear to be very prevalent in this group with genetic alterations [12,15,20,21]. Finally, the body asymmetry, as expected, was not described in this group of patients with genetic germline variants (except for 3 patients with *IGF2* alterations [12,16]) as this is usually a characteristic of a mosaic distribution of 11p15 LOM [21].

Apart from the typical SRS characteristics (e.g., IUGR, PNGR, feeding difficulties), the index and her affected relatives also showed dental problems, comprehension/intellectual difficulties, and fine hair. Dental problems in SRS patients have been previously described in the literature, and were also reported in two patients with *HMGA2* alterations (not previously mentioned in patients with *PLAG1* alterations) [12,33]. However, regarding comprehension/intellectual difficulties, even though several reports on SRS children mentioned a reduced intelligence quotient (IQ) [34], a recent study carried out in adults with the typical 11p15 epimutation came to the conclusion that the IQ score was in the normal range and the patients had no problem with verbal comprehension [35]. Learning difficulties were present in the current family both in carriers and non-carriers of the *PLAG1*-variant, but unfortunately, IQ testing was just done for the index. Therefore, we cannot univocally correlate the variant with learning difficulties. Nevertheless, intellectual developmental delay has been reported in two non-related patients with *IGF2* alterations (IQ/DQ = 77 and 79) [15], and attention-deficit hyperactivity disorder and difficulties were mentioned in a recently reported patient with a *PLAG1* nonsense variant [21]. Further studies on this aspect are needed.

4. Conclusions

Firstly, as previously described in a few patients, we presented the case of a girl with clinical features of SRS with a frameshift pathogenic variant in the *PLAG1* gene. It is the fourth truncating variant identified in this gene associated with SRS. All of them seem to affect its ability for DNA binding. *PLAG1* is a regulator of growth, so it should be taken into account in SRS molecular diagnosis and, maybe, in other conditions affecting growth.

Secondly, *HMGA2*, *PLAG1*, and *IGF2* are genes involved in the same pathway. All of them have been associated with growth, so studying the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway in cases of SRS, once the most common alterations are excluded, could be a useful approach.

Finally, the *HMGA2-PLAG1-IGF2* pathway should be considered as a new genetic cause of Silver–Russell syndrome because it can lead to growth restriction.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/12/1461/s1>, Table S1: Molecular and clinical findings for patients with *PLAG1* gene alterations, in current study and described in the bibliography. Table S2: Molecular and clinical findings for patients with *CDKN1C* gene alterations, described in the bibliography. Table S3: Molecular and clinical findings for patients with *HMGA2* gene alterations or rearrangements involving this gene, described in the bibliography. Table S4: Molecular and clinical findings for patients with *IGF2* gene, described in the bibliography.

Author Contributions: Conceptualization, G.P.d.N.; methodology: I.L.-R., N.G.-R., I.D., A.P., Y.V., and G.P.d.N.; software: A.P.; validation A.P. and Y.V.; formal analysis A.P., Y.V., and G.P.N.; investigation: I.L.-R., N.G.-R., I.D., and G.P.d.N.; data curation: A.P. and Y.V.; writing—original draft preparation A.P., Y.V., and G.P.d.N., reviewing, all authors; writing—review and editing A.P., Y.V., and G.P.d.N.; funding acquisition, G.P.d.N. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Instituto de Salud Carlos III (Institute of Health Carlos III) of the Ministry of Economy and Competitiveness (Spain), co-financed by the European Regional Development Fund (PI16-00073), and the Department of Health of the Basque Government (GV2017/111040).

Acknowledgments: The authors would like to thank Karol Jimenez for technical assistance and the family who participated in the study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Russell, A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc. R. Soc. Med.* **1954**, *47*, 1040–1044. [PubMed]
2. Silver, H.K.; Kiyasu, W.; George, J.; Deamer, W.C. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* **1953**, *12*, 368–376. [PubMed]

3. Wakeling, E.L.; Brioude, F.; Lokulo-Sodipe, O.; O'Connell, S.M.; Salem, J.; Blik, J.; Canton, A.P.M.M.; Chrzanowska, K.H.; Davies, J.H.; Dias, R.P.; et al. Diagnosis and management of Silver-Russell syndrome: First international consensus statement. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2017**, *13*, 105–124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Duncan, P.A.; Hall, J.G.; Shapiro, L.R.; Vibert, B.K. Three-generation dominant transmission of the Silver-Russell syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **1990**, *35*, 245–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Azzi, S.; Salem, J.; Thibaud, N.; Chantot-Bastarud, S.; Lieber, E.; Netchine, I.; Harbison, M.D. A prospective study validating a clinical scoring system and demonstrating phenotypical-genotypical correlations in Silver-Russell syndrome. *J. Med. Genet.* **2015**, *52*, 446–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Eggermann, T.; Begemann, M.; Binder, G.; Spengler, S. Silver-Russell syndrome: Genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J. Rare Dis.* **2010**, *5*, 19. [[CrossRef](#)]
7. Giabicani, E.; Netchine, I.; Brioude, F. New clinical and molecular insights into Silver-Russell syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* **2016**, *28*, 529–535. [[CrossRef](#)]
8. Tümer, Z.; López-Hernández, J.A.; Netchine, I.; Elbracht, M.; Grønskov, K.; Gede, L.B.; Sachwitz, J.; den Dunnen, J.T.; Eggermann, T. Structural and sequence variants in patients with Silver-Russell syndrome or similar features—Curation of a disease database. *Hum. Mutat.* **2018**, *39*, 345–364. [[CrossRef](#)]
9. Brioude, F.; Oliver-Petit, I.; Blaise, A.; Praz, F.; Rossignol, S.; Le Jule, M.; Thibaud, N.; Faussat, A.M.; Tauber, M.; Le Bouc, Y.; et al. CDKN1C mutation affecting the PCNA-binding domain as a cause of familial Russell Silver syndrome. *J. Med. Genet.* **2013**, *50*, 823–830. [[CrossRef](#)]
10. Kerns, S.L.; Guevara-Aguirre, J.; Andrew, S.; Geng, J.; Guevara, C.; Guevara-Aguirre, M.; Guo, M.; Oddoux, C.; Shen, Y.; Zurita, A.; et al. A novel variant in CDKN1C is associated with intrauterine growth restriction, short stature, and early-adulthood-onset diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E2117–E2122. [[CrossRef](#)]
11. Sabir, A.H.; Ryan, G.; Mohammed, Z.; Kirk, J.; Kiely, N.; Thyagarajan, M.; Cole, T. Familial Russell-Silver Syndrome like Phenotype in the PCNA Domain of the CDKN1C Gene, a Further Case. *Case Rep. Genet.* **2019**, *2019*, 1398250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Abi Habib, W.; Brioude, F.; Edouard, T.; Bennett, J.T.; Lienhardt-Roussie, A.; Tixier, F.; Salem, J.; Yuen, T.; Azzi, S.; Le Bouc, Y.; et al. Genetic disruption of the oncogenic HMGA2-PLAG1-IGF2 pathway causes fetal growth restriction. *Genet. Med.* **2018**, *20*, 250–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Begemann, M.; Zirn, B.; Santen, G.; Wirthgen, E.; Soellner, L.; Büttel, H.-M.; Schweizer, R.; van Workum, W.; Binder, G.; Eggermann, T. Paternally Inherited IGF2 Mutation and Growth Restriction. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 349–356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liu, D.; Wang, Y.; Yang, X.-A.; Liu, D. De Novo Mutation of Paternal IGF2 Gene Causing Silver-Russell Syndrome in a Sporadic Patient. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 105. [[CrossRef](#)]
15. Masunaga, Y.; Inoue, T.; Yamoto, K.; Fujisawa, Y.; Sato, Y.; Kawashima-Sonoyama, Y.; Morisada, N.; Iijima, K.; Ohata, Y.; Namba, N.; et al. IGF2 Mutations: Report of Five Cases, Review of the Literature, and Comparison with H19/IGF2:IG-DMR Epimutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 116–125. [[CrossRef](#)]
16. Poulton, C.; Azmanov, D.; Atkinson, V.; Beilby, J.; Ewans, L.; Gratton, D.; Dreyer, L.; Shetty, V.; Peake, C.; McCormack, E.; et al. Silver Russel syndrome in an aboriginal patient from Australia. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2018**, *176*, 2561–2563. [[CrossRef](#)]
17. Rockstroh, D.; Pfäffle, H.; Le Duc, D.; Rößler, F.; Schlenzog-Schuster, F.; Heiker, J.T.; Kratzsch, J.; Kiess, W.; Lemke, J.R.; Jamra, R.A.; et al. A new p.(Ile66Serfs*93) IGF2 variant is associated with pre- and postnatal growth retardation. *Eur. J. Endocrinol.* **2019**, *180*, K1–K13. [[CrossRef](#)]
18. Yamoto, K.; Saitsu, H.; Nakagawa, N.; Nakajima, H.; Hasegawa, T.; Fujisawa, Y.; Kagami, M.; Fukami, M.; Ogata, T. De novo IGF2 mutation on the paternal allele in a patient with Silver-Russell syndrome and ectrodactyly. *Hum. Mutat.* **2017**, *38*, 953–958. [[CrossRef](#)]
19. De Crescenzo, A.; Citro, V.; Freschi, A.; Sparago, A.; Palumbo, O.; Cubellis, M.V.; Carella, M.; Castelluccio, P.; Cavaliere, M.L.; Cerrato, F.; et al. A splicing mutation of the HMGA2 gene is associated with Silver-Russell syndrome phenotype. *J. Hum. Genet.* **2015**, *60*, 287–293. [[CrossRef](#)]
20. Hübner, C.; Meyer, R.; Kenawy, A.; Ambrozaityte, L.; Matuleviciene, A.; Kraft, F.; Begemann, M.; Elbracht, M.; Eggermann, T. HMGA2 variants in Silver-Russell syndrome: Homozygous and heterozygous occurrence. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 2401–2407. [[CrossRef](#)]

21. Inoue, T.; Nakamura, A.; Iwahashi-Odano, M.; Tanase-Nakao, K.; Matsubara, K.; Nishioka, J.; Maruo, Y.; Hasegawa, Y.; Suzumura, H.; Sato, S.; et al. Contribution of gene mutations to Silver-Russell syndrome phenotype: Multigene sequencing analysis in 92 etiology-unknown patients. *Clin. Epigenetics* **2020**, *12*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kas, K.; Voz, M.L.; Röijer, E.; Aström, A.K.; Meyen, E.; Stenman, G.; Van de Ven, W.J. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and β -catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat. Genet.* **1997**, *15*, 170–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Akhtar, M.; Holmgren, C.; Göndör, A.; Vesterlund, M.; Kanduri, C.; Larsson, C.; Ekström, T.J. Cell type and context-specific function of PLAG1 for IGF2 P3 promoter activity. *Int. J. Oncol.* **2012**, *41*, 1959–1966. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W.W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **2015**, *17*, 405–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Luk, H.-M. Temple syndrome misdiagnosed as Silver-Russell syndrome. *Clin. Dysmorphol.* **2016**, *25*, 82–83. [[CrossRef](#)]
26. Goto, M.; Kagami, M.; Nishimura, G.; Yamagata, T. A patient with Temple syndrome satisfying the clinical diagnostic criteria of Silver-Russell syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2016**, *170*, 2483–2485. [[CrossRef](#)]
27. Docherty, L.E.; Kabwama, S.; Lehmann, A.; Hawke, E.; Harrison, L.; Flanagan, S.E.; Ellard, S.; Hattersley, A.T.; Shield, J.P.H.; Ennis, S.; et al. Clinical presentation of 6q24 transient neonatal diabetes mellitus (6q24 TNDM) and genotype-phenotype correlation in an international cohort of patients. *Diabetologia* **2013**, *56*, 758–762. [[CrossRef](#)]
28. Temple, I.K.; James, R.S.; Crolla, J.A.; Sitch, F.L.; Jacobs, P.A.; Howell, W.M.; Betts, P.; Baum, J.D.; Shield, J.P. An imprinted gene(s) for diabetes? *Nat. Genet.* **1995**, *9*, 110–112. [[CrossRef](#)]
29. Azzi, S.; Sas, T.C.J.; Koudou, Y.; Le Bouc, Y.; Souberbielle, J.C.; Dargent-Molina, P.; Netchine, I.; Charles, M.A. Degree of methylation of ZAC1 (PLAGL1) is associated with prenatal and post-natal growth in healthy infants of the EDEN mother child cohort. *Epigenetics* **2013**, *9*, 338–345. [[CrossRef](#)]
30. Lindeboom, R.G.H.; Supek, F.; Lehner, B. The rules and impact of nonsense-mediated mRNA decay in human cancers. *Nat. Genet.* **2016**, *48*, 1112–1118. [[CrossRef](#)]
31. Marco, E.; García-Nieto, R.; Gago, F. Assessment by molecular dynamics simulations of the structural determinants of DNA-binding specificity for transcription factor Sp1. *J. Mol. Biol.* **2003**, *328*, 9–32. [[CrossRef](#)]
32. Voz, M.L.; Agten, N.S.; Van de Ven, W.J.; Kas, K. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 106–113. [[PubMed](#)]
33. Ioannidou-Marathiotou, I.; Sluzker, A.; Athanasiou, A.E. Orthodontic management of silver-russell syndrome. A case report. *Open Dent. J.* **2012**, *6*, 131–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Noeker, M.; Wollmann, H.A. Cognitive development in Silver-Russell syndrome: A sibling-controlled study. *Dev. Med. Child Neurol.* **2004**, *46*, 340–346. [[CrossRef](#)]
35. Burgevin, M.; Lacroix, A.; Brown, G.; Mikaty, M.; Coutinho, V.; Netchine, I.; Odent, S. Intellectual functioning in Silver-Russell syndrome: First study in adults. *Appl. Neuropsychol. Adult* **2019**, 1–12. [[CrossRef](#)]









Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ORIGINAL ARTICLE

Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease with extremely long 14-year survival period

Izaro Kortazar-Zubizarreta¹  | Rebeca Ruiz-Onandi²  | Arrate Pereda³  |
Yerai Vado³  | Gonzalo González-Chinchon¹  | Hasier Eraña^{4,5}  |
Guiomar Perez de Nanclares³  | Joaquín Castilla^{4,6} 

¹Department of Neurology, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Spain

²Department of Pathology, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Spain

³Molecular (Epi)Genetics Laboratory, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital, Vitoria-Gasteiz, Spain

⁴Centre for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Spain

⁵Atlas Molecular Pharma, Bizkaia Technology Park, Derio, Spain

⁶Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

Correspondence

Izaro Kortazar-Zubizarreta, Department of Neurology, Bioaraba Health Research Institute, Araba University Hospital-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Spain.
Email: izaro.kortazarzubizarreta@osakidetza.eus

Joaquín Castilla, Centre for Cooperative Research in Biosciences (CIC bioGUNE), Basque Research and Technology Alliance (BRTA), Derio, Spain.
Email: castilla@joaquincastilla.com

Funding information

This work was supported financially by the Department of Health of the Basque Government (GV202018/111002), a Spanish grant awarded to J.C. (RTI2018-098515-B-I00) by MINECO/FEDER, as well as an Interreg (POCTEFA EFA148/16) grant awarded to J.C. by FEDER. Therefore, this project was cofunded by the European Regional Development Fund.

Abstract

Background and purpose: Sporadic Creutzfeldt–Jakob disease is a rapidly progressing and highly variable neurodegenerative disease with heterogeneous clinical presentation and a median survival time from diagnosis to death of 4–6 months.

Methods: We report a rare case of a 61-year-old woman with a history of initially rapidly progressive dementia, with subsequent development of pyramidal and extrapyramidal signs and with an unusually long survival period of 14 years. Initial magnetic resonance imaging evaluation, single-photon emission computed tomography, and electroencephalogram did not show relevant alterations.

Results: The postmortem examination of the brain showed diffuse spongiform change, gliosis, and neuronal loss along with abnormal immunostaining of prion protein in the grey matter, especially in the cerebellum. Indirect *PRNP* genetic analysis was negative.

Conclusions: This case is, to our knowledge, the sporadic Creutzfeldt–Jakob disease patient with the longest survival period ever documented. This surprisingly long duration highlights the importance of histopathological confirmation with brain autopsies for suspected cases, as the disease can easily be misdiagnosed in such slowly progressing cases.

KEYWORDS

Creutzfeldt–Jakob disease, long survival, neuropathology, sporadic CJD

INTRODUCTION

Creutzfeldt–Jakob disease (CJD) is a rare and devastating neurodegenerative disorder. The sporadic form of the disease (sCJD) is the

most common, although mutation-associated familial or hereditary cases are also known, as well as iatrogenic forms [1]. CJD is caused by neuronal degeneration due to the neurotoxic properties of the misfolded isoform (PrP^{Sc}) of cellular or natively folded prion protein

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2021 The Authors. *European Journal of Neurology* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of European Academy of Neurology

(PrP^C), which also becomes aggregation prone and accumulates in the central nervous system [2].

The typical clinical features involve rapidly progressive dementia plus two additional symptoms such as cerebellar ataxia, myoclonus, pyramidal or extrapyramidal motor signs, and visual symptoms. Supportive criteria include magnetic resonance imaging (MRI) signal alterations, especially in diffusion-weighted images or fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR) images in basal ganglia, with at least two cortical regions affected (temporal, parietal, or occipital), as well as typical periodic sharp and slow wave complexes in electroencephalogram pattern, and the presence of 14-3-3 protein in cerebrospinal fluid (CSF) biomarkers [3]. Among those, detection of minute amounts of PrP^{Sc} through real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC), a recently developed CSF biomarker that offers high sensitivity (85.7%) and specificity (100%) for the detection of sCJD [4], is worth highlighting. In spite of such recent advances, definitive confirmatory CJD diagnosis is based on pathological evaluation of the brain postmortem, by neuropathological, immunohistochemical, and biochemical analyses aimed at detecting spongiform lesions, astrogliosis, or deposits of proteinase-resistant PrP^{Sc}.

Despite being a clinically heterogeneous disease, with marked variability also regarding the age of onset and duration, usual survival periods from diagnosis to death are from 4 to 6 months [5,6]. Other unusually long sCJD cases have been previously reported, one of the longest survival times for sCJD being described in a teenage girl, with initially rapid neurocognitive decline followed by a prolonged 10-year clinical course [7]. To our knowledge, among adults, the longest period described corresponds to a case with 16-year survival after diagnosis of rapidly progressive dementia, with neuropathological postmortem diagnosis of CJD. However, the patient had a family history of similar disease, which could suggest that the disease may not have been sCJD but some other form of prion disease with a longer disease course [8].

Herein, we report the case of an adult with a 14-year survival period after the diagnosis of rapidly progressive dementia, with neuropathological postmortem diagnosis of CJD, which is to our knowledge the longest confirmed case of sCJD ever described.

METHODS

A 61-year-old woman presented to the hospital with a 2-month history of behavioural change including hyperactivity, aggressiveness, and exhibitionism. She had also developed progressive cognitive decline and in consequence was unable to carry out basic daily activities.

She had no history of other comorbidities, and her family history was unremarkable.

During the next month after hospitalisation, she subsequently developed delirium and visual and auditory hallucinations. The patient was inattentive and disoriented regarding time and space. On the Mini-Mental State Examination, the patient scored 10/30. Neurological examination revealed parkinsonism, including

hypomimia and symmetric increased tone with cogwheel rigidity and bradykinesia. She had no tremor. Cranial nerve, motor, sensory, and cerebellar examinations were normal. Babinski response was absent.

Extensive evaluations for autoimmune, infectious, toxic, metabolic, and neoplastic blood studies showed no alteration. Brain MRI, including diffusion-weighted imaging and single-photon emission computed tomography, was unremarkable. The routine electroencephalogram was normal. CSF analysis was not performed.

Based on the clinical symptoms of rapidly progressive cognitive decline and behavioural change, she received at that time the diagnosis of Pick's disease, more commonly referred to as one of the frontotemporal dementias with tau accumulation [9].

During the clinical course, she was admitted to a psychiatric hospital, where she started to present severe insomnia and new onset episodes of abnormal movements suggestive of myoclonus, which decreased with phenobarbital. Subsequently, as cognitive decline progressed, she developed aphasia with echolalia and perseveration. After a 1-year period from first hospitalisation, she was wheelchair-bound.

At neurological review 18 months after her first evaluation, she was mute, could not walk, even with assistance, and lost sphincter control. On examination, the patient presented with the following neurological symptoms and signs: spontaneous multidirectional nystagmus, akinetic mutism with global hyperreflexia, and extensor plantar response.

In the following years, she developed progressive dysphagia with significant weight loss, for which a dietary modification was prescribed. Nevertheless, during the follow-up, she had several aspiration pneumonia episodes, and she also developed severe constipation.

Follow-up MRI was not performed. During disease follow-up, the patient was prescribed only phenobarbital; neither doxycycline nor trazodone was given, probably because the prion disease condition was not suspected.

Despite having recurrent aspiration pneumonia episodes during the last 2 years that required antibiotic treatment, artificial feeding was not evaluated, despite the attendant risk of aspiration. However, modified-texture food diet and supplemental nutrition shakes were required since institutionalisation.

One hundred seventy-six months after clinical onset, she died of respiratory failure at age 76 years, and an autopsy was conducted.

RESULTS

Postmortem examination of the brain revealed macroscopic changes. It weighed 790 g before fixation. Cerebral atrophy was observed, particularly in the frontal cortex, associated with widening of ventricles. Basal ganglia, thalamus, brain stem, and cerebellum were macroscopically normal. The pigmentation of the substantia nigra and locus ceruleus was also considered unaltered.

Microscopic examination revealed diffuse spongiosis in the cerebral cortex and moderate spongiosis in basal ganglia (thalamus) and

granule cell layer of the cerebellum (Figure 1). In addition, marked neuronal loss and astrocytic gliosis were observed in the pulvinar and lenticular nuclei, being moderate in cerebral cortex. No spongiform alteration was found in brain stem. Additionally, neuropil threads, tangles, and pretangles were observed in the entorhinal cortex and hippocampus (Braak Stage II).

Immunohistochemical analysis for PrP^{Sc} with anti-PrP antibody (amino acids [a.a.] 109–112, clone 3F4 monoclonal antibody) showed synaptic, granular, and plaque-like patchy positivity in the cerebellum, frontal cortex, hippocampus, and parahippocampal circumvolution (Figure 2). The sections on the caudate and putamen nucleus were negative for prion staining. However, amyloid immunostaining with purified anti- β -amyloid 1–42 antibody (clone 12F4 monoclonal antibody) was only positive in some leptomeningeal vessels (Figure 3). Alpha-synuclein immunohistochemistry with purified anti- α -synuclein (amino acids 115–121, clone LB509 monoclonal antibody) in the amygdala and midbrain was negative, as well as phosphorylated TDP-43 in hippocampus visualised with anti-phospho-TDP-43 antibody (sp409/410 monoclonal antibody).

Unfortunately, Western blot assay for PrP^{Sc} was not possible, because only formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue sections were available.

As no blood sample from the patient was available, genomic DNA of the patient was extracted from formalin-fixed brain tissue using two different methods, QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) and the procedure developed by Campos and Gilbert [10]. On the other side, the DNA of the offspring and the partner was extracted from their peripheral blood using the QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN).

The *PRNP* gene was analysed by direct sequencing of the whole gene, including the coding and untranslated regions and exon/intron boundaries in the patient and her progeny. Insertions and deletions in the octapeptide repeat region and microsatellites flanking the *PRNP* gene (D20S906, D20S842, D20S846, D20S882) were studied by fluorescent PCR and posterior electrophoresis using the 3500 Series Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

It was not possible to sequence the index *PRNP* gene due to the fragmentation of the DNA sample extracted from formalin-fixed paraffin-embedded brain tissue samples. Because of this, indirect

genetic studies were performed. These studies revealed that none of the descendants presented alteration in the *PRNP* gene. In addition, microsatellite genotyping of her descendants and partner allowed haplotype reconstruction and showed that both alleles of the index had been analysed, as both chromosomes were present within the offspring. As none of the descendants presented any pathogenic variant at *PRNP*, we could infer that the index patient did not carry any alteration in the *PRNP* gene and was homozygous for the Val variant at position 129 of PrP (Figure S1).

Finally, because the codon 129 was Val/Val, this case should be classified as VV, although the absence of Western blot for the formal distinction between VV1 and VV2 categories precludes further classification [11].

DISCUSSION

Creutzfeldt-Jakob disease is a rapidly progressive neurodegenerative disorder. To our knowledge, despite a few studies reporting unusually long duration cases of prion disease [7,8,12], mainly case reports from familial or genetic forms of the disease [5], our patient had the longest survival time ever reported for sCJD.

Cutler et al. reported a case of a 16-year duration CJD in 1984 [8], the longest period ever reported for prion disease. However, they presented a case of a 46-year-old man whose father and paternal grandmother both had progressive mental deterioration, and genetic study was absent, so it resembled a familial CJD case.

Long survival in sCJD has being reported also in the paediatric population [7], in a 15-year-old girl with a total disease duration of nearly 10 years. The case was clinically characterised by rapid neurocognitive decline followed by myoclonus and seizures. Also, as in our case, the first MRI at presentation only showed mild generalised volume loss; nevertheless, in that case follow-up MRI was performed, presenting diffusion and FLAIR hyperintensity in basal ganglia and pulvinar bilaterally. Genetic study was negative, and neuropathological findings included minimal spongiform change, PrP^{Sc} deposits in the neocortex, striatum, and cerebellum by immunohistochemistry, and protease-resistant PrP^{Sc} by Western immunoblot.

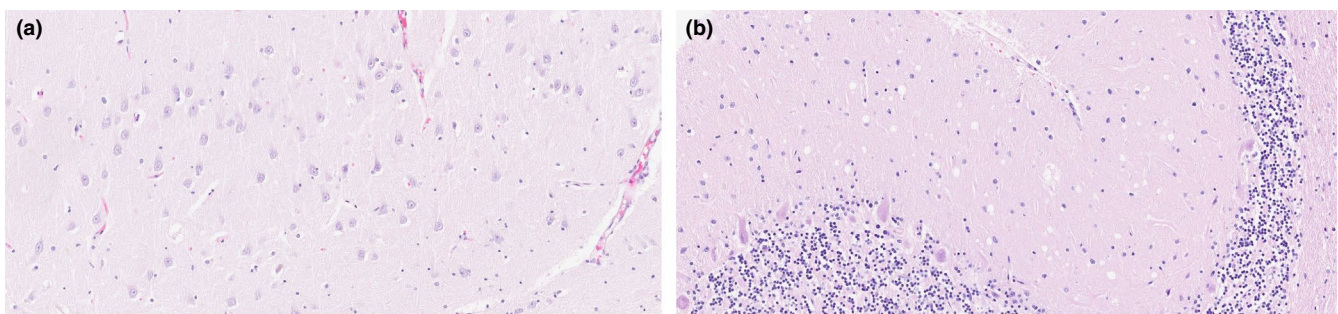


FIGURE 1 Low-power photomicrographs (original magnification, $\times 16$) of hippocampus (a) and cerebellum (b) stained with hematoxylin and eosin show characteristic spongiform degeneration (vacuolation) of the grey matter neuropil specific to Creutzfeldt-Jakob disease

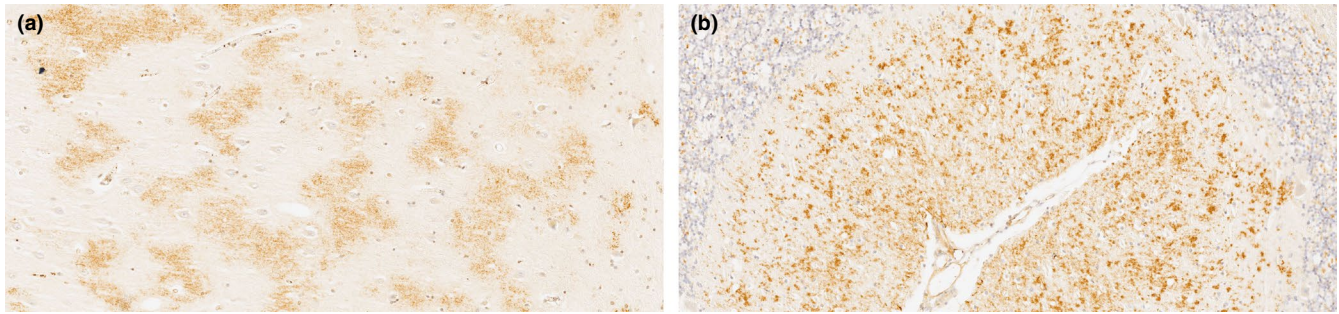


FIGURE 2 Low-power photomicrographs (original magnification, $\times 16$) show prion protein (PrP) staining that identifies widespread accumulation of PrP in a plaque-like, granular, and synaptic-like pattern in parahippocampal gyrus (a) and cerebellum (b) (anti-prion protein, amino acids 109–112, clone 3F4, monoclonal antibody)

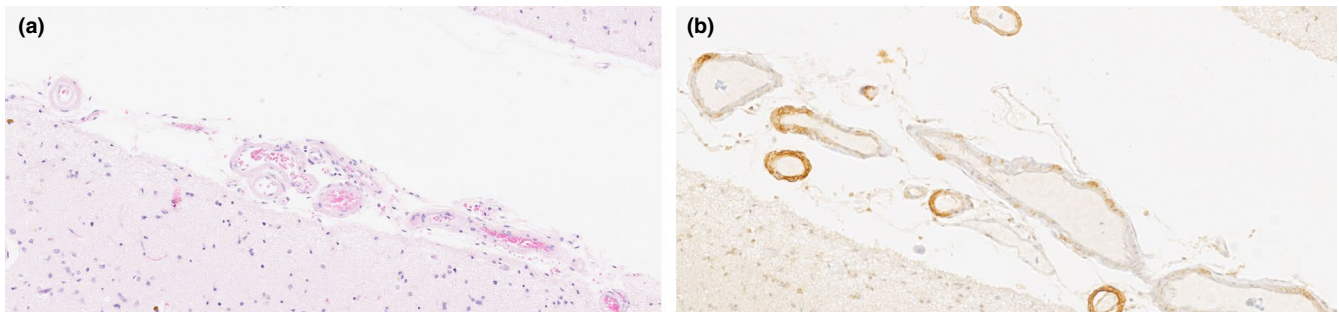


FIGURE 3 Neuropathologic features showed no indication of Alzheimer's disease. Low-power photomicrographs (original magnification, $\times 16$) of anti-amyloid- β immunostaining of leptomeningeal vessels in parahippocampal gyrus reveal absence of amyloid deposition (purified anti- β -amyloid 1–42, clone 12F4)

The most recently reported data of long survival [12] is a 63-year-old woman with slowly progressive dementia with pre-mortem confirmation of prion disease with positive skin biopsy testing by RT-QuIC assays, who was still alive at 34 months after disease onset.

In our patient, the clinical features of rapidly progressive dementia with pyramidal and extrapyramidal signs during the first year, in addition to the presence of early aphasia and myoclonus, made a pre-mortem diagnosis of CJD far more probable than Alzheimer disease (AD) or frontotemporal dementia. Despite the extremely long 14-year survival, the patient had a rapid clinical progression in the first year, including cognitive impairment, behavioural symptoms, motor involvement, aphasia, and myoclonus. Given that the rest of the neurodegenerative dementias have more specific clinical features than prion disorders, this initial involvement of multiple neuroanatomical regions is uncommon in most of them; evaluated retrospectively, the clinical clues of the first-year period taken altogether were indicative of sCJD. Nevertheless, CJD was not suspected in the present case, mainly due to the long survival and the absence of abnormal findings in brain MRI and electroencephalographic studies. Both tests were done in a very early phase of the disease, and because the results did not indicate a possible prion disease, they were not repeated during the course of her illness.

The co-occurrence of CJD hallmarks with AD-related findings on the neuropathological study, as in our patient, despite being

uncommon, has been previously reported [13,14]. Published data suggest that the coexistence of CJD and AD hallmarks could present in two different ways, on one hand as a regular AD case developing CJD findings in the late stages, or on the other hand as a CJD case that also develops pathological features of AD, without typical clinical findings of AD [13]. The patient reported here, according to the clinical evidence described, suggests the second option, because the main clinical hallmarks in our patient were rapid progressive dementia, with initial psychiatric and dysphasic characteristics, followed by progressive parkinsonism.

Typically, AD patients show brain atrophy, most marked in the medial temporal lobes, with relative preservation of the primary motor cortex and occipital lobes. In our case, we found atrophic brain, predominantly frontal, with ventricular dilatation.

In AD, there is also an accumulation of two proteins, extracellular beta amyloid peptide ($A\beta$) within plaques [15] and abnormally phosphorylated tau in neurofibrillary tangles [16]. Amyloid peptide plaques were not present in our case. Although some leptomeningeal vessels showed some positivity on $A\beta$ staining, these findings have been previously mentioned in sCJD patients, mainly in elderly cases [17]. The deposition of abnormal tau protein in the brain is not unique to AD but is also observed in many other neurodegenerative disorders [18–20]. In our case, tau pathology manifested in Braak Stage II findings, with neuropil threads, tangles, and pretangles in the entorhinal cortex and hippocampus.

Spongiform changes can occur in AD [21], similar to that observed in CJD [22], particularly when it is concomitant with Lewy bodies disease [23]. The spongiform change in AD usually involves the superior and inferior temporal, entorhinal, and insular cortices, as well as the amygdala [24]. In contrast, spongiform change in CJD is more widespread, with the involvement of the neocortex, striatum, thalamus, and cerebellum [22,25]. In our patient, diffuse and patchy spongiosis was observed in the cerebral cortex, the cerebellar molecular layer, and, to a lesser extent, in the basal ganglia, matching what is expected for CJD.

However, one of the most relevant findings from the immunohistochemical study was the detection of synaptic, granular, and plaque-like patchy positivity for PrP^{Sc} in the cerebellum, frontal cortex, hippocampus, and parahippocampal circumvolution, undoubtedly pointing towards prion disease.

Finally, there were no alpha-synuclein or phosphorylated TDP-43 inclusions, ruling out synucleinopathies or frontotemporal lobar degeneration. However, the latter could not be completely discarded, given that accumulation of other misfolded proteins such as FUS can also cause the disease [26]. To rule out the presence of Transmissible spongiform encephalopathies associated mutations, which could explain a slower or atypical disease progression than that expected for sCJD, genomic DNA from fixed brain samples was extracted, but the fragmentation of the extracted material due to its long conservation in the fixing agent impeded sequencing of the *PRNP* gene. Although genotyping of descendants of the index case demonstrated the absence of such disease-associated mutations at least in the germline, in agreement with the latest reports of the potential role of somatic mutations in adult onset neurodegenerative disorders [27], the existence of such an event could not be discarded.

Unfortunately, as there was only formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue, the Western blot assay for PrP^{Sc}, which would support the findings from the neuropathological analysis and permit further classification of the disease subtype, was impossible to perform, nor was it possible to analyse CSF for protein aggregation assays by RT-QulC. Nonetheless, based on the genetic information from the descendants, we could conclude the genotype of the patient regarding polymorphisms at codon 129, which was Val/Val. Therefore, we could classify the case as sCJD of VV subtype, although the distinction between VV1 and VV2 types in accordance with the molecular classification proposed by Parchi and Saverioni [11] was not possible. Histopathological analysis also allows distinction of subtypes in certain cases, because neuropathological hallmarks are distinguishable for some subtypes. However, the variability among cases of the same subtype makes it far more complicated than the biochemical classification derived from proteinase K digestion and Western blotting detection of disease-associated PrP^{Sc}. In the case of VV subtypes, VV2 shows usually medium-size vacuoles in striatum, hippocampus, limbic cortex, thalamus, cerebellum (molecular layer), and midbrain, and in the neocortex, the spongiform change affects deep layers predominantly. In contrast, VV1 subtype is characterised by similar spongiform changes in neocortex

and striatum mainly, with sparing of brainstem and cerebellum. In the case presented herein, diffuse spongiosis in the cerebral cortex and moderate spongiosis in basal ganglia (thalamus) and the granule cell layer of the cerebellum were observed, reminiscent of Subtype 2 more than Subtype 1. In terms of PrP immunohistochemistry, we observed synaptic, granular, and plaquelike patchy positivity in the cerebellum, frontal cortex, hippocampus, and parahippocampal circumvolution, which does not completely match with the PrP deposition expected for VV1 or VV2, although synaptic and plaquelike deposits may be more frequently associated also with the VV2 type. In any case, the lack of biochemical characterisation of the PrP^{Sc} from the deposits impedes drawing robust conclusions on this matter, which is further complicated by the potential existence of strain mixes [28] and by atypical manifestations, which could easily happen with this case, given the unusually long duration.

CONCLUSION

We considered this case important to present, on the one hand because as it is a rare disease, reporting every unusual case of CJD could significantly improve our understanding of this disorder and all its possible manifestations. On the other hand, it is an example of the importance of thorough histopathological studies from brains in atypical rapidly progressive dementias, as the lack of thereof could easily lead to misdiagnosis, as demonstrated by our case.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Karol Jimenez for technical assistance and the family that participated in the study.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no competing interests to declare.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Izaro Kortazar-Zubizarreta: Conceptualisation (equal), data curation (equal), investigation (equal), methodology (equal), project administration (equal), writing—original draft (equal), writing—review & editing (equal). **Rebeca Ruiz-Onandi:** Data curation (equal), validation (equal). **Arrate Pereda:** Data curation (equal), formal analysis (equal), investigation (equal), methodology (equal), writing—review & editing (equal). **Yerai Vado:** Formal analysis (equal), methodology (equal). **Gonzalo González-Chinchon:** Supervision (equal). **Hasier Eraña:** Conceptualisation (equal), formal analysis (equal), investigation (equal), methodology (equal), project administration (equal), writing—review & editing (equal). **Guimar Perez de Nanclares:** Conceptualisation (equal), data curation (equal), formal analysis (equal), project administration (equal), supervision (equal), writing—review & editing (equal). **Joaquín Castilla:** Conceptualisation (equal), data curation (equal), formal analysis (equal), funding acquisition (equal), investigation (equal), methodology (equal), project administration (equal), resources (equal), supervision (equal), validation (equal), writing—review & editing (equal).

ETHICAL APPROVAL

The Clinical Research Ethics Committee of the Basque Country approved the study (PI2021019). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

CONSENT TO PARTICIPATE

Family members consented to publication.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are available upon request due to privacy/ethical restrictions.

ORCID

Izaro Kortazar-Zubizarreta  <https://orcid.org/0000-0002-8107-660X>

Rebeca Ruiz-Onandi  <https://orcid.org/0000-0003-3667-4333>

Arrate Pereda  <https://orcid.org/0000-0002-5442-7873>

Yerai Vado  <https://orcid.org/0000-0003-4156-9159>

Gonzalo González-Chinchon  <https://orcid.org/0000-0001-5474-8717>

Hasier Eraña  <https://orcid.org/0000-0001-8776-4211>

Guiomar Perez de Nanclares  <https://orcid.org/0000-0002-2424-5294>

Joaquín Castilla  <https://orcid.org/0000-0002-2216-1361>

REFERENCES

- Geschwind MD. Prion diseases. *Continuum*. 2015;21:1612-1638. Lippincott Williams and Wilkins.
- Requena JR, Wille H. The structure of the infectious prion protein and its propagation. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;150:341-359.
- Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, et al. Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*. 2009;132(10):2659-2668.
- McGuire LI, Poleggi A, Poggolini I, et al. Cerebrospinal fluid real-time quaking-induced conversion is a robust and reliable test for sporadic creutzfeldt-jakob disease: an international study. *Ann Neurol*. 2016;80(1):160-165.
- Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA, et al. Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain*. 2004;127(10):2348-2359.
- Llorens F, Rübnsamen N, Hermann P, et al. A prognostic model for overall survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Alzheimer's Dement*. 2020;16(10):1438-1447.
- D'Arcy CE, Bitnun A, Coulthart MB, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a young girl with unusually long survival. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2019;78(4):373-378.
- Cutler NR, Brown PW, Narayan T, Parisi JE, Janotta F, Baron H. Creutzfeldt-Jakob disease: a case of 16 years' duration. *Ann Neurol*. 1984;15(1):107-110.
- Mackenzie IRA, Neumann M, Bigio EH, et al. Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol*. 2009;117(1):15-18.
- Campos PF, Gilbert TMP. DNA extraction from formalin-fixed material. *Methods Mol Biol*. 2012;840:81-85.
- Parchi P, Saverioni D. Molecular pathology, classification, and diagnosis of sporadic human prion disease variants. *Folia Neuropathol*. 2012;50:20-45.
- Liu XY, Shi Q, Wang G. Long survival sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*. 2020;95(2):87-88.
- Tsuchiya K, Yagishita S, Ikeda K, et al. Coexistence of CJD and Alzheimer's disease: an autopsy case showing typical clinical features of CJD. *Neuropathology*. 2004;24(1):46-55.
- Miyake K, Hara T, Oshima E, et al. Creutzfeldt-Jakob disease with Alzheimer pathology, presenting with status epilepticus following repeated partial seizures: a case report and literature review. *BMC Neurol*. 2018;18(1):54-58.
- Murphy MP, LeVine H. Alzheimer's disease and the amyloid-beta peptide. Lovell MA, editor. *J Alzheimers Dis*. 2010;19(1):311-323.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol*. 2008;89:233-243.
- Debatin L, Streffer J, Geissen M, Matschke J, Aguzzi A, Glatzel M. Association between deposition of beta-amyloid and pathological prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegener Dis*. 2008;5(6):347-354.
- Crary JF, Trojanowski JQ, Schneider JA, et al. Primary age-related tauopathy (PART): a common pathology associated with human aging. *Acta Neuropathol*. 2014;128(6):755-766.
- Hickman RA, Flowers XE, Wisniewski T. Primary age-related tauopathy (PART): addressing the spectrum of neuronal tauopathic changes in the aging brain. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2020;20(9):39.
- Kovacs GG. Tauopathies. *Handb Clin Neurol*. 2018;145:355-368.
- Sherzai A, Edland SD, Masliah E, et al. Spongiform change in dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2013;27(2):157-161.
- Iwasaki Y. Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*. 2017;37(2):174-188.
- Hansen LA, Masliah E, Terry RD, Mirra SS. A neuropathological subset of Alzheimer's disease with concomitant Lewy body disease and spongiform change. *Acta Neuropathol*. 1989;78(2):194-201.
- Fujino Y, Dickson DW. Limbic lobe microvacuolation is minimal in Alzheimer's disease in the absence of concurrent Lewy body disease. *Int J Clin Exp Pathol*. 2008;1(4):369-375.
- Parchi P, De Boni L, Saverioni D, et al. Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathol*. 2012;124(4):517-529.
- Chornenka K, Hirsch-Reinshagen V, Perez-Rosendahl M, et al. Expanding the phenotype of frontotemporal lobar degeneration with FUS-positive pathology (FTLD-FUS). *J Neuropathol Exp Neurol*. 2020;79(7):809-812.
- Nicolas G, Veltman JA. The role of de novo mutations in adult-onset neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol*. 2019;137(2):183-207.
- Cali I, Puoti G, Smucny J, et al. Co-existence of PrPD types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease of the VV subgroup: phenotypic and prion protein characteristics. *Sci Rep*. 2020;10:1503.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Kortazar-Zubizarreta I, Ruiz-Onandi R, Pereda A, et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with extremely long 14-year survival period. *Eur J Neurol*. 2021;00:1-6. <https://doi.org/10.1111/ene.14946>



b+oaraba



EpiGenLab



NanoBioCel