

Jesús Manuel del Valle Domínguez

**Caracterización molecular del Síndrome de Sotos  
y estudio de otras causas genéticas de  
hipercrecimiento**

TESIS DOCTORAL

Barcelona, 2008



# **Caracterización molecular del Síndrome de Sotos y estudio de otras causas genéticas de hipercrecimiento**

Jesús Manuel del Valle Domínguez

Memoria presentada para optar al grado de Doctor  
en Biología por la Universitat Pompeu Fabra

Esta Tesis Doctoral ha estado realizada bajo la dirección  
del **Dr. Luis Alberto Pérez Jurado** y del **Dr. Miguel del Campo Casanelles**

Tesis doctoral realizada en la Unidad de Genética,  
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud  
Universitat Pompeu Fabra

Programa de doctorado en Ciencias de la Salud y de la Vida  
Bienio 2003-2005

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.1 El sobrecrecimiento</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Trastornos de hipercrecimiento</b>	<b>4</b>
1.2.1 Trisomía X (47, XXX)	7
1.2.2 Síndrome de Klinefelter (XXY, XXYY)	7
1.2.3 Síndrome XYY	8
1.2.4 Acromegalia y Gigantismo hipofisario	8
1.2.5 Hiperinsulinismo – Lipodistrofia	9
1.2.6 Síndrome de Marfan	10
1.2.7 Síndrome de Beckwith-Wiedemann	11
1.2.8 Síndrome de Bannayan Riley Ruvalcaba	12
1.2.9 Síndrome de Macrocefalia-cutis-marmorata	12
1.2.10 Síndrome de Marshall-Smith	13
1.2.11 Síndrome de Perlman	13
1.2.12 Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel	13
1.2.13 Síndrome de Costello	14
1.2.14 Síndrome de Weaver	15
1.2.14 Otras alteraciones no sindrómicas	15
<b>1.3 Síndrome de Sotos</b>	<b>17</b>
1.3.1 Historia	17
1.3.2 Prevalencia	18
1.3.3 Descripción clínica	18
1.3.3.1 Crecimiento	18
1.3.3.2 Características faciales	19
1.3.3.3 Desarrollo psicomotor y aprendizaje	20
1.3.3.4 Problemas perinatales	20
1.3.3.5 Hallazgos clínicos neurológicos	20
1.3.3.6 Características ortopédicas y esqueléticas	20
1.3.3.7 Características ectodérmicas	21
1.3.3.8 Anomalías cardíacas	21
1.3.3.9 Anomalías genito-urinarias y renales	21
1.3.3.10 Fertilidad	21

1.3.3.11 Riesgo de tumorigénesis	22
1.3.3.12 Otros hallazgos clínicos	22
1.3.4 Base genética de la enfermedad	22
1.3.5 El gen <i>NSD1</i>	23
1.3.6 Región cromosómica 5q35 y anomalías en <i>NSD1</i>	25
<b>2. Objetivos</b>	<b>28</b>
<b>3. Pacientes y métodos</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Pacientes</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Estudios de la región 5q35 y del gen <i>NSD1</i></b>	<b>34</b>
3.2.1 Análisis de microdeleciones	34
3.2.1.1 Estudios de microsatélites	34
3.2.1.2 Estudios de FISH	36
3.2.1.3 PCR cuantitativa a tiempo real	37
3.2.2 Análisis mutacional de <i>NSD1</i>	37
3.2.2.1 Análisis de exones y zonas de unión exón-intrón	37
3.2.2.2 RT-PCR y secuenciación	40
3.2.3 Análisis evolutivo y de las duplicaciones segmentarias	41
3.2.4 Estudios de detección del fragmento de unión	43
3.2.5 MLPA de reordenamientos intragénicos en <i>NSD1</i>	44
<b>3.3 Estudios de regiones y genes candidatos de sobrecrecimiento</b>	<b>46</b>
3.3.1 Estudios de MLPA	46
3.3.2 Hibridación genómica comparativa en micromatrices (array-CGH)	52
3.3.3 Estudios de FISH en el cromosoma 3	54
3.3.4 Estudios en el cromosoma X	54
3.3.4.1 Análisis del origen parental de las duplicaciones	54
3.3.4.2 Estudios de inactivación del X	55
<b>4. Resultados</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Estudios región 5q35 y gen <i>NSD1</i></b>	<b>58</b>
4.1.1 Caracterización clínica	58

4.1.2 Estudio mutacional	64
4.1.2.1 Análisis de microdeleciones en 5q35	64
4.1.2.2 MLPA de reordenamientos intragénicos de <i>NSD1</i>	75
4.1.2.3 Mutaciones puntuales en <i>NSD1</i>	78
4.1.2.4 RT-PCR, estudios de expresión	80
4.1.3 Correlaciones clínico-moleculares	82
4.1.4 Análisis evolutivo y de las duplicaciones segmentarias	86
4.1.5 Estudio del fragmento de unión en deleciones de <i>NSD1</i>	88
<b>4.2 Estudios de regiones y genes candidatos para síndromes de sobrecrecimiento</b>	<b>90</b>
4.2.1 Cribado de reordenamientos específicos por MLPA	91
4.2.2 Rastreo genómico global por array-CGH	93
4.2.3 Estudios de confirmación y validación de hallazgos	97
4.2.3.1 Duplicación parcial en el cromosoma 3	97
4.2.3.2 Estudios en el cromosoma X	100
4.2.3.2.1 Pacientes	100
4.2.3.2.2 Caracterización molecular de las anomalías del cromosoma X	101
<b>5. Discusión</b>	<b>106</b>
<b>5.1 Base genética y molecular del SS</b>	<b>108</b>
<b>5.2 Características clínicas en pacientes con alteraciones en <i>NSD1</i></b>	<b>124</b>
<b>5.3 Estudios de regiones y genes candidatos a sobrecrecimiento</b>	<b>128</b>
<b>5.4 Manejo de los pacientes</b>	<b>135</b>
<b>6. Conclusiones</b>	<b>139</b>
<b>7. Bibliografía</b>	<b>143</b>
<b>7. Anexo</b>	<b>157</b>

# INTRODUCCIÓN



## 1.1 El sobrecrecimiento

El crecimiento en el hombre es un proceso sumamente complejo ya que depende de múltiples factores genéticos, hormonales y ambientales, y todos ellos juegan un papel relevante.

Los diversos estudios y observaciones sobre las anomalías caracterizadas por hipercrecimiento o velocidad de crecimiento excesiva (además de los realizados sobre hipocrecimiento armónico) ilustran esta complejidad del crecimiento humano y el amplio número de genes y factores reguladores que intervienen en el desarrollo de un crecimiento normal y proporcionado.

El crecimiento pre- y postnatal tiene, como cualquier parámetro biológico, un grado de variabilidad notable, existiendo un amplio intervalo de valores considerados dentro de la normalidad. Las variables antropométricas preferentemente utilizadas en la práctica clínica son la medición del peso, talla y perímetro cefálico. El sobrecrecimiento o hipercrecimiento se puede definir por valores, de cualquiera de los anteriores parámetros (talla, peso y perímetro cefálico), situados dos desviaciones estándar (DE) por encima de la media o más, para la población de referencia [Weaver, 1994], o por encima del percentil 95 para la edad y sexo correspondiente.

El sobrecrecimiento puede ser generalizado cuando la mayoría o todas las variables antropométricas mensurables, de crecimiento y desarrollo, están aumentadas. El sobrecrecimiento es localizado o regional, cuando afecta sólo a una parte o una o varias regiones del cuerpo.

La mayoría de los trastornos de hipercrecimiento son causados por un incremento en el número de células (hiperplasia), aumento del tamaño celular (hipertrofia), o del intersticio, o bien una combinación de estos tres factores [Cohen, 1989].



## **1.2 Trastornos de hipercrecimiento**

Actualmente se tiene constancia de numerosos trastornos de hipercrecimiento, habiéndose identificado un nutrido número de factores causantes, tanto genéticos como hormonales, pero hasta la fecha se han elucidado los mecanismos patogénicos implicados en una minoría de éstos, ya que la etiopatogenia y bases moleculares de las anomalías que cursan con hipercrecimiento son muy complejas y parcialmente conocidas. Se muestra una clasificación con distintos trastornos de sobrecrecimiento en la tabla 1.

**Tabla 1.** Clasificación etiológica del hipercrecimiento, adaptación de J.F. Sotos, 1996

<b>Hipercrecimiento postnatal</b>	
<b>A. Variantes normales</b>	
Talla alta familiar (genético)	
Maduración familiar acelerada (genético)	
<b>B. Nutricional</b>	
Sobrenutrición (obesidad)	
<b>C. Hormonal</b>	
1. Exceso de hormona de crecimiento	5. Exceso prepuberal de hormonas sexuales
Gigantismo hipofisario	Pubertad precoz isosexual
- Adenoma hipofisario	Andrógenos o estrógenos adrenales
- Síndrome de McCune-Albright	Andrógenos o estrógenos gonadales
- Adenomatosis endocrina múltiple (MEN I)	6. Deficiencia de hormonas sexuales o insensibilidad a su efecto:
Adenomas ectópicos (esfenoides-cavidad nasal)	Eunucoidismo
Exceso de hormona liberadora de hormona de crecimiento	- Masculino-Hipogonadotrópico
- Gangliocitomas intracraneales.	Deficiencia testicular
- Tumores extracraneales (carcinoide, islotes pancreáticos, adenoma bronquial, etc.)	- Femenino- Hipogonadotrópico
2. ¿Exceso de factor de crecimiento?	Ausencia de Ovarios
Acromegalia	Resistencia a estrógenos y deficiencia de aromatasas
3. Hipertiroidismo	Falta de respuesta a los andrógenos
4. Hiperinsulinismo	Disgenesia gonadal XY (Síndrome de Swayer)
Lipodistrofia	Deficiencia de 17-hidroxilasa XY
	7. Deficiencia de glucocorticoides familiar
<b>D. Genético</b>	
1. Alteraciones cromosómicas	
Trisomía X (47, XXX femenino)	Trisomía 5p
Síndrome de Klinefelter XXY, XXXY	Trisomía 15q25-ter
Síndrome XYY	Mosomía 9q22
Cromosoma X frágil	Monosomía 22q13
Trisomía 8, mosaicismo	Trisomía 4p16
Tetrasomía 12p (síndrome Pallister-Killian)	
Trisomía 8p	
2. Síndromes y otros:	
Síndrome de Marfan	Síndrome de Sotos
Síndrome de Beals (CCA)	Síndrome de Weaver
Homocistinuria	Hipercrecimiento somático (H19)
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel
Neurofibromatosis tipo I	Síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba
Síndrome de Partington	Síndrome de Nevo
Síndrome de Ejalde	Síndrome de Teebi
Síndrome de Richieri-Costa	Macrocefalia/cutis marmorata telangiectasoa
Síndrome de MOMO	Síndrome de Cantu
Síndrome de Costello	

## **Hipercrecimiento prenatal**

Hijo de madre diabética	Síndrome de Sotos
Síndrome de Beckwith-Wiedemann	Síndrome de Weaver
Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel	Síndrome de Nevo
Lipodistrofia	Síndrome de Marshall-Smith
Síndrome de Ejalde	Síndrome de Perlman

Existe una gran diversidad y heterogeneidad de características asociadas a los distintos trastornos y síndromes de hipercrecimiento, por lo que es difícil hacer una clasificación de distintos rasgos comunes asociados a estas afecciones. Sin embargo, los diferentes cuadros de hipercrecimiento generalizado en el nacimiento, suelen compartir algunas características, que incluyen:

- Peso con incremento proporcional al aumento de la altura.
- El sobrecrecimiento no suele ser el único hallazgo clínico, sino que va a acompañado de otras anomalías.
- Asociación con frecuencia a cierto grado de retraso mental.
- Riesgo aumentado de neoplasias en diferentes tejidos (Ej.: tumor de Wilms, leucemia, neuroblastoma y astrocitoma) [Cohen, 2002].

La incidencia de cada trastorno o síndrome de sobrecrecimiento varía enormemente, pudiendo ser tan común como 1 de cada 1.000-1.500 recién nacidos, como ocurre en el síndrome del X frágil, o tan infrecuente como una tasa inferior a 1 de cada millón de recién nacidos, caso del síndrome de Ejalde [Weaver, 1994].

### **1.2.1 Trisomía X (47, XXX)**

Las pacientes con trisomía X tienden a ser altas, siendo esta, la característica clínica más frecuente, también es común el retraso del desarrollo y los trastornos del comportamiento, sin embargo, el fenotipo de estas pacientes es bastante variable con un pequeño porcentaje de pacientes que no presentan ningún tipo de sintomatología. Tanto las mujeres adolescentes como adultas 47,XXX manifiestan una tendencia a una talla por encima del percentil 90. La trisomía X es la aneuploidía más frecuente, esta afectación presenta una incidencia de una de cada 1000 recién nacidas. La causa de la talla alta, probablemente es debida a la presencia del cromosoma X extra. Dado que cada célula posee únicamente un cromosoma X activo (los otros son inactivados y condensados en el cuerpo de Barr), los efectos fenotípicos se pueden atribuir a regiones cromosómicas y genes que escapan a la inactivación. Uno de los mejores genes candidatos para explicar el hipercrecimiento en esta y otras aneuploidías sexuales es el gen *SHOX*, situado en la región pseudoautosómica (Xp22, Yp11.3), y que no resulta inactivado. Es bien conocido que la delección de este gen provoca estatura baja y retraso del crecimiento [Rao *et al.*, 1997], también se han descrito algunos pacientes con estas características y mutaciones puntuales afectando a este gen [Clement-Jones *et al.*, 2000]. Se cree además que la haploinsuficiencia de *SHOX*, no solo causa la baja estatura sino también otras anomalías esqueléticas características del síndrome de Turner (cuartos metacarpos cortos, cubitus valgus y discondrosteosis de Leri-Weill) [Kosho *et al.*, 1999].

### **1.2.2 Síndrome de Klinefelter (XXY, XXXY)**

Los varones con esta afectación cromosómica tienden a presentar una talla alta. Fenotípicamente son individuos altos y delgados, con piernas relativamente largas, en algunos casos, se observa a partir de la pubertad signos de hipogonadismo e infertilidad. En las variantes de síndrome de Klinefelter con más de dos cromosomas X, el fenotipo resulta más llamativo con un desarrollo sexual más deficiente y retraso mental acusado. La incidencia de este síndrome se situaría en torno a 1 de cada 1.000 recién

nacidos. Como se indicó para la trisomía X, el fenotipo de talla alta está relacionado con los genes que no son inactivados en el cromosoma X, siendo igualmente *SHOX* el mejor gen candidato para explicar la talla alta. Además en pacientes con este síndrome con un isocromosoma Xq (47, XiXqY), en los que existe ausencia de un brazo corto extra del segundo cromosoma X, donde se encontraría el gen *SHOX*, muestran las manifestaciones clínicas del síndrome de Klinefelter, exceptuando la talla alta.

### **1.2.3 Síndrome XYY**

Los varones con un cromosoma Y adicional presentan talla alta en el 50% de los casos, también puede asociarse con problemas de comportamiento y retraso en la adquisición del lenguaje. En este trastorno la talla alta está probablemente determinada por la existencia de un cromosoma Y adicional, que también contiene una copia activa del gen *SHOX*.

### **1.2.4 Acromegalia y Gigantismo hipofisario**

Ambas enfermedades son provocadas por una secreción excesiva de hormona de crecimiento o somatotropina (GH), debida a un adenoma de la glándula pituitaria o hipófisis (también conocido como somatotropinoma). Existen además casos originados por hiperplasia del lóbulo anterior hipofisario o adenohipófisis. En algunos casos muy excepcionales la acromegalia puede ser debida a la secreción hormonal ectópica asociada a cáncer de ovario, tiroides, páncreas o broncopulmonar. La enfermedad puede ocurrir aislada o asociada a otros trastornos. Se cree que aproximadamente un 40% de los adenomas pituitarios tienen mutaciones somáticas heterocigotas en el gen *GNAS1* (20q13.2) [Thakker *et al.*, 1993; Hayward *et al.*, 2001]. Aunque la mayoría de los casos son esporádicos, también se han descrito formas familiares de predisposición de baja penetrancia, habiéndose encontrado en algunos pacientes, mutaciones germinales en el gen *AIP* (11q13) [Vierimaa *et al.*, 2006]. Los pacientes afectados presentan hipertrofia de las extremidades, talla alta y una facies tosca característica, además la secreción excesiva de hormona de crecimiento puede acarrear problemas cardiacos y diabetes.

Debido al lento progreso de los síntomas el diagnóstico suele ser tardío, este diagnóstico se realiza en base al cuadro clínico y a través de la demostración de la secreción aumentada de GH. La acromegalia tiene una prevalencia de 40-70 afectados por cada 1.000.000 de personas.

### **1.2.5 Hiperinsulinismo – Lipodistrofia**

La lipodistrofia incluye un grupo infrecuente de anomalías que se caracterizan por la ausencia parcial o generalizada de tejido adiposo desde el nacimiento o la infancia temprana y una resistencia severa a la insulina. Existen tanto formas generalizadas como parciales. Los pacientes con lipodistrofia generalizada congénita, también conocida como síndrome de Berardinelli-Seip, suelen presentar gigantismo y una aceleración de la velocidad de crecimiento por desordenes de tipo endocrinológico, elementos acromegaloides, mandíbula prominente y edad ósea adelantada [Garg *et al.*, 2004]. En la lipodistrofia congénita generalizada, se han identificado mutaciones transmitidas de forma autosómica recesiva en los genes *AGPAT2* (9q43.3) y *BSCL2* (11q13), que provocan el trastorno. *AGPAT2* codifica una enzima que cataliza una reacción esencial en la vía de biosíntesis de glicerofosfolípidos y triacilglicerol, afectando a la síntesis de triacilglicerol en el tejido adiposo, las mutaciones de este gen pueden causar lipodistrofia inhibiendo la síntesis y almacenamiento de y triacilglicerol en los adipositos [Agarwal *et al.*, 2002]. *BSCL2* se expresa sobretodo en el cerebro y los testículos, siendo la expresión débil en los adipositos, lo que sugiere un defecto primario en el eje hipotálamo-hipófisi-adipocito. *BSCL2* codifica una proteína llamada seipina de función desconocida [Magre *et al.*, 2001]. Los pacientes con mutaciones de *BSCL2* suelen presentar retraso mental, una característica diferencial con los pacientes afectos de mutación en *AGPAT2* [Fu *et al.*, 2004]. Existen probablemente más loci implicados aún no identificados [Agarwal *et al.*, 2003]. La prevalencia de la lipodistrofia congénita generalizada se ha estimado en menos de 1 caso por 1.000.000 de habitantes.

### 1.2.6 Síndrome de Marfan

Este síndrome consiste en una alteración del tejido conectivo que afecta al esqueleto humano, con elongación de los huesos tubulares, y alteraciones en el sistema cardiovascular y el sistema ocular. Los pacientes afectados de este síndrome suelen presentar además moderada laxitud articular, dedos y extremidades desproporcionadamente largos, dientes apiñados, escoliosis y lordosis torácica. La esperanza de vida de estos pacientes suele estar mermada por complicaciones cardio-vasculares, ya que suelen presentar debilidad de la túnica media de los grandes vasos originando una dilatación de la aorta ascendente o arteria pulmonar y/o aneurisma disecante, con frecuencia pueden presentar también prolapso de la válvula mitral. Este trastorno autosómico dominante es provocado por mutaciones en el gen *FBN1* (15q21), la mayoría de ellas mutaciones puntuales habiéndose encontrados pocos casos de grandes reordenamientos afectando a este gen. El síndrome de Marfan es una fibrilopatía originada por una inadecuada síntesis de la fibrilina 1 a raíz de alteraciones del gen *FBN1*. La fibrilina es el componente más importante del tejido conectivo y muy probablemente un elemento funcional esencial, por lo que la producción de proteína alterada explica los signos clínicos y los cambios histológicos observados en los pacientes con mutaciones en el gen *FBN1* al interferir en la organización normal de las microfibrillas. Se ha definido un síndrome de Marfan tipo II o Loeys Dietz por el hallazgo de mutaciones en los genes *TGFBR1* (9q33) y *TGFBR2* (3p22) en algunos pacientes en los que previamente no se habían encontrado mutaciones afectando al gen *FBN1*, estos pacientes presentan un fenotipo bastante similar al producido por el síndrome de Marfan clásico, aunque no presentan anomalías oculares y su esperanza de vida parece ser menor. Los genes *TGFBR1* y *TGFBR2* codifican para el receptor TGF-Beta, se sabe que este factor tiene generalmente un efecto negativo sobre el crecimiento celular, y la inactivación de su vía contribuye a la tumorigenesis [Mizuguchi *et al.*, 2004; Disabella *et al.*, 2006; Matyas *et al.*, 2006; Loeys *et al.*, 2006]. El síndrome de Marfan tiene una incidencia de 1 de cada 15.000 recién nacidos

### 1.2.7 Síndrome de Beckwith-Wiedemann

El síndrome de Beckwith-Wiedemann es un síndrome de sobrecrecimiento caracterizado por macrosomía, macroglosia, organomegalia y anomalías del desarrollo (en particular defectos de la pared abdominal con exónfalos/onfalocele). También pueden padecer durante la infancia hemihiperplasia y hipoglicemia [Lapunzina, 1999], así como un riesgo incrementado de sufrir tumores calculado entre el 5% y el 10% [Porteus *et al.*, 2000]. La incidencia de este síndrome está estimada en 1 de cada 14.000 nacimientos [Arroyo *et al.*, 1999]. La mayoría de los casos de Beckwith-Wiedemann son esporádicos (85%), no obstante alrededor del 15% se corresponden con formas familiares. Se trata de una enfermedad multigénica causada por una mala regulación de la expresión génica en la región cromosómica 11p15. Esta región incluye genes que codifican factores de crecimiento y genes supresores de tumores, varios de los genes reguladores están sometidos a impronta genómica. Los genes de expresión paterna (impronta materna) tienen actividad potenciadora del crecimiento y los de expresión materna (impronta paterna) tienen actividad supresora del crecimiento. La región 11p15 tiene dos dominios diferentes de impronta, uno telomérico que contiene los genes *H19* e *IGF2* y otro centromérico que incluye: *KCNQ1*, *KCNQ10T1* (*LIT1*) y *CDKN1C*. Se han descrito mutaciones puntuales intragénicas en el gen *CDKN1C*, microdeleciones de *LIT1*, alteraciones de la metilación en el gen *H19*, duplicaciones de origen paterno, translocaciones cromosómicas de origen materno, etc. Es por ello que tanto mecanismos cromosómicos, genéticos o epigenéticos pueden darse en pacientes con este síndrome [Weksberg *et al.*, 2001, 2003]. Una serie de estudios recientes sugieren que las técnicas de reproducción asistida pueden incrementar los riesgos de defectos de la impronta, y en particular del síndrome de Beckwith-Wiedemann [Debaun *et al.*, 2003; Halliday *et al.*, 2004], similares observaciones se han reportado entorno al síndrome de Angelman. En ambos trastornos después de la reproducción asistida la alteración observada siempre implica la pérdida de metilación de los genes metilados de impronta materna, lo que sugiere que las técnicas de reproducción asistida impiden la adquisición o mantenimiento de las marcas de metilación en los genes de impronta materna.



### **1.2.8 Síndrome de Bannayan Riley Ruvalcaba**

Este trastorno es una enfermedad autosómica dominante que causa: macrocefalia, lipomas múltiples, pólipos intestinales, retraso del desarrollo, malformaciones vasculares y nevus pigmentarios localizados en los genitales en los pacientes varones. Aproximadamente la mitad de los pacientes sufren hipotonía y retraso mental moderado a severo. Los pacientes presentan también un riesgo aumentado de sufrir cáncer. El cuadro clínico es similar a la enfermedad de Cowden, un síndrome de predisposición al cáncer, especialmente de tiroides y mama. Las mutaciones y deleciones del gen supresor de tumores *PTEN* (10q23.31) son una de las causas conocidas de este síndrome [Marsh *et al.*, 1997], también se han encontrado mutaciones en *PTEN* en pacientes con un fenotipo sugerente de enfermedad de Cowden, lo que unido a la imposibilidad de establecer correctas relaciones genotipo-fenotipo, parece sugerir que en realidad ambos trastornos son la misma enfermedad, que presenta una variabilidad a diferentes edades, al igual que en otros trastornos que implican alteraciones de factores supresores de tumores como la neurofibromatosis tipo 1. El gen *PTEN* puede bloquear el crecimiento celular y tumorigenicidad bloqueando la progresión celular en la fase G1 [Li y Sun, 1998], por lo que su alteración probablemente desregula el crecimiento celular.

### **1.2.9 Síndrome de Macrocefalia-cutis-marmorata-telangiectasia**

Los pacientes con esta alteración autosómica dominante presentan un cuadro con macrocefalia, retraso mental, telangiectasia congénita, cutis marmorata y sobrecrecimiento, además de otras anomalías como hemihipertrofia, hemangioma del labio y/o *philtrum*, sindactilia, anomalías del tejido conectivo y retraso del desarrollo [Lapunzina *et al.*, 2004]. Se desconoce hasta la fecha la causa genética y por tanto el mecanismo de sobrecrecimiento. Se han descrito alrededor de 100 casos con este trastorno, y en aproximadamente el 5% de ellos han desarrollado alguna neoplasia.

### **1.2.10 Síndrome de Marshall-Smith**

Las características principales de este trastorno son la edad ósea adelantada, retraso mental, edad ósea adelantada, anomalías faciales y dificultades de crecimiento postnatal. Se incluye dentro de los síndromes de hipercrecimiento ya que los recién nacidos presentan una talla alta y edad ósea adelantada, aunque con la edad manifiestan una tendencia a peso bajo con un crecimiento lento. Este síndrome se asocia a varios signos dismórficos como frente prominente, ojos protuberantes, escleróticas azules, micrognatia y narinas antevertidas. Los síntomas clínicos son graves, con dificultades para alimentarse, déficit de crecimiento y una gran tendencia a contraer infecciones respiratorias. El pronóstico es pobre y el trastorno suele tener un desenlace fatal en los primeros años de vida [Adam *et al.*, 2005]. Se desconoce la causa de este síndrome, pero por su ocurrencia esporádica, se piensa que es debida a mutaciones dominantes *de novo*. Aun no se ha determinado la prevalencia de este síndrome aunque se han reportado poco más de 30 casos en la literatura.

### **1.2.11 Síndrome de Perlman**

Se trata de un trastorno de hipercrecimiento autosómico recesivo caracterizado por gigantismo fetal, visceromegalia, facies inusual, hamartomas renales bilaterales con nefroblastomatosis y tumores de Wilms. Se trata de un trastorno extremadamente infrecuente habiéndose descrito alrededor de 25 casos hasta la fecha [Lapunzina *et al.*, 2001]. Por el momento se desconoce el mecanismo de hipercrecimiento y la alteración genética subyacente, no habiéndose encontrado ninguna alteración cromosómica ni genética en los pacientes estudiados.

### **1.2.12 Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel**

Este síndrome es una enfermedad recesiva de herencia ligada a X, causado por mutaciones que afectan al gen *GPC3* (Xq26) [Pilia *et al.*, 1996; Veugelers *et al.*, 1998]. Aunque presenta una amplia variabilidad clínica, se caracteriza por un sobrecrecimiento pre- y postnatal, organomegalia,

malformaciones múltiples de la línea media, anomalías cardíacas congénitas, retraso mental variable, rasgos faciales dismórficos consistentes en facies tosca, macroglosia, macrostomia y mala oclusión dental. Los pacientes presentan un riesgo aumentado de neoplasia, sobre todo tumor de Wilms, neuroblastoma y hepatoblastoma [Rodríguez-Criado *et al.*, 2005]. Este trastorno presenta un solapamiento clínico destacado con el síndrome de Beckwith-Wiedemann. Se cree que GPC3 juega un papel importante en el crecimiento, controlando el mesodermo embrionario donde se expresa selectivamente. Parece que este proteoglicano forma un complejo con el factor de crecimiento IGF2, modulando, por tanto, su acción. Con frecuencia se han descrito grandes reordenamientos afectando a *GPC3*, tanto deleciones parciales como implicando a todo el gen, como la causa molecular subyacente a este síndrome, además de las mutaciones puntuales afectando a este gen. Se desconoce la prevalencia de este síndrome, aunque se han reportado más 100 casos en la literatura. Recientemente se ha descubierto una segunda forma mucho más severa de este síndrome reportada en una sola familia, asociada a una mutación en el gen *CXORF5* (Xp22) [Budny *et al.*, 2006].

### **1.2.13 Síndrome de Costello**

El síndrome de Costello es un trastorno con alteraciones congénitas múltiples y retraso mental caracterizado por: sobrecrecimiento prenatal, facies tosca, piel redundante, cardiomiopatía y predisposición a tumores. Los pacientes suelen nacer con alto peso y desarrollan luego progresivamente dificultades en la alimentación y talla baja. El riesgo de tumores parece estar aumentado (17%), siendo los más frecuentes los rhabdomiomas. El diagnóstico diferencial debe incluir el síndrome de Noonan y el síndrome cardio-facio-cutáneo. Recientemente se han detectado mutaciones en el proto-oncogen *HRAS* (11p15.5) en pacientes afectados de este síndrome [Aoki *et al.*, 2005]. El gen *HRAS* parece regular la proliferación celular dependiente de factores de crecimiento, lo que puede explicar el mecanismo de hipertrofia. La mayoría de las mutaciones son puntuales de pérdida de sentido, existiendo una mutación recurrente que afecta al codón 12 de la proteína [Kerr *et al.*, 2006]. Se

desconoce la prevalencia de este síndrome habiéndose descrito alrededor de 150 casos en la literatura.

#### **1.2.14 Síndrome de Weaver**

Esta alteración se caracteriza por un hipercrecimiento pre- y postnatal, retraso en el desarrollo, hipertonía, edad ósea adelantada, camptodactilia y apariencia facial característica, consistente en una frente alta y ancha, hipertelorismo, línea media del labio superior prominente y larga y micrognasia, además estos pacientes suelen presentar uñas de implatación profunda, llanto ronco y de tono bajo y yemas de los dedos prominentes [Cole *et al.*, 1992; Opitz *et al.*, 1998; Proud *et al.*, 1998]. Se desconoce la causa molecular subyacente, aunque se han encontrado algunas mutaciones en *NSD1* en pacientes con este síndrome [Douglas *et al.*, 2003]. Muchas características del fenotipo de los pacientes afectados de este trastorno se asemejan mucho a las presentes en los afectados de síndrome de Sotos, lo que ha llevado a hipotetizar que ambos trastornos son variantes alélicas, pero actualmente se considera que son dos entidades distintas, pues estudios realizados en series más largas de pacientes con síndrome de Weaver no han evidenciado alteraciones en el gen *NSD1* [Douglas *et al.*, 2003; Türkmen *et al.*, 2003; Taton-Brown *et al.*, 2005]. Se desconoce la prevalencia de este trastorno, aunque se cree que su incidencia es muy baja, con alrededor de 50 casos reportados en la literatura, la mayoría de ellos esporádicos, aunque se han identificado dos familias afectas con un patrón de herencia autosómico dominante.

#### **1.2.15 Otras alteraciones no sindrómicas**

Existen además otras alteraciones genéticas no filiadas descritas en la literatura, en las que esta presente la alteración del crecimiento en los pacientes estudiados, entre otros hallazgos clínicos. Entre ellas cabe destacar la trisomía del brazo corto del cromosoma 8, anomalía largamente conocida como causativa de hipercrecimiento [Sotos, 1996]. Existen además de la conocida trisomía del cromosoma 8 otras grandes deleciones y duplicaciones que parecen causar una alteración en el crecimiento, como la trisomía del

brazo corto del cromosoma 5 que también se ha asociado con sobrecrecimiento [Avansino *et al.*, 1999; Lorda-Sanchez *et al.*, 1997], en los escasos pacientes reportados se ha descrito también macrocefalia, dilatación de los ventrículos cerebrales, inclinación antimongoloide de las fisuras palpebrales, micrognasia, cuello corto y defectos cardíacos. La duplicación de la región p16 del cromosoma 4 también se ha asociado a sobrecrecimiento y la delección recíproca es causativa a su vez de hipocrecimiento, se ha hipotetizado que la alteración del crecimiento es debida a efectos de dosis del gen receptor factor de crecimiento fibroblasto 3 (*FGFR3*), esto es, cuando la dosis de este gen es única existe un fallo del crecimiento, cuando la dosis del gen es triple provoca el crecimiento excesivo [Partington *et al.*, 1997]. En pacientes con trisomía 15q25-qter también se describe como una característica clínica común a todos ellos el sobrecrecimiento, entre otros numerosos hallazgos clínicos más variables entre pacientes [Zollino *et al.*, 1997; Nagai *et al.*, 2002; Faivre *et al.*, 2002; Bonati *et al.*, 2004]. La monosomía de la región 9q22.3 ha sido propuesta recientemente como una posible causa de sobrecrecimiento, originando también macrocefalia, trigonocefalia, retraso del desarrollo psicomotor e hiperactividad [Redon *et al.*, 2006]. Adicionalmente se han descrito dos pacientes con delección intersticial de la región 22q13 que presentan crecimiento acelerado, retraso del desarrollo psicomotor e hipotonía [Romain *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2000].

## 1.3 Síndrome de Sotos

### 1.3.1 Historia

El síndrome de Sotos (SS) (MIM 117550) es un trastorno de sobrecrecimiento autosómico dominante, descrito en 1964 por Juan F. Sotos y colaboradores [Sotos *et al.*, 1964]. Inicialmente se le dio el nombre de “gigantismo cerebral” (término en desuso), en alusión a la alta frecuencia con que se hallan dilataciones ventriculares en el cerebro de los pacientes afectados de esta condición. Sin embargo, es posible que no fuese el doctor Sotos el primero en describir esta enfermedad, sino el doctor Bernard Schlesinger en el año 1931, al referir una paciente con características propias de esta enfermedad.

Desde entonces se reportaron bastantes casos, pero el diagnóstico clínico no es fácil, debido a cierta variabilidad en el fenotipo de los pacientes. En 1994, Cole y Hughes publicaron un estudio en el que sugerían los siguientes criterios de diagnóstico clínico como los más relevantes: apariencia facial característica, perímetro cefálico y estatura pre- y postnatal por encima del percentil 97, edad ósea adelantada y retraso del desarrollo psicomotor. Propusieron que la ausencia de alguno de los 4 criterios anteriores supondría la imposibilidad de hacer un diagnóstico claro, y éste sería muy dudoso si el caso no presentase dos de estos criterios principales.

En el año 2002, Kurotaki *et al.*, descubrieron que la haploinsuficiencia del gen *NSD1* era la principal causa del síndrome de Sotos. En posteriores artículos de diferentes autores, se ha constatado que las mutaciones o deleciones del gen *NSD1* están presentes en alrededor del 70% de los pacientes con un diagnóstico clínico de síndrome de Sotos.

En el 2005, Tatton-Brown *et al.*, publicaron un estudio de asociación genotipo-fenotipo en 266 pacientes con alteraciones en *NSD1* y pudieron

determinar que la apariencia facial característica, el sobrecrecimiento postnatal y el retraso mental estaban presentes en más del 90% de estos pacientes.

### 1.3.2 Prevalencia

El síndrome de Sotos se considera una enfermedad rara (prevalencia  $1 < 2000$ ), aunque es uno de los trastornos de sobrecrecimiento más comunes tras el síndrome de Beckwith-Wiedemann y el síndrome de Marfan. Se desconoce su prevalencia exacta, pero se estima en 1 de cada 14.000 recién nacidos. Aunque se puede transmitir de padres a hijos con herencia autosómica dominante, la gran mayoría de los casos se producen de novo sin historia familiar.

### 1.3.3 Descripción clínica

#### 1.3.3.1 Crecimiento

El **excesivo crecimiento pre- y postnatal**, que tiende a normalizarse con la llegada de la edad adulta [Cole y Hughes, 1994], son hallazgos clínicos muy característicos. El sobrecrecimiento prenatal es una alteración muy común en todos los pacientes, tanto en peso y longitud o talla como en perímetro craneal, siendo la talla el parámetro más importante e indicativo, incrementada más 2 DE por encima de la media para edad y sexo en el 85% de los neonatos [Root *et al.*, 2006]. Durante la infancia y hasta la pubertad, el excesivo crecimiento continúa siendo uno de los signos clínicos principales: al menos un 90% de los individuos afectados presentan bien una estatura o un perímetro cefálico, o ambos, igual o por encima del percentil 98 ( $>2$ DE) [Tatton-Brown *et al.*, 2005]. La altura y el peso tienden a normalizarse hacia la pubertad. No obstante, los hombres adultos suelen superar la media en 11 cm y las mujeres en 6 cm. [Root *et al.*, 2006]

La **edad de la menarquia** en las mujeres es normal o está ligeramente adelantada [Agwu *et al.*, 1999].

La **edad ósea adelantada** es una característica común presente en al menos el 76% de los pacientes [Tatton-Brown *et al.*, 2005].

### 1.3.3.2 Características faciales

La apariencia facial característica o “gestalt”, parece ser el rasgo fenotípico de mayor relevancia para el diagnóstico clínico. Los rasgos craneofaciales incluyen: frente alta y prominente, inclinación antimongoloide de las fisuras palpebrales, mentón ancho y prominente (que se hace más prominente con la edad), poca densidad de pelo especialmente en la región frontoparietal, nariz antevertida, paladar alto y estrecho con hipertrofia alveolar, tendencia al rubor facial y nasal, y con cierta frecuencia dolicocefalia y aspecto hipertelórico (no siempre confirmado por medidas).

En definitiva, existe una configuración facial característica del SS que los genetistas clínicos experimentados pueden reconocer como tal, especialmente entre el primer y sexto año de vida del paciente. (Ver figura 1)



**Figura 1:** Paciente con apariencia facial característica del síndrome de Sotos



### **1.3.3.3 Desarrollo psicomotor y aprendizaje**

Al menos el 90% de los casos presentan **retraso mental de grado variable y no progresivo**. El retraso en las adquisiciones del desarrollo en todas sus áreas, incluyendo los avances motores y especialmente el desarrollo del lenguaje expresivo, está casi siempre presente. También se han detectado problemas de pronunciación, balbuceo en el habla, y problemas de voz (tonalidad monótona, carraspeo y baja sonoridad) [Ball *et al.*, 2005]. La mayoría de los pacientes (97%) presentan dificultades de aprendizaje, pero el grado de retraso cognitivo es bastante variable pudiendo oscilar desde ligero a moderado y rara vez severo, con un amplio espectro de cociente intelectual de 20 a 120. [Cole y Hughes, 1994].

### **1.3.3.4 Problemas perinatales**

En el periodo neonatal son muy frecuentes la hipotonía, la ictericia prolongada y las dificultades de alimentación, hallazgos presentes en aproximadamente el 70% de los pacientes [Tatton-Brown *et al.*, 2005].

### **1.3.3.5 Hallazgos clínicos neurológicos**

En múltiples pacientes se han descrito problemas neurológicos como convulsiones (aproximadamente la mitad de los casos son de origen febril) y coordinación pobre. Además suelen encontrarse anomalías intracraneales en las imágenes obtenidas por tomografía computerizada o resonancia magnética, como dilatación ventricular, aumento de los espacios subaracnoideos y/o hipoplasia del cuerpo calloso. Los problemas de coordinación motora parecen mejorar con el tiempo.

### **1.3.3.6 Características esqueléticas y ortopédicas**

Con frecuencia tienen pies y manos grandes, siendo los pies planos un problema muy común en estos pacientes. Los problemas de curvaturas anómalas de la columna también afectan aproximadamente a un tercio de los

pacientes [Tatton-Brown *et al.*, 2005] con una gran variabilidad en cuanto a su severidad.

#### **1.3.3.7 Características ectodérmicas**

Entre el 60% y el 80% de los pacientes presentan una erupción prematura de los dientes. También se han descrito, por distintos autores, uñas de las manos finas o excesivamente frágiles. Con frecuencia se describe poca densidad del pelo en el cuero cabelludo durante la infancia, y dirección ascendente de la primera línea del cabello.

#### **1.3.3.8 Anomalías cardíacas**

Se ha estimado una frecuencia del 21-25% de anomalías cardíacas congénitas en los pacientes con SS frente al 0,6-1% en población normal [Tatton-Brown *et al.*, 2005]. La incidencia en pacientes japoneses parece ser mayor, siendo superior al 30% [Tsukahara *et al.*, 1999]. El defecto congénito más frecuente es el ductus arterioso persistente con o sin defecto del septo atrial [Faravelli, 2005].

#### **1.3.3.9 Anomalías genito-urinarias y renales**

En alrededor del 15% de los casos se encuentran problemas urinarios, especialmente el reflujo vesicouretral [Cole y Hughes, 1994; Tatton-Brown *et al.*, 2005]. Esta frecuencia está probablemente subestimada, ya que en pocos pacientes se realizan estudios renales. Con menor frecuencia se detectan en algunos casos criptorquia y escroto en chal [Noreau *et al.*, 1998].

#### **1.3.3.10 Fertilidad**

Los datos sobre fertilidad son bastante limitados, no estando bien definida la influencia que tiene este trastorno sobre la capacidad reproductora. No obstante el retraso mental no parece justificar, por sí solo, la baja tasa de

transmisión vertical de síndrome de Sotos. Se ha visto que, en los casos familiares, predominan más las mutaciones de pérdida de sentido que en los esporádicos, lo que sugiere que el mecanismo mutacional subyacente y la severidad de sus consecuencias, pueden afectar a la capacidad reproductiva. [Van Haelst *et al.*, 2005; Høglund *et al.*, 2003; Turkmen *et al.*, 2003; De Boer *et al.*, 2004, Tatton-Brown *et al.*, 2005].

#### **1.3.3.11 Riesgo de tumorigénesis**

Con relativa frecuencia, los síndromes de sobrecrecimiento se asocian a la presencia de neoplasias. En el SS se ha demostrado que existe una cierta predisposición a tumores, cuya incidencia según los estudios publicados oscila entre el 2% y el 7% de los pacientes [Maldonado *et al.*, 1984; Hersh *et al.*, 1992]. Los tumores más frecuentes son linfomas, leucemias, tumores de Wilms, neuroblastomas, carcinoma hepatocelular y teratomas sacrococigeos. Es importante destacar que el riesgo de tumor tiene un ratio hombre:mujer de 2:1. [Lapunzina, 2005].

#### **1.3.3.12 Otros hallazgos clínicos**

El espectro de las características clínicas del SS es muy amplio y muy variable, e incluye otros hallazgos clínicos, aunque con menor frecuencia y de forma más inespecífica, como infecciones frecuentes del tracto superior respiratorio durante la infancia, otitis media, estreñimiento crónico, alteraciones oftalmológicas (estrabismo, cataratas, anomalías del nervio óptico o de la retina), hipotiroidismo, hernias inguinales, craneosinostosis y problemas de comportamiento (agresividad).

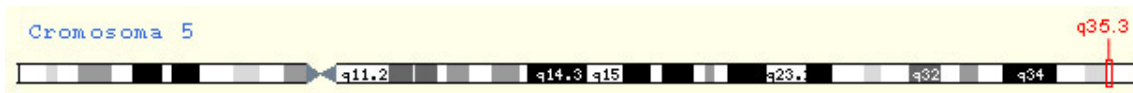
#### **1.3.4 Base genética de la enfermedad**

A raíz del hallazgo de una paciente con SS que portaba una translocación recíproca t(5;8)(q35;q24.1) [Imaizumi *et al.*, 2002], se llegó a la identificación del gen *NSD1* en el punto de rotura 5q35 de dicha translocación,

encontrándose posteriormente mutaciones y deleciones submicroscópicas que afectaban a este gen en otros pacientes [Kurotaki *et al.*, 2002]. Todas las mutaciones encontradas ocurren en un único alelo y son hipomórficas, indicando que es la haploinsuficiencia del gen *NSD1* la principal causa del SS. A partir del 2002, más de 300 individuos con anomalías en *NSD1* han sido citados en la literatura [Kurotaki, 2003; Türkmen, 2003; Kasimura, 2003; Douglas, 2003; Rio, 2003; Melchior, 2005; Nagai, 2005; Cecconi, 2005; Tatton-Brown, 2005]. Estos estudios confirman que el síndrome de Sotos está originado por la haploinsuficiencia de *NSD1*, bien por deleciones que incluyen todo el gen o mutaciones puntuales causantes de pérdida de función.

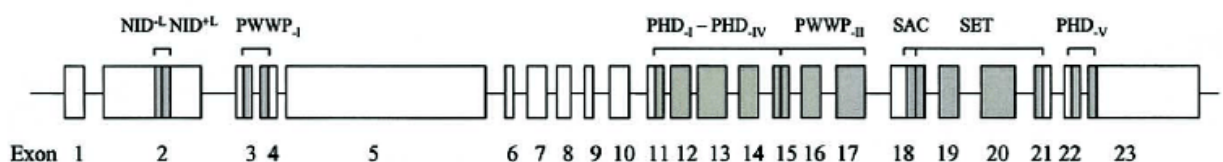
### 1.3.5 El gen *NSD1*

*NSD1* (Nuclear Receptor Set-domain-containing protein), es un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en la región q35.3 (Ver figura 2)



**Figura 2:** representación esquemática del cromosoma 5, donde se señala en rojo la región cromosómica donde se localiza *NSD1*

*NSD1* consta de 23 exones, de los cuales el primero no se traduce, que ocupan una región genómica de 161.854 pares de bases, y se expresa como un ARNm de 8,5 kilobases que codifica una proteína de 2.696 aminoácidos con múltiples dominios funcionales (Ver figura 3).



**Figura 3:** Representación esquemática del gen *NSD1* (figura modificada de Douglas *et al.*, 2003), representándose como rectángulos los diferentes exones, y en gris la ubicación de los diferentes dominios funcionales.

Los motivos funcionales incluidos en la proteína NSD1 son un dominio SET (SU[VAR]3-9,E[Z],trithorax), un dominio rico en cisteínas asociado a SET (SAC) adyacente al dominio SET, cinco homeodominios de plantas (PHD), dos dominios prolina-triptofano-triptofano-prolina (PWWP), dos dominios de interacción receptor nuclear (NR): NID<sup>-L</sup> y NID<sup>+L</sup>. Se ha demostrado que los dominios SET median interacciones con una familia de proteínas que guardan similitud con fosfatasas dual-específicas (dsPTPasas). La combinación de dominios SAC y SET está presente en proteínas que funcionan como histonametiltransferasas (HMTasas). Los dominios PHD están presentes en proteínas que actúan a nivel de la cromatina. El papel de los dominios PWWP no ha sido establecido, pero se encuentran en factores reguladores y metiltransferasas “*de novo*”, se piensa que están implicados en interacciones proteína-proteína. Los dominios de interacción NID<sup>-L</sup> y NID<sup>+L</sup> se localizan en receptores nucleares que actúan como co-represores y co-activadores respectivamente [Kurotaki *et al.*, 2001].

No están claras todavía las funciones de NSD1, pero se piensa que funciona como un factor intermediario transcripcional capaz de actuar bien activando o inhibiendo la transcripción, dependiendo del contexto celular. Además, la combinación de los dominios SAC y SET sugiere que NSD1 posiblemente esté implicado en la modificación de las histonas y la regulación de los estados de la cromatina.

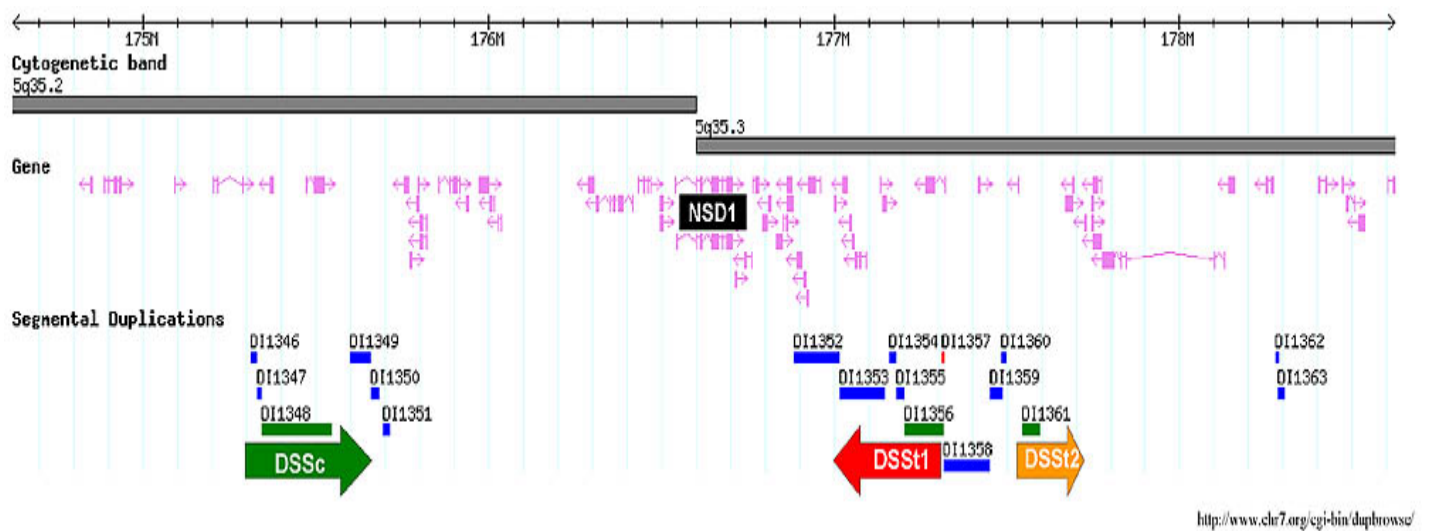
*NSD1* muestra una identidad del 86% a nivel nucleotídico con su homólogo en ratón *nsd1*, y de un 83% a nivel aminoacídico. *NSD1* se expresa en cerebro fetal/adulto, riñones, músculo esquelético, bazo, timo y débilmente en los pulmones [Kurotaki *et al.*, 2001].

En estudios con ratones *NSD1* knockout, los ratones heterocigotos son viables, fértiles y tienen un crecimiento normal, no mostrando ninguna característica propia del SS. Los ratones homocigotos muestran una gran incidencia de apoptosis al comenzar la formación del mesodermo lo que impide

finalizar la gastrulación, produciéndose una muerte temprana durante la gestación. Esto indica que la proteína juega un papel esencial en el desarrollo inicial post-implantacional [Rayasam *et al.*, 2003]

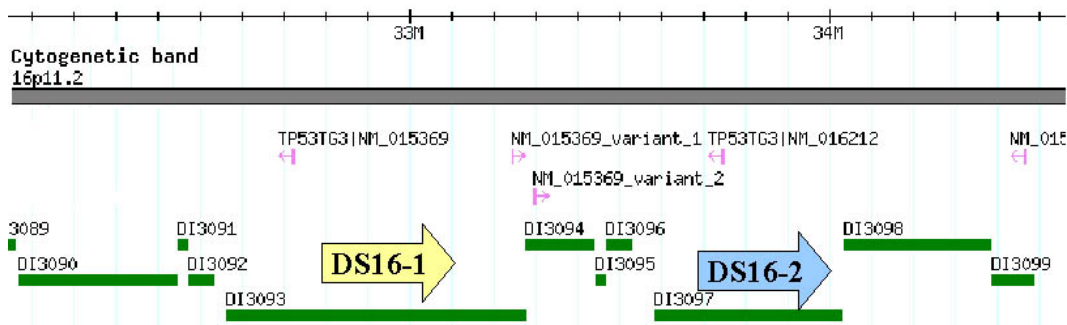
### 1.3.6 Región cromosómica 5q35 y anomalías en *NSD1*

La región 5q35 presenta tres bloques de duplicaciones segmentarias (DSs) con una identidad de secuencia mayor al 98% flanqueando el gen *NSD1*, uno centromérico a *NSD1* y 2 teloméricos a unas 2,2 Mb del primero, en orientaciones invertida y en tándem respectivamente (Ver figura 4).



**Figura 4:** La región 5q35 alrededor de *NSD1* presenta bloques de duplicaciones, uno centromérico a *NSD1* (DSSc) y dos teloméricos, en orientaciones invertida DSS1 y en tándem DSS2 como señalan las flechas.

Además existen dos bloques de DSs adicionales en 16p11.2 de aproximadamente 60 kb y con identidad de secuencia algo menor (96%) (Ver figura 5)



**Figura 5:** Bloques de DSs en el cromosoma 16 de alta homología con los de la región 5q35. Las flechas señalan la orientación de los mismos.

En Japón, las microdeleciones en 5q35, de 1,9 Mb, son la causa más frecuente de SS (más del 50%). Fuera de Japón, las microdeleciones son más infrecuentes, sumando apenas el 10% de los casos, predominando las mutaciones puntuales “de novo” causantes de pérdida de función.

En población japonesa, la mayoría de las microdeleciones son idénticas, estando los puntos de rotura proximal y distal flanqueados por estas DSs, lo que hace suponer que la deleción no ocurre al azar sino mediada por estos bloques de alta homología por el mecanismo de recombinación homóloga no alélica [Kurotaki *et al.*, 2003]. Es más, se ha detectado que, en todos los padres de pacientes con esta microdeleción de 1,9 Mb, existe una inversión entre bloques que favorecería el mal alineamiento y recombinación homóloga no alélica. Es posible que esta variante genómica sea más frecuente en población japonesa, lo que explicaría su mayor tasa de microdeleciones [Visser *et al.*, 2005].

En estudios de correlación fenotipo-genotipo, parecen desprenderse diferencias clínicas entre los pacientes con microdeleciones y aquellos con mutaciones puntuales. Hay una mayor incidencia de anomalías cardíacas y genitourinarias en los pacientes con microdeleción, parecen tener un retraso mental más acusado y el sobrecrecimiento es menos evidente que en los pacientes con mutaciones puntuales [Douglas *et al.*, 2003; Rio *et al.*, 2003]. No obstante, se hace necesario realizar estos estudios en un número más elevado de pacientes.

Las anomalías en *NSD1* son específicas del síndrome de Sotos. Aunque se han descrito ocasionalmente anomalías en *NSD1* en otros síndromes de sobrecrecimiento, como en el síndrome de Weaver, donde en estudios previos se habían encontrado tres casos atípicos de síndrome de Weaver con mutaciones en *NSD1* [Douglas *et al.*, 2003], pero en estudios más recientes con una mayor caracterización clínica de estos 3 casos, se ha puesto de manifiesto que el fenotipo de esos pacientes era reminiscente del SS. Por añadidura en estudios adicionales con series más largas de pacientes con síndrome de Weaver no se ha logrado encontrar más alteraciones afectando a *NSD1* [Türkmen *et al.*, 2003; Douglas *et al.*, 2005]. Tanto el SS como el síndrome de Weaver muestran bastantes características clínicas comunes que dificultan en gran medida el diagnóstico clínico certero, pero también existe otros aspectos que los diferencian, sobre todo la apariencia facial, que un experto genetista clínico puede reconocer.



# OBJETIVOS



1. Estudio de la región 5q35 y análisis mutacional de *NSD1* en un grupo de pacientes con hipercrecimiento y diagnóstico clínico probable o seguro de SS.
2. Estudio de la variabilidad de la región 5q35 en progenitores de pacientes con SS y en la población general, y análisis evolutivo de la región en primates.
3. Definición del origen parental y de los puntos de rotura en casos de en microdeleciones en 5q35, así como estudio de las DS.
4. Estudio de correlaciones clínico-moleculares en los pacientes con mutación de *NSD1*
5. Análisis de alteraciones de genes y regiones candidatas a influir en el crecimiento, en aquellos pacientes con sobrecrecimiento sin mutaciones en *NSD1*,
6. Investigación de la presencia de reordenamientos genómicos en el grupo de pacientes con un diagnóstico clínico claro, de sobrecrecimiento sin causa molecular identificada con los estudios anteriores.

# PACIENTES Y MÉTODOS



### 3.1 Pacientes

Se han estudiado 51 pacientes con sospecha clínica de SS, procedentes de diversos hospitales de la red nacional de sistemas de salud y de la Universidad Católica de Chile, así como dos pacientes con diagnóstico clínico de síndrome de Weaver.

De cada paciente se obtuvo el consentimiento informado para la participación en el estudio y el consentimiento de documentación fotográfica. Se solicitó además rellenar un protocolo clínico al médico de referencia (adjunto en anexo) donde se recoge detalladamente a través de un cuestionario específico la historia familiar, la historia perinatal, la historia médica y el examen físico del paciente.

Los pacientes reclutados en el estudio manifiestan un amplio espectro de fenotipos que incluyen: diagnóstico clínico claro de SS, sobrecrecimiento y/o macrocefalia pero sin las características faciales típicas del SS, y pacientes con “gestalt” sugerente de SS pero sin sobrecrecimiento manifiesto.

Se solicitaron fotografías de todos los pacientes pero sólo se obtuvieron fotografías faciales de 20 de ellos, que fueron evaluadas por un experto genetista, ignorando en todo momento si el paciente era o no *NSD1* positivo. Los pacientes fueron clasificados en tres categorías: (+) SS típico, (P) posible SS, (-) no sugerente de SS.

Para los estudios moleculares se solicitaron tres mililitros de sangre con EDTA del paciente y familiares de primer grado para extracción de ADN genómico, y además se realizó una extracción de ARN en los casos en que se dispuso del volumen adicional necesario. Se solicitó también un mililitro de sangre con heparina del paciente y de sus padres para cultivos de linfocitos, para la obtención de *pellets* celulares para estudios de hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Se utilizó en cada caso procedimientos estándar.

## 3.2 Estudios de la región 5q35 y del gen *NSD1*

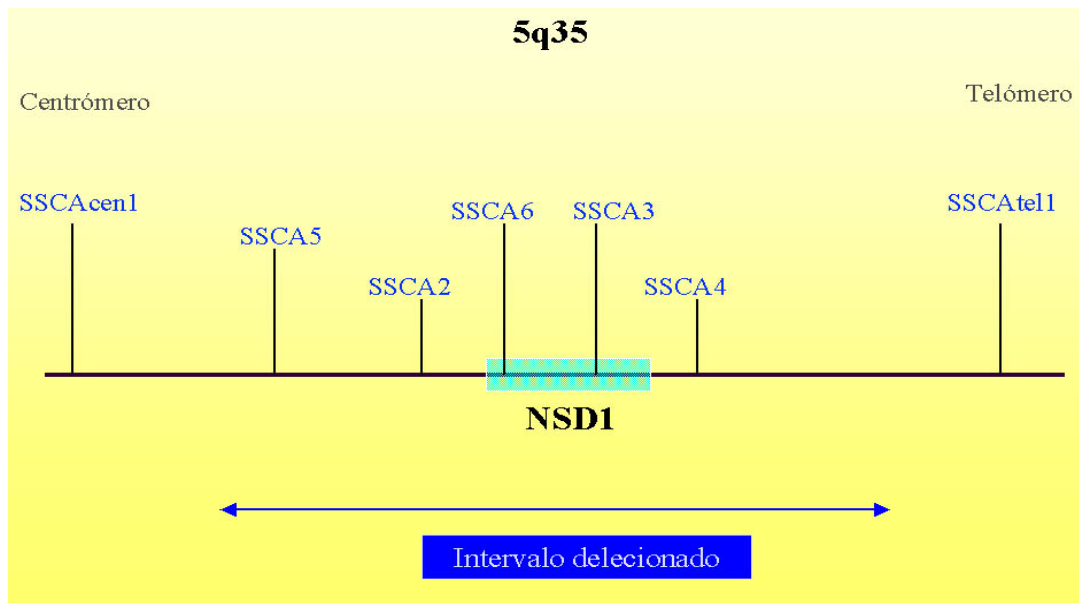
### 3.2.1 Análisis de microdeleciones

Para identificar posibles microdeleciones que afecten el gen *NSD1*, se analizaron marcadores microsatélites de la región, FISH con varios BACs y PCR cuantitativa a tiempo real en el locus *NSD1*:

#### 3.2.1.1 Estudios de microsatélites

Se buscaron microsatélites potencialmente polimórficos en una región de 2 Mb, unos incluidos en las DS que flanquean al gen *NSD1*, otros en la propia secuencia del gen y otros en las regiones centromérica y telomérica a estas DS. Para ello se analizó informáticamente (Repeat Finder) la secuencia de BACs de la región para localizar elementos repetidos en tándem de dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos. Una vez localizados, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar estas regiones usando el programa informático Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)).

Análizamos 7 microsatélites: SSCAcen1, SSCA2, SSCA3, SSCA4, SSCA5, SSCA6 y SSCAtel1. SSCAcen1, es centromérico a la región comúnmente delecionada en pacientes japoneses; SSCA5 se incluye en el extremo más centromérico a *NSD1* del intervalo comúnmente delecionado; SSCA2 es también centromérico y adyacente a *NSD1*; SSCA3 y SSCA6 se localizan dentro del gen *NSD1* (intron 17 y 2 respectivamente); SSCA4 es adyacente y telomérico a *NSD1*; SSCAtel1 se localiza fuera de la región comúnmente delecionada hacia telómero (Ver figura 6).



**Figura 6:** Posición relativa de los microsatélites estudiados respecto a *NSD1*, indicando si se encuentran fuera o dentro del intervalo comúnmente deletado.

**Tabla 2.** Secuencia nucleotídica de los oligos utilizados para amplificar los microsatélites

Secuencia de oligonucleótidos	
SSCAcen	F 5' TTAAACAAAATATATAAAAATGCCTG 3'
	R 5' AATGAATCTTACAACAATTTGG 3'
SSCA2	F 5' CTGAGCAACAGCAAAACTCG 3'
	R 5' TGACCCCTGGGTATTACCTTC 3'
SSCA3	F 5' GAGACAGGGGGAGACTCCAT 3'
	R 5' CTTTGATGGCATTGTTCCTG 3'
SSCA4	F 5' TGTGAACGTTCCCTCCATACTG 3'
	R 5' GATGAATACACGGAATGTGGTC 3'
SSCA5	F 5' AGGCCGGGGGTGGAAT 3'
	R 5' AGCTGCCTGGGTGTGAGAAG 3'
SSCA6	F 5' GCACCGTTTTACAGTCCTACTT 3'
	R 5' CTGCAGTGAGCCAAGACCAT 3'
SSCA1	F 5' GGTGGCTCACACATATAATTC 3'
	R 5' AGA TGATTCCCATTACATTTTG 3'

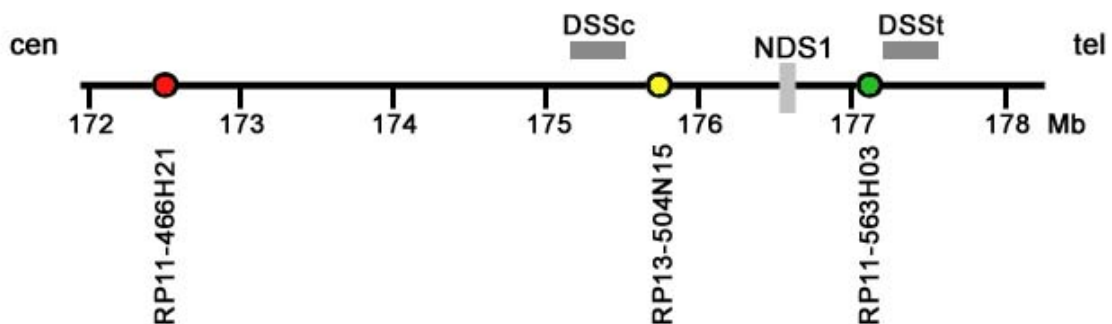
Las PCR se realizaron en un volumen de reacción de 10  $\mu$ l conteniendo 50 ng de ADN genómico, 0,25 U Taq polimerasa, 10% de búfer (10x), 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 4 mM de cada dNTP y 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido. Las muestras fueron amplificadas tras 4 minutos de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30", 56-59°C durante 30", 72°C durante 30"), y una extensión final a 72°C de 7'. Un oligonucleótido de cada pareja fue marcado con uno de estos fluorocromos: FAM, HEX, o NED. Los productos de



PCR fueron analizados en ABI PRISM3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems), y la longitud y áreas de los picos de los alelos fueron calculadas con el programa GeneScan 3.7 (Applied Biosystems).

### 3.2.1.2 Estudios de FISH

Dos de las microdeleciones fueron verificadas por FISH (Hibridación *in situ* fluorescente) sobre extensiones de núcleos interfásicos procedentes de linfocitos de sangre periférica cultivados según procedimientos estándar, tratados con una solución hipotónica y fijados con metanol/ácido acético (3:1). Se emplearon sondas no comerciales a partir de BACs. Los clones fueron obtenidos de la librería genómica de BACs del Children's Hospital Oakland Research Institute ([www.chori.org/bacpac](http://www.chori.org/bacpac)) de la librería 32k disponible en el Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). Los BACs utilizados fueron RP11-466H21, RP13-504N15, RP11-563H03 marcados con biotina-16-dUTP y/o digoxigenina-11-dUTP (Roche®) (Ver figura 7). Se valoraron las preparaciones con un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100x), captándose las imágenes con el programa de análisis de imagen digital de Cytovision (Applied Imaging®).



**Figura 7:** Posición en el brazo largo del cromosoma 5 de los clones utilizados en los experimentos de FISH, representados por círculos de colores que reflejan la señal emitida según los fluorocromos empleados en cada caso. También se representa la ubicación relativa de las DS (DSSc y DSSt) que flanquean al gen *NSD1*.

### **3.2.1.3 PCR cuantitativa a tiempo real**

La PCR cuantitativa a tiempo real se realizó por el método de la curva estándar con SYBR<sup>®</sup> Green (Applied Biosystems) con el objetivo de identificar microdeleciones. El amplicón estudiado fue del exón 5 (fragmento 5K) de *NSD1*, utilizando como control endógeno un amplicón del gen *CYLN2*, cromosoma 7q11.23. La reacción se llevó a cabo en ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) bajo condiciones estándar (2' 50°C, 10' 95°C, 40 ciclos 30" 95°C, 30" 58°C, 30" 72°C, y una extensión final de 10' a 72°C), los resultados fueron analizados con el software ABI Prism Sequence Detection System (SDS v2.1).

### **3.2.2 Análisis mutacional de *NSD1***

Se realizó por dos métodos: amplificación y análisis individual de diversos amplicones y zonas flanqueantes con exones y por secuenciación directa del cDNA obtenido de RNA mediante RT-PCR

#### **3.2.2.1 Análisis de exones y zonas de unión exón-intrón**

*NSD1* consta de 23 exones, de los cuales el primero es no codificante. Para amplificar los 22 exones restantes y las zonas de unión exón/intrón se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Douglas *et al.* [Am. J. Hum. Genet., 2003] (Ver tabla 3). Los exones mayores de 400 pb se amplificaron utilizando oligonucleótidos solapantes. El gen fue amplificado y rastreado en 40 fragmentos.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia codificante de *NSD1*, y tamaños de los productos de PCR amplificados

Exón	Primer directo (5'—3')	Primer reverso (5'—3')	Tamaño (pb)
2A	AGAGTCGAGTCAGATGGCCTA	GATCCATCAGCAGACCATT	355
2B	GTGGAACATCCCAAAATGCT	TCTGTGACTGGCTGTTCTGG	367
2C	TGGCTTTCTGCACTTTGAGA	GAAGGGCTGCTTTTTTCATTG	317
2D	GCCATTCTTGCCATTAGCTC	TTCCCTTTAAGTGGCCTGT	323
3	TGCTTTTTTTCAGAAGGCTAATAGG	TCATTCACAAAATGTTCCAAGG	332
4	GCAATGATGTGGCTGTTCTC	TCCAATCTGGGAAACAGAGC	364
5A	TCTGATTTTCATCTCCCTTTTCC	GGCTTTTCTTCTCATCTGC	315
5B	ATGCCATTTGAAGACTGCAC	TCCACAGGAAGAAAACAGAAAA	360
5C	CGCAGGCCTCTAATGAACTT	GATGGGATCCAGGTCACTGC	323
5D	GGAAAAGCGAAGTGATTCCA	TCTGACTGGGGTTTGTGAAC	348
5E	GGGTTGTACTAAGAGTGCAGAGC	TTAGAAATGCTGGCCAAAGG	348
5F	TATGGCAGAACCCCCAGTTA	CGCTGCTCCTTCGTCTTACT	381
5G	TGGAACATCAAAGCCATCAA	CGCCAGATAATGCAGAGTCA	332
5H	GGCTCCACACACAATTCAGA	CTCCCTGCAGTACAGCATCA	334
5I	ATGCTTTTTTCAGCCCAAATG	CTGGGCCTTTTCCGTTTT	312
5J	GATGTGCATTTTCGATAGCAAG	GCTCTGTCAGTGGTTCCTCA	343
5K	GGTCTTACTTCCCTAGTGACC	TATCACATTTAGATGTCCTTAC	255
6	ATGTGGTTTTCCCATCTGGTT	TGACATTGAAGATAAAAATTGCAG	300
7	AACAATTTTGGCCTGTGGAC	TCAAATACTGAGACCCCAACC	345
8	TTGTGCCCAGTTTCTAAATCA	TGCAAAACAGCCTTTCATGT	327
9	TGGCAGCTGACAATTCAGAC	CTCACTGGTCGGGCTTACAC	268
10	CCCGTTTTTCTAATCCACAA	CCTCTGGCGTGAAAAGTAGC	310
11	AGGGGGTCAAATGGAAGAGA	GATGGAGTGGGTTTCCCTTT	273
12	TCACCTCCTTTTCTGCCACT	CCCAGTGTTGCCACAAAATA	337
13	TGGGTTTCAGACGATGTCAAA	TCTGTTGCCAATTAAGTGGAGG	383
14	TCCATCATCTTAGTGGTCATTCC	TCCAGTGGCAATATGATGAAA	411
15	TGGATGTACACATACATGACTTGC	AAGAGGGGAGGAGTACCATGA	342
16	ATTTTCTAATGCCTTGCAG	GGCAGTTTCAAATGGAGCA	364
17	TCTCCAACCTTAAAGGGGAAAAA	AGAGTGGGAAGAGCCAGCTA	273
18	GGACGTGAATTGTCTTCTGCT	TCAAGCAACTGCAAAGAGGA	381
19	CTGCTGCTGACAGTGGTAGG	TATGGCTGGGACAACACAAA	386
20	AAATTTTAATCCACAGCAGAGGTC	GTGGTGATGGTTGCACAAAA	356
21	CTCTTGGGAGTTGGTATCCTTT	ACACTGTTAGGGAGGGAGGAC	257
22	GAATGAGGCTCAGAGAGGGTA	AAATGGCATGAGACCCTGAG	360
23A	GGAAGGTCATCATCCACACC	GATTGCTCTGCCAGGTGAGT	356
23B	TGGGGAGATCCGTGAGTATG	CTGGTCACTGGAGAGGGTTT	369
23C	AATCCCAATCCTTGGTTTCC	GGTCTGGACCACAGCTGATA	380
23D	CCTACTGACAAACCCCATGC	CTGCTGCTTCCAGATGTC	346
23E	AGCAAAGGTCTGGGGCATA	CAGGGACTTGTCTGTGGT	395
23F	TTTTAGGTCTCTCGGGAAGG	GGGGCAGCTTGTGTTGTTT	331

Todos los fragmentos se han amplificado en un volumen de reacción de 25  $\mu$ l ó 50  $\mu$ l según el caso, conteniendo 100 ng de ADN genómico, 0,625 U de Taq polimerasa (para reacción de 25  $\mu$ l), 1,25 U de Taq polimerasa (para reacción de 50  $\mu$ l), 10% de búfer (10x), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4 mM de cada dNTP y 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido. Las muestras fueron amplificadas tras 4 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de amplificación (94°C durante

30'', 56-59°C durante 30'', 72°C durante 30''), y una extensión final a 72°C de 7'. El amplificado se comprobó por electroforesis en gel de agarosa 1% con tinción de bromuro de etidio. Se analizó la presencia de mutaciones en todos los fragmentos mediante SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) y/o dHPLC (denaturing high-pressure liquid chromatography).

En la técnica de SSCP se desnaturalizan los productos de PCR a 94°C para posteriormente enfriarlos rápidamente en hielo impidiendo que las moléculas de cadena simple se vuelvan a emparejar, y posteriormente se someten a una electroforesis en un gel de acrilamida 10%. Para aumentar la fiabilidad de esta técnica, cada fragmento se rastreó por SSCP a dos temperaturas diferentes (a 4°C y a temperatura ambiente).

En la técnica de dHPLC la temperatura determina la sensibilidad de este método. Se determinaron informáticamente las distintas temperaturas óptimas de desnaturalización para cada fragmento de *NSD1* mediante el uso del software "Melt program" (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>). Los estudios de dHPLC fueron realizados en la Unidad de Genotipación del Centro de Regulación Genómica (CRG).

En ambos métodos, en los casos en que se detectaron patrones de migración electroforética anómalos, se realizó otra PCR del mismo fragmento, se purificó con el kit GFX™ PCR ADN (Amersham Biosciences) y posteriormente se secuenció en ABI3100 (Applied Biosystems) usando BigDye® v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems).

En los casos de mutación, se analizó también el ADN parental (secuenciación directa y/o digestión enzimática cuando la mutación crea o altera una diana de restricción).

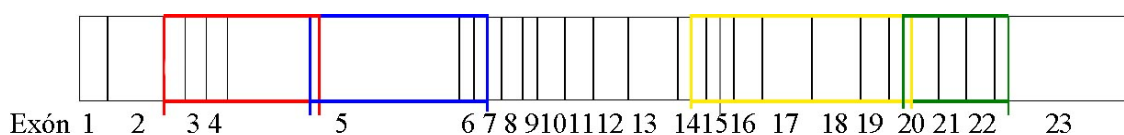
### 3.2.2.2 RT-PCR y secuenciación

En los 12 pacientes de los que se dispuso de ARN linfocitario, se estudió la expresión de *NSD1* y se rastrearon mutaciones mediante RT-PCR y secuenciación directa de 4 fragmentos que incluyen la mayor parte del ADN codificante del ADNc de *NSD1* (Ver figura 8).

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la RT-PCR

fragmento	Primer directo (5'—3')	Primer reverso (5'—3')	Tamaño (pb)
RT-PCR1	GCCATTCTTGCCATTAGCTC	CGCTGCTCCTTCGTCTTACT	2106
RT-PCR2	TGGAACATCAAAGCCATCAA	GGAGCCTCCCTTTCAAGAAC	1413
RT-PCR5	TTAGCTGGTGCTTTGTGTGC	CACGGGTATCTCCATTACACA	999
RT-PCR6	CCAGCCCAACTGTGAAACAC	GATTGCTCTGCCAGGTGAGT	651

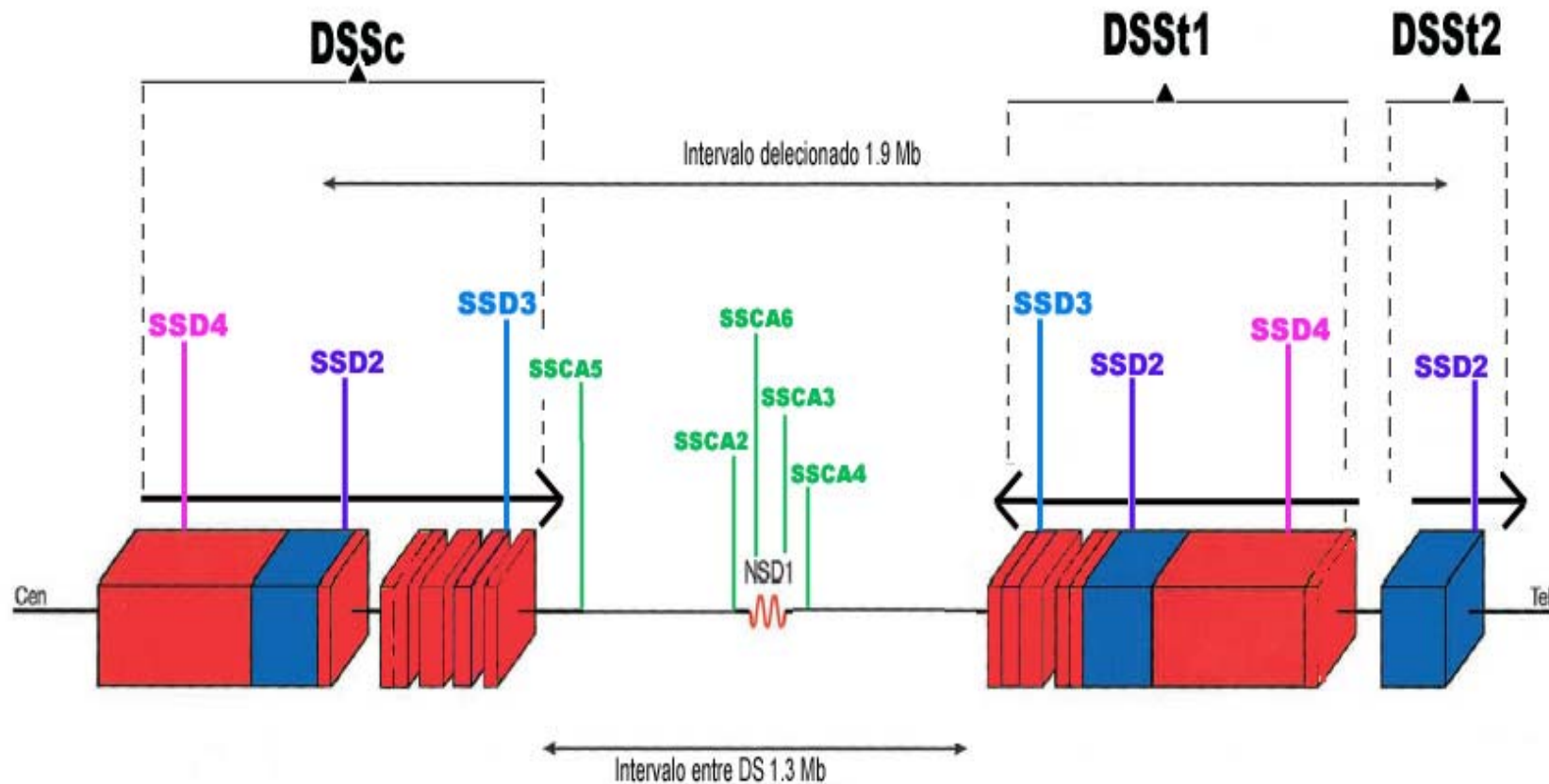
Todos los fragmentos se amplificaron en un volumen de reacción de 25  $\mu$ l, conteniendo 100 ng de ADNc, 0,625 U de Taq polimerasa, 10% de búfer (10x), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4 mM de cada dNTP y 0,2  $\mu$ M de cada oligonucleótido. Las muestras fueron amplificadas tras 4 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de amplificación (94°C durante 30'', 56-58°C durante 30'', 72°C durante 1'-2'), y una extensión final a 72°C de 7'. Posteriormente, se secuenció a partir de purificación de banda en gel de agarosa 1% con el kit GFX™ PCR ADN (Amersham Biosciences). En los casos en los que la amplificación fue muy débil, se realizó una re-amplificación para posteriormente secuenciar los fragmentos purificados de banda en ABI3100 (Applied Biosystems) usando BigDye® v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems).



**Figura 8:** Representación de todos los exones que componen *NSD1*, cada rectángulo de color se corresponde con cada fragmento diferente. En rojo el fragmento RT-PCR1, en azul el fragmento RT-PCR2, en amarillo el fragmento RTPCR5 y en verde el fragmento RT-PCR6

### **3.2.3 Análisis evolutivo y de las duplicaciones segmentarias**

Realizamos un análisis evolutivo en la región 5q35 mediante el estudio de dos microsatélites marcadores (SSD2 y SSD4) de las duplicaciones y el estudio de una variante paráloga de secuencia (SSD3). SSD2 se localiza en los tres bloques de DS y en dos bloques adicionales en el cromosoma 16p11.2. SSD3 es una variante paráloga de secuencia entre DSSc y DSSt1, consistente en la pérdida de tres nucleótidos en el bloque de DS centromérico respecto al primer bloque de DS telomérico. SSD4 está presente en en DSSc y DSSt1 (Ver figura 9).



**Figura 9:** Representación esquemática de las DS que flanquean *NSD1*: DSSc, DSSt1 y DSSt2. Las flechas horizontales muestran la orientación genómica de los bloques. Se indica en verde la posición relativa de los microsatélites internos al intervalo comúnmente deletado, en morado el marcador interno a las duplicaciones segmentarias SSD2, en azul SSD3 y en rosa SSD4.

Se han estudiado muestras de primates hominoides, al menos dos por especie, (chimpancé, gorila, orangután y macaco) en población normal, así como en todos los pacientes y progenitores incluidos en este estudio.

**Tabla 5.** Secuencia de oligonucleótidos para amplificar los microsatélites marcadores de las duplicaciones

SSD2	F 5' CAGTMGCATGCCACCATTC 3'
	R 5' TGTGTTTTGTCTACCTGGGACT 3'
SSD3	F 5' GGTTTGCATAGGTTTCAGTGGA 3'
	R 5' AGGGCCTAGGAATGTTTGC 3'
SSD4	F 5' CCCCAGTTAAAGTATCAGGAAGC 3'
	R 5' GCTATTTTGATGCCGATACCA 3'

Las PCRs se realizaron siguiendo protocolos habituales de nuestro laboratorio en un volumen de reacción de 10 µl conteniendo 50 ng de ADN genómico, 0,25 U de Taq polimerasa, 10% de búfer (10x), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 4 mM de cada dNTP y 0,2 µM de cada oligonucleótido. Las muestras fueron amplificadas tras 4 minutos de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (94°C durante 30", 56-59°C durante 30", 72°C durante 30"), y una extensión final a 72°C de 7'. El oligonucleótido reverso de SSD2 estaba marcado con el fluorocromo HEX y el de SSD3 y SSD4 estaban marcados a su vez con el fluorocromo FAM. Los productos de PCR fueron analizados en ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems), y la longitud y áreas de los picos de los alelos fueron calculadas con el programa GeneScan 3.7 (Applied Biosystems).

### 3.2.4 Estudios de detección del fragmento de unión

En los pacientes con microdelección se trató de amplificar mediante un ensayo de PCR el fragmento de unión resultante de la delección producida en uno de los cromosomas, utilizando para ello una pareja de oligonucleótidos (SET 2) directo y reverso específicos a DSSc y DSSt1 respectivamente descritos por Visser *et al.* [Am J Hum Genet., 2005].



**Tabla 6.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para amplificar el fragmento de unión.

SET2	F 5' CACCAAAGGCCAGTGATGCCAATAT 3'
	R 5' AGCCCTCCCCTGGCCGACTG 3'

El fragmento de 6,9 Kb se ha amplificado utilizando el kit Expand Long Template PCR System de Roche®, en un volumen final de 25 µl, conteniendo 100 ng de ADN, 2,6 U de Expand High Fidelity enzyme Mix, 2,5µl del búfer, 1, 4 mM de cada dNTP y 300 nM de cada oligonucleótido. Las condiciones de termociclado fueron de 2 minutos de desnaturalización a 94°C, 10 ciclos de amplificación (94°C durante 10", 57°C durante 30", 68°C durante 6'30") y 25 ciclos de amplificación (94°C durante 10", 55°C durante 30", 68°C durante 6'30"\* , \*10" adicionales en cada ciclo) y una extensión final a 72°C de 20'. El producto fue visualizado y purificado de banda en un gel de agarosa 1% con el kit GFX™ PCR ADN (Amersham Biosciences) para posteriormente ser secuenciado con dos oligonucleótidos (Frag-Union 1 y 2) diseñados para estudiar el punto caliente de recombinación de SS en ABI3100 (Applied Biosystems) usando BigDye® v3.1 Sequencing Kit (Applied Biosystems).

**Tabla 6.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados para secuenciar internamente el fragmento de unión.

Frag-Union 1	F 5' CTTCAAAGCTGGCTTCATCC 3'
Frag-Union 2	R 5' ACACCAGGGCTAGGCTCAAT 3'

### 3.2.5 MLPA de reordenamientos intragénicos en *NSD1*

En 13 pacientes de la serie, con criterios claros de SS y en los que no se encontró ninguna mutación puntual ni la delección más frecuente en este síndrome, se realizó un estudio de reordenamientos intragénicos en *NSD1* con el kit comercial SALSA MLPA Kit P026B ®, en el Hospital Universitario de la Paz (Madrid).

La técnica de MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) [Schouten JP, Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 12] permite detectar y cuantificar el número de copias de varias secuencias diferentes en una misma reacción a

partir de 100 ng de ADN. Esta técnica consiste en la hibridación específica en las regiones génicas diana de 2 oligonucleótidos adyacentes y la ligación de los mismos mediante una reacción enzimática. Únicamente los oligonucleótidos ligados serán amplificados mediante PCR con una única pareja de cebadores gracias a que todas las parejas de oligonucleótidos ligados tienen en sus extremos secuencias comunes homólogas a los cebadores de PCR.

Estos experimentos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones precisadas por el fabricante (MRC-Holland, <http://www.mrc-holland.com> ). Los productos de ligación se amplificaron por PCR, utilizando oligonucleótidos marcados con el fluorocromo FAM suministrados por el fabricante. Los productos de PCR fueron analizados en ABI PRISM3100 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Los picos correspondientes a los distintos productos fueron identificados en función de sus diferentes tamaños. La longitud y áreas de los picos de los productos de PCR fueron calculadas con el programa GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).

Todos los datos fueron analizados en una hoja de cálculo con Microsoft Excel. Los datos fueron normalizados dividiendo cada altura/área de pico de la muestra por la media de alturas de picos de la misma muestra. Este patrón de picos normalizado fue dividido por la media normalizada de cada pico de todas las muestras del experimento. Los valores resultantes son de aproximadamente 1 para cada pico salvaje, 0,5 para identificar las deleciones heterocigotas y 1,5 para duplicaciones heterocigotas.

### 3.3 Estudios de regiones y genes candidatos de sobrecrecimiento

#### 3.3.1 Estudios de MLPA

Adicionalmente a la región 5q35 y el gen *NSD1*, hemos diseñado un ensayo múltiple por MLPA para buscar posibles variaciones en el número de copia de otras regiones que contienen genes candidatos a participar o influir en el crecimiento humano. Escogimos la técnica de MLPA por la posibilidad de multiplexar y así poder rastrear en un solo experimento alteraciones de número de copia en todas ellas, además de por su asequible coste, robustez y reproductibilidad.

En total se seleccionaron 19 regiones o genes relacionados con crecimiento y diversos síndromes con alteración del crecimiento. La mayoría son fehacientemente conocidos por jugar un papel relevante en la regulación del crecimiento y el resto son regiones y genes propuestos en la literatura como buenos candidatos a participar en este proceso:

- *GH1* (17q24.2)
- *LIT1* (11p15) Beckwith-Wiedemann
- *IGF2* (11p15) Beckwith-Wiedemann
- *PTEN* (10q23.3) Bannayan-Riley-Ruvalcaba
- *NSD1* (5q35) Sotos
- *GPC3* (Xq26.1) Simpson-Golabi-Behmel.
- *HRAS* (11p15.5) Costello
- *SHOX* (Xpter-p22, Yp11.3)
- *FAM51A1* (Xp22) Simpson-Golabi-Behmel
- *TGFBR2* (3p22) Marfan
- *BCAT1* (12p) tetrasomía 12p, Pallister-Killiam.
- *PINX1* (8p23) trisomía 8
- *CSDM1* (8p23) trisomía 8

- *IGF1R* (15q26.3) Dup 15q25-ter
- *TGFBR1* (9q22) Del 9q22
- *FBN1* (15q21) Marfan
- *EP300* (22q13) Del 22q13.2
- *RAI14* (5p13.2) Dup 5p
- *FGFR3* (4p16.3) Dup 4p16

Así pues, procedimos al diseño manual de las sondas hibridantes en las regiones seleccionadas, atendiendo a los requerimientos y condicionantes para un adecuado funcionamiento de las mismas.

Las sondas fueron diseñadas con diferentes tamaños a fin de poder ser identificadas en el electroferograma, con una diferencia de dos nucleótidos respecto a la sonda inmediatamente anterior y a la posterior. Dos sondas del primer juego y una del segundo tuvieron que ser revisadas, lo que llevó a variar la longitud de las mismas, ya que los resultados experimentales mostraron cierto grado de solapamiento con los picos correspondientes a otras sondas adyacentes, lo que impedía la correcta identificación de cada pico en función de su tamaño, y la adecuada cuantificación de la altura y área de las mismas.

Se determinó experimentalmente la concentración idónea de cada sonda en la “mix” de hibridación donde se incluyen todas ellas, con el fin de que todas las sondas resultasen en unos niveles de amplificación similares, para facilitar el análisis.

Además se realizaron análisis en la región 3q21.1 (duplicada en uno de los pacientes) en todos los pacientes con criterios clínicos de sobrecrecimiento y en 210 controles. Concretamente se estudiaron los genes *ADCY5*, *PTPLB* y *MYLK* utilizando 6 sondas diseñadas en las localizaciones que se indican en la figura 10.



**Figura 10:** Representación esquemática de la región cromosómica 3q21.1 con los genes *ACDY5*, *PTPLB* y *MYLK*. Indicándose mediante círculos amarillos la localización relativa de las 6 sondas utilizadas en el estudio.

En cada gen o región se analizó la posible variación en el número de copias génicas a través de la técnica de MLPA (Multiplex Ligation Probe Amplification) [Schouten JP, Nucleic Acids Research 2002, Vol 30, No. 12].

Cada gen o región seleccionada, se estudió en todos los pacientes mediante dos juegos de sondas diferentes diseñadas manualmente a partir de las secuencias obtenidas en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), con las que se pudo estudiar ganancias o pérdidas de copias génicas en zonas no contiguas del mismo gen o región génica.

**Tabla 7.** Secuencia de las sondas utilizadas en el Juego 1 de sondas de sobrecrecimiento

Sondas Juego 1			
Región	Gen	Sonda L	Sonda R fosforilada en 5'
17q24.2	<i>GHI</i>	CTTTCCCCGCTGGGAAATAAG	AGGAGGAGACTAAGGAGCTCAGGG
11p15.5	<i>LIT1</i>	GGATTACTCAGCCCAGATCACGGCT	GCTTTTGTTTACGTGGCCCCCTG
11p15.5	<i>IGF2</i>	GTTTCCATCAGGTTCCATCCCGA	AAATCTCTCGGTTCCACGTCCCCCTGG
5q35	<i>NSD1</i>	CCCAAAAAGAGCTAAGACAGCTGCAGGAA	GACCGAAAGAATGACAAGAAGC
11p15.5	<i>HRAS</i>	GTTTGCCATCAACAACACCAAGTC	TTTTGAGGACATCCACCAGTACAGGTGAAC CC
Xq26.1	<i>GPC3</i>	GGTACTGCTCTTACTGCCAGGGACTGATGA TG	GTTAAACCCTGTGGCGGTTACTGC
10q23.3	<i>PTEN</i>	GTGTGGAATGAAGTGAGGCTGTAGTC	ATGGTTCTAGTGTTCAGTTTGCCAAGTCT G
X Y	<i>SHOX</i>	CTGCTATACCCTATGCATGCGGTTAACTA	CACACGTTTGGAAGATCCTTAGAGTCTATT G
12p12.1	<i>BCAT1</i>	GTGGAGTGGTCCTCAGAGTTTGGATGGGAG AAAC	CTCATATCAAGCCTTTCAGAACCTGTC
8p23	<i>PINX1</i>	GAGTAATGACGATTCCAAGTTTGGCCAGCG GA	TGCTAGAGAAGATGGGGTGGTCTAAAGGA AAG
8p23.2	<i>CSMD1</i>	CTGGCATTCTATAAACGG- ACGACGTTTTGGTGAC	AGGTTTCTACTCGGGAGCTCGGTTTCTTTC C
15q26.3	<i>IGF1R</i>	CATTTCTAACCTTCGGCCT- TTCACATTGTACCGCATCG	ATATCCACAGCTGCAACCACGAGGCTGAG AAG
15q21.1	<i>FBNI</i>	GGAGGACCAGGAAACAGCCT- CAGTGCCAGAGGATCA	CCAGTGCATCCTTCATCACAG- CATGTGCAATATGC
Xp22.2	<i>FAM51A1</i>	CTCCACCAGCCCATTGGA- GAAAAGTTACTGTTTCAG	TCCCTGAAGGCTTGTGCCATAAAA- GAGTGGGAGACATTC
22q13.2	<i>EP300</i>	CCCAACAGAGCAGTCCTGGATTA- GGTTTGATAAATAGCATGGTC	AAAAGCCCAATGACACAGGCAGGCTTGAC TTC
5p13.2	<i>RAI14</i>	CCCCTTGTCATCTGTCTTTG- TGTTAGATCCAGAGTTG	TCGGCAGCCGCTGCCATTGTT- CTCATTCTGGTATGCACTG
4p16.3	<i>FGFR3</i>	GCCTGGACTGCTACCTTTCAAAGCTTGGAG GGA	AGCCGTGAATTCAGTTGGTTCGTT- CTGTACTGTTACTGGGCCCTGAG
3p22	<i>TGFBR2</i>	CCTGCCTAGCACTTCTCTTGCCCA- TGGAATAAGTACAGTGGCAC	TGTTTGAGGACCAGTGTCCCGGGGT- TCCTGTGTG
9q22	<i>TGFBR1</i>	CCCCACAGCCGTTTACTGAAGGCT- GCTCTGGAGACCTAGAGTAAA	ACGGCTGATGGAAGTTGT- GGGACCCACTTCCATTCC

**Tabla 8.** Secuencia de las sondas utilizadas en el Juego 2 de sondas de sobrecrecimiento

Sondas Juego 2			
Región	Gen	Sonda L	Sonda R fosforilada en 5'
3p22	<i>TGFBR2</i>	GCTCACCTCCACAGTGATCACAC	TCCATGTGGGAGGCCCAAGATGC
4p16.3	<i>FGFR3</i>	CCACCAATTTTCATAGGCGTGGCCGA	GAAGGCCTTTTGGCTGAGCGTTC
5p13.2	<i>RAI14</i>	CATTCCACCCAAACTGACTTGGGCCCA	TCCCTGGGAAAACCTGGTGAAC
9q22	<i>TGFBR1</i>	GTGCTGACATCTATGCAATGGGCTT	AGTATTCTGGGAAATTGCTCGACGATG
22q13.2	<i>EP300</i>	CAGCCATGATGTCAGTGGCCAGCATG	GTCAACCTTTGAACATGGCTCCACAAC
Xq26.1	<i>GPC3</i>	GTCAGCAGGCAACTCCGAAGGACAA	CGAGATAAGCACCTTTCACAACCTCGGGA AC
15q26.3	<i>IGF1R</i>	CATTTACCTCCACCACCACGTCGAAGAA	TCGCATCATCATAACCTGGCACCGGTACC
Xp22.2	<i>FAM51A1</i>	GTAGTGAGACAAATACCACTACCTGTAGTG GAG	AGGGATGCATGTTCTATAAAGGGCCAG
15q21.1	<i>FBN1</i>	CCCGGGCTCTGTCAGGGA- GGAAATTGCATTAATAC	TGTTGGGTCTTTGAGTGCAAATGCC
8p23.2	<i>CSMD1</i>	CATCCCTGTGAACGGCCATCGC- CACGGTGGAGACTTT	GGCATCAGGTCCACAGTACTTTCAGC
17q24.2	<i>GHI</i>	CAATCCTGGAGCCCCACTG- ACTTTGAGAGCTGTGT	TAGAGAAACACTGCTGCCCTCTTTTTAGCA G
11p15.5	<i>IGF2</i>	CTATCCTTGATACAACAGCTG- ACCTCATTTCCCGATACC	TTTTCCCCCGAAAAGTACAACATCTGG
11p15.5	<i>LIT1</i>	GCATACGGTCACGAGAGTGCAA- GTCTGTGAAACGCTCCAGTGG	TTACACGCCCCGGGTTTCAGCTTC
10q23.3	<i>PTEN</i>	CCTCTACACTGAGCAGCGTGGTCACCTGGT CCTTT	TCACCTGTGCACAGGTAACC- TCAGACTCGAGTCAGTG
11p15.5	<i>HRAS</i>	GGAGCAGATCAAACGGGTGAA- GGACTCGGATGACGTGCCCATGG	TGCTGGTGGGGAACAAGTGTGACCTGGCT G
X Y	<i>SHOX</i>	GGATTTATGAATGCAAAGA- GAAGCGCGAGGACGTGA	AGTCGGAGGACGAGGACGGG- CAGACCAAGCTGAAACAGAG
5q35	<i>NSD1</i>	GCCAGTGTGGACTTGCAGAACA- GTATGATGTTCCAAGGGGTCAA	AGAACCGAAAATGTATTCTGGTTCAATCA AG
12p12.1	<i>BCAT1</i>	GAGGATACCAACTGTATG- CTACTGGGACAGACTGTT	GCATTTGAATTGTGATAGATTCTT- TGGCTACCTGTGCATAATG
8p23	<i>PINX1</i>	CTCGGTTCCCTTCAATAACAATGAATGGTG C	TTTCTTCTGAAAGACTCAGCCTAATTAAG -GATTAAGAGGCAATAGCTTGG

**Tabla 9.** Secuencia de las sondas específicas para el estudio de la región 3q21.1

Gen	Sonda L	Sonda R fosforilada en 5'
<i>ADCY5-1</i>	CGTGGTCAAGGTCAAGGGCAAAGGCGA	GATGATGACCTACTTCCTCAATGGAGGGC
<i>ADCY5-2</i>	CAATGTTCTCATTTTCTCCTGCACCAACATCGTGG GTG	TCTGCACCCACTATCCGGCTGAGGTCTCCAGA GACAG
<i>ADCY5-3</i>	CTACTTCTTCCGCCTGAACCAG	AGCAGCCTCACCATGCTCATGG
<i>PTPLB-1</i>	GTGCTGTACCCAATGGGAGTGTGTCAGGAGAACTGC TC	ACAATATATGCAGCTCTGCCCTTTGT- CAGACAAGCTGGCCTATATTC
<i>PTPLB-2</i>	CGGTTGGTCTGGTCCGAGCATA	CCTGGCTAAGGGTAGCTACCATAGCC
<i>MYLK</i>	GATGACCAGTCAATCAGGGAGTCCCGCCACTT	CCAGATAGACTACGATGAGGACGGGAACTGCT C

**Tabla 10.** Secuencia de los extremos universales de las todas las sondas y los oligonucleótidos complementarios a ellas para su amplificación por PCR

Secuencias universales extremos	
Sonda L	5' GGGTTCCTAAGGGTTGGA 3'
Sonda R	5' TCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC 3'

Oligonucleotidos universales MLPA	
MLPA-F	FAM-5' GGGTTCCTAAGGGTTGGA 3'
MLPA-R	5' GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA 3'

Los experimentos de MLPA se realizaron siguiendo protocolos estándar recomendados por el fabricante (MRC-Holland, <http://www.mrc-holland.com>). Los productos de ligación se amplificaron por PCR, utilizando oligonucleotidos marcados con el fluorocromo FAM suministrados por el fabricante. Los productos de PCR fueron analizados en ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems), los picos correspondientes a los distintos productos fueron identificados en función de sus diferentes tamaños, la longitud y áreas de los picos de los productos de PCR fueron calculadas con el programa GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems).



Todos los datos fueron analizados en una hoja de cálculo con Microsoft Excel. Los datos fueron normalizados dividiendo cada altura de pico de la muestra por la media de alturas de picos de la misma muestra. Este patrón de picos normalizado fue dividido por la media normalizada de cada pico de todas las muestras del experimento. Los valores resultantes son de aproximadamente 1 para cada pico salvaje, 0,5 para deleciones heterocigotas y 1,5 para duplicaciones heterocigotas.

### **3.3.2 Hibridación genómica comparativa en micromatrices (array-CGH)**

En 13 pacientes seleccionados por criterios clínicos, fundamentalmente aquéllos con un mayor número de anomalías menores y, por tanto, mayor sospecha de diagnóstico sindrómico, en los que no se detectaron alteraciones en el gen *NSD1* ni en las otras regiones génicas analizadas mediante los estudios de MLPA, se realizaron estudios complementarios de Array CGH utilizando:

1) Un microarray de 5600 BACs denominado HSBA (Hot-Spot-BAC-Array). Diseñado en el PRBB, tiene una cobertura del 23% de las regiones eucromatínicas, con una mayor densidad de sondas en puntos calientes de regiones candidatas a sufrir alteración, así como aquellas localizadas entre duplicaciones segmentarias y todas las zonas subteloméricas. Los BACs fueron seleccionados del array Sanger 1 Mb, amablemente cedido por JC Cigudosa y complementado con clones de la librería genómica de BACs del Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI), librería 32K disponible en el Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). La distribución de las sondas en el array no es homogénea, y la distancia entre clones consecutivos va de 0,5 Mb hasta un máximo de 1,2 Mb.

2) Un tiling path array del Cromosoma X de 1769 BACs de la librería genómica de BACs del CHORI, desarrollado por Irene Madrigal y Eva González de la Unidad de Microarrays del Centro de Regulación Genómica (CRG). Este array fue utilizado para estudiar los dos pacientes con duplicaciones en el cromosoma X con mayor resolución.

3) El array comercial Agilent G4410B de oligonucleóticos, que consta de un total 43.000 oligonucleótidos. Las sondas están localizadas en regiones codificantes y no codificantes con una resolución espacial de 1/35 kb en todo el genoma.

El aislamiento de los BACs en los dos primeros arrays fue llevado a cabo por Olaya Villa (Unidad de Genética de la Universidad Pompeu Fabra) y Eva González (Unidad de Microarrays del Centro de Regulación Genómica) con el kit BAC96 Montage de Millipore siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación de todos los clones fue realizada por DOP-PCR como describe Fiegler *et al.* [Genes Chromosomes Cancer., 2003]. Los BACs fueron espoteados por cuadruplicado en portas Corning UltraGaps utilizando DMSO al 50% como búfer de impresión (VersArray ChipWriter Pro System, Bio Rad).

Cuatrocientos nanogramos de ADN genómico de cada paciente fueron marcados por *random priming* con Cy3-dCTP y Cy5-dCTP. Las muestras fueron hibridadas en función del sexo contra un *pool* de 50 hombres o mujeres normales, en modo *dye swap*, según describe Wang *et al.* [Am J Hum Genet., 2004], usando sulfato dextrano y formamida como solución de hibridación. En el array comercial de Agilent, la hibridación fue realizada según el protocolo del fabricante contra el mismo pool de referencia que los anteriores arrays.

El análisis de los tres arrays se realizó del siguiente modo: después de escanear el chip (Agilent G2565BA), la imagen fue analizada con el software Genepix Pro v6.0 (Axon, Molecular Devices), utilizando la opción “irregular feature finding” para la localización de los spots. Los datos extraídos fueron filtrados y normalizados utilizando el programa Bacanal [Lozano *et al.*, no publicado], una implementación del paquete Limma desarrollado dentro del proyecto Bioconductor que se basa en el entorno de programación estadístico de libre distribución R. Por cada chip, se calculó su desviación estándar y se consideraron alterados aquellos clones que poseyeran valores de  $\log_2$  ratio normalizado superior a 2, 3, 4 veces la desviación estándar anterior. Estos

análisis estadísticos fueron realizados por Mireia Vilardell (Unidad de Genética de la Universidad Pompeu Fabra).

Los clones cuyos triplicados tenían una desviación estándar superior al 10% fueron excluidos del análisis.

### **3.3.3 Estudios de FISH en el cromosoma 3**

La duplicación la región q21.1 del cromosoma 3 fue analizada por FISH (Hibridación *in situ* fluorescente) sobre extensiones de núcleos interfásicos procedentes de linfocitos de sangre periférica cultivados según procedimientos estándar, tratados con una solución hipotónica y fijados con metanol/ácido acético (3:1). Se empleó una sonda marcada sintetizada a partir de un BAC. El clon fue obtenido de la librería genómica de BACs del Children's Hospital Oakland Research Institute ([www.chori.org/bacpac](http://www.chori.org/bacpac)) de la librería 32k disponible en el Parc de Recerca Biomèdica de Barcelona (PRBB). El BAC utilizado fue RP11-9N20 marcado con biotina-16-dUTP (Roche®). Se valoraron las preparaciones con un microscopio óptico con el objetivo de inmersión (100x), captándose las imágenes con el programa de análisis de imagen digital de Cytovision (Applied Imaging ®).

### **3.3.4 Estudios en el cromosoma X**

#### **3.3.4.1 Análisis del origen parental de las duplicaciones**

En el caso de la duplicación en Xp se estudiaron 9 microsatélites marcadores (DXS1060, DXS8051, DXS987, DXS1226, DXS992, DXS1214, DXS1068, DXS993, DXS991). Se analizaron 5 microsatélites marcadores en el caso de la duplicación Xq (DXS990, DXS8055, DXS1047, DXS8057, DXS1059). Las amplificaciones fueron realizadas utilizando un oligonucleótido marcado con fluorescencia en cada caso, siguiendo procedimientos estándar. El análisis de los fragmentos fue realizado en ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) con el programa GeneMapper v3.7 (Applied

Biosystems). El origen parental de la duplicación se determinó visualmente comparando la altura de los picos entre los alelos paternos y maternos.

#### **3.3.4.2 Estudios de inactivación del X**

En ambas pacientes con duplicaciones en el cromosoma X, se analizó el patrón de inactivación del cromosoma X, realizando una PCR fluorescente utilizando el protocolo estándar del experimento HUMARA descrito por Allen *et al.* [Am J Hum Genet., 1992], seguido de una digestión enzimática con la endonucleasa HpaII sensible a metilación. Los productos de PCR fueron analizados en ABI PRISM310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) con el programa GeneScan 3.7 (Applied Biosystems).

# RESULTADOS



## **4.1 Estudios región 5q35 y gen *NSD1***

### **4.1.1 Caracterización clínica**

Se ha tratado de recoger una detallada descripción clínica de los 51 pacientes incluidos en este estudio con diagnóstico clínico de sospecha de SS. En la caracterización se ha hecho hincapié en aquellos hallazgos clínicos más relevantes a la vista de los estudios publicados: apariencia facial (dividida en tres categorías: (+) SS típico, (P) posible SS, (-) escasos rasgos de SS, perímetro cefálico (>97), estatura (>97), escolarización (normal, con apoyo, especial) como valoración del déficit cognitivo, edad ósea adelantada, anomalías cardíacas, anomalías intracraneales en tomografía computerizada o resonancia magnética, hiperlaxitud y/o pies planos, hipotonía neonatal, ictericia neonatal, alimentación dificultosa en el lactante como expresión de la hipotonía e incoordinación promotora, escoliosis y presencia de convulsiones.

Los datos están recogidos en las tablas de las siguientes páginas (tablas 11 a 14). En todas ellas, los datos que faltan reflejan que no han sido recogidos por los clínicos de referencia o que no se ha realizado el estudio concreto.

**Tabla 11.** Hallazgos clínicos en los pacientes incluidos en el estudio. En los pacientes con código SS coloreado en rojo se ha encontrado algún tipo de alteración afectando a *NSD1*.

Hallazgos clínicos	SS1	SS2	SS3	SS4	SS6	SS8	SS9	SS10	SS11	SS12	SS13	SS14	SS15	SS16	SS17	SS18
Apariencia facial característica	P	P	+	P	+	P		-	P	-	+	-	P	-	+	P
Sobrecrecimiento prenatal perímetro cefálico (>90)	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+		-	+	+	-
Sobrecrecimiento prenatal Talla (>90)	-	-		-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Sobrecrecimiento postnatal perímetro cefálico (>97)	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Sobrecrecimiento postnatal Estatura (>97)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-		-
Retraso Desarrollo psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Escolarización	E	E	E	N		N		A	A	E	N	A	A	A		A
Edad ósea adelantada	+	-	+	+		-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+
Anomalías cardíacas	-	-			+	+	-	+		-			-	-	-	-
Anomalías intracraneales en TC o resonancia magnética		+			+	-				-	-			-		
Hiperlaxitud/pies planos	+	+			+	+	+	+	+		+		+	+		+
Hipotonía neonatal	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Ictericia neonatal	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Tomas dificultosas en el lactante	-			-	-		-	-	-	-				-	-	-
Escoliosis	+	+		-		+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-
Convulsiones	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-		+

P: posible *gestalt* SS; N: escolarización normal, A: escolarización con apoyo, E: educación especial



**Tabla 12.** Hallazgos clínicos en los pacientes incluidos en el estudio. En los pacientes con código SS coloreado en rojo se ha encontrado algún tipo de alteración afectando a *NSD1*.

Hallazgos clínicos	SS19	SS20	SS21	SS22	SS23	SS24	SS25	SS26	SS27	SS28	SS29	SS30	SS31	SS32	SS33	SS34
Apariencia facial característica	P	+		+	+	+	P	+					+			
Sobrecrecimiento prenatal perímetro cefálico (>90)		-			+	-	+	-			-		+	+		
Sobrecrecimiento prenatal Talla (>90)	-	-	-		+	+	+				-	-	+	-		
Sobrecrecimiento: perímetro cefálico (>97)	+	+	+	+	+	-	+	+			-	-	+	+		
Sobrecrecimiento: Estatura (>97)	-	+	+	-		-	+	+				+	+			
Retraso Desarrollo psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Escolarización	A	A				E	A	N	A		A	A	A			
Edad ósea adelantada		+		+	-	-		-	+		+	-				
Anomalías cardíacas		+	-		-	+	-	-			-	-	+	-		
Anomalías intracraneales en TC o resonancia magnética		+	+	+	+	+		+			-	+	+	+		
Hiperlaxitud/pies planos		+					+	-			-	-				
Hipotonía neonatal	-	+		+	-	+	+	+	+		-	-	-	+		
Ictericia neonatal		+	-		-	-	+	-			-	-	+			
Tomas dificultosas en el lactante	-	-	-	+	-	-	-	-			-	-				
Escoliosis	-	+		-	-	+	-	-			-	-		+		
Convulsiones		-	-		-	-	-	+	+			-		-		

P: posible *gestalt* SS; N: escolarización normal, A: escolarización con apoyo, E: educación especial

**Tabla 13.** Hallazgos clínicos en los pacientes incluidos en el estudio. En los pacientes con código SS coloreado en rojo se ha encontrado algún tipo de alteración afectando a *NSD1*.

Hallazgos clínicos	SS35	SS36	SS37	SS38	SS39	SS40	SS41	SS42	SS43	SS44	SS45	SS46	SS47	SS48	SS49	SS50
Apariencia facial característica	+	-	-	+			+	P	+		+					P
Sobrecrecimiento prenatal perímetro cefálico (>90)	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-				-		+
Sobrecrecimiento prenatal Talla (>90)	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+					-
Sobrecrecimiento: perímetro cefálico (>97)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			-	+	-
Sobrecrecimiento: Estatura (>97)	+	+		+	-	+	-	+	+	+	-			-	+	-
Retraso Desarrollo psicomotor	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Escolarización	A	A		A		A		A	A	A	A		A	A		
Edad ósea adelantada	+	+	+			-		+	+		+			+		
Anomalías cardíacas				-	-			-	-	+	-		-	-		-
Anomalías intracraneales en TC o resonancia magnética	+	-	+	+	-			-	+	+	+			-	+	
Hiperlaxitud/pies planos	+	+	+	+	+	-		+	+	+	+			-	-	-
Hipotonía neonatal	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+			-	-	+	-
Ictericia neonatal	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-		-	-	+	-
Tomas dificultosas en el lactante	-	-	-	+		-	+	-	+	+	-		-	+	-	-
Escoliosis	-	-	-		-	-	-	-	+	-	-			-		-
Convulsiones	+	-	-	-	-	-		+	+	+	-		-	-		-

P: posible *gestalt* SS; N: escolarización normal, A: escolarización con apoyo, E: educación especial

**Tabla 14.** Hallazgos clínicos en los pacientes incluidos en el estudio. En los pacientes con código SS coloreado en rojo se ha encontrado algún tipo de alteración afectando a *NSD1*.

Hallazgos clínicos	SS51	AUT12	NW14
Apariencia facial característica			P
Sobrecrecimiento prenatal perímetro cefálico (>90)	+		
Sobrecrecimiento prenatal Talla (>90)	+		+
Sobrecrecimiento: perímetro cefálico (>97)	+		+
Sobrecrecimiento: Estatura (>97)	-		+
Retraso Desarrollo psicomotor	+	+	+
Escolarización	N		E
Edad ósea adelantada			+
Anomalías cardíacas			-
Anomalías intracraneales en TC o resonancia magnética			-
Hiperlaxitud/pies planos	+		-
Hipotonía neonatal			-
Ictericia neonatal			-
Tomas dificultosas en el lactante			-
Escoliosis			+
Convulsiones			-

P: posible *gestalt* SS; N: escolarización normal, A: escolarización con apoyo, E: educación especial

En los pacientes con fotografías y datos clínicos suficientes se ha constatado en 15 de 33 la apariencia facial característica del SS. En el periodo neonatal, 19 de 36 presentaron perímetro cefálico ( $p>90$ ), 14 de 39 tuvieron talla ( $p>90$ ), 23 de 43 presentaron hipotonía, 12 de 41 mostraron ictericia transitoria, 7 de 31 padecían anomalías cardíacas y 6 de 35 tenían tomas dificultosas en el lactante. Más tarde, a la edad de la valoración clínica para este estudio, 35 de 44 tenían macrocefalia, 17 de 39 tenían talla alta ( $p>97$ ), 22 de 32 presentaban una edad ósea adelantada sobre su edad cronológica, 18 de 28 mostraron anomalías intracraneales en las pruebas de neuroimagen, 23 de 31 manifestaban hiperlaxitud y/o pies planos, 11 de 37 tenían curvaturas de la columna y 13 de 38 han sufrido en alguna ocasión convulsiones. La alteración cognitiva de los pacientes se refleja en que 5 siguen una escolarización normal, 23 con apoyo y 8 precisan educación especial. Los 51 pacientes de nuestra serie presentaban algún retraso en el desarrollo psicomotor.

Hemos realizado una clasificación de este grupo de pacientes por tres criterios clínicos diagnósticos mayores. 1. La apariencia facial distintiva (macrocefalia, frente prominente, implantación hacia atrás de la primera línea del cabello, inclinación antimongoloide las fisuras palpebrales, mentón prominente...). 2. El sobrecrecimiento pre y postnatal. 3. El retraso en el desarrollo psicomotor (dificultades de aprendizaje, retraso mental, coordinación motora pobre...). Basándonos en la presencia o ausencia de estos tres criterios clínicos mayores propios de este síndrome [Tatton-Brown *et al*, 2005], hemos identificado 3 categorías de pacientes:

- Diagnóstico clínico seguro de SS: aquellos pacientes que reúnen los tres hallazgos clínicos mayores, una apariencia cráneo-facial distintiva, sobrecrecimiento prenatal y/o postnatal y retraso en el desarrollo psicomotor.
- Posible diagnóstico clínico de SS: aquellos pacientes con apariencia facial característica, retraso del desarrollo psicomotor y sin sobrecrecimiento manifiesto; pacientes con una apariencia facial calificada como posiblemente característica de SS, o bien no

característica de SS según la evaluación del genetista, retraso en el desarrollo psicomotor y sobrecrecimiento prenatal y/o postnatal.

- No SS: todos aquellos pacientes no englobados en las categorías anteriores, que cumplen uno solo de los tres criterios clínicos diagnósticos mayores.

Según esta clasificación, de nuestra cohorte pacientes, 15 pacientes son “seguros”, 12 son “posibles” y 5 “no SS”. Los 19 pacientes restantes no han podido ser categorizados por no contar con los datos clínicos necesarios ni la iconografía apropiada para realizar esta clasificación.

Aunque varios de los pacientes de nuestro grupo no se ajustan a los criterios clínicos propios del SS, se decidió el análisis de todas las muestras para poder caracterizar la variabilidad del fenotipo asociado a alteraciones en *NSD1* en población española, ya sean mutaciones puntuales o reordenamientos genómicos afectando a este gen.

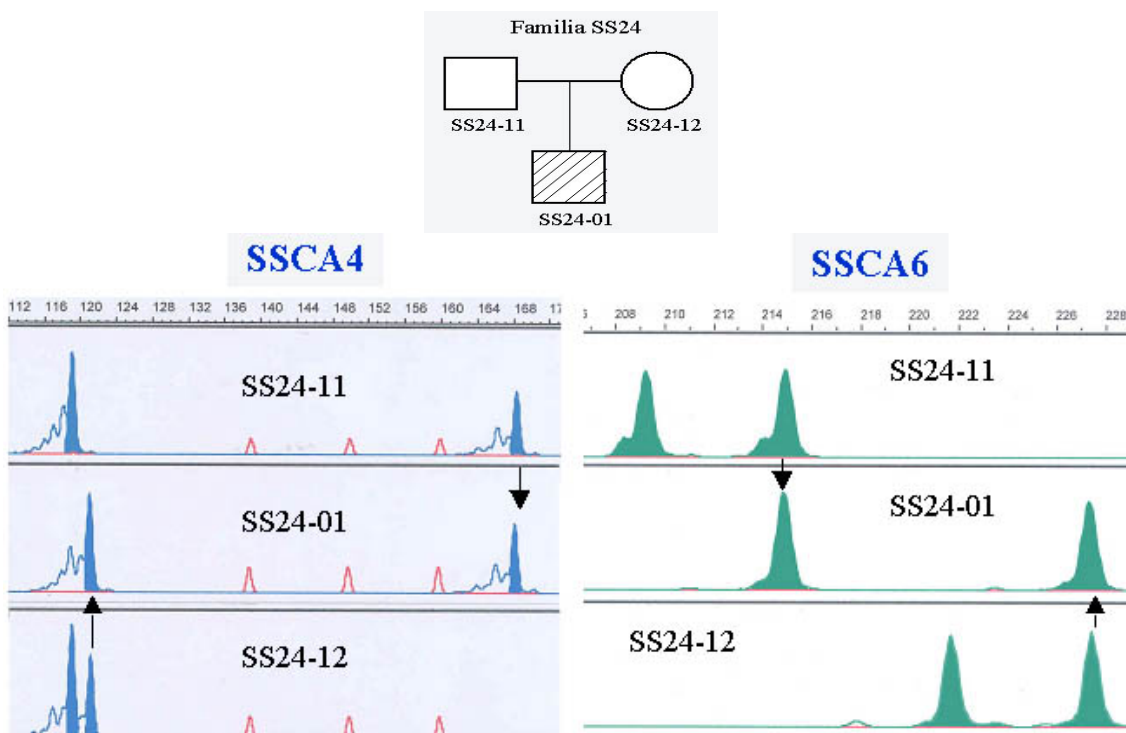
#### **4.1.2 Estudio mutacional**

##### **4.1.2.1 Análisis de microdeleciones en 5q35**

Al ser la deleción de 1,9 Mb la mutación más prevalente en la primera serie de pacientes con SS publicada en Japón, se decidió iniciar la búsqueda de estas deleciones como primer abordaje estratégico. Dada la disponibilidad de ADN de todos los pacientes y de la mayoría de los progenitores, se diseñó un experimento de análisis de múltiples STRs (Short Tandem Repeats) para detectar posibles pérdidas alélicas. Para ello se genotiparon 7 microsatélites potencialmente polimórficos de la región comúnmente delecionada y zonas adyacentes (Ver figura 21).

En todos los pacientes, así como en padres y hermanos, analizamos al menos los dos marcadores microsatélites internos al gen *NSD1* (SSCA6 y SSCA3) y los dos microsatélites (SSCA2 y SSCA4) adyacentes al gen y dentro

del intervalo comúnmente deleciónado [Ver tabla con genotipos en anexo]. En 45 de 51 pacientes se demostró heterocigosidad para al menos dos microsatélites (Ver figura 11).



**Figura 11:** Análisis de dos microsatélites marcadores en familia SS24, ambos marcadores son informativos y demuestran la heterocigosidad para ambos en el paciente

En la tabla 15 se señala el grado de heterocigosidad de los diferentes marcadores estudiados a partir de los resultados experimentales obtenidos en los pacientes y familiares estudiados.

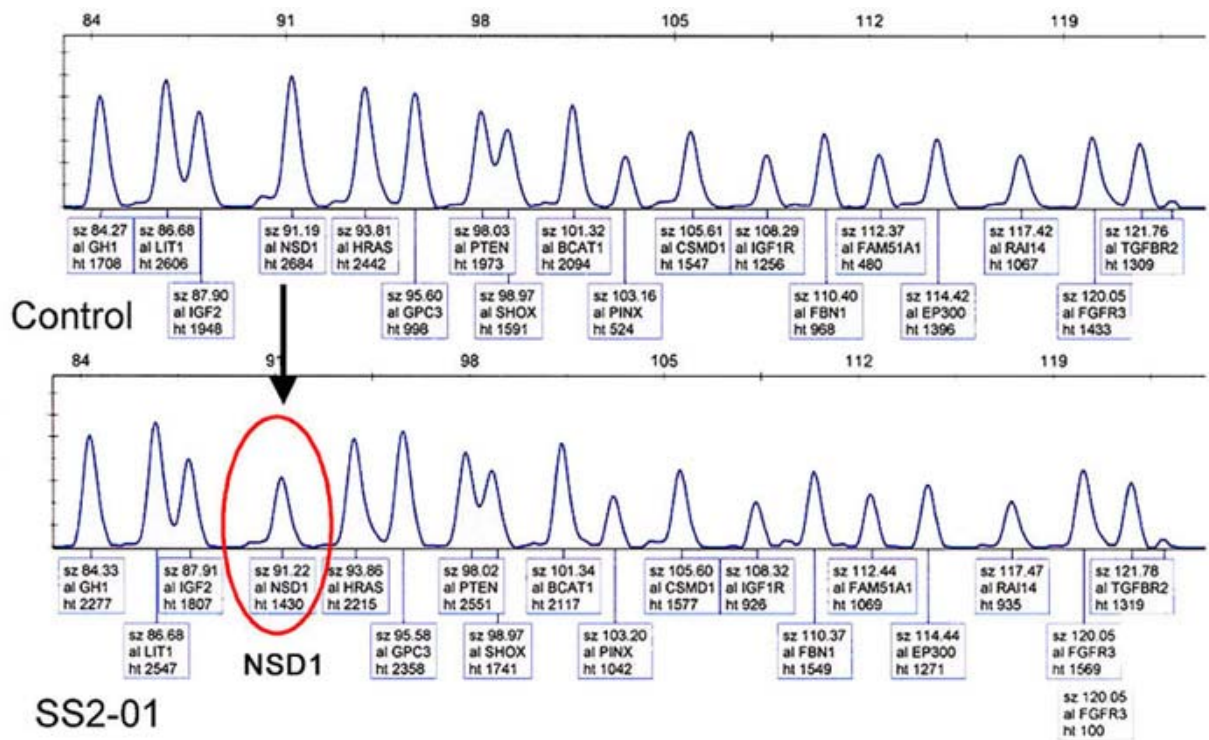
**Tabla 15.** Heterocigosidad de los marcadores microsatélites utilizados

	<b>Total</b>	<b>Familiares</b>	<b>Pacientes</b>
<b>SSCACen</b>	<b>68,8%</b> (11/16)	<b>55%</b> (6/11)	<b>100%</b> (5/5)
<b>SSCA2</b>	<b>66,4%</b> (87/131)	<b>64,2%</b> (52/81)	<b>70%</b> (35/50)
<b>SSCA3</b>	<b>24,6%</b> (31/126)	<b>24,7%</b> (19/77)	<b>24,5%</b> (12/49)
<b>SSCA4</b>	<b>80,2%</b> (105/135)	<b>78,7%</b> (67/85)	<b>83,3%</b> (38/50)
<b>SSCA5</b>	<b>57,1%</b> (8/14)	<b>50%</b> (5/10)	<b>75%</b> (3/4)
<b>SSCA6</b>	<b>82%</b> (105/128)	<b>83,3%</b> (65/78)	<b>80%</b> (40/50)
<b>SSCATel</b>	<b>68,8%</b> (11/16)	<b>58,3%</b> (7/12)	<b>100%</b> (4/4)

Así mismo, con objeto de confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis de marcadores microsatélites y rastrear otras posibles deleciones parciales (afectando solo a parte del gen *NSD1*), además de la clásica de este síndrome de 1,9 Mb, algunos pacientes fueron analizados por PCR cuantitativa a tiempo real y todos fueron estudiados por MLPA con los juegos de sondas para genes y regiones candidatas a sobrecrecimiento que diseñamos y validamos para estos estudios. Una de las 19 sondas de que consta cada juego tiene su diana de hibridación dentro del gen *NSD1*, y su uso nos ha permitido cuantificar las copias del gen *NSD1* a nivel de 2 secuencias exónicas bastante distantes entre si (una situada en el inicio del exón 5 y la otra en el exón 17).

Mediante estos estudios, en los pacientes SS2, SS32 y SS38 se constató la presencia de una microdelección afectando a todo el gen *NSD1*. Ninguno de los padres porta la deleción, lo que indica que las 3 microdeleciones se han producido *de novo*.

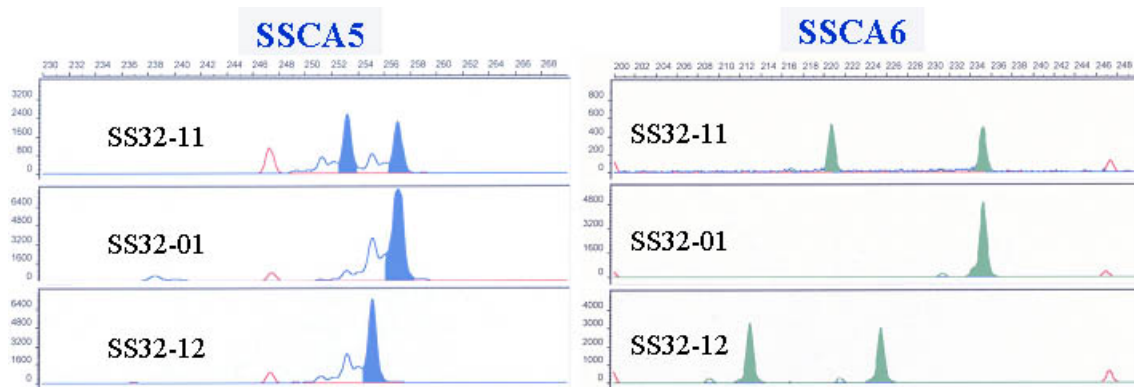
En el individuo SS2 ninguno de los microsatélites internos a la región comúnmente delecionada resultó informativo. La presencia de una microdelección de más de 1,3 Mb afectando a todo el gen *NSD1* se evidenció por estudios de microarray, que fueron posteriormente validados con ambos juegos de sondas en la mezcla MLPA de sobrecrecimiento.(Ver figura 12).



**Figura 12:** Análisis de MLPA correspondiente al juego 1 de “sondas de sobrecrecimiento”. En el paciente 2-01 se puede observar una reducción de dosis correspondiente al gen *NSD1*.

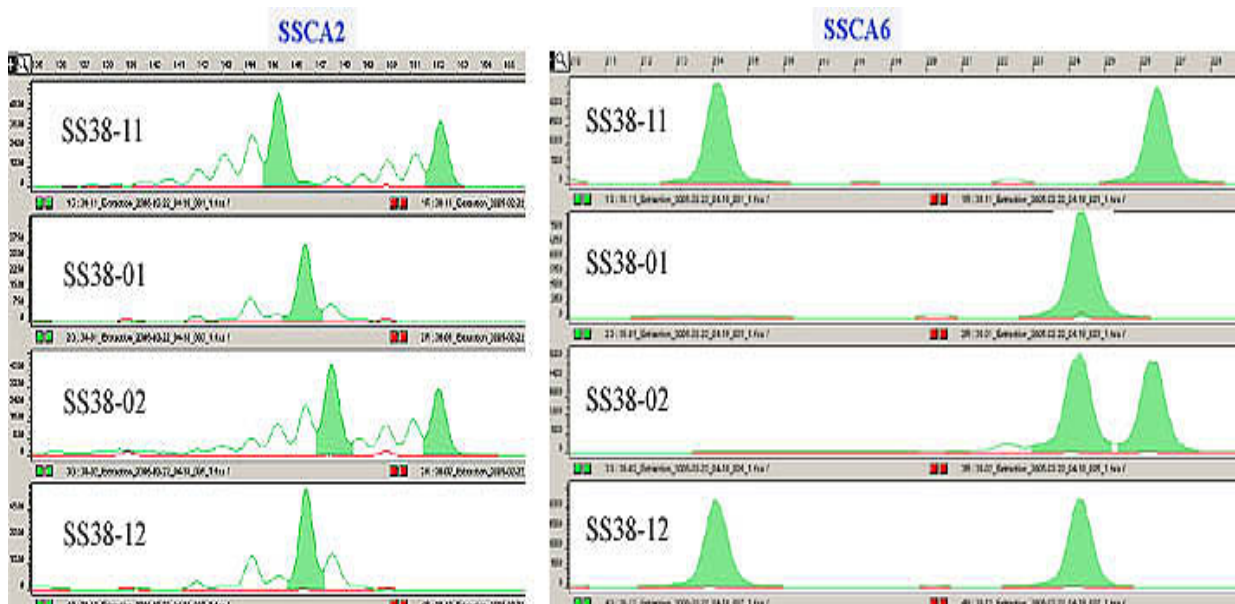
En el individuo SS32 (Ver figura 13) se produce una pérdida de herencia del alelo materno constatada para los marcadores SSCA5, SSCA2 y SSCA6 (fragmento de más de 500 Kb). Los marcadores microsatélites SSCA3 y SSCA4 no son informativos y existe heterocigosidad para los marcadores SSCAcen y SSCAtel fuera ya del intervalo comúnmente deletado. Esta deleción ha sido confirmada también mediante el estudio de MLPA con ambos juegos de sondas de sobrecrecimiento.





**Figura 13:** Análisis de dos microsatélites al intervalo comúnmente deletionado, uno de ellos intragénicos (SSCA6), en la familia SS32. En el paciente 32-01 se puede observar pérdida de herencia del alelo materno en la región 5q35 para ambos marcadores

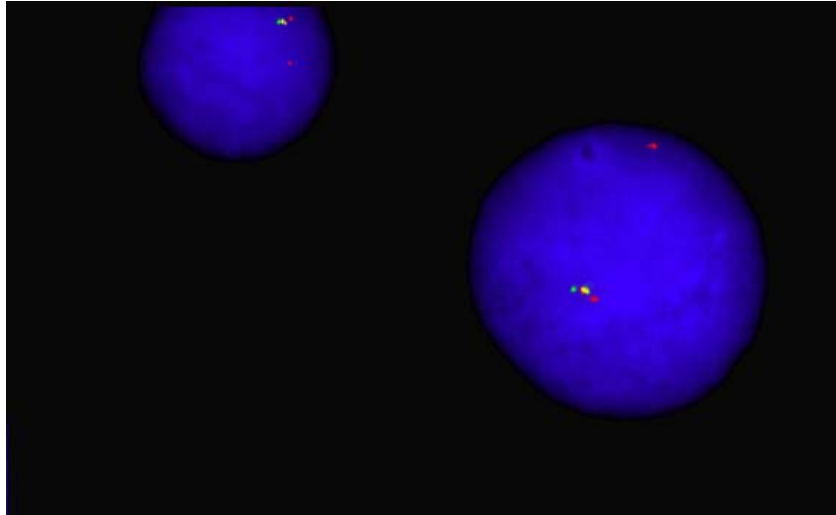
En el paciente SS38 (Ver figura 14) existe una pérdida de herencia del alelo paterno en la región 5q35 constatada para los marcadores SSCA2 y SSCA6, los marcadores microsatélites SSCA5, SSCA3, SSCA4 y SSCAtel no son informativos y existe heterocigosidad para el marcador SSCAcen. Esta deleción ha sido confirmada también a través del MLPA con ambos juegos de sondas de sobrecrecimiento.



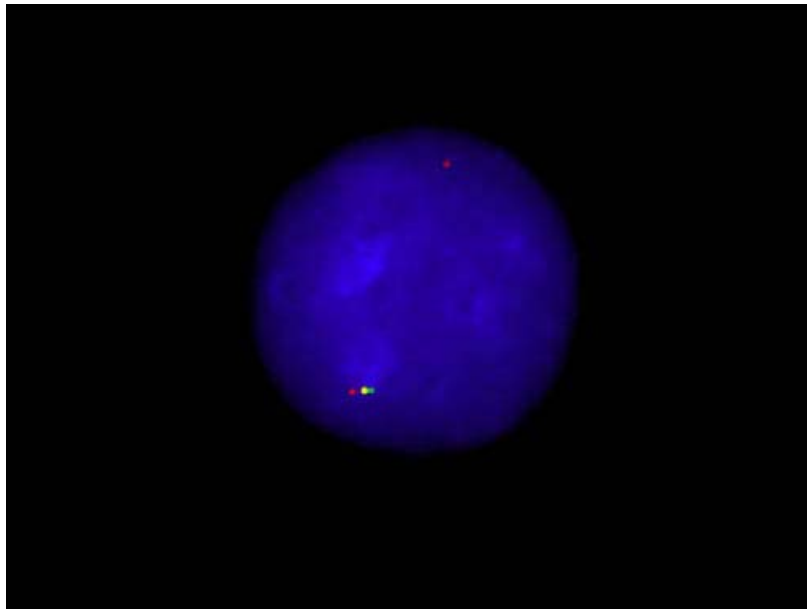
**Figura 14:** Análisis de dos microsatélites en el intervalo comúnmente deletionado, uno de ellos intragénicos (SSCA6), en la familia SS38. En el paciente 38-01 se puede observar pérdida de herencia del alelo paterno en la región 5q35 para ambos marcadores

Los estudios de FISH con tres colores realizados en los pacientes SS32 y SS38 confirman la existencia de una microdelección, como se constata por la ausencia de dos de las tres señales en uno de los cromosomas 5, que se corresponden con las sondas situadas entre los bloques de DS que flanquean al gen (Ver figura 15).

**a**



**b**

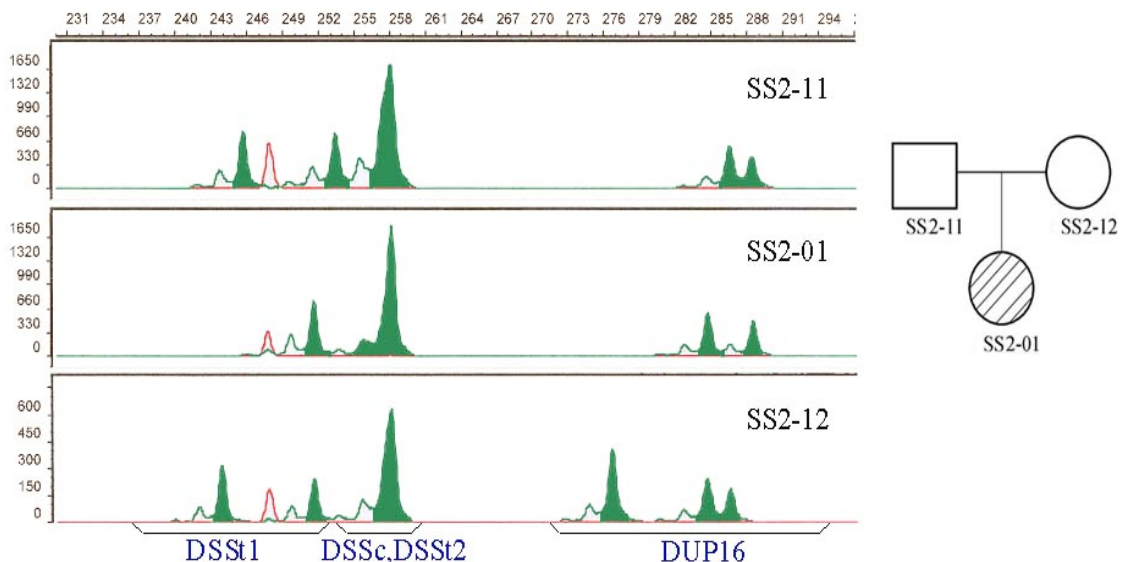


**Figura 15:** Preparación de núcleos interfásicos de los pacientes SS32-01 (Figura **a**) y SS38-01 (figura **b**). Hibridación con 3 sondas: de centromero a telomero (roja, amarilla, verde), que se corresponden con RP11-466H21, RP13-504N15y RP11-563H03. Se observan tres señales en uno de los cromosomas. En el otro, sólo se observa la señal correspondiente a la sonda más centromérica, lo que confirma una delección en heterocigosis.

Tras identificar la presencia de grandes deleciones que afectan al gen *NSD1* mediante los anteriores experimentos, hemos tratado de caracterizar el tamaño de estas microdeleciones. Para ello, además de los marcadores y sondas ubicadas en las regiones de copia única flanqueantes al intervalo de 1,9 Mb, se analizaron otros 2 microsatélites (SSD2 y SSD4) y una variante paróloga de secuencia (PSV) (SSD3) localizados dentro de las duplicaciones segmentarias que flanquean el gen con objeto de determinar si estas estaban o no delecionadas (Ver figura 21).

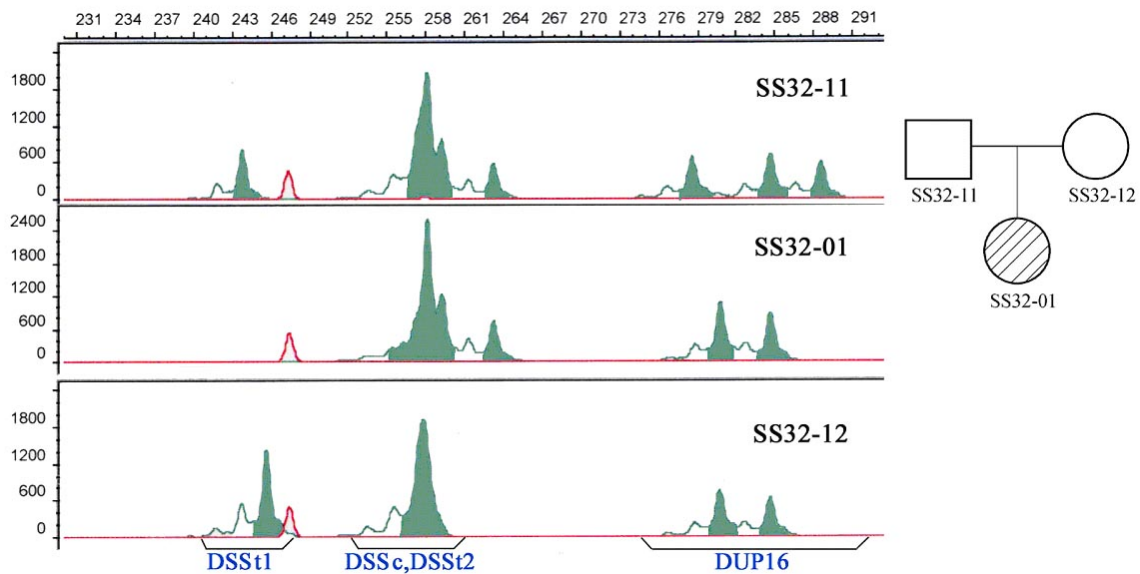
El estudio del microsatélite marcador de las DS (SSD2) reveló los siguientes resultados:

El paciente SS2-01 presenta sólo un alelo DSSt1 heredado de la madre, no habiendo heredado ninguno de los dos alelos del padre (Ver figura 16), lo que parece indicar que este paciente presenta una deleción de origen paterno. A diferencia de los otros dos pacientes con microdeleción de nuestra serie, no ha podido ser identificado el origen de la deleción por el estudio de los STRs de copia única, por no ser ninguno de ellos informativo para esta familia.



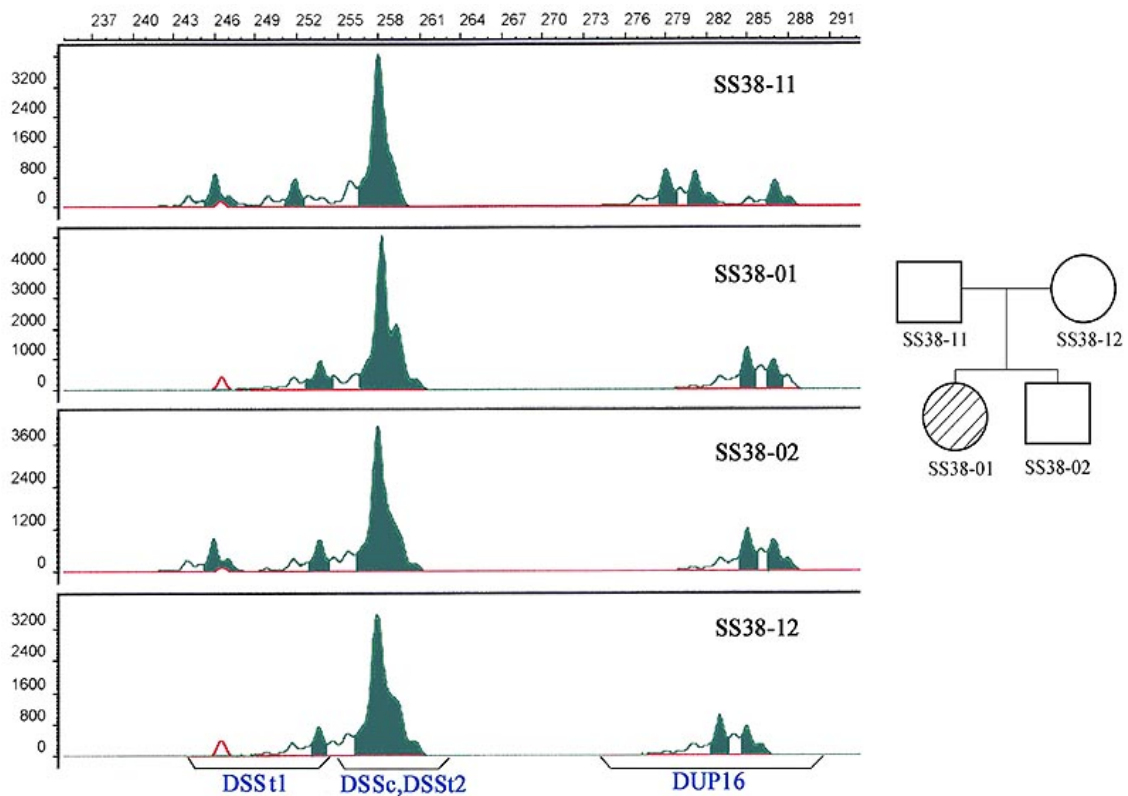
**Figura 16:** Genotipado del microsatélite SSD2 en la familia SS2. Los alelos DSSt1 corresponden al primer bloque telomérico, los alelos DSSc corresponden a la duplicación segmentaria centromérica, DSSt2 corresponde al segundo bloque telomérico y los alelos DUP16 corresponden a los dos bloques adicionales del cromosoma 16.

El paciente SS32-01 parece no portar ningún alelo correspondiente al primer bloque telomérico, DSSt1 (Ver figura 17).



**Figura 17:** Genotipado del microsatélite SSD2 en la familia SS32. Los alelos DSSt1 corresponden al primer bloque telomérico y los alelos DSSc corresponden a la duplicación segmentaria centromérica. DSSt2 corresponde al segundo bloque telomérico y los alelos DUP16 corresponden a los dos bloques adicionales del cromosoma 16.

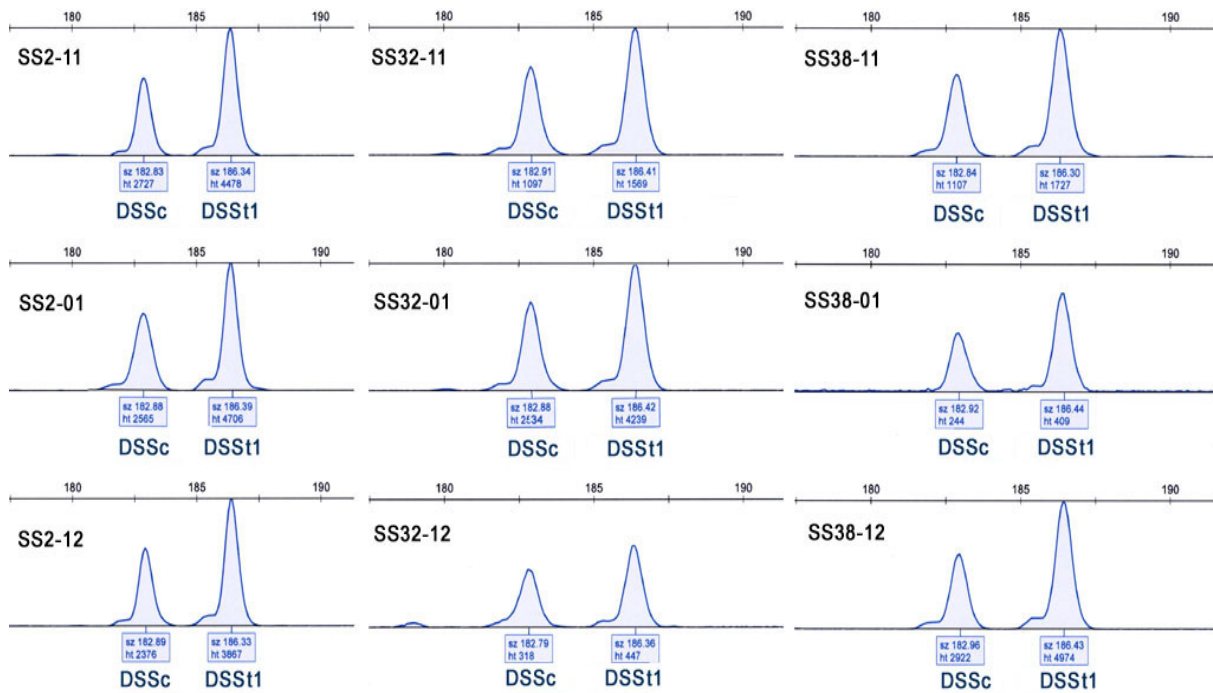
El paciente SS38, con una microdelección de origen paterno, presenta sólo un alelo DSSt1 heredado de la madre, no habiendo heredado ninguno de los dos alelos del padre (Ver figura 18).



**Figura 18:** Genotipado del microsatélite SSD2 en la familia SS38. Los alelos DSSt1 corresponden al primer bloque telomérico, los alelos DSSc corresponden a la duplicación segmentaria centromérica, DSSt2 corresponde al segundo bloque telomérico y los alelos DUP16 corresponden a los dos bloques adicionales del cromosoma 16.

Estos resultados indican que, en los tres pacientes afectados por una microdelección, existe una pérdida de herencia del alelo del primer bloque telomérico en el cromosoma portador de la delección.

El estudio de la PSV SSD3 que permite diferenciar entre DSSc y DSSt1, reveló ratios entre la altura de los picos de los dos bloques similares, tanto entre los padres y controles, como en los pacientes con microdelección (Ver figura 19). Esto parece indicar que este marcador, bien no está delecionado en estos casos, o lo está en ambos bloques de DS en el cromosoma delecionado.

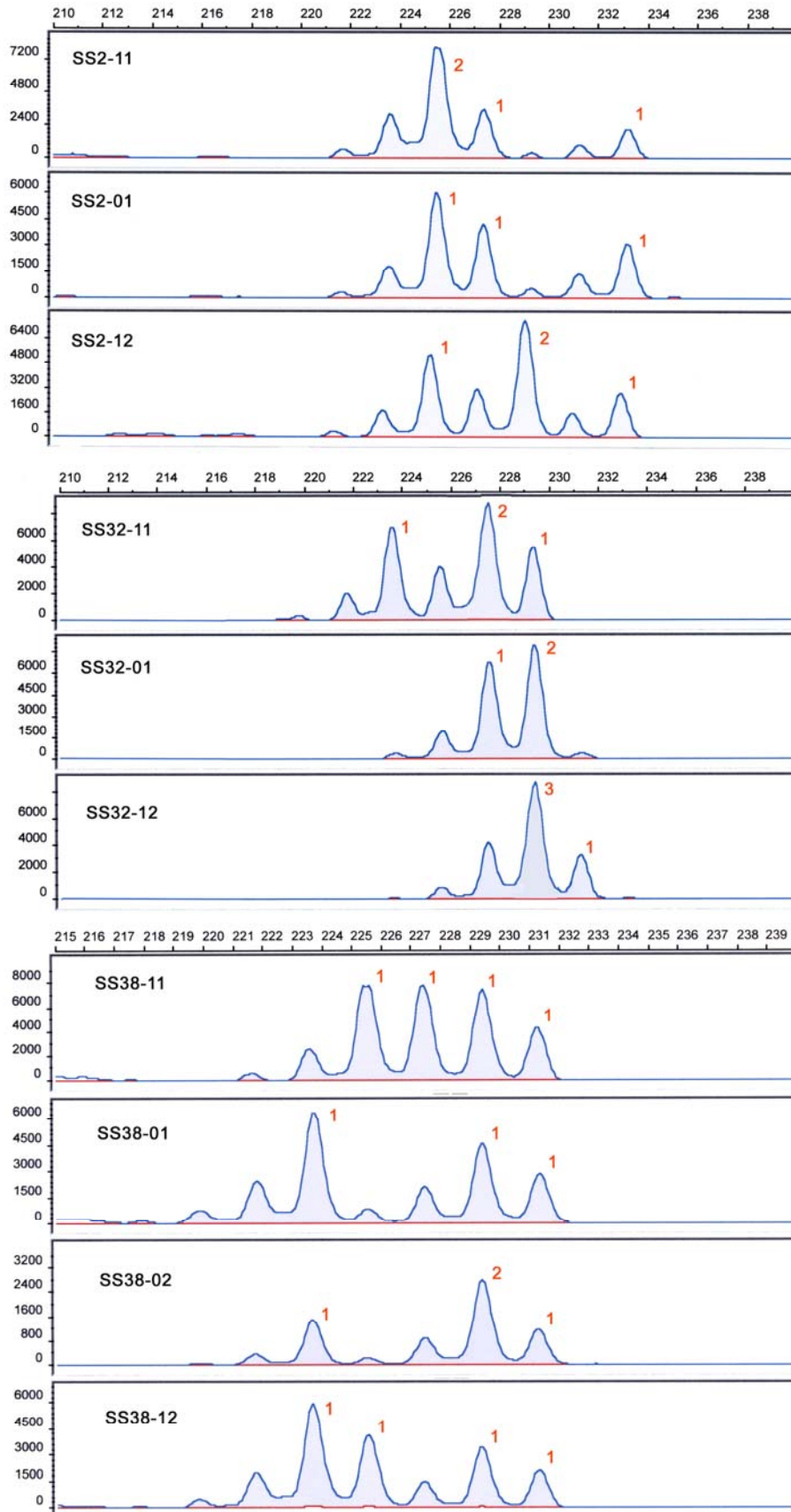


**Figura 19:** Analisis de la PSV SSD3 en las familias SS2, SS32 y SS38. El pico DSSc corresponde a la duplicación segmentaria centromérica y el pico DSS1 corresponde al primer bloque telomérico.

El estudio del segundo microsatélite marcador de las DS (SSD4) reveló los siguientes resultados:

Los pacientes portadores de una microdelección SS2-01, SS32-01 y SS38-01, presentan solamente 3 alelos de los 4 esperados (2 correspondientes al bloque centromérico DSSc y los otros 2 correspondientes al primer bloque telomérico DSS1). Existiendo por tanto una pérdida de herencia de uno de los alelos (Ver figura 20).





**Figura 20:** Genotipado del microsatélite SSD4 presente en los bloques DSSc y DSSt1 en las familias SS2, SS32 y SS38. Los números indican en cada caso el probable número de alelos. Los 3 pacientes con microdelección presentan sólo 3 alelos.

También estudiamos por un tercer método (PCR cuantitativa a tiempo real) las posibles alteraciones en la dosis génica de *NSD1*, en algunos pacientes de nuestra serie, con el objetivo de validar la técnica para la detección o confirmación de estas microdeleciones. Los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real en los pacientes analizados son en todo caso coherentes con los obtenidos mediante el análisis de microsatélites marcadores. Tres de los 15 pacientes sometidos a este estudio, SS2, SS32 y SS38, en los que previamente habíamos detectado una microdelección en 5q35, muestran una cantidad significativamente menor del amplicón del exón 5 comparada con el resto de muestras y 2 controles. Por esta técnica, tampoco hemos detectado deleciones que afecten a esta región de *NSD1* en ninguno de los 15 pacientes analizados.

Posteriormente, con el desarrollo de los juegos sondas de sobrecrecimiento para estudios de MLPA, analizamos todos los pacientes incluyendo también aquellos que no habían sido estudiados por PCR cuantitativa a tiempo real, lo que nos permitió analizar alteraciones en el número de copias del exón 5 y 17. Los datos obtenidos por las sondas de *NSD1*, correspondientes a los dos juegos de MLPA, confirman nuevamente los resultados obtenidos, con excepción del paciente SS46-01 (muestra no analizada por PCR cuantitativa), que mostró en varios experimentos independientes una disminución de dosis para la sonda *NSD1* del juego 2, cuyo sitio de hibridación y ligación se ubica en el inicio del exón 5 del gen. Por el contrario, el ratio de la sonda para *NSD1* del primer juego ubicada en el exón 17 no mostró una disminución de dosis. Esto sugirió que podría haber una deleción parcial intragénica que debía ser confirmada por otra técnica.

#### **4.1.2.1 MLPA de reordenamientos intragénicos**

A fin de localizar posibles deleciones parciales afectando a *NSD1*, en exones no estudiados en los experimentos anteriores y que por lo tanto habrían pasado inadvertidas, se realizaron experimentos con el kit comercial SALSA



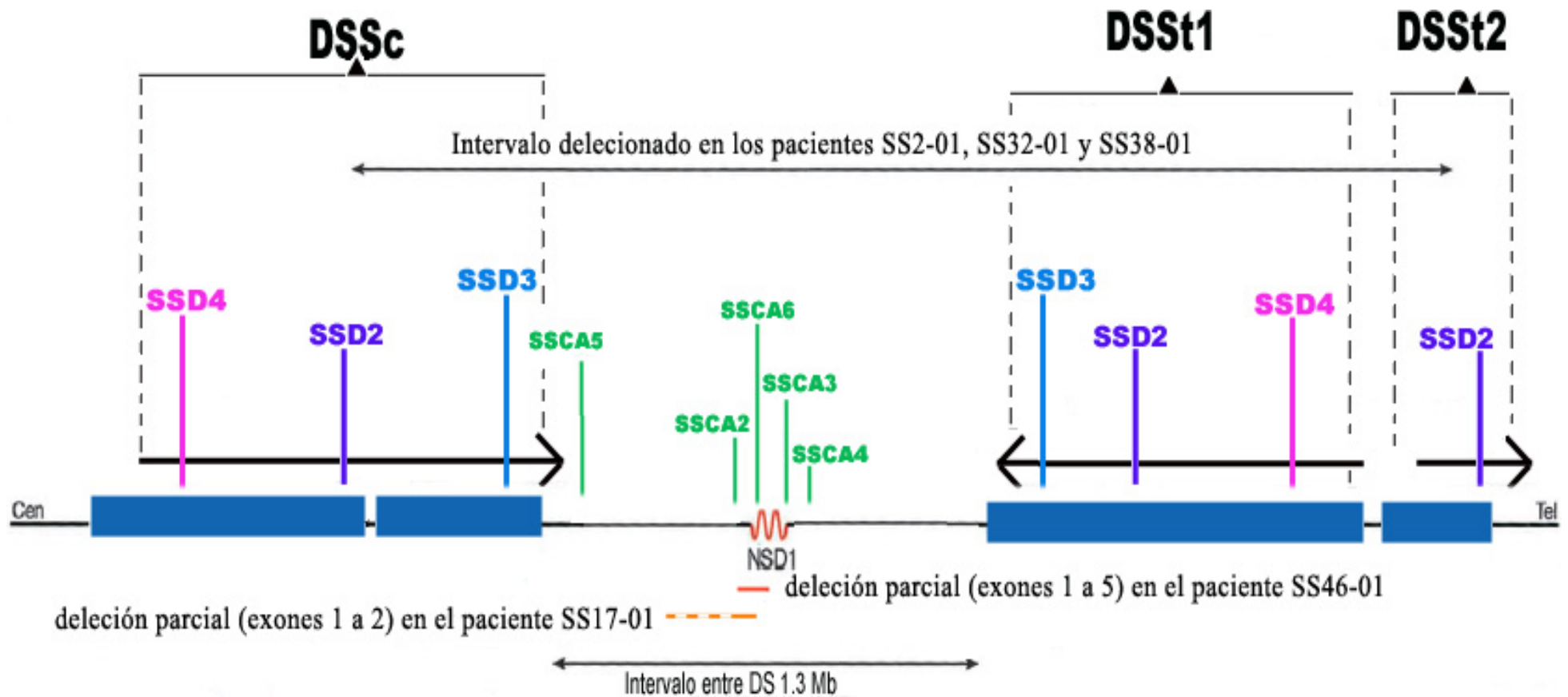
MLPA kit P026B ®, que nos permitiría detectar cualquier reordenamiento intragénico en *NSD1* ya que incluye sondas para todos los exones del gen.

Seleccionamos para este estudio 13 pacientes en los que no habíamos encontrado previamente mutación alguna (sin mutación puntual ni la deleción más frecuente en este síndrome) y con criterios clínicos indicativos de SS, a excepción del paciente SS46-01 y SS17-01.

En el paciente SS46-01, en el cual previamente habíamos detectado una deleción parcial afectando al exón 5, sin pérdida de copia para el exón 17, según nuestros experimentos con los 2 juegos de sondas de sobrecrecimiento, se corroboró la presencia de una deleción parcial. Esta deleción afecta a los exones 1, 2, 3, 4 y 5, pero no se pudo delimitar el tamaño de la misma hacia el extremo 5' del gen. El microsatélite SSCA2, localizado en las proximidades del extremo 5' del gen, resultó informativo y no estaba delecionado, por lo que, en este caso, la deleción no abarcaría más allá del promotor del gen.

En el paciente SS17, en el cual en experimentos previos de Array-CGH se mostró una pérdida de número de copia para un clon de la región 5q35, se constató una deleción de los exones 1 y 2, que por su localización había pasado inadvertida con los otros estudios realizados hasta el momento. En este caso, el microsatélite SSCA2 ubicado en la zona cercana al extremo 5' del gen no es informativo, por lo que no ha podido delimitarse con mayor precisión el tamaño de la misma, ni el origen parental.

En los 11 pacientes restantes no se detectó pérdida ni ganancia alguna de número de copias en ninguno de los 23 exones que conforman el gen *NSD1*.

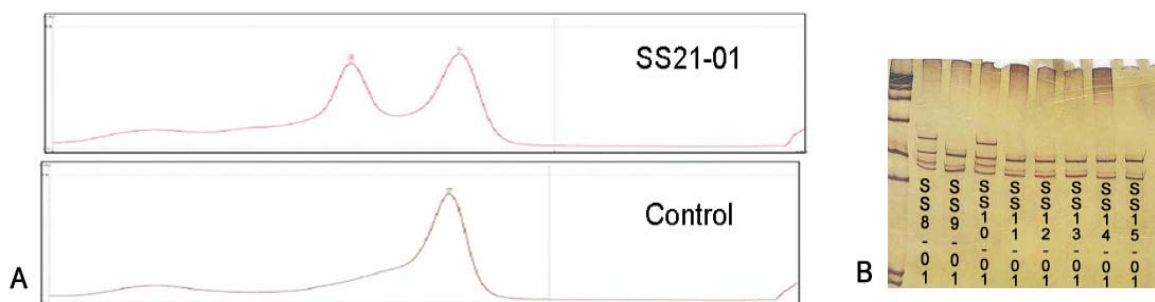


**Figura 21:** Representación esquemática de las DS que flanquean *NSD1*: DSSc, DSSt1 y DSST2. Las flechas horizontales muestran la orientación genómica de los bloques. Se indica en verde la posición relativa de los microsatélites internos al intervalo comúnmente delecionado, en morado el marcador interno a las duplicaciones segmentarias SSD2, en azul SSD3 y en rosa SSD4. Se muestra mediante línea horizontal el tamaño probable de las deleciones completas de *NSD1* en los pacientes SS2-01, SS32-01 y SS38-01, y de las deleciones parciales en los paciente SS46-01 (en rojo) y SS17-01 (en naranja, representándose en discontinuo la región no informativa para la deleción).

### 4.1.2.3 Mutaciones puntuales en *NSD1*

Como segunda aproximación dentro de nuestra estrategia para localizar alteraciones en el gen *NSD1*, procedimos a los estudios para la búsqueda de mutaciones puntuales.

Para realizar el rastreo mutacional, se emplearon las técnicas de dHPLC y/o SSCP (Ver figura 22). Se analizaron 22 de los 23 exones de que consta *NSD1* (el primer exón se omitió del estudio ya que no se traduce) y las zonas de unión exón-intrón, divididos en un total de 40 fragmentos para su amplificación por PCR en todos los pacientes que han participado en este estudio.

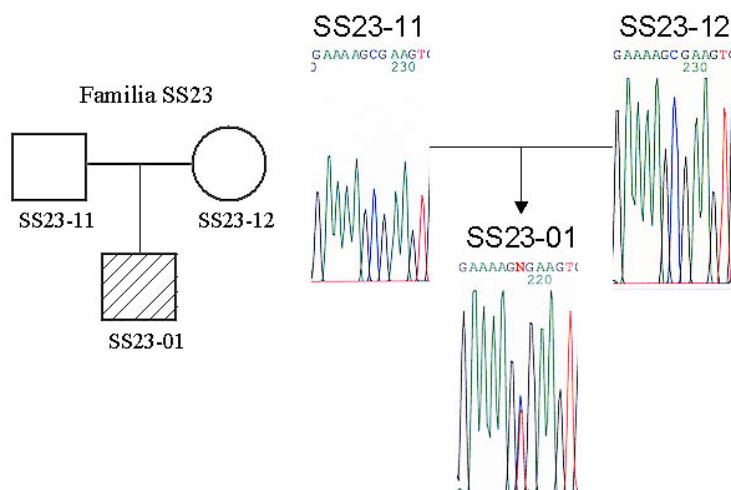


**Figura 22:** **A** Cromatogramas de dHPLC correspondientes productos de PCR del exón 5, de un paciente (SS21-01) y un control. El paciente porta una mutación en este fragmento c.1939-1940 ins 2nt (GT). **B** SSCP en gel de acrilamida al 10% de productos de PCR de un fragmento del exón 5 en ocho pacientes. Se detectaron bandas con una migración diferente en los pacientes SS8 y SS10, lo que evidencia un cambio en la secuencia consistente en un polimorfismo c.1482C>T (cambio sinónimo).

Todos los productos de PCR en los que hemos detectado una migración anormal fueron secuenciados, identificándose así cambios en la secuencia interpretables como polimorfismos o como probables mutaciones patogénicas.

Se han detectado de esta manera un total de 11 mutaciones puntuales claras, todas *de novo* (Ver figura 23). En 10 de los 11 casos se produce un codón de stop prematuro que probablemente da lugar a una proteína truncada. En un único caso se encontró una mutación de cambio de sentido, alteración no encontrada en más de 200 controles estudiados. En todos los casos, se confirmó que la mutación era *de novo*, bien secuenciando el ADN de ambos

progenitores, bien realizando digestiones enzimáticas en los casos en que la mutación afectaba a alguna diana de restricción.



**Figura 23:** Secuencias de un fragmento del exón 5 en la familia SS23, que refleja en el paciente (SS23-01) una mutación sin sentido (c.1894C>T, R632X) aparecida *de novo*.

En la tabla inferior (tabla 16) se recogen las mutaciones encontradas en nuestro estudio, así como en el exón en que se localizan, el cambio aminoacídico producido, la herencia estudiada y la probable consecuencia a nivel de proteína.

**Tabla 16.** Mutaciones detectadas en nuestro estudio.

Paciente	Exón	Mutación	Cambio aa'	Proteína	Herencia
SS23-01	5	c. 1894 C>T	R632X	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS49-01	5	c. 1894 C>T	R632X	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS21-01	5	c. 1939-1940 ins 2nt (GT)	D648fxX654	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS33-01	5	c. 2023-2024 del 2nt (AT)	M675fsX681	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS24-01	5	c. 2576-2577 del 2nt (AT)	H859fsX873	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS41-01	5	c. 2613-2614 ins C	L872fsX874	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS20-01	5	c.2995 C>G & c.2996-2997ins AA	L999fsX1040	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS6-01	7	c.3957-3966 del 10nt	A1319fsX1331	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS43-01	11	c. 4598-4599 del G	G1533fxX1573	Proteína truncada	<i>de novo</i>
SS35-01	14	c. 5117 A>T	N1637I	Cambio aminoácido	<i>de novo</i>
SS31-01	22	c. 6349 C>T	R2117X	Proteína truncada	<i>de novo</i>

De estas 11 mutaciones, 2 han sido descritas anteriormente: la mutación c.1894 C>T en el exón 5 ha sido descrita por Cecconi *et al.* (2005) y la mutación c.2576-2577 del 2nt (AT) también ha sido descrita en otro paciente por Douglas *et al.* (2003).

Se han encontrado varios polimorfismos c.1482C>T (sinónimo), c.1749G>A (sinónimo), c.1840G>T (p.V614L), c.2176T>C (p.S726P), c.3705T>C (sinónimo), c.6829C>T (sinónimo) y c.6903G>C (sinónimo), todos ellos descritos anteriormente y ya descritos en la base de datos de polimorfismos SNPdb.

Se han identificado además 6 nuevos probables polimorfismos c.1980 C>T (sinónimo), c.2586 C>T, (sinónimo), c.2667 T>C, (sinónimo), c.6813 G>T, (sinónimo) c.7850 T>G (L2617W) y c.209 T>G (I70S). En todos los casos, la variante genética ha sido heredada de un progenitor asintomático. Las variantes c.2586 C>T, c.2667 T>C, c.6813 G>T, c.7850 T>G y c.209 T>G no han sido encontradas en la población normal estudiada.

#### **4.1.2.4 RT-PCR, estudios de expresión**

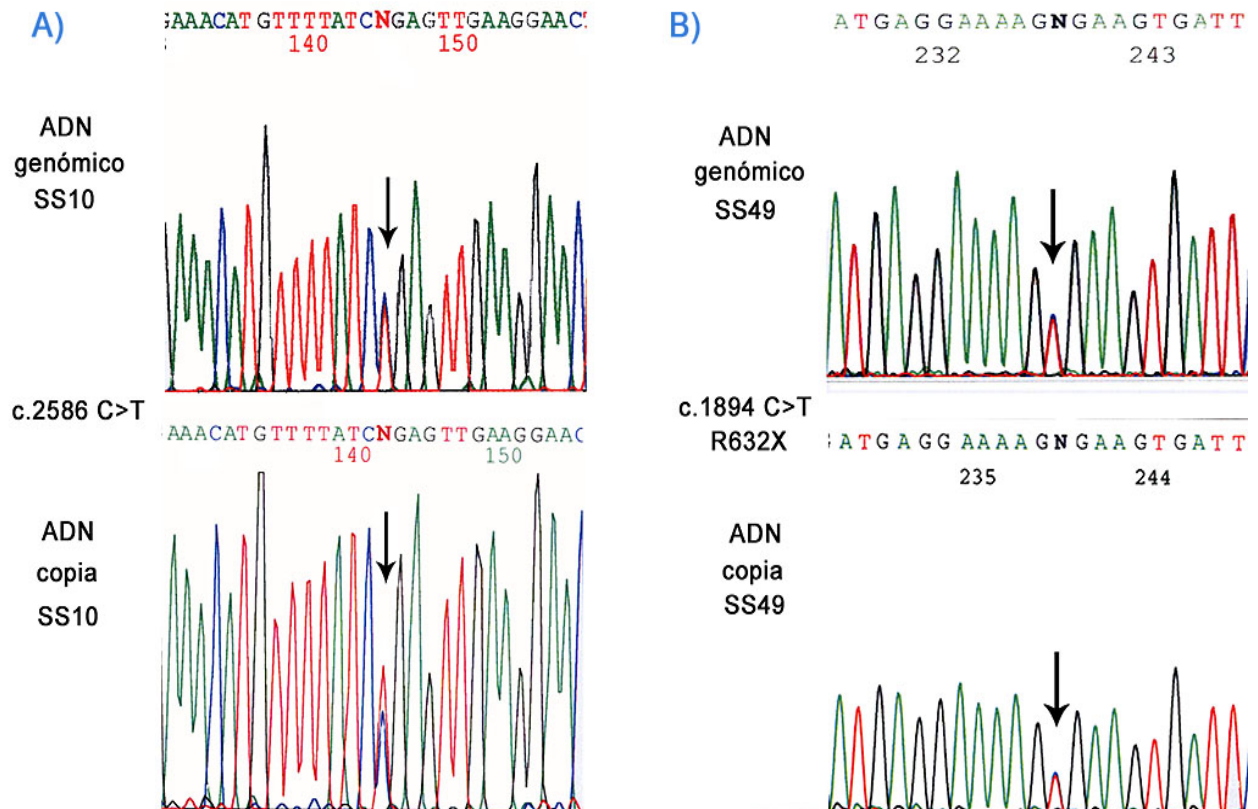
En aquellos pacientes en los que se extrajo ARN linfocitario, se obtuvo ADNc por RT-PCR y se procedió a su secuenciación. A través de la secuenciación de la mayor parte del ADNc, se pudo rastrear la presencia de mutaciones no detectadas mediante los experimentos previos de SSCP y/o dHPLC. Del mismo modo pudimos estudiar los niveles de transcripción de varios polimorfismos y algunas de las mutaciones detectadas.

Los resultados obtenidos por RT-PCR y posterior secuenciación directa de la casi totalidad de la parte codificante del ADNc ratifican los resultados anteriores en los 12 pacientes estudiados. Tres de los pacientes estudiados presentaban una mutación, se cuantificó la expresión relativa de los dos alelos del gen mediante el análisis varios polimorfismos en heterocigosis. En 9 de 12 casos en la expresión de ambos alelos a nivel de ARNm pareció idéntica.

En los pacientes SS33-01 con una mutación c. 2023-2024 del 2nt (M675fsX681) y SS49-01 con una mutación c. 1894 C>T (R632X), se observó la presencia del alelo mutado en cantidad normal en ARNm, lo que parece indicar que estas dos mutaciones no afectan a la expresión (Ver figura 24B).

El paciente SS17-01 con una delección parcial afectando a los exones 1 y 2, presentó expresión monoalélica en 2 polimorfismos estudiados, presentes en ADN genómico. Por otro lado los pacientes SS34 y SS45, en los que no se ha identificado ninguna mutación (ni ningún reordenamiento intragénico de *NSD1* en el estudio de MLPA de *NSD1*), presentaron expresión monoalélica para el único polimorfismo detectado en ADN genómico, dato que parece indicar la presencia de una mutación no detectada en *NSD1* o en una región reguladora más o menos distante que causaría, una reducción en la expresión del alelo mutado.

Estos estudios también han permitido demostrar que la expresión normal de *NSD1* es bialélica con poca variabilidad, observándose un nivel de expresión alélica idéntica para los pacientes estudiados con los siguientes polimorfismos: c.1482C>T, c.1840G>T, c.2176T>C, c.2586 C>T y c.6903G>C (Ver figura 24A).



**Figura 24: A)** secuencias del polimorfismo c.2586 C>T (sinónimo) en el paciente SS10 sobre ADN genómico y ADN copia que demuestran un nivel similar de expresión de ambas variantes. **B)** secuencias de la mutación c.1894 C>T (R632X) en el paciente SS49 sobre ADN genómico y ADN copia, lo que indica que esta mutación no afecta a la expresión.

#### 4.1.3 Correlaciones clínico-moleculares

De acuerdo a los datos clínicos disponibles, 15 de 32 individuos con datos suficientemente completos cumplen estrictamente los tres criterios mayores [Tatton-Brown *et al.*, 2005] para el diagnóstico clínico del SS: apariencia facial típica del SS, sobrecrecimiento (altura y/o perímetro cefálico) y retraso mental de grado variable no progresivo. De ellos, 9 presentan anomalías detectadas en *NSD1*. Ocho de 32 presentan también sobrecrecimiento y retraso mental, pero “gestalt” categorizado como “posible SS”, y sólo uno presenta mutación de *NSD1*.

Con los datos clínicos completos en el 70% de los pacientes en los que se detectó una mutación o delección, se confirma que los rasgos fenotípicos que constantes asociados a mutaciones o delecciones en *NSD1* son: la apariencia

facial característica, el retraso en el desarrollo psicomotor y las anomalías intracraneales. Estas últimas están presentes en todos los pacientes con mutación, menos 1, aquel cuya apariencia facial fue de “posible SS”. El sobrecrecimiento prenatal (perímetro cefálico y/o talla prenatal superior al percentil 90) estuvo presente en 12 pacientes con anomalías en este gen, el sobrecrecimiento postnatal en 12 de 14 y la hipotonía neonatal presente en 11 de 13. En ninguno de los pacientes categorizados por su apariencia facial como “escasos rasgos de SS”, se ha encontrado mutación alguna en el presente estudio.

La ictericia neonatal, la escoliosis, la edad ósea adelantada, la hiperlaxitud y/o los pies planos, son hallazgos clínicos presentes en más de un 50% de nuestra serie de pacientes *NSD1* positivos. Hasta la fecha, en nuestra serie de pacientes no hay constancia del desarrollo de tumores malignos.

Se han realizado tests de Chi-cuadrado (mediante aproximación bootstrap con 10.000 réplicas) para determinar la posible relación entre los principales rasgos clínicos seleccionados por su relevancia, y la presencia/ausencia de mutación. Hemos comparado quince rasgos clínicos: apariencia facial, perímetro cefálico prenatal (>90%), talla prenatal (>90%) perímetro cefálico (>97%), estatura (>97%), escolarización (normal, con apoyo, especial), edad ósea adelantada, anomalías cardíacas, anomalías intracraneales en tomografía computerizada o resonancia magnética, hiperlaxitud y/o pies planos, hipotonía neonatal, ictericia neonatal, toma dificultosa en el lactante, escoliosis y convulsiones. Se ha determinado la existencia de diferencias significativas en siete de estas variables: apariencia facial, estatura prenatal (superior al percentil 90), estatura (superior al percentil 97), anomalías intracraneales, hipotonía neonatal, ictericia y escoliosis. Todas estas variables clínicas se asocian con significación estadística a la presencia de mutación.



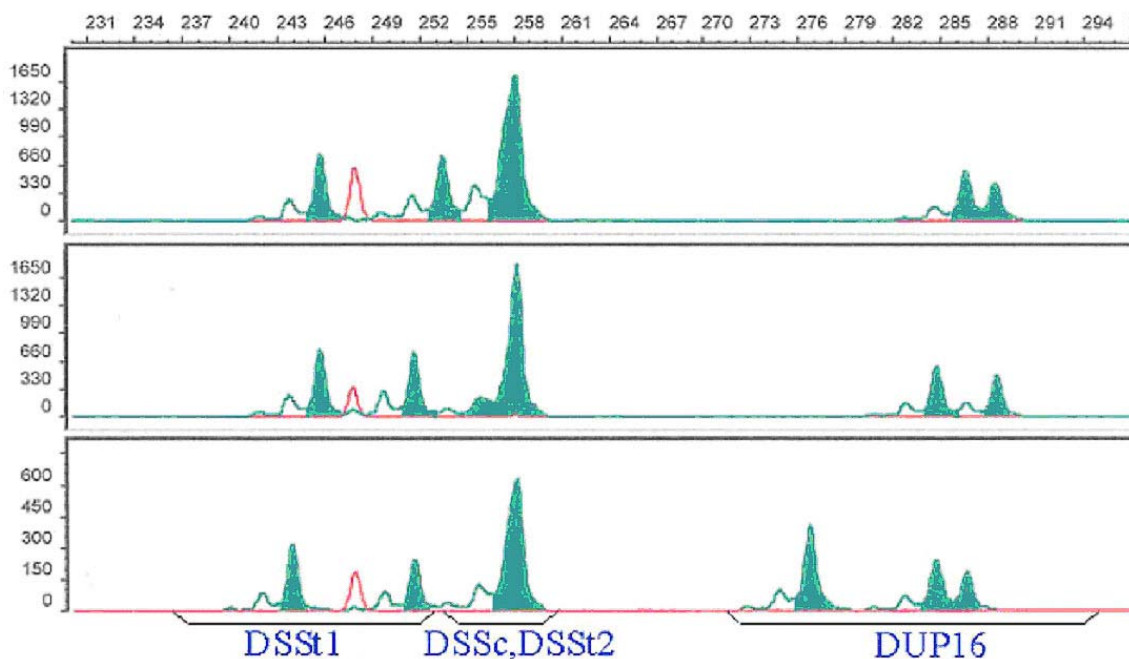
**Tabla 17.**

Rasgo clínico		No Mutado		Mutado		p-valor	significación
		N	%	N	%		
Apariencia facial	Típico	4	19%	11	92%	0,0002	**
	Posible	11	52%	1	8%		
	Escasos rasgos	6	29%	0	0%		
Perímetro cefálico prenatal P>90	Positivo	10	42%	9	75%	0,0890	
	Negativo	14	58%	3	25%		
Talla prenatal P>90	Positivo	8	31%	6	46%	0,0130	*
	Negativo	18	69%	7	54%		
Perímetro cefálico	Positivo	23	77%	12	86%	0,6910	
	Negativo	7	23%	2	14%		
Estatura P>97	Positivo	9	32%	8	73%	0,0353	*
	Negativo	19	68%	3	27%		
Escolarización	Normal	5	18%	0	0%	0,3697	
	Con apoyo	18	64%	5	62%		
	Especial	5	18%	3	38%		
Edad ósea	Positivo	18	72%	4	57%	0,6413	
	Negativo	7	28%	3	43%		
Anomalías Cardíacas	Positivo	3	15%	4	36%	0,2069	
	Negativo	17	85%	7	64%		
Anomalías Intracraneales	Positivo	6	38%	12	100%	0,0005	**
	Negativo	10	63%	0	0%		
Hiperlaxitud/ Pies planos	Positivo	17	71%	6	86%	0,6380	
	Negativo	7	29%	1	14%		
Hipotonía Neonatal	Positivo	12	40%	11	85%	0,0104	*
	Negativo	18	60%	2	15%		
Ictericia Neonatal	Positivo	5	18%	7	54%	0,0276	*
	Negativo	23	82%	6	46%		
Toma dificultosa lactante	Positivo	3	13%	3	27%	0,3437	
	Negativo	21	88%	8	73%		
Escoliosis	Positivo	5	18%	6	67%	0,0104	*
	Negativo	23	82%	3	33%		
Convulsiones	Positivo	10	36%	3	30%	1,0000	
	Negativo	18	64%	7	70%		

En los pacientes portadores de una mutación o delección afectando a *NSD1*, cabe mencionar el siguiente espectro de hallazgos adicionales. El individuo SS2 (microdelección) presenta hiperlaxitud articular, estrabismo convergente y mal oclusión dental. En el individuo SS6 (mutación patogénica) se hallaron niveles altos de  $\alpha$  feto proteína en rastreo bioquímico realizado durante el embarazo y un engrosamiento del pliegue nucal en el estudio ecográfico en la semana 12. Tras el parto, presentó hipoglucemia e hipocalcemia. El individuo SS20 (mutación patogénica) fue prematuro (35 semanas) por ruptura prematura de membranas, precisó ser intervenido quirúrgicamente para cerrar el ductus arterioso persistente a los 9 meses, presenta retraso severo del lenguaje, padece hipermetropía y en ecografía abdomino-renal se ha hallado un quiste hepático. El individuo SS21 (mutación patogénica) presentó complicaciones durante el parto por procidencia del cordón umbilical. El individuo SS23 (mutación patogénica) ha presentado bronquitis obstructivas recurrentes y disgenesia de *septum pellucidum* hallado en tomografía computerizada cerebral a los 8 meses de edad. El individuo SS24 (mutación patogénica) ha presentado bronconeumonías, bronquitis obstructivas recurrentes, infección urinaria y sinusitis. El individuo SS31 (mutación patogénica) presenta bronquiectasia en lóbulo medio (segmento medial), sufriendo procesos catarrales con fiebre frecuentes, y ha tenido un episodio de dolor precordial derecho con elevación de las enzimas cardíacas. El individuo SS32 (microdelección) presentó al nacer un distress respiratorio importante asociado a una hernia diafragmática de Bochdalek, lo que llevó a un fracaso multiorgánico neonatal con insuficiencia renal, precisando ventilación mecánica. Como secuela, presenta una encefalopatía hipóxico-isquémica y estrabismo. El individuo SS35 ha padecido faringoamigdalitis frecuentes y presenta atrofia cortico-subcortical leve a moderada. En el individuo SS38 (microdelección) existe un retraso severo del lenguaje, si bien la madre fue diagnosticada de toxoplasmosis durante el embarazo. El individuo SS41 presentó al nacer una alteración hepática y reseñable retraso en la adquisición de habilidades motoras. El individuo SS49 ha sufrido dos fracturas de clavícula y presenta oclusión dental defectuosa.

#### 4.1.4 Análisis evolutivo y de las duplicaciones segmentarias

Se ha genotipado en todos los pacientes y sus progenitores, así como en 20 individuos control, el microsatélite marcador de las tres DS y los dos bloques adicionales en el cromosoma 16p11.2. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un número variable de DS entre individuos al menos para las copias correspondientes al cromosoma 16 (Ver figura 25).

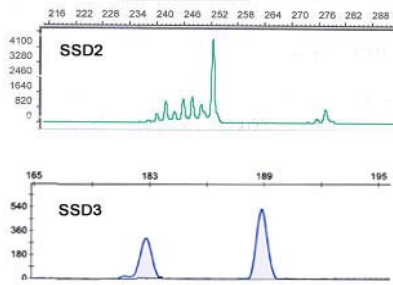


**Figura 25:** Genotipado en una familia control del microsatélite SSD2 interno a las DS en 5q35 y los dos bloques adicionales en el cromosoma 16p11.2

Adicionalmente se ha realizado el estudio evolutivo de las DS estudiando también el marcador microsatélite SSD2 y la PSV SSD3. Para ello, se han genotipado muestras de chimpancé, gorila, orangután y macaco.



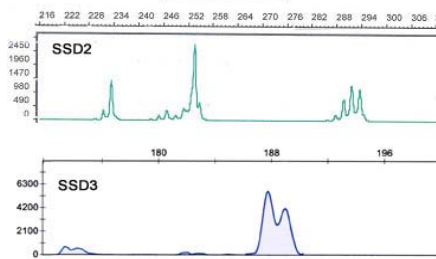
Chimpancé



En los análisis realizados en chimpancé se observa el mismo número de bloques para el cromosoma 5 que en humanos y parece existir sólo un bloque en el cromosoma 16.



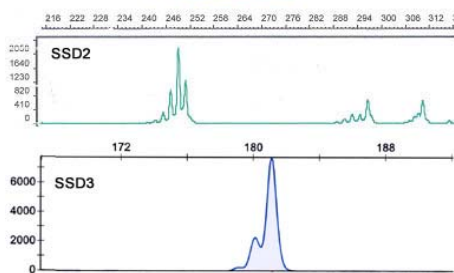
Gorila



En gorila parecen existir sólo dos bloques de DS en el cromosoma 5 y un bloque en el cromosoma 16



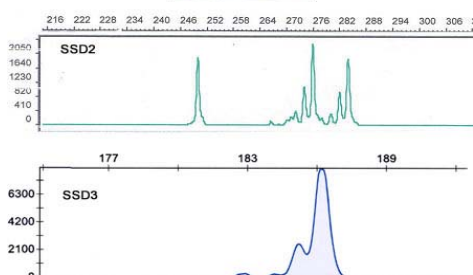
Orangután



En orangután hay un menor número de copias de las duplicaciones del cromosoma 5 que en humanos (uno o dos) sólo un bloque en el cromosoma 16



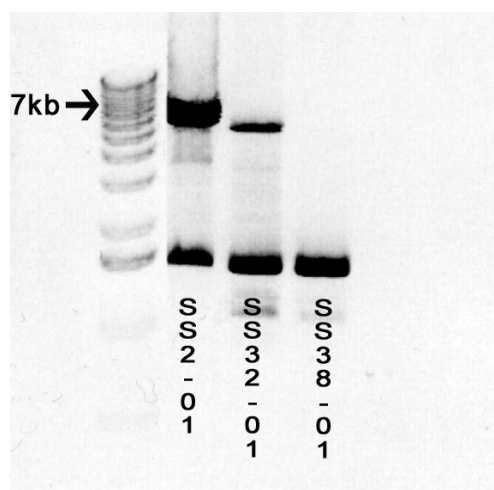
Macaco



En macaco parece existir sólo un bloque en el rango del cromosoma 5 (tal vez pudiera ser el ancestral) y otro (dos alelos) en el cromosoma 16.

#### 4.1.5 Estudio del fragmento de unión en las deleciones

En los tres pacientes con deleción de todo el gen *NSD1*: SS2-01, SS32-01 y SS38-01 se realizaron PCRs para tratar de amplificar el fragmento de unión resultante de la deleción [Visser *et al.*, 2005]. En los pacientes SS2-01 y SS32-01, se consiguió amplificar un fragmento de 6,9 Kb esperado (Ver figura 26), pero en el paciente SS38-01 no se consiguió amplificar producto alguno, por lo que probablemente el punto de rotura no se encuentra en la región de 3 kb considerada como un punto caliente de recombinación [Visser *et al.*, 2005; Kurotaki *et al.*, 2005].



**Figura 26:** Productos de PCR en los pacientes SS2-01, SS32-01 y SS38-01. La primera línea corresponde al marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder de Invitrogen.

Se buscó el fragmento de unión mediante secuenciación de un producto amplificado mediante PCR anidada, a partir de purificación de banda del fragmento inicial de 6,9 kb. Esto nos permitió definir el punto de rotura en ambos pacientes (Ver figura 27), a partir de la identificación de las PSVs de secuencias entre DSSc y DSSt2.

Posición pb	2557	2582	2687	2783	2929	2957	3320	3553	3622	3743	4003	4017	4177	4395	4484	4608	5072	5218	5228	5430
DSSc	G	G	A	A	A	C	T	A	C	T	C	A	T	T	T	C	A	G	A	C
DSSt2	T	A	G	G	G	G	A	G	T	C	T	G	C	C	C	A	G	T	G	T

**SS32-01** G | G | A | **A | A | C | T** | G | T | C | T | G | C | C | C | A | G | T | G | T

**SS2-01** G | G | A | **A | A | C | T** | A | C | T | C | A | T | T | C | **C** | G | T | G | T

**Figura 27:** PSVs halladas en la zona del punto de rotura. Se muestra en azul oscuro las PSVs correspondientes al bloque centromérico DSSc y en azul claro las PSVs del segundo bloque telomérico DSSt2. La posición en pares de bases representa la distancia desde el oligonucleótido directo SET2. En la parte inferior se muestra el punto de rotura en ambos pacientes, representándose en gris las PSVs no confirmadas por secuenciación.

## **4.2 Estudios de otras regiones y genes candidatos para sobrecrecimiento**

### **4.2.1 Cribado de reordenamientos específicos por MLPA**

En 34 casos de nuestra serie de 51 pacientes no localizamos ningún tipo de alteración causal del sobrecrecimiento y otros hallazgos clínicos observados en los estudios llevados a cabo en el gen *NSD1*. Muchos de estos pacientes no se enmarcan bien dentro del espectro de hallazgos clínicos del SS o al menos con suficiente certeza clínica. Además, existen otros síndromes y alteraciones con características similares que pueden dificultar el diagnóstico diferencial con el SS. Por todo ello, a fin de poder identificar la posible presencia de otras alteraciones en genes y regiones cromosómicas no analizadas, también candidatas a alterar el crecimiento, emprendimos el diseño experimental para estudiar dichas regiones.

Como primer punto de este abordaje, estudiamos y seleccionamos aquellos genes y regiones cromosómicas conocidas por su papel relacionado con el crecimiento o síndromes en los que existe una alteración de este. Como resultado de este estudio, seleccionamos 19 regiones y/o genes que creímos podrían tener una mayor relación con el hipercrecimiento.

Decidimos estudiar variaciones en el número de copia de estas regiones, dada la inviabilidad de realizar dentro de este proyecto un rastreo mutacional exhaustivo de todos los genes implicados. Además, en más de mitad de estos genes y regiones, se han descrito ya alteraciones de número de copia como causantes del trastorno asociado a sobrecrecimiento (tetrasomía 12p, trisomía 8, duplicación 15q25-ter, duplicación 5p, duplicación 4p16, delección 9q22, delección 22q13-ter).

Escogimos la técnica de MLPA para estudiar las 19 regiones cromosómicas y genes elegidos para el estudio. Posteriormente, diseñamos un segundo juego de sondas para los mismos genes y regiones, pero con sitios de hibridación distantes del primer juego, ubicados en un exón diferente y alejado. El objetivo de disponer de 2 juegos de sondas para el estudio es poder corroborar los resultados obtenidos en cada caso, y también validar los resultados positivos con dos sondas diferentes en sitios de hibridación distantes, y así descartar los posibles falsos positivos.

Cada juego contiene dos sondas para genes del cromosoma X no pertenecientes a la región pseudoautosómica (*GPC3* y *FAM51A1*), lo que constituye un buen control interno, ya que según el sexo del caso analizado estas sondas estarán duplicadas o delecionadas comparadas con individuos de sexo contrario. Hemos validado también el correcto funcionamiento de otras sondas, como las correspondientes al gen *NSD1*, en las que hemos podido detectar perfectamente las deleciones que habíamos encontrado en los pacientes SS2-01, SS32-01 y SS38-01. Utilizamos también la muestra de una paciente con síndrome de Turner para revalidar el funcionamiento de las sondas de los genes *GPC3* y *FAM51A1*, y también la del gen *SHOX* ubicado en la región pseudoautosómica (presente en el cromosoma X y también en el Y). También pudimos validar el buen funcionamiento de las sondas del gen *IGF1R*, ya que contamos con un paciente con síndrome de Silver Russell con una deleción previamente detectada en este gen.

Estudiamos además el buen funcionamiento general y posible variabilidad por presencia de cambios puntuales en el sitio de hibridación, de ambos juegos analizando más de 50 individuos sanos. En ninguno de estos casos obtuvimos falsos positivos u otros resultados anómalos.

Analizamos también la dispersión y la variabilidad de cada sonda como una medida de calidad de la misma. En los pacientes y controles analizados, la sonda del juego 1 correspondiente al gen *TGFBR1* mostró una variabilidad

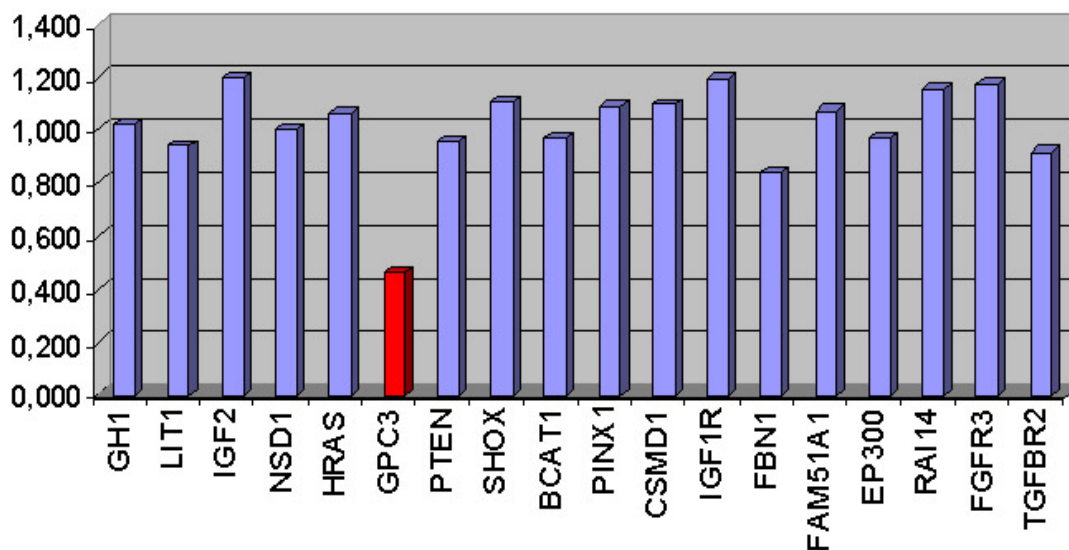


superior al 25%, debida probablemente a su tamaño, ya que esta sonda es la más grande del juego, razón por la cual creemos que justifica una amplificación deficiente en muchos casos, lo que provoca a su vez una tasa de dispersión mayor a la admisible. El resto de sondas del juego 1 mostró una desviación estándar inferior a 0,2 e inferior a 0,1 en doce de las dieciocho sondas restantes (*GH1*, *LIT1*, *NSD1*, *HRAS*, *GPC3*, *PTEN*, *SHOX*, *BCAT1*, *CSDMD1*, *FAM51A1*, *FGFR3* y *TGFBR2*). En el juego 2, todas las sondas diseñadas muestran una variabilidad inferior al 20%, siendo la desviación estándar inferior a 0,1 en trece de las 19 sondas (*TGFBR2*, *FGFR3*, *RAI14*, *TGFBR1*, *EP300*, *GPC3*, *IGF1R*, *CSDM1*, *GH1*, *LIT1*, *PTEN*, *HRAS* y *BCAT1*).

La escasa variabilidad mostrada por nuestras sondas y la reproductibilidad de los resultados son una medida indirecta del buen funcionamiento experimental de la técnica. No obstante, en los resultados positivos, especialmente en aquellos casos no confirmados con ambos juegos de sondas, es aconsejable que sean analizados y validados por otro método, debido a la existencia de posibles falsos positivos provocados por alteraciones puntuales en el sitio de unión de las sondas. Estos cambios pueden ser detectados por simple secuenciación.

Una vez analizados todos los pacientes, se encontró en el caso SS16-01 una delección del fragmento correspondiente a la sonda situada en el gen *GPC3* (Xq26.1) (Ver figura 28), confirmada con ambos juegos de sondas de MLPA. Esta delección no se detectó en ninguno de los dos progenitores.

## SS16-01



**Figura 28:** Resultados normalizados de las sondas del juego 1 de sobrecrecimiento. Las barras representan cada región amplificada como una función del número de copia. Los valores entre 0,8 y 1,2 se consideran normales, 1,5 duplicación heterocigota y 0,5 deleción heterocigota. La sonda situada en el gen *GPC3* coloreada en rojo, presenta un valor cercano a 0,4 lo que indica una deleción en esta sonda.

Además de confirmar con ambos juegos de sondas la deleción del gen *NSD1* en los pacientes SS2-01, SS32-01, y SS38-01, logramos localizar una deleción parcial en el paciente SS46-01 correspondiente a la sonda del juego 1 que hibrida en el exón 5. La sonda del juego 2, cuyo sitio de hibridación se ubica en el exón 17, no mostró alteración de dosis. Experimentos posteriores con experimentos con el kit comercial SALSA MLPA kit P026B® (*NSD1*) confirmaron la presencia de una deleción parcial de los exones 1 a 5.

No se ha detectado ninguna otra anomalía en el resto de pacientes estudiados, descartándose por tanto alteraciones de dosis génicas detectables con las dos sondas utilizadas para cada gen.

### 4.2.2 Rastreo genómico global por array-CGH

Con objeto de profundizar en la búsqueda e identificación de nuevas alteraciones de dosis de copia génica, se seleccionaron algunos pacientes con

sobrecrecimiento claramente documentado, para someterlos a un análisis genómico global mediante técnicas de array-CGH.

Estos estudios nos han permitido buscar alteraciones de copia en genes candidatos, y a su vez estudiar duplicaciones y deleciones en otras regiones que podrían llevar a identificar nuevos loci responsables del fenotipo asociado.

Los estudios de Array-CGH realizados a algunos pacientes con criterios clínicos de SS, en los que no se detectaron mutaciones afectando al gen *NSD1*, permitieron detectar 4 alteraciones de copia no identificadas previamente, además de múltiples variantes de número de copia (CNVs) ya descritas.

En los pacientes estudiados hemos encontrado las siguientes CNVs ya descritas en otros estudios y listadas en la base de datos *Human Variation Database* (<http://projects.tcag.ca/variation/>):

En el paciente SS13-01 se detectó una duplicación en la región cromosómica 6p21.32, coincidente con la variante 0599 que solapa con una duplicación segmentaria y que incluye los genes *RDBP*, *DOM3Z*, *C4B*, *C4A*, *SKIV2L* y *STK19*. Asimismo, se detectó una deleción de aproximadamente 17 kb que no afectaba a ningún gen en la región 2q27.3, que solapaba con una región de CNVs reportada por varios autores (variante 2429, variante 0032, variante 3411, variante 0694, variante 7257, variante 8028 y variante 8286).

En el paciente SS17-01 se localizó una pérdida de número de copia en la región Xp22.31 coincidente con la variante genómica conocida 5361, que además solapa con varias duplicaciones segmentarias e incluye los genes *VCX* y *PNPLA4*.

En el paciente SS9-01, se observó una ganancia de número de copia correspondiente al clon RP11-706I13 en la región cromosómica 5p14.1, que solapa con la variante genómica 3549 e incluye al gen *CDH9*.

En el paciente SS15-01 se detectó pérdida de número de copia del clon RP11-335G20, correspondiente a la región 1p36.11, que solapa con dos duplicaciones segmentarias, incluye los genes *RHD*, *TMEM50A* y *RHCE*, y las siguientes varias variantes reportadas (variante 2047, variante 0381, variante 0680, variante 4217, variante 6821 y variante 0257). En el cromosoma 7 se observó una ganancia de número de copia del clon RP11-410M8 que solapa con las variantes genómicas 3681 y 4538 en la región 7q11.1, sin genes conocidos. En la región 8q12.1, se perdió el clon RP11-513O17, en una zona sin genes y que solapa con numerosas variantes (variante 3736, variante 4594, variante 6621, variante 7694, variante 0634, variante 0635). Se detectó pérdida del clon RP11-25J23 en la región 13q31.1, parcialmente solapante con la variante 4812 y que incluiría parte del gen *NDFIP2*. Por último, se detectó una pérdida en la región 14q22.1 del clon RP11-589E15 que no incluye genes y solapa con la variante 4836.

En el paciente SS37-01, se encontró una pérdida de número de copia del clon RP11-697E15 de la región 3q29 que solapa con muchas variantes (variante 2064, variante 2491, variante 3472, variante 0696, variante 7399, variante 4366, variante 1383, variante consistente en inversión 568, variante 7969, variante 8111 y variante 6299) y que incluye dos duplicaciones segmentarias y los genes *MUC20* y *MUC4*. En la región 5p14.1, se ha visto una pérdida en el clon RP11-706I13, que solapa con la variante 3549 e incluye el gen *CDH9*. Se encontró pérdida en el clon RP13-49I15 de la región 10q26.3 que solapa con numerosas CNVs (variante 2896, variante 3829, variante 4721, variante 4722, variante 4723, variante 5270, variante 5272, variante 5273, variante 8262 y variante 5271) y que incluye los genes *VENTX*, *ADAM8* y *TUBGCP2*. En el cromosoma 19 se detectó ganancia del clon RP11-749K3 de la región 19q13.42 que solapa con una duplicación segmentaria y varias CNVs (variante 3200, variante 4088, variante 5344, variante 5345, variante 7222, variante 5447, variante 5117, variante 7220, variante 2248, variante 0809, variante 1302, variante 7221 y variante 8282), incluye los genes *LILRB4*, *KIR3DL3*, *KIR3DP1*, *KIR2DL3*, *KIR2DL1*, *KIR3DL1*, *KIR2DL4*, *KIR2DS4* y *KIR3DL2*. En la región 20p12.1 se detectó pérdida en el clon RP5-855L24 que

solapa con las variantes 5449 y 3209, y que incluye parte del posible gen *C20orf133*.

En el paciente SS51-01 se observó una pérdida de número de copia en la región 1p21.1 que solapa con varias variantes descritas (variante 3302, variante 4238, variante 6767, variante 2048, variante 0012 y variante 0681), que incluye varias duplicaciones segmentarias y los genes *RNPC3*, *AMY2B*, *AMY2A* y *AMY1A*. En la región 8q12.1 correspondiente al clon RP11-513O17, se observó una ganancia de dosis, esta región no contiene genes identificados y que solapa con varias CNVs (variante 3736, variante 4594, variante 6621, variante 7694, variante 0634 y variante 0635). En el cromosoma 9 se detectó pérdida de número de copia del clon RP11-490H9, de la región 9q21.2, que no incluye genes y que solapa con la variante 3771. Por último se encontró disminución de dosis de la región 13q31.1 correspondiente al clon RP11-25J23, que solapa con la variante 4812 y que incluye el gen *NDFIP2*.

Además de identificar estas CNVs en el grupo de pacientes estudiados, también hemos detectado otras alteraciones no halladas previamente en otros estudios. Como analizamos a continuación algunas son probablemente patogénicas y otras de significado clínico desconocido.

El paciente SS37-01 mostró ganancia del clon RP5-1060P11 del cromosoma 19 que incluye varios genes de la familia KIR de células “natural killer” que juegan un papel destacado en la respuesta inmune. No obstante, este clon no ha sido todavía correctamente asignado en el ensamblaje “assembly” actual, por lo que podría estar incluido en alguna región de CNVs. Es conocida además la abundancia de este tipo de genes que participan en la respuesta inmune en CNVs. No obstante, la alteración de dosis de estos genes, por su función, no invita a pensar en un papel destacado en el crecimiento y, por ende, responsable del fenotipo observado en este paciente.

El paciente SS9-01 mostró una pérdida de dosis en la región 18q12.3 (clon RP11-339F17) que incluye el gen *SYT4* (synaptotagmin 4). Este gen se expresa principalmente en astrocitos y su función parece contribuir a la

memoria dependiente del hipocampo. En ratones mutantes para este gen, estos presentaban una pobre coordinación motora y problemas en el aprendizaje y en la memoria dependiente del hipocampo. Por ello, es posible que, aunque este gen pueda jugar un papel relevante en el fenotipo neurológico de este paciente, no parece que sea el responsable de sobrecrecimiento manifiesto observado en él.

El paciente SS17-01 mostró una pérdida de número de copia, para un clon que incluye el gen *NSD1*. Posteriormente, por estudios de MLPA, se confirmó una deleción parcial del gen *NSD1* que afecta a los dos primeros exones del gen.

El paciente SS13-01 mostró una ganancia de dosis en la región 3q21.1 (ganancia en 5 clones) posteriormente confirmada por estudios de MLPA.

#### **4.2.3 Estudios de confirmación y validación de hallazgos**

##### **4.2.3.1 Duplicación parcial en el cromosoma 3**

El paciente SS13-01, de acuerdo a nuestra clasificación inicial en función de los criterios clínicos principales, se englobaría dentro de los SS seguros, ya que presenta sobrecrecimiento prenatal, apariencia facial característica y retraso del desarrollo psicomotor. Otras características clínicas adicionales son edad ósea adelantada, hiperlaxitud, pies planos y convulsiones.

En este paciente, con objeto de estudiar la duplicación detectada en el cromosoma 3 en los estudios de rastreo genómico global mediante array-CGH, se diseñaron 6 sondas de MLPA específicas de la región 3q21.1

En el experimento se utilizaron también 4 sondas pertenecientes al juego 1 de sondas de sobrecrecimiento (*NSD1*, *BCAT1*, *FBN1* y *FGF3*), con

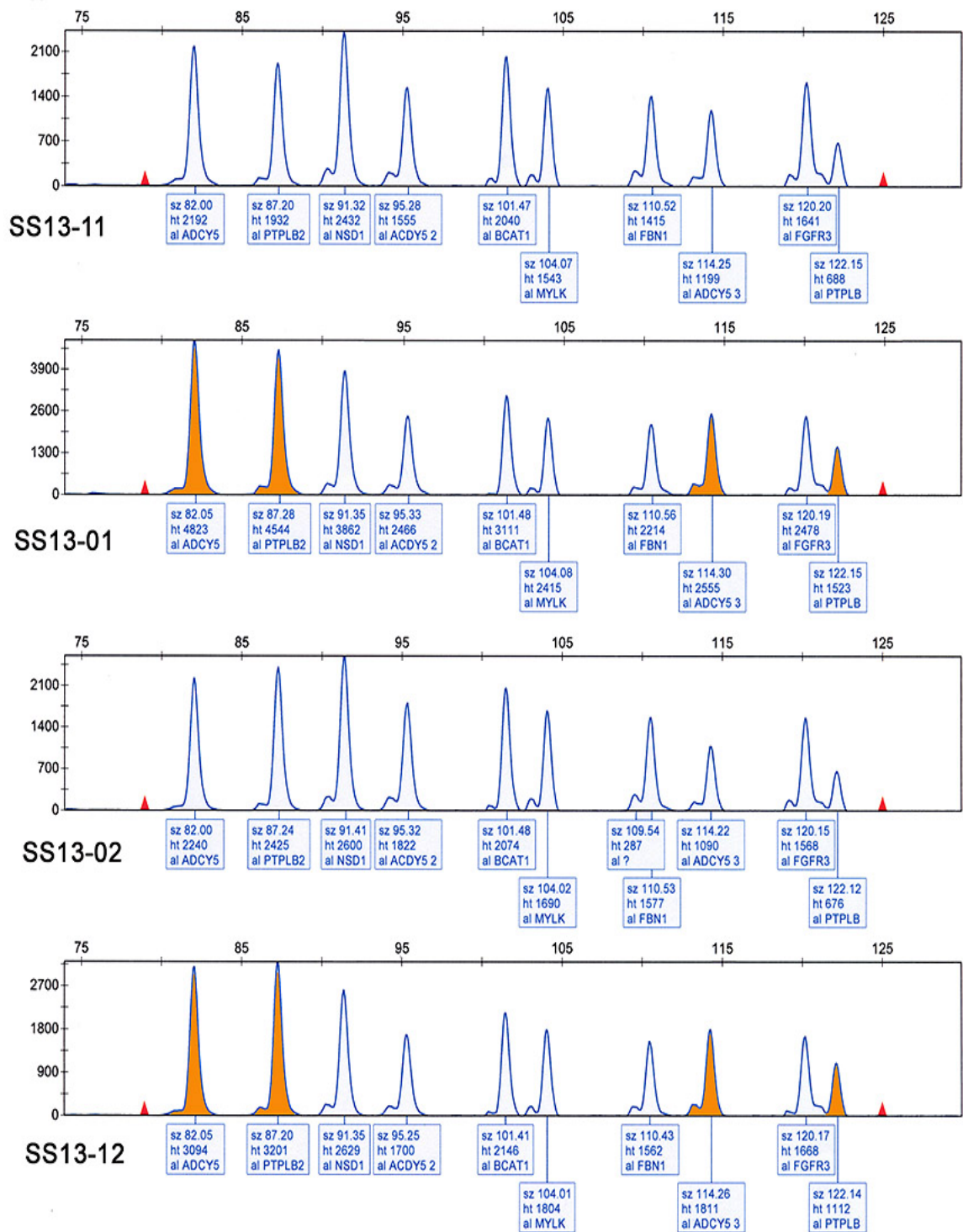
lugares de hibridación en otros cromosomas para utilizarlas como controles externos. Las 6 sondas específicas de la región 3q21.1 mostraron todas una desviación estándar inferior a 0,1.

Los experimentos realizados con este juego de MLPA de 10 sondas, 6 de ellas específicas para la región 3q21.1 duplicada en el paciente SS13-01, han permitido acotar la duplicación. Esta incluye todo el gen *PTPLB* y al menos la mitad 3' del gen *ADCY5*, no estando duplicado su extremo 5' ni tampoco la parte más centromérica del gen *MYLK* en el otro extremo de la zona duplicada (ver figura 29).

Estos estudios han permitido también detectar la misma duplicación en la madre del paciente y en la abuela materna, que no presentan sobrecrecimiento ni otros rasgos clínicos destacables hasta nuestro conocimiento (Ver figura 29).

Los estudios de FISH realizados en el paciente han permitido determinar que la duplicación se produce en *cis* sobre el mismo cromosoma

Esta duplicación no está presente en el padre, ni en el hermano del paciente, ni en dos hermanas maternas. Tampoco se encontró alteración alguna en otros pacientes con sobrecrecimiento ni en 210 individuos controles, estudiados con la misma técnica de MLPA.



**Figura 29:** Análisis MLPA de la familia SS13 en la región 3q21.1, El paciente SS13-01 y la madre SS13-12 presentan una duplicación de las sondas del gen *PTPLB* y de 2 de las tres sondas del gen *ADCY5* (las sondas duplicadas se representan coloreadas en naranja).



### 4.2.3.2 Estudios en el cromosoma X

#### 4.2.3.2.1 Pacientes

En tres pacientes de nuestra serie, se hallaron alteraciones en el cromosoma X. Se detectó por estudios de MLPA una deleción parcial en el cromosoma X en el paciente SS16-01, cuyo cariotipo fue informado como normal. Adicionalmente, se estudiaron dos pacientes con alteraciones citogenéticas ya detectadas, resultantes en ganancias de material genético no identificable por citogenética, cada una de un brazo diferente del cromosoma X, y efectos contrarios en el crecimiento.

##### Caso 1 (deleción parcial Xq)

El paciente SS16-01 fue incluido en el estudio mutacional de *NSD1*, si bien, según nuestra categorización era un caso de “no SS”, ya que no presenta una apariencia facial característica, y sólo presenta sobrecrecimiento cefálico. Entre otras características clínicas, cabe destacar la hiperlaxitud, pies planos, hipotonía neonatal y escoliosis. La citogenética de este paciente fue informada como normal. En este paciente, mediante nuestros estudios previos de MLPA, se encontró una deleción del gen *GPC3* confirmada con ambos juegos de sondas de sobrecrecimiento.

##### Caso 2 (duplicación parcial Xp)

Era una hija de padres sanos, de estatura e inteligencia normales y no consanguíneos. El peso, altura y perímetro cefálico de recién nacida fueron superiores al percentil 95.

La paciente presentó un retraso del desarrollo con hipotonía. A la edad de 4 años, sus parámetros de crecimiento seguían por encima del percentil 90. El examen físico revela numerosas características dismórficas incluyendo dolicocefalia, macrocefalia, frente alta y prominente, con implantación hacia atrás de la línea del cabello, fisuras palpebrales antimongoloides, mentón prominente, paladar alto y estrecho, asimetría en los pabellones auditivos, pies y manos alargados. En examen radiológico, también se detectó una edad ósea adelantada. Se categorizó como “posible SS”.

### Caso 3 (duplicación parcial Xq)

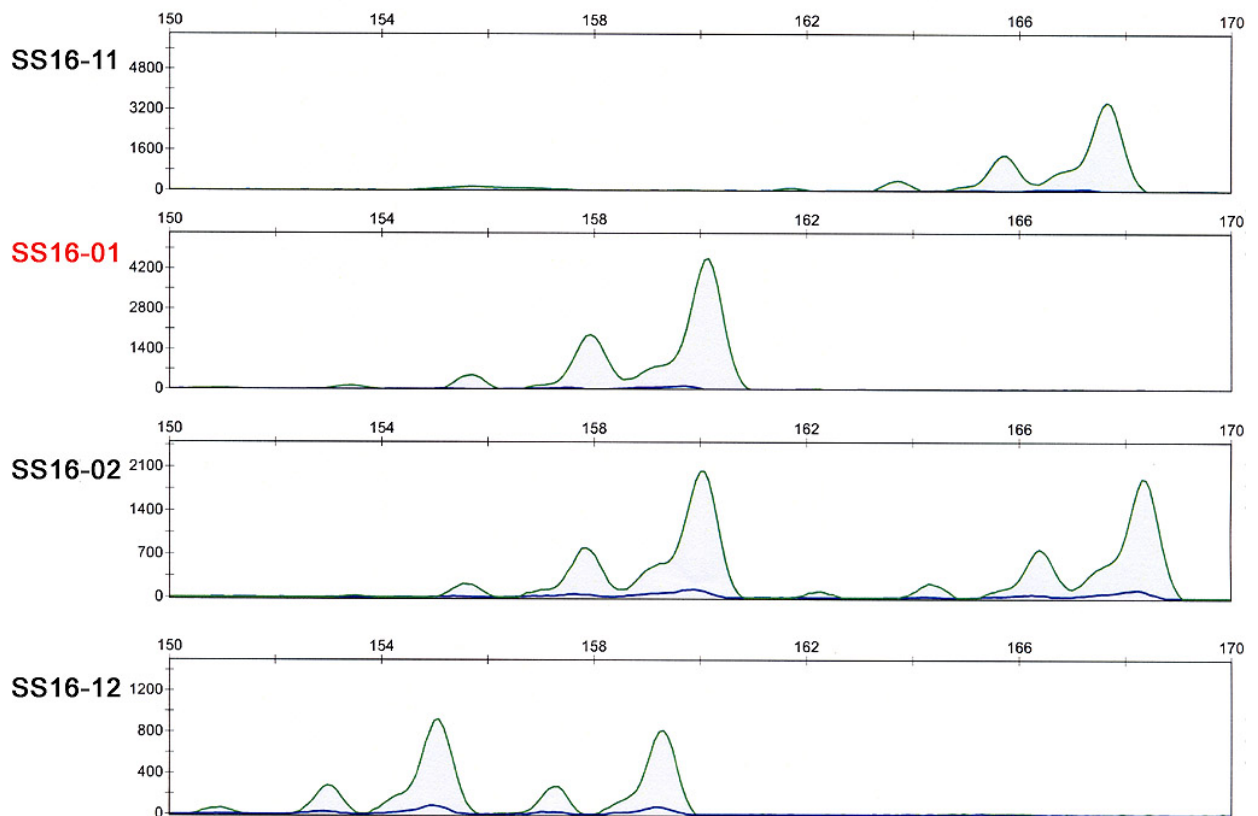
En este caso, se trataba de la primera hija de padres no consanguíneos, de inteligencia y estatura normales. A las 35 semanas de gestación, se detectó un retraso del crecimiento intrauterino. La paciente nació por cesárea a las 37 semanas debido a una detención en el crecimiento fetal. Longitud, peso y perímetro cefálico fueron inferiores al percentil 5.

Después del nacimiento, sus parámetros de crecimiento siguieron permaneciendo por debajo del percentil 5. En examen físico la paciente presentaba una plagiocefalia moderada, rostro triangular, pliegues epicánticos y nariz prominente, así como moderada asimetría en las medidas de manos y pies. Estos rasgos clínicos llevaron a un diagnóstico posible de Síndrome de Silver-Russell.

#### **4.2.3.2.2 Caracterización molecular de las anomalías**

##### Caso1 (delección parcial Xq)

En este paciente, mediante nuestros estudios anteriores de MLPA, se encontró una delección del gen *GPC3* confirmada con ambos juegos de sondas de sobrecrecimiento. Con el fin de ratificar esta delección en el cromosoma X y profundizar en el conocimiento de la misma, se procedió al estudio de varios marcadores microsatélites polimórficos. Los resultados derivados revelaron que la delección afectaba a todo el gen *GPC3* y regiones adyacentes, extendiéndose hasta el telómero Xq. La paciente no había heredado el alelo paterno de los marcadores DXS1047 (Ver figura 30), DXS1227, DXS8091 y DXS1073, siendo heterocigota para el marcador DXS8055. Esto supone una delección de al menos 24,58 Mb desde la banda citogenética q25 a qter.



**Figura 30:** Genotipado en la familia SS16 (SS16-11: padre; SS16-01: paciente; SS16-02: hermana; SS16-12: madre) del microsatélite DXS1047, donde se observa una pérdida de herencia en la paciente SS16-01 del alelo paterno.

Adicionalmente, se realizaron estudios de inactivación del cromosoma X utilizando el protocolo estándar del experimento HUMARA [Allen *et al.*, 1992], que revelaron una inactivación selectiva del cromosoma paterno portador de la deleción parcial.

#### Caso 2 (duplicación parcial Xp)

El análisis citogenético mostró un cromosoma X normal y otro con material extra en Xp. Mediante *painting* cromosómico, se demostró que el material extra procede también del cromosoma X

El análisis de los microsatélites marcadores DXS1214 y DXS1068, localizados en el intervalo duplicado, reveló el origen paterno de una duplicación de la región que afectaba al menos desde Xp21.2 a Xp11.4 (Ver figura 31).

Los estudios de inactivación mostraron un porcentaje de metilación idéntico de ambos alelos, paterno y materno, en ADN de linfocitos de sangre periférica, lo que indica que ambos cromosomas en la paciente están inactivados aleatoriamente.

Para establecer con mayor definición el intervalo duplicado se realizó un array CGH del cromosoma X, resultando que un total de 187 clones consecutivos, correspondientes a Xp, mostraron una ganancia en el número de copia ( $\log_2\text{ratio} > 0,3$ ), consistente con una duplicación de unas 20,4 Mb (25,755 Mb a 46,125). El punto de rotura proximal se ubica en la banda Xp21.3, dentro del clon genómico RP11-48A16 y el punto de rotura distal estaría en el clon genómico RP11-649P8, localizado en la banda citogenética Xp11.3 (Ver figura 32 A).

### Caso 3 (duplicación parcial Xq)

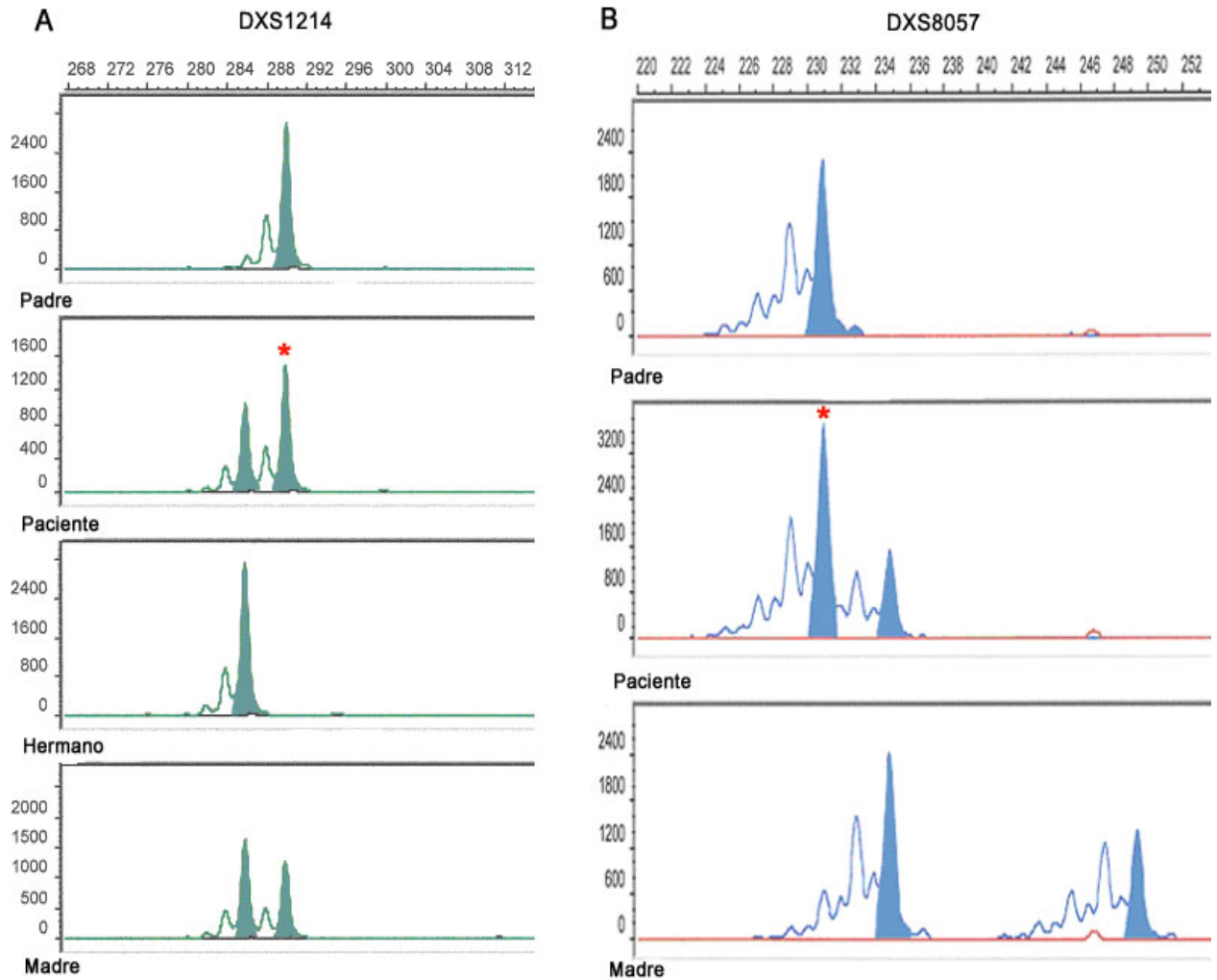
Los estudios citogenéticos de este paciente mostraron un cariotipo femenino con un cromosoma X normal y otro cromosoma X con material adicional en Xq.

En el análisis de 5 microsatélites marcadores polimórficos se detectó la duplicación en uno de ellos (DXS8057). La comparación visual de la altura entre los picos del alelo materno y el paterno, mostró evidencias del origen paterno de la duplicación (Ver figura 31).

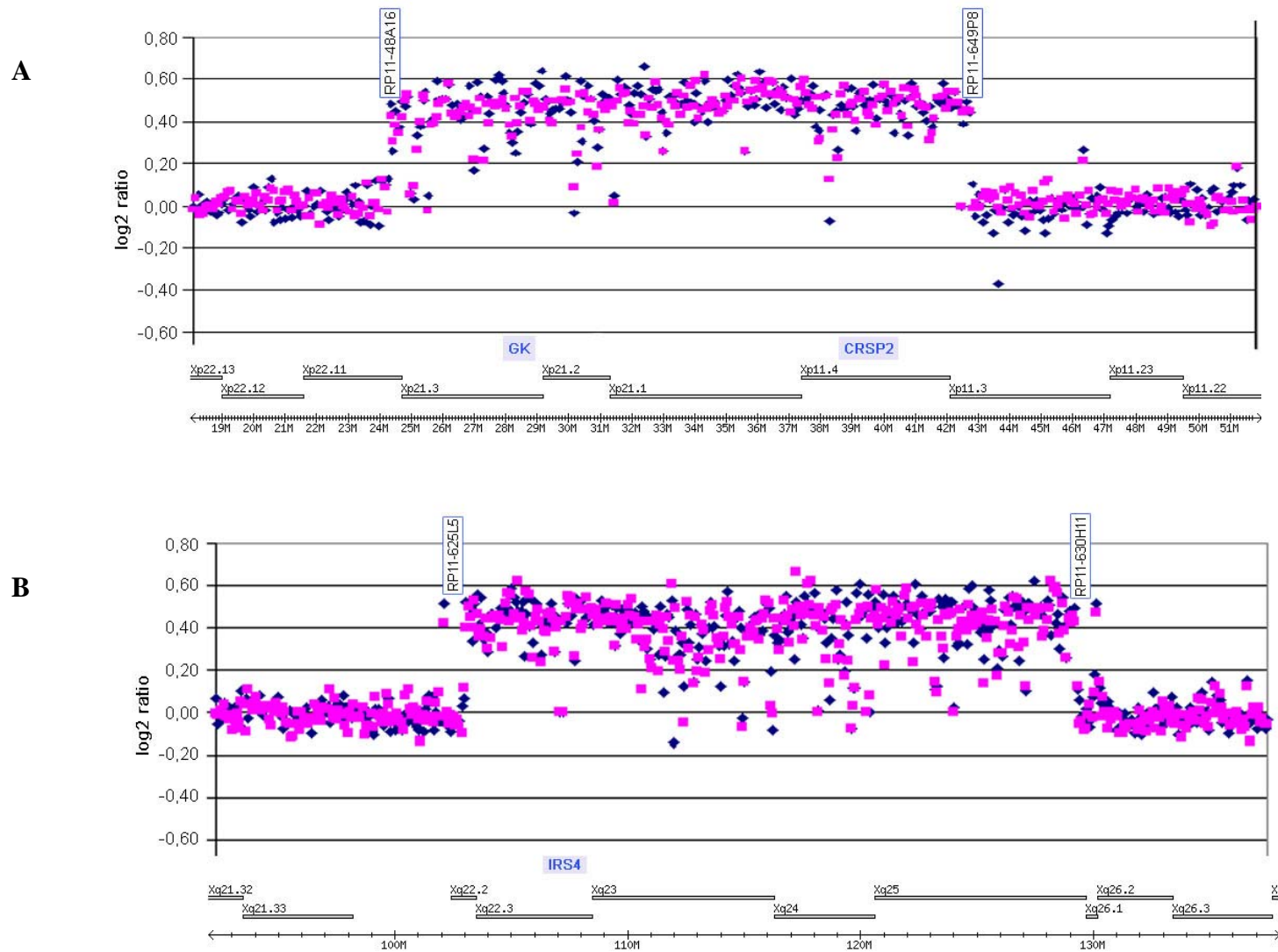
Los estudios de inactivación con el experimento HUMARA [Allen *et al.*, 1992] revelaron una inactivación al azar de ambos alelos, paterno y materno.

Los estudios de array-CGH mostraron una ganancia de número de copia para un total de 187 clones en Xp ( $\log_2\text{ratio} > 0,3$ ), por lo que el tamaño de la duplicación es de unos 25,6 Mb (104,134 Mb a 129,706). El punto de rotura centromérico se localiza en el clon genómico RP11-625L5 en la banda citogenética Xq22.3 (contiene parte del gen IL1RAPL2) y el punto de rotura

telomérico estaría en el clon genómico RP11-63011 (contiene parte del gen COVA1), asignado a la banda citogenética Xq25 (Ver figura 32 B).



**Figura 31:** Análisis de microsatélites para definir el origen parental de la duplicación. **A)** Genotipos de marcador DXS1214 en la familia del caso 1. **B)** Genotipos del marcador DXS8057 en la familia del caso 2. Un asterisco rojo identifica el alelo duplicado, en ambos casos correspondiente al alelo de origen paterno.



**Figura 32:** Perfil del cromosoma X mediante array-CGH en ambos pacientes, alrededor del intervalo duplicado. **A)** Perfil del ADN del caso 1 que muestra una desviación de los ratios para los clones localizados entre Xp21.3 y Xp11.3 (BACs RP11-48A16 a RP11-649P8). **B)** Perfil del ADN del caso 2 que muestra una desviación de los ratios para los clones localizados entre Xq22.3 y Xq25 (BACs RP11-625L5 a RP11-630H11)

# DISCUSIÓN





## 5.1 Base genética y molecular del SS

La causa genética del SS fue descubierta en el 2002 por el doctor Naohiro Kurotaki y colaboradores, a raíz de la identificación de un niño con SS con la siguiente translocación: 46, XX,t(5;8)(q35;q24.1) [Imaizumi *et al.*, 2002], se identificó en gen *NSD1* en el punto de rotura en 5q35. Hallando alteraciones de este gen en 24 de 42 individuos estudiados con diagnóstico clínico de SS (57% de los casos). De estas alteraciones el 83% fueron microdeleciones en hemicigosis y el 17% restante mutaciones puntuales en heterocigosis. Estableciéndose así la haploinsuficiencia del gen *NSD1* como principal causa del SS. [Kurotaki *et al.*, 2002],

Desde ese artículo se han publicado varios estudios en población europea, encontrándose alteraciones de este gen habitualmente en más del 50% de los pacientes investigados. En la mayoría de estos casos, la alteración predominante del gen son mutaciones puntuales (aproximadamente el 90%) en lugar de microdeleciones afectando a todo el gen (alrededor de un 10 %). Estudios posteriores en población japonesa cifran la tasa media de microdeleciones en alrededor del 50% de las alteraciones encontradas.

Las funciones de *NSD1* no se comprenden aun totalmente. La proteína consta entre otros, de dos dominios de interacción receptor nuclear (NR), estos dominios de interacción se localizan en proteínas que pueden actuar tanto como co-represores como co-activadores [Huang *et al.*, 1998]. Se ha postulado que la proteína funcionaría como un receptor nuclear capaz de actuar como co-represor y como co-activador interactuando con los dominios de unión-ligación de los receptores hormonales nucleares, se piensa que funciona como un factor intermediario transcripcional capaz de actuar bien activando o inhibiendo la transcripción, dependiendo del contexto celular [Kurotaki *et al.*, 2002]. Además la presencia y combinación de los dominios SAC y SET sugiere que *NSD1* posiblemente esté implicado en la modificación de las histonas y la regulación de los estados de la cromatina. El hecho de que la

haploinsuficiencia de *NSD1* provoque hipercrecimiento implica que *NSD1* actúa como un co-represor de genes que promueven el crecimiento.

Después de la publicación del artículo de Kurotaki, nosotros hemos investigado alteraciones afectando al gen *NSD1* en pacientes españoles con sospecha clínica de SS. Estudiando un total de 51 pacientes con sospecha clínica de SS y 2 pacientes adicionales con diagnóstico clínico de síndrome de Weaver dado el cierto grado de solapamiento clínico entre ambos síndromes, además en algunos estudios anteriores se han encontrado mutaciones en *NSD1* en pacientes con síndrome de Weaver [Rio *et al.*, 2003].

Habiendo realizado análisis mutacionales completos y de microdelección en nuestra serie de pacientes, hemos encontrado 16 casos (31%) con mutaciones patogénicas con alteración de *NSD1*. En todos estos pacientes estas alteraciones se han producido *de novo*, siendo siempre los padres normales.

Tres de estas alteraciones identificadas (19%) son microdeleciones afectando a todo el gen *NSD1*, 2 son deleciones parciales (12%) afectando solo a algunos exones del gen y 11 (69%) son mutaciones puntuales.

Dentro de las 11 mutaciones puntuales halladas 9 no han sido citadas previamente y 2 han sido descritas anteriormente, por lo que tienen una cierta recurrencia: la mutación c.1894 C>T en el exón 5 ha sido descrita por Cecconi *et al.* (2005) y la mutación c.2576-2577 del 2nt (AT) también ha sido descrita en otro paciente por Douglas *et al.* (2003). Todas las mutaciones a excepción de una son “sin sentido”, dando lugar a codones de stop prematuros que probablemente originan proteínas truncadas.

La mutación c.1894 C>T presente en dos de nuestros pacientes (sin relación familiar) y ya descrita anteriormente se produce en un dinucleótido CpG, en general los dinucleótidos CpG son áreas de mayor frecuencia de sustitución nucleotídica, lo que puede ser una causa para explicar esta mutación recurrente.

En la mutación c-2576-2577 del 2nt (AT) recurrente (presente en uno de nuestros casos y descrita en la literatura con anterioridad), los dos nucleótidos deletados son centrales a un palíndromo de 10 nucleótidos, lo que es sugerente de que pueda predisponer de alguna manera no explicada a la mutación.

La mutación c. 5117 A>T presente en uno de nuestro pacientes produce un cambio aminoacídico en la proteína (N1637I), esta alteración ha sido producida *de novo* y no se ha podido identificar la presencia de esta mutación en más de 200 individuos controles estudiados. La alteración se localiza en el exón 14 del gen y afecta a uno de los motivos funcionales de la proteína, uno de los 5 homeodominios de plantas (PHD) de que consta, esta clase de dominios PHD se encuentran en proteínas que actúan a nivel de la cromatina. Por todo ello creemos que esta alteración puede tratarse de una mutación de cambio de sentido que afecta a la funcionalidad de la proteína teniendo un carácter probablemente patogénico.

Hasta la fecha ya han sido publicadas más de 200 mutaciones puntuales diferentes [Kurotaki *et al.*, 2002; Douglas *et al.*, 2003; Nagai *et al.*, 2003; Rio *et al.*, 2003; Türkmen *et al.*, 2003; Hoglund *et al.*, 2003; Kamimura *et al.*, 2003; Kurotaki *et al.*, 2003; de Boer *et al.*, 2004; Melchior *et al.*, 2005; Cecconi *et al.*, 2005; Tatton-Brown *et al.*, 2005; Van Haelst *et al.*, 2005; Tei *et al.*, 2006]. Las mutaciones parecen distribuirse por toda la región codificante del gen *NSD1* sin que existan *puntos calientes* claros, pese a la existencia de algunas mutaciones con cierta frecuencia de recurrencia como reflejan nuestros resultados y los de otros estudios, existiendo algunas mutaciones que se han identificado en más de 4 individuos no emparentados. La mayoría de nuestras mutaciones (7/11) se localizan en el exón 5 del gen, también en los estudios publicados este exón contiene una fracción muy importante de las mutaciones identificadas (más del 35%), por otro lado el exón 5 es el más largo de los 23 exones de este gen, lo que explica esta mayor tasa de mutaciones. La gran mayoría de las mutaciones producen proteínas truncadas originadas por un codón de stop prematuro, resultante de pequeñas inserciones/deleciones

nucleotídicas que desvían la pauta de lectura generando un codón de stop prematuro o bien por una sustitución nucleotídica que origina un codón de stop directo. Este tipo de mutación se ha identificado a lo largo de todo el gen. También se han identificado algunas mutaciones sin sentido afectando casi todas ellas a dominios funciones del gen (~25%), este tipo de mutación están agrupadas hacia el extremo 3' del gen pero no existen puntos calientes mutacionales. En una menor proporción también se han encontrado algunas mutaciones que afectan al “*splicing*” de la proteína (~5% de las mutaciones). Finalmente las deleciones parciales del gen suponen aproximadamente el 5% de las anomalías de *NSD1* detectadas, la mayoría implican a los exones 1 y 2, como ocurre en uno de nuestros casos, probablemente debido a la alta densidad de elementos *Alu* flanqueando estos exones. Algunas deleciones génicas parciales se generan mediante recombinação homóloga no alélica entre repeticiones *Alu* mientras que en otros casos parecen más probablemente originadas por unión de terminales no homólogos [Douglas *et al.*, 2005].

Casi todas las mutaciones, en las que se ha podido estudiar muestras parentales, se han producido de novo, con excepción de los menos de 20 casos familiares en los que se ha documentado una transmisión del fenotipo desde el progenitor afecto [Douglas *et al.*, 2003; Hoglund *et al.*, 2003; Kurotaki *et al.*, 2003; Tatton-Brown *et al.*, 2005; Cecconi *et al.*, 2005; Van Haelst *et al.*, 2005; *et al.*, 2006]. Las causas por las cuales las tasas de transmisión vertical son tan bajas no han sido completamente elucidadas.

Las tablas inferiores recogen todas las mutaciones intragénicas reportadas.

**Tabla 18.** Mutaciones intragénicas reportadas en la literatura

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
2	896delC	Frameshift	Familiar	[3]
4	1130G>A	W377X		[4]
4	1171delC	Frameshift	<i>De novo</i>	[2]
5	1266delA	Frameshift		[10]
5	1283delC	A428G		[2]
5	1306-1307insTG	Frameshift		[12]
5	1310C>G	S437X	<i>De novo</i>	[1]
5	1318C>T	R440X		[11], [6], 2x [12]
5	1357G>T	E453X		[12]
5	1363-4insA	Frameshift		[12]
5	1427T>A	L476X		[9]
5	1492C>T	R498X		[5], [2], [12]
5	1648-9insGG	Frameshift		[12]
5	1697delG	Frameshift		[11], [12]
5	1727delA	Frameshift		2x [2]
5	1727insA	Frameshift		[11], [12]
5	1730-1insAC	Frameshift		[12]
5	1807delT	Frameshift		[4]
5	1810C>T	R604X	<i>De novo</i> [2]	2x [2], [12]
5	1828C>T	Q610X	<i>De novo</i>	[7]
5	1831C>T	R611X		2x [12]
5	1894C>T	R632X	<i>De novo</i>	[11], [12]
5	1967C>G	S656X		[12]
5	1969insA	Frameshift		[9]
5	1984delT	Frameshift		[12]
5	2053-2057del	Frameshift		[4]
5	2227C>T	Q743X		[12]
5	2323C>T	Q775X		[2]
5	2333T?G	L778X	Familiar	[12]
5	2362C>T	R788X		[12]
5	2362delG	Frameshift		[6], [12]
5	2379delA	Frameshift		[12]
5	2386-2389delGAAA	Frameshift	Familiar [7]	[7], [11], 3x [12]
5	2399delT	Frameshift		[12]
5	2407delC	Frameshift	<i>De novo</i>	[11], [12]
5	2432delG	Frameshift		[7]
5	2437-8insTTGA	Frameshift		[12]
5	2493delG	Frameshift		2x [12]
5	2516-7delTGins13	Frameshift	<i>De novo</i> [11]	[11], [12]
5	2576delAT	Frameshift		[2]
5	2760delTAAG	Frameshift		[6], [12]

**Tabla 18 continuación.**

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
5	2807-8insA	Y936fsX936		[2]
5	2808C>A	Y936X		[12]
5	2809delCGinsT	R937X		[9]
5	2943-4insT	Frameshift	<i>De novo</i> [11]	[11], [12]
5	3062T>A	C1021X		[6]
5	3062delG	Frameshift		[11], [12]
5	3063T>A	C1021X		[12]
5	3067C>T	R1023X		[12]
5	3071C>G	S1024X		[12]
5	3090C>T	R1030X		[6]
5	3091C>T	R1031X	<i>De novo</i> [5]	[5], 2x [12]
5	3141delC	Frameshift		[5], [12]
5	3160delA	Frameshift		[5], [12]
5	3172C>T	Q1058X		[10]
5	3174-6delGCTinsAG	Frameshift		[12]
5	3091C>T	R1031X		2x [12]
5	3196delC	Frameshift		[6]
5	3214C>T	R1072X		[6], 2x [12]
5	3273delT	Frameshift		[4]
5	3316-7insT	Frameshift		[12]
5	3355delC	Frameshift		[6], [12]
5	3383delCT	Frameshift		[2]
5	3464-5delITG	Frameshift		[12]
5	3531delT	Frameshift		[9]
5	3536delA	Frameshift	<i>De novo</i> [5]	[1], [5], [12]
5	3541-44delGAAA	Frameshift		[5], [12]
5	3549-50insT	Frameshift		[2], [9]
5	3680T>G	L1227X		[9]
5	3705delTTGT	Frameshift		[6], [12]
Intrón 5	IVS5+33A>T	Exon 5 skipping		[9]
6	3806C>G	S1269X		2x [12]
6	3834-7delCAAG	Frameshift		[12]
6	3841delC	Frameshift		[6], [12]
6	3844delTTGGGinsGATC	Frameshift		[6]
6	3882delT	Frameshift	Familiar	[12]
6	3886A>T	K1296X	<i>De novo</i>	[4]
7	3955delG	Frameshift		[12]
7	3958C>T	R1320X		[8], 2x [12]
7	3964C>T	R1322X	<i>De novo</i> [4]	[4], 2x [12]
7	4108C>T	Q1370		[9], [12]
7	4138-42delAAGTCinsG	Frameshift		[12]

**Tabla 18 continuación.**

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
7	4139delAAGTCinsCTG	Frameshift		[6]
7	4160insC	Frameshift	<i>De novo</i> [5]	[5], [12]
Intrón 8	IVS8-2A>G	–		[12]
Intrón 8	IVS8-1G>C	Exon 9 skipping	<i>De novo</i> [5]	[5], [12]
9	4370-71delTT	Frameshift		[12]
Intrón 9	IVS9+3-6delGAGT	–		2x [12]
10	4390delATATinsGCACTACC	Frameshift		[6], [12]
10	4411C>T	R1471X	<i>De novo</i>	[2]
10	4411C>G	R1471G		[7]
10	4417C>T	R1473X	<i>De novo</i> [2], familiar [12]	[2], 3x [12]
10	4497G>C	Splice site exon skip		[11]
11	4576delC	Frameshift		[12]
11	4548-4549delGGinsC	Frameshift		[9]
11	4588-91del	Frameshift		[10]
11	4623-4insTC	Frameshift		[12]
12	4670-1insT	Frameshift		[12]
12	4707-16delGTGCCTTGGA	Frameshift		[12]
12	4709G>T	C1570F		[12]
12	4731-2delAA	Frameshift		[12]
13	4769insT	Frameshift		[4]
13	4773delTA	Frameshift	<i>De novo</i> [11]	[11], [12]
13	4779-81delTTTTinsATTC	Frameshift	<i>Familiar</i>	[12]
13	4806delTGTTAAA	Frameshift	<i>De novo</i> [5]	[5], [12]
13	4831T>A	C1611S		[12]
13	4847A>T	H1616L	<i>De novo</i>	[2]
13	4855T>C	C1619R	<i>Familiar</i>	[12]
13	4883delT	Frameshift		[2]
13	4885C>T	Q1629X		[5], [12]
13	4895delG	Frameshift		[5], [12]
13	4910T>C	L1637P	<i>De novo</i>	[2]
13	4912delCACA	Frameshift		[9]
13	4919G>A	C1640Y		[12]
Intrón 13	IVS13+1G>A	Exon 13 skipping	<i>Familiar</i>	[14]
14	4976insG	Frameshift		[12]
14	4987C>T	R1663C	<i>Familiar</i>	[12]
14	5008-9insG	Frameshift		[2]
14	5022C>G	C1674W		[2]
14	5059 T >A	I1687N		[6]
14	5060T>A	I1687N		[12]
14	5127G>A	W1709X		[10]
14	5129G>A	C1710Y	<i>De novo</i>	[9]

**Tabla 18 continuación.**

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
15	5178T>C	A1726P		[7]
15	5179G>C	P1725L		[7]
15	5194G>T	E1732X		[5], [12]
15	5197T>C	C1733R		[12]
15	5198G>C	C1733S		[12]
15	5229G>A	W1743		[4]
15	5279-82delTCTG	Frameshift		3x [12]
15	5296C>T	R1766X		[12]
Intrón15	IVS15-1G>C	–		[2]
Intrón15	IVS15-1G>T	Skip 16		[5], [12]
16	5332C>T	R1778X		[2]
16	5375G>T	G1792V	Familiar	[2]
16	5341delC	Frameshift	<i>De novo</i>	[7]
16	5349delC	Frameshift		[12]
16	5386G>T	V1796F	<i>De novo</i> [5]	[5], [12]
16	5398insT	Frameshift	<i>De novo</i> [5]	[5], [12]
16	5431C>T	R1811X		[6], 5x [12]
16	5435T>A	V1812D		[9]
16	5477-8insA	Frameshift		[12]
16	5509G>C	Exon 16 skipping	<i>De novo</i>	[11]
Intrón16	IVS16-2delA	–		[2]
17	5566C>T	Q1856X		[12]
17	5611A>T	K1871X		[5], [12]
17	5615delAT	Frameshift		[12]
18	5684G>A	C1895Y	<i>De novo</i>	[7]
18	5684G>T	C1895F		[12]
18	5685C>G	C1895W		[12]
18	5689T>G	C1897G		[12]
18	5740C>T	R1914C	<i>De novo</i> [9]	[9], 2x [12]
18	5744-5insT	Frameshift	<i>De novo</i>	[2]
18	5766-67insCC	Frameshift		[12]
18	5773T>C	C1925R	<i>De novo</i> [2]	[2], [12]
18	5787delG	Frameshift		[10]
18	5826delA	Frameshift		[12]
18	5861G>A	W1954X	<i>De novo</i>	[2]
18	5854C>T	R1952W		2x [12]
18	5864G>A	G1955R		[6], [12]
18	5885T>C	I1962T	<i>De novo</i>	[9]
Intrón18	IVS18-2A>G	–		[12]
19	5907-8insT	Frameshift		[12]
19	5950C>G	R1984G	<i>De novo</i>	[9]



**Tabla 18 continuación.**

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
19	5950C>T	R1984X	<i>De novo</i> [11]	[11], 3x [12]
19	5951G>A	R1984Q		[6], 4x [12]
19	5965C>T	Q1989X		[12]
19	5989A>G	Y1996C		[6]
19	5990A>C	Y1997S		[12]
19	5990A>G	Y1997C		2x [12]
19	5998insT	Frameshift	<i>De novo</i>	[1]
19	6001delC	Frameshift		[2]
Intrón19	IVS19-2A>G	Exon 20 skipping	<i>De novo</i>	[5], [12]
Intrón19	IVS19+1delGTAA	Exon 19 skipping		[11], [12]
20	6013C>T	R2005X	<i>De novo</i> [5]	[5], 2x [12]
20	6014G>A	R2005Q	<i>De novo</i> [2]	[2], [12]
20	6024delT	Frameshift		[12]
20	6048C>T	R2017W		[6]
20	6049C>T	R2017W		2x [12]
20	6050G>A	R2017Q	<i>De novo</i> [2]	[2], [12]
20	6079T>C	C2027R		[12]
20	6081-2delTG	Frameshift		[12]
20	6084delAA	Frameshift	<i>De novo</i>	[10]
20	6088C>T	Q2030X		[12]
20	6122G>A	G2041D		[12]
Intrón20	6151+1G>A	Exon 20 skipping	<i>De novo</i>	[1]
21	6205-6delGT	Frameshift		[12]
21	6214T>C	C2072R	<i>De novo</i>	[10]
21	6230G>A	C2077Y		[12]
22	6291delG	Frameshift	<i>Familiar</i>	[12]
22	6291-4delGAAA	Frameshift		[12]
22	6302delA	Frameshift	<i>De novo</i>	[2]
22	6309-10insA	Frameshift		[12]
22	6311-2delAG	Frameshift		[12]
22	6364-6delTTT	F2122del-1		[12]
22	6370T>C	C2124R	<i>Familiar</i>	[12]
22	6424T>A	Y2142N		[12]
22	6427C>T	H2143Y		[12]
22	6429C>G	H2143E	<i>De novo</i>	[2]
22	6431-2ins17	Frameshift	<i>De novo</i>	[2]
22	6436T>C	C2146R		[12]
22	6450-1insC	Frameshift	<i>De novo</i>	[2]
22	6454C>T	R2152X		[12]
22	6455G>A	R2152Q	<i>De novo</i>	[10]
23	6559C?T	R2187X		[12]

**Tabla 18 continuación.**

Exón	Mutación	Proteína	Herencia	Referencia
23	6466-91del	K2156fs		[10]
23	6476G>A	C2159Y		[12]
23	6485A>G	H2162R		[12]
23	6490T>C	C2164R		[12]
23	6491G>A	C2164Y		[12]
23	6499T>C	C2167R		[7]
23	6521delTCT	F2174del-1		[12]
23	6532delTGCCCCAGC	2178-2180del-3	Familiar	[5], [12]
23	6533G>A	C2178Y		[12]
23	6544T>A	F2182I		[12]
23	6548G>C	C2183S	<i>De novo</i>	[2]
23	6562-7delGAAGGGinsA	Frameshift		[12]
23	6596delG	Frameshift		2x [12]
23	6604T>C	C2202R	<i>De novo</i>	[9]
23	6605G>A	C2202T	Familiar	[13]
23	6614A>G	H2205R	Familiar	[12]
23	6680C>T	P2227L		[7]
23	7514delA	Frameshift	<i>De novo</i> [11]	[11], [12]

2x, Nx: número de casos identificados

Referencias:[1] Kurotaki *et al.*, 2002; [2] Douglas *et al.*, 2003; [3] Hoglund *et al.*, 2003; [4] Kamimura *et al.*, 2003; [5] Türkmen *et al.*, 2003; [6] Rio *et al.*, 2003; [7] Kurotaki *et al.*, 2003; [8] Nagai *et al.*, 2003; [9] de Boer *et al.*, 2004; [10] Melchior *et al.*, 2005; [11] Cecconi *et al.*, 2005; [12] Tatton-Brown *et al.*, 2005; [13] Van Haelst *et al.*, 2005; [16] Tei *et al.*, 2006

Hemos encontrado en nuestra cohorte de pacientes varios polimorfismos ya descritos anteriormente y presentes en las bases de datos de SNPs. Además hemos identificado 6 nuevos probables polimorfismos c.209 T>G, c.1980 C>T, c.2586 C>T, c.2667 T>C, c.6813 G>T y c.7850 T>G. En todos los casos la variante genética ha sido heredada de un progenitor asintomático.

El polimorfismo c.1980 T>C no produce cambio aminoacídico y no afecta a ninguno de los dominios funcionales del gen, se ha detectado en un 0,9% en la población estudiada. Las variantes c.2586 C>T, c.2667 T>C, c.6813 G>T, c.7850 T>G y c.209 T>G no han sido encontradas en la población normal estudiada. Los cambios c.2586 C>T, c.2667 T>C y 6813 G>T no producen cambio aminoacídico. El cambio c.209 T>G no ha sido detectado en los 100 individuos (población normal) estudiados, creemos que se trata también de un polimorfismo ya que aunque produce un cambio aminoacídico (I70S) no se

localiza en un dominio funcional, ni afecta al “splicing”, además en el paciente en el que se detectó esta variante heredada se ha encontrado en otro exón una mutación patogénica producida *de novo*, lo que hace que sea más improbable que el anterior cambio sea también deletéreo sobre la proteína. El cambio c.2586 C>T no ha sido encontrado en los 75 individuos (población normal) analizados, creemos también que se trata de un polimorfismo, ya que, el cambio no produce variación aminoacídica, no se localiza en un dominio funcional, no afecta al “splicing” y además en los estudios de expresión realizados mediante RT-PCR no se han observado cambios en la expresión relativa del alelo portador del polimorfismo. El cambio c.2667 T>C no se ha identificado en los más de 70 controles analizados, esta variante no produce cambio aminoacídico, no afecta al “splicing” ni a los dominios funcionales de la proteína, además el paciente portador de esta variante posee también una mutación patogénica producida *de novo* que da lugar a una proteína truncada, por todo ello creemos que se trata claramente de un polimorfismo. La variante 6813 G>T no ha podido ser localizada en los más de 100 individuos control estudiados, pensamos que este cambio es un polimorfismo ya que no produce variación aminoacídica, no altera el “splicing”, ni afecta a alguno de los dominios funcionales de la proteína. El cambio 7850 T>G no ha sido detectado en los 100 individuos analizados, creemos que se trata también de un polimorfismo ya que aunque produce un cambio aminoacídico (L2617W) no se localiza en un dominio funcional, ni afecta al “splicing”, además el paciente es portador en otro exón de una mutación patogénica producida *de novo*, por lo que nuevamente creemos que es bastante improbable que esta variante heredada sea también de carácter patogénico.

Además de la sensibilidad de la técnica que se use, la tasa de detección de mutaciones patogénicas depende en gran medida de una correcta y estricta definición clínica de los pacientes, como ilustran estudios previos en los que se observa que la tasa de detección de mutaciones en *NSD1* puede ser de hasta el 90% de los pacientes que cumplen rigurosamente todos los criterios clínicos de diagnóstico de SS [Türkmen *et al.*, 2003]. En nuestro estudio, se han incluido pacientes tanto con un diagnóstico claro de SS como pacientes con sólo algunos indicios compatibles con este síndrome, incluyéndose así casos

que *a priori* no cumplían estrictamente todos los criterios clínicos mayores, con el fin de incluir el espectro fenotípico completo de posibles mutaciones de *NSD1*. Es posible que algunos de los pacientes estudiados sufran aberraciones en *NSD1* que no hayamos localizado por falta de sensibilidad de las técnicas empleadas. El hecho de haber incluido en el estudio pacientes que no cumplen todos los criterios clínicos de diagnóstico ha repercutido sin duda en una menor tasa de detección de mutaciones, que en nuestra serie es de un 31% (16/51), cifra que contrasta con tasas mucho más altas cosechadas en otros estudios con criterios clínicos de inclusión mucho más inflexibles. Por otra parte, con nuestro protocolo de análisis mutacional hemos conseguido detectar hasta 7 polimorfismos conocidos y 6 no descritos hasta la fecha, lo que da prueba de una buena sensibilidad de detección de las técnicas empleadas (SSCP y/o dHPLC). Estos resultados quedan también validados al ser coincidentes con los estudios mutacionales realizados en 12 pacientes por RT-PCR a partir de ARN leucocitario y posterior secuenciación en varios fragmentos que incluyen la casi totalidad de la parte codificante del ADNc de *NSD1*.

Adicionalmente, con el mismo abordaje de RT-PCR y posterior secuenciación hemos estudiado los niveles de expresión de varios polimorfismos y algunas de las mutaciones detectadas. En los casos con polimorfismos (al menos 5 diferentes) en heterocigosis se cuantificó la expresión relativa de los dos alelos del gen, siendo en estos casos la expresión de ambos alelos en ARNm idéntica. En estos casos, se concluye además que si existe mutación no detectada en *NSD1*, ésta no conllevaría una reducción en la expresión del alelo mutado. Por otro lado en el paciente con delección de los exones 1 y 2 del gen se ha observado expresión monoalélica en los dos polimorfismos estudiados presentes en ADN genómico. También a través de estos estudios detectamos en dos pacientes, en los que no logramos identificar ninguna mutación puntual ni reordenamiento intragénico en *NSD1*, expresión monoalélica en el único polimorfismo detectado en ADN genómico. Este resultado puede ser debido a la presencia de una mutación no detectada en la secuencia estudiada de *NSD1*, o deberse a una alteración que afecte al promotor del gen o a alguna región reguladora distante no estudiada y que conlleva una reducción en la expresión del alelo mutado como ocurre en el

anterior paciente con delección parcial del gen. Además hemos constatado en los pacientes con las mutaciones c. 2023-2024 del 2nt (M675fsX681) y c. 1894 C>T (R632X) respectivamente, la presencia del alelo mutado en ARNm, lo que es indicativo de que estas dos mutaciones no afectan a la expresión.

Hemos encontrado tres microdeleciones que incluyen todo el gen *NSD1* (3/51), lo que supone el 5,9% de nuestra serie, tasa similar a la hallada en el resto de poblaciones europeas y que contrasta con la frecuencia mucho mayor de deleciones en pacientes japoneses y que supone alrededor del 50% de los casos. En dos de los pacientes el cromosoma que porta la delección es de origen paterno y en el otro caso es probablemente materno. En estudios previos en pacientes con microdelección se ha documentado un mayor número de casos en que la delección es de origen paterno independientemente de su origen étnico [Miyake *et al.*, 2003; Tatton-Brown *et al.*, 2005]. Aunque se hace necesario el estudio en un mayor número de casos, se desconoce la razón de esta preferencia pero se hipotetiza la existencia de una mayor susceptibilidad a los reordenamientos cromosómicos anómalos en el cromosoma derivado paterno que en el materno.

El genoma humano es particularmente rico en DS (~ 5%), secuencias repetidas en bajo número de copias de entre 10 y 500 kb con un alto grado de homología (>95%), que se han originado recientemente en la evolución de los primates. Se conocen muy poco los mecanismos implicados en la aparición de estos segmentos parálogos, su difusión en la población y su fijación en el estado homocigoto. Parece que su distribución no es aleatoria y se sitúan preferentemente en regiones subteloméricas y pericentroméricas. Se ha observado una coincidencia marcada entre la presencia de DS en el genoma humano en regiones concretas de pérdida de sintenia con el genoma de ratón, apareciendo inversiones relativas de los intervalos genómicos entre DS [Valero *et al.*, 2000]. Eso parece indicar que la generación de las DS coincide con reordenamientos cromosómicos evolutivos. La mayoría de las DS que han sido estudiadas no están presentes en otros mamíferos y sí en algunos primates hominoides por lo que se ha estimado que surgieron entre hace 5 y 12 millones de años y parece que presentan una evolución rápida y divergente en las

distintas especies [Antonell *et al.*, 2005; Samonte y Eichler, 2002]. También se ha observado la presencia de secuencias *Alu* en muchas de las intersecciones entre duplicones, lo que indicaría el posible papel facilitador de la retrotransposición y/o recombinación desigual mediada por *Alu* en la aparición de las DS y explicaría su dinamismo en primates.

La estructura genómica de 5q35 incluye DS complejas flanqueando la región que contiene el gen *NSD1*. Las DS de 5q35 han aparecido durante la evolución reciente de los primates, no estando presentes ni en ratón ni en otros mamíferos. Se observa una transición en el número de bloques de DS entre especies de primates en 5q35, en macaco parece tener un solo bloque en el rango del cromosoma 5, en orangután existen una o dos copias, en gorila parece haber solo dos copias y en chimpancé se observa el mismo número de bloques (3) que en humanos.

La estructura y el dinamismo evolutivo de la región (variabilidad de las DS del cromosoma 5 entre especies de primates), sugieren la posibilidad de que existan variantes polimórficas entre poblaciones humanas.

Según los estudios publicados la mayoría de las microdeleciones son idénticas teniendo un tamaño de 1,9 Mb, (37/47 en los estudios de Visser *et al.* y 18/33 en los estudios de Tatton-Brown *et al.*), estando además los puntos de rotura flanqueados por estas DS, lo que evidencia que en estos casos las deleciones no se producen al azar sino mediadas por estos bloques de alta homología por el mecanismo de recombinación homóloga no alélica [Kurotaki *et al.*, 2003; Visser *et al.*, 2005]. En los 3 pacientes con microdeleciones que se han identificado en nuestro estudio hemos detectado que existe al menos una pérdida de herencia del alelo del primer bloque telomérico de las DS en el cromosoma portador de la deleción. En dos de las 3 microdeleciones conseguimos amplificar y secuenciar el fragmento de unión resultante ubicándose el punto de rotura en el punto caliente de recombinación, conformado por un cluster de 3 kb identificado en estudios previos [Kurotaki *et al.*, 2005; Visser *et al.*, 2005]. En el otro paciente no hemos podido determinar

con exactitud el tamaño de la deleción, en todo caso y a la vista de los resultados el tamaño de la deleción parece diferente a los otros dos. Aunque la mayoría de las microdeleciones tienen el mismo tamaño, existe una considerable proporción de microdeleciones no-recurrentes de tamaño variable [Kurotaki *et al.*, 2003; Tatton-Brown *et al.*, 2005], que no parecen causadas por el mecanismo de recombinación homóloga no alélica, a falta de elucidarse el mecanismo mutacional subyacente a estos casos.

Las grandes diferencias en la frecuencia de microdeleciones entre la población japonesa (50%) y europea (10%), podrían sustentarse en la existencia de variantes polimórficas entre poblaciones que pueden condicionar diferentes susceptibilidades a las mutaciones genómicas. Se ha observado una inversión polimórfica en población japonesa entre el bloque centromérico (DSSc) y el primer bloque telomérico (DSSt1) [Visser *et al.*, 2005] presente en un alto grado de heterocigosidad, y que parece ocurrir en todos los progenitores de los pacientes con deleción estudiados, aunque estos resultados son cuestionables. Esta inversión genómica entre DS predispondría a un apareamiento meiótico anómalo que incrementaría a su vez la susceptibilidad a la recombinación homóloga desigual entre estos bloques de DS [Emanuel *et al.*, 2001]. Este factor de susceptibilidad provocado por una inversión se da también en otros casos, como en el síndrome de Williams, para el cual 28% de los padres transmisores del cromosoma que porta la deleción tienen una inversión en heterocigosis entre bloques de DS que predispone a la recombinación homóloga no alélica [Bayes *et al.*, 2003]. En el síndrome de Angelman se observa también una inversión en heterocigosis entre 15q11-q13 en más de un 60% de las madres de pacientes con síndrome de Angelman tipo II con deleción de origen materno, en contraposición al 9% en población normal [Gimelli *et al.*, 2003]. En los progenitores de nuestros pacientes con microdeleción no hemos podido obtener resultados fiables, debido a la dificultad de la técnica (FISH con tres colores con sondas no comerciales muy contiguas) y el estado de las muestras, respecto a la existencia de una posible inversión. Por ello este es un punto de especial interés a analizar en estudios futuros.

No hemos localizado ningún tipo de mutación en *NSD1* en los 2 pacientes diagnosticados clínicamente de síndrome de Weaver. En estudios previos se habían encontrado tres casos atípicos de síndrome de Weaver con mutaciones en *NSD1* [Douglas *et al.*, 2003], pero en estudios recientes con una mayor caracterización clínica de estos tres pacientes, dos de estos han sido re-clasificados como SS típico y un tercero como posible SS. Además, no se ha encontrado ninguna mutación en series más largas de pacientes con síndrome de Weaver [Taton-Brown *et al.*, 2005]. Aunque existe un considerable solapamiento clínico entre estas dos afecciones sobre todo a edades tempranas, lo que hizo sospechar en tiempos pasados que ambas enfermedades podrían ser variantes alélicas, a la vista de los estudios realizados, el síndrome de Weaver típico no es debido a anomalías en *NSD1*. Todo ello parece indicar que las anomalías en el gen *NSD1* son específicas del síndrome de Sotos y no ocurren en otros síndromes de sobrecrecimiento.



## 5.2 Características clínicas en pacientes con alteraciones en NSD1

Tres características clínicas han sido designadas como los criterios mayores para el diagnóstico clínico de SS, una apariencia facial característica, el sobrecrecimiento pre- y/o postnatal y el retraso mental [Tatton-Brown *et al.*, 2005]. Estos 3 hallazgos clínicos están presentes en más del 90% de los individuos portadores de mutaciones patogénicas.

Se ha propuesto la apariencia facial entre la edad de 1 y 6 años como el criterio clínico más distintivo, consistente principalmente en: frente alta y prominente, poca densidad de pelo especialmente en la región frontoparietal, mala oclusión dental, inclinación antimongoloide de las fisuras palpebrales y mentón ancho y prominente. En el periodo adulto la apariencia continúa siendo distintiva pero la cara se hace más alargada y el mentón más prominente.

Casi todos individuos con SS presenta algún grado de dificultad de aprendizaje. La mayoría presentan un retraso mental ligero a moderado pero el grado de retraso cognitivo es bastante variable.

La talla y circunferencia cefálica en el nacimiento, es con frecuencia, más de dos veces superior a la desviación estándar de la media. Antes de la adolescencia, los individuos afectados suelen presentar parámetros de crecimiento superiores al percentil 97. Aunque existe una tendencia a la normalización post-pubertad de la altura, por lo que este parámetro puede no estar muy desviado de la media durante el periodo adulto.

De nuestros pacientes, 15 (de un total de 32 de los que disponemos de datos clínicos suficientes) cumplen estrictamente los anteriores tres criterios mayores, de ellos 9 presentan alteraciones en *NSD1* (60%). Solo uno de los pacientes portadores de una mutación identificada no cumple los tres criterios mayores.

El fenotipo de los individuos *NSD1*-positivos en nuestra serie es variable, pero hemos encontrado varias características clínicas presentes en todos los pacientes afectados, apariencia facial característica, retraso en el desarrollo psicomotor y anomalías intracraneales, que están presentes en todos los pacientes mutados (a excepción de un solo paciente que presenta un “gestalt” categorizado como “posible SS”).

El sobrecrecimiento prenatal (perímetro cefálico y/o talla prenatal superior al percentil 90) ha sido constatado en más del 80% de los pacientes con anomalías en este gen. En nuestro estudio dos de los pacientes *NSD1* positivos (15%) presentan valores de crecimiento postnatal dentro de los rangos normales, indicando que el sobrecrecimiento postnatal siendo uno de los hallazgos principales, no es una característica obligatoria para el diagnóstico de SS. Resultados similares se han observado en estudios a mayor escala donde el 10% de 266 individuos con aberraciones en *NSD1* presentaban valores dentro de los rangos normales de altura y perímetro cefálico postnatal [Tatton-Brown *et al.*, 2005]. Es probable que estos resultados estén ligados a la influencia de la talla y perímetro cefálico familiar, aunque esto no ha sido confirmado.

La hipotonía neonatal y la hiperlaxitud/pies planos son también características clínicas bastante comunes (>80%) en los individuos de nuestro estudio portadores de una mutación, así como la escoliosis (de diferente severidad), la ictericia neonatal y la edad ósea adelantada, presentes en el 50%, resultados que concuerdan bien con los datos obtenidos en otros estudios en los que siempre se citan estas características clínicas de relevancia, presentes en un porcentaje importante de pacientes *NSD1* positivos.

Hemos realizado estudios estadísticos en nuestra cohorte de pacientes con datos clínicos suficientes, con el fin de conocer que hallazgos clínicos son más predictivos de alteración en *NSD1*. En nuestra serie los datos clínicos que se encuentran asociados significativamente a presencia de mutación en *NSD1* son la apariencia facial, las anomalías intracraneales, el sobrecrecimiento en

estatura pre y postnatal, la hipotonía neonatal, la ictericia neonatal y la escoliosis.

A partir de los datos de los estudios publicados no parece existir ninguna correlación entre el tipo y posición de la mutación puntual en *NSD1* y el fenotipo clínico. Existe un amplio espectro de variación en la clínica de estos pacientes independiente de su genotipo. Buena prueba de este hecho es que individuos con mutaciones idénticas, a menudo presentan características clínicas diferentes.

En cambio parece que los individuos con microdelección tienden a presentar un mayor retraso en el aprendizaje y un sobrecrecimiento menos pronunciado [Nagai *et al.*, 2003; Tatton-Brown *et al.*, 2005]. Dos de nuestros tres pacientes con microdelección presentan un sobrecrecimiento postnatal tanto a nivel de altura como de perímetro cefálico bastante acusado, superior al percentil 97. En el caso restante pese a que presenta sobrecrecimiento prenatal a nivel de perímetro cefálico, presenta niveles de crecimiento postnatal normales. Es este caso particular además, el único paciente *NSD1*-positivo cuya apariencia cráneo-facial ha sido clasificada por los genetistas como “posible SS”. De los otros dos pacientes uno presenta un retraso severo en la adquisición del lenguaje, aunque la madre sufrió toxoplasmosis durante el embarazo lo que puede haber influido en la afectación. El otro paciente portador de una microdelección presenta una afectación más severa que los pacientes con mutación puntual, lo que en parte avala las hipótesis formuladas en estudios previos, aunque resulta necesario un estudio en un mayor número de casos de microdelección para poder corroborar estadísticamente estas conclusiones. Según los datos publicados de la cohorte más extensa estudiada [Tatton-Brown *et al.*, 2005], las características clínicas de los pacientes con deleciones en 5q35 son atribuibles principalmente a la haploinsuficiencia de *NSD1* y no a la deleción de otros genes contiguos, de escaso efecto a nivel fenotípico.

Cabe reseñar que aunque con relativa frecuencia los síndromes de sobrecrecimiento se asocian a la presencia de neoplasias, hasta la fecha, en

nuestra serie de pacientes no hay constancia del desarrollo de tumores malignos.

Existen además otros muchos hallazgos clínicos presentes con una frecuencia mucho más variable en nuestra serie de pacientes con mutaciones patogénicas, dando muestras de una gran variabilidad fenotípica.

### **5.3 Estudios de regiones y genes candidatos a sobrecrecimiento**

La existencia de numerosos casos en nuestra serie, con datos clínicos suficientes, que no se ajustan estrictamente dentro del espectro de hallazgos clínicos del SS o al menos no al nivel de certeza clínica según nuestra clasificación (>50% en nuestra serie) y como se ha expuesto anteriormente dada la existencia de otros síndromes y alteraciones con características análogas al SS que pueden dificultar el diagnóstico diferencial, nos llevo a tratar de identificar la posible presencia de otras alteraciones en genes y regiones cromosómicas no analizadas, también candidatas a influir o alterar el crecimiento.

Para ello diseñamos y desarrollamos dos experimentos, mediante la técnica de MLPA, para estudiar la presencia de alteraciones de número de copia en 19 genes y regiones génicas seleccionadas por nosotros por su papel relacionado con el crecimiento o síndromes en los que existe una alteración de este.

El principal resultado de estos estudios, además de la confirmación de los hallazgos previamente conocidos, fueron la localización de una delección parcial en *NSD1*, y la identificación de una microdelección en el cromosoma X que afectaba al gen *GPC3* en un paciente con cariotipo notificado como normal.

Estudios posteriores realizados en otros centros con ambos kits de MLPA de sondas de sobrecrecimiento, en series diferentes de pacientes, han permitido hasta la fecha localizar numerosas alteraciones previamente no identificadas.

La robustez de la técnica empleada, así como su reproducibilidad y fiabilidad, unido a su bajo coste, hacen de ella según nuestro criterio una buena estrategia como primer método de abordaje en el estudio de pacientes con

fenotipos dentro del espectro de las alteraciones de desarrollo y crecimiento. Ya que nos permite de una manera fácil y rápida estudiar simultáneamente los principales genes y regiones cromosómicas conocidas por su participación en el crecimiento. Además, el hecho de haber desarrollado dos juegos diferentes para estudiar los mismos genes y regiones, nos permite validar y ratificar los resultados de una manera muy fiable. Por ello recomendamos su uso antes de iniciar otra clase de estudios, como rastreo de mutaciones puntuales, que son bastante más costosos y que precisan de un tiempo de estudio mucho más prolongado.

La existencia también de varios casos en nuestra serie (5/15) y en otros estudios con criterios clínicos rotundos y sin alteraciones en NSD1 sugieren que existe heterogeneidad genética y pueden apuntar a la presencia de al menos otro locus.

Por todo ello con el fin de identificar nuevos loci responsables del fenotipo en los pacientes categorizados como Sotos “Seguros” realizamos estudios de array CGH global. Estos estudios nos llevaron a la identificación de numerosas variaciones de número de copia (CNV) descritas, además de una delección parcial no detectada en estudios previos y otra alteraciones no descritas de posible significado fenotípico.

Dentro de las alteraciones no descritas anteriormente hemos encontrado una ganancia de número de copia en el cromosoma 19 que incluye varios genes de la misma familia, relacionados con la respuesta inmune. Pensamos que esta ganancia produce escaso efecto fenotípico dado que el clon en el que se ha observado la ganancia no ha sido todavía correctamente asignado en el “assembly” actual, por lo que podría estar incluido en alguna región de CNVs, abundan además entre las CNVs este tipo de genes que participan en la respuesta inmune. Por otro lado dada la función de estos genes no invitan a pensar que tengan una participación en el crecimiento o desarrollo. También hemos encontrado en un paciente una pérdida de número de copia afectando al gen *SYT4* presente en astrocitos y al parecer con un papel relevante en la memoria basada en el hipocampo, por lo que tal vez esta alteración pueda ser

responsable del fenotipo neurológico de este paciente pero en todo caso no parece responsable del hipercrecimiento manifiesto en él. Por último hemos encontrado una ganancia de número de copia en la región 3q21.1 en uno de los pacientes, mediante estudio de MLPA con sondas diseñadas específicamente para analizar esta región hemos podido delimitar con mayor definición la zona alterada, hallando que todo el gen *PTPLB* se halla duplicado y al menos la mitad 3' del gen *ADCY5*. El gen *ADCY5* codifica un enzima que pertenece a la familia de las adenilato-ciclasas responsables de la síntesis de AMPc. *ADCY5* es un componente importante de los receptores mu-delta-opiodes, jugando un papel importante en la ruta del AMPc como mediador de la acción opioide. El gen *PTPLB* codifica para una proteína tipo tirosin-fosfatasa B, perteneciente a la familia PTPL, familia muy conservada a la que también pertenecen la proteína PTPLA y la Pepino/Pasticcino. No se conoce demasiado sobre la proteína PTPLB pero se sabe que forma parte de la membrana del retículo endoplásmico y se cree que puede jugar un papel regulador. La proteína Pepino/Pasticcino de la misma familia se ha postulado que puede jugar un papel regulador negativo en la proliferación y división celular en plantas. Por lo que esta alteración podría tener un efecto fenotípico en el crecimiento y desarrollo de este paciente, sin embargo, se ha comprobado que esta alteración no se ha producido *de novo*, sino que es heredada de la madre, que es clínicamente asintomática, siendo además la abuela materna portadora de esta duplicación. Por otro lado no hemos podido encontrar esta alteración en más de 200 individuos controles analizados, tampoco se ha reportado esta alteración en los estudios de array CGH con sondas en esta zona realizados hasta la fecha, y que suponen más de 1.000 individuos estudiados, por ello si se trata de una CNV su prevalencia es realmente muy baja. Por lo que tal vez el fenotipo observado en el paciente portador de esta alteración y que no se observa ni en su madre, ni abuela, sea producto de otra mutación o por el efecto combinado de otra alteración no presente ni en la madre ni abuela.

Además hemos realizado estudios adicionales en tres pacientes con un fenotipo anómalo asociado a alteraciones en el cromosoma X.

En el paciente en el que detectamos una pérdida de número de copia en el gen *GPC3* (Xq), con citogenética notificada como normal, experimentos posteriores con microsatélites marcadores han permitido precisar con mayor definición el intervalo deleciónado, constándose una deleción de alrededor de ~25Mb que iría desde la banda citogenética q25 a qter, de origen paterno. Asimismo, los estudios de inactivación del cromosoma X en linfocitos de sangre periférica, mostraron una inactivación selectiva del cromosoma X portador de la deleción, por lo que el fenotipo mostrado por este paciente, es probablemente producido por la pérdida de dosis de genes que escapan a la inactivación (monosomía funcional para estos genes), o bien deberse a efectos producidos en otros tejidos, no estudiados, donde la inactivación se produzca al azar, o por una combinación de ambas causas. Las anomalías en *GPC3* son conocidas por provocar el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, una alteración de hipercrecimiento. Por lo que probablemente la deleción de este gen, puede jugar un papel importante en el fenotipo de este paciente.

En otros dos pacientes con un fenotipo anómalo asociado a duplicaciones parciales en el cromosoma X detectadas por citogenética, realizamos estudios con un Tiling-path BAC array del cromosoma X. Estos estudios nos han permitido precisar los límites del segmento duplicado, ~20,2 Mb desde Xp11.3 a Xp21.3 en una paciente con un fenotipo de sospecha de SS, y una duplicación de ~25,8 Mb desde Xq22.3 a Xq25 en una paciente con características propias del síndrome de Silver-Russell. En ambos casos hemos precisado que la duplicación se produjo *de novo* en el cromosoma X de herencia paterna, existiendo en los dos casos una inactivación al azar de los dos cromosomas X en linfocitos de sangre periférica.

Por lo tanto se espera que en ambos casos expresen una trisomía funcional de aquellos genes que escapan normalmente a la inactivación y disomía funcional en aquellos genes sujetos normalmente a la inactivación del cromosoma X en aquellas células donde el cromosoma X portador de la duplicación es activo (50%). Las características clínicas de estos pacientes pueden atribuirse a la sobreexpresión de varios genes del segmento duplicado.



Por el contrario, las células con el cromosoma X inactivo no sufrirán un gran efecto deletéreo ya que no tienen un desequilibrio funcional. Se han reportado varios casos de pacientes femeninas afectas de duplicaciones parciales en el cromosoma X y con inactivación al azar del cromosoma X, independientemente del tamaño y de la localización del intervalo duplicado. Lo que sugiere que los cromosomas X portadores de una duplicación parcial no sufren siempre inactivación selectiva, al menos en todos los tejidos, como se confirma con estos dos casos.

Hasta la fecha se han publicado 7 casos de pacientes femeninas con un fenotipo anómalo con duplicaciones parciales en el brazo corto del cromosoma X solapantes con la que se produce en nuestro caso [Deng, *et al.* (1990); Wyandt, *et al.* (1991); Tuck-Muller, *et al.* (1993); Zhang, *et al.* (1997); Matsuo, *et al.* (1999); Portnoi, *et al.* (2000); Kokalj, *et al.* (2002)]. Solo en dos de estos casos se ha precisado inactivación aleatoria del cromosoma X. Existen algunas características bastante comunes entre los pacientes portadores de una duplicación Xp, retraso en el desarrollo y habla, macrocefalia, frente prominente, bóveda palatina alta, pabellones auriculares asimétricos e hipotonía muscular generalizada.

Existen muchos genes relacionados con enfermedad en la región Xp duplicada, aunque en la mayoría de ellos no se conoce ninguna función relacionada con crecimiento. *CRSP2* codifica para una subunidad del complejo CRSP (Cofactor requerido para la activación de SP1) y también un componente de otros complejos multisubunidades que interactúan con el receptor hormona tiroidea, receptor que media en las actividades biológicas de la hormona tiroidea. Por lo que resulta lógico hipotetizar que *CRSP2* puede jugar un importante papel en el crecimiento y desarrollo, modulando la acción de la hormona tiroidea en los tejidos diana. Este gen es conocido por escapar a la inactivación del cromosoma X, por lo que la sobreexpresión debida a la triple dosis de este gen puede ser la que produzca algunas de las características observadas en este paciente. Otro gen candidato a estar implicado en el fenotipo es *GK*, que codifica para una glicerol kinasa que cataliza la fosforilación del glicerol por ATP. Se sabe que la alteración de este gen

provoca deficiencia de glicerol kinasa, asociado con retraso con retraso del crecimiento postnatal en ratones mutantes. Dado que los alelos hipomórficos *GK* producen baja estatura, el incremento de dosis debido a la duplicación puede estar relacionado con hipercrecimiento.

Hasta la fecha se han publicado 18 casos de pacientes femeninas con fenotipos anómalos asociados a duplicaciones Xq [Varella-Garcia, *et al.* (1981); Van Dyke, *et al.* (1983); Knuutila, *et al.* (1984); Magenis, *et al.* (1984); Crandall, *et al.* (1993); Aughton, *et al.* (1993); Kleczkowska, *et al.* (1993); Carrozzo, *et al.* (1997); García-Heras, *et al.* (1997); Zhang, *et al.* (1997); Monaghan, *et al.* (1998); Correa-Cerro, *et al.* (1999); Rajangam, *et al.* (1999); Tihy, *et al.* (1999); Armstrong, *et al.* (2003); Lachlan, *et al.* (2004); Tachdjian, *et al.* (2004); Stankiewicz, *et al.* (2005)]. Solo en nuestro caso y en el de otra paciente referida por Monaghan se ha encontrado inactivación aleatoria del cromosoma X.

La duplicación Xq se asocia en mujeres a estatura baja aislada o asociada a retraso mental y anomalías congénitas. El retraso en el crecimiento, como el referido en nuestra paciente, es una característica común.

En el intervalo duplicado existen también numerosos genes relacionados con enfermedad. Entre ellos, varios han sido asociados al retraso mental no específico, mientras que el retraso en el crecimiento puede también transmitirse como un carácter ligado a X. El gen *IRS4* codifica una tirosin kinasa que fosforila substratos celulares. Un homólogo de este gen en *Drosophila*, denominado *Chico*, juega un papel esencial en el control del tamaño celular y el crecimiento. Por ello, proponemos *IRS4* como un posible candidato para el retraso del crecimiento, una característica clínica comúnmente observada en nuestro paciente y otras mujeres con duplicaciones Xq.

Es interesante reseñar como la sobredosis génica en el cromosoma X puede causar efectos opuestos en el crecimiento, dependiendo de la región duplicada. La altura es un carácter donde la herencia juega un papel clave y

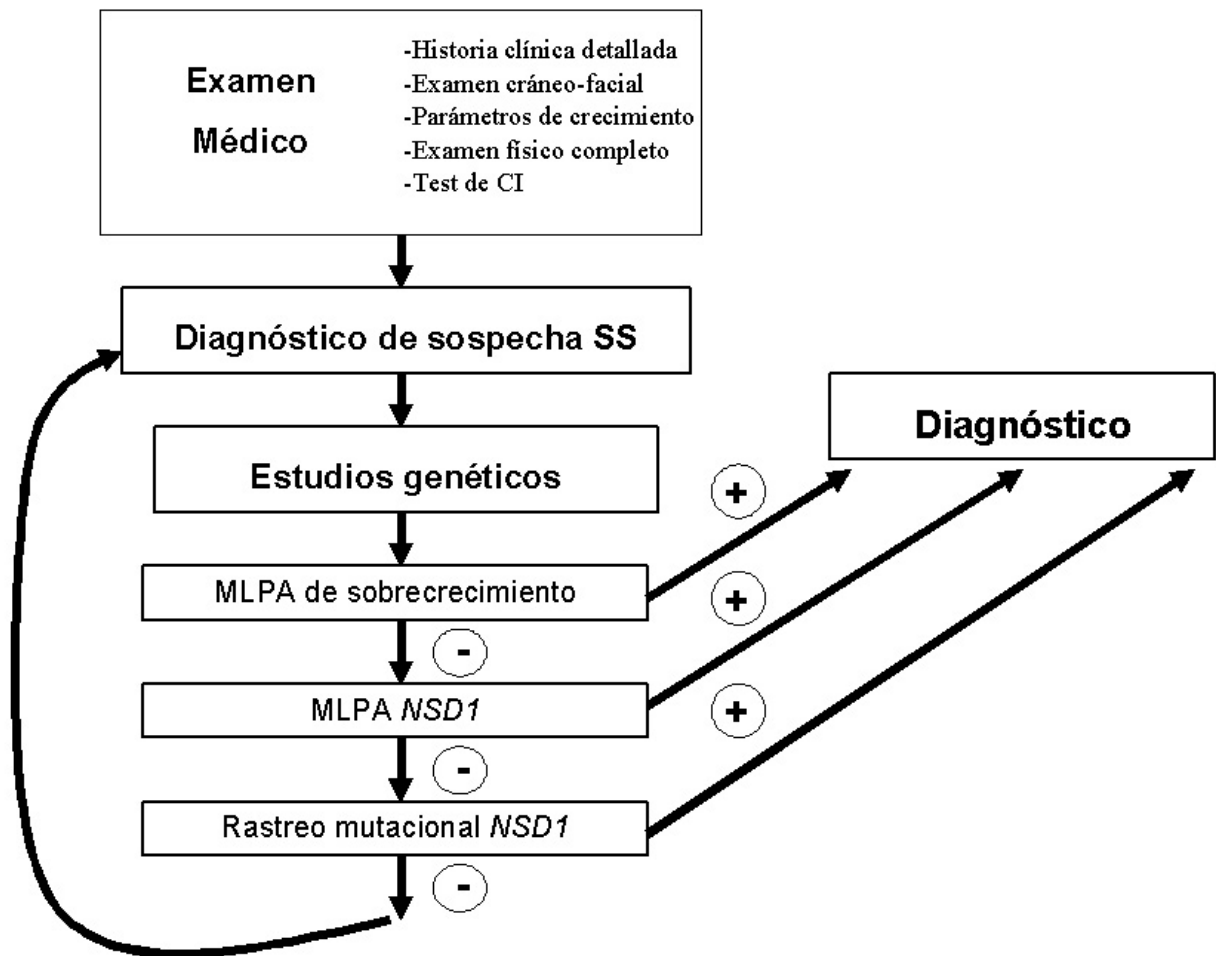
varias regiones del cromosoma X han mostrado su contribución en la regulación del crecimiento. Los estudios de asociación genómicos han permitido identificar un locus en Xq24 asociado a estatura baja en dos poblaciones diferentes [Liu *et al.*, 2006]. Otros estudios han mostrado también loci adicionales en el cromosoma X asociados a la altura, como Xp22 identificado con el marcador DXS1060, y Xq25 identificado con el marcador DXS1001. Ambos loci de Xq están incluidos en la duplicación asociada con retraso del crecimiento de nuestro paciente. Los pacientes con un cromosoma X extra (síndrome de Klinefelter y tripe-X) normalmente presentan un sobrecrecimiento moderado, que se atribuye a los genes que escapan a la inactivación, también se ha observado talla alta en pacientes con duplicación parcial del brazo corto del cromosoma X, lo que apoya la hipótesis de que la triple dosis de genes en cromosoma X es responsable del sobrecrecimiento, mientras que las duplicaciones en Xq suelen asociarse a talla baja.

## 5.4 Manejo de los pacientes

El diagnóstico clínico de pacientes con hipercrecimiento y sospecha de SS puede ser complicado, dada la gran variabilidad fenotípica de este síndrome y la existencia de numerosos trastornos de hipercrecimiento con características clínicas solapantes. Por lo que el diagnóstico diferencial debería incluir, al menos, el síndrome de Weaver, el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Simpson-Golabi-Behmel ya que pueden ser los trastornos de hipercrecimiento que más hallazgos clínicos comparten además del sobrecrecimiento pre y postnatal, como son la hipotonía neonatal, edad ósea adelantada, anomalías cardíacas y riesgo de neoplasias entre otros. El síndrome de Weaver aun siendo una identidad distinta al SS es el que más se asemeja a este, aunque presenta algunas características propias a tener en cuenta para su correcta identificación como son, la camptodactilia, hipertonía y sobre todo la apariencia facial distintiva.

Desde la experiencia de nuestra unidad en los apartados clínico y molecular proponemos un modelo para el manejo de estos pacientes (Ver figura 33). Creemos que el manejo de estos pacientes debe comenzar desde el propio pediatra o médico de familia, con la derivación a un clínico especialista tras la observación de signos y hallazgos clínicos sugerentes de hipercrecimiento o de trastorno del desarrollo. Una vez en el especialista genetista clínico, este debería recoger una detallada historia clínica haciendo especial énfasis en los síntomas de las complicaciones conocidas dentro del SS. Realizar un examen físico completo, midiendo parámetros físicos de crecimiento, realizando un examen renal, cardíaco y ortopédico. En el caso de encontrar anomalías en estos estudios, referir el paciente al especialista apropiado para su adecuado tratamiento. También es importante la realización de test de inteligencia, ya que estos pacientes suelen presentar diferentes grados de retraso mental. El examen craneo-facial por un genetista experto puede ser uno de los datos más predictivos para el diagnóstico.

Una vez que el genetista clínico ha establecido un diagnóstico de sospecha de SS, el siguiente paso es llevar a cabo estudios genéticos para confirmar molecularmente el diagnóstico. Como primer punto del abordaje molecular proponemos el estudio con los juegos de MLPA que hemos desarrollado para el estudio de genes y regiones candidatas a influir en el crecimiento, ya que este estudio es rápido (3 días) y su coste es reducido (alrededor de 10 euros), permitiéndonos analizar a la vez y en un solo experimento microdelecciones afectando a NSD1 (~10% de las alteraciones), y en otros 18 genes y regiones susceptibles de producir hipercrecimiento. Si los resultados son negativos, recomendamos realizar un estudio completo de reordenamientos intragénico a *NSD1*, con el kit comercial SALSA MLPA kit P026B ®, para detectar delecciones y duplicaciones parciales del gen no detectadas en el anterior análisis, ya que aunque estas mutaciones pueden constituir solamente alrededor del 5% de las alteraciones totales encontradas [Douglas *et al.*, 2005], la rapidez y escaso coste de este estudio, lo hacen aconsejable antes de empezar otros estudios mutacionales de mucho mayor coste y mayor duración temporal. Si este estudio resulta también infructuoso se debe proceder al rastreo mutacional del gen NSD1, mediante el estudio de la secuencia codificante y las zonas de unión exón-intrón. Si estos estudios resultasen también negativos, pero el paciente cumpliera estrictamente los criterios mayores de diagnóstico de SS se mantendrá el diagnóstico de sospecha de SS ya que en un porcentaje variable de los pacientes con SS no se encuentra mutaciones en NSD1. En los casos de pacientes NSD1 negativos, especialmente en aquellos en que los criterios clínicos no son seguros, se pueden emprender estudios adicionales en mayor profundidad (*screening* de mutaciones puntuales) de otros genes responsables de alteraciones de hipercrecimiento.



**Figura 33:** protocolo sugerido para la evaluación y manejo de individuos con SS

En general, se ha propuesto que los individuos con SS sean sometidos a revisiones clínicas anuales durante el periodo de infancia. Esto es importante ya que estos pacientes pueden sufrir infecciones respiratorias, convulsiones y se sospecha que tienen un riesgo aumentado de tumorigenesis. Esta revisión debe incluir un repaso a la historia clínica y examen físico general con especial atención en la identificación de posibles alteraciones cardiacas y/o renales, que de no ser detectadas pueden aumentar significativamente la morbilidad de estos pacientes.

En el consejo genético hay que tener en cuenta, que la mayoría de los individuos con SS son el resultado de mutaciones producidas *de novo*, existiendo muy pocos casos familiares, además hasta la fecha no se han encontrado hermanos afectados de pacientes con SS hijos de padres sanos, lo que lleva a pensar que la incidencia del mosaicismo germinal ha de ser muy

baja. Por lo tanto, el riesgo de recurrencia para padres no afectados sería próximo al de la población normal, que se estima aproximadamente en 1 de cada 14.000 recién nacidos.

El riesgo de transmisión vertical para individuos *NSD1*-positivos es del 50% al igual que otros trastornos autosómicos dominantes. Hasta la fecha el número de casos familiares identificados es muy bajo, no se conoce exactamente la causa de esta escasa tasa de transmisión vertical, aunque se ha especulado que quizás sea debida a una reducción de la fertilidad de los individuos afectados en función del tipo de mutación que presenten, ya que en los casos familiares predominan más las mutaciones de pérdida sentido que en los no-familiares, lo que sugiere que el mecanismo mutacional subyacente y la severidad de sus consecuencias pueden afectar a la capacidad reproductiva. De todas maneras en los escasos individuos *NSD1*-positivos con descendencia, se ha observado aproximadamente un 50% de hijos afectados.

# CONCLUSIONES





En un breve resumen podemos inferir que las principales aportaciones y conclusiones de este trabajo son:

- La haploinsuficiencia del gen *NSD1* es la principal causa de SS, también en población española. Aunque existe un importante grado de soleamiento clínico con el síndrome de Weaver, las alteraciones del gen *NSD1* no parecen ser la causa de esta otra patología.
- Las alteraciones patogénicas predominantes detectadas en nuestra población son de tipo puntual (70%) frente a los grandes reordenamientos genómicos (las microdeleciones afectado a todo el gen *NSD1* son mucho más habituales en población japonesa).
- En nuestra población como en otras estudiadas, casi todas las mutaciones puntuales afectando a *NSD1* son “sin sentido”, dando lugar a codones de stop prematuros y son producidas *de novo*. Así mismo una porción importante de ellas tiende a localizarse en el exón 5 del gen.
- La estructura genómica de 5q35 donde incluye DSs complejas flanqueando la región que contiene el gen *NSD1*. Estas DSs han aparecido durante la evolución reciente de los primates. El dinamismo evolutivo de esta región sugiere la posibilidad de que existan variantes polimórficas entre poblaciones humanas.
- Las grandes diferencias en la frecuencia de microdeleciones entre la población japonesa (50%) y europea (10%), podrían sustentarse en la existencia de variantes polimórficas entre poblaciones que pueden condicionar diferentes susceptibilidades a las mutaciones genómicas.
- El tamaño de las microdeleciones tiende a ser muy parecido en la mayoría de los pacientes portadores, estando los puntos de rotura flanqueados por DSs. Lo que parece claramente indicativo de que esta deleciones no se producen por azar sino mediadas por estos bloques de alta homología por el mecanismo de recombinación homóloga no alélica.

- Los criterios clínicos mayores para el diagnóstico de SS son la apariencia facial característica, el sobrecrecimiento y el retraso mental.
- Dadas las similitudes y dificultades para un certero diagnóstico clínico de algunos de los trastornos de sobrecrecimiento, sugerimos un protocolo de evaluación clínica y varios estudios genéticos, encabezados por un estudio de alteración de dosis génica en varios loci candidatos (con los kits de MLPA no comerciales que hemos desarrollado) por su rapidez y coste, previo a otros estudios de mutaciones puntuales.

# BIBLIOGRAFÍA



- Adam MP, Hennekam RC, Keppen LD, Bull MJ, Clericuzio CL, Burke LW, Ormond KE, Hoyme EH. 2005. Marshall-Smith syndrome: natural history and evidence of an osteochondrodysplasia with connective tissue abnormalities. *Am J Med Genet A* 137(2):117-24.
- Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A. 2002. AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat Genet* 31:21-23
- Agarwal AK, Simha V, Oral EA, Moran SA, Gorden P, O'Rahilly S, Zaidi Z, Gurakan F, Arslanian SA, Klar A and others. 2003. Phenotypic and genetic heterogeneity in congenital generalized lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 88(10):4840-7.
- Agwu JC, Shaw NJ, Kirk J, Chapman S, Ravine D, Cole TR. 1999. Growth in Sotos syndrome. *Arch Dis Child* 80(4):339-42.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. 1992. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 51(6):1229-39.
- A. Antonell, O. de Luis, X. Domingo-Roura, and L. A. Perez-Jurado. Evolutionary mechanisms shaping the genomic structure of the Williams-Beuren syndrome chromosomal region at human 7q11.23. *Genome Res.*, September 1, 2005; 15(9): 1179 - 1188.
- Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S and others. 2005. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37(10):1038-40.
- Armstrong L, McGowan-Jordan J, Brierley K, Allanson JE. 2003. De novo dup(X)(q22.3q26) in a girl with evidence that functional disomy of X material is the cause of her abnormal phenotype. *Am J Med Genet A* 116(1):71-6.
- Arroyo I, Martinez-Frias ML, Egues JJ. 1999. Síndrome de Wiedemann-Beckwith. Análisis clínico y epidemiológico de una serie consecutiva de casos de España. *An Esp Pediatr* 50:161–165.
- Aughton DJ, AlSaadi AA, Johnson JA, Transue DJ, Trock GL. 1993. Dir dup(X) (q13-->qter) in a girl with growth retardation, microcephaly, developmental delay, seizures, and minor anomalies. *Am J Med Genet* 46(2):159-64.
- Avansino JR, Dennis TR, Spallone P, Stock AD, Levin ML. 1999. Proximal 5p trisomy resulting from a marker chromosome implicates band 5p13 in 5p trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 87(1):6-11.

- Ball LJ, Sullivan MD, Dulany S, Stading K, Schaefer GB. 2005. Speech-language characteristics of children with Sotos syndrome. *Am J Med Genet A* 136(4):363-7.
- Baujat G, Rio M, Rossignol S, Sanlaville D, Lyonnet S, Le Merrer M, Munnich A, Gicquel C, Colleaux L, Cormier-Daire V. 2005. Clinical and molecular overlap in overgrowth syndromes. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137(1):4-11.
- Baujat G, Rio M, Rossignol S, Sanlaville D, Lyonnet S, Le Merrer M, Munnich A, Gicquel C, Cormier-Daire V, Colleaux L. 2004. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 74(4):715-20.
- Bayes M, Magano LF, Rivera N, Flores R, Perez Jurado LA. 2003. Mutational mechanisms of Williams-Beuren syndrome deletions. *Am J Hum Genet* 73(1):131-51.
- Bonati MT, Finelli P, Giardino D, Gottardi G, Roberts W, Larizza L. 2005. Trisomy 15q25.2-qter in an autistic child: genotype-phenotype correlations. *Am J Med Genet A* 133:184-188
- Carrozzo R, Arrigo G, Rossi E, Bardoni B, Cammarata M, Gandullia P, Gatti R, Zuffardi O. 1997. Multiple congenital anomalies, brain hypomyelination, and ocular albinism in a female with dup(X) (pter-->q24::q21.32-->qter) and random X inactivation. *Am J Med Genet* 72(3):329-34.
- Cecconi M, Forzano F, Milani D, Cavani S, Baldo C, Selicorni A, Pantaleoni C, Silengo M, Ferrero GB, Scarano G and others. 2005. Mutation analysis of the NSD1 gene in a group of 59 patients with congenital overgrowth. *Am J Med Genet A* 134(3):247-53.
- Cohen MM, Jr. 1989. A comprehensive and critical assessment of overgrowth and overgrowth syndromes. *Adv Hum Genet* 18:181-303, 373-6.
- Cohen MM, Jr., Neri G. 1998. New overgrowth syndrome and FGFR3 dosage effect. *J Med Genet* 35(4):348-9.
- Cohen MM, Jr. 1999. Tumors and nontumors in Sotos syndrome. *Am J Med Genet* 84(2):173-5.
- Cohen MM Jr, Neri G, Weksberg R. 2002. Overgrowth syndromes. New York: Oxford University Press.
- Cole TR, Hughes HE. 1994. Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. *J Med Genet* 31(1):20-32.
- Cooper DN, Krawczak M. 1989. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet* 83(2):181-8.

- Correa-Cerro L, Garcia-Cruz D, Ruiz MX, Sanchez-Corona J. 1999. De novo duplication xq22-q23 in a girl with short stature and gonadal dysgenesis. *Ann Genet* 42(1):41-4.
- Corsello G, Giuffre M, Carcione A, Cuzto ML, Piccione M, Ziino O. 1996. Lymphoproliferative disorders in Sotos syndrome: observation of two cases. *Am J Med Genet* 64(4):588-93.
- Chandley AC. 1991. On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* 28(4):217-23.
- Chen CP, Lin SP, Wang TH, Chen YJ, Chen M, Wang W. 2006. Perinatal findings and molecular cytogenetic analyses of de novo interstitial deletion of 9q (9q22.3-->q31.3) associated with Gorlin syndrome. *Prenat Diagn* 26:725-729
- Crandall BF, Lamb AN, Estabrooks LL. 1993. A girl with an inverted duplicated Xq and an abnormal phenotype. *Am J Hum Genet* 53:539A.
- DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. 2003. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72:156-160
- de Boer L, Kant SG, Karperien M, van Beers L, Tjon J, Vink GR, van Tol D, Dauwerse H, le Cessie S, Beemer FA and others. 2004. Genotype-phenotype correlation in patients suspected of having Sotos syndrome. *Horm Res* 62(4):197-207.
- Deng HX, Xia JH, Ishikawa M, Niikawa N. 1990. Parental origin and mechanism of formation of X chromosome structural abnormalities: four cases determined with RFLPs. *Jinrui Idengaku Zasshi* 35(3):245-51.
- Disabella E, Grasso M, Marziliano N, Ansaldi S, Lucchelli C, Porcu E, Tagliani M, Pilotto A, Diegoli M, Lanzarini L and others. 2006. Two novel and one known mutation of the TGFBR2 gene in Marfan syndrome not associated with FBN1 gene defects. *Eur J Hum Genet* 14(1):34-8.
- Douglas J, Hanks S, Temple IK, Davies S, Murray A, Upadhyaya M, Tomkins S, Hughes HE, Cole TR, Rahman N. 2003. NSD1 mutations are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. *Am J Hum Genet* 72(1):132-43.
- Douglas J, Coleman K, Tatton-Brown K, Hughes HE, Temple IK, Cole TR, Rahman N. 2005. Evaluation of NSD2 and NSD3 in overgrowth syndromes. *Eur J Hum Genet* 13(2):150-3.
- Douglas J, Tatton-Brown K, Coleman K, Guerrero S, Berg J, Cole TR, Fitzpatrick D, Gillerot Y, Hughes HE, Pilz D and others. 2005. Partial NSD1 deletions cause 5% of Sotos syndrome and are readily identifiable by multiplex ligation dependent probe amplification. *J Med Genet* 42(9):e56.



- Emanuel BS, Shaikh TH. 2001. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nat Rev Genet* 2(10):791-800.
- Faivre L, Rousseau T, Laurent N, Gosset P, Sanlaville D, Thauvin-Robinet C, Cusin V, Lionnais S, Callier P, Khau Van Kien P, Huet F, Turleau C, Sagot P, Mugneret F. 2004. Prenatal overgrowth and mosaic trisomy 15q25-qter including the IGF1 receptor gene. *Prenat Diagn* 24:393-395
- Faravelli F. 2005. NSD1 mutations in Sotos syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137(1):24-31.
- Fiegler H, Carr P, Douglas EJ, Burford DC, Hunt S, Scott CE, Smith J, Vetrie D, Gorman P, Tomlinson IP and others. 2003. DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* 36(4):361-74.
- Fu M, Kazlauskaitė R, Baracho Mde F, Santos MG, Brandao-Neto J, Villares S, Celi FS, Wajchenberg BL, Shuldiner AR. 2004. Mutations in Gng3lg and AGPAT2 in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy and Brunzell syndrome: phenotype variability suggests important modifier effects. *J Clin Endocrinol Metab* 89:2916-2922
- Fujita Y, Mochizuki D, Mori Y, Nakamoto N, Kobayashi M, Omi K, Kodama H, Yanagawa Y, Abe T, Tsuzuku T and others. 2000. Girl with accelerated growth, hearing loss, inner ear anomalies, delayed myelination of the brain, and del(22)(q13.1q13.2). *Am J Med Genet* 92(3):195-9.
- Garcia-Heras J, Martin JA, Day DW, Scacheri P, Witchel SF. 1997. "De novo" duplication Xq23-->Xq26 of paternal origin in a girl with a mildly affected phenotype. *Am J Med Genet* 70(4):404-8.
- Garg A. 2004. Acquired and inherited lipodystrophies. *N Engl J Med* 350(12):1220-34.
- Gimelli G, Pujana MA, Patricelli MG, Russo S, Giardino D, Larizza L, Cheung J, Armengol L, Schinzel A, Estivill X and others. 2003. Genomic inversions of human chromosome 15q11-q13 in mothers of Angelman syndrome patients with class II (BP2/3) deletions. *Hum Mol Genet* 12(8):849-58.
- Goodman BK, Shaffer LG, Rutberg J, Leppert M, Harum K, Gagos S, Ray JH, Bialer MG, Zhou X, Pletcher BA and others. 1998. Inherited duplication Xq27-qter at Xp22.3 in severely affected males: molecular cytogenetic evaluation and clinical description in three unrelated families. *Am J Med Genet* 80(4):377-84.
- Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA. 2004. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 75:526-528

- Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, Grossman AB, Jacquet P, Enjalbert A, Bonthron DT. 2001. Imprinting of the G(s)alpha gene GNAS1 in the pathogenesis of acromegaly. *J Clin Invest* 107(6):R31-6.
- Hersh JH, Cole TR, Bloom AS, Bertolone SJ, Hughes HE. 1992. Risk of malignancy in Sotos syndrome. *J Pediatr* 120(4 Pt 1):572-4.
- Hoglund P, Kurotaki N, Kytola S, Miyake N, Somer M, Matsumoto N. 2003. Familial Sotos syndrome is caused by a novel 1 bp deletion of the NSD1 gene. *J Med Genet* 40(1):51-4.
- Huang N, vom Baur E, Garnier JM, Lerouge T, Vonesch JL, Lutz Y, Chambon P, Losson R. 1998. Two distinct nuclear receptor interaction domains in NSD1, a novel SET protein that exhibits characteristics of both corepressors and coactivators. *Embo J* 17(12):3398-412.
- Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y. 2002. Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). *Am J Med Genet* 107(1):58-60.
- Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. 2000. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 10(5):597-610.
- Kamimura J, Endo Y, Kurotaki N, Kinoshita A, Miyake N, Shimokawa O, Harada N, Visser R, Ohashi H, Miyakawa K and others. 2003. Identification of eight novel NSD1 mutations in Sotos syndrome. *J Med Genet* 40(11):e126.
- Kaneko H, Tsukahara M, Tachibana H, Kurashige H, Kuwano A, Kajii T. 1987. Congenital heart defects in Sotos sequence. *Am J Med Genet* 26(3):569-76.
- Kerr B, Delrue MA, Sigaudy S, Perveen R, Marche M, Burgelin I, Stef M, et al. 2006. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases. *J Med Genet* 43:401-405
- Kirchhoff M, Bisgaard AM, Bryndorf T, Gerdes T. 2007. MLPA analysis for a panel of syndromes with mental retardation reveals imbalances in 5.8% of patients with mental retardation and dysmorphic features, including duplications of the Sotos syndrome and Williams-Beuren syndrome regions. *Eur J Med Genet* 50(1):33-42.
- Kleczkowska A, Fryns JP, Van den Berghe H. 1993. Duplication in the long arm of the X-chromosome associated with spastic paraparesis and premature menopause. *Genet Couns* 4(3):213-6.
- Knuutila S, Heinonen K, Hongell K, Varonen S, Simell O. 1984. A duplication within the critical fertility region of X chromosome in a mentally retarded woman with normal menarche. *Hereditas* 101(2):253-5.

- Kok K, Mosselaar A, Faber H, Dijkhuizen T, Draaijers TG, van der Veen AY, Buys CH, Schrander-Stumpel CT. 1999. Breakpoint mapping by FISH in a Sotos patient with a constitutional translocation t(3;6). *J Med Genet* 36(4):346-7.
- Kokalj Vokac N, Seme Ciglencecki P, Erjavec A, Zagradisnik B, Zagorac A. 2002. Partial Xp duplication in a girl with dysmorphic features: the change in replication pattern of late-replicating dupX chromosome. *Clin Genet* 61(1):54-61.
- Kurotaki N, Harada N, Yoshiura K, Sugano S, Niikawa N, Matsumoto N. 2001. Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. *Gene* 279(2):197-204.
- Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y and others. 2002. Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nat Genet* 30(4):365-6.
- Kurotaki N, Harada N, Shimokawa O, Miyake N, Kawame H, Uetake K, Makita Y, Kondoh T, Ogata T, Hasegawa T and others. 2003. Fifty microdeletions among 112 cases of Sotos syndrome: low copy repeats possibly mediate the common deletion. *Hum Mutat* 22(5):378-87.
- Kurotaki N, Stankiewicz P, Wakui K, Niikawa N, Lupski JR. 2005. Sotos syndrome common deletion is mediated by directly oriented subunits within inverted Sos-REP low-copy repeats. *Hum Mol Genet* 14(4):535-42.
- Lachlan KL, Collinson MN, Sandford RO, van Zyl B, Jacobs PA, Thomas NS. 2004. Functional disomy resulting from duplications of distal Xq in four unrelated patients. *Hum Genet* 115(5):399-408.
- Lapunzina P, Arberas C, Fernández MC, Goldschmidt E, Tello AM. 1999. Síndrome de Beckwith-Wiedemann. *Rev Hosp Niños Bs As* 41:110-115.
- Lapunzina P, Echegaray A, Gracia-Bouthelier R, García-Alix B, Oviedo M. 2001. Síndrome de Perlman. Presentación de cuatro pacientes y revisión de la literatura. *Rev Hosp Niños Bs As* 43:155-160.
- Lapunzina P, Gairi A, Delicado A, Mori MA, de Torres ML, Goma A, Navia M, López Pajares I. 2004. Macrocephaly cutis marmorata telangiectatica congenita. Report of six new patients and a review. *Am J Med Genet* 130A:45-51.
- Lapunzina P. 2005. Other tumors in Sotos syndrome. *Am J Med Genet A* 135(2):228.
- Lapunzina P. 2005. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137(1):53-71.
- Lapunzina P, Gairi A, Delicado A, Mori MA, Torres ML, Goma A, Navia M, Pajares IL. 2004. Macrocephaly-cutis marmorata telangiectatica congenita: report of six new patients and a review. *Am J Med Genet A* 130(1):45-51.

- Li DM, Sun H. 1998. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15406-11.
- Li M, Shuman C, Fei YL, Cutiongco E, Bender HA, Stevens C, Wilkins-Haug L, Day-Salvatore D, Yong SL, Geraghty MT and others. 2001. GPC3 mutation analysis in a spectrum of patients with overgrowth expands the phenotype of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet* 102(2):161-8.
- Liu YZ, Xiao P, Guo YF, Xiong DH, Zhao LJ, Shen H, Liu YJ, Dvornyk V, Long JR, Deng HY and others. 2006. Genetic linkage of human height is confirmed to 9q22 and Xq24. *Hum Genet* 119(3):295-304.
- Lupski JR. 1998. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14(10):417-22.
- Magenis RE, Tochen ML, Holahan KP, Carey T, Allen L, Brown MG. 1984. Turner syndrome resulting from partial deletion of Y chromosome short arm: localization of male determinants. *J Pediatr* 105(6):916-9.
- Magre J, Delepine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Jr., Van Maldergem L, Sobel E, Papp J, et al. 2001. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 28:365-370
- Maldonado V, Gaynon PS, Poznanski AK. 1984. Cerebral gigantism associated with Wilms' tumor. *Am J Dis Child* 138(5):486-8.
- Marsh DJ, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Parsons R, Gorlin RJ, Eng C. 1997. Germline mutations in PTEN are present in Bannayan-Zonana syndrome. *Nat Genet* 16(4):333-4.
- Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF, Bodurtha J, Crowe C, Curtis MA, Dasouki M and others. 1999. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet* 8(8):1461-72.
- Matsuo M, Muroya K, Kosaki K, Ishii T, Fukushima Y, Anzo M, Ogata T. 1999. Random X-inactivation in a girl with duplication Xp11.21-p21.3: report of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet* 86(1):44-50.
- Matyas G, Arnold E, Carrel T, Baumgartner D, Boileau C, Berger W, Steinmann B. 2006. Identification and in silico analyses of novel TGFBR1 and TGFBR2 mutations in Marfan syndrome-related disorders. *Hum Mutat* 27(8):760-9.
- Mauceri L, Sorge G, Baieli S, Rizzo R, Pavone L, Coleman M. 2000. Aggressive behavior in patients with Sotos syndrome. *Pediatr Neurol* 22(1):64-7.

- Melchior L, Schwartz M, Duno M. 2005. dHPLC screening of the NSD1 gene identifies nine novel mutations--summary of the first 100 Sotos syndrome mutations. *Ann Hum Genet* 69(Pt 2):222-6.
- Miyake N, Kurotaki N, Sugawara H, Shimokawa O, Harada N, Kondoh T, Tsukahara M, Ishikiriyama S, Sonoda T, Miyoshi Y and others. 2003. Preferential paternal origin of microdeletions caused by prezygotic chromosome or chromatid rearrangements in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 72(5):1331-7.
- Mizuguchi T, Collod-Beroud G, Akiyama T, Abifadel M, Harada N, Morisaki T, Allard D, Varret M, Claustres M, Morisaki H and others. 2004. Heterozygous TGFBR2 mutations in Marfan syndrome. *Nat Genet* 36(8):855-60.
- Monaghan KG, Van Dyke DL, Feldman GL. 1998. Prader-Willi-like syndrome in a patient with an Xq23q25 duplication. *Am J Med Genet* 80(3):227-31.
- Nagai T, Shimokawa O, Harada N, Sakazume S, Ohashi H, Matsumoto N, Obata K, Yoshino A, Murakami N, Murai T, Sakuta R, Niikawa N. 2002. Postnatal overgrowth by 15q-trisomy and intrauterine growth retardation by 15q-monosomy due to familial translocation t(13;15): dosage effect of IGF1R? *Am J Med Genet* 113:173-177
- Nagai T, Matsumoto N, Kurotaki N, Harada N, Niikawa N, Ogata T, Imaizumi K, Kurosawa K, Kondoh T, Ohashi H and others. 2003. Sotos syndrome and haploinsufficiency of NSD1: clinical features of intragenic mutations and submicroscopic deletions. *J Med Genet* 40(4):285-9.
- Nielsen AL, Jorgensen P, Lerouge T, Cervino M, Chambon P, Losson R. 2004. Nizp1, a novel multitype zinc finger protein that interacts with the NSD1 histone lysine methyltransferase through a unique C2HR motif. *Mol Cell Biol* 24(12):5184-96.
- Noreau DR, Al-Ata J, Jutras L, Teebi AS. 1998. Congenital heart defects in Sotos syndrome. *Am J Med Genet* 79(4):327-8.
- Opitz JM, Weaver DW, Reynolds JF, Jr. 1998. The syndromes of Sotos and Weaver: reports and review. *Am J Med Genet* 79(4):294-304.
- Partington MW, Fagan K, Soubjaki V, Turner G. 1997. Translocations involving 4p16.3 in three families: deletion causing the Pitt-Rogers-Danks syndrome and duplication resulting in a new overgrowth syndrome. *J Med Genet* 34:719-728
- Pilia G, Hughes-Benzie RM, MacKenzie A, Baybayan P, Chen EY, Huber R, Neri G, Cao A, Forabosco A, Schlessinger D. 1996. Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat Genet* 12(3):241-7.
- Porteus MH, Narkool P, Neuberg D, Guthrie K, Breslow N, Green DM, Diller L. 2000. Characteristics and outcome of children with Beckwith-Wiedemann syndrome

- and Wilms' tumor: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J Clin Oncol* 18(10):2026-31.
- Portnoi MF, Bouayed-Abdelmoula N, Mirc M, Zemni R, Castaing H, Stephann J, Ardalan A, Vialard F, Nouchy M, Daoud P and others. 2000. Molecular cytogenetic analysis of a duplication Xp in a female with an abnormal phenotype and random X inactivation. *Clin Genet* 58(2):116-22.
- Rajangam S, Lincoln S, Tilak P, Thomas IM. 1999. Primary amenorrhea with Xq duplication. *Indian J Med Sci* 53(2):49-52.
- Rayasam GV, Wendling O, Angrand PO, Mark M, Niederreither K, Song L, Lerouge T, Hager GL, Chambon P, Losson R. 2003. NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *Embo J* 22(12):3153-63.
- Redon R, Baujat G, Sanlaville D, Le Merrer M, Vekemans M, Munnich A, Carter NP, Cormier-Daire V, Colleaux L. 2006. Interstitial 9q22.3 microdeletion: clinical and molecular characterisation of a newly recognised overgrowth syndrome. *Eur J Hum Genet* 14:759-767
- Rio M, Clech L, Amiel J, Faivre L, Lyonnet S, Le Merrer M, Odent S, Lacombe D, Edery P, Brauner R and others. 2003. Spectrum of NSD1 mutations in Sotos and Weaver syndromes. *J Med Genet* 40(6):436-40.
- Romain DR, Goldsmith J, Cairney H, Columbano-Green LM, Smythe RH, Parfitt RG. 1990. Partial monosomy for chromosome 22 in a patient with del(22)(pter----q13.1::q13.33----qter). *J Med Genet* 27:588-589
- Root AW, Diamond FB. 2006. The Sotos syndrome - NSD1 haploinsufficiency: cerebral gigantism update. *Growth, Genetics & Hormones* 22(3):33-38.
- Samonte RV, Eichler EE. 2002. Segmental duplications and the evolution of the primate genome. *Nat Rev Genet* 3(1):65-72.
- Schaefer GB, Bodensteiner JB, Buehler BA, Lin A, Cole TR. 1997. The neuroimaging findings in Sotos syndrome. *Am J Med Genet* 68(4):462-5.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.
- Shapira M, Dar H, Bar-EI H, Bar-Nitzan N, Even L, Borochowitz Z. 1997. Inherited inverted duplication of X chromosome in a male: report of a patient and review of the literature. *Am J Med Genet* 72(4):409-14.
- Sotos JF, Dodge PR, Muirhead D, Crawford JD, Talbot NB. 1964. Cerebral Gigantism in Childhood. a Syndrome of Excessively Rapid Growth and Acromegalic Features and a Nonprogressive Neurologic Disorder. *N Engl J Med* 271:109-16.

- Stankiewicz P, Thiele H, Schlicker M, Cseke-Friedrich A, Bartel-Friedrich S, Yatsenko SA, Lupski JR, Hansmann I. 2005. Duplication of Xq26.2-q27.1, including SOX3, in a mother and daughter with short stature and dyslalia. *Am J Med Genet A* 138(1):11-7.
- Tachdjian G, Aboura A, Benkhalifa M, Creveaux I, Foix-Helias L, Gadisseux JF, Boespflug-Tanguy O, Mohammed M, Labrune P. 2004. De novo interstitial direct duplication of Xq21.1q25 associated with skewed X-inactivation pattern. *Am J Med Genet A* 131(3):273-80.
- Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Cole TR, Das S, Horn D, Hughes HE, Temple IK, Faravelli F and others. 2005. Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *Am J Hum Genet* 77(2):193-204.
- Tatton-Brown K, Douglas J, Coleman K, Baujat G, Chandler K, Clarke A, Collins A, Davies S, Faravelli F, Firth H and others. 2005. Multiple mechanisms are implicated in the generation of 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *J Med Genet* 42(4):307-13.
- Tatton-Brown K, Rahman N. 2007. Sotos syndrome. *Eur J Hum Genet* 15(3):264-71.
- Tei S, Tsuneishi S, Matsuo M. 2006. The first Japanese familial Sotos syndrome with a novel mutation of the NSD1 gene. *Kobe J Med Sci* 52(1-2):1-8.
- Thakker RV, Pook MA, Wooding C, Boscaro M, Scanarini M, Clayton RN. 1993. Association of somatotrophinomas with loss of alleles on chromosome 11 and with gsp mutations. *J Clin Invest* 91(6):2815-21.
- Tihy F, Lemyre E, Lemieux N, Dallaire L. 1999. De novo dup(X)(q22.1q25) in a girl with an abnormal phenotype. *Am J Med Genet* 87(4):302-5.
- Tsukahara M, Murakami K, Iino H, Tateishi H, Fujita K, Uchida M. 1999. Congenital heart defects in Sotos syndrome. *Am J Med Genet* 84(2):172.
- Tuck-Muller CM, Martinez JE, Batista DA, Kearns WG, Wertelecki W. 1993. Duplication of the short arm of the X chromosome in mother and daughter. *Hum Genet* 91(4):395-400.
- Turkmen S, Gillessen-Kaesbach G, Meinecke P, Albrecht B, Neumann LM, Hesse V, Palanduz S, Balg S, Majewski F, Fuchs S and others. 2003. Mutations in NSD1 are responsible for Sotos syndrome, but are not a frequent finding in other overgrowth phenotypes. *Eur J Hum Genet* 11(11):858-65.
- Valero MC, de Luis O, Cruces J, Perez Jurado LA. 2000. Fine-scale comparative mapping of the human 7q11.23 region and the orthologous region on mouse chromosome 5G: the low-copy repeats that flank the Williams-Beuren

- syndrome deletion arose at breakpoint sites of an evolutionary inversion(s). *Genomics* 69(1):1-13.
- Van Dyke DL, Miller MJ, Weiss L. 1983. The origin of inverted tandem duplications, and phenotypic effects of tandem duplication of the X chromosome long arm. *Am J Med Genet* 15(3):441-50.
- van Haelst MM, Hoogeboom JJ, Baujat G, Bruggenwirth HT, Van de Laar I, Coleman K, Rahman N, Niermeijer MF, Drop SL, Scambler PJ. 2005. Familial gigantism caused by an NSD1 mutation. *Am J Med Genet A* 139(1):40-4.
- Varella-Garcia M, Tajara EH, Gagliardi AR. 1981. Structural aberration of the X chromosome in a patient with gonadal dysgenesis: an approach to karyotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 18(3):228-31.
- Veugelers M, Vermeesch J, Watanabe K, Yamaguchi Y, Marynen P, David G. 1998. GPC4, the gene for human K-glypican, flanks GPC3 on xq26: deletion of the GPC3-GPC4 gene cluster in one family with Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Genomics* 53(1):1-11.
- Visser R, Matsumoto N. 2003. Genetics of Sotos syndrome. *Curr Opin Pediatr* 15(6):598-606.
- Visser R, Shimokawa O, Harada N, Kinoshita A, Ohta T, Niikawa N, Matsumoto N. 2005. Identification of a 3.0-kb major recombination hotspot in patients with Sotos syndrome who carry a common 1.9-Mb microdeletion. *Am J Hum Genet* 76(1):52-67.
- Visser R, Hasegawa T, Niikawa N, Matsumoto N. 2006. Analysis of the NSD1 promoter region in patients with a Sotos syndrome phenotype. *J Hum Genet* 51(1):15-20.
- Wang NJ, Liu D, Parokonny AS, Schanen NC. 2004. High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am J Hum Genet* 75(2):267-81.
- Weaver DD, Graham CB, Thomas IT, Smith DW. 1974. A new overgrowth syndrome with accelerated skeletal maturation, unusual facies, and camptodactyly. *J Pediatr* 84(4):547-52.
- Weaver DD. 1994. Overgrowth syndromes and disorders: Definition, classification and discussion. *Growth Gen Horm* 10:1-4.
- Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, Fei YL, Shuman C, Wei C, Steele L, Cameron J, Smith A, Ambus I and others. 2001. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet* 10(26):2989-3000.



- Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. 2003. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R61-8.
- Wyandt HE, Bugeau-Michaud L, Skare JC, Milunsky A. 1991. Partial duplication of Xp: a case report and review of previously reported cases. *Am J Med Genet* 40(3):280-3.
- Xiao W, Oefner PJ. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: A review. *Hum Mutat* 17(6):439-74.
- Yule SM. 1999. Cancer in Sotos syndrome. *Arch Dis Child* 80(5):493.
- Zhang A, Weaver DD, Palmer CG. 1997. Molecular cytogenetic identification of four X chromosome duplications. *Am J Med Genet* 68(1):29-38.
- Zollino M, Tiziano F, Di Stefano C, Neri G. 1999. Partial duplication of the long arm of chromosome 15: confirmation of a causative role in craniosynostosis and definition of a 15q25-qter trisomy syndrome. *Am J Med Genet* 87:391-394

# ANEXO



**Análisis genotípico en el locus NSD1 en pacientes y familiares directos**

<b>Marcadores</b>	<b>Padre</b>	<b>Paciente</b>	<b>Madre</b>	<b>Interpretación</b>	<b>Hermano 1</b>	<b>Hermano2</b>
<b>Familia SS1</b>						
SSCAcen	205	205/209	209	H	205/209	
SSCA2	148/144	148/144	144/142	H		
SSCA3	160/158	160/158	158	H		
SSCA4	168/119	168/119	119	H	119	
SSCA6	221/217	221/209	209	H		
SSCAtel	204	204/198	198/202	H	204/202	
<b>Familia SS2</b>						
SSCAcen	208/210	208/188	188/208	H		
SSCA2	144/147	144	144	NI		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121	121	121	NI		
SSCA6	221/231	221	221/217	NI		
SSCAtel	204/198	204/202	202	H		
<b>Familia SS3</b>						
SSCAcen		208/210	210	H	208/210	
SSCA3	158	158	158	NI	158	
SSCA4	119/121	119/121	121/168	H	121/168	
SSCA6	213	213	213/209	NI		
SSCAtel	204	204/202	202/204	H	204	
<b>Familia SS4</b>						
SSCA2	147/151	147/143	143/147	H	147/143	
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/166	119/168	168/119	H	119/168	
SSCA6	213	213/209	209/217	H		
<b>Familia NW</b>						
SSCAcen	218/191	218/208	208	H		
SSCA2	A/B	A/C	C/C	H		
SSCA3	160/162	160	160	NI		
SSCA4	122/124	122/124	122/124	H		
SSCA5	262	262/258	258/264	H		
SSCA6	221	221/209	209/223	H		
<b>Familia SS6</b>						
SSCA2		143/147		H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4		119/168		H		
SSCA6	220/208	220/208	208/201	H		
<b>Familia SS8</b>						
SSCA2	147	147/149	149/147	H	147	
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121	121	121/119	NI		
SSCA6	222	222/218	218/212	H		
<b>Familia SS9</b>						
SSCA2	147/149	147	147/143	NI		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	168/119	168/119	119	H		
SSCA6	212/218	212/208	208	H		

Marcadores	Padre	Paciente	Madre	Interpretación	Hermano 1	Hermano2
<b>Familia SS10</b>						
SSCA2	143/147	143/147	147	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4		119/121	121/168	H		
SSCA6	209/215	209/215	215/213	H		
<b>Familia SS11</b>						
SSCA2	145/147	145/143	143/147	H	147/143	
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121	121/119	119/168	H	121/119	
SSCA6	213/209	213	213/217	NI		
<b>Familia SS12</b>						
SSCA2	146	146	146	NI	146	146
SSCA3	158/160	158/160	158/160	H	160	
SSCA4	119/168	119/168	119/168	H	119/168	119/168
SSCA6	205	205/221	221/213	H		
<b>Familia SS13</b>						
SSCA2	148/146	148/142	142/144	H	148/142	
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/168	119	119/168	NI	119	
SSCA5	257/261	257	257	NI	257	
SSCA6	213	213/221	221/213	H	213/221	
<b>Familia SS14</b>						
SSCA2	147/143	147	147	NI	143/147	
SSCA3	158/166	158	158	NI	166/158	
SSCA4	119/168	119/168	168/119	H	168/119	
SSCA5	259/257	259/257	257	H	257	
SSCA6	213/230	213	213/217	NI	230/213	
<b>Familia SS15</b>						
SSCA2	144/146	144/146		H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119	119/121	121/168	H	119/168	
SSCA6	205	205/217	217/213	H		
<b>Familia SS16</b>						
SSCA2	138/142	142/146	146/154	H	142/154	
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/168	119	119/168	NI	119/168	
SSCA6	214/224	214/206	206/210	H		
<b>Familia SS17</b>						
SSCA2		146		NI		
SSCA3		160/166		H		
SSCA4		119/168		H		
SSCA6		207		NI		
<b>Familia SS18</b>						
SSCA2		146/142	146	H		
SSCA3		158	158	NI		
SSCA4		119/121	119/121	H		
SSCA6		210	210/218	NI		
<b>Familia SS19</b>						
SSCA2	146	146/142	142/146	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/121	119/121	119/121	H		
SSCA6	223/209	223/231	231/215	H		

Marcadores	Padre	Paciente	Madre	Interpretación	Hermano 1	Hermano2
<b>Familia SS20</b>						
SSCA2	146	146	146	NI		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	168/121	168/123	123/119	H		
SSCA6	209/218	209/227	227/201	H		
<b>Familia SS21</b>						
SSCA2		144/146		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/168		H		
SSCA6		213/233		H		
<b>Familia SS22</b>						
SSCA2		148/152	146/152	H		
SSCA3	158	158	158/160	NI		
SSCA4		119/168	119/168	H		
SSCA6		205/213	213/217	H		
<b>Familia SS23</b>						
SSCA2	146	146	146	NI		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	168/121	168/121	121	H		
SSCA6	213/220	213/211	211/221	H		
<b>Familia SS24</b>						
SSCA2	144/146	144/146	146	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	168/119	168/121	119/121	H		
SSCA6	215/209	215/227	221/227	H		
<b>Familia SS25</b>						
SSCA2	142/146	142/146	146	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/121	119/121	121/168	H		
SSCA6	209/219	209/227	227/213	H		
<b>Familia SS26</b>						
SSCA2	146/162	146	146	NI		
SSCA3	158/160	158/160	158/160	H		
SSCA4	119	119/168	168/119	H		
SSCA6	209	209/213	213/209	H		
<b>Familia SS27</b>						
SSCA2	142/146	142/156	156/142	H		
SSCA3	158	158	158/160	NI		
SSCA4	121/168	121	121/168	NI		
SSCA6	209	209/225	225/230	H		
<b>Familia SS28</b>						
SSCA2	140/142	140/146	144/146	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/168	119/121	121/119	H		
SSCA6	201/209	201/217	217/213	H		
<b>Familia SS29</b>						
SSCA2	147/153	147/153	147/153	H		
SSCA3	158/166	158/166		H		
SSCA4	119	119	119/168	NI		
SSCA6	235/217	235/217	217/213	H		
<b>Familia SS30</b>						
SSCA2	146/142	146/142	142/144	H		
SSCA3	158	158		NI		
SSCA4	119	119/121	121/168	H		
SSCA6	213/209	213/223	223/211	H		

Marcadores	Padre	Paciente	Madre	Interpretación	Hermano 1	Hermano2
<b>Familia SS31</b>						
SSCA2		142/146		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/121		H		
SSCA6		205/225		H		
<b>Familia SS32</b>						
SSCAcen	209	209/207	207/209	H		
SSCA2	142/144	142	144	DM		
SSCA3	158	158	158/160	NI		
SSCA4	121	121	121	NI		
SSCA5	253/257	257	255	DM		
SSCA6	221/235	235	213/225	DM		
SSCAtel	198/202	202/204	204	H		
<b>Familia SS33</b>						
SSCA2		142	142/146	NI		
SSCA3		158	158	NI		
SSCA4		119/168	119/168	H		
SSCA6		205/209	205/209	H		
<b>Familia SS34</b>						
SSCA2	148/146	148/154	154/148	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	119/121	119/134	134/119	H		
SSCA6	209/213	209	209/197	NI		
<b>Familia SS35</b>						
SSCA2	148	148	148	NI		
SSCA3	158/168	158	158	NI	158/168	
SSCA4	121	121/168	168/121	H	121/168	
SSCA6	223	223/217	217/209	H	223/209	
<b>Familia SS36</b>						
SSCA2	148	148/144	144/148	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121	121/119	119/121	H		
SSCA6	219/209	219/213	213/221	H		
<b>Familia SS37</b>						
SSCA2	142/146	142/146	146	H		
SSCA3	158/160	158	158/160	NI		
SSCA4	121/168	121	121	NI		
SSCA6	213/221	213/209	209/235	H		
<b>Familia SS38</b>						
SSCAcen	203/207	203/207	207/205	H	203/207	
SSCA2	144/152	146	146	DP	146/152	
SSCA3	158	158	158	NI	158	
SSCA4	121/168	121	119/121	NI	121/168	
SSCA5	257/259	259	259/261	NI	259	
SSCA6	213/225	223	223/213	DP	223/225	
SSCAtel	204	204	204	NI	204	
<b>Familia SS39</b>						
SSCA2	146	146/138	138/144	H		
SSCA3	160/158	160/158	158	H		
SSCA4	121/119	121	121/119	NI		
<b>Familia SS40</b>						
SSCA2		148	148	NI		
SSCA3		158/160	158/160	H		
SSCA4		121/168	121/168	H		
SSCA6		239/243	243/231	H		

Marcadores	Padre	Paciente	Madre	Interpretación	Hermano 1	Hermano2
<b>Familia SS41</b>						
SSCA2	146/144	146	146	NI		
SSCA3	158	158	158/160	NI		
SSCA4	119/168	119/168	119/168	H		
SSCA6	225/209	225/205	205/213	H		
<b>Familia SS42</b>						
SSCA3		158/166	158/166	H		
SSCA4		119/121	119/121	H		
SSCA6		217/235	235/223	H		
<b>Familia SS43</b>						
SSCA2	148/150	148/144	144/148	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121	121/119	119/121	H		
SSCA6	227/219	227/209	209/211	H		
<b>Familia SS44</b>						
SSCA2	148	148/144	144/142	H	148/144	
SSCA3	158	158	158	NI	158	
SSCA4	119/121	119	119	NI	119	
SSCA6	213/235	213/197	197/217	H	213/197	
<b>Familia SS45</b>						
SSCA2		142		NI		
SSCA3		158/160		H		
SSCA4		119		NI		
SSCA6		209/221		H		
<b>Familia SS46</b>						
SSCA2		142/144		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/164		H		
SSCA6		213		NI		
<b>Familia SS47</b>						
SSCA2		148		NI		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		121		NI		
SSCA6		215/223		H		
<b>Familia SS48</b>						
SSCA2		142/146	142	H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		121/119	119/168	H		
SSCA6		209	209	NI		
<b>Familia SS49</b>						
SSCA2	148	148/144	144	H		
SSCA3	158	158	158	NI		
SSCA4	121/168	121	121/123	NI		
SSCA6	213/209	213	213/218	NI		
<b>Familia SS50</b>						
SSCA2		144/148		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/168		H		
SSCA6		216/221		H		
<b>Familia SS51</b>						
SSCA2	148/146	148/146	146	H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4	121/168	121/168	121/168	H		
SSCA6	229/209	229/205	205/235	H		



Marcadores	Padre	Paciente	Madre	Interpretación	Hermano 1	Hermano2
<b>Familia AUT12</b>						
SSCA2		144/148		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/168		H		
SSCA6		209/213		H		
<b>Familia S. Weaver 1</b>						
SSCA2		142/148		H		
SSCA3		158/166		H		
SSCA4		121/168		H		
SSCA6		207/223		H		
<b>Familia S. Weaver 2</b>						
SSCA2		144/146		H		
SSCA3		158		NI		
SSCA4		119/121		H		
SSCA6		209/213		H		

NI: no informativo H: herocigoto D M: delección mateARN D P: delección pateARN. Se da el tamaño del alelo en nº de pares de bases

# HOJA DE RECOGIDA DE DATOS SÍNDROME DE SOTOS

Paciente referido por Dr: Dirección:  
Nombre clave del paciente:  
Fecha Nacimiento: Edad: Sexo:

## HISTORIA FAMILIAR

Arbol familiar de 3 generaciones (incluir Talla de los familiares, enfermedades, malformaciones, retraso mental, edad de fallecimiento, abortos y mortinatos...)

**Madre** Edad  
Talla Perímetro cefálico Edad menarquia  
Peso RN Perímetro cefálico RN Talla RN  
Edad marcha Edad primeras palabras Edad lenguaje complejo  
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos?  
(si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)  
¿Precisó educación especial? Nivel educativo alcanzado Profesión  
¿Dificultades de aprendizaje?  
Edad primeros dientes Cociente Intelectual (test utilizado)  
Dificultad coordinación motora ¿Habilidad para el deporte?

**Padre** Edad  
Talla Perímetro cefálico Edad estirón puberal  
Peso RN Perímetro cefálico RN Talla RN  
Edad marcha Edad primeras palabras Edad lenguaje complejo  
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos?  
(si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)  
¿Precisó educación especial? Nivel educativo alcanzado Profesión  
¿Dificultades de aprendizaje?  
Edad primeros dientes Cociente Intelectual (test utilizado)  
Dificultad coordinación motora ¿Habilidad para el deporte?

<b>Hermanos/as 1</b>	Fecha de nacimiento	Edad
Talla	Perímetro cefálico	Edad estirón puberal
Peso RN	Perímetro cefálico RN	Talla RN
Edad marcha	Edad primeras palabras	Edad lenguaje complejo
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos? (si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)		
¿Precisó educación especial?	Nivel educativo alcanzado	Profesión
¿Dificultades de aprendizaje?		
Edad primeros dientes	Cociente Intelectual (test utilizado)	
Dificultad coordinación motora		¿Habilidad para el deporte?

<b>Hermanos/as 2</b>	Fecha de nacimiento	Edad
Talla	Perímetro cefálico	Edad estirón puberal
Peso RN	Perímetro cefálico RN	Talla RN
Edad marcha	Edad primeras palabras	Edad lenguaje complejo
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos? (si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)		
¿Precisó educación especial?	Nivel educativo alcanzado	Profesión
¿Dificultades de aprendizaje?		
Edad primeros dientes	Cociente Intelectual (test utilizado)	
Dificultad coordinación motora		¿Habilidad para el deporte?

<b>Hermanos/as 3</b>	Fecha de nacimiento	Edad
Talla	Perímetro cefálico	Edad estirón puberal
Peso RN	Perímetro cefálico RN	Talla RN
Edad marcha	Edad primeras palabras	Edad lenguaje complejo
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos? (si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)		
¿Precisó educación especial?	Nivel educativo alcanzado	Profesión
¿Dificultades de aprendizaje?		
Edad primeros dientes	Cociente Intelectual (test utilizado)	
Dificultad coordinación motora		¿Habilidad para el deporte?

<b>Hermanos/as 4</b>	Fecha de nacimiento	Edad
Talla	Perímetro cefálico	Edad estirón puberal
Peso RN	Perímetro cefálico RN	Talla RN
Edad marcha	Edad primeras palabras	Edad lenguaje complejo
¿Rasgos físicos de síndrome de Sotos? (si la respuesta es sí, hacer hoja de datos propia para un nuevo paciente)		
¿Precisó educación especial?	Nivel educativo alcanzado	Profesión
¿Dificultades de aprendizaje?		
Edad primeros dientes	Cociente Intelectual (test utilizado)	
Dificultad coordinación motora		¿Habilidad para el deporte?

**HISTORIA PERINATAL**(contestar sí/no, mucho o un poco, ↑↓ o texto libre)**Gestación**

Controlada en

Complicaciones

Teratógenos

Movimientos fetales (inicio, intensidad)

Screening bioquímico

¿Cariotipo prenatal?

Ecografías (hallazgos)

**Parto**

Presentación

Modo de parto

Apgar

Peso RN

Talla RN

PCefálico RN

Complicaciones

**HISTORIA MÉDICA** (contestar sí/no, mucho o un poco, ↑↓ y tipo cuando proceda, también texto libre si hay que elaborar más)**Complicaciones médicas**

Hipotonía neonatal y lactante

Ictericia

Causa

Tratamiento

Lactancia

¿Tomaba bien?

¿Precisó sonda NG?

¿Estreñimiento?

Apetito actual

¿Come mucho?

¿Bebe mucho?

Infecciones

Vía respiratoria

Otitis

Infección urinaria

Malformaciones mayores

Cardiacas

Vía urinaria

Enfermedades intercurrentes

Intervenciones quirúrgicas

Accidentes

Fracturas

Convulsiones (frecuencia, tipo, con o sin fiebre)

Especialistas que le cuidan

Medicamentos

Otras manifestaciones de interés

**Desarrollo psicomotor y aprendizaje**

Sonrisa social

Sedestación

Gateo

Marcha sin apoyo

Primeras palabras

Frases simples

Lenguaje completo

Caídas frecuentes

Poco diestro en andar, correr, saltar

Practica deporte

Habilidad en el deporte

Escolarización

Normal

Normal con ayuda

Especial

Materia más dificultosa

Dificultad Memoria

Lectura

Cálculo

Razonamiento

Dibujo

Cociente de Desarrollo (test utilizado)

Cociente intelectual (test utilizado)

Comportamiento

Atención

Actividad

**Pruebas complementarias realizadas y resultado**

Cariotipo

Otras pruebas genéticas/metabólicas

Ecografía abdominal-renal

Ecocardiografía

Edad ósea (incluir todas las realizadas)

Ecografía cerebral

EEG

Tomografía computarizada cerebral

