

**MÁSTER CONDICIONANTES GENÉTICOS, NUTRICIONALES Y AMBIENTALES**  
**DEL CRECIMIENTO Y DESARROLLO**  
 CURSO ACADÉMICO 2016-2017



**DELECIÓN 16p11.2 Y FENOTIPO CORNELIA DE LANGE:  
 ESTUDIO DE UN CASO ÚNICO CON SINDROME DE  
 KLINEFELTER**

**16p11.2 DELETION SYNDROME AND CORNELIA DE LANGE PHENOTYPE:  
 STUDY OF AN UNIQUE CASE WITH KLINEFELTER SYNDROME**

<b>APELLIDOS:</b> LANUZA ARCOS	<b>DNI:</b> 76974173G
<b>NOMBRE:</b> REBECA	<b>FIRMA</b>

**TUTORES:**

- Feliciano Ramos Fuentes (Dpto. Pediatría, Radiología y Medicina física)
- Juan Pié Juste (Dpto. Farmacología y Fisiología)

**CENTRO DE REALIZACIÓN:** Servicio de Pediatría, Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" y Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza

## RESUMEN:

El Síndrome Cornelia de Lange (SCdL) es una alteración congénita del desarrollo de afectación multisistémica. Se han identificado hasta 5 genes causales de este síndrome (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *HDAC8* y *RAD21*). Todos ellos forman parte de la regulación o estructura de un anillo de cohesinas. Sin embargo sigue habiendo un 30% de pacientes sin diagnóstico genético concluyente.

La deleción del cromosoma 16p11.2 se encuentra entre las causas genéticas que pueden producir un trastorno del espectro autista (TEA) y otras alteraciones del neurodesarrollo. Los pacientes tiene además rasgos dismórficos variables, sin que hasta la fecha se haya definido el fenotipo característico de esta deleción.

Se presenta el caso clínico de un varón con síndrome de Klinefelter (SK) que es enviado a nuestra Consulta de Genética Clínica a los 20 meses de edad por presentar retraso psicomotor y un fenotipo sugerente de SCdL. El SK se identificó a los 21 meses de vida tras realizarse un cariotipo por presentar rasgos dismórficos. El estudio de los genes causantes de SCdL fue negativo. Durante el seguimiento del paciente su fenotipo seguía sugiriendo un SCdL leve, aunque algunos datos clínicos evolutivos no se correspondían con dicho diagnóstico.

Ante la sospecha de que se tratara de otro problema genético, se realizó un CGH-Array que identificó una deleción en la región cromosómica 16p11.2. En este trabajo hemos intentado establecer una posible correlación genotipo-fenotipo, especialmente con la deleción 16p11.2 y el fenotipo SCdL intentado ampliar lo que hoy día se conoce como “Espectro Cornelia de Lange” (ECdL). La existencia de un síndrome de Klinefelter (SK) no fue relevante en esta comparación dada la ausencia de manifestaciones físicas características del SK a edades tempranas.

El estudio exhaustivo de casos complejos como el presentado en este trabajo permite un mejor conocimiento de la correlación genotipo-fenotipo facilitando al clínico el diagnóstico precoz del paciente y un adecuado asesoramiento genético a la familia.

**Palabras clave:** *Deleción 16p11.2. Síndrome/Espectro Cornelia de Lange, Síndrome de Klinefelter. Correlación genotipo-fenotipo.*

## **ABSTRACT:**

Cornelia de Lange syndrome (SCdL) is a congenital alteration in the development of multisystemic involvement. Up to five causal genes of this syndrome have been identified (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *HDAC8* and *RAD21*). They all form part of the regulation or structure of the cohesin ring. However, 30% of patients remain without a conclusive genetic diagnosis.

The deletion of chromosome 16p11.2 is among the genetic causes that can produce an autistic spectrum disorder (ASD) and other neurodevelopmental disorders. Patients also have variable dysmorphic features, but to date the phenotype characteristic of this deletion has not been defined.

We report the clinical case of a male with Klinefelter syndrome (KS) who is sent to our Clinical Genetic Clinic at 20 months of age for psychomotor retardation and a suggestive SCdL phenotype. The KS was identified at 21 months of life after a karyotype for presenting dysmorphic features. The study of genes responsible for SCdL was negative. During follow-up the patient's phenotype still suggested mild SCdL, although some evolutionary clinical data did not correspond to this diagnosis.

Given the suspicion that it was another genetic problem, we performed a CGH-Array that identified a deletion in the chromosomal region 16p11.2. In this work we have attempted to establish a possible genotype-phenotype correlation, especially with the 16p11.2 deletion and the SCdL phenotype attempted to extend what is now known as "Cornelia de Lange Spectrum" (CdLSp). The existence of a Klinefelter syndrome (KS) was not relevant in this comparison given the absence of characteristic physical manifestations of KS at early age.

The in-depth study of complex cases as the one presented here will allow a better understanding of the genotype-phenotype correlation facilitating the clinician an early diagnosis and adequate genetic counseling to the family.

**Keywords:** *Deletion 16p11.2. Cornelia de Lange syndrome/spectrum. Klinefelter syndrome. Genotype-phenotype correlations.*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Síndrome Cornelia de Lange</b>	<b>1</b>
1.1.1. Características clínicas	1
1.1.1.1 Fenotipo craneofacial	2
1.1.1.2 Aparato locomotor	2
1.1.1.3 Desarrollo pondero-estatural y puberal	3
1.1.1.4 Discapacidad intelectual y alteraciones del comportamiento	3
1.1.1.5 Sistema nervioso	4
1.1.1.6 Aparato digestivo	4
1.1.1.7 Aparato cardiovascular	5
1.1.1.8 Aparato genitourinario	5
1.1.1.9 Manifestaciones cutáneas	5
1.1.1.10 Alteraciones en órganos de los sentidos	5
1.1.2 Bases genéticas	5
1.1.2.1 Complejo de cohesinas	5
1.1.2.2 Complejo remodelador de la cromatina	7
1.1.2.3 Genes afectados	8
1.1.2.4 Correlación genotipo-fenotipo en SCdL	9
<b>1.2 Síndrome de microdelección 16p11.2</b>	<b>10</b>
1.2.1 Características clínicas	10
1.2.2 Bases genéticas	13
<b>1.3 Síndrome de Klinefelter</b>	<b>15</b>
1.3.1 Características clínicas	15
1.3.2 Bases genéticas	16
<b>1.4 Relación del Síndrome Cornelia de Lange y las cromosopatías</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>19</b>
<b>3.1 Datos clínicos:</b>	<b>19</b>
3.1.1 Historia Clínica	19
3.1.1.1 Síndrome Cornelia de Lange. Deep phenotyping (HPO)	19
3.1.1.1.1 Criterios de Kline	20
3.1.1.1.2 Criterios de Gillis	21
3.1.1.2 Síndrome microdelección 16p11.2	22
<b>3.2 De laboratorio</b>	<b>24</b>
3.2.1 Secuenciación Sanger	24
3.2.1.1 Obtención de ADN en leucocitos	24
3.2.1.2 Amplificación de exones por PCR para secuenciación Sanger.	25
3.2.1.3 Gel de agarosa	26
3.2.1.4 Purificación del producto:	27
3.2.1.5. Secuenciación tipo Sanger:	27
3.2.2 MLPA	28
3.2.3 Secuenciación masiva	32
3.2.4 Cariotipo	32
3.2.5 CGH array	33
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Historia clínica recogida</b>	<b>35</b>
4.1.1 Datos clínicos y clasificación según protocolo “deep phenotyping”	35
4.1.2 Criterios diagnósticos de Kline	39

4.1.3 Escala de valoración de Gillis.	42
4.1.4 Valoración clínica Sd. Deleción 16p11.2.	42
<b>4.2. Resultados de laboratorio.</b>	<b>44</b>
4.2.1. Secuenciación Sanger	44
4.2.1.1. Estudio del gen NIPBL:	44
4.2.1.2. Estudio del gen SMC1A:	45
4.2.1.3. Estudio del gen SMC3:	45
4.2.1.4. Estudio del gen RAD21:	46
4.2.1.5. Estudio del gen HDAC8:	47
4.2.2. MLPA	47
4.2.3. Panel de Secuenciación masiva	50
4.2.4 Cariotipo	50
4.2.5. CGH array	51
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>54</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Síndrome Cornelia de Lange

El síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) (MIM # 122470 y 300590) es un trastorno congénito multisistémico, genéticamente heterogéneo, con una incidencia que oscila entre 1:10.000 y 1:30.000 nacidos vivos.<sup>(20)</sup>

Aunque el síndrome fue descrito inicialmente por Brachmann en 1916, no fue hasta el año 1933 cuando la doctora Cornelia de Lange documentó dos casos que sirvieron de referencia para el reconocimiento del síndrome. Se conoce también como síndrome Brachmann-de Lange.<sup>(21)</sup>

Las características clínicas comunes incluyen, rasgos dismórficos faciales característicos, retraso de crecimiento prenatal y postnatal, hirsutismo, malformaciones en extremidades, retraso del desarrollo psicomotor/discapacidad intelectual, así como afectación de otros órganos y sistemas.<sup>(21, 16)</sup>

La herencia es autosómica dominante para variantes patogénicas en los genes *NIPBL*, *SMC3* y *RAD21*, o ligada a X para variantes patogénicas en genes *SMC1A* y *HDAC8*. Todos ellos forman parte de la estructura (*SMC1A*, *SMC3* y *RAD21*) o de elementos reguladores (*NIPBL* y *HDAC8*) del complejo de cohesinas, implicado, entre otras funciones, en la regulación de la expresión génica. Es por ello que el SCdL se considera una cohesinopatía.

De todos los genes implicados, el *NIPBL* es el que alberga el mayor número de variantes patogénicas en los pacientes con fenotipo clínico típico de SCdL, representando aproximadamente el 70% del total de los casos.<sup>(2)</sup>

Aunque la mayoría de los casos con este síndrome son esporádicos, se han descrito casos familiares y en gemelos,<sup>(15)</sup> casos con consanguinidad entre los progenitores,<sup>(25)</sup> y pacientes con anomalías cromosómicas.<sup>(11,13)</sup>

A pesar de los grandes avances realizados hasta la fecha en el conocimiento clínico y genómico del síndrome, siguen existiendo pacientes que suponen un reto diagnóstico y abren nuevas rutas para la investigación.

#### **1.1.1. Características clínicas**

Los pacientes con SCdL presentan un fenotipo característico en el que destaca una facies peculiar, malformaciones en las extremidades y retraso del crecimiento pre y postnatal y con retraso psicomotor/discapacidad intelectual.<sup>(21)</sup> Además, pueden

presentar otras malformaciones congénitas que afectan a distintos órganos o sistemas.

A pesar de la existencia de rasgos clínicos característicos, es importante destacar la gran variabilidad existente en la expresión clínica del síndrome, por lo que el espectro fenotípico de presentación es muy amplio.<sup>(20)</sup>

En 2007 Kline modificó un sistema de diagnóstico basado en el cumplimiento de criterios clínicos mínimos, agrupados en categorías, lo que permitía ser más riguroso con el diagnóstico clínico.<sup>(16)</sup>

A continuación se desarrollan dichos criterios a partir de las categorías establecidas por el mismo.

#### 1.1.1.1 Fenotipo craneofacial

Es sin duda, la afectación más característica del SCdL. Los pacientes suelen presentar microcefalia, con PC <P3. Suelen ser necesarias gráficas específicas para la valoración de datos antropométricos como este. Esto se acompaña de una facies característica donde destaca la presencia de sinofridia (cejas juntas, finas y arqueadas). Pueden presentar también pestañas largas y finas, nariz pequeña y corta con puente nasal ancho y deprimido y narinas antevertidas. A nivel de la boca, destaca la presencia de philtrum largo y prominente, así como labio superior fino con comisuras bucales orientadas hacia abajo, paladar elevado, diastema dentario y micrognatia. Los pabellones auriculares suelen tener baja implantación y rotados hacia atrás.

#### 1.1.1.2 Aparato locomotor

Las malformaciones en las extremidades son frecuentes y características del SCdL, lo que puede ayudar a su diagnóstico en algunos casos. Si bien es importante tener en cuenta que no siempre están presentes, y que cuando aparecen, el espectro de presentación también puede ser muy amplio.

La mayoría de los pacientes presentan manos y pies de pequeño tamaño, por debajo del P3. Pueden presentar además sindactilia, braquiclinodactilia del 5º dedo, alteraciones en el pliegue palmar, así como primer metacarpiano acortado.

Con una incidencia menor, aproximadamente en un tercio de los pacientes, pueden presentar graves malformaciones en las extremidades superiores, pudiendo incluir desde oligodactilia, hipoplasia de cúbito hasta ausencia completa de antebrazo, con implantación de los dedos a nivel de la articulación del codo.

Las extremidades inferiores se ven afectadas con menor frecuencia, apareciendo como alteración más común una sindactilia parcial del segundo y tercer dedo. Sin embargo, existen publicaciones en la literatura, donde se describen casos de afectación más importante, como se observa en el artículo publicado en 2014 por Baquero Montoya et al., En dicho artículo se reporta el caso de un paciente que presenta anomalías musculoesqueléticas ipsilaterales, destacando una importante afectación de extremidad inferior derecha caracterizada por la presencia de hipoplasia de peroné y agenesia tibial, acompañada de oligodactilia de tercer y cuarto dedo ipsilateral. <sup>(2)</sup>

#### 1.1.1.3 Desarrollo pondero-estatural y puberal

Es común en los pacientes con SCdL la presencia de retraso de crecimiento intrauterino y postnatal. Los recién nacidos con SCdL suelen tener peso, talla y perímetro cefálico por debajo del P3. Como ya se ha dicho previamente, incluso se han desarrollado curvas de crecimiento específicas para este síndrome, gráficos que se adjuntan en el apartado Anexos. Es importante destacar también, los problemas para la alimentación que suelen aparecer durante los primeros meses de vida, hecho que contribuye a la persistencia del problema de desarrollo pondero-estatural.

En lo referido a la pubertad femenina, la menarquia tiene lugar en el 76% de las mujeres, pero hasta en el 30% de los casos se describe irregularidad en los ciclos.

Los cambios emocionales comunes para el síndrome, se ven agravados en esta etapa para ambos sexos. A menudo se describe un aumento de los problemas de comportamiento, particularmente la auto-lesión, durante la adolescencia. Además, puede haber desarrollo de comportamientos obsesivo-compulsivos, ansiedad y agresión

En lo referido a la fertilidad, se describe una disminución de la misma en los individuos con afectación más graves.

#### 1.1.1.4 Discapacidad intelectual y alteraciones del comportamiento

El retraso psicomotor y mental suele ser también un hallazgo habitual en pacientes con SCdL. El rango de afectación, de forma similar a lo que ocurre en el resto de categorías es muy amplio, y puede ir desde un cociente intelectual (CI) normal o límite con problemas en el aprendizaje, hasta una discapacidad intelectual profunda. El habla y el lenguaje son probablemente las áreas de desarrollo más afectadas, pero todas las áreas pueden estar involucradas. La adquisición de nuevas habilidades continúa durante toda la vida sin existir regresión. La atención temprana en estos



pacientes es fundamental para conseguir sus máximas, aunque limitadas, capacidades.

En la mayoría de los individuos se presentan problemas conductuales específicos que pueden incluir hiperactividad, trastorno de déficit de atención con o sin hiperactividad (ADHD), agresividad, auto-agresividad, extrema timidez, comportamientos obsesivo-compulsivos y depresión. Los problemas de conducta pueden verse exacerbados por complicaciones. Pueden aparecer rasgos del espectro autista, correlacionadas con el grado de deterioro mental. Las habilidades sociales y la capacidad de interactuar con los demás se logran de manera variable, pero en general, las interacciones suelen ser mejores con personas y situaciones familiares.

#### 1.1.1.5 Sistema nervioso

La afectación neurológica incluye principalmente la epilepsia, presente en el 23% de los casos, y sin patrón específico en el EEG. La neuropatía periférica puede ocurrir en una minoría de pacientes, y podría explicar una alta tolerancia al dolor. A nivel del tono muscular, existe tendencia inicial a la hipertonía, pero también puede haber hipotonía, especialmente en etapas posteriores de la vida. Los reflejos osteotendinosos suelen ser normales, aunque muchos pacientes presentan cierta hiperreflexia.

Las pruebas de imagen cerebrales pueden revelar la existencia de ventriculomegalia, incluyendo un aumento de tamaño de las cisternas basales, adelgazamiento o atrofia de la sustancia blanca, especialmente lóbulos frontales, hipoplasia del tronco cerebral e hipoplasia o agenesis cerebelosa.

#### 1.1.1.6 Aparato digestivo

Casi el 100% de los pacientes con SCdL presentan reflujo gastroesofágico (RGE), siendo la manifestación clínica más importante y la más frecuente del aparato digestivo. A menudo requiere intervención quirúrgica para su resolución, que no siempre es definitiva. El desarrollo de esófago de Barrett, la hernia diafragmática y la estenosis esofágica son otras de las complicaciones o manifestaciones posibles. Las complicaciones de los problemas gastrointestinales son una de las causas más frecuentes de mortalidad en este síndrome, generalmente debida a síndrome de aspiración. También se han descrito casos de estenosis pilórica, malrotación intestinal y mayor riesgo vólculo.

#### 1.1.1.7 Aparato cardiovascular

El 25% de los pacientes presentan cardiopatía congénita. El riesgo de cardiopatía aumenta cuando la mutación se encuentra a nivel del gen *SMC3*. Las alteraciones más frecuentes son la estenosis de la válvula pulmonar y la comunicación interventricular (CIV). Con menor incidencia se describen casos de defectos de canal auriculo-ventricular, tetralogía de Fallot o coartación de aorta.

#### 1.1.1.8 Aparato genitourinario

Las malformaciones del aparato genitourinario aparecen en el 40% de los pacientes. Pueden presentar anomalías estructurales del tracto urinario, reflujo vesico-ureteral, dilatación de cálices renales o riñón displásico. En un porcentaje elevado, los pacientes presentan anomalías genitales. Los genitales hipoplásicos están presentes en el 57% de los casos. En los varones es frecuente la presencia de criptorquidia (hallada en el 73% de los varones), se observan también casos de hipospadias y micropene. En el caso de los genitales femeninos, puede haber alteraciones tales como pequeños labios mayores, y, raramente, útero malformado.

#### 1.1.1.9 Manifestaciones cutáneas

El hirsutismo es una manifestación frecuente, pudiendo aparecer hasta en el 78% de los pacientes. Su predominio se localiza en área facial, espalda y extremidades. Hasta un 60% de los pacientes pueden presentar además cutis marmorata.

#### 1.1.1.10 Alteraciones en órganos de los sentidos

En lo referido a alteraciones auditivas, destaca la posibilidad de presentar estenosis de conducto auditivo externo, favoreciendo la aparición de episodios frecuentes de otitis media y sinusitis. Hasta en un 60% de los pacientes, aparece pérdida de audición, neurosensorial o de transmisión, lo que requiere revisiones audiológicas frecuentes.

A nivel oftalmológico pueden aparecer alteraciones como ptosis y blefaritis, así como defectos en la refracción, siendo más frecuente el diagnóstico de miopía. Con menor frecuencia puede aparecer obstrucción de conducto lagrimal, microcórnea o nistagmo.

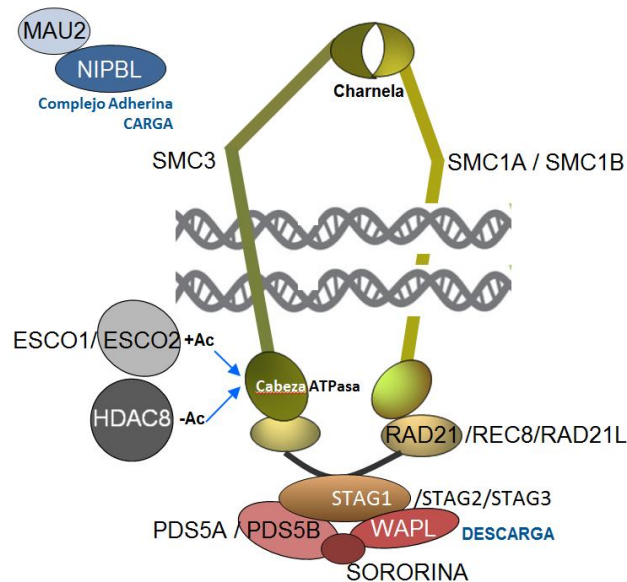
### **1.1.2 Bases genéticas**

#### 1.1.2.1 Complejo de cohesinas

El complejo de cohesinas es un complejo proteico multifuncional en forma de anillo. Está formado por dos proteínas estructurales, *SMC3* y *SMC1A*. Ambas proteínas interactúan entre sí a nivel de un dominio denominado bisagra. En fase de meiosis, la

proteína estructural SMC1A cambia por SMC1B. Además, cuenta con dos proteínas de cierre de menor tamaño, RAD21 (Kleisina) o alternativamente REC8 o RAD21L (Figura 1.1), y STAG1 (o STAG2 o STAG326), cerrando la estructura del anillo y atrapando en su interior el ADN. <sup>(3)</sup>

Además de las proteínas estructurales, el complejo está constituido por proteínas reguladoras del mismo. No se conoce con exactitud el número de las mismas, aunque se cree que puede ser muy superior al número de proteínas estructurales. (Figura 1.1). Destacan entre ellas NIPBL y HDAC 8. NIPBL se encarga de regular la carga del ADN al anillo, <sup>(3)</sup> mientras que HDAC8 (histona deacetilasa) juega un papel imprescindible en la apertura del anillo, mediante la deacetilación de SMC3 y en el reciclaje de sus unidades constitutivas. <sup>(20)</sup>



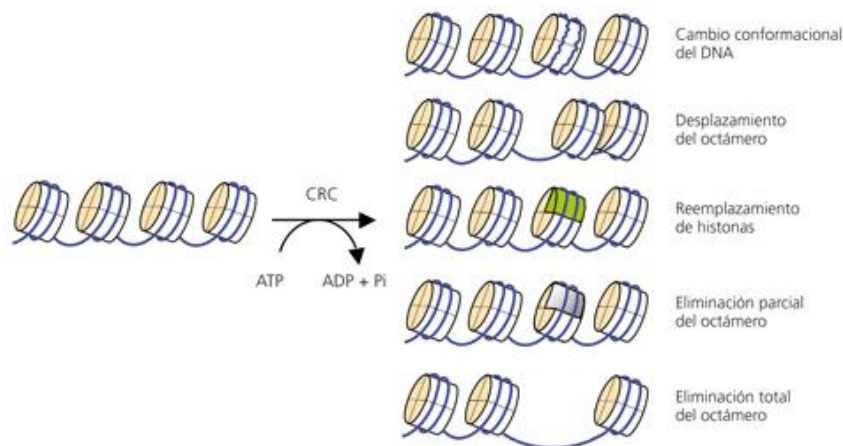
**FIGURA 1.1.** Proteínas estructurales y reguladoras del anillo de cohesinas

La primera función que fue atribuida a las cohesinas, y por la cual llevan su nombre, es la de mantener las cromátidas hermanas unidas durante el ciclo celular hasta su correcta segregación en la anafase. Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes con diagnóstico de SCdL, no presentan alteraciones a este nivel. También se han descrito otras funciones del anillo, como su intervención en la replicación y reparación del ADN y más recientemente la regulación de la expresión génica. Es la alteración en ésta última, la que en los últimos años, se ha relacionado con más fuerza a la patología del SCdL. <sup>(20)</sup>

### 1.1.2.2 Complejo remodelador de la cromatina

El complejo remodelador de la cromatina (RSC) de un complejo multiproteico, codificado a partir del complejo SWI/SNF, capaz de alterar la estructura de los nucleosomas a través de un proceso catalítico utilizando la energía liberada en la hidrólisis del ATP. <sup>(27)</sup>

Además de esta función el complejo remodelador posee también actividad ATPasa estimulada por el *ADN*, pudiendo desestabilizar las interacciones *histona-ADN*, dependiendo para ello también del ATP.



**FIGURA 1.2** Actividades llevadas a cabo por complejos remodeladores de cromatina.

Dado el importante papel que juegan los RSC dependientes de ATP en la regulación transcripcional, así como en estabilidad genómica, las variantes patogénicas a este nivel generan una gran cantidad de anomalías congénitas. Dentro de ellas se encuentran síndromes como los denominados ATR-X, Cockayne, Nicolaides-Baraitser, Coffin-Siris y CHARGE, entre otros.<sup>(5)</sup> Estas alteraciones son debidas a variantes patogénicas en ATPasas de la familia SNF2 o en otras subunidades de CRC. Todas las anomalías citadas, aunque presentan manifestaciones diferenciales entre ellas, se caracterizan por mostrar defectos neurológicos, lo que pone de manifiesto el importante papel que tienen los CRC en el desarrollo del sistema nervioso y la diferenciación neuronal.

También se ha descrito la actividad conjunta que desempeña el RSC junto con la adherina. La adherina, es un complejo protéico formado por la unión de NIPBL y MAU2, cuya función sería mantener libre de nucleosomas la hebra de *ADN*. La presencia de los mismos, impide la unión del anillo de cohesinas y por tanto el desarrollo de su función. Esto hace que variantes patogénicas o déficits en RSC producirían también alteraciones en la cohesión y expresión génica, lo que justificaría

la similitud clínica que encontramos entre el SCdL y otras alteraciones producidas por variantes patogénicas en *RSC* como el síndrome de Coffin-Siris.<sup>(19)</sup>

### 1.1.2.3 Genes afectados

Se conocen hasta la fecha 5 genes implicados en la patogenia del síndrome: *NIPBL* (5p13.2), *SMC1A* (Xp11.22-p11.21), *SMC3* (10q25.2), *RAD21* (8q24.11) y *HDAC8* (Xq13.1) Todos ellos, reguladores o componentes estructurales del complejo de cohesinas.<sup>(20,26)</sup>

*NIPBL* fue el primer gen causal del síndrome en describirse. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 5 y codifica para una gran proteína de 2804 aminoácidos. Se trata del gen más importante de SCdL, habiéndose hallado mutación en el mismo hasta en el 70-80% de los pacientes con el síndrome, incluyendo el 23% de los casos con mosaicismo.<sup>(26)</sup> Hasta el momento actual, se han comunicado más de 300 variantes patogénicas en dicho gen, aunque el exón 10 parece constituirse como punto caliente para la presencia de las mismas. Del total de las variantes patogénicas descritas, un 32% provocan cambio del marco de lectura (*frameshift*), un 26% cambio de una base (*missense*), un 18% generan un codón de stop (*nonsense*), un 17% afectan al splicing y un 7% son pequeñas deleciones o inserciones que no alteran el marco de lectura (*in frame deletion or insertion*).<sup>(26)</sup>

Con una incidencia considerablemente inferior (4-6%), se encuentra mutación en el gen *SMC1A*, situado a nivel del cromosoma X. Hasta el momento se han descrito 34 variantes patogénicas, de las cuales un 82% son de tipo *missense* y un 18% de tipo *in frame deletions*.<sup>(26)</sup>

A nivel de *SMC3*, localizado en el brazo largo del cromosoma 10, las variantes patogénicas halladas representa < 1% del total de los casos.<sup>(13,26)</sup> También son pocos los casos reportados que presentan mutación en *RAD21* (8 casos descritos), con variantes patogénicas tipo pequeñas deleciones y variantes patogénicas *missense* y *frameshift*.<sup>(26)</sup>

En un 4% de los pacientes se han encontrado variantes patogénicas en el gen *HDAC8*, localizado en el brazo largo del cromosoma X, siendo las más frecuentes las tipo *missense*, aunque también se han descrito variantes patogénicas de tipo *nonsense*, *splice site* y microdeleciones-microduplicaciones.<sup>(26)</sup>

A pesar de todos los avances realizados hasta la fecha en la identificación de nuevas variantes patogénicas, todavía hoy encontramos que en el 30% de los pacientes con fenotipo SCdL, no se identifican variantes patológicas en ninguno de los genes causales conocidos.

#### 1.1.2.4 Correlación genotipo-fenotipo en SCdL

El síndrome de Cornelia de Lange impresiona por su gran heterogeneidad, tanto a nivel genético, como también clínico.

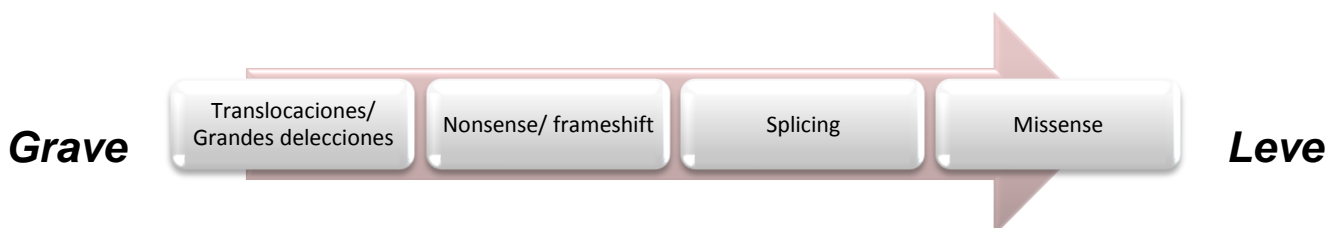
Como ya hemos expuesto previamente, son 5 los genes hasta el momento relacionados con el síndrome, y esta variabilidad puede relacionarse con las distintas formas de manifestación del mismo. Además, dentro de un mismo gen, las variantes patogénicas posibles son muy variadas, lo que también se relaciona con dicha heterogeneidad.

Si nos basamos en la relación genotipo-fenotipo, podemos establecer una escala de gravedad clínica, atendiendo al gen en el que se localiza la mutación. Así pues, ordenados de mayor a menor gravedad, nos encontramos que variantes patogénicas en el gen *NIPBL*, se correlacionan con formas de presentación más graves, mientras que variantes patogénicas en *SMC1A* y *SMC3*, se manifiestan de forma más leve. (Figura 1.3).<sup>(20)</sup>



**FIGURA 1.3.** Escala de gravedad clínica según el gen afectado. Figura adaptada del trabajo de Mannini et al.<sup>(20)</sup>

De la misma manera, y atendiendo a los distintos tipos de variantes patogénicas causales del síndrome dentro del mismo gen, podemos volver a establecer relación entre tipo de mutación y gravedad clínicas. Es necesario para ello, centrarnos en el gen que más frecuentemente se ve afectado en el síndrome, es decir *NIPBL*. En él se han descrito fenotipos más leves cuando el tipo de mutación producida es de tipo *missense*, mientras que translocaciones y grandes deleciones junto a variantes patogénicas *nonsense* y *frameshift* dan lugar a clínica grave. (Figura 1.4)



**FIGURA 1.4** Escala de gravedad clínica según tipo de mutación en *NIPBL*. Figura adaptada del trabajo de Mannini et al.<sup>(20)</sup>

Si la variabilidad clínica dentro del propio síndrome de Cornelia de Lange es amplia, cabe destacar además, la existencia de otros síndromes también de afectación multisistémica y heterogeneidad genética, que se asemejan en muchas de las manifestaciones que nos encontramos en SCdL.

Casi todos ellos presentan variantes patogénicas que afectan, de la misma forma que ocurre en el SCdL, al complejo de cohesinas. En otros casos, las variantes patogénicas originarias del síndrome, están implicadas en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo, de la misma manera que ocurre en el SCdL. Por lo tanto, algunos de ellos se engloban dentro de las denominadas como Cohesinopatías mientras que otras formarán parte del llamado “Espectro Cornelia de Lange” (ECdL).<sup>(6)</sup>

De todos estos síndromes destacamos el síndrome de Roberts, por ser el primero en relacionarse con alteraciones en el complejo de cohesinas. Se caracteriza clínicamente por discapacidad intelectual moderada-grave, afectación estructural grave de extremidades, dismorfia facial y afectación de otros órganos y sistemas, si bien existen diferencias significativas que permiten el diagnóstico diferencial. En la Figura 1.5 quedan reflejadas las variantes patogénicas más frecuentes de ambos síndromes a nivel del anillo de cohesinas.<sup>(6)</sup>

El síndrome de Coffin-Siris es otro de los constituyentes del Espectro Cornelia de Lange. A nivel clínico, los pacientes con dicho diagnóstico presentan un fenotipo más tosco que los afectados de SCdL, sin embargo, las variantes patogénicas genéticas en 6 de los genes implicados en el mismo, juegan papeles similares a los que encontramos en el SCdL. Algo muy similar ocurre en el caso de el síndrome de Nicolaidis-Baraitser.<sup>(28)</sup>

## 1.2 Síndrome de microdelección 16p11.2

El síndrome de microdelección 16p11.2 (MIM # 611913), es una anomalía cromosómica consiste generalmente en una delección recurrente de una región pericentromérica del cromosoma 16 de aproximadamente 593 kb en los que se engloban un total de 27 genes.<sup>(29)</sup>

La relación entre genotipo y fenotipo clínico sigue siendo imprecisa. Este síndrome presenta una gran heterogeneidad clínica y una penetrancia incompleta. Sin embargo, existen ciertas manifestaciones clínicas características asociadas, en



especial autismo/trastorno del espectro autista, discapacidad intelectual (DI), así como otros trastornos del neurodesarrollo. Los pacientes afectados presentan además rasgos dismórficos diversos.<sup>(29)</sup>

Su prevalencia se estima en 1/5.000 individuos de la población general.<sup>(29)</sup>

En la actualidad, no se conoce la correlación del gen o genes implicados en las diferentes manifestaciones clínicas presentes en los pacientes. Se describen manifestaciones clínicas diferenciales en los pacientes que presentan delección frente a aquellos que presentan duplicación en la región de reordenamiento 16p11.2. Dichas manifestaciones diferenciales quedan recogidas, ordenadas por categorías, en la tabla 1.1.<sup>(30)</sup>

### **1.2.1 Características clínicas**

Las manifestaciones clínicas son muy variables, y como se ha dicho previamente, su penetrancia es también variable. De todas ellas, las que parecen tener una manifestación clínica más estable, son aquellas que se relacionan con el desarrollo neurológico y alteraciones en el comportamiento. La alteración en esta región del cromosoma 16, se ha relacionado con hasta el 3% del total de los casos de autismo, pero pese a ser una de las manifestaciones más frecuentemente encontradas en pacientes con esta alteración, recientemente se han descrito casos de pacientes que no cumplían criterios DMS V para autismo. Además suelen asociar también trastorno por déficit de atención aislado, trastorno de hiperactividad aislado o combinación de ambos.<sup>(22)</sup>

Pese a que las manifestaciones del desarrollo neurológico y del comportamiento, son las más estables de dicho síndrome, no debemos olvidar la presencia de dismorfismo facial en los pacientes que presentan delección o duplicación de esta región del cromosoma 16. Además pueden presentar otras alteraciones, aunque ninguna de ellas distintivas del síndrome, tal y como se recogen en la tabla 1.1.

		Delección 16p11.2	Duplicación 16p11.2
<b>Datos perinatólogicos</b>	<b>Edad gestacional</b>	A término	A término
	<b>Tipo de parto</b>	Eutócico	Eutócico
	<b>Adaptación CR</b>	Inestabilidad al nacimiento	Inestabilidad al nacimiento



	<b>Comorbilidad postnatal</b>	Ictericia	Ictericia
		Policitemia	Policitemia
		Hipoglucemia	Hipoglucemia
		Hipotermia	Hipotermia
<b>Craneofaciales</b>	<b>Frente ancha</b>	+/-	+(menos marcado)
	<b>Micrognatia</b>	+/-	+(menos marcado)
	<b>Aplanamiento de región ½ de la cara</b>	+/-	+(menos marcado)
	<b>Hipertelorismo</b>	+/-	+(menos marcado)
	<b>Paladar hendido</b>	+/-	+
<b>Crecimiento</b>	<b>PC</b>	Aumentado	Disminuido
	<b>Peso</b>	Obesidad	Bajo peso
	<b>Talla</b>		
<b>Desarrollo</b>	<b>Retraso motor</b>	50% y leve	Presente
	<b>Retraso cognitivo (lenguaje)</b>	Presente	Más severo
<b>Comportamiento</b>	<b>Autismo</b>	+/-	+/-
	<b>TDAH</b>	+/-	+/-, aunque más F que en delección
<b>Extremidades</b>	<b>Pectus excavatum</b>	-	+/-
	<b>Pectus carinatum</b>	-	+/-
	<b>Pies planos</b>	-	+/-
	<b>Polidactilia</b>	+/-	-
	<b>Fusión de costillas</b>	+/-	-
	<b>Escoliosis</b>	-	+/-
<b>Neurosensorial</b>	<b>Convulsiones</b>	+/-	+/-
	<b>Miopía</b>	+/-	+/-
	<b>Alteración cuerdas vocales</b>	+	-
<b>Otros sistemas</b>	<b>Hernia diafragmática</b>	+/-	-
	<b>RGE</b>	+/-	+/-
	<b>Defectos cardiacos</b>	+/-	-

	<b>congénitos</b>		
	<b>Hipospadias</b>	-	+/-
	<b>Fimosis</b>	-	+/-
	<b>Riñón displásico</b>	+/-	-
	<b>Estenosis pilórica</b>	+/-	-

**TABLA 1.1.** Características clínicas Sd de reordenamiento 16p11.2, según se trate de delección o duplicación de la región 11.2. Tabla de elaboración propia.<sup>(30)</sup>

A continuación, se exponen distintos casos publicados en la literatura como síndrome de microdelección 16p11.2, que permite el conocimiento del dismorfismo facial que pueden presentar los mismos.



**FIGURA 1.5** Fenotipo de pacientes con delección 16p11.2. Figura adaptada.<sup>(30)</sup>

### 1.2.2 Bases genéticas

El diagnóstico está basado en la realización de técnicas moleculares que pueden usarse para la caracterización genética de la microdelección 16p11.2 proximal. Aquí se incluyen: hibridación fluorescente in situ (FISH), MLPA, hibridación genómica comparada basada en microarrays (aCGH) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). En nuestro caso, el diagnóstico se llevó a cabo mediante aCGH.

La región pericentromérica del cromosoma 16p es rica en duplicaciones segmentarias que predisponen a reordenamientos mediante la recombinación homóloga no alélica. Distintas variaciones recurrentes del número de copias se han

descrito recientemente en el cromosoma 16p. Esto daría lugar al síndrome de reordenamiento 16p11.2, con delección o duplicación de dicha región cromosómica.

Como ya hemos señalado previamente, el intervalo 16p11.2 contiene 27 genes, y, aunque se desconoce qué genes están relacionados con las alteraciones clínicas, sí se señalan algunos de ellos como candidatos prometedores para los diferentes fenotipos en pacientes con estos síndromes.<sup>(30)</sup>

1. MAPK3 (MIM 601795) es un componente sináptico de señalización necesario para el aprendizaje. Relacionado con memoria a largo plazo.<sup>(30)</sup>

2. TBX6 (MIM 602427) este gen codifica un regulador transcripcional involucrado en procesos de desarrollo y puede jugar un papel causal en las anomalías que se observan en estos pacientes.<sup>(30)</sup>

3. SEZ6L2 es un gen relacionado con convulsiones, en relación con un aumento en su expresividad a nivel de SNC. Recientemente se ha descrito también una variación en una secuencia a nivel del mismo que puede representar un nuevo factor de riesgo genético para autismo.<sup>(30)</sup>

4. QPRT (MIM 606248) codifica para quinolinato fosforribosiltransferasa, una enzima clave en el catabolismo de una exitotoxina endógena potente (quinolinato) presente a nivel neuronal. La elevación de los niveles de quinolinato en el cerebro debido a la disminución de la actividad de esta enzima ha sido relacionada con la patogénesis de la epilepsia en los seres humanos.<sup>(30)</sup>

5. DOC2A (MIM 604567) codifica una proteína expresada de forma predominantemente en el cerebro. Posiblemente está implicada en la liberación de neurotransmisores y en el transporte de vesículas intracelulares dependientes de la dineína. La proteína serina / treonina fosfatasa 4, codificada por el gen PPP4C (602035), interactúa con el complejo de neuronas motoras a nivel de su supervivencia y está regulado por la histona desacetilasa 3.<sup>(30)</sup>

6. MAZ (MIM 600999), expresado en cerebro embrionario humano y en cerebro de ratón, codifica el factor de transcripción MYC, asociado a la proteína dedo de zinc que aumenta el receptor de NMDA, subunidad tipo 1 (MIM 138249) durante la diferenciación neuronal. Además, la sobreexpresión de MAZ puede inhibir la proliferación del ciclo celular en células de sinoviocitos de conejo.<sup>(30)</sup>

### 1.3 Síndrome de Klinefelter

El síndrome de Klinefelter (SK) es una forma de hipogonadismo masculino, producida por una anomalía en los cromosomas sexuales. Su incidencia se estima en 1 de cada 1000 recién nacidos vivos.

#### 1.3.1 Características clínicas

Fenotípicamente, se caracterizan por ser individuos altos y delgados, con segmento inferior relativamente superior al segmento superior. Generalmente, no se encuentran alteraciones a nivel físico hasta la pubertad, momento en el que empiezan a aparecer los signos característicos de hipogonadismo, con tendencia a la obesidad. En las variantes de SK que tienen más de dos cromosomas X, la presencia de fenotipo anómalo es más frecuente, además de asociar un desarrollo sexual más deficiente y déficit intelectual más grave.

A nivel del sistema musculoesquelético, la masa muscular se encuentra poco desarrollada. Pueden presentar una displasia leve a nivel de la articulación del codo, y clinodactilia del 5º dedo de la mano. Puede haber presencia de escoliosis durante la adolescencia, con una incidencia superior a la de la población general. En aquellos pacientes que no reciben tratamiento con testosterona, la incidencia de osteoporosis se ve aumentada. Aunque lo característico del síndrome es la talla alta, se han descrito casos de talla baja en pacientes con cariotipo 48,XXXY.

La pubertad aparece a una edad normal, sin embargo, no se producirá un desarrollo testicular adecuado. Además tampoco se producirá un desarrollo adecuado de los caracteres secundarios. La distribución del tejido adiposo es de tipo ginecoide, con acúmulo de la misma a nivel de caderas y posibilidad de desarrollar ginecomastia. El exceso de gonadotropina que se produce de forma progresiva, genera hialinización y fibrosis de los túbulos seminíferos, que afecta a la producción de testosterona y azoospermia en la mayoría de casos. Esto va a generar una incidencia elevada de infertilidad.

El cociente intelectual de estos individuos es inferior al de la población general. Los problemas en el aprendizaje son frecuentes, siendo el predominante la dislexia.

A nivel de los trastornos de comportamiento, destaca la dificultad para relacionarse con los demás. Suelen presentar inmadurez, inseguridad y poca capacidad de juicio.

Se han descrito aumento de la incidencia de enfermedades autoinmunes así como neoplasias, destacando los tumores germinales extragonadales de localización mediastínica.

### **1.3.2 Bases genéticas**

En aproximadamente la mitad de los casos, las alteraciones en los cromosomas sexuales se deben a errores en la meiosis I paterna. El resto de los casos se producen por errores en la meiosis I ó II materna. Dichos errores en la división celular, suelen aparecer como fenómenos aislados, sin que existan factores predisponentes, a excepción de la edad materna avanzada que parece jugar un papel en los casos debidos a errores en la meiosis I materna.<sup>(7)</sup>

La forma clásica de KS se caracteriza por la presencia de un cariotipo 47, XXY y representa alrededor del 90% de los casos. El 10% restante de casos se compone de mosaicismos, siendo el más frecuente el representado por el cariotipo 46, XY / 47, XXY. Las aneuploidías como 48, XXXY y 48, XXYY, representan una forma poco común de este síndrome.<sup>(7)</sup>

### **1.4 Relación del Síndrome Cornelia de Lange y las cromosomopatías (sexuales).**

En apartados anteriores se han expuesto los genes implicados hasta el momento actual con el SCdL. Si algo hay como denominador común en todos ellos, es la acción global que desarrollan durante la división celular; participan en la segregación cromosómica, los mecanismos de reparación del ADN, la expresión génica y la conformación cromosómica.<sup>(18)</sup>

Ésta característica es la que hace posible la asociación en el diagnóstico de SCdL y cromosomopatías.

Se han publicado series de casos con afectación cromosómica, incluyendo afectación de los cromosomas 1-5, 7-14, 17, 18, 21 y cromosoma X. Hasta la fecha, tan sólo se han publicado cinco pacientes con CdLS y anomalías en cromosomas sexuales: un varón con mosaicismo 45, X / 46, XY <sup>(18)</sup> una mujer 45, X <sup>(4)</sup> y 3 mujeres con mosaicismo 45, X / 46, XX, <sup>(12,17)</sup> la última de ellas publicada en el año 2012, y con la participación del Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza.<sup>(31)</sup>

En este trabajo se reporta el caso de una paciente mujer, de 4 años de edad, con fenotipo característico de SCdL y afectación grave. Presentaba una mutación tipo *frameshift* en el NIPBL (C.1445\_1448delGAGA) así como cariotipo compatible con TS, con mosaicismo 45,X/46,XX. En el artículo se concluye afirmando que la coexistencia

en varios pacientes de estos dos trastornos raros (SCdL y cromosomopatía) plantea la cuestión de si existe una asociación causa-efecto entre ambas.<sup>(31)</sup>

Las descripciones clínicas detalladas hechas hasta el momento actual en estos casos, indican que el fenotipo CdLS es predominante frente a la cromosomopatía, aunque esto puede verse influenciado por la edad de la paciente, ya que manifestaciones adicionales de TS o KS podrían aparecer en la adolescencia.<sup>(31)</sup>

## 2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo ha sido el estudio clínico-molecular detallado de un paciente complejo con un fenotipo inicial sugerente de síndrome de Cornelia de Lange (SCdL) en el que se indentificó una deleción 16p11.2 y un síndrome de Klinefelter

Para ello, se han desarrollado los siguientes objetivos secundarios:

1. Describir detalladamente y cuantificar en lo posible las manifestaciones clínicas del paciente, incluyendo las de la deleción 16p11.2 y las del SCdL (criterios de Gillis y Kline).
2. Diagnosticar molecularmente al paciente mediante el uso de técnicas de secuenciación Sanger, secuenciación masiva (NGS), MLPA, cariotipo convencional y CGH-Array.
3. Establecer las correlaciones genotipo-fenotipo correspondientes para la correcta caracterización y diagnóstico del paciente presentado y de posibles casos futuros.

## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Datos clínicos:**

#### **3.1.1 Historia Clínica**

Para la recogida e interpretación de datos clínicos del paciente, se ha utilizado de forma inicial, la denominada “tabla intermedia”. En dicha tabla, el grupo de trabajo del Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, sintetiza, a través de una tabla estandarizada para todos los pacientes, los datos más relevantes sobre los mismos. Dichos datos se ordenan por apartados, recogándose en primer lugar, datos epidemiológicos del paciente, y en segundo lugar, ordenados por aparatos, los datos clínicos de mayor interés.

Esto permite disponer de toda la información de cada paciente, estructurada de forma adecuada y sintetizada. Se adjunta un ejemplar de dicha tabla en el apartado Anexos (Anexo 2).

Además de la Tabla intermedia, se ha consultado la HCE e HC en formato papel del paciente, lo que ha permitido la obtención de información más amplia y detallada, así como evolutiva.

##### **3.1.1.1 Síndrome Cornelia de Lange. Deep phenotyping (HPO)**

El “*Deep phenotyping*” ó HPO (*Human Phenotype Ontology*) tiene como objetivo fundamental proporcionar un lenguaje estandarizado para designar anomalías fenotípicas encontradas en las distintas enfermedades humanas. Cada término incluido en la base HPO describe una anomalía fenotípica.

Se está utilizando para su desarrollo toda la información contenida en la literatura, así como aquella recogida en bases de datos como ORPHANET, DECIPHER, y OMIM.

En el momento actual, HPO contiene aproximadamente 11.000 términos (aún en crecimiento) y más de 115.000 anotaciones a enfermedades hereditarias.

Para la recogida sistematizada de los rasgos clínicos que presenta el caso índice, se ha utilizado una tabla de elaboración propia donde quedan reflejados dichos datos clínicos asociando la correspondiente nomenclatura en protocolo HPO.



### 3.1.1.1.1 Criterios de Kline

En el año 2007, Kline modificó un sistema de diagnóstico basado en unos criterios clínicos mínimos (Tabla 3.1). Para considerar que un paciente tiene el SCdL debe cumplir alguna de las siguientes dos situaciones:

1. **Posibilidad nº1:** Sinofridia (considerado criterio principal de la categoría craneofacial), más tres de los criterios secundarios de esta categoría. Además deberá cumplir los criterios necesarios de dos de las categorías siguientes: crecimiento, desarrollo físico o comportamiento.

2. **Posibilidad nº2:** Sinofridia (considerado criterio principal de la categoría craneofacial), más tres de los criterios secundarios de esta categoría. Además deberá cumplir los criterios necesarios de 3 de las otras seis categorías expuestas en la tabla, siendo necesario el cumplimiento de los criterios de al menos una de las siguientes: crecimiento, desarrollo físico o comportamiento.

CATERGORÍA	Nº	CRITERIO PRINCIPAL	CON	CRITERIO SECUNDARIO
<b>Craneofacial</b>		Sinofridia (cejas finas y arqueadas)	Y ≥ 3 de	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Pestañas largas</li> <li>* Nariz pequeña y narinas antevertidas</li> <li>* <i>Philtrum</i> largo y prominente</li> <li>* Puente nasal ancho y deprimido</li> <li>* Mentón pequeño y cuadrado</li> <li>* Labios finos y comisuras bucales hacia abajo</li> <li>* Paladar elevado</li> <li>* Diastema dentario</li> </ul>
<b>Crecimiento</b>	≥ 2 de	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Peso &lt;P5 según edad</li> <li>* Longitud o talla &lt;P5 según edad</li> <li>* Perímetro cefálico &lt;P5 según edad</li> </ul>		
<b>Desarrollo</b>	≥ 1 de	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Retraso del desarrollo o discapacidad intelectual</li> <li>* Dificultades de aprendizaje</li> </ul>		
<b>Comportamiento</b>	≥ 2 de	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Déficit de atención ± hiperactividad</li> <li>* Comportamiento obsesivo-compulsivo</li> <li>* Ansiedad</li> <li>* Agresividad</li> <li>* Comportamiento autolesivo</li> <li>* Timidez extrema</li> <li>* Trastorno del espectro autista (TEA)</li> </ul>		
<b>Extremidades</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>* Defectos de reducción con ausencia de antebrazos</li> <li>* Manos y/o pies pequeños</li> </ul>	Sólo	

	Ó Ó	(< P3) u oligodactilia * Ninguna de las anteriores	y ≥ 2 de  y ≥ 3 de	* Clinodactilia 5º dedo * Línea palmar única * Extensión limitada de codos * 1º metacarpiano corto/localización proximal de pulgares * Deformidades en los dedos de los pies* Sindactilia 2-3 en pies * Escoliosis * <i>Pectus excavatum</i> * Displasia o dislocación de caderas
<b>Neurosensorial/ piel</b>	≥ 3 de	* Ptosis palpebral * Malformación del conducto lacrimal o blefaritis * Miopía ≥ -6 D * Malformaciones oculares mayores o pigmentación peripapilar * Sordera o pérdida de audición (hipoacusia) * Epilepsia * <i>Cutis marmorata</i> * Hirsutismo generalizado * Mamas y/u ombligo pequeños * Malrotación/malformación intestinal		
<b>Otros sistemas</b>	≥ 3 de	* Hernia diafragmática * Reflujo gastroesofágico * * Fisura palatina * Cardiopatía congénita * Micropene * Hipospadias * Criptorquidia * Malformaciones renales o en el tracto urinario		

**TABLA 3.1** Criterios diagnósticos para el Síndrome de Cornelia de Lange (Modificada de Kline et al, 2007). Tabla adaptada.<sup>(16)</sup>

### 3.1.1.1.2 Criterios de Gillis

La probabilidad de presentación clínica en el SCdL presenta una gran heterogeneidad, lo que ha dado lugar al desarrollo de diversas formas de clasificación de los pacientes basándose en el grado de afectación. De todas las mismas, es la de Gillis del año 2004, la más utilizada. En ella se diferencian tres grados de afectación en el paciente con SCdL, la forma leve, moderada y grave (Tabla 1). Dicha clasificación se basa en la valoración de tres parámetros fenotípicos: el grado de reducción de las extremidades, desarrollo y habilidades cognitivas y percentil de crecimiento, valorado según curvas estándar para pacientes con SCdL.

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

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

**TABLA 3.2.** Clasificación de las distintas formas del SCdL según la gravedad de los rasgos fenotípicos Tabla adaptada.<sup>(10)</sup>

### 3.1.1.2 Síndrome microdelección 16p11.2

Para la recogida de datos clínicos compatibles con dicho síndrome, se ha utilizado una tabla de elaboración propia en la que se recogen datos perinatólogicos, rasgos fenotípicos, así como alteraciones del desarrollo neurológico y del comportamiento, descritos en pacientes con diagnóstico molecular de Síndrome de microdelección 16p11.2, que han sido publicados hasta la fecha en la literatura. Dicha tabla se adjunta a continuación (Tabla 3.3).

		Delección 16p11.2	Duplicación 16p11.2	
Datos perinatólogicos	Edad gestacional	A término	A término	
	Tipo de parto	Eutócico	Eutócico	
	Adaptación CR	Inestabilidad al nacimiento	Inestabilidad al nacimiento	
	Comorbilidad postnatal	Ictericia	Ictericia	Ictericia
		Policitemia	Policitemia	Policitemia
		Hipoglucemia	Hipoglucemia	Hipoglucemia
		Hipotermia	Hipotermia	Hipotermia
Hallazgos craneofaciales	Frente ancha	+/-	+ (menos marcado)	
	Micrognatia	+/-	+ (menos marcado)	
	Aplanamiento de región malar	+/-	+ (menos marcado)	
	Hipertelorismo ocular	+/-	+ (menos marcado)	
	Fisura palatina	+/-	+	

<b>Crecimiento</b>	<b>Perímetro cefálico</b>	Aumentado	Disminuido
	<b>Peso</b>	Obesidad	Bajo peso
	<b>Talla</b>	Baja	Baja
<b>Desarrollo</b>	<b>Retraso motor</b>	Presente en 50% casos (grado leve)	Presente
	<b>Retraso cognitivo (lenguaje)</b>	Presente	Presente (más grave)
<b>Comportamiento</b>	<b>TEA/Autismo</b>	+/-	+/-
	<b>TDAH</b>	+/-	+/- (más frecuente que en delección)
<b>Extremidades</b>	<b><i>Pectus excavatum</i></b>	-	+/-
	<b><i>Pectus carinatum</i></b>	-	+/-
	<b>Pies planos</b>	-	+/-
	<b>Polidactilia</b>	+/-	-
	<b>Fusión de costillas</b>	+/-	-
	<b>Escoliosis</b>	-	+/-
<b>Neurosensorial</b>	<b>Convulsiones</b>	+/-	+/-
	<b>Miopía</b>	+/-	+/-
	<b>Alteración cuerdas vocales</b>	+	-
<b>Otros sistemas</b>	<b>Hernia diafragmática</b>	+/-	-
	<b>Reflujo gastroesofágico</b>	+/-	+/-
	<b>Cardiopatía congénita</b>	+/-	-
	<b>Hipospadias</b>	-	+/-
	<b>Fimosis</b>	-	+/-
	<b>Displasia renal</b>	+/-	-
	<b>Estenosis pilórica</b>	+/-	-

**TABLA 3.3.** Características clínicas Sd de reordenamiento 16p11.2, según se trate de delección o duplicación de la región 11.2. Tabla de elaboración propia.

### 3.2 De laboratorio

Se exponen a continuación las técnicas moleculares que han sido desarrolladas a lo largo del estudio genético de nuestro paciente, siguiendo un orden establecido dependiente de los resultados de las mismas, con el objetivo de hallar la mutación causal del fenotipo clínico.

Algunas de ellas han sido desarrolladas en el Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, centro de referencia del SCdL, siendo necesario completar el estudio con técnicas llevadas a cabo en laboratorios externos.

#### **3.2.1 Secuenciación Sanger**

La Secuenciación tipo Sanger se desarrolló en el Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza. Para ello, se obtuvo muestra de sangre periférica del paciente, llevando a cabo a continuación los siguientes procedimientos: obtención de ADN en leucocitos, amplificación del material génico mediante técnica de PCR, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación del material génico según el método Sanger.

##### 3.2.1.1 Obtención de ADN en leucocitos

La obtención del ADN de leucocitos a partir de la muestra de sangre venosa del paciente, para el posterior estudio genético se realizó según el protocolo del laboratorio que se detalla a continuación.

- 1- Rotular los tubos FALCON de 50 mL y Eppendorf con código de cada paciente
- 2- Homogeneizar los tubos de sangre por inversión
- 3- Separar 4 mL de sangre por cada tubo FALCON de 50 mL
- 4- Añadir 10 volúmenes de Tritón Sucrosa, aproximadamente hasta 40 mL
- 5- Centrifugar 10 min a 2000 rpm a 0°C
- 6- Eliminar sobrenadante por decantación
- 7- Resuspender el pellet en 6 mL de tampón SE (0,1 g SDS, 15 mL CINa 0,5M, 5 mL EDTA 0,5M)
- 8- Añadir 120 µL de proteinasa K
- 9- Incubar toda la noche a 37°C
- 10- Añadir 2 mL de CINa 6M
- 11- Añadir 8 mL de cloroformo
- 12- Agitar en rotor 30 min y centrifugar 15 min a 2000 rpm
- 13- Recoger el sobrenadante del tubo
- 14- Añadir isopropanol 1:1 y esperar aparición de ovillo de ADN
- 15- Absorber ovillo de ADN y pasar a Eppendorf
- 16- Añadir 1 mL etanol 70%
- 17- Agitar en rotor 30 min y centrifugar a 12000 rpm 5 min
- 18- Eliminar el etanol y añadir 3000 µL de buffer TE
- 19- Dejar en estufa a 37°C hasta que disuelva

### 3.2.1.2 Amplificación de exones por PCR para secuenciación Sanger.

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa, es una técnica de biología molecular cuyo objetivo se basa en obtener un gran número de copias a partir de un fragmento mínimo de ADN.

Para ello, utiliza la ADN polimerasa, con capacidad para replicar hebras de ADN a partir de una hebra original. Se realizan varios ciclos a distinta temperatura, lo que facilita la separación de las 2 hebras de ADN y su unión a las ADN polimerasa.

Para su realización son necesarios los siguientes componentes: muestra de ADN original del paciente, ADN polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) como sustrato para la formación de nuevo ADN, cofactores (Mg<sup>2+</sup>), solución tampón así como *primers*.

Los *primers* o cebadores, son oligonucleótidos complementarios a las secuencias de ADN situadas en los extremos del fragmento que se desea amplificar y serán los primeros en complementar la hebra de ADN original. Con ellos, se consigue delimitar el fragmento que se desea replicar y es por esta razón por la que su diseño debe ser muy cuidadoso, ya que marcará la especificidad de la reacción. Dicho diseño puede ser asistido por programas informáticos o bien realizado de manera manual siguiendo protocolos específicos para ello.

Así pues, se procede a mezclar todos los componentes de la reacción. En el caso de la muestra de nuestro paciente, en vez de adicionar de forma independientemente cada compuesto, se utilizó la mezcla “Master-Mix”, que incluía todos los elementos previamente descritos (ADN polimerasa, dNTPs, Magnesio y tampón), en las concentraciones que se reflejan a continuación:

<b>Master-Mix</b>	10 µL
<b>Primer forward</b>	0,5 µL
<b>Primer reverse</b>	0,5 µL
<b>ADN paciente</b>	0,5 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,8 µL

A continuación, debemos introducir la mezcla en el termociclador, donde se producirán los cambios de temperatura para que se lleve a cabo la reacción. Se llevarán a cabo varias fases de diferente duración y temperatura, cuyos objetivos son:

1º Iniciación: Esta fase sólo se realiza en caso de que las ADN usadas requieran de activación por calor. La temperatura necesaria oscila entre 94-96 °C.

2º Desnaturalización: Se separarán las 2 hebras de ADN original.

3º Alineamiento: La ADN-polimerasa une los *primers* con el ADN original.

4º Extensión: La ADN-polimerasa produce la elongación de la hebra de ADN a partir de los *primers*. El tiempo de esta fase va a depender de la longitud del fragmento a elongar y del tipo de ADN-polimerasa usada.

5º Elongación final: Etapa única final con la que asegurar que todas las cadenas simples de ADN que pudieran permanecer sin elongar finalmente sean ampliadas.

6º Conservación: Para la conservación a corto plazo de la muestra, ésta ha de mantenerse a 4-15°C.

Normalmente la PCR consta de una primera iniciación, seguida de unos 20-35 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión. Finalmente se termina con una única elongación final y se conserva el material a 4-15°C.

Las temperaturas y duración de cada fase se especifican en la siguiente tabla:

	Tiempo	Duración	
<b>Inicio</b>	3 min	98°C	
<b>Desnaturalización</b>	30 s	96°C	} 35 ciclos
<b>Hibridación</b>	30 s	50 - 60°C	
<b>Extensión</b>	40 s	72°C	
<b>Extensión final</b>	7 min	72°C	

### 3.2.1.3 Gel de agarosa

El objetivo de este procedimiento consiste en verificar que la PCR se ha realizado de forma correcta y, por lo tanto, ha dado lugar a la amplificación del fragmento de ADN esperado. Para ello es necesario separar por tamaños el producto de la PCR dentro de un gel de agarosa mediante electroforesis. Posteriormente se debe comparar el peso molecular esperado del exón con el obtenido mediante dicha técnica.

Para fabricar el gel de agarosa y posteriormente realizar la electroforesis se deben seguir los pasos especificados a continuación:

1. *Disolver y calentar la mezcla de agarosa con el tampón TBE1X. Las cantidades dependerán del porcentaje de gel agarosa que queramos obtener.*
2. *Con la mezcla caliente, pero sin solidificar, debemos añadir bromuro de etidio (BrEt) , para poder visualizar los fragmentos de ADN a la luz ultravioleta.*
3. *Verter la mezcla en una cama, colocar un peine para que deje impronta de los pocillos y dejar solidificar.*
4. *Tras retirar el peine y sacar el bloque de gel de la cama, éste se introduce en una cubeta llena de TBE.*
5. *Introducir en cada pocillo la muestra de PCR mezclada con azul de bromo fenol, que proporcionara color y densidad a la muestra.*
6. *Electroforesis a 90V, 30 minutos.*
7. *Revelar el producto mediante luz UV y comparar el peso molecular obtenido, con el esperado.*

#### 3.2.1.4 Purificación del producto:

Tras la PCR, se realiza una purificación del producto obtenido, con el objetivo de eliminar las sustancias sobrantes de la reacción.

Existen varios kits comerciales para realizar esta función, en nuestro caso se empleó “Exo SAP-IT®” de GE Healthcare, que permite la purificación de fragmentos de PCR entre 100pb y 20kb. Se basa en la eliminación de *primers* y *dNTPs* mediante la degradación enzimática con exonucleasa I y Shrimp alkaline fosfatasa.

Para ello, se sigue el protocolo indicado por la casa comercial del producto:

1. *Colocar el tubo de ExoSAP-IT en un baño de hielo.*
2. *Mezclar 5  $\mu$ L de producto de PCR con 2  $\mu$ L de ExoSAP-IT.*
3. *Incubar a 37°C 15 min (degradación de primers y nucleótidos)*
4. *Incubar a 80°C 15 min (inactivación ExoSAP-IT)*
5. *Guardar el producto de PCR purificado a -20°C.*

#### 3.2.1.5. Secuenciación tipo Sanger:

Este tipo de secuenciación nos permite demostrar la existencia de mutaciones en el gen estudiado.

Para su realización, se necesita, de igual modo que en la PCR, el empleo ADN polimerasas y *primers*.

El método dideoxi de secuenciación desarrollado por Sanger se basa en el empleo de didesoxinucleótidos que carecen de uno de los grupos hidroxilo. Esto hace que, cuando uno de esos nucleótidos se incorpora a una cadena de ADN en crecimiento, dicha cadena no puede continuar su elongación ya que la ADN polimerasa necesita un



extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el desoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo.

Ésta información es expresada mediante un cromatograma y a partir de éste se obtiene la secuencia de nucleótidos mediante programas informáticos.

Posteriormente, se comparará la secuencia obtenida con el patrón de secuencia esperada para ese fragmento de ADN o *Wild Type*, que es conocida y almacenada en bases de datos como la del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). De esta manera se podrán detectar las variaciones del fragmento de ADN de nuestros pacientes.

### 3.2.2 MLPA

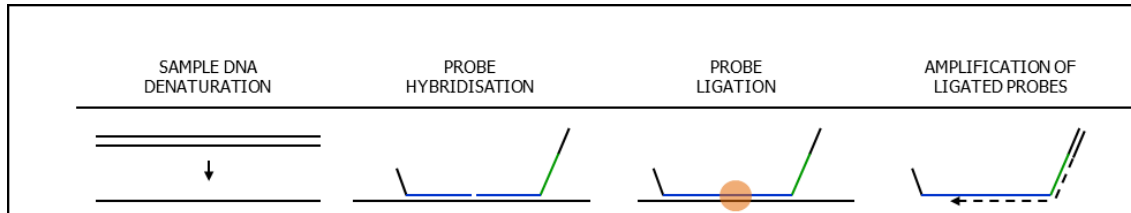
La técnica MLPA ó *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*, es una técnica de biología molecular semicuantitativa, (*Multiplex PCR*), que permite, a partir de una misma reacción, poder detectar copias anormales de hasta 50 secuencias genómicas diferentes de ARN o ADN.

Esta técnica se basa en una primera reacción de unión-ligación de sondas con la zona homóloga de interés. Sólo las sondas que hayan hibridado, podrán ser ligadas, y posteriormente amplificadas por PCR. Mediante un análisis de fragmentos y aprovechando la diferencia de tamaño de cada una de las sondas, se podrán identificar aberraciones en el número de copias genómicas.

El gen *NIPBL*, gen que nos disponemos a estudiar está localizado en la región 5p13.2 y contiene 47 exones. Los dos kits utilizados para el análisis de fragmentos en nuestro laboratorio fueron los *Kit SALSA MLPA p141 NIPBL-1 probemix* y *SALSA MLPA p142 NIPBL-2 probemix (MRC-Holland)*.

Ambos kits utilizan para el caso concreto de este gen, una sonda para cada exón, a excepción del exón 1 que está por duplicado. Cada sonda está formada por dos oligonucleótidos. Uno de ellos es complementario a la secuencia que se quiere estudiar (21-30 nucleótidos), y, el segundo, tiene otra secuencia complementaria a la secuencia diana, ADN de relleno que puede ser de distintos tamaños. Al primer oligonucleótido descrito, se le añade la secuencia de un cebador universal en el extremo 5', mientras que en el segundo de los casos, la secuencia del cebador se añade en el extremo 3'. Además, contiene 10 sondas de referencia para el probemix P141-A3 y 11 sondas de referencia para el probemix 142-A3.

La técnica se lleva a cabo en 2 días; el primero de ellos se realiza una primera reacción de desnaturalización e hibridación de sondas con la zona homóloga de interés, y en un segundo tiempo, una segunda reacción de ligación y amplificación del ADN.



**FIGURA 3.1.** Fases en la reacción MPLA. Incluye reacción de desnaturalización, hibridación, ligación y amplificación. *Tabla adaptada.* <sup>(25)</sup>

El protocolo de realización de la técnica, se recoge en la siguiente tabla.

	TEMPERATURA	TIEMPO
<b>Desnaturalización del ADN</b>	98°C	5 min
	25°C	Pausar
<b>Hibridación Master-Mix</b>	95°C	1 min
	60°C	Pausar (16-20 horas)
<b>Ligación Ligasa 65-Mix</b>	54°C	Pausar
	54°C	15 min
	98°C	5 min
	20°C	Pausar
<b>Reacción PCR (35 ciclos)</b>	95°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	60 s
	72°C	20 min
	15°C	Pausar

**TABLA 3.4.** Programa de Termociclación para MPLA. *Tabla adaptada.* <sup>(23,24)</sup>

A continuación se desarrolla el protocolo correspondiente a la técnica MPLA. En el primer día del mismo, se llevan a cabo las dos primeras fases de la técnica: desnaturalización de ADN e hibridación con las sondas MLPA. El ADN se desnaturaliza y se incuba durante la noche con una mezcla de sondas de MLPA que constan de dos oligonucleótidos. Éstos dos oligonucleótidos de sonda, hibridarán con las secuencias diana inmediatamente adyacentes.

### **1. Desnaturalización:**

- Añadir 5  $\mu\text{L}$  de *ADN* a un tubo de PCR de 0.2 mL, es decir, entre 50-250 ng por lo que quedará una solución de *ADN* entre 10 ng/ $\mu\text{L}$  y 50 ng/ $\mu\text{L}$ .
- Introducir la muestra de *ADN* en un termociclador durante 5 minutos a 98° C para su desnaturalización.
- Finalizar con 5 minutos de enfriamiento de la muestra a 25°C.

### **2. Hibridación MASTER MIX:**

- Mezclar 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer amarillo MLPA con 1.5  $\mu\text{L}$  de *salsa probemix* (sondas). Homogeneizar bien la muestra mediante pipeteo o inversión.
- Añadir 3  $\mu\text{L}$  de master mix hibridación a la muestra desnaturalizada sin sacar los tubos del termociclador y mezclar mediante pipeteo.
- Continuar con el programa a 95°C durante 1 minuto y pausa a 60°C durante 16-20 horas.

En un segundo tiempo (en las siguientes 24 horas), se llevan a cabo las dos últimas fases del protocolo, que incluyen la ligación a través de *LIGASA 65 MIX*, y la amplificación del material genético obtenido mediante *MIX POLYMERASA* y *MIX SALSA PCR*.

### **3. Ligación por LIGASA 65 MIX:**

- Se preparan 2 disoluciones antes de comenzar y se colocan en hielo. Voltar los Buffer antes de utilizarlos.
- Para cada reacción utilizar 25  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O junto con 3  $\mu\text{L}$  de Ligasa Buffer A (transparente), 3  $\mu\text{L}$  de Ligasa Buffer B (blanco) y 1  $\mu\text{L}$  de enzima Ligasa (verde). Mezclar mediante pipeteo pero nunca voltear las soluciones enzimáticas. Reservar en hielo.
- Poner las muestras que estaban en el termociclador a una temperatura de 54°C.
- Una vez que las muestras consiguen alcanzar la temperatura deseada, añadir 32  $\mu\text{L}$  de ligasa mix por pipeteo a cada tubo sin sacarlo del termociclador. Continuar con el programa 15 minutos a 54°C para que se produzca la ligación y después 5 minutos a 98°C. Pausar a 20°C.
- En este punto retirar los tubos del termociclador.

#### **4. Amplificación MIX POLYMERASA y MIX SALSA PCR:**

- Añadir a cada reacción 7,5  $\mu\text{L}$  dH<sub>2</sub>O, 2  $\mu\text{L}$  de salsa PCR y 0,5  $\mu\text{L}$  de polimerasa. Mezclar bien por pipeteo pero sin voltear. Conservar en hielo hasta utilizarlo.
- A temperatura ambiente, añadir 10  $\mu\text{l}$  del preparado a cada tubo. Mezclar por pipeteo.
- Colocar los tubos de nuevo en el termociclador y comenzar con el programa de PCR 35 ciclos; 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C y terminar 20 minutos a 72°C. Pausar y dejar a 15°C.
- Tras esta reacción PCR, guardar la muestra bien tapada con papel de plata puesto que contienen sustancias fluorescentes sensibles a la luz.
- Después del proceso, la muestra puede mantenerse 1 semana a 4°C, sin embargo si queremos preservarla más tiempo, debe estar guardada a una temperatura de -15°C.

#### **5. Análisis de fragmentos:**

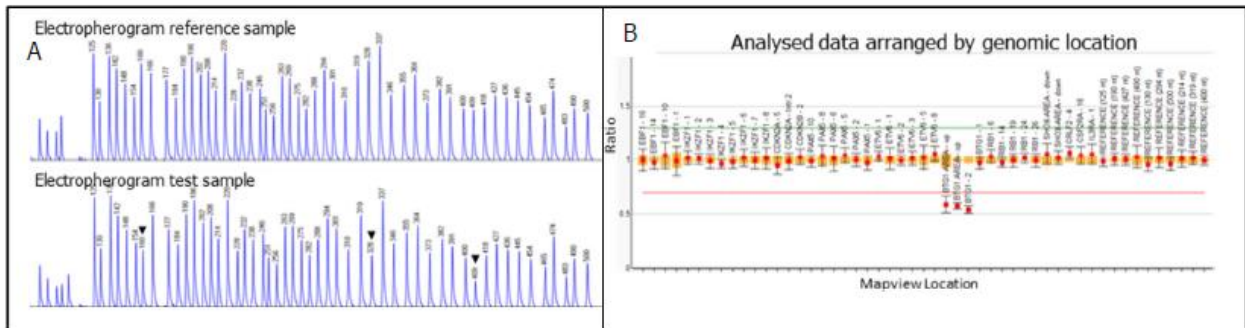
El último paso es la separación de los productos de amplificación por electroforesis. Los productos amplificados generan fragmentos de longitud variable que serán separados por electroforesis capilar y analizados en un secuenciador automático pudiéndose estimar la cantidad de producto obtenido mediante la emisión de un pico de señal.

Sólo aquellas sondas que hayan hibridado correctamente podrán ser ligadas. Ambas sondas hibridan a ambos lados de la secuencia diana, y son ligadas por una ligasa termoestable. Las sondas que no fueron ligadas, no podrán ser amplificadas exponencialmente, y por consiguiente no generaran señal.

#### **6. Interpretación:**

La interpretación de los resultados se basa en la comparación de los valores de nuestra muestra con unos valores de referencia proporcionados por las sondas preestablecidas en los probemix MLPA. El estudio cuantitativo de la intensidad o área de pico que se lleva a cabo en cada una de las sondas es comparado con las de referencia pudiendo identificar de esta forma, la cantidad de secuencias presentes y por tanto, si presentan CNV. Los pacientes que no presentan ninguna anomalía en su ADN muestran unos patrones de intensidad iguales a los de las sondas de referencia. El software *Coffalyser* calcula el valor de Dosis Relativa de cada sonda en la muestra mediante la medición de la intensidad de pico. Las sondas son organizadas en su

localización cromosómica correspondiente para una correcta interpretación. El ratio de normalidad o dosis relativa de cada sonda se establece entre 0,7 y 1,3. Por lo tanto, una disminución de Dosis Relativa por debajo de 0,7 indica delección así como un aumento de Dosis Relativa por encima de 1,3 indicara duplicación.<sup>(23,24)</sup>



**FIGURA 3.2.** Ejemplo de resultados MLPA. A) Electroforesis capilar, comparación de muestra con sonda de referencia. B) Organización de las sondas en su localización cromosómica correspondiente.<sup>(23,24)</sup>

### 3.2.3 Secuenciación masiva

La Secuenciación Masiva permite realizar el análisis simultáneo de un grupo amplio de genes relacionados con una patología, a través de diseños específicos y adaptados a las necesidades de cada paciente. Se caracteriza por obtener resultados con mayor brevedad que con las aproximaciones clásicas de secuenciación Sanger para un mismo número de genes. Además, esta técnica ha demostrado una mayor eficacia con respecto a la secuenciación individual de genes, aumentado así la probabilidad de encontrar la causa de la enfermedad.

En nuestro caso, se ha empleado un panel de genes predeterminado, que explora los genes causales y candidatos para el SCdL.

### 3.2.4 Cariotipo

El cariotipo o mapa citogenético es la imagen o apariencia visual, ordenada según el número, tamaño y forma de los cromosomas de un individuo o especie cuando se tiñe y se examina bajo un microscopio.

Para su realización, es necesaria la obtención de una muestra de sangre periférica, que posteriormente se someterá a cultivo durante 72 horas. A la muestra, se le debe adicionar heparina para evitar su coagulación. El procesamiento de la muestra tiene lugar en tres fases:

1. Primeras 24 horas: La muestra sanguínea se introduce en un medio de cultivo RPMI, al que se añade un extracto embrionario y antibiótico para prevenir la contaminación. Se adiciona además fitohemaglutinina, lecitina que se unirá a la

membrana plasmática de los linfocitos y hace que estos se conviertan en linfoblastos, es decir, que se diferencien.

2. Posteriormente los linfoblastos se dividen y se estimulan segregando interleuquina 2. Este cultivo se mantendrá durante 48 horas más, lo que permitirá valorar mayor número de células en mitosis.

3. A las 72 horas, se realiza la extracción de aquellas células que se encuentran en metafase. A esta fase se le denomina sacrificio. Para ello, es necesario adicionar colchicina que hace que el uso acromático desaparezca, impidiendo que tenga lugar la anafase. Posteriormente se someterá a la muestra a choque hipotónico con CIK, lo que genera aumento del volumen celular y que los cromosomas se separen.

A continuación se produce la fijación de cromosomas con fijador de Carnoy, y se realizan las extensiones.

Por último, se procede al reordenamiento de los cromosomas siguiendo las siguientes normas:

- Tamaño: de mayor a menor tamaño.
- Posición del centrómero: en primer lugar los cromosomas metacéntricos, seguido de los submetacéntricos y en último lugar los acrocéntricos.
- Presencia o no de constricciones secundarias.

### **3.2.5 CGH-Array**

El *CGH-Array* (también conocido como cariotipo molecular) es una técnica citogenética molecular de tipo cuantitativa utilizada en diagnóstico genético que nos permite analizar el genoma completo de un individuo en busca de alteraciones de ganancia o pérdida de material genético.

Permiten la detección de deleciones o duplicaciones de material genómico con una resolución de hasta 200 Kb, respecto la resolución del cariotipo convencional que se sitúa de media en las 10 Mb (550 - 650 bandas), siendo su máxima resolución 5 Mb.

El *CGH-Array* se fundamenta en la comparación de la dosis genética contenida en el *ADN* del caso índice respecto a la presentada por un *ADN* de referencia procedente de un individuo sano. Ambos *ADNs* son marcados con diferentes colores (verde y rojo), y, posteriormente, se hibridan de forma conjunta en el array. En dicho array se presentan sondas específicas que abarcan todo el genoma humano, pudiéndose elegir la concentración y distribución de estas, lo que permite elegir la resolución del análisis.

El análisis final del array se realiza de una manera cuantitativa. Para ello se utilizan herramientas bioinformáticas así como de análisis de imagen de alta resolución, lo que permite calcular la proporción de ADN de cada color para cada región genómica. La presencia de mayor o menor cantidad de ADN en una región concreta del genoma analizado respecto al control implicará un viraje del color del marcaje en un sentido u otro, lo que se traduce en la detección de una inserción o delección en el paciente respecto el *ADN* de referencia.

Como limitaciones de la técnica destaca su imposibilidad para diagnosticar aquellas alteraciones que no supongan una pérdida o una ganancia neta de material genómico, donde se encuentran: las mutaciones puntuales, los reordenamientos equilibrados (translocaciones recíprocas, robertsonianas, inversiones y/o las inserciones balanceadas), disomías uniparentales, mosaicismos, etc.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Historia clínica recogida

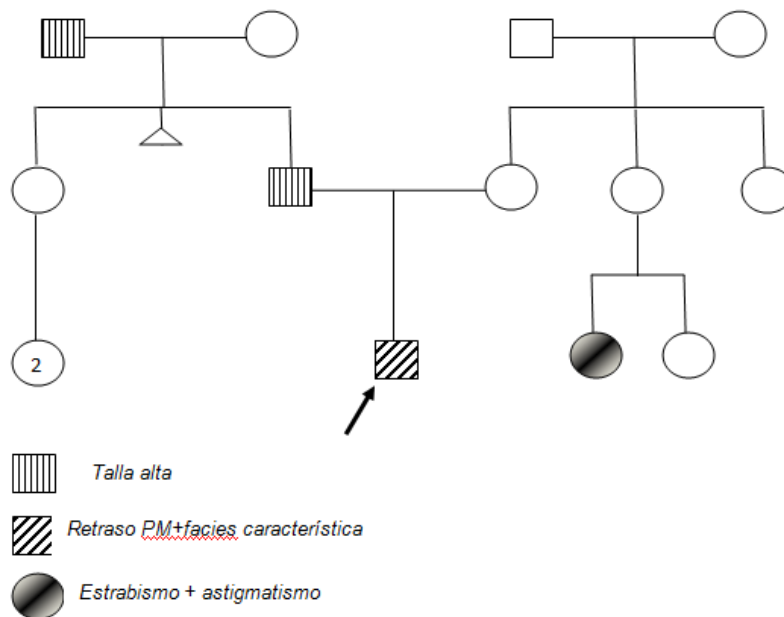
Como ya se ha reflejado en el apartado métodos, los datos clínicos así como estudios realizados en el caso índice, se han recogido a partir de la historia clínica estándar e historia clínica ampliada.

La primera de ellas, disponible en el Laboratorio de Genética y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza, permite el conocimiento de los datos clínicos y epidemiológicos más relevantes del paciente, de una forma perfectamente sintetizada.

La historia clínica ampliada, cuyos datos se recogieron de la historia clínica hospitalaria del paciente, permite un conocimiento más amplio y de forma evolutiva, de cada uno de los signos clínicos que han ido apareciendo en nuestro paciente, desde el nacimiento hasta el momento actual. Además permite conocer el seguimiento que se ha realizado en nuestro paciente en cada una de las especialidades de las que ha requerido valoración: Neonatología, Cardiología, Neurología, Gastroenterología, Psiquiatría y Genética clínica.

#### 4.1.1 Datos clínicos y clasificación según protocolo “*deep phenotyping*”

Paciente varón, de raza caucásica que en la actualidad tiene 8 años y 11 meses. Primer hijo de la pareja. Como antecedentes familiares de interés destacan talla alta en rama paterna y estrabismo congénito e hipermetropía en rama materna. Se expone a continuación el árbol genealógico del paciente.



**Figura 4.1.** Árbol genealógico del caso índice.



Embarazo controlado. Diagnóstico de CIR en el tercer trimestre, sin otras incidencias. A nivel perinatólogo destaca un parto inducido a término, a las 38 semanas de gestación. Apgar 9/10, peso 2.380 g (P2; -2,15 DE para P50), longitud 45 cm (P<1; -2,66 DE para P50), PC: 34 cm (P51; 0,04 DE para P50). No requirió reanimación.

Ingresado en periodo neonatal por bajo peso. A las 72 horas de vida inicia ictericia que requirió tratamiento con fototerapia durante 48 horas. Buena ganancia ponderal y disminución de cifras de bilirrubina indirecta por debajo de rango de fototerapia, por lo que fue dado de alta.

A los 20 meses es derivado por su Pediatra a la Consulta Hospitalaria del Servicio de Psiquiatría Infanto-Juvenil del Hospital Clínico Universitario "Lozano Blesa" por retraso psicomotor. Posteriormente, desde dicha Consulta es remitido a la Consulta de Genética Clínica del Servicio de Pediatría del Hospital por presentar además rasgos dismórficos.

En la primera valoración, se objetivan los rasgos dismórficos siguientes: cejas pobladas con sinofridia, pestañas largas, puente nasal ancho y deprimido, narinas antevertidas, *philtrum* alargado y labio superior fino. A nivel de extremidades, se objetiva la presencia de dedos algo cortos y clinodactilia bilateral de 5º dedo. El fenotipo sugiere inicialmente el diagnóstico de Síndrome Cornelia de Lange, de grado leve. A lo largo de su seguimiento en la Consulta de Genética, se presentaron otras manifestaciones clínicas entre las que destaca un reflujo gastroesofágico (RGE), que requirió estudio por la Unidad de Gastroenterología Pediátrica. Tras la realización de una pHmetría, se confirma la existencia de un RGE grave, iniciándose tratamiento médico-farmacológico, que todavía mantiene en el momento actual.

Además, ha sido valorado y seguido por el servicio de Oftalmología por la presencia de ptosis palpebral bilateral leve y alteraciones en la refracción (hipermetropía).

Requirió valoración en Cardiología Pediátrica por aparición de un soplo sistólico de intensidad II/VI, sin irradiación. Tras realización de ecocardiografía se identifica una insuficiencia tricuspídea leve, que hasta la fecha no precisa tratamiento.

En lo referido al desarrollo psicomotor, a los 2 meses de vida apareció la sonrisa social, así como inicio de seguimiento de objetos con la mirada y sobresalto con los ruidos. A los 7 meses sedestación sin apoyo, a los 12 meses inició gateo y bipedestación y a los 17 meses, consiguió la deambulacion independiente. A los 20 meses subía y bajaba escaleras aunque con dificultad. Control de esfínteres a los 2

años y 9 meses. Ha presentado dificultad para la motórica fina y gruesa desde siempre.

Lo más llamativo del desarrollo psicomotor del paciente ha sido el desarrollo del lenguaje expresivo. A los 8-9 meses era capaz de pronunciar 3 bisílabos, y con 20 meses decía trisílabos aunque no articulaba dos palabras juntas. Ha presentado dificultad para la pronunciación de algunos fonemas. Silabea al leer y presenta problemas de lecto-escritura, comprensión lectora y atencionales, lo que se traduce en una afectación de su aprendizaje y sus capacidades adaptativas. Todo ello ha hecho necesario la inclusión de nuestro paciente en programas de Atención Temprana, logopedia, psicomotricidad y apoyo curricular, lo que ha supuesto una mejoría de sus limitaciones, aunque sigue persistiendo retraso en la adquisición de nuevas habilidades.

Además de lo presentado, destaca también la presencia de problemas de atención y regulación del comportamiento, con baja tolerancia a la frustración.

Todo ello ha sido valorado y seguido evolutivamente por el servicio de Psiquiatría Infanto-Juvenil, incluyendo las valoraciones del equipo de Psicología. Se han aplicado escalas de valoración psicomotora, así como escalas psicopedagógicas a lo largo de dicho seguimiento, cuyos resultados se muestran a continuación:

- Escala Desarrollo Psicomotor Primera infancia Brunet-Lézine:

Los ítems de dicha escala se agrupan en torno a las cuatro áreas siguientes: Postural, Coordinación, Lenguaje y Sociabilidad. La escala está estructurada en los 15 niveles (meses) siguientes: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 17, 20, 24 y 30. Cada nivel consta de 10 ítems, con un total de 150. La puntuación de cada uno de ellos es binaria (1/0), en dependencia de si dicha adquisición evaluada está presente o no.<sup>(8)</sup>

A partir de la suma de los ítems se obtiene la edad de desarrollo (ED). El CD o cociente de desarrollo, se obtiene al dividir la edad de desarrollo por la edad real o cronológica (EC). Este cálculo se puede realizar con el resultado del sumatorio de todos los ítems, hablando entonces de cociente de desarrollo global, así como para cada una de las áreas exploradas, lo que correspondería a los cocientes de desarrollo parciales. Estos valores se pueden obtener a partir de los 4 meses, puesto que durante el primer trimestre son más fiables las pruebas para la evaluación del comportamiento neonatal.<sup>(8)</sup>

EDAD CRONOLÓGICA (EC)	C.D. (ED/EC)
20 meses	120 (24/20)
3 años y 7 meses	98 (42/43)
4 años	112 (54/48)
4 años y 7 meses	101 (57/56)

**TABLA 4.1.** Escala Desarrollo Psicomotor Primera infancia Brunet-Lézine. Tabla de elaboración propia según datos recogidos en HC.

– Reversal test:

El objetivo de la prueba es diagnosticar el nivel de madurez para la lectura. Este test de tipo gráfico no verbal, se puede cumplimentar a partir de los 5 años, de forma individual o colectiva, con un límite de tiempo para su realización de 15 minutos.<sup>(9)</sup>

Para la interpretación de resultados, se hace uso de un baremo de corrección, de tal forma que puntuaciones entre 72 y 79, se interpreta como apto para la lectura, entre 57 y 71 madurez media suficiente, entre 52 y 56 caso límite, y por debajo de 50, inmadurez para la lectura.

En nuestro caso, a la edad de 5 años, nuestro paciente obtuvo una puntuación de 60 (madurez media suficiente).

– PPVT – III:

Dicho test se realiza a edades comprendidas entre los 2 años y medio y los 18 años. Evalúa el nivel de vocabulario receptivo. Se trata de un test de rendimiento que mide el nivel de adquisición de vocabulario de una persona. Además se puede usar para la detección rápida de dificultades o para el cribado de la actitud verbal. Así el PPVT-III puede ser incluido como un dato más dentro de una batería de tests para evaluar procesos cognitivos.

En nuestro paciente, dicho estudio se realizó a la edad de 3 años y 2 meses, obteniendo una puntuación directa de 34, lo que se relaciona con un CI de 111, situándose en un percentil 75 con respecto a la población general.

Después del análisis de todos los test realizados, observamos que, pese que en algún momento evolutivo ha presentado retraso en el desarrollo motor y de lenguaje, dicha afectación no es tan importante como la presentada en pacientes con SCdL y además se ha producido una evidente mejoría a lo largo de los años, lo que ha

permitido una mejor adaptación del paciente en el ámbito escolar y correcto desarrollo, aunque con más dificultades en la adquisición de habilidades propias de la edad.

A continuación, se adjunta una tabla resumen, en la que se recogen los datos clínicos presentes en el caso índice, con la correspondiente nomenclatura HPO.

<b>SIGNO CLÍNICO CASO ÍNDICE</b>	<b>Clasificación HPO</b>
<b>ALTERACIONES CRANEOFACIALES</b>	
Sinofridia ( <i>synophrys</i> )	HP:0000664
Pestañas largas ( <i>long eyelashes</i> )	HP:0000527
Philtrum prominente ( <i>prominent philtrum</i> )	HP:0002002
Philtrum largo ( <i>long philtrum</i> )	HP:0000343
Puente nasal deprimido ( <i>depressed nasal bridge</i> )	HP:0005280
Puente nasal ancho ( <i>wide nasal bridge</i> )	HP:0000431
Labio superior fino ( <i>thin upper lip</i> )	HP: 0000219
Comisuras labiales hacia abajo ( <i>downturned corners of the mouth</i> )	HP:0002714
<b>TRASTORNOS DEL DESARROLLO</b>	
Talla <P3 al nacimiento ( <i>birth length less than 3rd percentile</i> )	HP:0003561
Bajo peso al nacimiento ( <i>small for gestational age</i> )	HP:0001518
Hipotonía ( <i>infantile muscular hypotonia</i> )	HP:0008947
Retraso del desarrollo ó discapacidad intelectual ( <i>global developmental delay/intellectual disability</i> )	HP:0001263
<b>ALTERACIONES DEL COMPORTAMIENTO</b>	
Déficit de atención ± hiperactividad ( <i>attention deficit hyperactivity disorder</i> )	HP:0007018
Ansiedad ( <i>anxiety</i> )	HP:0000739
<b>ALTERACIÓN EN EXTREMIDADES</b>	
Clinodactilia de 5º dedo ( <i>clinodactyly of the 5th finger</i> )	HP:0004209
<b>NEUROSENSORIAL/PIEL</b>	
Ptosis palpebral ( <i>congenital bilateral palpebral ptosis</i> )	HP:0007911
Epilepsia ( <i>seizures</i> )	HP:0001250
Hirsutismo generalizado ( <i>hirsutism</i> )	HP:0001007
Mamas y/u ombligo pequeños ( <i>breast/umbilicus aplasia/hypoplasia</i> )	HP:0010311
Hipermetropía ( <i>hypermetropia</i> )	HP:0000540
<b>OTROS SISTEMAS</b>	
Reflujo gastroesofágico ( <i>gastroesophageal reflux</i> )	HP:0002020
Ictericia neonatal ( <i>prolonged neonatal jaundice</i> )	HP:0006579
Insuficiencia tricuspídea ( <i>tricuspid regurgitation</i> )	HP:0005180

**TABLA 4.2.** Signos clínicos del caso índice según clasificación HPO. Tabla de elaboración propia.

#### 4.1.2 Criterios diagnósticos de Kline

Dados los hallazgos clínicos sugestivos de afectación de SCdL, se hace uso de los criterios diagnósticos de Kline, para confirmar su cumplimiento. A continuación se expone cada uno de los criterios que cumple nuestro caso índice, recogidos en una tabla adaptada.

Como queda reflejado en dicha tabla, si aplicamos ambas posibilidades diagnósticas expuestas en el apartado material y métodos, comprobamos que el paciente cumple con los criterios diagnósticos de Kline. Se observa la presencia de criterios de alteración craneal, así como dos de las tres categorías siguientes: alteraciones del desarrollo, del crecimiento y alteraciones del comportamiento, siendo positivas tanto la categoría de alteraciones del desarrollo como de comportamiento. Podemos afirmar de esta manera que se cumple la posibilidad diagnóstica nº1.

Así mismo, si se contempla la posibilidad diagnóstica nº2, se cumplen los criterios craneofaciales, así como criterios de 3 de las 6 categorías restantes, siendo una de ellas la correspondiente a las alteraciones del comportamiento y del desarrollo.

Se puede concluir entonces que, el paciente cumple clínicamente con los criterios diagnósticos de SCdL.

<b>DIAGNÓSTICO CLÍNICO DEL SCdL. CRITERIOS DE KLINE</b>		
Posibilidad nº 1	+	
Posibilidad nº 2	+	
<b>ALTERACIONES CRANEOFACIALES (Sinofridia + 3 criterios)</b>		
Sinofridia	+	
Pestañas largas	+	
Nariz pequeña con narinas antevertidas	-	
<i>Philtrum</i> largo y prominente	+	
Puente nasal ancho y deprimido	+	
Mentón pequeño y cuadrado	-	
Labios finos y comisuras bucales hacia abajo	+	
Paladar elevado, diastema dentario	-	
<b>ALTERACIÓN DEL DESARROLLO (1 ó más criterios)</b>		
Retraso psicomotor o discapacidad intelectual	+	
Dificultad en el aprendizaje	+	
<b>ALTERACIONES DEL CRECIMIENTO (2 ó más criterios)</b>		
Peso <P5 según la edad	-	
Longitud o talla <P5 según la edad	-	
Perímetro cefálico <P5 según la edad	-	
<b>ALTERACIONES EN EL COMPORTAMIENTO (2 ó más criterios)</b>		
Déficit de atención ± hiperactividad	+	
Comportamiento obsesivo-compulsivo	-	
Ansiedad	+	
Agresividad	-	
Comportamiento autolesivo	-	
Timidez extrema	-	
Rasgos autistas (TEA)	-	
<b>ALTERACIÓN EN EXTREMIDADES</b>		
Defectos de reducción con ausencia de antebrazos (definitorio)	-	
Manos y/o pies pequeños (por debajo del percentil 3) u oligodactilia	-	
+ 2 ó más criterios	Clinodactilia de 5º dedo (bilateral)	+
	Línea palmar única (surco de los 4 dedos)	-
	Extensión limitada de codos	-
	1º metacarpiano corto/localización proximal de pulgares	-

	Deformidades en los dedos de los pies	-
	Sindactilia 2-3 en pies	-
	Escoliosis	-
	<i>Pectus excavatum</i>	-
	Displasia o dislocación de caderas	-
Ninguna de las anteriores		
+ 3 o más criterios	Clinodactilia de 5º dedo (bilateral)	+
	Línea palmar única (surco de los 4 dedos)	-
	Extensión limitada de codos	-
	1º metacarpiano corto/localización proximal de pulgares	-
	Deformidades en los dedos de los pies	-
	Sindactilia 2-3 en pies	-
	Escoliosis	-
	<i>Pectus excavatum</i>	-
	Displasia o dislocación de caderas	-
<b>NEUROSENSORIAL/PIEL (3 ó más criterios)</b>		
	Ptosis palpebral	+
	Malformación del conducto lacrimal o blefaritis	-
	Miopía $\geq -6D$	-
	Malformaciones oculares mayores o pigmentación peripapilar	-
	Sordera o pérdida de audición (hipoacusia)	-
	Epilepsia	+
	Cutis marmorata	-
	Hirsutismo generalizado	+
	Mamas y/u ombligo pequeños	+
	Malrotación/malformación intestinal	-
<b>OTROS SISTEMAS (3 ó más criterios)</b>		
	Hernia diafragmática	-
	Reflujo gastroesofágico	+
	Fisura palatina	-
	Defectos cardíacos congénitos	-
	Micropene	-
	Hipospadias	-
	Criptorquidismo	-
	Malformaciones renales o del tracto urinario	-

**TABLA 4.3.** Diagnóstico clínico según criterios de Kline. Tabla de elaboración propia.

Si bien es cierto que nuestro paciente cumple dichos criterios, hecho que nos acerca al diagnóstico clínico de SCdL, podemos ver como aquellos rasgos que clásicamente más se han relacionado con dicho síndrome no están presentes en el caso índice. Hablamos fundamentalmente de las alteraciones que afectan a extremidades. No encontramos defectos de reducción con ausencia de antebrazos, rasgo definitorio del síndrome y manifestación grave, ni tampoco otros rasgos de menor gravedad.

Sin embargo, a nivel facial sí encontramos la mayoría de los rasgos fenotípicos que se han descrito en el síndrome, a pesar de que la intensidad de manifestación no es tan intensa como en otros casos descritos en la literatura.

Todo esto puede explicarse con el hecho de que el SCdL se caracteriza por su gran heterogeneidad, tanto a nivel genético, como también clínico, pudiendo encontrar una gran variabilidad en el espectro clínico de presentación en cada paciente, modificado principalmente por el tipo de mutación y la localización de la misma.

Es por tanto en estos casos, donde encontramos un verdadero reto diagnóstico, sumando a ello el conocimiento de la muy probable existencia de mutaciones distintas a las descritas hasta el momento actual, que hacen que la búsqueda de la justificación genética de las manifestaciones clínicas y su clasificación dentro del SCdL sea una tarea muy compleja.

#### 4.1.3 Escala de valoración de Gillis.

A continuación se expone la aplicación de la escala de valoración Gillis para el caso índice. Aparece en área sombreada los parámetros y la clase correspondiente de nuestro paciente, observando que cumple criterios de clase leve para las alteraciones de extremidades y desarrollo de habilidades cognitivas, mientras que en el caso del parámetro crecimiento, la afectación sería moderada. Estaríamos entonces ante una forma leve-moderada de SCdL.

PARÁMETROS	CLASE I (Leve)	CLASE II (Moderada)
Reducción en las extremidades	No reducción	Alteraciones parciales (> 2 dedos en cada mano)
Desarrollo y habilidades cognitivas	Retraso motor < 2 años Presentación capacidad de habla y comunicación	Retraso motor > 2 años, habla y comunicación limitada
Crecimiento*	> percentil 75	Entre percentil 25 - 75

**TABLA 4.4** Aplicación de escala de valoración Gillis según clínica del caso índice. Tabla de elaboración propia.

#### 4.1.4 Valoración clínica Sd. Delección 16p11.2.

A continuación se adjunta una tabla resumen donde se recogen los datos clínicos que presenta nuestro paciente, coincidentes con algunos de los descritos en la literatura como presentes en el Síndrome de delección 16p11.2.

		Delección 16p11.2	Duplicación 16p11.2
Datos perinatólogicos	Edad gestacional	A término	A término
	Tipo de parto	Eutócico	Eutócico
	Adaptación CR	Inestabilidad al nacimiento	Inestabilidad al nacimiento
	Comorbilidad	Ictericia	Ictericia

	<b>postnatal</b>	Policitemia	Policitemia
		Hipoglucemia	Hipoglucemia
		Hipotermia	Hipotermia
<b>Craneofaciales</b>	<b>Frente amplia</b>	+/-	+ (menos marcado)
	<b>Micrognatia</b>	+/-	+ (menos marcado)
	<b>Aplanamiento de región malar</b>	+/-	+ (menos marcado)
	<b>Hipertelorismo ocular</b>	+/-	+ (menos marcado)
	<b>Fisura palatina</b>	+/-	+
<b>Crecimiento</b>	<b>Perímetro cefálico</b>	Aumentado	Disminuido
	<b>Peso</b>	Obesidad	Bajo peso
	<b>Talla</b>	Baja	Baja
<b>Desarrollo</b>	<b>Retraso motor</b>	Presente en 50% (leve)	Presente
	<b>Retraso cognitivo (lenguaje)</b>	Presente	Presente (más grave)
<b>Comportamiento</b>	<b>TEA/Autismo</b>	+/-	+/-
	<b>TDAH</b>	+/-	+/- (más frecuente que en delección)
<b>Extremidades</b>	<b><i>Pectus excavatum</i></b>	-	+/-
	<b><i>Pectus carinatum</i></b>	-	+/-
	<b>Pies planos</b>	-	+/-
	<b>Polidactilia</b>	+/-	-
	<b>Fusión de costillas</b>	+/-	-
	<b>Escoliosis</b>	-	+/-
<b>Neurosensorial</b>	<b>Convulsiones</b>	+/-	+/-
	<b>Miopía</b>	+/-	+/-
	<b>Alteración cuerdas vocales</b>	+	-
<b>Otros sistemas</b>	<b>Hernia diafragmática</b>	+/-	-
	<b>Reflujo GE</b>	+/-	+/-
	<b>Cardiopatía</b>	+/-	-



	<b>congénita</b>		
	<b>Hipospadias</b>	-	+/-
	<b>Fimosis</b>	-	+/-
	<b>Riñón displásico</b>	+/-	-
	<b>Estenosis pilórica</b>	+/-	-

**TABLA 4.5.** Características clínicas Sd de reordenamiento 16p11.2, según se trate de delección o duplicación de la región 11.2.

En dicha tabla podemos observar que, pese a que nuestro paciente cumple algunos de los rasgos clínicos concordantes con el síndrome, la gran variabilidad y la inexistencia de rasgos clínicos definitorios del mismo, dificulta la justificación de todas las manifestaciones que presenta nuestro paciente a través del diagnóstico de Síndrome de delección 16p11.2. Sin embargo, es cierto que las alteraciones del desarrollo y del comportamiento que presenta, tal y como ha quedado reflejado en apartados anteriores, sí se relacionan con mayor intensidad con este síndrome, y acercan a nuestro paciente a dicho diagnóstico.

## 4.2. Resultados de laboratorio.

### **4.2.1. Secuenciación Sanger**

Mediante dicha técnica molecular se estudiaron 5 genes causales de SCdL: *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*. Los resultados de los mismos se exponen a continuación.

#### 4.2.1.1. Estudio del gen *NIPBL*:

##### RESULTADOS:

GEN <i>NIPBL</i>		
Mutación encontrada	Cambio de aminoácido	Exón/Intrón
Ninguna	-	-

**TABLA 4.6** Mutación encontrada en gen *NIPNL*.

No se ha detectado ninguna mutación en los exones del gen *NIPBL*, responsable del 50% de los casos de Síndrome de Cornelia de Lange. Sin embargo, se han encontrado cuatro polimorfismos intrónicos sin significación patológica que se indica en la tabla inferior.

La no identificación de mutaciones en este gen no excluye el diagnóstico del SCdL.

POLIMORFISMOS	
c.3855+52A>G	Intrón 16
c.4239+53T>C	Intrón 18
c.5575-193T>C	Intrón 29
c.6109-3T>C	Intrón 34

**TABLA 4.7** Polimorfismos encontrados en gen NIPNL.

#### 4.2.1.2. Estudio del gen SMC1A:

##### RESULTADOS:

GEN SMC1A		
Mutación encontrada	Cambio de aminoácido	Exón/Intrón
Ninguna	-	-

**TABLA 4.8** Mutación encontrada en gen SMC1A.

El paciente no presenta ninguna mutación en el gen SMC1A responsable del 5% de casos del Síndrome de Cornelia de Lange. Sin embargo, se ha encontrado un polimorfismo conocido y sin significación patológica que se indica en la tabla inferior.

La no identificación de mutaciones en este gen no excluye el diagnóstico de SCdL.

POLIMORFISMOS	
c.1338-32C>A	Intrón 18

**TABLA 4.9** Polimorfismos encontrados en gen SMC1A.

#### 4.2.1.3. Estudio del gen SMC3:

##### RESULTADOS:

El paciente no presenta ninguna mutación en el gen SMC3, responsable, en algunos casos, del SCdL. Sin embargo se han encontrado varios polimorfismos conocidos sin aparente significación patológica que se indican en la tabla de resultados. La no identificación de mutaciones en este gen no excluye el diagnóstico de SCdL.

GEN SMC3		
Mutación encontrada (NM_005445.3)	Exón	Cambio de aminoácido (NP_005436.1)
Ninguna	-	-

**TABLA 4.10** Mutación encontrada en gen SMC3.

Polimorfismos(NM_005445.3)	Intrón/Exón	dbSNP
c.548-45A>C (Heterocigosis)	I 8	rs2275570
c.724-206_201delTTGTAG (Heterocigosis)	I 9	rs1384492046
c.970-8G>A(Heterocigosis)	I 11	rs11195199
c.1092-18T>C(Heterocigosis)	I 12	rs11195200
c.1305+165_166insTC(Heterocigosis)	I 13	rs72427324
c.1306-159A>G(Heterocigosis)	I 13	rs2419572
c.2116+23G>A(Homocigosis)	I 19	rs7075340
c.2644+48A>G(Heterocigosis)	I 23	rs11195213
c.3039A>G,p.(=)(Homocigosis)	E 25	rs2419565

**TABLA 4.11** Polimorfismos encontrados en gen SMC3. Tabla adaptada

#### 4.2.1.4. Estudio del gen *RAD21*:

##### RESULTADOS:

El paciente no presenta ninguna mutación en el gen *RAD21*, tal y como se refleja en la siguiente tabla

GEN RAD21		
Mutación (NM_006265.2)	Exón	Cambio de aminoácido (NP_006256.1)
Ninguna	-	-

**TABLA 4.12** Mutación encontrada en gen RAD21.

Sin embargo se han encontrado varios polimorfismos conocidos sin aparente significación patológica que se indican en la tabla de resultados.

<b>Polimorfismos (NM_006265.2)</b>	<b>Intrón/Exón</b>	<b>Cambio de aminoácido (NP_006356.1)</b>
c.274+37_38insGTT (Heterocigosis)	I 3	rs2275570
c.688+8G>A (Heterocigosis)	I 6	rs1384492046

**TABLA 4.13** Polimorfismos identificados en el gen *RAD21*.

#### 4.2.1.5. Estudio del gen *HDAC8*:

##### RESULTADOS:

No se ha caracterizado ninguna mutación en el gen *HDAC8* del paciente. Según la literatura, este gen es responsable de aproximadamente el 4% de los casos del Síndrome Cornelia de Lange (SCdL). La no identificación de mutaciones en este gen no excluye el diagnóstico de Síndrome Cornelia de Lange. El paciente debe recibir consejo genético en una consulta especializada.

<b>GEN <i>HDAC8</i></b>		
<b>Mutación (NM_018486.2)</b>	<b>Exón</b>	<b>Cambio de aminoácido (NP_080956.1)</b>
Ninguna	-	-

**TABLA 4.14** Mutaciones encontradas en gen *HDAC8*.

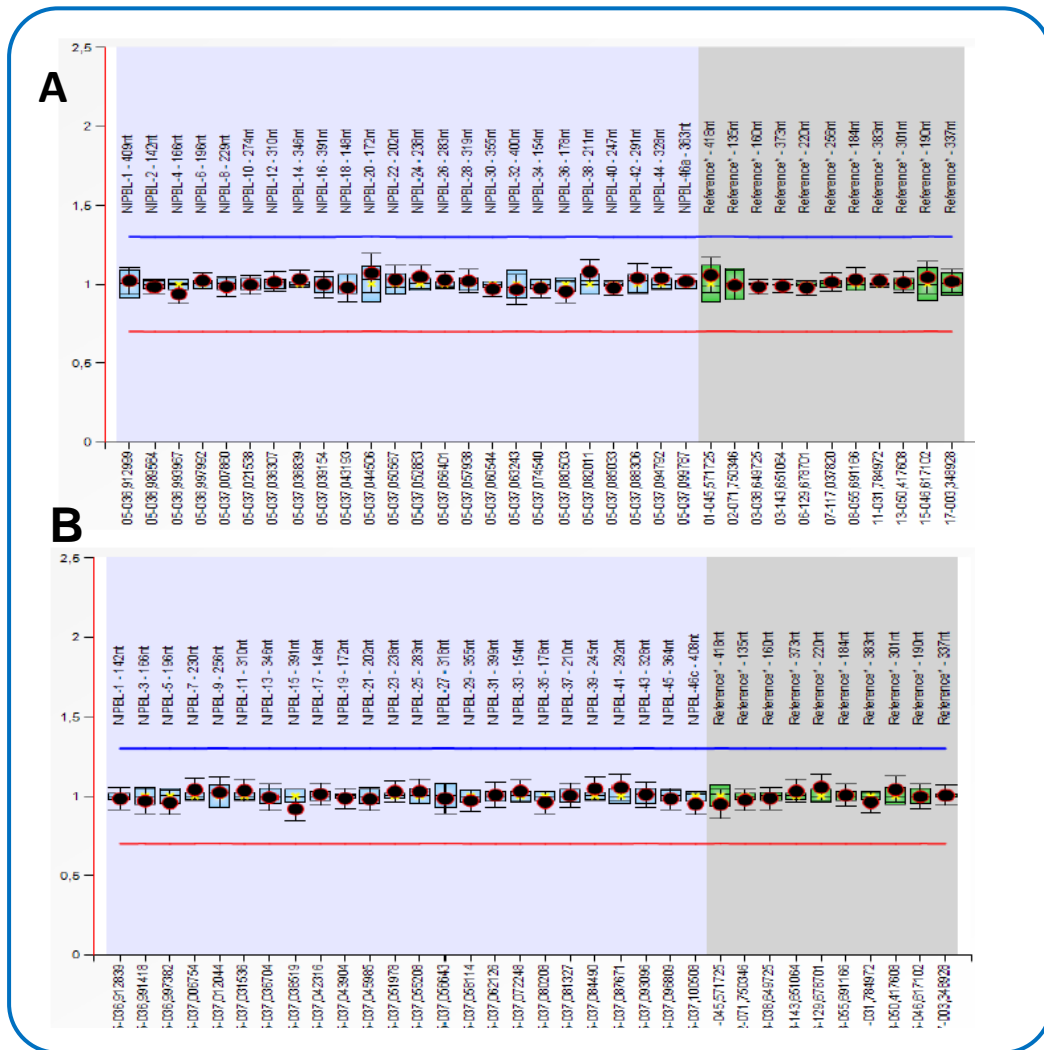
#### 4.2.2. MLPA

El estudio molecular se ha realizado en el Laboratorio de Genética Clínica y Genómica Funcional de la Universidad de Zaragoza.

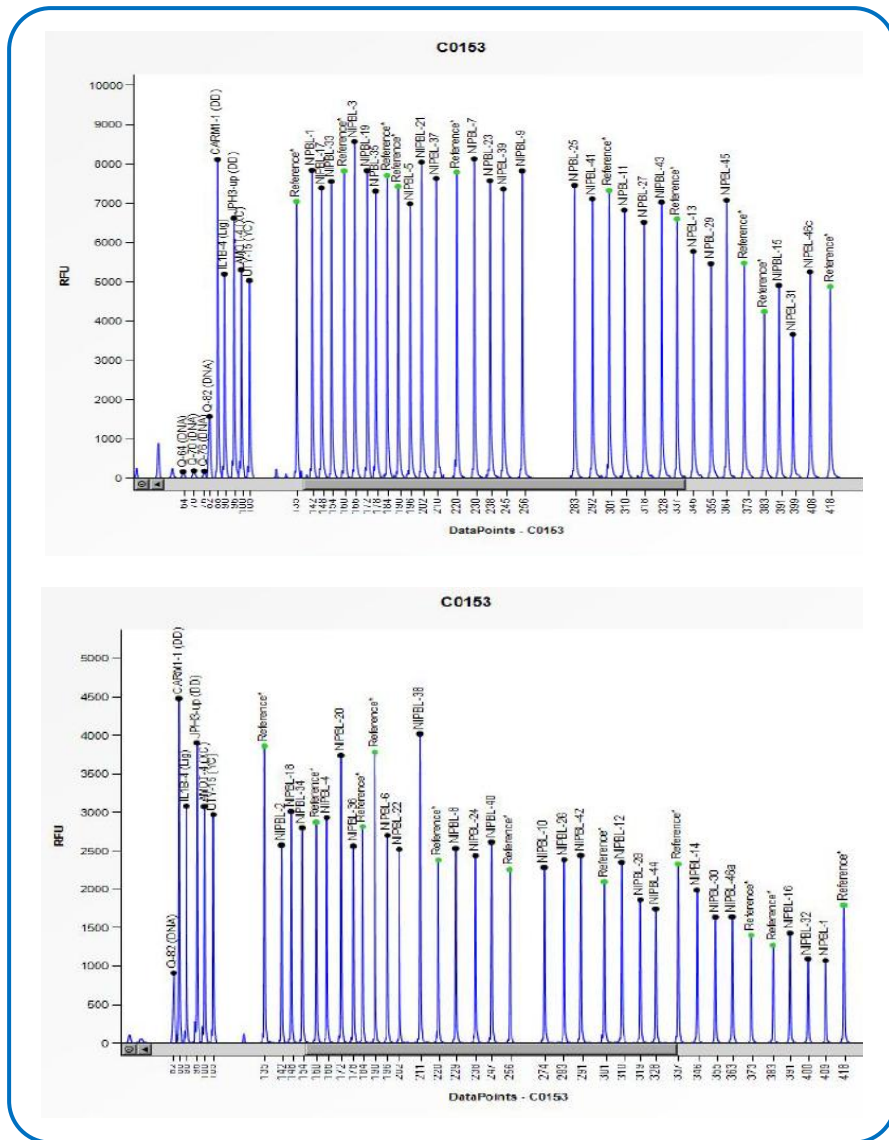
Tras su realización, se concluye que el paciente no presenta alteración del número de copias (*CNV, Copy Number Variations*) en el gen *NIPBL*, estudiadas mediante la técnica *MLPA*. Estudios recientes han mostrado que las deleciones intragénicas en el gen *NIPBL* están presentes en el 2.5% de los pacientes con Síndrome Cornelia de Lange.

La no identificación de variantes no excluye el diagnóstico genético de Síndrome de Cornelia de Lange.

A continuación se exponen los resultados mediante gráfica de ratios, electroforesis capilar y dosis relativa calculada mediante el software Coffalyser.



**FIGURA 4.2.** Resultado MLPA en nuestro paciente. Organización de las sondas en su localización cromosómica correspondiente. En el eje X, que representada la cobertura de cada sonda de MLPA en la secuencia de ADN (gen NIPBL). En el eje Y, se indica la Dosis Relativa o Ratio. Por debajo de 0,7 o por encima de 1,3 se considera delección o duplicación de la región respectivamente. **A.** Sondas Probemix 141. Sin alteraciones. **B.** Probemix 142. Sin alteraciones. Se descarta mutación en gen NIPBL



**FIGURA 4.3.** Resultado MLPA en nuestro paciente. Electroforesis capilar. Análisis de producto obtenido en función del pico de señal.

MLPA GEN NIPBL			
REGIÓN ANALIZADA		DOSIS RELATIVA (RATIO)	RESULTADO
Localización cromosómica	GEN-EXÓN		
Kit MLPA_NIPBL_p141			
GEN NIPBL (5p13.2)	NIPBL-1	0,98	Normal
	NIPBL-3	0,97	Normal
	NIPBL-5	0,96	Normal
	NIPBL-7	1,04	Normal
	NIPBL-9	1,02	Normal
	NIPBL-11	1,04	Normal
	NIPBL-13	0,99	Normal
	NIPBL-15	0,92	Normal
	NIPBL-17	1,01	Normal
	NIPBL-19	0,99	Normal
	NIPBL-21	0,98	Normal
	NIPBL-23	1,03	Normal
	NIPBL-25	1,03	Normal
	NIPBL-27	0,99	Normal
	NIPBL-29	0,97	Normal
	NIPBL-31	1,01	Normal
	NIPBL-33	1,03	Normal
	NIPBL-35	0,96	Normal
	NIPBL-37	1	Normal
	NIPBL-39	1,05	Normal
	NIPBL-41	1,05	Normal
NIPBL-43	1,01	Normal	
NIPBL-45	0,98	Normal	
NIPBL-46c	0,95	Normal	
Kit MLPA_NIPBL_p142			
GEN NIPBL (5p13.2)	NIPBL-1	1,02	Normal
	NIPBL-2	0,98	Normal
	NIPBL-4	0,94	Normal
	NIPBL-6	1,02	Normal
	NIPBL-8	0,99	Normal
	NIPBL-10	1	Normal
	NIPBL-12	1,02	Normal
	NIPBL-14	1,03	Normal
	NIPBL-16	1	Normal
	NIPBL-18	0,98	Normal
	NIPBL-20	1,07	Normal
	NIPBL-22	1,03	Normal
	NIPBL-24	1,05	Normal
	NIPBL-26	1,03	Normal
	NIPBL-28	1,02	Normal
	NIPBL-30	0,97	Normal
	NIPBL-32	0,97	Normal
	NIPBL-34	0,97	Normal
	NIPBL-36	0,95	Normal
	NIPBL-38	1,08	Normal
	NIPBL-40	0,98	Normal
NIPBL-42	1,04	Normal	
NIPBL-44	1,04	Normal	
NIPBL-46a	1,02	Normal	

**TABLA 4.15.** Resultado MLPA en nuestro paciente. Dosis relativa calculada mediante el software Coffalyser. Todas ellas muestran valores comprendidos entre 0,7 y 1,3, por lo que se descarta mutación. Tabla adaptada.

#### 4.2.3. Panel de Secuenciación masiva

La secuenciación masiva se llevó a cabo en un laboratorio externo, en concreto en la Sección de Genética Funcional del Instituto de Genética Humana de la Universidad de Lübeck, dirigida por el profesor *Frank J Kaiser*, tras la inclusión de nuestro paciente en un estudio llevado a cabo por él mismo.

En dicho estudio se incluyeron a 7 pacientes con fenotipo clínico compatible con SCdL. El objetivo del mismo era la caracterización molecular de los pacientes con fenotipo de SCdL con el fin de detectar la posible relación de dicho fenotipo con mutaciones en los genes reguladores de cromatina que producen otros trastornos del desarrollo neurológico incluidos en el diagnóstico diferencial del SCdL.<sup>(14)</sup>

El resultado de dicha secuenciación masiva fue negativo.

#### 4.2.4 Cariotipo

Fue realizado estudio citogenético en linfocitos tras cultivo.

El informe del dicho estudio muestra como resultados, lo que a continuación se expone:

- Todas las metafases examinadas, tras cultivo de linfocitos, presentan 47 cromosomas, no observándose ninguna alteración de tipo estructural.
- Fórmula cromosómica: **47, XXY** que se corresponde con un **Síndrome de Klinefelter**.

#### 4.2.5. CGH-Array

El análisis se ha llevado a cabo en un laboratorio externo, concretamente en el laboratorio qGenomics de Barcelona. Se recogieron muestras tanto del caso índice como de sus padres.

Para el estudio se ha utilizado un microarray de oligonucleótidos de hibridación genómica comparada de aproximadamente 60.000 sondas, distribuidas a lo largo de todo el genoma (*qChip Post*). La muestra remitida se ha hibridado frente a un ADN de referencia interno del mismo sexo. Los datos obtenidos se han analizado con el software Genomic Workbench 7.0 y se han interpretado siguiendo los parámetros que se especifican a continuación (Tabla 4.16).

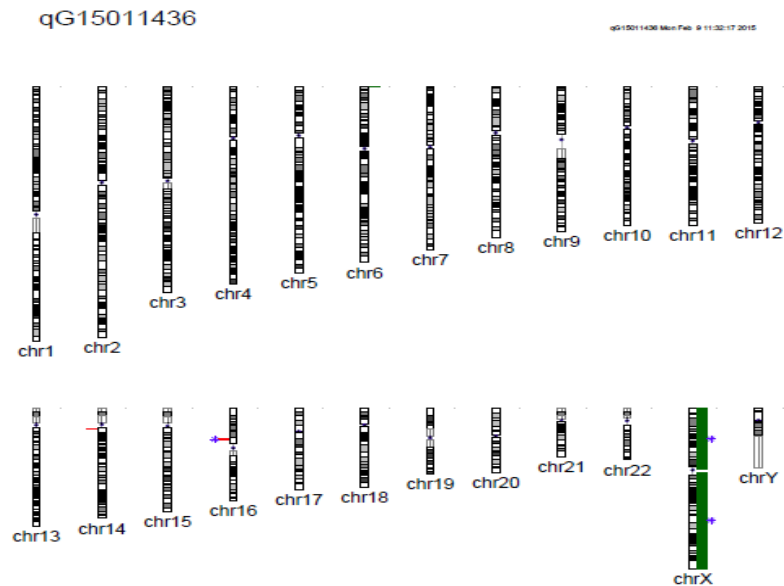
<b>Tipo de Array</b>	qChip Post
<b>Control Hibridación</b>	20M (male)
<b>Tipo Hibridación</b>	Marcaje directo
<b>Calidad Hib. (Agilent's DLRS):</b>	0.099
<b>Software Análisis</b>	Genomic Workbench 7.0
<b>Parámetros Detec. Alteraciones:</b>	Algorithm ADM2 _ 6;0; abs(log2ratio) _ 0;25; probes _ 3
<b>Ensamblaje de Referencia</b>	hg18
<b>Plataforma</b>	Agilent Technologies

**TABLA 4.16.** *Parámetros de estudio de aCGH de nuestro paciente. Tabla adaptada.*

El informe emitido tras la realización de la técnica, demuestra la existencia de dos hallazgos que se exponen a continuación:

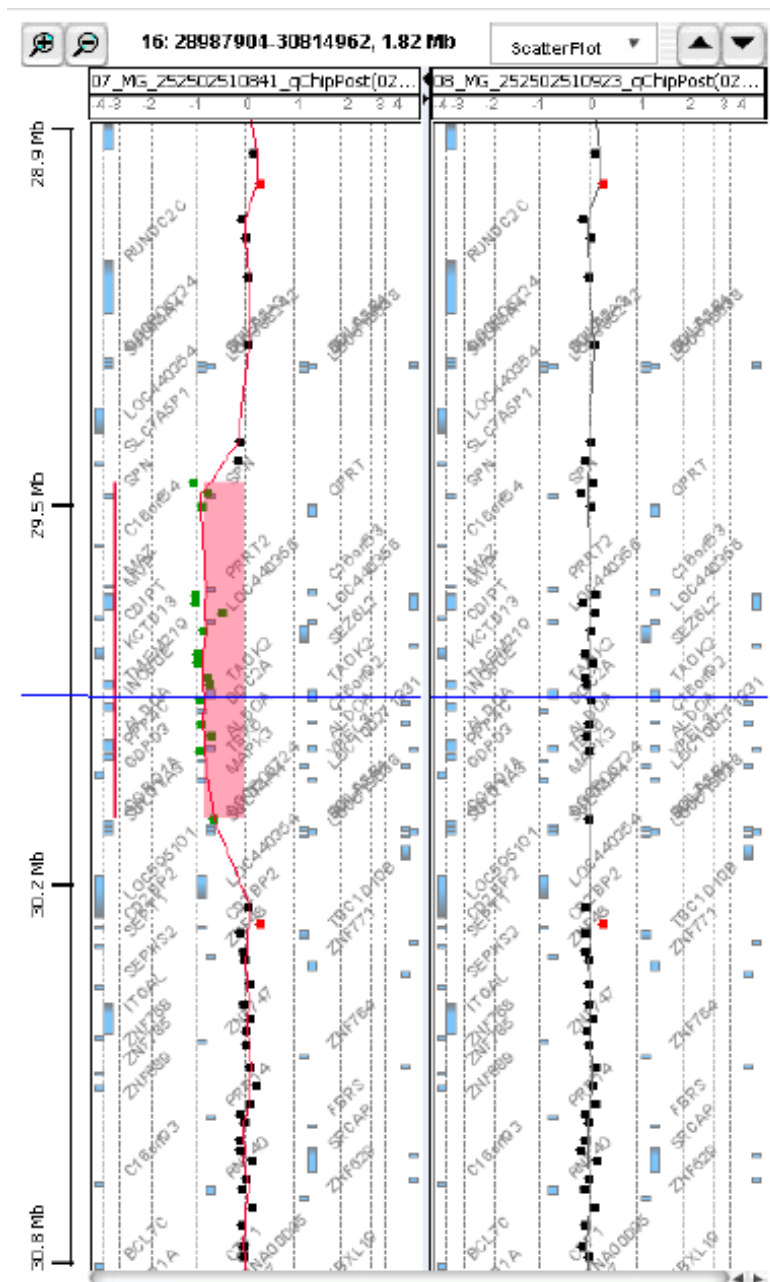


El análisis detallado de la hibridación con el qChip Post, confirma la existencia de un cromosoma X extra, compatible con un cariotipo 47,XXY, que se ha descrito previamente en la bibliografía como causa del síndrome de Klinefelter.



**FIGURA 4.4. Cariotipo Molecular utilizando qChip Post.** Las ganancias, quedan representadas en color verde a la derecha del ideograma y las pérdidas en color rojo, a la izquierda. El asterisco (\*) indica que la variante es potencialmente patogénica porque no se ha reportado en población general. En nuestro paciente se pone de manifiesto la ganancia (color verde a la derecha) en cromosoma X, lo que se traduce en dotación 47, XXY, compatible con Sd. Klinefelter.

El estudio CGH-Array, revela la causa del síndrome que presenta nuestro paciente, poniendo de manifiesto la existencia de una delección de aproximadamente 534Kb en la banda 16p11.2, que coincide con una región de reordenamiento recurrente (síndrome de microdelección 16p11.2, OMIM #611913), que se caracteriza por presentar un fenotipo con penetrancia incompleta y expresividad variable. Cabe destacar que no es descartable un efecto aditivo y/o modificador de las variantes que presenta el caso índice, siguiendo un modelo de doble-hit.



**FIGURA 4.5.** Detalle del cariotipo molecular donde se puede apreciar la delección (línea roja) de  $\sim 534\text{Kb}$  identificada en el caso índice, a nivel de la banda cromosómica 16p11.2, que coincide con una microdelección recurrente de esta banda. A su derecha (línea gris), se puede observar que no hay variación de los valores de  $\log_2\text{ratio}$  de las sondas de esta misma región en la hibridación del padre vs madre.

## 5. DISCUSIÓN

Nos encontramos ante un paciente de etiología compleja y fenotipo atípico compatible en el momento inicial de estudio, con Espectro Cornelia de Lange. Si aplicamos los criterios diagnósticos de Kline y de gravedad de Gillis para SCdL, atendiendo a los rasgos clínicos recogidos en la historia clínica del paciente, comprobamos que cumple con los mismos, clasificándose como caso leve.

De entre ellos, destacan la presencia de retraso de crecimiento, tanto prenatal como perinatal, situándose en percentiles 3, tanto de peso, talla y perímetro cefálico. Dentro de los rasgos faciales destaca la presencia de sinofridia, filtrum largo y pestañas largas, y como manifestación de otros aparatos, la presencia de un importante RGE, que requiere tratamiento médico.

Todos los datos expuestos, son los que motivan el inicio del estudio genético dirigido al diagnóstico molecular de SCdL.

Los resultados nos permiten descartar la presencia de mutaciones características para dicho síndrome, atendiendo a las hasta ahora descritas en la literatura.

Sin embargo, este estudio revela otros resultados no menos importantes.

Presenta un cariotipo 47,XXY, alteración descrita como Síndrome de Klinefelter.

Además, la realización de *CGH-Array*, localiza la presencia de una delección en 16p11.2, descrita como Síndrome delección-duplicación 16p11.2. Existen pocos casos descritos en la literatura, y destaca además la heterogeneidad en dicha presentación. Estamos pues, ante un síndrome no muy bien conocido ni documentado en la literatura, lo que impide el conocimiento de rasgos clínicos típicos y concluyentes que nos ayuden en el diagnóstico de nuestro caso índice. Sin embargo, dicha revisión pone de manifiesto la presencia de algunos rasgos clínicos comunes con el caso índice presentado, tal y como se recoge en el apartado resultados. Casi todos ellos se relacionan con las alteraciones en el neurodesarrollo, sin poder justificar de esta forma, que el fenotipo de nuestro paciente pueda atribuirse en su totalidad a dicha delección.

Si atendemos a la evolución ponderoestatural que presenta nuestro paciente, podemos observar cómo, a pesar de que inicialmente se encontraba en percentiles de peso y talla por debajo de P5 para la población general, el desarrollo que ha presentado hasta el momento actual es satisfactorio, y se contradice con la evolución que suelen presentar los pacientes diagnosticados de SCdL. Dichos pacientes presentan bajo peso y talla, tanto a nivel perinatal como postnatal. Sin embargo,

debemos recordar la alteración cromosómica que presenta nuestro caso, con una dotación 47, XXY, descrita en la literatura como Sd de Klinefelter, caracterizado por talla alta, lo que podría justificar dicha controversia.

Todos los rasgos clínicos típicos que nos acercan al diagnóstico de SCdL, destacando entre ellos la presencia de sinofridia, pestañas largas e importante RGE, quedan en segundo plano tras los resultados moleculares que hablan a favor de una posible justificación de todos ellos, asumiendo el diagnóstico de Síndrome de delección-duplicación 16p11.2.

Sin embargo, asumir este hecho resulta difícil, ya que, a pesar de que los estudios moleculares son claros, a nivel clínico podemos seguir realizando una clara diferenciación entre los rasgos que presenta nuestro paciente, algunos de ellos, claramente relacionados con el SCdL y el espectro de presentación clínica típico, y otros no tan manifiestos, que podrían ser incluidos dentro de las probables manifestaciones clínicas del Síndrome de delección-duplicación 16p11.2, debido a la gran variabilidad clínica que presenta el mismo.

Así pues, observamos cómo, a pesar de la realización de un estudio genético completo, y con los resultados que se derivan del mismo, siguen existiendo limitaciones a la hora de atribuir todas las manifestaciones clínicas a dichos resultados.

Quizás, la ausencia de rasgos clínicos característicos para la delección 16p11.2, y la presencia de manifestaciones que cumplen con los criterios diagnósticos de SCdL, genere más obstáculos a la hora de determinar un diagnóstico final de nuestro paciente.

Sin embargo, este punto de unión entre ambas anomalías moleculares, podría ayudar a guiar el diagnóstico molecular en otros pacientes con fenotipo atípico. Cabe destacar además, que hasta el momento actual, no se habían descrito casos en la literatura con asociación de Síndrome de delección 16p11.2 y cromosopatía (Síndrome de Klinefelter).

La descripción de nuevos casos, como el presentado en esta revisión, nos permite ayudar a establecer adecuadas relaciones genotipo-fenotipo que faciliten la caracterización del paciente y el diagnóstico de futuros casos similares.

## 6. CONCLUSIONES

Se presentan las siguientes conclusiones:

- Se ha descrito el caso de un paciente con fenotipo clínico compatible con SCdL, con escala de valoración de Gillis Clase I (leve).
- Se ha realizado un estudio genómico secuencial, incluyendo: secuenciación Sanger de los genes *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* y *HDAC8*; Secuenciación masiva y CGH-Array siendo dicho estudio negativo para mutaciones en los genes causales de SCdL.
- Se ha documentado alteración en la dotación cromosómica de nuestro paciente consistente en una dotación 47,XXY, lo que se describe en la literatura como Sd de Klinefelter.
- Se ha demostrado además la presencia de una delección localizada en el cromosoma 16, a nivel del brazo corto, en la región 11.2, documentada en la literatura como síndrome de microdelección 16p11.2.
- Dicha delección, tal y como queda reflejado en la literatura, podría justificar las alteraciones a nivel neurológico que presenta nuestro paciente, sin embargo, no explicaría de forma definitiva rasgos fenotípicos presentes, aunque el espectro posible dentro del síndrome es muy heterogéneo.
- Estamos pues, ante un caso con fenotipo clínico atípico, con presencia de rasgos clínicos característicos de SCdL, y otros que podrían atribuirse al síndrome de delección 16p11.2, con estudio genético negativo para el mismo, cariotipo 47,XXY y delección 16p11.2.
- Se establece por tanto, una probable relación entre las manifestaciones fenotípicas de SCdL de presentación más leve y el Síndrome de delección-duplicación 16p11.2.
- El estudio de casos límite y complejos como el presentado en esta revisión, nos ayuda al establecimiento de relaciones genotipo-fenotipo que faciliten la caracterización del paciente y el diagnóstico de futuros casos similares.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. A-C Tabet et al. Duplication 16p11.2p12.2 in twins with autism. *European Journal of Human Genetics*. 2012; 20: 540 - 546.
2. Baquero-Montoya C, Gil-Rodríguez MC, Hernández-Marcos M, Teresa-Rodrigo ME, Vicente-Gabas A, et al. Severe ipsilateral musculoskeletal involvement in a Cornelia de Lange patient with a novel NIPBL mutation. *European Journal of Medical Genetics*. 2014; 57: 503-509.
3. Barbero, J.L. Genetic basis of cohesinopathies. *Appl Clin Genet*. 2013; 6: 15-23.
4. Beck B, Mikkelsen M: Chromosomes in the Cornelia de Lange syndrome. *Hum Genet*. 1981; 59(4):271–276.
5. Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet*. 2013; 132: 359-83.
6. Bose T, Gerton JL. Cohesinopathies, gene expression, and chromatin organization. *J Cell Biol*. 2010; Apr 19;189(2):201-10.
7. Calogero AE<sup>1</sup>, Giagulli VA, Mongioi LM, Triggiani V, Radicioni AF. Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders. *J Endocrinol Invest*. 2017; Jul;40(7):705-712.
8. Moragas C, Carme A. Evaluación del desarrollo en atención temprana. *Revista Interuniversitaria de Formación del Profesorado* [en línea] 2009, 23 (Agosto) : [Fecha de consulta: 10 de agosto de 2017] Disponible en:<<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=27419063004>> ISSN 0213-8646.
9. Fernández-Serrano M. J., Perales J. C., Moreno-López L, Pérez-García M, Verdejo-García, A. Neuropsychological profiling of impulsivity and compulsivity in cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology*. 2012; 219(2): 673-683.
10. Gil MC, Ribate MP, Ramos FJ. Síndrome de Cornelia de Lange. *Protoc diagn ter pediatr*. 2010; 1:1-12.
11. Holder SE, Grimsley LM, Palmer RW, Butler LJ, Baraitser M. Partial trisomy 3q causing mild Cornelia de Lange phenotype. *J Med Genet*. 1994; 31: 150-152.
12. Hoppman-Chaney N, Jang JS, Jen J, Babovic-Vuksanovic D, Hodge JC. Inframe multi-exon deletion of SMC1A in a severely affected female with Cornelia de Lange syndrome. *Am J Med Genet A*. 2012; 158A(1):193–198.

13. Ireland M, English C, Cross I, Houldsby WT, Burn J. A. De novo translocation t(3;17)(q26.3;q23.1) in a child with Cornelia de Lange syndrome. *J Med Genet.* 1991; 28:639-640.
14. Kaiser FJ, Parenti I, Teresa-Rodrigo ME, Pozojevic J, Ruiz S, Bader I, et al. Mutations in chromatin regulators functionally link Cornelia deLange syndrome and clinically overlapping phenotypes *Hum Genet.* 2017; 136:307–320.
15. Karen L.Russell, Jeffrey E.Ming, Ketan Patel, Lori Jukofsky, Mark Magnusson and Ian D.Krantz. Dominant Paternal Transmission of Cornelia de Lange syndrome: A new case and review of 25 previously reported familial recurrences. *American Journal of Medical Genetics.* 2001; 104: 267-276.
16. Kline A.D. et al. Cornelia de Lange Syndrome: clinical review, diagnostic and scoring systems, and anticipatory guidance. *Am J Med Genet Part A.* 2007. 143 (12): 1287-1296.
17. Klosovskii BN, Iankova MF, Fateeva EM, Damanskaia L: On the problem of the De Lange's syndrome. *Pediatrics.* 1968, 47(8):33–39.
18. Liu J, Krantz ID: Cornelia de Lange syndrome, cohesin, and beyond. *Clin Genet.* 2009; 76(4):303–314.
19. Lopez-Serra, L.; Kelly, G.; Patel, H.; Stewart, A.; Uhlmann, F.: “TheScc2-Scc4 complex acts in sister chromatid cohesion and transcriptional regulation by maintaining nucleosome-free regions”. *Nature Genetics.* 2014; 46:1147-1151.
20. Mannini L, Cucco F, Quarantotti V et al. Mutation Spectrum and Genotype-Phenotype Correlation in Cornelia de Lange Syndrome. *Hum Mutat.* 2013; 34 (12).
21. Martínez-Frías ML, Bermejo E, Félix V, Jiménez N, Gómez-Ullate J, López JA, et al. Síndrome de Brachmann de Lange en nuestro medio: Características clínicas y epidemiológicas. *An Esp Pediatr.* 1998; 48:293-298.
22. Milone R, Valetto A, Bertini V, Sicca F. Benign infantile seizures followed by autistic regression in a boy with 16p11.2 deletion. *Epileptic Disord.* 2017; 19 (2): 222-25.
23. MRC- Holland. *MLPA General Protocol.*; 2014. [www.mlpa.com](http://www.mlpa.com).
24. MRC- Holland. *SALSA MLPA Probemix P141-A3 / P142-A3 NIPBL MRC-Holland*; 2015
25. Preus M, Rex AP. Definicion and diagnosis of the Bachmann-de Lange síndrome. *Am J Med Genet.* 1983; 16:301-312.

26. Ramos FJ, Puisac B, Baquero-Montoya C, Gil-Rodríguez MC, Bueno I, Deardorff MA et al. Clinical utility gene card for: Cornelia de Lange syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2014.
27. Ronan JL, Wu W, Crabtree GR: From neural development to cognition: unexpected roles for chromatin. *Nat Rev Genet* 2013; 14: 347-59.
28. Santen GW, Aten E, Sun Y, Almomani R, Gilissen C, Nielsen M, et al. Mutations in SWI/SNF chromatin remodeling complex gene *ARID1B* cause Coffin-Siris syndrome. *Nat Rev Genet* 2012; 44: 379-380.
29. Shinawi M, Liu P, Kang SH, Shen J, Belmont JW, et al. Recurrent reciprocal 16p11.2 rearrangements associated with global developmental delay, behavioural problems, dysmorphism, epilepsy, and abnormal head size. *J Med Genet*. 2010; 47(5): 332–341.
30. Steinman KJ, Spence SJ, Ramocki MB, Proud MB, Kessler SK, Marco EJ, et al. 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort. *Am J Med Genet A*. 2016;170(11):2943-2955.
31. Wierzba et al. Cornelia de Lange syndrome with NIPBL mutation and mosaic Turner syndrome in the same individual. *BMC Medical Genetics* 2012, 13:43.



## **8. ANEXOS**

### **Anexo 1: Abreviaturas**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
CGH-Array	Array de hibridación genómica comparativa
BrEt	Bromuro de etidíol
CI	Cociente intelectual
CIV	Comunicación interventricular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
dsADN	ADN de doble hebra
ECdL	Espectro Cornelia de Lange
EDTA	Etilendiaminotetraacetato
et al.	Y otros
g	Gramo
H <sub>2</sub> O	Agua
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
mb	megabase
mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
mL	Mililitro
MLPA	Multiplex Ligation Probe Analysis
mmol	Milimol
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
CINa	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
nmol	Nanomol
Nº	Número
°C	Grado centígrado
OMIM*	Herencia Mendeliana en el hombre online, referencia para un gen
OMIM#	Herencia Mendeliana en el hombre online, referencia para una enfermedad
pb	Pares de bases
PC	Perímetro cefálico

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
ClK	Cloruro potásico
SK	Síndrome de Klinefelter
ARNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RSC	Complejo remodelador de la cromatina
SCdL	Síndrome de Cornelia de Lange
TBE	Tris-Borato-EDTA
TS	Turner Syndrom
WT o wt	Wild type
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol

## SÍMBOLOS DE BASES NITROGENADAS

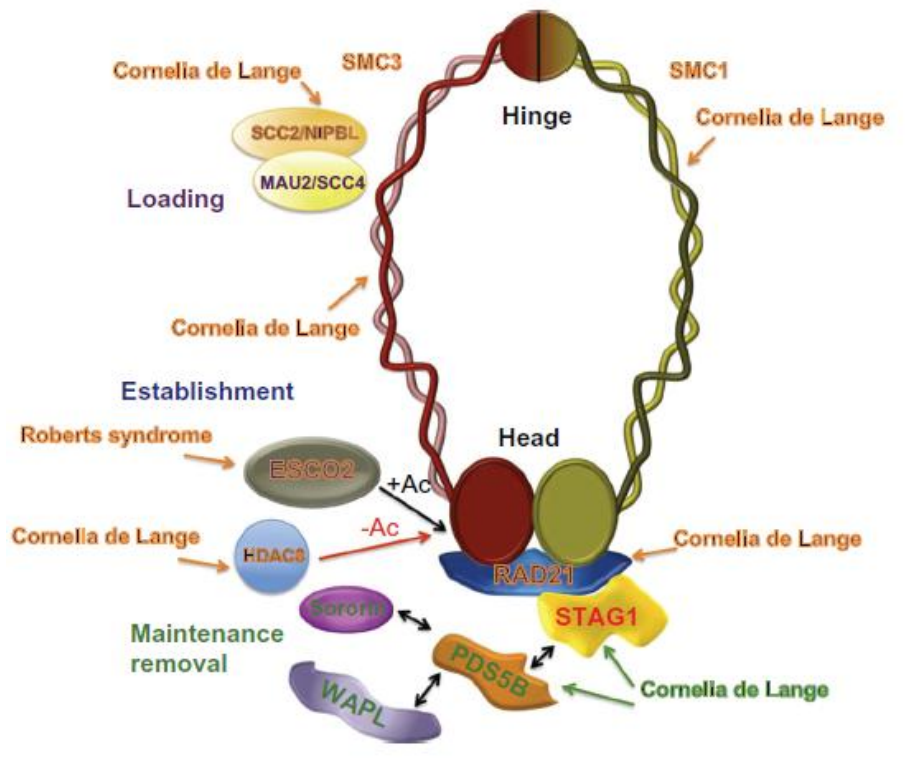
A	Adenina
C	Citosina
T	Timina
G	Guanina

## SÍMBOLOS DE AMINOÁCIDOS.

<b>A</b>	<b>Ala</b>	Alanina
<b>C</b>	<b>Cys</b>	Cisteína
<b>D</b>	<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>E</b>	<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>F</b>	<b>Phe</b>	Fenilalanina
<b>G</b>	<b>Gly</b>	Glicina
<b>H</b>	<b>His</b>	Histidina
<b>I</b>	<b>Ile</b>	Isoleucina
<b>K</b>	<b>Lys</b>	Lisina
<b>L</b>	<b>Leu</b>	Leucina
<b>M</b>	<b>Met</b>	Metionina
<b>N</b>	<b>Asn</b>	Asparagina
<b>P</b>	<b>Pro</b>	Prolina
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	Glutamina
<b>R</b>	<b>Arg</b>	Arginina

<b>S</b>	<b>Ser</b>	Serina
<b>T</b>	<b>Thr</b>	Treonina
<b>V</b>	<b>Val</b>	Valina
<b>W</b>	<b>Trp</b>	Triptófano
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	Tirosina

**ANEXO 1.**



**FIGURA 1.** Anillo de cohesina: proteínas estructurales y factores reguladores del anillo.  
Mutaciones específicas de Cohesinopatías.

**ANEXO 2.**

**ESTUDIO MOLECULAR DEL SINDROME DE CORNELIA DE LANGE  
Facultad de Medicina - Universidad de Zaragoza**

**HOJA DE DATOS CLINICO-EPIDEMIOLOGICOS**

PACIENTE:

Apellidos:                      Nombre:

Fecha nacimiento:                      Edad:                      Sexo:

Dirección:

Teléfono:                                              E-mail:

Grupo étnico:

Edad de diagnóstico del síndrome:

Profesional remitente:

Centro procedencia:

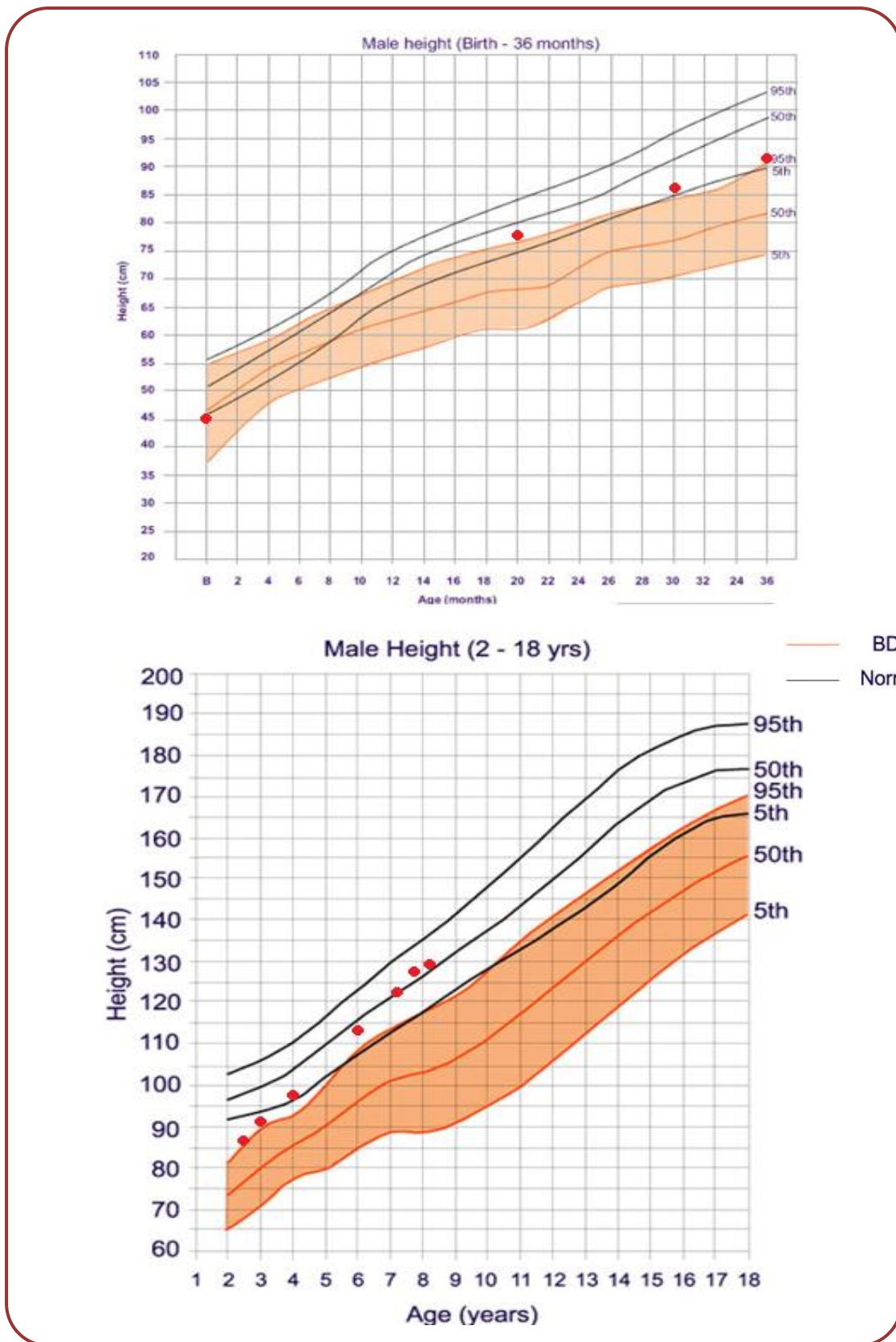
Teléfono:                                              E-mail:

FECHA	IDENTIFICACIÓN DEL PACIENTE:	
	HALLAZGOS CLINICOS	RESPONDA SI/ NO ó descripción breve
	SEXO	
	EDAD	
	FECHA DE NACIMIENTO	
CRANEO	MICROCEFALIA	
	BRAQUICEFALIA	
	LINEA DE INSERCIÓN DEL CABELLO ANTERIOR BAJA	
	EDAD DE CIERRE DE LA FONTANELA ANTERIOR	
	OTRAS	
OJOS	CEJAS ARQUEADAS	
	SINOFRIDIA	
	PESTANAS LARGAS	
	PTOSIS	
	MIOPIA	
	OBSTRUCCIÓN DEL CONDUCTO LACRIMAL	
	OTROS	
NARIZ	PUENTE NASAL DEPRIMIDO	
	NARINAS ANTEVERTIDAS	
	PHILTRUM LARGO Y LISO	
BOCA	LABIO SUPERIOR DELGADO	
	BOCA EN CARPA	
	PALADAR ALTO	
	PALADAR HENDIDO	
	ANOMALIAS DENTALES	
	MICROGNATIA	
	OTROS	
ORL	HIPOACUSIA/ SORDERA	
	OTITIS/ SINUSITIS/ AMIGDALITIS A REPETICIÓN	
CUELLO	LINEA DE INSERCIÓN DE CABELLO POSTERIOR BAJA	
CARDIOVASCULAR	CARDIOPATIA CONGENITA	
PULMONAR	APNEAS	
	INFECCIONES RESPIRATORIAS RECURRENTES	
	OTRAS	
GASTROINTESTINAL	REFLUJO GASTROESOFAGICO	
	PROBLEMAS CON LA ALIMENTACION/SUCCION	
GENITOURINARIO	MALFORMACIONES RENALES	
	REFLUJO VESICoureTERAL	

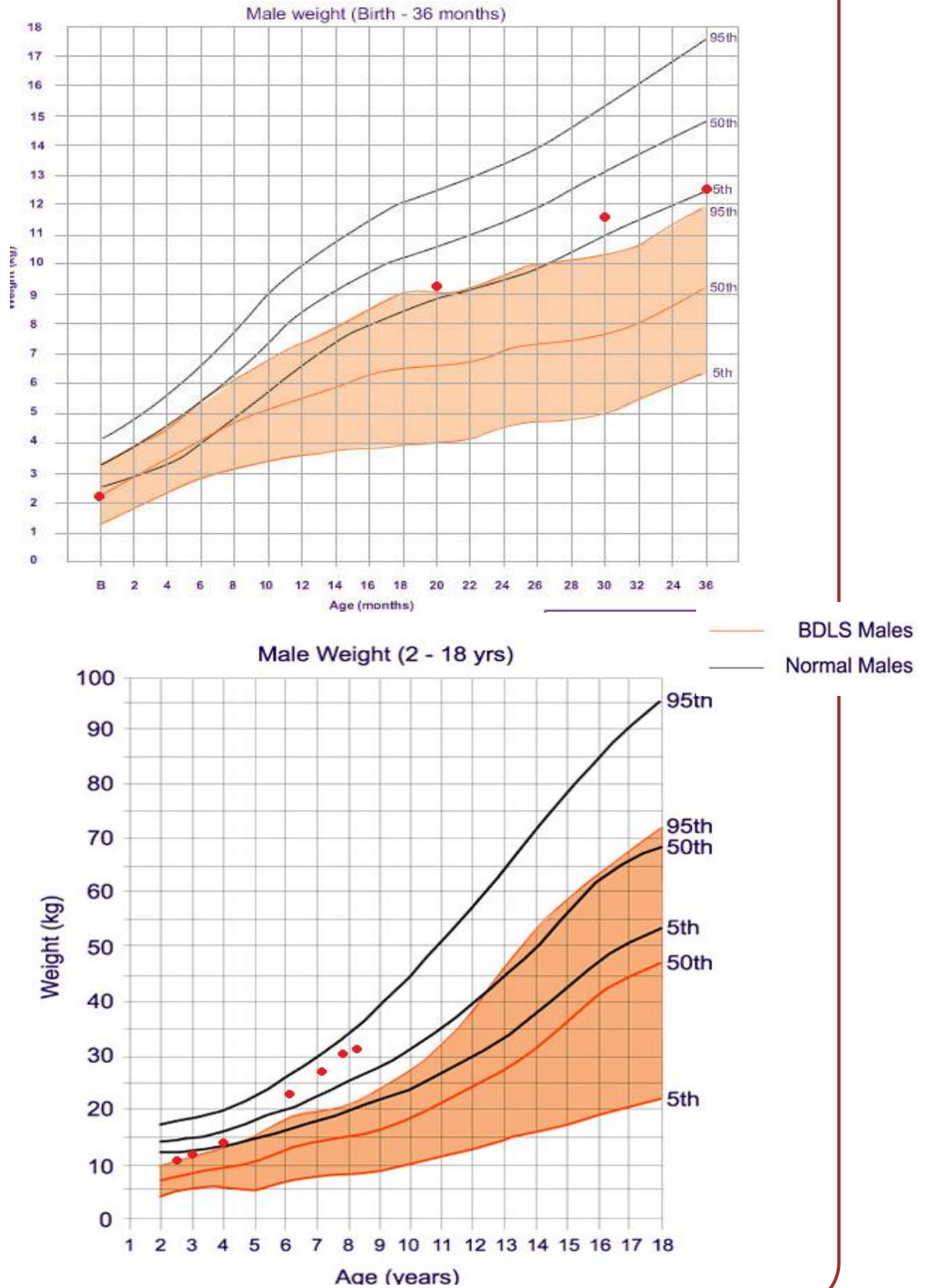
	MALFORMACIONES UTERINAS/OVARIOS	
	CRIPTORQUIDIA	
	HIPO/EPISPADIAS	
	OTROS	
<b>EXTREMIDADES</b>	MANOS PEQUEÑAS	
	INSERCIÓN PROXIMAL DEL PULGAR	
	CLINODACTILIA DEL 5º DEDO	
	PLIEGUE PALMAR ÚNICO	
	PIES PEQUEÑOS	
	SINDACTILIA DE LOS DEDOS DEL PIE	
	DEFECTOS DE REDUCCIÓN DE EXTREMIDADES	
	LIMITACIÓN PARA EL MOVIMIENTO DE LOS CODO	
	OTROS	
<b>PIEL</b>	HIRSUTISMO	
	CUTIS MARMORATA	
	OTROS	
<b>SNC</b>	ANOMALIAS ESTRUCTURALES EN SNC (ECO, TAC, RNM)	
	CONVULSIONES	
	OTRAS	
<b>MENTAL / COGNITIVO</b>	DISCAPACIDAD INTELECTUAL	
	ALTERACIONES DE COMPORTAMIENTO/PERSONALIDAD	
<b>DESARROLLO</b>	DESARROLLO DEL LENGUAJE	
	EDAD PRIMERA PALABRA	
	DESARROLLO MOTOR	
	EDAD SENTARSE SOLO	
	EDAD CAMINAR SOLO	
<b>DATOS ANTROPOMETRICOS</b>	EDAD GESTACIONAL	
<b>NACIMIENTO</b>	PESO AL NACER (g)	
	LONGITUD AL NACER (cm)	
	PERIMETRO CEFALICO (cm)	
<b>DATOS ACTUALES</b>	EDAD DE LA VALORACIÓN	
	PESO (kg)	
	TALLA (cm)	
	PERIMETRO CEFALICO (cm)	
<b>DATOS GENETICOS</b>	GEN AFECTADO	
	MUTACION/ VARIANTE	
	EFFECTO EN LA PROTEINA	
<b>SEVERIDAD CLINICA</b>		

**FIGURA 2** Tabla intermedia de estudio clínico de SCDL.

**ANEXO 3. Gráficas de crecimiento adaptadas a SCdL**

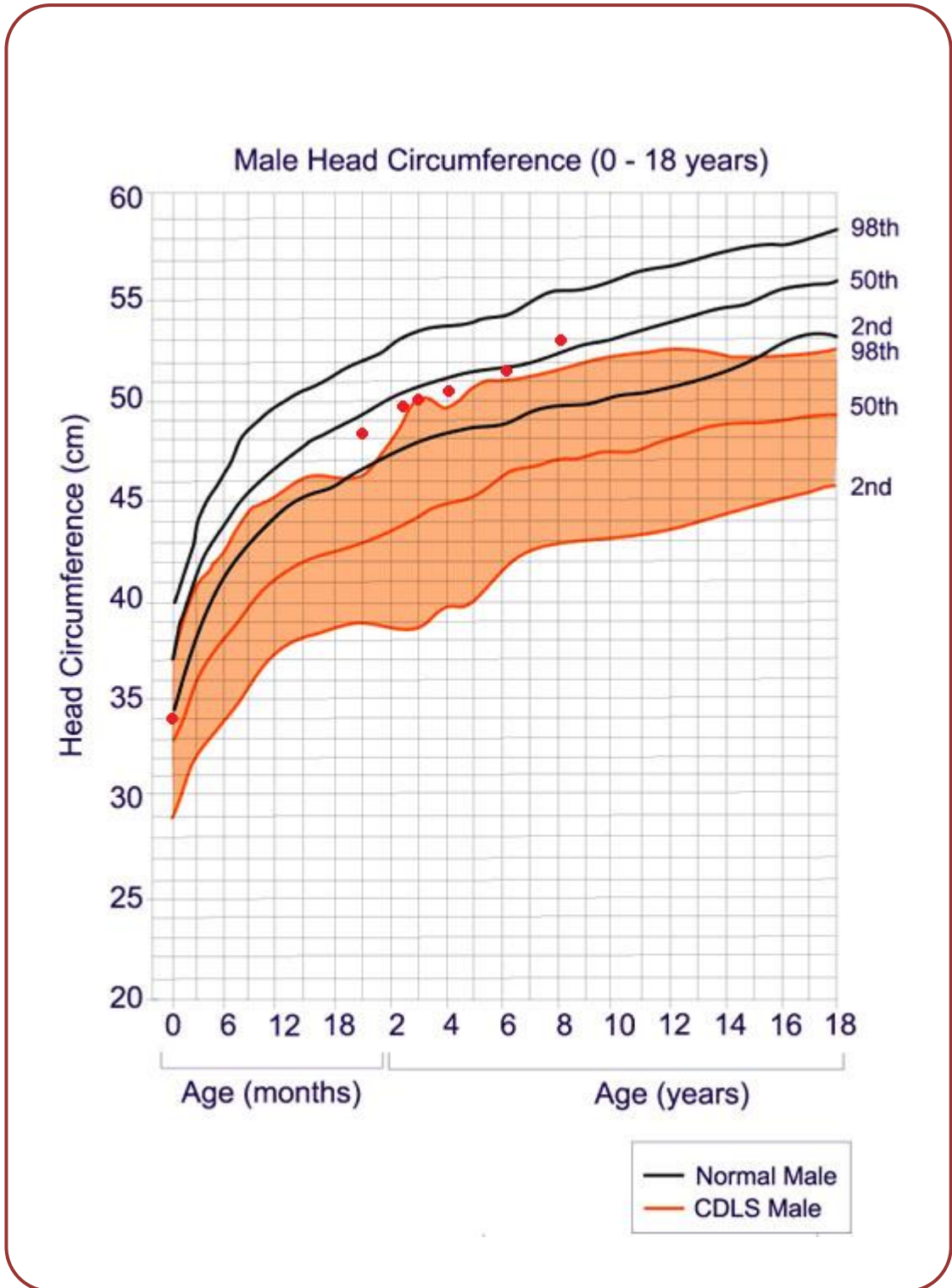


**FIGURA 3.1** Percentiles de talla estandarizados para el Síndrome Cornelia de Lange (Naranja) y niños sin patología (Blanco). Curva de crecimiento de nuestro paciente (rojo).



**FIGURA 3.2** Percentiles de peso estandarizados para el Síndrome Cornelia de Lange (Naranja) y niños sin patología (Blanco). Curva de peso de nuestro paciente (rojo).





**FIGURA 3.3** Percentiles de perímetro cefálico estandarizados para el Síndrome Cornelia de Lange (Naranja) y niños sin patología (Blanco). Curva de PC de nuestro paciente (rojo).

