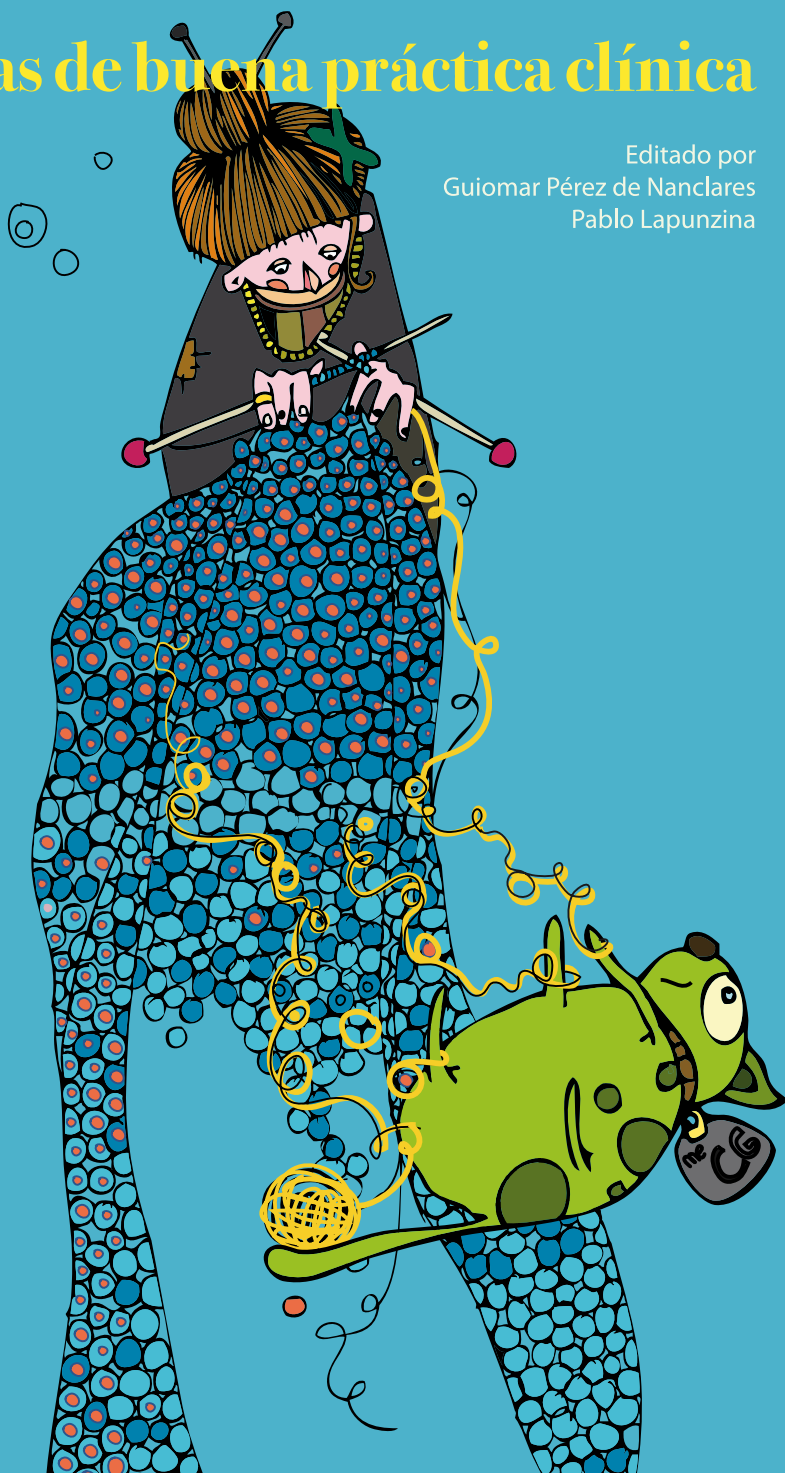


ENFERMEDADES DE IMPRONTA

Guías de buena práctica clínica

Editado por
Guiomar Pérez de Nanclares
Pablo Lapunzina



Avalado por:



ENFERMEDADES DE IMPRONTA

Guías de buena práctica clínica

Editado por:

Guiomar Pérez de Nanclares

Pablo Lapunzina

© Texto y figuras: Todos los autores, 2015
© Diseño portada e ilustración: David Ulibarri, 2015

Depósito legal: BI-1284-2015
ISBN: 978-84-608-2142-7

Esta obra ha sido creada con carácter gratuito. Está absolutamente PROHIBIDA SU VENTA. Agradecemos sea difundida y compartida lo máximo posible para poder satisfacer el objetivo con el que fue creada: dar a conocer estas raras enfermedades de impronta.

ÍNDICE

Prefacio	i
Prólogo	iii
Capítulo 1: Conceptos básicos: Técnicas moleculares para el estudio de enfermedades de impronta <i>Intza Garin, Elena Beristain, Arrate Pereda</i>	1
Capítulo 2: Diabetes neonatal transitoria asociada a 6q24 <i>Oscar Rubio-Cabezas, Guiomar Pérez de Nanclares</i>	29
Capítulo 3: Síndrome Silver-Russell <i>Sixto García-Miñaur, Francisco Martínez, Julio Guerrero-Fernández, Sonia Mayo</i>	47
Capítulo 4: Síndrome de Beckwith-Wiedemann <i>Jair Tenorio, Guiomar Pérez de Nanclares, Julián Nevado, Irene Dapia, Gema Gordo, David Monk, Pablo Lapunzina</i>	67
Capítulo 5: Disomía uniparental del cromosoma 14 y síndromes relacionados <i>Clara Serra-Juhé, Luis A. Pérez-Jurado</i>	93
Capítulo 6: Síndrome de Angelman <i>Miriam Guitart, Cristina Camprubí, Conchita Fernandez, Blanca Gener, Elisabeth Gabau</i>	113
Capítulo 7: Síndrome de Prader-Willi <i>Elisabeth Gabau, Neus Baena, Assumpta Caixàs, Ramon Novell, Miriam Guitart</i>	147
Capítulo 8: Pseudohipoparatiroidismo <i>Beatriz Lecumberri, Intza Garin, Guiomar Pérez de Nanclares</i>	181
Capítulo 9: Causas y consecuencias de los defectos de metilación en múltiples loci en trastornos asociados a la impronta genómica <i>Marta Sanchez-Delgado, Alex Martin Trujillo, Isabel Iglesias-Platas, David Monk</i>	223
Capítulo 10: La voz del paciente	
<i>Asociación Española de Síndrome de Beckwith-Wiedemann</i>	259
<i>Asociación de Síndrome de Angelman</i>	261
<i>Asociación Española para el síndrome de Prader-Willi</i>	267
<i>Asociación Española de Pseudohipoparatiroidismo</i>	269

PREFACIO

En los últimos años, las enfermedades debidas a alteraciones del imprinting genómico han cobrado importancia capital, no sólo en el ámbito de la biología del cáncer, sino también en las enfermedades raras de base genética. Su relevancia ha crecido con la introducción de tecnologías de modificación del ADN, técnicas de recombinación genética, microchips de ADN/ARN y la introducción de técnicas de secuenciación masiva.

Como editores, cuando comenzamos a pensar en escribir este libro, vimos claramente la necesidad de que sea un libro de consulta rápido, estructurado y organizado bajo subtítulos que permitan al lector identificar inmediatamente la patología de imprinting específica, el área específica de consulta y la posibilidad de hallar en cada uno de los capítulos la información compilada y actualizada. Creemos que, dentro de las enfermedades raras, éstas son especialmente desconocidas.

En “Enfermedades de impronta: guías de buena práctica clínica”, nuestro objetivo ha sido actualizar, compendiar, revisar y comunicar a los profesionales de la salud y personas interesadas en el campo de la genética y epigenética los aspectos más importantes de este grupo complejo de enfermedades. Hemos realizado un esfuerzo de síntesis en cuanto a contenido y a la organización del libro para intentar transmitir lo mejor posible la importancia de las enfermedades de *imprinting* y las enfermedades raras con alteraciones epigenéticas. En diez capítulos, con múltiples tablas, figuras y gráficos, y con bibliografía actualizada, el libro aborda las principales patologías asociadas a alteraciones del *imprinting* genómico, con contribuciones de destacados genetistas de nuestro país, expertos en el diagnóstico y seguimiento de estos pacientes.

Esta obra ha salido a la luz gracias al esfuerzo desinteresado de muchas personas e instituciones. Nuestra inmensa gratitud a todos y cada uno de los autores de estas guías, que voluntariamente han dedicado su tiempo y su conocimiento para que otros profesionales podamos estar al tanto de las últimas novedades en cada una de estas enfermedades; a ellos, que han tenido una paciencia infinita con la presión a las que les hemos sometido para cumplir los plazos y una comprensión extrema para escuchar todas nuestras sugerencias sobre el texto que con tanto amor han

preparado. Gracias, por tanto a Neus Baena, Elena Beristain, Assumpta Caixàs, Cristina Camprubí, Irene Dapia, Conchita Fernández, Elisabeth Gabau, Sixto García-Miñaur, Intza Garin, Blanca Gener, Gema Gordo, Julio Guerrero-Fernández, Miriam Guitart, Isabel Iglesias-Platas, Beatriz Lecumberri, Alex Martin-Trujillo, Francisco Martínez, Sonia Mayo, David Monk, Julián Nevado, Ramon Novell, Arrate Pereda, Luis A. Pérez-Jurado, Oscar Rubio-Cabezas, Marta Sanchez-Delgado, Clara Serra-Juhé, Jair Tenorio. Gracias por aceptar desde el principio ser parte de esta aventura.

Gracias a David Ulibarri, que con su imaginación y creatividad ha sido capaz de plasmar en la portada el mecanismo tan complejo que subyace en estas raras enfermedades de impronta. Gracias también a Fernando Castillo, de Genzyme, que desde el principio estuvo con nosotros y supo ver y valorar la importancia de que estas guías viesan la luz. A CIBERER, por su apuesta sin condiciones por las enfermedades raras; a la AEGH, por confiar en nosotros y a EUCID, por enseñarnos tanto y hacernos ver la importancia de trabajar juntos para el avance del conocimiento.

Y, por supuesto, a las Asociaciones de Pacientes, cuya voz es tan importante oír y a quienes está realmente dedicado este libro.

Dres. Guiomar Pérez de Nanclares y Pablo Lapunzina

PRÓLOGO

El acto médico, el establecimiento de una relación entre el médico y el paciente, es un momento fundamental de la atención sanitaria y es un momento de toma de decisiones, no necesariamente inmediatas pero sobre las cuales se va a fundamentar todo el proceso diagnóstico y terapéutico que pueda llevar a la cura o al cuidado y mejora la calidad de vida de la persona enferma. Es un acto de toma de decisiones que involucra a todos los profesionales sanitarios que participan en el manejo clínico, sea mediante la realización de pruebas complementarias y de laboratorio (aquí se incluyen, claro está, la pruebas genéticas y genómicas), sea para manejo terapéutico global y la orientación psicológica y social, en un proceso de atención integral.

Para poder ofrecer respuestas prácticas a las preguntas y necesidades de los pacientes, el médico y los profesionales biosanitarios han de conocer la enfermedad y sus variantes en función del modo de enfermar el individuo. La mejor manera de llegar a un diagnóstico y ofrecer un tratamiento y un plan terapéutico es conocer la biología de la enfermedad y su efecto en cada persona. En este proceso acerca de la fisiopatología el primer punto es saber cuáles son la(s) causa(s) biológica(s) que la originan y cómo la originan en una persona concreta, incluso en una familia cuando la patología es hereditaria. La enfermedad genética se caracteriza porque la causa primaria reside en una mutación en los genes o el genoma del individuo. Esta mutación es una variación genética que conduce a una función anómala del organismo y a una mala adaptación a su entorno ambiental de la persona portadora. Hay muchos tipos de mutaciones y variantes genéticas de susceptibilidad, desde mutaciones puntuales que afectan a un par de bases nucleotídicas en la doble cadena de ADN a alteraciones cromosómicas, pasando por reordenamientos genómicos por debajo de las 3-5 megabases. Los conceptos de la genética tradicional mendeliana sugieren que la mayoría de los genes se expresan por igual tanto cuando se heredan del linaje materno como del paterno. Las excepciones a esta regla han venido siendo los genes en el cromosoma X que son susceptibles a la inactivación, por el fenómeno de lyonización, y los genes de las inmunoglobulinas sujetos a la exclusión alélica, un fenómeno que resulta en la expresión monoalélica de una cadena de inmunoglobulina particular mediante la conexión y desconexión de la expresión

de los alelos de los progenitores. La impronta genómica se produce cuando la expresión fenotípica de un gen depende del origen parental de ciertos genes o, en algunos casos, regiones enteras de cromosomas. En esta situación biológica el que un gen se exprese o no depende del sexo del progenitor de quien proviene la copia genética. Las enfermedades por impronta tienen su causa en este fenómeno que acontece durante el desarrollo y afecta a la herencia de los caracteres humanos. El conocimiento de los mecanismos de la impronta genómica deviene así fundamental para comprender cómo se produce la enfermedad, qué aspectos biológicos y qué dianas moleculares son de interés para el diagnóstico y tratamiento, y cómo hemos de manejar el asesoramiento genético.

El libro ‘Enfermedades de Impronta – Guías de Buena Práctica Clínica’ compilado por los Dres. Guiomar Pérez de Nanclares y Pablo Lapunzina, quiere ser una respuesta a las cuestiones que se plantean en la praxis médica integral de los niños y adultos afectados por estos trastornos que comparten un proceso biológico y causa genética comunes aunque la consecuencia clínica y fisiopatológica sea distinta. Y todo ello con el ánimo de ofrecer apoyo a los profesionales sanitarios no especialistas, tanto en el ámbito de la atención primaria como especializada, y a las familias.

En un primer capítulo se aborda la biología y la genética/epigenética del fenómeno de impronta génica o genómica, con indicación de las técnicas moleculares que permiten el diagnóstico genético. Los capítulos dedicados a las distintas enfermedades consideradas están estructurados para ofrecer una comprensión amplia y completa de los aspectos clínicos y genéticos de las mismas. En cada uno de ellos se indican las manifestaciones clínicas y su evolución y evaluación temporal a lo largo de la historia natural, la variabilidad fenotípica, el manejo clínico y terapéutico, el diagnóstico y el diagnóstico diferencial, la genética y herencia, los aspectos moleculares y los mecanismos de producción genéticos y epigenéticos subyacentes, la correlación genotipo-fenotipo y el asesoramiento genético.

En cada capítulo los autores han hecho un esfuerzo por reflejar el conocimiento actual de la enfermedad, tanto por lo que corresponde al fenotipo y la acción clínica, diagnóstica y terapéutica, como por mostrar los mecanismos moleculares y las consecuencias de todo ello en el consejo o asesoramiento genético. Se ha puesto especial hincapié en resaltar los diferentes momentos vitales del niño considerando que el proceso es evolutivo y qué es fundamental conocer e investigar, pues, en la historia natural de la enfermedad en cada individuo. Todo ello sustentado en una amplia revisión de la literatura científica y médica.

Los autores trabajan en diversos centros hospitalarios distribuidos por la geografía española, ejercen la práctica genética en la clínica pediátrica o genética, en el

laboratorio... Representan las diferentes maneras de acercarse al fenómeno de la enfermedad genética, esto es, el pediatra –médico especialista en el niño y el adolescente–, el genetista clínico que se interesa por los pacientes con enfermedades y condiciones causadas por variaciones y mutaciones en los genes y los genomas, el profesional biomédico que hace posible escudriñar los genes en los laboratorios de citogenética, de genética molecular, de genética bioquímica, el asesor genético que hace de la comunicación informada el arte de ofrecer al paciente o a sus padres qué riesgos de recurrencia y cómo modificarlos en el marco de la familia, el investigador que quiere averiguar por qué y cómo la enfermedad aparece y se desarrolla. Este conjunto de profesionales, trabajando en un medio clínico y científico, permiten conocer mejor las enfermedades genéticas por mecanismo de impronta, ofrecer diagnóstico y asesoramiento, mejorar la calidad de vida de los pacientes y su familia.

Las enfermedades las padecen las personas y ellas participan en todo su proceso vital. En este libro las personas, las asociaciones de pacientes que se preocupan por ellas, también nos dicen qué quieren y cuáles son sus preocupaciones, sus ocupaciones y sus necesidades. Los pacientes han de participar en todo aquello que les incumbe, junto con los profesionales, del proceso clínico, de los proyectos de investigación, de las decisiones de política sanitaria. Y esto es bueno y necesario. Y en este libro esto se tiene en cuenta... esperemos que cree impronta.

Francesc Palau

*Hospital Sant Joan de Déu y CIBER de Enfermedades Raras
Barcelona*



Capítulo 1: CONCEPTOS BÁSICOS: TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDADES DE IMPRONTA

Intza Garin, Elena Beristain, Arrate Pereda

Laboratorio de (Epi) Genética Molecular. Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, Instituto Nacional de Investigación BioAraba, Vitoria-Gasteiz

1. Introducción

El término “epigenética”, introducido en 1942 por Conrad Hal Waddington, describía la forma en que la acción de los genes y su expresión influía para originar un fenotipo determinado¹. Actualmente el concepto ha evolucionado y la epigenética se define como la ciencia encargada de estudiar la regulación de la expresión de genes durante el desarrollo y la proliferación celular, por medio de procesos que no cambian la información contenida en el material genético, pero que modulan la expresión génica a través de modificaciones específicas relacionadas con la remodelación de la cromatina (variaciones en los patrones de condensación de la cromatina), por modificaciones covalentes de las histonas y el grado de metilación del ADN². Precisamente *Epi* significa *Sobre*: es lo que está sobre la genética. De todos es bien sabido que la mitad del material genético de cada individuo es de origen paterno y la otra mitad de origen materno, y que para el

desarrollo correcto es necesaria la presencia del ADN procedente de ambos progenitores. Así como la mayoría de los genes son expresados independientemente de su origen parental, existe un número reducido de ellos que son regulados y transcritos de manera mono-alélica. Para estos genes, denominados genes improntados (marcados), su patrón de expresión y regulación es dependiente de su origen parental, es decir, se comporta de una manera distinta si su origen es paterno o materno^{3,4} (Figura 1).

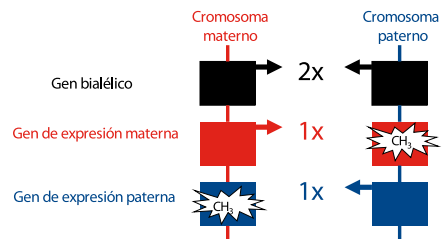


Figura 1: Funcionamiento normal de un gen bialélico (ambos alelos se expresan) y genes improntados (sólo se expresará el alelo que no esté improntado o metilado). La “marca” CH₃ representa el grupo metilo que impronta ese gen, silenciándolo. Imagen adaptada de Hitchins et al.⁴

En el establecimiento de la impronta genómica, la metilación del ADN juega un papel fundamental^{5,6}; siendo una de las modificaciones epigenéticas mejor estudiadas. Tal y como constata la definición de epigenética, la impronta o marcaje genómico no supone cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN en esos genes, sino que ésta se produce por la adición de grupos metilos (-CH₃) a los residuos de citosina de los dinucleótidos formados por citosina y guanina (CpGs). Estos dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente a lo largo del genoma, sino que se concentran en las regiones de las secuencias genómicas repetitivas e islas CpG comúnmente asociados con los promotores de genes. Los grupos metilos pueden crear una configuración local de la cromatina que hace los genes inaccesibles y por ello transcripcionalmente inactivos.

El proceso del establecimiento de la impronta ocurre antes de la fertilización, tiene lugar durante la producción de las células germinales masculinas o femeninas, y se mantiene sin cambios a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal³. El establecimiento de estos patrones de metilación provoca que, tras la fecundación, ciertos genes sean activos en uno de los cromosomas parentales, pero no en el otro. La consecuencia de esto a nivel genético es la presencia de un único alelo activo para el gen improntado, lo cual tiene implicaciones clínicas cuando hay fallos en la impronta.

Actualmente, se conocen aproximadamente unos 70 genes humanos improntados, la mayoría de

ellos localizados en los cromosomas 6, 7, 11, 14, 15 y 20⁷⁻⁹, de manera que los genes improntados parecen no estar distribuidos al azar a lo largo del genoma, sino que tienden a localizarse en grupos. Este fenómeno de agrupación sugiere que el control primario de la impronta no es a nivel individual del gen, sino a nivel de dominio de cromosomas⁸. De hecho, se han encontrado varias regiones que contienen un elemento que actúa en *cis* llamado centro de impronta (IC, *imprinting center*) o región de control de impronta (ICR, *imprinting control region*)⁷. Estos elementos se caracterizan por marcas epigenéticas diferenciales (metilación del ADN y modificaciones de histonas), y ejercen como sitios de unión para factores de regulación y actúan a distancia para regular la expresión de genes en *cis*⁸.

Tal y como se ha mencionado, a consecuencia de la impronta genómica, sólo uno de los dos alelos parentales de un gen improntado es activo. Por lo tanto, la pérdida de la función del alelo activo no puede ser compensada por el otro alelo. Esto hace que los *loci* improntados sean especialmente vulnerables a las mutaciones⁷. Por otra parte, muchos genes improntados son sensibles a la dosis, es decir, la duplicación del alelo activo también puede ser perjudicial⁷. Sin embargo, una mutación del alelo inactivo no produce consecuencias para el portador de la mutación. Hasta la actualidad, se han identificado trece enfermedades de impronta (las regiones cromosómicas afectadas se indican entre paréntesis): diabetes neonatal transitoria (6q24) (TNDM, OMIM#601410),

síndrome Beckwith-Wiedemann (11p15) (BWS, OMIM#130650), síndrome Silver-Russell (11p15) (SRS, OMIM#180860), síndrome Temple (14q32)¹⁰ (síndrome UPD 14 materna) (OMIM#616222), síndrome Kagami-Ogata (14q32), (síndrome UPD 14 paterna) (OMIM#608149), síndrome Angelman (15q11-13) (AS, OMIM#105830), síndrome Prader-Willi (15q11-13) (PWS, OMIM#176270), Pseudohipoparatiroidismo tipo 1B (20q13) (PHP1B, OMIM#603233), disomía materna del cromosoma 20^{11,12}, pubertad precoz central (15q11, gen *MKRN3*) (PCPB2, OMIM#615346), síndrome de Birk Barel (8q24, gen *KCNK9*) (OMIM#612292), síndrome IMAge (11p15.5, gen *CDKN1C*) (OMIM#614732) y mola hidatiforme

recurrente familiar (19q13.4, gen *NLRP7*) (MHR, OMIM#231090).

Gracias a los avances biotecnológicos, se espera que otros muchos genes que están a la espera de ser identificados se asocien a nuevos síndromes. A medida que se van descubriendo más genes improntados, queda más patente que ejercen su efecto sobre numerosos y variados procesos, incluyendo el crecimiento pre y post-natal, así como el desarrollo de funciones cerebrales y el comportamiento¹³.

Las enfermedades de impronta pueden estar causadas por varios mecanismos: mutación genética, delección o duplicación cromosómica, disomía uniparental (UPD, *uniparental disomy*) y defectos de impronta (Figura 2).

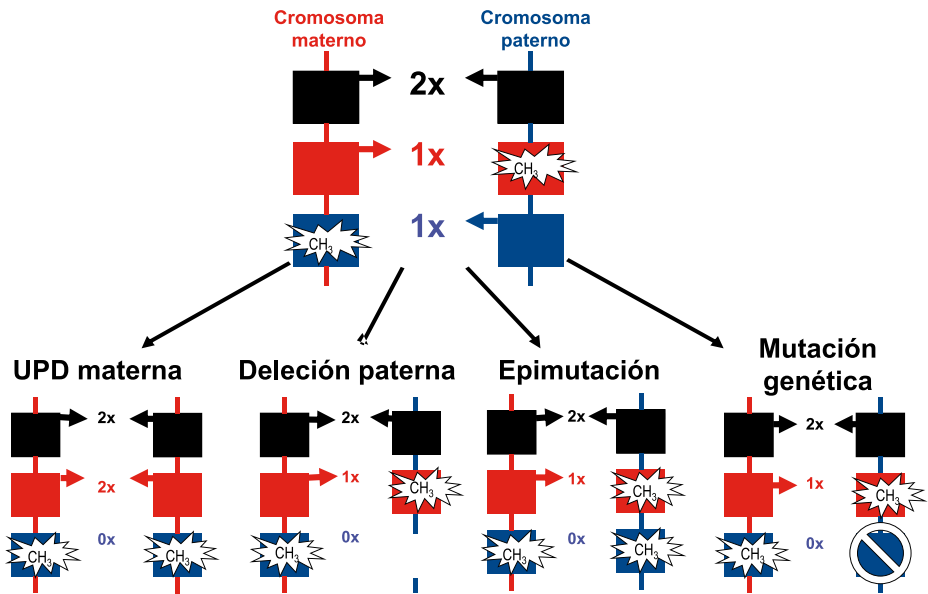


Figura 2: Mecanismos (epi)genéticos que conducen a la aparición de enfermedades de impronta, comparados con el patrón normal. UPD: disomía uniparental, el material genético de ese cromosoma pertenece a sólo uno de los progenitores

1. Mutación genética: una sola mutación de pérdida de función que afecta al alelo activo donde se sitúa el gen improntado conduce a una pérdida completa de la función de ese gen.
2. Duplicación o deleción cromosómica: el cambio en número de copia en el alelo activo donde se sitúa el gen improntado conduce a una pérdida completa de la función o una doble dosis de este gen.
3. Disomía uniparental: se refiere a una situación en la que ambas copias de un par de cromosomas proceden de un mismo progenitor. En muchas ocasiones, el fenómeno de UPD es el resultado de eventos de no-disyunción meiótica de los cromosomas⁷. Este mecanismo conlleva la pérdida completa de la función o una dosis doble de una región improntada, dependiendo del origen parental de los dos cromosomas y el estado de metilación de la región en el cromosoma donde se ha originado la UPD. Las UPDs pueden ser de 2 tipos: isodisomía (se hereda el cromosoma homólogo de un progenitor y éste se duplica, por tanto los 2 cromosomas heredados son idénticos) o heterodisomía (se heredan los 2 cromosomas homólogos de un progenitor y por tanto, los 2 cromosomas son diferentes).
4. Defectos de impronta: son defectos en el establecimiento o en el mantenimiento de la impronta. Una huella equivocada conduce a la

activación de un alelo que debería estar en silencio o al silenciamiento de un alelo que debería estar activo. Los defectos de impronta pueden ocurrir espontáneamente, sin ningún cambio en la secuencia de ADN (defecto de impronta primario) o como resultado de una mutación en un elemento regulador en *cis* o un factor que actúa en *trans* (defecto de impronta secundario). Considerando que una mutación en un elemento del centro de impronta (IC) afecta sólo a una región determinada, una mutación en un factor que actúa en *trans*, como por ejemplo *ZFP57*, a menudo conduce a defectos de metilación en múltiples *loci*¹⁴.

Excepto las mutaciones en el ADN de un gen improntado, el resto de los mecanismos conducen a aberraciones en el patrón de metilación del ADN. Por lo tanto, el análisis de metilación del ADN de regiones diferencialmente metiladas (DMRs, *differentially methylated regions*) es una prueba de diagnóstico primordial para las personas con sospecha de una enfermedad de impronta.

Hoy en día existen numerosos métodos y técnicas para el estudio del estado de metilación. Algunos de ellos se centran en análisis de regiones individuales o *locus*, otros en el análisis paralelo de varios *loci* y otros en cambio, en el estudio de la metilación de todo el genoma, lo que se conoce como metiloma. Al igual que se lanzaron los microarrays de expresión y revolucionaron el estudio de la regulación transcripcional, las apremiadas y continuas mejoras de las

tecnologías están permitiendo que cada vez más investigadores utilicen las plataformas de alto rendimiento para evaluar el metiloma. Sin embargo, la enorme cantidad de datos generados por este tipo de tecnología conlleva importantes desafíos relativos al manejo, análisis e interpretación de toda esta información. El cuello de botella actual de los procesos basados en tecnologías de secuenciación masiva ya no se encuentra en el propio proceso del experimento en sí, sino en la gestión y el análisis computacional de la información obtenida de estas plataformas¹⁰. Por ello, actualmente el mayor reto reside en sintetizar e interpretar de forma fiable esta gran cantidad de datos crudos, y que a la vez favorezcan la obtención de un diagnóstico fiable y eficaz. Por lo tanto, este tipo de aproximaciones, aunque altamente informativas, son caras y laboriosas y están más allá de las capacidades de la mayoría de los laboratorios. De modo que, para fines clínicos y de diagnóstico se requieren técnicas fáciles de realizar y además de bajo coste. Además, los cambios en la metilación identificados en experimentos de microarrays o de secuenciación masiva, por ahora, siguen requiriendo la validación por uno o más métodos específicos de *locus*.

Por todo ello, el objetivo de este capítulo no consiste en abarcar todas las técnicas existentes para el estudio de la metilación del ADN, sino la descripción de las técnicas más empleadas en el diagnóstico rutinario del estado de metilación del ADN en regiones improntadas con implicación clínica.

2. Técnicas diagnósticas para el estudio de la impronta

El análisis de los patrones de metilación del ADN se ha visto significativamente obstaculizado por el hecho de que la información de la metilación no se conserva durante los procesos de amplificación; procesos que forman la base de la mayoría de las técnicas estándar en biología molecular. Éstos incluyen amplificaciones bioquímicas, tales como la PCR, amplificaciones biológicas mediante clonación en *Escherichia coli*, y amplificación de señal por hibridación de sondas.

A lo largo de los años se han desarrollado diversos métodos para analizar la metilación del ADN, sin embargo todos ellos se basan en uno de los tres principios básicos para la detección de la metilación:

1. Digestión por enzimas de restricción sensibles a metilación
2. Modificaciones químicas mediante conversión por bisulfito dependiente de la metilación de los residuos de citosina.
3. Interacción de proteínas con las citosinas metiladas: el ADN previamente fragmentado en tamaños de entre 200-1500pb se precipita con la ayuda de proteínas que reconocen las citosinas metiladas. El complejo formado se captura por técnicas estándar de precipitación (agarosa, esferas magnéticas u otra matriz apropiada). Su baja especificidad

y sensibilidad limitan su uso con valor diagnóstico, por lo que no detallaremos dicha metodología en este capítulo.

En este capítulo hemos agrupado los diferentes métodos, fundamentalmente, en función de estos principios básicos que se emplean. No obstante, ya que algunos protocolos se basan en una combinación de varias técnicas, no siempre es posible una separación clara. Además, aunque muchas técnicas se centraron inicialmente en el análisis de CpGs individuales, posteriormente han ido adaptándose al análisis simultáneo de varios *loci*. Por lo tanto, varias de las técnicas básicas descritas en este capítulo son adecuadas tanto para el estudio de un único *locus* como para un análisis más amplio de varias regiones del genoma. Asimismo, las técnicas pueden dividirse en cualitativas y cuantitativas. Así pues, el objetivo de este capítulo es presentar una visión general de las técnicas diagnósticas más adecuadas para el estudio de la metilación.

2.1. Técnicas basadas en la digestión por enzimas de restricción sensibles a metilación

Las endonucleasas de restricción han sido una herramienta fundamental en la biología molecular, ya que reconocen secuencias diana específicas y cortan el ADN de una manera determinada. Curiosamente, la actividad de escisión de muchas enzimas de restricción depende también de modificaciones

del ADN en su secuencia de reconocimiento. Si una enzima es sensible a la metilación de un residuo de citosina en un dinucleótido CpG en su secuencia diana, esto puede ser utilizado para el análisis de metilación¹⁵. Así, la primera generación de ensayos de detección de la metilación emplea la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción sensibles a la metilación¹⁶⁻¹⁸.

En la práctica, como control de la digestión se utilizan isoesquízómeros (enzimas con la misma secuencia de reconocimiento, aunque puede que no corten en la misma posición). Las enzimas de restricción más utilizadas son los isoesquízómeros *HpaII* y *MspI*, que reconocen la secuencia 5'-C[^]CGG-3' (siendo [^] el lugar de corte de la enzima), pero mientras que la enzima *HpaII* es sensible a la metilación (cuando las citosinas del dinucleótido CpG están metiladas no reconoce su lugar de restricción y en consecuencia no lo digiere), la enzima *MspI* es insensible a la metilación de las citosinas (digerirá independientemente del estado de metilación)^{19,20}. Por lo tanto, después de dividir el ADN en dos alícuotas, una se digiere con una enzima sensible a la metilación del ADN (*HpaII*), mientras que la segunda alícuota se mantiene sin digerir, o se incuba con una enzima que reconoce la misma secuencia pero que corte independientemente del estado de metilación del ADN (*MspI*) (Figura 3). Posteriormente, el patrón de restricción del ADN generado por estas enzimas puede ser analizado y comparado por numerosos métodos:

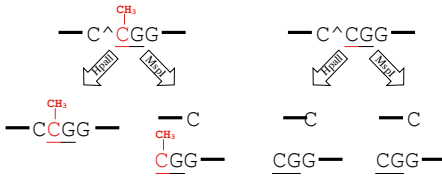


Figura 3: Principio del proceso de digestión por enzimas de restricción sensible (*HpaII*) e insensibles (*MspI*) a metilación. En presencia de metilación, la enzima *HpaII* no podrá reconocer su sitio de restricción y no cortará su secuencia de reconocimiento, mientras que la enzima *MspI* cortará el ADN independientemente de su estado de metilación.

2.1.1. Southern-blot

Quizás sea el método más fácil para analizar la metilación del ADN de CpG específicos después de que los fragmentos de ADN se hayan separado mediante electroforesis²¹. El producto de la digestión se somete a electroforesis en gel de agarosa para separar los distintos fragmentos de ADN generados por la digestión enzimática. A continuación los fragmentos de ADN de doble cadena son parcialmente hidrolizados con un ácido débil y desnaturalizados con NaOH para permitir la transferencia. Posteriormente, el ADN es transferido a un filtro de nitrocelulosa, con lo que en el filtro queda representada una réplica de la disposición de los fragmentos de ADN presentes en el gel. Finalmente, el filtro se incuba con sondas marcadas (radiactivamente o con un fluorocromo) específicas de las regiones de interés. La sonda unida al fragmento de ADN complementario se puede visualizar en el filtro de una forma sencilla mediante una exposición

a una película de rayos X para el caso de sondas radiactivas o con una película sensible a la luz, para el caso de sondas con fluorocromo^{22,23}. La banda marcada adquiere una posición determinada por el tamaño del fragmento del ADN, de modo que se diferenciará el ADN que ha sido sometido a la digestión y el que no se ha digerido.

A pesar de que se trata de una técnica fácil y sencilla, es tediosa y requiere una gran cantidad de ADN de partida, es por ello que esta estrategia ha sido sustituida en la mayoría de los laboratorios por técnicas más eficientes.

2.1.2. PCR + electroforesis

Después de digerir el ADN genómico con enzimas sensible e insensibles a metilación (*HpaII* y *MspI*, respectivamente) se realiza una amplificación por PCR (o reacción en cadena de la polimerasa) con cebadores o *primers* situados fuera de las secuencias de reconocimiento de dichas enzimas. La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) consiste, en resumen, en sintetizar múltiples copias de un fragmento de ADN específico. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN en sentido 5'-3' complementaria a otra ya existente. Para ello requiere un par de oligonucleótidos cebadores (*primers*) en cada extremo de la secuencia que queremos amplificar y que existan deoxinucleótidos trifosfatos (dNTP) en el medio de reacción que son la materia base para la síntesis del

ADN²⁴. La PCR amplificará siempre y cuando el ADN no haya sido digerido por las enzimas de restricción. Finalmente se testa el producto de la PCR en un gel de agarosa (Figura 4). Debido a que se trata de una técnica cualitativa (presencia o ausencia de producto), junto con la PCR previa se amplifica otra región del ADN (que no contenga ninguna secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción y de un tamaño diferente para discernirlo) como control interno de la PCR. Así mismo, en una tercera alícuota se amplifica el ADN genómico no digerido para confirmar que la ausencia de amplificación no se deba a una delección de la región improntada a analizar.

Se puede evaluar de manera semicuantitativa la metilación del fragmento amplificado, con una modificación de la técnica descrita

(marcando con un fluoróforo uno de los cebadores de cada fragmento amplificado y parando la reacción de PCR en su fase exponencial). Así, después de la PCR los fragmentos de ADN se separan en un Analizador Genético mediante electroforesis capilar. El porcentaje de metilación se puede calcular como el ratio entre la altura del pico digerido y el no digerido, normalizado con el producto de control interno.

2.1.3. MS-MLPA

Traducido del inglés “amplificación de múltiples sondas dependientes de ligasa y específicas de metilación” (*Methylation-Specific Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), es un método semicuantitativo empleado para medir la metilación del genoma²⁵. Se trata de

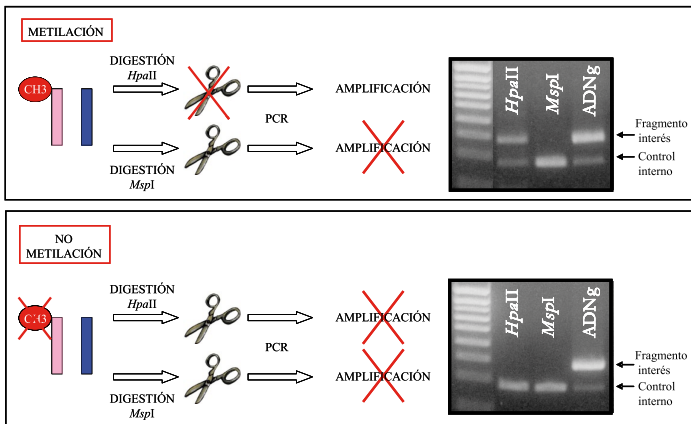


Figura 4: Principio de la metodología de digestión por enzimas de restricción, PCR y posterior análisis por electroforesis en gel de agarosa. Si el ADN es digerido (bien porque se ha empleado la enzima *MspI* o porque no presenta metilación y es cortado por *HpaII*), no podrá ser amplificado por la polimerasa y, por tanto, no se observará una banda de amplificación al testarlo en agarosa. Es importante incluir controles de amplificación de tamaño diferente al fragmento de interés. Se trata de fragmentos de ADN que no contienen secuencias de reconocimiento para las enzimas *HpaII* ni *MspI*, por lo que siempre permanecerán sin cortarse y, tras la PCR; generarán un producto de amplificación

una variante de la técnica MLPA en la que, además de detectar anomalías en el número de copias del ADN, se cuantifica la metilación de secuencias genómicas de interés gracias a la utilización de una enzima de restricción sensible a la metilación. Esta técnica permite en una única reacción de amplificación, aprovechando los diferentes tamaños de las sondas empleadas, detectar copias genómicas anormales hasta en 50 secuencias genómicas, y cuantificar, además, la metilación de ciertas regiones de interés²⁶.

En líneas generales, con esta técnica obtenemos dos tipos de muestras amplificables: una muestra no digerida por la enzima de restricción sensible a metilación, en la que se detecta el número de copias; y otra digerida por la enzima, en la que se cuantifica la metilación. La técnica se puede resumir en 5 pasos, tal y como muestra la Figura 5: 1) desnaturalización del ADN (muestra problema) e hibridación de las sondas a estudio; 2) ligación de las sondas y digestión del ADN, para lo cual la muestra con las sondas hibridadas del paso anterior se divide en dos alícuotas: en una se lleva a cabo la ligación de las

sondas directamente; y en la otra se llevará a cabo, en primer lugar, la digestión del ADN con la enzima de restricción y a continuación la ligación de las sondas; 3) PCR de las sondas hibridadas unidas por la ligasa; 4) separación de los productos amplificados mediante electroforesis capilar; y 5) análisis de los datos.

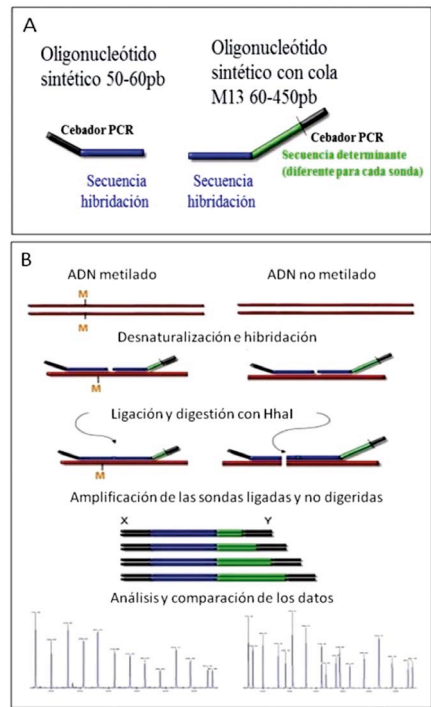


Figura 5: Base molecular de la técnica MS-MLPA, adaptado de www.mlpa.com. **(A) Diseño de las sondas:** Cada sonda está formada por dos fragmentos de oligonucleótidos que hibridan con secuencias de ADN diana adyacentes (en azul). Cada fragmento contiene además una secuencia en el extremo que no hibrida con el ADN diana sino con cebadores universales (*forward* y *reverse*, en gris). Para diferenciar unas sondas de otras en la misma reacción, uno de los fragmentos que compone la sonda contiene una secuencia de tamaño diferente, que tampoco hibrida con ninguna secuencia de interés (en verde). **(B) Metodología:** Para poder detectar las variaciones en el número de copia y en la metilación de una muestra de ADN, la técnica MS-MLPA consta de las siguientes etapas: desnaturalización del ADN e hibridación de las sondas; una vez hibridadas las sondas, la reacción se divide en dos tubos; uno para el análisis de copia y el otro para la metilación. A continuación, se sigue con el proceso de ligación y digestión con la enzima de restricción *HhaI* (este último sólo en el tubo de análisis de metilación) de las sondas hibridadas. Después se realiza una PCR con cebadores universales marcados con fluorocromo; sólo aquellas sondas que se han ligado y que no han sido digeridas por la enzima *HhaI*, podrán amplificarse por PCR. Finalmente, gracias a los diferentes tamaños de cada sonda ligada, el resultado se analiza mediante electroforesis capilar.

Lo característico de esta técnica es que las sondas que miden la metilación se hibridan con regiones del ADN que pueden estar metiladas (regiones CpG) que presentan un sitio de corte para la enzima de restricción *HhaI*. De esta forma, aquellas sondas que hibridan con regiones no metiladas son digeridas por la enzima y como consecuencia no pueden ser amplificadas en la posterior reacción de PCR. Por el contrario, aquellas sondas que hibridan con regiones metiladas, estarán protegidas de esa digestión y darán lugar a productos amplificados detectables tras la electroforesis capilar.

Una de las grandes ventajas de esta técnica es que de manera simultánea se analiza la metilación y el número de copia de la región estudiada, de tal manera que se puede determinar si la alteración de la metilación es debida a una delección/duplicación de la región analizada. Actualmente, se trata de la única técnica que permite ambas determinaciones en un único experimento.

La empresa *MRC-Holland* (Amsterdam, Holanda, www.mlpa.com), desarrolladora de esta técnica, ofrece decenas de *kits* de MS-MLPA que analizan una amplia variedad de regiones genómicas sensibles a la metilación, como son las regiones de impronta. Es por ello que se trata de una herramienta sencilla y de gran utilidad en la detección de enfermedades relacionadas con alteraciones de la impronta.

Aunque las técnicas de análisis de metilación de ADN basadas en enzimas de restricción son relativamente

sencillas y robustas, presentan ciertos problemas. Por un lado, pueden generar resultados falsos positivos debido a la digestión incompleta del ADN, y por otro lado requieren grandes cantidades de ADN no degradado, restringiendo así el uso de estas técnicas. Además, un inconveniente general de estos métodos es su dependencia de la disponibilidad de sitios de restricción informativos en la secuencia de ADN a analizar. Por consiguiente, las CpGs que se sitúan fuera de estas secuencias de reconocimiento, no pueden ser analizadas. Por lo tanto, la sensibilidad y la cobertura de las técnicas basadas en enzimas de restricción, dependen en gran medida del sitio de restricción utilizado y su distribución en la secuencia a analizar. La enzima más utilizada para el análisis de metilación, *HpaII*, cubre sólo el 8% de las CpG del genoma humano; de éstas el 51% se encuentra en los elementos de transposición y el 48% en las secuencias únicas²⁷.

2.2. Técnicas basadas en modificaciones químicas

La segunda generación de técnicas para el análisis de la metilación del ADN surgió a partir del tratamiento del ADN genómico con bisulfito sódico. Publicada originalmente en 1992 por Frommer y colaboradores, la técnica de conversión del ADN mediante bisulfito de sodio ha revolucionado el análisis epigenético^{28,29}. Se trata del *gold standard* para el análisis de metilación del ADN y facilita la identificación y cuantificación de la metilación del

ADN en la resolución de un solo nucleótido. Es por ello que hoy en día, numerosos protocolos se basan en esta técnica, desde el análisis cualitativo de CpG individuales hasta los análisis cuantitativos de todo el metiloma.

La técnica consiste en el tratamiento del ADN genómico con bisulfito de sodio seguido por un tratamiento alcalino, convirtiendo así las citosinas no metiladas en uracilo y dejando las citosinas metiladas intactas^{29,30}. Posteriormente se puede analizar la metilación mediante amplificación por PCR con cebadores diseñados para hibridar con el ADN modificado con bisulfito. Durante la amplificación por PCR, el uracilo se amplifica como timina mientras que los residuos de citosinas metiladas permanecen como citosinas, lo que permite distinguir las CpGs metiladas de las CpGs no metiladas por la presencia de una citosina “C” frente a la timina “T”, respectivamente (Figura 6).

Una ventaja importante de este método es que la integridad del ADN se mantiene. Por lo tanto, casi todas las técnicas utilizadas para amplificar, modificar o analizar el ADN también se pueden realizar con el ADN convertido por

bisulfito. Además, la opción de amplificar el ADN convertido por bisulfito, permite partir de cantidades muy bajas de ADN³¹.

Sin embargo, esta técnica también presenta ciertas limitaciones; para la conversión, el ADN tiene que estar completamente desnaturalizado, y especialmente las regiones de ADN ricas en CpG a menudo pueden no desnaturalizarse completamente, generando una conversión incompleta del ADN. En estos casos, el análisis posterior del tratamiento con bisulfito dará lugar a resultados erróneos, simulando una mayor metilación de la que existe en realidad³¹.

Otra consecuencia desfavorable de la conversión con bisulfito es que la región de ADN que no contenga citosinas metiladas originalmente, contendrá después sólo tres bases, por tanto se reducen las opciones para el diseño de cebadores de PCR.

Una vez generadas las diferencias de patrón de metilación en el ADN convertido, éstas pueden ser reveladas mediante diferentes técnicas. En este capítulo hablaremos de las más empleadas en la rutina diagnóstica.

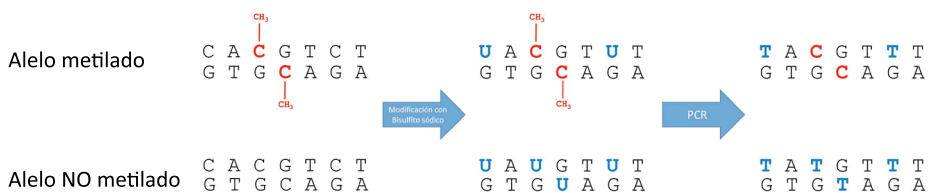


Figura 6: Fundamento de conversión del ADN genómico mediante bisulfito sódico y posterior amplificación por PCR. La citosina metilada queda “protegida” de la modificación química por el bisulfito sódico y, por tanto, se mantiene como tal. Sin embargo, la citosina no metilada es convertida en uracilo tras la modificación y de nuevo a timina, tras la amplificación por PCR.

2.2.1. Secuenciación alelo específica del ADN bisulfitado

Se trata de la técnica gold standard para la asignación alelo-específica de la metilación en la región amplificada por PCR después de la conversión con bisulfito²⁹. Consiste en amplificar el ADN bisulfitado usando cebadores que no solapan con los CpG, de modo que tanto el alelo metilado como el no metilado se amplifican. A continuación, el producto de PCR se liga a un vector de clonación y se trasforma a células competentes, que se dejan crecer en placas de agar. A continuación se seleccionan individualmente y se crecen en medio LB. Posteriormente, se aísla el ADN plasmídico y se secuencia (Figura 7), pudiendo identificar si el amplificado clonado estaba metilado (veremos una C) o no metilado (veremos una T) en cada una de las regiones CpG estudiadas.

Si se secuencia (véase apartado 3.3 para técnica de secuenciación) un número suficiente de clones, este método puede ser cuantitativo. Como cada clon representa un solo alelo, los datos proporcionan información sobre la metilación de cada CpG de la región amplificada de un alelo específico. El inconveniente de esta técnica es que es muy laboriosa y costosa para grandes cantidades de muestras.

2.2.2. Amplificación por PCR específica de metilación (MS-PCR)

Se trata de una reacción de PCR realizada con diferentes parejas de cebadores, una específica para el alelo

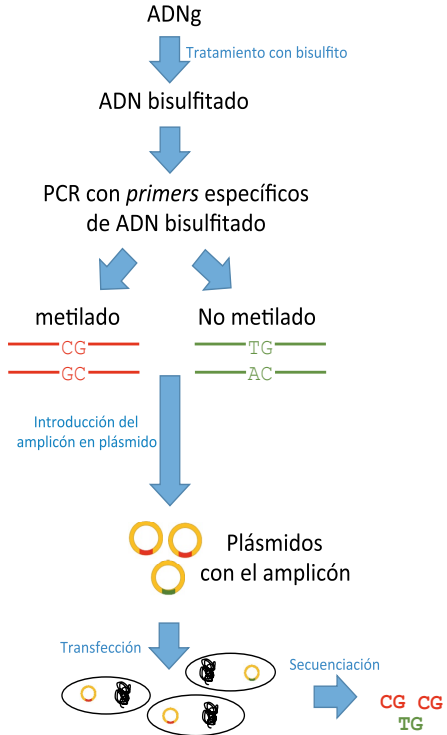


Figura 7: Principio de la secuenciación alelo específica del ADN bisulfitado. En un primer paso, el ADN genómico se trata con bisulfito. Posteriormente se realiza una PCR con primers específicos que se unirán al ADN bisulfitado, y que se diseñan para que hibriden fuera de las CpG. De esta manera, tras la reacción de PCR tendremos dos tipos de fragmentos: amplicones que contienen los alelos inicialmente metilados y que presentarán citosina (C) en las CpG, y amplicones que contienen los alelos inicialmente no metilados, que llevarán timina (T). Estos fragmentos o amplicones se introducen dentro de un vector de clonación, generalmente un plásmido, para introducirlos después en bacterias. Cada bacteria sólo es capaz de captar un único plásmido, de manera que cuando crecer en un medio de cultivo, cada colonia de bacterias tendrá un mismo fragmento introducido (el que contiene CG o TG). Generalmente se analizan unas 100 colonias para determinar con cierta confianza el porcentaje de metilación de la región analizada. Una vez crece la suficiente cantidad de bacterias, se aísla el ADN plasmídico y se secuencia la región de interés, obteniendo la información de cuántas C o T hay en cada isla CpG analizada.

metilado y otra para el no metilado³². Dado que todas las citosinas no metiladas se convierten en uracilo y las metiladas se mantienen tal cual, la secuencia de hibridación de los cebadores debe incluir los CpG que nos interesa analizar. Por lo tanto, una PCR se realiza con cebadores específicos de metilación y una segunda PCR con cebadores específicos para el ADN no metilado (Figura 8A). Además, si los cebadores abarcan más de una CpG, es necesario validar el efecto de cada una de ellas en la hibridación del cebador

y en los resultados finales. El impacto del estado de metilación de cada CpG en la hibridación del cebador es difícil de prever, ya que un único desajuste en la secuencia puede conllevar una mala hibridación del cebador, con el consiguiente efecto en la amplificación. Por tanto, el análisis de múltiples CpGs en el sitio de unión del cebador aumenta la especificidad de la técnica, únicamente si todos ellos muestran el mismo estado de metilación.

Los resultados de la MS-PCR se pueden visualizar por electroforesis

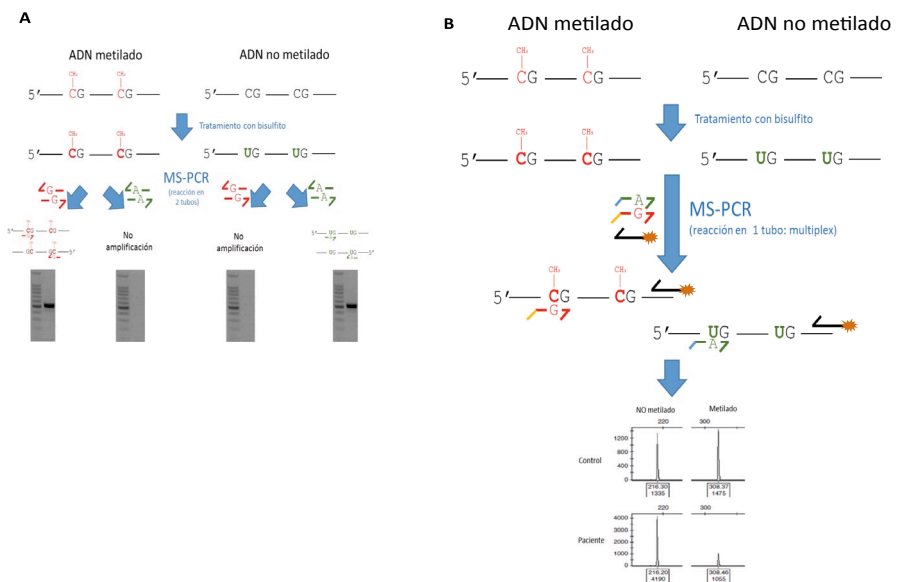


Figura 8: Base de la metodología de MS-PCR. **(A)** Una vez modificado el ADN genómico con bisulfito, se realiza una PCR con dos parejas de *primers* diferentes, una pareja específica para unión a las CpG metiladas (hibrará con CG) y otra pareja específica para hibridar con CpG no metiladas (TG). De modo que se realizan dos PCR independientes, cada una con una pareja de *primers* diferente. El resultado (presencia/ausencia de metilación) se puede visualizar fácilmente en un gel de agarosa. **(B)** En este caso, sólo hay una reacción de PCR que contiene tres *primers* diferentes: uno común para el alelo metilado y el no metilado (libre de CpG), que estará marcado con un fluoróforo (estrella); y dos *primers* específicos (uno que hibrida con el alelo metilado y el otro con el no metilado). Estos dos *primers* específicos, además, tienen una secuencia (cola, en amarillo y en azul) añadida en el extremo 5' que no hibrida con los nucleótidos adyacentes, y que sirve para discernir, en tamaño, el fragmento metilado del no metilado. El resultado de la PCR se analiza mediante una electroforesis capilar, que permite determinar el porcentaje de metilación comparando el ratio de la altura del pico de cada fragmento (metilado/no metilado) frente a controles sanos.

en gel de agarosa (Figura 8A). De modo que, se trata de un método fácil de ejecutar y sin necesidad de equipamiento especial, por lo que es una herramienta interesante para el análisis de metilación de un pequeño número de CpGs. Sin embargo, la MS-PCR ofrece solamente datos cualitativos. Además, es necesario establecer el umbral de metilación del ADN que conduce a determinar si los resultados son positivos o negativos (metilado/no metilado)³¹. Sin fijar este umbral de metilación, la técnica de MS-PCR podría fácilmente dar lugar a resultados erróneos, especialmente en el análisis de genes que muestran una metilación intermedia, ya que no se trata de una decisión simple de positivo o negativo, y con esta técnica no se pueden determinar niveles de metilación absolutos³³. Por lo tanto, la técnica de MS-PCR tiene que estar implementada con cuidado y los resultados tienen que interpretarse con cautela, especialmente si se realiza con fines de diagnóstico clínico.

Del mismo modo que se ha descrito en el apartado de la digestión enzimática, se puede evaluar de manera semicuantitativa la metilación de los fragmentos amplificados, marcando con un fluoróforo uno de los cebadores. En este caso, el alelo metilado y el no metilado se puede amplificar en una misma reacción, ya que mediante la electroforesis capilar, la diferencia de tamaño de los productos se puede discernir incluso en 1pb. De modo que, cada reacción de PCR contiene un primer marcado con fluorescencia (común tanto para el alelo metilado

como el no metilado, y por tanto tiene que estar libre de CpGs) y 2 cebadores diferentes (uno para el alelo metilado y el otro para el no metilado) que contengan CpGs (Figura 8B) y que se diferencien en tamaño mediante una cola en el extremo 5' que no hibrida con la secuencia³⁴⁻³⁶. El grado de metilación se calcula como el ratio entre la altura del pico no metilado vs. el metilado (Figura 8B), y normalizado frente a controles sanos (5 controles por experimento).

2.2.3. MS-SNuPE

Conocida como extensión del cebador en un único nucleótido sensible a la metilación (*Methylation-Sensitive Single-Nucleotide Primer Extension*), esta técnica se basa en la tecnología SNaPshot® Multiplex^{37,38} (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Consiste en amplificar el ADN bisulfitado con cebadores específicos de la región de interés y que no contengan CpGs, de modo que se amplifica tanto el ADN metilado como el no metilado. Una vez purificado el producto de PCR, se desnaturaliza y se añade lo que se conoce como el *primer* de elongación (*primer* SNuPE) que se hibrida justo en el nucleótido adyacente a la CpG que se quiere estudiar. Posteriormente, se añaden ddCTPs y ddTTPs para poder analizar y cuantificar la metilación de esa CpG (Figura 9). De modo que esta técnica limita el estudio a CpGs individuales. Para la cuantificación, se mide la altura del pico metilado (azul-si ha añadido ddCTP) y del pico no metilado (rojo-si se ha añadido ddTTP), y se calcula el índice de metilación (IM;

IM=alelo metilado / (alelo metilado + alelo no metilado), normalizado frente a controles sanos)³⁹.

Una gran ventaja de la MS-SNuPE es que permite analizar múltiples CpGs en una única reacción, independientemente de su posición en el genoma, empleando diversos

primers de elongación (*PCR multiplex*) de tamaño diferente. Para realizar una *PCR multiplex* con *primers* que tengan la misma temperatura de *melting* (*T_m*), éstos se diseñan con el mismo número de nucleótidos, consiguiendo la diferencia de longitud mediante la adición de colas inespecíficas poliAT en el extremo 5' del *primer*. Se recomienda que los cebadores difieran entre sí unos 4-6 nucleótidos.

Así, MS-SNuPE representa un método adecuado y económico para el diagnóstico clínico simultáneo de diferentes trastornos de impronta. Sin embargo, y al igual que otras técnicas, no permite distinguir entre una disomía uniparental, una delección/duplicación o un defecto aislado de la metilación.

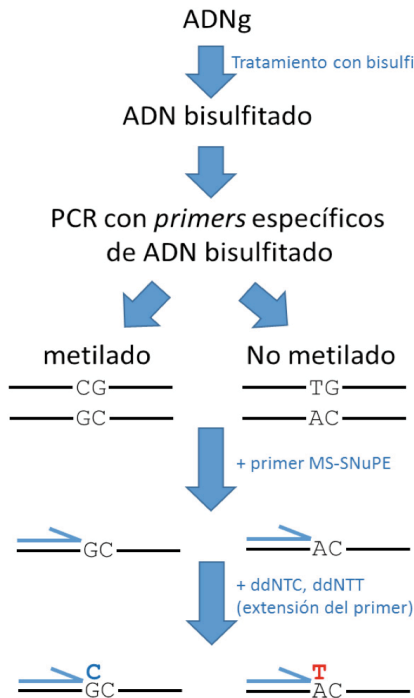


Figura 9: Principio de la técnica de MS-SNuPE. Imagen adaptada de Gonzalzo ML & Jones PA⁸⁰. El ADN bisulfitado se amplifica con *primers* que no contengan CpGs, de modo que se amplifica tanto el ADN metilado como el no metilado. Posteriormente el producto de PCR se desnaturaliza y se añade el *primer* de elongación, que hibrida justo en el nucleótido anterior a la CpG que se quiere estudiar. Después, se añaden ddCTPs y ddTTPs marcados fluorescentemente para poder analizar y cuantificar la metilación de esa CpG. En función de la fluorescencia obtenida sabremos qué ddNTP se ha añadido y, en caso de estar ambos presentes, el ratio de la fluorescencia nos permite establecer el porcentaje de metilación para esa CpG.

2.2.4. Pirosecuenciación

Es una tecnología de secuenciación de ADN basada en el principio de secuenciación por síntesis. La detección de esa síntesis, que se monitoriza a tiempo real, se lleva a cabo mediante bioluminiscencia. Se trata de una tecnología rápida, sencilla y con buenos resultados partiendo de pequeñas concentraciones de ADN⁴⁰.

En líneas generales, la técnica de pirosecuenciación consiste en la adición secuencial de nucleótidos a un *primer* molde, deduciéndose la nueva secuencia de ADN por el orden de nucleótidos que se van incorporando, que será complementario a la secuencia diana. La actividad de la Taq polimerasa, que incorpora los nucleótidos, se detecta mediante bioluminiscencia, para lo cual se

requiere la utilización de una serie de enzimas y sus sustratos. Estas enzimas son la ATP-sulfurilasa, la luciferasa y la apirasa, que utilizan como sustratos la adenosina fosfosulfato (APS) y la luciferina. Todos ellos deberán actuar de forma simultánea en cada una de las muestras que se vayan a analizar. Con ello se consigue que la adición de cada nucleótido se traduzca en la liberación de una o varias moléculas de pirofosfato (según cuántos nucleótidos iguales se hayan incorporado), que son convertidas a ATP por la enzima ATP

sulfurilasa en presencia de APS. Este ATP es requerido por la luciferasa para la conversión de luciferina en oxi-luciferina que genera una luz visible proporcional a la cantidad de ATPs obtenidos. La presencia de la enzima apirasa es necesaria para degradar los nucleótidos que no se hayan incorporado, para que un nuevo nucleótido pueda añadirse a la mezcla. El aparato analiza la señal de luz transformándola en picos que indican qué nucleótidos y cuántos se van incorporando (Figura 10)⁴¹.

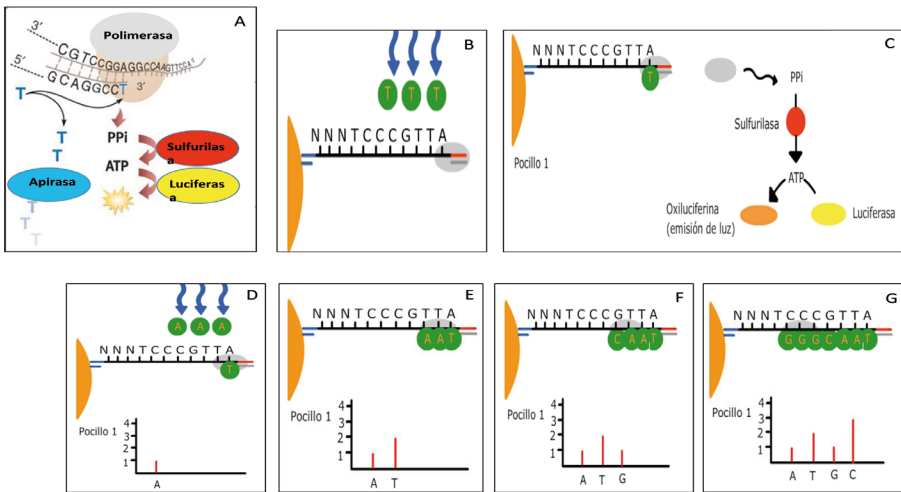


Figura 10: Técnica de pirosecuenciación. Imagen adaptada de Bartolomei MS & Ferguson-Smith AC⁸¹. **(A)** Resumen de la técnica con las enzimas implicadas. **(B)** Comienzo de la reacción: se dispensa el nucleótido complementario a la primera posición a analizar. Por lo general, en cada paso se dispensan tres nucleótidos iguales. **(C)** La polimerasa adiciona ese nucleótido al cebador, liberándose un grupo pirofosfato (PPI), que la sulfurilasa convierte a ATP, siendo utilizado por la luciferasa para emitir luz. Esta luz será proporcional al número de ATPs utilizados (y por tanto, al de nucleótidos incorporados). La apirasa elimina los nucleótidos no incorporados. **(D)** El software interpreta esa emisión de luz y en el pirograma dibuja esa intensidad. Bajo el pico del pirograma, el software representa la base complementaria a la dispensada, que corresponde a la secuencia que se quiere analizar. Se dispensan los nucleótidos correspondientes a la segunda posición a analizar. **(E)** La polimeasa incorpora los nucleótidos complementarios, repitiéndose el proceso representado en la figura (C). En este caso, dado que son dos los nucleótidos incorporados, la emisión de luz será el doble y, por tanto, la gráfica representa un pico con el doble de intensidad. **(F-G)** El proceso continúa con la adición del resto de nucleótidos y la generación del pirograma, donde la intensidad de cada pico es proporcional al número de nucleótidos de ese tipo presentes en la secuencia a analizar.

Una de las aplicaciones de la pirosecuenciación es la cuantificación de la metilación de regiones del ADN susceptibles de metilación. Analiza y cuantifica en un único ensayo la metilación de múltiples regiones CpG. Para ello es necesario partir de una muestra modificada con bisulfito de sodio.

En todos estos métodos basados en PCR, el diseño de cebadores es clave para una amplificación exitosa. Los cebadores para los métodos cuantitativos de PCR post-bisulfito idealmente deben estar libres de las CpGs. Si no es posible debido a la alta densidad de CpGs, se puede incluir un CpG en el extremo 5' del cebador. Estos cebadores degenerados deben ser sintetizados con Y (C/T) en la hebra *forward* y R (G/A) en el *reverse*, de manera que puedan unirse tanto al alelo metilado como al no metilado. Además, los cebadores para PCR post-bisulfito deben contener citosinas suficientes en la secuencia original para evitar la amplificación de ADN no modificado. El problema principal de la PCR post-bisulfito es el sesgo de la PCR, que se debe a que a veces las moléculas de ADN metilado y no metilado amplifican con eficiencias muy diferentes⁴². Para comprobar el sesgo de la PCR, se recomienda realizar para cada ensayo un experimento utilizando cantidades conocidas de ADN genómico metilado y no metilado⁴³.

Además, como ya se ha comentado previamente, la conversión por bisulfito a menudo es incompleta (sobre todo en regiones ricas en CpG), por lo tanto en este tipo de técnicas se requiere

el uso de controles apropiados (ADN completamente metilado y no metilado) junto con el análisis de las muestras que queremos estudiar.

Las vertiginosas y continuas mejoras en la tecnología hacen que el estudio de la metilación del ADN sea cada vez más accesible y emocionante. Indudablemente, no existe un método que sea apropiado para todas las aplicaciones. Por tanto, la comprensión de la base metodológica de cada técnica, junto con la información del sesgo inherente y de los artefactos asociados a cada una de ellas, puede facilitar al investigador la selección del método más apropiado para sus necesidades específicas del estudio.

3. Técnicas diagnósticas para las alteraciones genéticas subyacentes

Tal y como se ha mencionado previamente en este capítulo, las causas subyacentes de las aberraciones en el patrón de metilación pueden ser de diferente naturaleza, y para identificarla es necesario que una vez se detecte la pérdida/ganancia de la metilación, se realicen diversas determinaciones.

3.1. Estudio de ganancias o pérdidas en el número de copia

3.1.1. (MS)-MLPA

Como se ha indicado en el apartado previo, la técnica del MS-MLPA es, a

día de hoy, el único método que permite identificar en un sólo experimento, tanto alteraciones en el patrón de metilación como en el número de copia de la región estudiada. Así pues, si la causa subyacente de una aberración en la metilación fuese una pérdida/ganancia en el número de copia de esa región, mediante esta técnica se podría confirmar en el mismo estudio.

El paso en el que la técnica MS-MLPA detecta alteraciones en el número de copias (MLPA), se basa en la amplificación de un gran número de sondas, de forma simultánea, con el uso de una única pareja de *primers*. Cada una de estas sondas están formadas por 2 oligonucleótidos adyacentes, que se hibridan con sus regiones complementarias de la muestra de ADN a estudio, uniéndose a continuación mediante una ligasa para formar una única sonda. Al presentar cada sonda un tamaño diferente, todas pueden separarse y visualizarse a la vez durante la electroforesis capilar, obteniéndose un electroferograma. La altura relativa de cada pico del electroferograma (correspondiente a cada sonda) al compararla con la altura relativa correspondiente a las sondas de referencia, refleja el número de copia de cada secuencia diana complementaria a cada sonda. La delección de una o más secuencias diana provoca la disminución de la altura del pico correspondiente, mientras que una altura de pico mayor indicaría la presencia de duplicación⁴⁴.

3.1.2. Cariotipo convencional

Se trata de una prueba para examinar cromosomas en una muestra de células, lo cual puede ayudar a identificar problemas genéticos como la causa de un trastorno o enfermedad. Por medio de esta prueba se pueden identificar alteraciones en el número de cromosomas, así como cambios estructurales dentro de ellos^{45,46}.

Para el estudio cromosómico se debe realizar el cultivo de un tejido del individuo donde las células crezcan y se dividan rápidamente. El tejido más accesible para ese fin es la sangre y las células que crecen son los linfocitos. La estimulación de la división celular (durante 72 horas) se logra con la adición de un factor mitogénico como es la fitohemaglutinina⁴⁷. Pasado ese tiempo, se agrega una solución de colchicina al medio para detener la división celular y evitar que las células completen la mitosis⁴⁸. La colchicina actúa inhibiendo la formación del huso mitótico y las células que alcanzan la metafase se acumulan en el cultivo. Luego se agrega una solución hipotónica que provoca que las células se hinchen y se les hace estallar con una técnica de goteo sobre un portaobjeto liberando los cromosomas⁴⁹. Posteriormente el material se fija y se tiñen de acuerdo a las diferentes técnicas. El bandeado G es el más utilizado en citogenética clínica. Se logra con un tratamiento controlado con tripsina antes de la coloración con Giemsa y produce bandas claras y oscuras en los cromosomas. Las bandas oscuras contienen ADN rico en bases A-T que replica tardíamente y son pobres en genes constitutivos y

las bandas claras contienen ADN rico en G-C que replica tempranamente y tienen muchos genes constitutivos^{50,51}.

Se trata de una metodología sencilla y de bajo coste, que permite identificar anomalías numéricas y estructurales (deleciones, duplicaciones, traslocaciones, inversiones) de los cromosomas. Sin embargo, la mayor desventaja del bandeo cromosómico es que está limitado a células en división (cromosomas en metafase), lo que requiere utilizar técnicas de cultivo celular retrasando el diagnóstico. Asimismo, la resolución está limitada a reordenamientos cromosómicos mayores a 5 Mb de tamaño⁵²⁻⁵⁴.

3.1.3. FISH

La hibridación in situ fluorescente (FISH) es una técnica de hibridación que se realiza directamente sobre tejido, células o cromosomas localizados sobre un soporte sólido. El primer paso de la técnica consiste en la desnaturalización del ADN para separar la doble hélice. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés (fragmento de ADN marcado). Las sondas hibridan con las regiones específicas para las que han sido diseñadas. Después, se tiñen los núcleos con un color de contraste inespecífico (generalmente DAPI). Las sondas de ADN pueden marcarse con moléculas fluorescentes denominados fluoróforos (método directo) o no fluorescentes que se detectan con anticuerpos fluorescentes (método indirecto). Por último, se visualiza la muestra preparada bajo

un microscopio de fluorescencia identificando el número de sondas y su localización^{55,56}.

Por tanto, se trata de una técnica mixta de citogenética molecular que permite detectar anomalías cromosómicas estructurales (como las deleciones submicroscópicas) que se encuentran más allá de la resolución de cariotipo de bandeo cromosómico, de manera que incrementa la especificidad, sensibilidad (permitiendo la identificación de alteraciones de hasta 1Kb) y resolución del análisis cromosómico (hasta 1-3Mb)⁵⁷⁻⁵⁹. Según el diseño de la sonda de hibridación específica, el FISH puede ser centromérico, específico de locus, subtelo mérico, de brazos cortos y/o largos, de pintado cromosómico, etc...⁶⁰. Su gran virtud es que permite identificar las células donde se produce la alteración. Otra ventaja respecto al cariotipo convencional es que puede aplicarse sobre células en interfase (no requiere células en división) y facilita su análisis sobre un mayor número de células⁶¹. No siempre es posible tener núcleos fijados en metafase para realizar el FISH, y los resultados obtenidos no serán tan específicos. Sin embargo, el FISH en interfase tiene la ventaja de que no es necesario cultivar previamente las células durante diversos días antes de poder analizar sus cromosomas. Además, cuando las células se encuentran en interfase, la cromatina está en torno a 10000 veces más descondensada que en metafase, lo cual permite una mayor resolución de hasta 190Kb^{51,62}.

3.1.4. Array CGH (aCGH)

La Hibridación Genómica Comparada (CGH) es una técnica de *arrays* utilizada para identificar en una sola hibridación variaciones en el número de copias del genoma (ganancias y pérdidas)⁶³, por tanto, las técnicas basadas en *microarrays* permiten estudiar miles de *loci* simultáneamente.

Una colección (*array*) de ADN consiste en un gran número de moléculas de ADN ordenadas sobre un sustrato sólido⁶⁴. A estos fragmentos de material genético de una sola hebra, inmovilizados en el soporte se les denomina sondas. Los ácidos nucleicos de las muestras a analizar se incuban sobre el panel de sondas, permitiendo la

hibridación de secuencias homólogas. Durante la hibridación, las muestras de material genético se unirán a sus complementarias inmovilizadas en el soporte del *microarray*, permitiendo la identificación y cuantificación del ADN presente en la muestra.

El aCGH se basa en el uso de dos fluoróforos [Cyanine 3-dUTP (Cy3) y Cyanine 5-dUTP (Cy5)] para determinar el cambio en el número de copias del ADN de la muestra a estudio con respecto al ADN control. Así, las muestras de ADN que se vayan a hibridar en un mismo *array*, se deben marcar en paralelo, con Cy3 y Cy5. Generalmente, se recomienda marcar la muestra problema con Cy3 y la muestra de referencia contra la que se

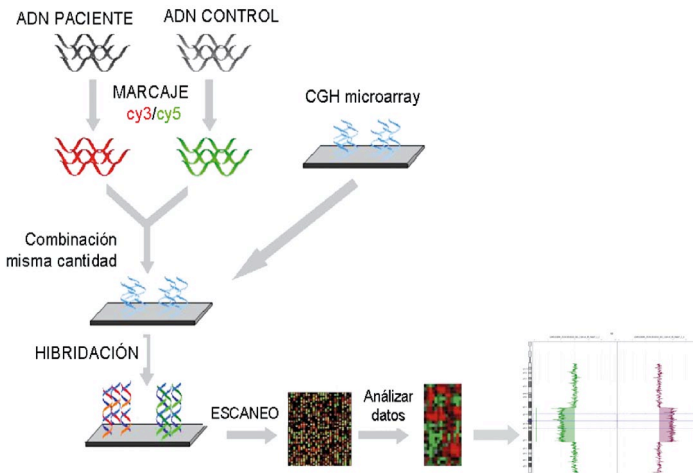


Figura 11: Esquema del proceso de análisis de arrays de CGH. El ADN problema y el ADN control se marcan con diferentes fluorocromos (Cy3 y Cy5, respectivamente). Posteriormente se hibridan ambas muestras de manera conjunta y equimolar con el array donde se localizan las sondas de las regiones a estudiar. Después se escanea y se analizan los datos. Si el ADN problema presenta una pérdida en el número de copia en una región concreta, hibridará más ADN marcado con Cy5 (ADN control) con las sondas del array y al escanear se visualizará un color rojo (correspondiente al Cy5 del ADN control). Sin embargo, si el ADN problema tiene una ganancia, hibridará más ADN marcado con Cy3 y por tanto, al escanear se visualizará un color verde. Si existe una cantidad equivalente de ADN problema y control, la región se visualizará en amarillo. Estas imágenes obtenidas de la emisión de fluorescencia de los diferentes fluorocromos se transforman en subidas (ganancias de ADN) o bajadas (pérdidas de ADN) de líneas gráficas. Figura modificada de www.crp-sante.lu

compara con Cy5. Después de marcar el material genético, se deja hibridar en los *microarrays* durante 16-20 horas. Una vez hibridado, se realizan los lavados correspondientes para eliminar el ADN que no haya hibridado o que se haya unido de manera inespecífica y se deja secar. Posteriormente, se escanea el *microarray* y los datos obtenidos se analizan con los diferentes *software*⁶⁵ (Figura 11).

Es una potente técnica de estudio del genoma completo con una resolución muy superior al cariotipo convencional (100-1000 veces más)⁶⁶⁻⁶⁸. Dicha resolución dependerá de la cantidad de sondas empleadas en el *microarray*. De hecho, existen aCGH de alta resolución que permiten detectar variaciones a una resolución de hasta 200pb⁶⁵. No necesita cultivo celular, se realiza a partir de ADN, acortando así los plazos de entrega de resultados. Además, presenta ventajas importantes con respecto a otras técnicas como FISH o MLPA, ya que permite en un solo ensayo detectar ganancias y pérdidas de material genético a lo largo de todo el genoma

Sin embargo, este tipo de metodología sólo permite detectar alteraciones en número de copias, por tanto, no permite identificar traslocaciones balanceadas u otros reordenamientos equilibrados como las inversiones, al no existir en ellas pérdidas o ganancias de ADN⁶³. Además, mediante aCGH es imposible detectar poliploidías, ya que son cambios globales de material genético, indetectables por los sistemas de normalización de sondas. Asimismo, otra limitación potencial

para el uso del aCGH es el hecho de la aparición de alteraciones en un bajo nivel de mosaicismo, que puede permanecer sin ser detectado⁶⁹.

3.2. Estudio de disomias uniparentales (UPD)

3.2.1. Estudio de microsatélites

Las secuencias de tipo microsatélite (SSR o STR, *Simple Sequence Repeats* o *Short Tandem Repeats*), muy abundantes en los genomas de eucariotas y algunos procariotas, están constituidas por unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, que se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada secuencia STR se define por el tipo de unidad repetida (lo más frecuente mono, di, tri o tetra, aunque también penta o hexanucleótido) y por el sitio que ocupan en el genoma (locus)²⁶. Se trata de secuencias altamente variables, intra e interindividualmente⁷⁰. La variación se manifiesta normalmente como diferencias en longitud entre los distintos alelos del mismo locus. Estas diferencias en longitud surgen de la existencia de un número diferente de repeticiones del motivo básico en cada microsatélite. Se ha estimado que la tasa de mutación en los microsatélites varía entre 10^{-2} y 10^{-5} por generación y el mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo en tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN⁷⁰. Por tanto, esta característica de los microsatélites permite su empleo como marcadores genéticos, ya que a pesar

de que los microsatélites en sí poseen altas tasas de mutación, las regiones flanqueantes están más conservadas y se emplean para la amplificación específica de los alelos de cada locus²⁶.

Así pues, su detección se basa en la amplificación por PCR de la región que los contiene, empleando cebadores complementarios a las regiones flanqueantes (generalmente marcados con un fluoróforo), y la posterior visualización de la diferencia de tamaño de estos amplicones en un analizador de secuencias. De esta manera, se puede determinar si las alteraciones de la impronta (sobretudo en caso de pérdidas de metilación), pueden ser a causa de disomías uniparentales (UPD). En este tipo de determinaciones, es muy importante seleccionar marcadores genéticos informativos (polimórficos) y tener acceso a la muestra de los

progenitores, para poder determinar correctamente la trasmisión de los alelos desde los progenitores (isodisomía/heterodisomía) (Figura 12).

3.2.2. Array de SNPs

Un polimorfismo de un solo nucleótido o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) es una variación o sustitución en la secuencia de ADN que afecta a una sola base en la secuencia del genoma. Como bien sabemos, el genoma humano es diploide, es decir, cada célula contiene dos copias de la cadena de ADN (una heredada de la madre y otra del padre), que se denominan alelos. Así pues, para cada SNP existen dos alelos. El alelo más frecuente en la población se denomina mayoritario y se suele denotar como A, y el menos frecuente se denomina minoritario y se suele denotar como

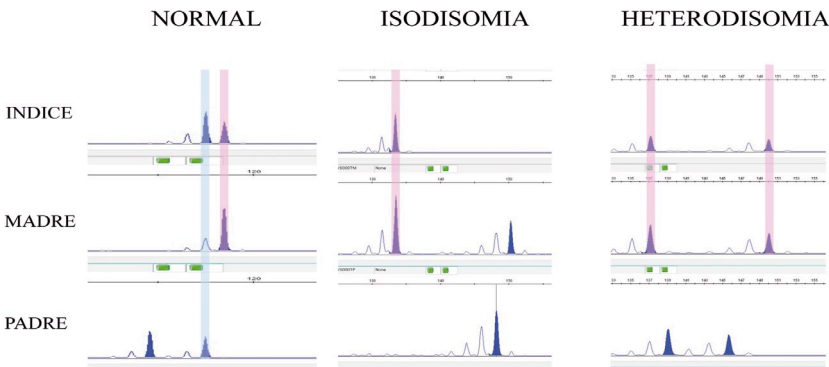


Figura 12: Electroferograma de PCR fluorescente de marcadores microsatélite. Ejemplos de resultado normal, isodisomía materna y heterodisomía materna. Cada pico azul corresponde a un alelo de la región amplificada en la PCR fluorescente. Los fragmentos se localizan en función de su tamaño, de manera que lo más pequeños se visualizan más a la izquierda. Así, un individuo sano presenta 2 alelos (uno heredado del padre y otro de la madre), que pueden ser iguales (1 pico) o diferentes (2 picos). Lo normal es que un hijo adquiera dotación genética de ambos progenitores y, por tanto, presente un alelo de cada uno de ellos. Cuando esto no ocurre, nos encontramos ante un caso de disomía uniparental, que puede ser isodisomía (el hijo hereda un cromosoma parental que se duplica y por tanto, se convierte en homocigoto para ese marcador) o heterodisómico (el hijo hereda los dos cromosomas del mismo progenitor).

a o B. Esto hace que para cada SNP pueda darse tres combinaciones posibles, dando lugar a tres genotipos distintos: que las dos bases sean iguales y correspondan al alelo mayoritario, AA, llamado homocigoto dominante; que sean distintas, Aa o AB, llamado heterocigoto; o que ambas correspondan al alelo minoritario, aa o BB, llamado homocigoto recesivo⁷¹. La importancia de los SNPs radica en que son muy frecuentes y están distribuidos por todo el genoma. De hecho, constituyen hasta el 90% de todas las variaciones genómicas humanas, y aparecen cada 300 bases (como promedio), a lo largo del genoma humano⁷². Estas variaciones en la secuencia del ADN pueden afectar a la respuesta de los individuos a enfermedades, bacterias, virus, productos químicos, fármacos, etc...

Los *array* de SNPs permiten en un único ensayo determinar el genotipo de un gran número de SNPs localizados a lo largo de todo el genoma. En estos casos, los *arrays* están compuestos por sondas localizadas en regiones adyacentes a SNPs. En un primer paso, el ADN se amplifica y se fragmenta para preparar la muestra problema para su posterior hibridación en el *array*. El ADN preparado se hibrida en los *microarrays* y se une a las sondas complementarias correspondientes. Una vez hibridada la muestra en el *array*, se añaden los nucleótidos marcados. Después se escanean los *microarrays* y los datos obtenidos se analizan mediante un *software*.

La ventaja de este tipo de *arrays*, es que además de determinar el genotipo de

cada SNP e identificar así si existe algún tipo de pérdida de heterocigosidad causado por una isodisomía a lo largo de todo el genoma, es capaz de detectar el número de copia, y por tanto, en un mismo experimento se obtienen ambas determinaciones⁷³ (Figura 13).

Sin embargo, en comparación con el estudio de microsatélites, se trata de una metodología de precio elevado. Además, en caso de que la causa subyacente sea debida a una heterodisomía, donde en principio no existiría homocigosidad, este tipo de experimento no es capaz de identificarlo, a no ser que se analice también a ambos progenitores, con el correspondiente coste adicional.

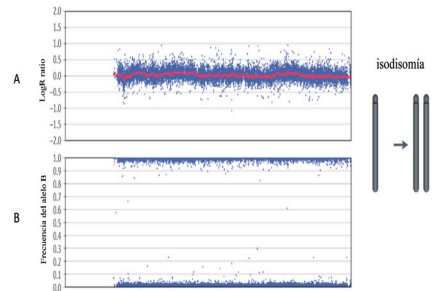


Figura 13: Resultado de SNP array donde se muestra un paciente con isodisomía. Cada uno de los puntos azules representa el resultado para un SNP analizado a lo largo del cromosoma estudiado. **(A)** El *log R ratio* representa el resultado de número de copia. Se calcula como el logaritmo del ratio de la intensidad correspondiente a cada una de las dos variantes del SNP. Si hay dos copias, el *log R ratio* nos da un valor de cero, como en este caso. Si hay pérdida, irá hacia $-0,5$ y si hay ganancia, hacia $+0,5$. **(B)** La frecuencia del alelo B representa la frecuencia del alelo minoritario: si el resultado es 1, indica que el SNP de esa posición es homocigoto B/B; si es $0,5$, el SNP es A/B; mientras que si es 0, el SNP es A/A. En este caso, el paciente es homocigoto a lo largo de toda la región analizada. Considerando el resultado de ambas gráficas, se concluye que el paciente estudiado presenta una isodisomía.

3.3. Estudio de genes reguladores de impronta

Hace una década, Arima et al⁷⁴ y Mackay et al³⁵ reportaron por primera vez pacientes con TND que presentaban epimutación en *PLAG1/ZAC1* e hipometilación en ICR2-11p15 (conocido como KvDMR), la alteración más frecuente en pacientes con Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS). Así se evidenció por primera vez el trastorno MLMD (*Multilocus Methylation Defect*). Posteriormente, se describieron mutaciones en *ZFP57* en algunos de estos pacientes que presentaban TNDM y MLMD, vinculando así por primera vez un gen a una enfermedad de impronta con un patrón autosómico recesivo¹⁴.

Después, Meyer et al⁷⁵ detectaron mutaciones en *NLRP2* en pacientes BWS con epimutación en KvDMR y *MEST*.

También se han identificado mutaciones en *NLRP7* asociados a la aparición recurrente de molas hidatiformes biparentales familiares (FHM) en los que existen anomalías epigenéticas en múltiples DMRs⁷⁶⁻⁷⁸. Una mola hidatiforme es una masa o tumor poco común que se forma en el interior del útero al comienzo de un embarazo y es un tipo de enfermedad trofoblástica gestacional⁷⁹. Está bien establecido que las molas completas (MHC) son diploides y diándricas, es decir, que tienen dos complementos cromosómicos, ambos derivados del padre. En el 90% de los casos

el complemento diploide surge de la fertilización de un óvulo vacío (que ha perdido el núcleo) por un espermatozoide que, una vez dentro del óvulo, duplica su material genético (fertilización monospermica); en el otro 10% se originan por una fertilización dispérmica, es decir, por la fertilización simultánea de dos espermatozoides a un óvulo vacío. Una tercera opción, mucho más rara que las anteriores, es la fertilización de un óvulo vacío por un espermatozoide previamente diploide^{80,81} (ver capítulo 9).

En definitiva, se han descrito varios genes reguladores de impronta que se deberían estudiar, sobre todo en los pacientes donde se detecten alteraciones de la metilación en más de un *locus*. Para ello, la técnica que más se emplea es la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen.

La secuenciación automática se basa en la técnica de terminación de cadena de Sanger⁸². Consiste en una amplificación empleando dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos, que son deoxinucleótidos que carecen de grupo hidroxilo en el carbono 3'. Debido a que la polimerasa necesita un grupo hidroxilo en el carbono 3' para formar un enlace fosfodiéster y así poder agregar el siguiente deoxinucleótido, la ausencia de este grupo conlleva el fin de la síntesis de una nueva hebra. Así, en la reacción de secuenciación están presentes tanto los deoxinucleótidos (dATP, dTTP, dCTP y dGTP) como los dideoxinucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP), pero estos últimos en menor proporción puesto que son los encargados de detener la reacción de

amplificación de la polimerasa. Por lo tanto tras la reacción de secuenciación se generan una serie de cadenas sencillas de ADN cuyos tamaños difieren en una única base. Finalmente en la secuenciación automática se separan las diferentes hebras de ADN, basándose en el tamaño/carga, mediante electroforesis capilar y se detectan las diferentes longitudes de onda emitidas por los fluorocromos al ser excitados por el láser, obteniendo finalmente un cromatograma (Figura 14).

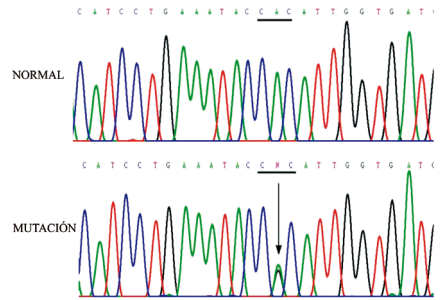


Figura 14: Electroferograma de la secuenciación de un fragmento de ADN. La gráfica de arriba representa la secuencia normal, mientras que la de abajo incorpora una mutación en heterocigosis (indicado por una flecha: sustitución de una adenina (A) por guanina (G)).

RESUMEN

Las enfermedades de impronta pueden estar causadas por varios mecanismos: mutación genética, delección o duplicación cromosómica, disomía uniparental (UPD, *uniparental disomy*) y defectos de impronta (variaciones/mutaciones epigenéticas).

Son muchas y variadas las técnicas que nos permiten el estudio de estas alteraciones y es importante conocer las ventajas y desventajas de cada una y lo que realmente nos permite identificar para un correcto diagnóstico molecular.

Actualmente, la técnica de MS-MLPA es de las más completas, al permitirnos detectar simultáneamente ganancias o pérdidas de copia de material genético junto con alteración en el patrón de metilación. Pero no nos permite identificar UPD ni alteraciones cromosómicas, por lo que, en algunas ocasiones, será necesario recurrir a otras técnicas para completar el estudio.

Es imprescindible el estudio de las posibles alteraciones genéticas subyacentes a las alteraciones del patrón de metilación identificado de cara a un adecuado consejo genético a los pacientes y sus familiares.

REFERENCIAS

1. Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942;1:18-20.
2. Sha K. A mechanistic view of genomic imprinting. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008;9:197-216.
3. Deal CL. Parental genomic imprinting. *Curr Opin Pediatr* 1995;7:445-458.
4. Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, Moore GE. Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 2001;38:810-819.
5. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;366:362-365.
6. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-1093.
7. Horsthemke B. In brief: genomic imprinting and imprinting diseases. *J Pathol* 2014;232:485-487.
8. Horsthemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:321-328.
9. Kelsey G, Bartolomei MS. Imprinted genes... and the number is? *PLoS Genet* 2012;8:e1002601-
10. Buiting K, Kanber D, Martin-Subero JI et al. Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum Mutat* 2008;29:1141-1146.
11. Chudoba I, Franke Y, Senger G et al. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. *Eur J Hum Genet* 1999;7:533-540.
12. Salafsky IS, MacGregor SN, Claussen U, von EF. Maternal UPD 20 in an infant from a pregnancy with mosaic trisomy 20. *Prenat Diagn* 2001;21:860-863.
13. Tycko B, Morison IM. Physiological functions of imprinted genes. *J Cell Physiol* 2002;192:245-258.
14. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 2008;40:949-951.
15. Schmitz A, Short M, Ammerpohl O, Asbrand C, Nickel J, Renkawitz R. Cis-elements required for the demethylation of the mouse M-lysozyme downstream enhancer. *J Biol Chem* 1997;272:20850-20856.
16. Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* 1985;40:91-99.
17. Bird AP, Southern EM. Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol* 1978;118:27-47.
18. Lindsay S, Bird AP. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA. *Nature* 1987;327:336-338.
19. Korch C, Hagblom P. In-vivo-modified gonococcal plasmid pJD1. A model system for analysis of restriction enzyme sensitivity to DNA modifications. *Eur J Biochem* 1986;161:519-524.
20. Waalwijk C, Flavell RA. MspI, an isoschizomer of hpaII which cleaves both unmethylated and methylated hpaII sites. *Nucleic Acids Res* 1978;5:3231-3236.
21. Reilly JG, Thomas CA, Jr., Sen A. DNA methylation in mouse cells in culture as measured by restriction enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1982;697:53-59.
22. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975;98:503-517.
23. Barabash A, Robledo M, Sanz R et al. [A clinical, cytogenetic and molecular study of 10 patients with the Prader-Willi syndrome]. *Med Clin (Barc)* 1997;108:304-306.
24. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986;51 Pt 1:263-273.
25. Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM et al. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e128-
26. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res* 1989;17:6463-6471.
27. Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nat Rev Genet* 2004;5:446-455.
28. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994;22:2990-2997.
29. Frommer M, McDonald LE, Millar DS et al. A genomic sequencing protocol that yields a

- positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:1827-1831.
30. Furuichi Y, Wataya Y, Hayatsu H, Ukita T. Chemical modification of tRNA-Tyr-yeast with bisulfite. A new method to modify isopentenyladenosine residue. *Biochem Biophys Res Commun* 1970;41:1185-1191.
 31. Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R. Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim Biophys Acta* 2009;1790:847-862.
 32. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-9826.
 33. Shen L, Waterland RA. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2007;10:576-581.
 34. Mackay DJ, Temple IK, Shield JP, Robinson DO. Bisulphite sequencing of the transient neonatal diabetes mellitus DMR facilitates a novel diagnostic test but reveals no methylation anomalies in patients of unknown aetiology. *Hum Genet* 2005;116:255-261.
 35. Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2006;120:262-269.
 36. Mackay DJ, Hahnemann JM, Boonen SE et al. Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith-Wiedemann syndrome centromeric locus in individuals with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2006;119:179-184.
 37. Gonzalgo ML, Bender CM, You EH et al. Low frequency of p16/CDKN2A methylation in sporadic melanoma: comparative approaches for methylation analysis of primary tumors. *Cancer Res* 1997;57:5336-5347.
 38. Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3761-3766.
 39. Begemann M, Leisten I, Soellner L, Zerres K, Eggemann T, Spengler S. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics* 2012;7:473-481.
 40. Ahmadian A, Ehn M, Hober S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* 2006;363:83-94.
 41. Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal Biochem* 1996;242:84-89.
 42. Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4422-4426.
 43. Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa JP. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *Biotechniques* 2007;42:48, 50, 52-
 44. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57-
 45. Liehr T, Brude E, Gillessen-Kaesbach G et al. Prader-Willi syndrome with a karyotype 47,XY,+min(15)(pter->q11.1:) and maternal UPD 15--case report plus review of similar cases. *Eur J Med Genet* 2005;48:175-181.
 46. Font-Montgomery E, Stone KM, Weaver DD, Vance GH, Das S, Thurston VC. Clinical outcome and follow-up of the first reported case of Russell-Silver syndrome with the unique combination of maternal uniparental heterodisomy 7 and mosaic trisomy 7. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73:577-582.
 47. Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 1976;193:1007-1008.
 48. Blakeslee AF. Variations in *Datura* due to changes in chromosome number. *Am Nat* 1922;56:16-31.
 49. Thorgaard GH, Disney JE. Chromosome preparation and analysis. 1990;171-190.
 50. Craig JM, Bickmore WA. Chromosome bands--flavours to savour. *Bioessays* 1993;15:349-354.
 51. Bickmore WA. Karyotype Analysis and Chromosome Banding. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES* 2001;
 52. Robberecht C, Schuddinck V, Fryns JP, Vermeesch JR. Diagnosis of miscarriages by molecular karyotyping: benefits and pitfalls. *Genet Med* 2009;11:646-654.
 53. Shaffer LG, Bejjani BA. A cytogeneticist's perspective on genomic microarrays. *Hum Reprod Update* 2004;10:221-226.
 54. Kearney L. Molecular cytogenetics. *Best Pract Res Clin Haematol* 2001;14:645-669.
 55. Riegel M. Human molecular cytogenetics: From cells to nucleotides. *Genet Mol Biol* 2014;37:194-209.

56. Tsuchiya KD. Fluorescence in situ hybridization. *Clin Lab Med* 2011;31:525-viii.
57. Moers MH, Kalle WH, Ruiter AG et al. Fluorescence in situ hybridization on human metaphase chromosomes detected by near-field scanning optical microscopy. *J Microsc* 1996;182:40-45.
58. Laan M, Isosomppi J, Klockars T, Peltonen L, Palotie A. Utilization of FISH in positional cloning: an example on 13q22. *Genome Res* 1996;6:1002-1012.
59. Raap AK, Florijn RJ, Blonden LAJ et al. Fiber FISH as a DNA Mapping Tool. *Methods* 1996;9:67-73.
60. Liehr T. Fluorescence in situ hybridization (FISH) - Application guide. 2009;
61. Vorsanova S, Yurov Y, Iourov I. Technological Solutions in Human Interphase Cytogenetics. *Human Interphase Chromosomes: Biomedical Aspects* 2013;
62. Cheung VG, Nowak N, Jang W et al. Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* 2001;409:953-958.
63. Oostlander AE, Meijer GA, Ylstra B. Microarray-based comparative genomic hybridization and its applications in human genetics. *Clin Genet* 2004;66:488-495.
64. Rogers YH, Jiang-Baucom P, Huang ZJ, Bogdanov V, Anderson S, Boyce-Jacino MT. Immobilization of oligonucleotides onto a glass support via disulfide bonds: A method for preparation of DNA microarrays. *Anal Biochem* 1999;266:23-30.
65. Urban AE, Korbel JO, Selzer R et al. High-resolution mapping of DNA copy alterations in human chromosome 22 using high-density tiling oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4534-4539.
66. Bejjani BA, Saleki R, Ballif BC et al. Use of targeted array-based CGH for the clinical diagnosis of chromosomal imbalance: is less more? *Am J Med Genet A* 2005;134:259-267.
67. Emanuel BS, Saitta SC. From microscopes to microarrays: dissecting recurrent chromosomal rearrangements. *Nat Rev Genet* 2007;8:869-883.
68. Shaffer LG, Bui TH. Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145C:87-98.
69. Ballif BC, Rorem EA, Sundin K et al. Detection of low-level mosaicism by array CGH in routine diagnostic specimens. *Am J Med Genet A* 2006;140:2757-2767.
70. Ellegren H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 2004;5:435-445.
71. Montana G. Statistical methods in genetics. *Brief Bioinform* 2006;7:297-308.
72. Palmer LJ, Cardon LR. Shaking the tree: mapping complex disease genes with linkage disequilibrium. *Lancet* 2005;366:1223-1234.
73. Ting JC, Ye Y, Thomas GH, Ruczinski I, Pevsner J. Analysis and visualization of chromosomal abnormalities in SNP data with SNPscan. *BMC Bioinformatics* 2006;7:25-
74. Arima T, Kamikihara T, Hayashida T et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2650-2660.
75. Meyer E, Lim D, Pasha S et al. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet* 2009;5:e1000423-
76. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 2006;38:300-302.
77. Djuric U, El-Maarri O, Lamb B et al. Familial molar tissues due to mutations in the inflammatory gene, NALP7, have normal postzygotic DNA methylation. *Hum Genet* 2006;120:390-395.
78. Kou YC, Shao L, Peng HH et al. A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles. *Mol Hum Reprod* 2008;14:33-40.
79. Freedman RS, Tortolero-Luna G, Pandey DK et al. Gestational trophoblastic disease. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23:545-571.
80. Garner EI, Goldstein DP, Feltmate CM, Berkowitz RS. Gestational trophoblastic disease. *Clin Obstet Gynecol* 2007;50:112-122.
81. Shih I, Kurman RJ. Molecular basis of gestational trophoblastic diseases. *Curr Mol Med* 2002;2:1-12.
82. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5463-5467.

Capítulo 2: DIABETES NEONATAL TRANSITORIA ASOCIADA A 6q24

Oscar Rubio-Cabezas¹, Guiomar Pérez de Nanclares²

¹Servicio de Endocrinología Pediátrica. Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa, Madrid. ²Laboratorio de (Epi)Genética Molecular. Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, Instituto Nacional de Investigación BioAraba, Vitoria-Gasteiz

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

1.1. Introducción

La diabetes mellitus neonatal es una entidad clínica poco frecuente, con una incidencia aproximada de 1/50.000 recién nacidos vivos/año¹⁻⁴. Actualmente se conocen más de 40 genes distintos que pueden producir este fenotipo⁵. Aunque, *stricto sensu*, el período neonatal abarca las primeras 4 semanas de vida, el descubrimiento de nuevos subtipos de diabetes neonatal ha hecho que la edad límite para considerar una posible causa monogénica se haya ido ampliando sucesivamente a 45 días⁶, 3 meses⁷, 6 meses⁸ e incluso al primer año de vida⁵. Por ello, se ha sugerido que el término “diabetes monogénica del lactante” sería un nombre más apropiado que “diabetes neonatal”⁹, pero este último todavía se utiliza extensamente.

Clásicamente, se han descrito dos

formas de evolución de la enfermedad: una transitoria, en la que la diabetes se resuelve espontáneamente en los primeros 18 meses de vida, y otra permanente, en la que la alteración hidrocarbonada requiere tratamiento de por vida¹⁰. En el momento del diagnóstico inicial suele ser difícil distinguir entre ambas formas evolutivas ya que las características clínicas (e, incluso, los genes) se solapan entre sí⁵.

1.2. Diabetes neonatal transitoria

La diabetes neonatal transitoria (TND) es una alteración del desarrollo pancreático que afecta a la producción de insulina y, como su nombre indica, se resuelve en el periodo posnatal. Representa el 50-60% de los casos de diabetes neonatal diagnosticados en los primeros tres meses de vida^{11,12}. El 70% de los casos se deben a alteraciones genéticas y epigenéticas en la región cromosómica 6q24 (TND-6q24)^{12,13}.

1.3. *Presentación clínica de la diabetes neonatal transitoria por alteraciones de la región 6q24*

La TND-6q24 afecta por igual a niños y niñas. Los pacientes, a menudo, son pequeños para la edad gestacional debido a la presencia de retraso del crecimiento intrauterino¹³⁻¹⁷, y típicamente se afecta más el peso que la longitud (retraso de crecimiento intrauterino disarmónico)¹⁵. La insulina es el factor de crecimiento prenatal más importante¹⁸, por lo que este patrón de crecimiento intrauterino sugiere que la deficiencia de insulina es más precoz y/o más intensa que en otras formas de diabetes neonatal transitoria. Típicamente, el retraso de crecimiento es menos marcado cuanto antes se produce el parto, sobre todo en nacimientos prematuros, lo que ocurre cada vez con mayor frecuencia debido a la vigilancia estrecha de la evolución del crecimiento fetal. Aunque los niveles de insulina plasmática no han podido medirse intraútero en estos pacientes, son claramente bajos para la magnitud de la hiperglucemia poco después del nacimiento^{16,19}.

Estos pacientes suelen presentar hiperglucemia muy precozmente²⁰, con frecuencia ya en la primera semana de vida y antes de recibir el alta hospitalaria, pero es posible que se diagnostiquen más tarde en función de la presencia/ausencia de sintomatología clínica asociada y/o la cantidad de insulina endógena residual^{13-15,20,21}. Normalmente la diabetes cursa sin cetoacidosis, lo que sugiere que, aunque en niveles muy bajos, se mantiene una cierta producción

de insulina^{15,16,19}. La deshidratación, en cambio, puede ser muy rápida y muy intensa¹⁶, constituyendo un verdadero estado hiperglucémico hiperosmolar²². Aunque la mayoría de los pacientes requieren tratamiento con insulina durante la fase aguda^{14,15}, los requerimientos insulínicos suelen ser inferiores que en el caso de la diabetes neonatal permanente¹⁶. Como se ha mencionado previamente, los niveles de insulina y péptido C plasmáticos están disminuidos en el momento del diagnóstico¹⁶, no se detectan autoanticuerpos frente a las células de los islotes pancreáticos (típicos de la forma más frecuente de diabetes en la infancia, la diabetes tipo 1) y el páncreas puede visualizarse mediante ecografía/RM¹⁹. Sin embargo, estos datos no son específicos y no permiten diferenciar bien entre la diabetes neonatal transitoria asociada a 6q24 y otras formas de diabetes neonatal.

En resumen, debe sospecharse TND-6q24 en los pacientes que presenten los hallazgos clínicos referidos en la tabla 1.

Tabla 1. Principales hallazgos clínicos asociados a diabetes neonatal transitoria por alteración en 6q24

1. Retraso de crecimiento intrauterino (menos evidente en recién nacidos pretérmino).
2. Diabetes mellitus que comienza en las primeras 4 semanas de vida y asocia las siguientes características:
 - a. Hiperglucemia, generalmente marcada.
 - b. Deshidratación secundaria.
 - c. Insulina/péptido C disminuidos en presencia de hiperglucemia.
 - d. Ausencia de cetosis/cetoacidosis.
 - e. Ausencia de anticuerpos pancreáticas.
 - f. Presencia de páncreas en las pruebas de imagen.

1.4. Pronóstico a largo plazo

La mayoría de los pacientes con TND-6q24 mejoran rápidamente en los primeros meses de vida²⁰, con resolución espontánea de la diabetes sobre los 3-4 meses de edad^{14-16,19}. Sólo excepcionalmente, puede durar más de un año¹⁹. Las necesidades de insulina van disminuyendo progresivamente y los niños experimentan una recuperación del crecimiento durante el primer año de vida, normalizando el peso y la talla sobre los dos años de edad¹⁶.

A lo largo de los primeros años tras la remisión, la hiperglucemia puede manifestarse ocasionalmente, sobre todo durante las enfermedades intercurrentes, debido a un defecto compensado de la secreción de insulina endógena²³. Se han descrito también casos en los que los pacientes con TND-6q24 desarrollan, en lugar de diabetes, hipoglucemia secundaria a hiperinsulinismo precozmente tras la remisión²⁴.

La diabetes acaba recidivando en cerca del 50% de los pacientes, a menudo durante la pubertad, exhibiendo intolerancia a la glucosa o diabetes franca, ambas caracterizadas por cierto grado de insulinoresistencia^{15,16,19,23}. La recidiva puede presentarse asimismo en futuros embarazos en las mujeres afectadas, en los que se pone de manifiesto en forma de diabetes gestacional²⁵. Lamentablemente no existen datos prospectivos sobre la edad de recurrencia, la posibilidad de que ésta ocurra o el tipo de alteración hidrocarbonada que se manifestará. Aunque los pacientes con TND-6q24

no suelen presentar cetoacidosis, sí hay datos aislados que sugieren que pueden presentar complicaciones crónicas derivadas de la hiperglucemia mantenida²⁵.

2. Morbilidad asociada y Tratamiento

2.1. Morbilidad asociada

La anomalía congénita asociada más frecuentemente a la TND-6q24 es la macroglosia (44% de los casos), que puede aparecer con cualquiera de los mecanismos moleculares implicados (véase el apartado de correlación genotipo-fenotipo). Otras malformaciones, como hernia umbilical y rasgos faciales dismórficos, afectan aproximadamente a un 20% de los pacientes. Con menor frecuencia se observan anomalías de las vías urinarias (duplicidad renal, ectasia piélica/hidronefrosis y reflujo vesicoureteral) (9%), cardiopatías congénitas (conducto arterioso persistente, tetralogía de Fallot, defectos del tabique interauricular y foramen oval permeable) (9%), malformaciones de las manos (clinodactilia, polidactilia, uñas y dedos cortos) (8%) e hipotiroidismo (4%)²⁰. Ocasionalmente se han descrito también alteraciones neurológicas (hipotonía, retraso motor, epilepsia, alteraciones visuales y auditivas)^{14,26}, aunque éstas pueden deberse al subgrupo genético. Las comorbilidades asociadas deben ser tratadas por los especialistas correspondientes (cirugía pediátrica, cardiología/cirugía cardíaca

infantil, nefrología/urología pediátricas, neuropediatría, etc.).

2.2. Tratamiento de la diabetes

Dado que no se debe recurrir a la restricción calórica y de glucosa en un intento de evitar o retrasar el tratamiento con insulina, la administración precoz de insulina está indicada en la mayoría de los recién nacidos con diagnóstico reciente de diabetes para tratar o prevenir la descompensación metabólica aguda y para permitir el aumento de peso²⁷. La pauta de tratamiento con insulina más adecuada debe ser cuidadosamente diseñada en función del manejo nutricional y la monitorización frecuente de la glucemia.

Inicialmente tanto la rehidratación como la administración de insulina se realizan por vía intravenosa. En cuanto se resuelven la deshidratación y la hiperglucemia, y siempre que la situación clínica del paciente lo permita, se debe iniciar la administración de insulina subcutánea²⁸. La insulina puede ser proporcionada en forma de múltiples inyecciones diarias o, mejor aún, como infusión subcutánea continua²⁹. Puede ser necesario recurrir a la insulina diluida para satisfacer los requerimientos tan bajos de la misma y reducir al mínimo el riesgo de ocasionar hipoglucemia. En los recién nacidos con nutrición parenteral o alimentación enteral continua, la dosis diaria total de insulina se debe administrar como infusión basal. Mientras se hagan más de 6 tomas alimentarias al día, la

administración de dosis elevadas de un análogo de acción prolongada asociado a pequeños bolos de un análogo de acción ultrarrápida antes de las comidas permite mantener la glucemia relativamente estable³⁰. A medida que las tomas se van espaciando, el aumento de las necesidades de insulina asociada a las comidas requieren aumentar las dosis de análogos de insulina de acción rápida y la insulina basal tiene que ser reducida concomitantemente. Dado que la ingesta de alimentos en los lactantes es con frecuencia impredecible, la administración de insulina postprandial inmediata puede ser considerada en ciertas circunstancias^{12,28,29,31,32}.

El tratamiento con insulina exógena puede retirarse progresivamente cuando los niveles de glucosa en sangre se vayan estabilizando dentro del rango de normalidad al entrar el paciente en la fase de remisión.

Una vez la diabetes ha remitido, es importante alertar a los padres de la posibilidad de recurrencia de la enfermedad, especialmente durante las enfermedades intercurrentes. En caso de sed excesiva, poliuria/nicturia o infecciones bacterianas repetidas, es recomendable la determinación puntual de la glucemia. La determinación periódica de la hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), seguida o no por la utilización de sistemas de monitorización continua de glucosa (CGM), permite detectar las posibles recurrencias de manera precoz. Alternativamente, pueden realizarse pruebas de tolerancia a la glucosa oral de forma ocasional. En cualquier caso, los resultados anormales en cualquiera

de estas pruebas deben sugerir la posibilidad de recurrencia²³.

Existen pocos datos en los que apoyarse para establecer unas buenas prácticas de tratamiento en aquellos pacientes en los que la enfermedad recurre. Si bien el tratamiento con insulina consigue un buen control metabólico, generalmente con dosis inferiores a las utilizadas en la diabetes tipo 1, algunos grupos han presentado también buenos resultados con el tratamiento con sulfonilureas^{25,33} o inhibidores de la enzima dipeptidil peptidasa 4³⁴. Son necesarios ensayos clínicos para validar la eficiencia de estos agentes hipoglucemiantes como tratamiento de primera línea²⁸.

3. Manejo clínico de los pacientes

Los pacientes con diabetes neonatal transitoria secundaria a anomalías de la región 6q24 requieren un seguimiento multidisciplinar que involucre al menos a especialistas en neonatología y endocrinología pediátrica. En este sentido, es importante realizar un diagnóstico precoz para minimizar los riesgos asociados a la deshidratación secundaria a la hiperglucemia que puede causar graves secuelas a largo plazo si no se trata rápidamente, así como evitar los factores generales que predisponen a la diabetes de inicio tardío (como el aumento de peso) o los factores de riesgo cardiovasculares (por su posible asociación con complicaciones micro y macrovasculares). Idealmente, los pacientes deberían ser evaluados en

una consulta de genética clínica para garantizar que los estudios moleculares a realizar son los más adecuados para el paciente (y, en su caso, sus progenitores) y recibir asesoramiento genético sobre el riesgo de recurrencia en función del mecanismo molecular implicado.

La valoración clínica inicial de los pacientes debería incluir al menos los siguientes datos:

- Peso, longitud y perímetro cefálico, al nacer y después periódicamente.
- Glucemia, insulina y péptido C, autoanticuerpos contra las células beta pancreáticas y valoración de la anatomía del páncreas (por ecografía o resonancia magnética).
- Exploración dismorfológica general, incluyendo la evaluación del tamaño de la lengua y ombligo.
- Ecocardiograma. En caso de alteración, interconsulta a cardiología pediátrica.
- Pruebas de función renal y ecografía renal. En caso de alteración, interconsulta a nefrología pediátrica.
- Pruebas de función tiroidea.
- Exploración neurológica y evaluación del desarrollo. En caso de alteración, resonancia magnética cerebral e interconsulta a neurología pediátrica.

4. Diagnóstico diferencial

En el momento del diagnóstico puede ser difícil diferenciar una diabetes neonatal asociada a alteraciones en 6q24 de otras

formas de diabetes neonatal aunque la gravedad del retraso en el crecimiento, la presentación especialmente temprana y la velocidad en la recuperación pueden llegar a sugerirlo como el diagnóstico más probable^{15,28}. La macroglosia y la hernia umbilical se han descrito únicamente en la diabetes neonatal asociada a 6q24²⁸.

Además de las alteraciones en la banda 6q24, se han descrito otras alteraciones genéticas que pueden producir diabetes neonatal transitoria.

4.1. Alteración en los genes de los canales de potasio pancreáticos

Los canales de potasio sensibles al ATP (K_{ATP}), situados en la membrana de la célula beta pancreática, son complejos heterooctaméricos formados por cuatro subunidades Kir6.2, que constituirían el poro del canal, y cuatro subunidades SUR1, que formarían la parte externa del canal y actuarían como regulador de éste³⁵. Están codificados por los genes *KCNJ11* y *ABCC8*, respectivamente. Desde un punto de vista fisiológico, cuando la célula beta se encuentra en reposo, los canales K_{ATP} están abiertos, permitiendo la salida de potasio desde la célula beta al exterior. Con la entrada de glucosa en la célula y su posterior fosforilación para incorporarse al ciclo de Krebs, los niveles intracelulares de ATP aumentan y los canales de potasio se cierran, lo que conlleva la despolarización de la membrana y la consiguiente apertura de los canales de calcio dependientes del voltaje. La

entrada de calcio al interior de la célula permite la exocitosis de la insulina³⁶. Estos dos genes son responsables del 33-50% de los casos de diabetes neonatal permanente y del 26% de los casos de diabetes neonatal transitoria¹³.

Desde el punto de vista clínico, los pacientes presentan bajo peso al nacimiento, aunque el grado de afectación suele ser más bajo que en los pacientes con diabetes neonatal transitoria secundaria a alteraciones de la región 6q24¹⁵. Además de la hiperglucemia, tienen cetosis o cetoacidosis, lo que indica una mayor deficiencia de insulina en los portadores de una alteración en los genes del canal de potasio. En general, la diabetes se diagnostica más tarde (media: 1-3 meses) y la remisión es más prolongada^{13,15}. Existe una cierta correlación genotipo-fenotipo en función del impacto de la mutación en la capacidad de unión al ATP³⁷.

4.2. Gen de la insulina (*INS*)

Tras las mutaciones en el canal K_{ATP} constituye la segunda causa más importante de diabetes neonatal permanente. Las mutaciones en heterocigosis en el gen *INS* afectan a aproximadamente un 25% de los pacientes con diabetes menores de 6 meses^{38,39}. También se han descrito pacientes con mutaciones en homocigosis, que suelen diagnosticarse antes que los que presentan variaciones en heterocigosis y tienen un menor peso al nacimiento, similar a los que ocurre con la diabetes neonatal asociada a 6q24⁴⁰. Cuando las variantes (tanto en

homocigosis como en heterocigosis) se encuentran en la zona codificante, se asocian con la forma permanente, mientras que si se localizan en la región reguladora pueden ser responsables tanto de la forma permanente como de la transitoria⁴⁰.

4.3. Diabetes neonatal asociada a HNF1B

Aunque infrecuente, se han descrito algunos casos de diabetes neonatal transitoria asociada a mutaciones en *HNF1B*^{41,42}, que también puede recurrir posteriormente. Por lo general los pacientes con mutaciones en *HNF1B* presentan quistes renales asociados o no a diabetes de aparición en la adolescencia o juventud⁴³⁻⁴⁶.

4.4. Diabetes neonatal asociada a NEUROG3

Otra causa infrecuente de diabetes neonatal transitoria son las mutaciones recesivas en el gen *NEUROG3*, aunque en estos casos la sintomatología predominante es intestinal en forma de diarrea malabsortiva grave congénita⁴⁷.

5. Alteraciones genéticas asociadas

A pesar de que la diabetes neonatal transitoria (TND, OMIM #60410) fue reconocida como una entidad clínica en 1926⁴⁸, no se sospechó que fuera debida a una alteración genética relacionada con el imprinting hasta 1995, cuando se

asoció a la disomía uniparental paterna del cromosoma 6 [UPD(6)pat]⁴⁹. Desde entonces, los estudios realizados han permitido localizar el locus responsable de la TND en el brazo largo del cromosoma 6 (6q24) y confirmar que presenta *imprinting* materno, es decir, que en condiciones normales sólo se expresa el alelo paterno^{21,50}.

Se ha propuesto la sobreexpresión de los genes *PLAGL1* (*ZAC*) e *HYMAI* como posible responsable de la diabetes neonatal transitoria⁵¹ ya que ambos se encuentran imprintados en el cromosoma materno. La expresión monoalélica de ambos genes se produce desde un promotor que coincide con la región diferencialmente metilada (DMR, *differentially methylated region*) asociada con TND⁵². La pérdida de la metilación materna en este DMR conlleva la relajación de la expresión monoalélica normal de ambos genes⁵¹.

El gen *PLAGL1* codifica para una proteína de dedos de zinc implicada en la regulación de la apoptosis y parada del ciclo celular a nivel de G₁⁵³. Se trata de un regulador de la transcripción del receptor de tipo 1 del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria, que a su vez es un importante regulador intra-islole de la secreción de insulina estimulada por glucosa⁵⁰. Así, la sobreexpresión de *PLAGL1* podría alterar la función pancreática mediante uno o varios de los siguientes mecanismos: a) alterando la proliferación o la muerte programada de las células beta pancreáticas; b) alterando la regulación transcripcional del páncreas endocrino o, c) afectando

a la expresión génica de las células beta maduras, con la consiguiente alteración de la secreción de insulina en respuesta a glucosa u otros estímulos⁵⁴.

PLAGL1 tiene dos promotores, pero sólo el localizado en el extremo 3' está improntado; el localizado en 5', unas 50kb más centromérico, no está improntado y es el promotor principal en varios tejidos, incluyendo la sangre⁵⁵. Esta presencia de dobles promotores ha permitido hipotetizar la posible asociación entre *PLAGL1* y la TND: la presentación neonatal de la TND pudiera estar asociada con una sobreexpresión fetal de *PLAGL1* a partir de su alelo metilado en un momento y tejido donde el promotor no metilado no se usa. La remisión postnatal de la enfermedad podría deberse a la activación postnatal de este promotor no metilado en determinados tejidos clave. La posible aparición con el tiempo de la diabetes tipo 2 en estos pacientes sería el resultado de una sobreexpresión crónica, pero modesta, del alelo metilado¹⁷.

HYMAI codifica para un RNA no codificante. Tiene una expresión ubicua desde el mismo promotor y en la misma orientación que *PLAGL1*⁵⁶⁻⁵⁸. Aunque se desconoce su función, dado el papel que juegan otros RNAs no codificantes como *H19* y *KCNQ1OT1* en la regulación de otros genes improntados, es posible que *HYMAI* sea esencial para el control de *PLAGL1*.

Diferentes estudios en niños con diabetes neonatal transitoria han observado que la sobreexpresión de *PLAGL1* e *HYMAI* puede producirse a través de alguno de estos mecanismos⁵⁹:

- **disomía paterna:** La mayoría de las UPD(6)pat son isodisómicas, es decir, el paciente hereda dos copias del mismo cromosoma 6 de su padre (bien completo¹⁹, o bien de la zona más distal del brazo largo⁶⁰) y ninguno de la madre. Este individuo expresa ambas copias de la región ya que ninguna estará improntada. Esta alteración se ha identificado en el 41% de los casos^{61,62}. Se asume, aunque no ha sido probado, que el origen de esta alteración es la duplicación del cromosoma homólogo paterno en un estadio muy temprano de una célula embrionaria generada de un gameto materno nulisómico para el cromosoma 6²⁸.
- la **duplicación** submicroscópica de la región 6q de origen paterno se presenta en el 29% de los pacientes. Esta alteración conlleva la presencia de dos copias del gen *PLAGL1* e *HYMAI* en el mismo cromosoma 6 paterno.
- **pérdida del imprinting materno o epimutación** en el DMR *PLAGL1/HYMAI*: la pérdida de metilación (LOM, *loss of methylation* o hipometilación) del DMR *PLAGL1/HYMAI* materno conlleva una expresión inapropiada de los alelos maternos de *PLAGL1* e *HYMAI*. La hipometilación del DMR asociado a TND es siempre completa, es decir, hasta la fecha no se ha descrito la posibilidad de mosaicismo epigenético y es responsable del 30% de los casos de TND. En el caso de embarazos múltiples^{63,64}, es posible

la identificación de hipometilación parcial en el hermano sano debido al intercambio sanguíneo feto-fetal⁶⁵, lo que implica la necesidad del análisis de otros tejidos y limita la sensibilidad de los estudios prenatales. La hipometilación puede ser exclusiva de la región 6q24 o formar parte de una alteración más generalizada llamada hipometilación en múltiples loci improntados (HIL, *hypomethylation at imprinted loci*)^{26,66} o defectos de la metilación en múltiples loci (MLMD, *multilocus methylation defects*)⁶⁷. El 45% de los pacientes con TND-HIL presentan mutaciones en homocigosis o heterocigosis combinada en el gen *ZFP57*^{26,66}, el resto de las causas de TND-HIL se desconocen. El patrón de hipometilación es diferente en función de si existen o no mutaciones en *ZFP57*, pero hasta la fecha sólo afectan a loci con impronta materna⁶⁶. Las “marca” epigenética de los pacientes con mutaciones en *ZFP57* incluye LOM total para *PLAGL1*, hipometilación parcial de *PEG3* (19q13.4), e hipometilación parcial o completa de *GRB10* (7p12.2)^{26,68}. En el resto de pacientes donde no se ha identificado aún la causa genética subyacente, los loci principalmente implicados son *MEST/PEG1* (7q32), ICR2/KvDMR (11p15) y *GNAS* (20q13)^{17,66,69}.

neonatal transitoria pero no se han realizado estudios moleculares, la causa genética subyacente puede ser, como mencionamos en apartados anteriores, tanto alteraciones en 6q24 como mutaciones en los canales de potasio. Si se trata de un paciente diagnosticado con menos de 6 meses de vida, debieran considerarse tanto los estudios moleculares de diabetes neonatal transitoria como permanente^{5,8,70}.

En cuanto a TND asociada a 6q24, los estudios moleculares podrían clasificarse en varios niveles^{61,62}:

- Nivel 1: dado que la TND está causada por hipometilación en 6q24, identificar la pérdida de la metilación (independientemente de la causa genética que la origina) permite confirmar el diagnóstico clínico de la diabetes. Son muchas las técnicas que nos permiten analizar el nivel de metilación (MS-MLPA, pirosecuenciación, MS-PCR, MS-SNuPE, arrays de metilación)^{16,26,71,72} y la elección de la misma dependerá de la infraestructura de cada laboratorio. Es importante el uso de controles sanos para la correcta interpretación de resultados.
- Nivel 2: es necesario para un correcto consejo genético ya que permite caracterizar si la alteración en la metilación se debe a disomía paterna o a duplicación de la banda 6q24. Para la disomía paterna puede emplearse el array de SNPs o el análisis de marcadores microsatélites, en este último

6. Estudios moleculares

Cuando un paciente tiene un diagnóstico clínico de diabetes

caso se requiere el estudio de los progenitores⁷³. Los estudios de variaciones en el número de copia pueden realizarse mediante MS-MLPA, tipado de microsatélites y cariotipo molecular (array de SNPs o aCGH) y, en el caso de grandes duplicaciones, FISH o análisis citogenético⁷³.

- Nivel 3: en el caso que los estudios del nivel 2 hayan mostrado resultados compatibles con la normalidad, nos encontraremos antes un paciente con hipometilación materna. Como hemos visto, esta hipometilación puede ser aislada (de causa genética desconocida hasta la fecha) o asociada a un defecto en la metilación más generalizado, bien causado por mutaciones en *ZPF57* o de causa desconocida. En el caso de familias consanguíneas o con un defecto más generalizado de la metilación es recomendable el estudio mediante secuenciación de *ZFP57*.

7. Correlaciones genotipo-fenotipo

Aunque no existen diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas de la diabetes en relación con el mecanismo molecular subyacente, sí pueden existir diferencias fenotípicas para el resto de las características clínicas asociadas.

7.1. UPD(6)pat

Los pacientes con isodisomía paterna pueden presentar enfermedades recesivas

raras causadas por alteraciones genéticas que se desenmascaran con la presencia de esta doble carga paterna^{74,75}; por ejemplo, se han descrito casos de acidemia metilmalónica⁷⁶ o colestasis⁷⁷. Otras posibles enfermedades en el caso de isodisomía del cromosoma 6 completo serían la hiperplasia adrenal congénita causada por deficiencia de 21-hidroxiolasa⁷⁸ o la hemocromatosis hereditaria asociada a *HFE*¹⁷.

De hecho, son los pacientes pertenecientes a este subgrupo molecular los que asocian un mayor número de anomalías congénitas (macrogllosia, hernia umbilical, dismorfia facial, y, con menor frecuencia, alteraciones renales o cardíacas)²⁰.

7.2. Duplicación paterna

Aunque inicialmente se mencionaba que los pacientes con duplicación paterna del cromosoma 6 presentaban un retraso del crecimiento más importante que aquello con UPD(6)pat o epimutación aislada⁶⁶, sugiriendo que la duplicación de 6q implicaría a otros modificadores genéticos responsables del retraso del crecimiento intrauterino, estudios más recientes con una serie más amplia no han confirmado estos datos²⁰. Por el contrario, estos pacientes presentan con menor frecuencia otras anomalías congénitas que el resto de los subgrupos moleculares²⁰.

Los estudios genéticos iniciales de pacientes con duplicación en 6q indicaban que la región crítica tenía una extensión aproximada de 400kb²¹, posteriormente limitada a 160kb⁷⁹. La mayoría de las duplicaciones son

submicroscópicas, sin que se hayan identificado los puntos de rotura, y los pacientes son fenotípicamente similares¹⁹. Sin embargo se ha descrito una duplicación citogenéticamente visible, asociada a retraso mental y un cierto grado de dismorfia⁸⁰.

7.3. Hipometilación materna

Los pacientes con hipometilación exclusiva en 6q24 tienen menos anomalías congénitas que los que presenten hipometilación en más de un loci, siendo la macroglosia la más reportada²⁰.

En los pacientes con hipometilación en múltiples loci asociada a mutación en *ZFP57* las manifestaciones no asociadas con la diabetes son mucho más frecuentes e incluyen problemas de aprendizaje, hipotonía generalizada, cardiopatía congénita, sordera, epilepsia, y malformaciones renales^{26,81}. No se ha observado correlación entre la extensión de la afectación clínica y el grado de hipometilación o los loci implicados, pudiendo oscilar entre un grave trastorno en el desarrollo y muerte en la infancia temprana hasta fenotipo normal en la edad adulta⁶⁸.

8. Asesoramiento genético

El riesgo de los hermanos y descendientes de un paciente con TND-6q24 a desarrollar diabetes a lo largo de su vida depende del mecanismo genético identificado en la familia. Se recomienda que la familia acuda a un

especialista en genética para que se le informe de su caso concreto.

8.1. Isodisomía paterna

Normalmente se tratan de alteraciones *de novo*, con un riesgo de recurrencia similar al de la población general. En el caso de que esa UPD(6)pat sea debida a una posible anomalía cromosómica subyacente (como un cromosoma en anillo en la madre), el riesgo de recurrencia dependerá de la alteración identificada^{61,62}.

8.2. Duplicación en 6q24

En estos casos la alteración puede ser *de novo*, heredada o, incluso, ser consecuencia de un reordenamiento cromosómico complejo en uno de los progenitores. Por tanto, para un adecuado consejo genético es imprescindible identificar el origen de esta alteración:

- En el caso de haber sido heredada del padre, éste tiene probabilidades de desarrollar diabetes mellitus en algún momento de su vida^{17,61,62}, o, menos frecuentemente, permanecer asintomático²⁵. En este caso, cada uno de los hermanos del paciente tiene un 50% de riesgo de heredar la duplicación. Teniendo en cuenta la penetrancia incompleta de la enfermedad²⁵, los hermanos que hereden la duplicación pueden no desarrollar TND, pero tienen un incremento de riesgo de presentar diabetes mellitus a lo largo de su vida.
- En el caso de que el padre no sea portador, el riesgo para los hermanos del paciente depende

de la posibilidad de mosaicismo germinal en el padre (riesgo estimado $\approx 1\%$ ^{82,83}).

- En el caso de que el padre presente un reordenamiento cromosómico complejo que incluya la región 6q24, el riesgo de los hermanos del paciente depende del reordenamiento subyacente.
- De cara a la descendencia del paciente, si éste es varón, cada uno de sus hijos tiene un 50% de heredar la duplicación y presentar, por tanto, un riesgo mayor a desarrollar TND o diabetes mellitus a lo largo de su vida. Si el paciente es mujer, sus descendientes también tienen un 50% de riesgo de heredar la duplicación, pero en caso de hacerlo, no tienen una mayor predisposición al desarrollo de diabetes.

8.3. Hipometilación materna en 6q24

En los casos de hipometilación exclusiva en 6q24, hasta la fecha no se han descrito que los padres o hermanos de estos pacientes presenten la misma alteración o un mayor riesgo de desarrollar diabetes⁶¹. Sin embargo, teniendo en cuenta que se desconoce la causa de esta epimutación y que es posible que no en todas las familias sea un evento *de novo*, es recomendable el estudio en los hermanos de un paciente.

De cara a la descendencia de estos pacientes y teniendo en cuenta que la causa genética de esta epimutación es aún desconocida, se presupone que en el caso de que el paciente sea mujer,

el riesgo para su descendencia de desarrollar TND o diabetes mellitus en algún momento de su vida es mayor que en el caso de que sea varón. Esto es así si asumimos que existe (o puede existir) un mecanismo genético en el alelo materno (como deleciones en elementos reguladores, al igual que ocurre en otros síndromes de impronta⁸⁴⁻⁸⁷) cuya herencia implique esta hipometilación.

Es importante indicar que en estos pacientes se ha observado un aumento, aunque no estadísticamente significativo, de concepciones mediante técnicas de reproducción asistida^{20,26}.

8.4. Hipometilación en múltiples loci

La TND-HIL se hereda de forma autosómica recesiva cuando está causada por mutaciones en *ZFP57*. Por tanto, los padres de un paciente con TND-HIL son portadores heterocigotos obligados. En familias con alta tasa de consanguinidad, uno de los progenitores puede ser incluso homocigoto en lugar de heterocigoto, como ya ha sido descrito en, al menos, una familia²⁶. Por el momento no se ha descrito que las personas heterocigotas presenten ningún tipo de fenotipo asociado.

Cada uno de los hermanos de un paciente con TND-HIL causada por *ZFP57* tienen un 25% de riesgo de heredar las dos mutaciones en *ZFP57* y poder desarrollar TND (aunque las manifestaciones clínicas entre hermanos pueden ser muy variables), un 50% de posibilidades de ser portador asintomático y un 25%

de ser no portador. En los hermanos que han heredado las dos mutaciones en *ZPF57* se desconoce el riesgo de desarrollar TND, aunque podría ser alto. Las manifestaciones no asociadas a la diabetes son variables. De hecho se han descrito parejas de hermanos donde uno presentaba un marcado retraso del desarrollo y el otro una forma menos grave⁸¹ e incluso se han descrito personas homocigotas para mutaciones en *ZPF57* con fenotipo normal²⁶.

Los descendientes de los pacientes con TND-HIL causada por mutaciones en *ZPF57* son portadores obligados (en heterocigosis) de una mutación en *ZPF57*.

En el caso de los familiares (padres, hermanos y descendientes) de pacientes con TND-HIL no causada por

mutaciones en *ZPF57*, es actualmente imposible establecer su riesgo, aunque hasta la fecha no se han reportado casos de recurrencia para este grupo¹⁷.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido parcialmente financiado por el Instituto Carlos III (beca CP11/00273, a ORC). Oscar Rubio está financiado por el programa de subvención de investigación clínica Juan Rodés (JR13/00018) del Instituto de Salud Carlos III. Guiomar Pérez de Nanclares está parcialmente financiada por el programa I3SNS del Ministerio de Sanidad Español (CP03/0064; SIVI 1395/09). GPdN es miembro de la *European COST action – European Network for Human Congenital Imprinting Disorders* (BM1208)

RESUMEN

La diabetes neonatal transitoria asociada a alteraciones (epi)genéticas en la región 6q24 se caracteriza por la presencia de retraso del crecimiento intrauterino (con mayor afectación en el peso que en la talla), hiperglucemia sin cetoacidosis de comienzo en la primera semana de vida con remisión sobre los 3-4 meses de vida, deshidratación secundaria y, en algunos casos, macroglosia y hernia umbilical.

Aunque el tratamiento inicial incluye la insulinización intravenosa, poco a poco esta dependencia insulínica disminuye, hasta la remisión. Es importante el control glucémico en la infancia, sobre todo en caso de enfermedades intercurrentes, por el riesgo de recurrencia de la diabetes.

La causa subyacente de este tipo de diabetes es la sobreexpresión de los genes imprintados *PLAGL1* (*ZAC*) e *HYMAI* debido a tres posibles mecanismos: isodisomía paterna, duplicación paterna de la región 6q24 o hipometilación materna de la región imprintada. Cada una de estas alteraciones asocia unas características fenotípicas y un asesoramiento genético específico.

REFERENCIAS

1. Grulich-Henn J, Wagner V, Thon A, et al. Entities and frequency of neonatal diabetes: data from the diabetes documentation and quality management system (DPV). *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 2010;27:709-12.
2. Polak M, Shield J. Neonatal and very-early-onset diabetes mellitus. *Seminars in neonatology : SN* 2004;9:59-65.
3. Wiedemann B, Schober E, Waldhoer T, et al. Incidence of neonatal diabetes in Austria-calculation based on the Austrian Diabetes Register. *Pediatric diabetes* 2010;11:18-23.
4. Rosenbauer J, Herzig P, von Kries R, Neu A, Giani G. Temporal, seasonal, and geographical incidence patterns of type I diabetes mellitus in children under 5 years of age in Germany. *Diabetologia* 1999;42:1055-9.
5. Rubio-Cabezas O, Hattersley AT, Njolstad PR, et al. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes* 2014;15 Suppl 20:47-64.
6. von Muhlen Dahl KE, Herkenhoff H. Long-term course of neonatal diabetes. *N Engl J Med* 1995;333:704-8.
7. Shield JP. Neonatal diabetes: new insights into aetiology and implications. *Horm Res* 2000;53 Suppl 1:7-11.
8. Hattersley A, Bruining J, Shield J, Njolstad P, Donaghue KC. The diagnosis and management of monogenic diabetes in children and adolescents. *Pediatric diabetes* 2009;10 Suppl 12:33-42.
9. Massa O, Iafusco D, D'Amato E, et al. KCNJ11 activating mutations in Italian patients with permanent neonatal diabetes. *Human mutation* 2005;25:22-7.
10. Armentrout D. Neonatal diabetes mellitus. *Journal of pediatric health care : official publication of National Association of Pediatric Nurse Associates & Practitioners* 1995;9:75-8.
11. Shield JP. Neonatal diabetes: how research unravelling the genetic puzzle has both widened our understanding of pancreatic development whilst improving children's quality of life. *Horm Res* 2007;67:77-83.
12. Polak M, Cave H. Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms. *Orphanet journal of rare diseases* 2007;2:12.
13. Flanagan SE, Patch AM, Mackay DJ, et al. Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood. *Diabetes* 2007;56:1930-7.
14. Diatloff-Zito C, Nicole A, Marcelin G, et al. Genetic and epigenetic defects at the 6q24 imprinted locus in a cohort of 13 patients with transient neonatal diabetes: new hypothesis raised by the finding of a unique case with hemizygotic deletion in the critical region. *J Med Genet* 2007;44:31-7.
15. Rica I, Luzuriaga C, Perez de Nanclares G, et al. The majority of cases of neonatal diabetes in Spain can be explained by known genetic abnormalities. *Diabet Med* 2007;24:707-13.
16. Metz C, Cave H, Bertrand AM, et al. Neonatal diabetes mellitus: chromosomal analysis in transient and permanent cases. *J Pediatr* 2002;141:483-9.
17. Mackay DJ, Temple IK. Transient neonatal diabetes mellitus type 1. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:335-42.
18. Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res* 2006;65 Suppl 3:28-33.
19. Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP. Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes* 2000;49:1359-66.
20. Docherty LE, Kabwama S, Lehmann A, et al. Clinical presentation of 6q24 transient neonatal diabetes mellitus (6q24 TNDM) and genotype-phenotype correlation in an international cohort of patients. *Diabetologia* 2013;56:758-62.
21. Gardner RJ, Mackay DJ, Mungall AJ, et al. An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 2000;9:589-96.
22. Wolfsdorf JI, Allgrove J, Craig ME, et al. Diabetic ketoacidosis and hyperglycemic hyperosmolar state. *Pediatric diabetes* 2014;15 Suppl 20:154-79.
23. Shield JP, Temple IK, Sabin M, et al. An assessment of pancreatic endocrine function and insulin sensitivity in patients with transient neonatal diabetes in remission. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89:F341-F3.
24. Flanagan SE, Mackay DJ, Greeley SA, et al. Hypoglycaemia following diabetes remission in patients with 6q24 methylation defects: expanding the clinical phenotype. *Diabetologia* 2013;56:218-21.

25. Valerio G, Franzese A, Salerno M, et al. Beta-cell dysfunction in classic transient neonatal diabetes is characterized by impaired insulin response to glucose but normal response to glucagon. *Diabetes Care* 2004;27:2405-8.
26. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in ZFP57. *Nat Genet* 2008;40:949-51.
27. Karges B, Meissner T, Icks A, Kapellen T, Holl RW. Management of diabetes mellitus in infants. *Nature reviews Endocrinology* 2012;8:201-11.
28. Temple IK, Shield JP. 6q24 transient neonatal diabetes. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 2010;11:199-204.
29. Tubiana-Rufi N. Insulin pump therapy in neonatal diabetes. *Endocrine development* 2007;12:67-74.
30. Barone JV, Tillman EM, Ferry RJ, Jr. Treatment of transient neonatal diabetes mellitus with subcutaneous insulin glargine in an extremely low birth weight neonate. *The journal of pediatric pharmacology and therapeutics : JPPT : the official journal of PPAG* 2011;16:291-7.
31. Beardsall K, Pesterfield CL, Acerini CL. Neonatal diabetes and insulin pump therapy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2011;96:F223-4.
32. Park JH, Kang JH, Lee KH, et al. Insulin pump therapy in transient neonatal diabetes mellitus. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 2013;18:148-51.
33. Shield JP, Baum JD. Transient neonatal diabetes and later onset diabetes: a case of inherited insulin resistance. *Arch Dis Child* 1995;72:56-7.
34. Yorifuji T, Hashimoto Y, Kawakita R, et al. Relapsing 6q24-related transient neonatal diabetes mellitus successfully treated with a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor: a case report. *Pediatric diabetes* 2014;15:606-10.
35. Shyng S, Nichols CG. Octameric stoichiometry of the KATP channel complex. *The Journal of general physiology* 1997;110:655-64.
36. Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev* 2004;84:239-75.
37. Gloyn AL, Diatloff-Zito C, Edghill EL, et al. KCNJ11 activating mutations are associated with developmental delay, epilepsy and neonatal diabetes syndrome and other neurological features. *Eur J Hum Genet* 2006;14:824-30.
38. Edghill EL, Flanagan SE, Patch AM, et al. Insulin mutation screening in 1,044 patients with diabetes: mutations in the INS gene are a common cause of neonatal diabetes but a rare cause of diabetes diagnosed in childhood or adulthood 1. *Diabetes* 2008;57:1034-42.
39. Stoy J, Greeley SA, Paz VP, et al. Diagnosis and treatment of neonatal diabetes: a United States experience. *Pediatric diabetes* 2008;9:450-9.
40. Garin I, Edghill EL, Akerman I, et al. Recessive mutations in the INS gene result in neonatal diabetes through reduced insulin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:3105-10.
41. Edghill EL, Bingham C, Slingerland AS, et al. Hepatocyte nuclear factor-1 beta mutations cause neonatal diabetes and intrauterine growth retardation: support for a critical role of HNF-1beta in human pancreatic development. *Diabet Med* 2006;23:1301-6.
42. Yorifuji T, Kurokawa K, Mamada M, et al. Neonatal diabetes mellitus and neonatal polycystic, dysplastic kidneys: Phenotypically discordant recurrence of a mutation in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene due to germline mosaicism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2905-8.
43. Bellanne-Chantelot C, Chauveau D, Gautier JF, et al. Clinical spectrum associated with hepatocyte nuclear factor-1beta mutations. *Ann Intern Med* 2004;140:510-7.
44. Decramer S, Parant O, Beaufrils S, et al. Anomalies of the TCF2 gene are the main cause of fetal bilateral hyperechogenic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:923-33.
45. Mefford HC, Clauin S, Sharp AJ, et al. Recurrent reciprocal genomic rearrangements of 17q12 are associated with renal disease, diabetes, and epilepsy. *Am J Hum Genet* 2007;81:1057-69.
46. Ulinski T, Lescure S, Beaufrils S, et al. Renal phenotypes related to hepatocyte nuclear factor-1beta (TCF2) mutations in a pediatric cohort. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:497-503.
47. Rubio-Cabezas O, Codner E, Flanagan SE, Gomez JL, Ellard S, Hattersley AT. Neurogenin 3 is important but not essential for pancreatic islet development in humans. *Diabetologia* 2014;57:2421-4.
48. Ramsey WR. Glycosuria of the newborn treated with insulin. *Trans Am Pediatr Soc* 1926;38:100-1.
49. Temple IK, James RS, Crolla JA, et al. An imprinted gene(s) for diabetes? *Nature genetics* 1995;9:110-2.
50. Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, et al. The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted-

- a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 2000;9:453-60.
51. Mackay DJ, Coupe AM, Shield JP, Storr JN, Temple IK, Robinson DO. Relaxation of imprinted expression of ZAC and HYMAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2002;110:139-44.
 52. Varrault A, Bilanges B, Mackay DJ, et al. Characterization of the methylation-sensitive promoter of the imprinted ZAC gene supports its role in transient neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem* 2001;276:18653-6.
 53. Hoffmann A, Ciani E, Boeckardt J, Holsboer F, Journot L, Spengler D. Transcriptional activities of the zinc finger protein Zac are differentially controlled by DNA binding. *Mol Cell Biol* 2003;23:988-1003.
 54. Ma D, Shield JP, Dean W, et al. Impaired glucose homeostasis in transgenic mice expressing the human transient neonatal diabetes mellitus locus, TNDM. *J Clin Invest* 2004;114:339-48.
 55. Valleley EM, Cordery SF, Bonthron DT. Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet* 2007;16:972-81.
 56. Arima T, Wake N. Establishment of the primary imprint of the HYMAI/PLAGL1 imprint control region during oogenesis. *Cytogenetic and genome research* 2006;113:247-52.
 57. Arima T, Drewell RA, Arney KL, et al. A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 2001;10:1475-83.
 58. Arima T, Drewell RA, Oshimura M, Wake N, Surani MA. A novel imprinted gene, HYMAI, is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing ZAC. *Genomics* 2000;67:248-55.
 59. Gardner RJ, Mungall AJ, Dunham I, et al. Localisation of a gene for transient neonatal diabetes mellitus to an 18.72 cR3000 (approximately 5.4 Mb) interval on chromosome 6q. *J Med Genet* 1999;36:192-6.
 60. Das S, Lese CM, Song M, et al. Partial paternal uniparental disomy of chromosome 6 in an infant with neonatal diabetes, macroglossia, and craniofacial abnormalities. *Am J Hum Genet* 2000;67:1586-91.
 61. Temple IK, Mackay DJG. Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal. In: In Pagon Ra BTDDCRSKe, ed.; 2005:1993-.
 62. Temple IK, Mackay DJG, Docherty LE. Diabetes Mellitus, 6q24-Related Transient Neonatal. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., eds. *GeneReviews(R)*. Seattle (WA); 1993.
 63. Kant SG, van der Weij AM, Oostdijk W, et al. Monozygous triplets discordant for transient neonatal diabetes mellitus and for imprinting of the TNDM differentially methylated region. *Hum Genet* 2005;117:398-401.
 64. Laborie LB, Mackay DJ, Temple IK, Molven A, Sovik O, Njolstad PR. DNA hypomethylation, transient neonatal diabetes, and prune belly sequence in one of two identical twins. *Eur J Pediatr* 2010;169:207-13.
 65. Blik J, Alders M, Maas SM, et al. Lessons from BWS twins: complex maternal and paternal hypomethylation and a common source of haematopoietic stem cells. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1625-34.
 66. Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J, et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2006;120:262-9.
 67. Eggermann T, Leisten I, Binder G, Begemann M, Spengler S. Disturbed methylation at multiple imprinted loci: an increasing observation in imprinting disorders. *Epigenomics* 2011;3:625-37.
 68. Boonen SE, Mackay DJ, Hahnemann JM, et al. Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care* 2013;36:505-12.
 69. Mackay DJ, Hahnemann JM, Boonen SE, et al. Epimutation of the TNDM locus and the Beckwith-Wiedemann syndrome centromeric locus in individuals with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2006;119:179-84.
 70. Rubio-Cabezas O, Ellard S. Diabetes mellitus in neonates and infants: genetic heterogeneity, clinical approach to diagnosis, and therapeutic options. *Hormone research in paediatrics* 2013;80:137-46.
 71. Begemann M, Leisten I, Soellner L, Zerres K, Eggermann T, Spengler S. Use of multilocus methylation-specific single nucleotide primer extension (MS-SNuPE) technology in diagnostic testing for human imprinted loci. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society* 2012;7:473-81.
 72. Martin-Subero JI, Bibikova M, Mackay D, et al. Microarray-based DNA methylation analysis of imprinted loci in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Am J Med Genet A* 2008;146A:3227-9.
 73. Mackay D, Bens S, Perez de Nanclares G,

- Siebert R, Temple IK. Clinical utility gene card for: Transient Neonatal Diabetes Mellitus, 6q24-related. *Eur J Hum Genet* 2014;22.
74. Christian SL, Rich BH, Loebel C, et al. Significance of genetic testing for paternal uniparental disomy of chromosome 6 in neonatal diabetes mellitus. *J Pediatr* 1999;134:42-6.
 75. Chappell L, Gorman S, Campbell F, et al. A further example of a distinctive autosomal recessive syndrome comprising neonatal diabetes mellitus, intestinal atresias and gall bladder agenesis. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1713-7.
 76. Abramowicz MJ, Andrien M, Dupont E, et al. Isodisomy of chromosome 6 in a newborn with methylmalonic acidemia and agenesis of pancreatic beta cells causing diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994;94:418-21.
 77. Kenny AP, Crimmins NA, Mackay DJ, Hopkin RJ, Bove KE, Leonis MA. Concurrent course of transient neonatal diabetes with cholestasis and paucity of interlobular bile ducts: a case report. *Pediatr Dev Pathol* 2009;12:417-20.
 78. Lopez-Gutierrez AU, Riba L, Ordonez-Sanchez ML, Ramirez-Jimenez S, Cerrillo-Hinojosa M, Tusie-Luna MT. Uniparental disomy for chromosome 6 results in steroid 21-hydroxylase deficiency: evidence of different genetic mechanisms involved in the production of the disease. *J Med Genet* 1998;35:1014-9.
 79. Docherty LE, Poole RL, Mattocks CJ, Lehmann A, Temple IK, Mackay DJ. Further refinement of the critical minimal genetic region for the imprinting disorder 6q24 transient neonatal diabetes. *Diabetologia* 2010;53:2347-51.
 80. Zneimer SM, Ziel B, Bachman R. Partial trisomy of chromosome 6q: an interstitial duplication of the long arm. *Am J Med Genet* 1998;80:133-5.
 81. Boonen SE, Porksen S, Mackay DJ, et al. Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings. *Eur J Hum Genet* 2008;16:453-61.
 82. Zlotogora J. Germ line mosaicism. *Hum Genet* 1998;102:381-6.
 83. van der Meulen MA, van der Meulen MJ, te Meerman GJ. Recurrence risk for germinal mosaics revisited. *J Med Genet* 1995;32:102-4.
 84. Bastepe M, Frohlich LF, Hendy GN, et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest* 2003;112:1255-63.
 85. Bastepe M, Frohlich LF, Linglart A, et al. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type 1b. *Nat Genet* 2005;37:25-7.
 86. Chillambhi S, Turan S, Hwang DY, Chen HC, Juppner H, Bastepe M. Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type 1b and biparental defects of GNAS methylation in cis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3993-4002.
 87. Linglart A, Gensure RC, Olney RC, Juppner H, Bastepe M. A novel STX16 deletion in autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b redefines the boundaries of a cis-acting imprinting control element of GNAS. *Am J Hum Genet* 2005;76:804-14.

Capítulo 3: SÍNDROME SILVER-RUSSELL

Sixto García-Miñaur^{1,2,*}, Francisco Martínez^{3,4,*}, Julio Guerrero-Fernández⁵, Sonia Mayo⁴

¹Servicio de Genética Clínica, Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz, Madrid. ²Unidad 753, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ³Unidad de Genética, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia. ⁴Grupo de Investigación de Genética, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), Valencia. ⁵Servicio de Endocrinología Pediátrica, Hospital infantil La Paz, Madrid.

* Ambos autores colaboraron por igual y deben considerarse co-primeros autores

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

1.1. Introducción

El síndrome Silver-Russell (SRS) es un trastorno genético con manifestaciones variables, causado por diferentes mecanismos moleculares^{1,2}. SRS fue inicialmente descrito de forma independiente en 1953 por Silver³, que resaltaba la talla baja y la “hemihipertrofia congénita” y por Russell⁴, que resaltaba el “enanismo intrauterino” y la “disostosis craneofacial”. A pesar de los recientes avances en el conocimiento de los diversos mecanismos moleculares causantes del SRS, la orientación diagnóstica sigue siendo fundamentalmente clínica.

1.2. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas características del SRS son las siguientes:

- **Retraso del crecimiento intrauterino:** La mayoría de estos niños presentan retraso del crecimiento intrauterino con un peso y talla al nacimiento muy inferiores (entre -2 y -4 DE) al correspondiente para la edad de gestación⁵.
- **Restricción del crecimiento postnatal:** En los dos primeros años de vida el ritmo de crecimiento suele ser normal pero sin recuperación o *catch-up*, por lo que se mantiene la talla baja. La talla final media suele ser -4 DE⁵.
- **Escasa ganancia ponderal:** Es habitual el fallo de medro con

escaso tejido graso y muscular. Las dificultades de alimentación añadidas obligan en ocasiones a recurrir a la alimentación por sonda nasogástrica o gastrostomía en los primeros años de vida.

- **Macrocefalia relativa:** El crecimiento del cráneo no se ve afectado y el perímetro craneal se mantiene en el rango de la normalidad. Esta discrepancia entre el tamaño de la cabeza y la talla produce una impresión de pseudomacrocefalia o macrocefalia relativa, definida recientemente como un perímetro craneal al menos 1,5DE superior al correspondiente a la talla⁶.
- **Rasgos faciales característicos:** La frente amplia y prominente y la micrognatia confieren una forma triangular a la cara. Una boca amplia con comisuras de oblicuidad descendente contribuye al aspecto facial característico de estos niños que resulta más evidente en los primeros años de vida (Figura 1).



Figura 1: (A) Lactante de 10 meses de edad con SRS debido a hipometilación en ICR1; presenta pseudomacrocefalia y cara triangular características. (B) La misma paciente 6 años más tarde; los rasgos craneofaciales resultan menos evidentes.

- **Asimetría corporal:** Habitualmente del mismo lado. Puede incluir la cara y diferentes segmentos de distintas extremidades, mano, pie y dedos. Realmente se trata de una hemihipoplasia de la parte afectada. En ocasiones se manifiesta como una reducción del diámetro más que de la longitud de la extremidad implicada.
- **Anomalías menores:** La clinodactilia del V dedo de la mano y las anomalías de los pabellones auriculares se describen a menudo, pero no dejan de ser anomalías poco específicas. Lo mismo sucede con las hipospadias en los niños.
- **Retraso del desarrollo psicomotor:** Es habitual la hipotonía y el retraso en el desarrollo de aspectos motores, posiblemente asociados a la menor fuerza muscular. El desarrollo cognitivo, sin embargo, es habitualmente normal.

1.4. Diagnóstico

En el momento actual no se logra identificar el mecanismo molecular en cerca de la mitad de los casos de SRS¹. Esto plantea la posibilidad de que se estén diagnosticando como SRS pacientes que no lo son y la necesidad de contar con criterios diagnósticos que permitan establecer un diagnóstico clínico con cierta seguridad.

Se han establecido diferentes criterios y algoritmos diagnósticos, que se han revisado y modificado a medida

que se han ido identificando nuevos mecanismos moleculares causantes del SRS^{6,7}.

En un trabajo reciente, Dias *et al.*⁸ recurrieron a la regresión logística y a la elaboración de curvas ROC para comparar el poder predictivo de los cuatro modelos previamente propuestos en una muestra de 139 pacientes británicos identificados a lo largo de 10 años. Finalmente desarrollaron un nuevo modelo simplificado, bautizado como el *Birmingham Silver-Russell Syndrome Screening Score*, con el fin de poder ser utilizado en un ámbito clínico no especializado. Los criterios diagnósticos son los siguientes:

1. Peso bajo para la edad de gestación (peso al nacimiento < -2 DE)
2. Restricción del crecimiento postnatal (talla a los 2 años de edad < -2 DE)
3. Macrocefalia relativa (perímetro craneal 1,5 DE > DE talla)
4. Asimetría corporal o de extremidades

Se necesitan tres de estos cuatro criterios diagnósticos para establecer el diagnóstico clínico de SRS e indicar el estudio molecular. Este sistema tiene una sensibilidad del 82% con un valor predictivo positivo del 67% (la probabilidad de detectar una alteración molecular en un paciente que cumple criterios diagnósticos); su especificidad es del 80% con un valor predictivo negativo del 90,2% (la probabilidad de no detectar una alteración en un paciente que no cumple criterios diagnósticos).

Las manifestaciones clínicas también varían de acuerdo con el mecanismo molecular causante del SRS (ver apartado 7).

2. Morbilidad asociada y tratamiento

El retraso de crecimiento intrauterino y el trastorno de conducta alimentaria tan característicos de los niños con SRS representan el origen de las tres comorbilidades más importantes asociadas a SRS: la talla baja, el bajo peso y las hipoglucemias nocturnas, sin olvidar otros posibles problemas descritos en estos pacientes. Es por ello que se requiere de un seguimiento rutinario que los detecte de forma temprana y, en muchos casos, de terapias concretas que reduzcan las posibles secuelas descritas en ellos a medio y largo plazo.

2.1. Crecimiento

El escaso crecimiento prenatal de los niños con SRS que se traduce en un importante bajo peso y/o longitud al nacimiento, junto con una desaceleración que se hace máxima con 3 años de edad y en ausencia de *catch-up*, determinan una talla durante la infancia que se sitúa paralela al percentil 3 pero en -4 DE de media respecto a la población normal (-3,9 DE en varones y -4,3 DE en mujeres). Durante esta evolución, la edad ósea suele retrasarse a principios y mediados de la niñez, y se sincroniza con la edad cronológica en torno a los 10 años, lo que indica riesgo de pubertad de evolución rápida

(adelantada tan solo en un 10% de los casos) y con un estirón de crecimiento que, habitualmente, está disminuido. Con todo ello, la media de la talla adulta en los varones con SRS se ha calculado en 151,2 cm y en mujeres en 139,9 cm^{5,9,10}.

Se desconocen con exactitud los mecanismos implicados en esta desaceleración inicial de la talla y en la ausencia de *catch-up* pero probablemente su origen sea multifactorial e influyan factores tales como la reducida masa corporal total, la escasa ingesta y anomalías menores en la secreción de GH^{11,12}.

La terapia con hormona de crecimiento recombinante (rhGH) es aceptada, desde el año 2003, como tratamiento para los niños nacidos pequeños para la edad gestacional (PEG) siempre que se cumplan las siguientes premisas: niños mayores de 4 años de edad (o mayores de 2 años en algunos países) con estatura baja postnatal (altura actual inferior a -2,5 DE y talla parental ajustada en -1 DE) y que han nacido con un peso y/o longitud <-2 DE, donde no se haya demostrado en su evolución recuperación del crecimiento o *catch-up*¹³. Dado que muchos niños con SRS reunirían estos criterios, se podría decir que deberían beneficiarse de dicha terapia, si bien, en algunos países como el nuestro, una entidad sindrómica, como es el caso del SRS, constituye un criterio de exclusión. Pese a ello, dicha terapia debe ser considerada en estos niños con 4 años de edad o incluso antes. Aunque la evidencia existente es escasa, varios estudios parecen demostrar que se trata de una terapia

eficaz, si bien menor en comparación con el resto de niños con PEG no sindrómico. Por ejemplo, un estudio de Toumba *et al.* mostró una mejoría significativa del crecimiento con una altura final de -1,3 DE, especialmente si la talla inicial se encontraba más afectada¹⁴. Otro estudio más reciente de Binder *et al.* mostró una ganancia algo más discreta, de +1,16 DE (u 8 cm) en varones, y de +1,11 DE (o 7,4 cm en niñas)¹⁵. Respecto a los factores predictivos de eficacia, sólo se ha podido demostrar una relación directa con la duración del tratamiento, siendo menor la relación con otros factores como la severidad de la talla al comienzo del tratamiento, la longitud al nacimiento, la respuesta en el primer año de terapia, la altura materna o la presencia de una alteración epigenética¹⁴⁻¹⁶. Por último, aunque son aún menos numerosos estos estudios, la terapia combinada con análogos de GnRH en casos de pubertad adelantada podría mejorar ligeramente esta eficacia¹⁵.

Otros posibles beneficios de la terapia con rhGH, como cambios en el perfil lipídico, el aumento de la densidad mineral ósea, los cambios en el comportamiento y la mejora en la auto-estima requieren ser estudiados en estos pacientes y sopesados con los posibles efectos adversos ya conocidos. De hecho, estos niños también pueden desarrollar resistencia a la insulina, aunque no hay evidencia hasta la fecha para sugerir que esto tenga efectos negativos a largo plazo sobre el metabolismo de la glucosa¹¹.

Pese a todo, algunos autores abogan por mejorar la nutrición de estos niños y

evitar las hipoglucemias nocturnas para potenciar el *catch-up* de crecimiento en los primeros años de vida; y en caso de que este no tenga lugar o no sean prevenibles las hipoglucemias, plantear la terapia con rhGH¹².

2.2. Nutrición

Al igual que el crecimiento, aunque en menor grado, la masa grasa corporal de los niños con SRS sufre un empeoramiento postnatal progresivo hasta los 3 años de edad, que sitúa al peso en -4,1 DE en varones y -4,3 DE en niñas, pero que mejora ligeramente hasta una media en -3 DE (-3,1 DE en varones y -3 DE en mujeres)⁵. Los factores que influyen en este retraso ponderal son similares a los de la talla, si bien parece que la falta de apetito desempeña un factor importante y obliga en algunos casos a una alimentación enteral con sonda o gastrostomía en los primeros años^{5,11}.

2.3. Hipoglucemia

Tanto la escasa ingesta por falta de apetito como un gasto calórico elevado en estos niños son responsables de las hipoglucemias cetósicas nocturnas que padecen durante los primeros años de su vida, sin olvidar la posibilidad, aunque mucho menos probable según algunos autores, de un déficit concomitante de GH^{17,18}. En tales casos se recomienda la ingesta de cantidades reducidas aunque frecuentes a lo largo del día y en forma de suplementos calóricos ricos en carbohidratos de lenta absorción; sin olvidar que se debe instruir a los padres sobre la detección y tratamiento de

esta posible eventualidad. Pese a ello, algunos casos requieren de nutrición enteral continua durante la noche con sonda nasogástrica o gastrostomía y, si se confirma un déficit de GH, terapia con dicha hormona desde el momento del diagnóstico en una, o incluso dos, dosis diarias como forma de prevenirlas¹⁸.

2.4. Asimetría corporal

Es generalmente sutil y de escasa o nula progresión durante la infancia (máximo de 2,5 cm). No suele requerir terapia ortopédica aunque sí seguimiento que constate periódicamente una adecuada estabilidad lumbo-pélvica¹¹. Por otro lado, no parece que la terapia con rhGH determine un empeoramiento de la misma^{12-16,18,19}.

2.5. Alteraciones oculares

Frecuentes pero poco referidas en la literatura²⁰, las alteraciones oculares que parecen asociarse con más significación al SRS son una reducción de la agudeza visual, los trastornos leves de refracción y la anisometropía, no siendo infrecuente, por tanto, el uso de gafas por parte de estos niños. Otras alteraciones menores pero que podrían precisar igualmente de terapia oftalmológica para frenar el desarrollo de la ambliopía, son la ptosis palpebral y el estrabismo. Y dado que la terapia con rhGH es una práctica frecuente en estos niños, se especula que ésta podría modificar el desarrollo ocular y consecuentemente dichas alteraciones, requiriéndose de más estudios a largo

plazo que definan qué beneficio puede reportar dicho tratamiento.

2.6. Desarrollo cognitivo

Las habilidades cognitivas de los niños con SRS son en promedio -1DE por debajo de la población normal, tanto en términos de habilidades verbales como no verbales. Un tercio de ellos, en su mayoría formas de SRS debidas a UPD(7)mat, presentan dificultades en el aprendizaje con bajo rendimiento en lectura y aritmética, precisando un gran porcentaje de ellos apoyo educativo y terapia del habla (ver apartado 7)¹¹. No hay que olvidar que factores como la presencia de hipoglucemias y la frecuente desnutrición de estos niños podrían influir en este aspecto^{11,21}.

Otras comorbilidades menos frecuentes pero que pueden requerir terapia específica son la fisura palatina, problemas menores de audición, anomalías dentarias y craneofaciales, cardiopatías congénitas, defectos de reducción en miembros y anomalías genitales como criptorquidia o hipospadias¹¹.

3. Manejo clínico de los pacientes

El seguimiento de estos pacientes requiere de un manejo multidisciplinar que implique esencialmente a especialistas en endocrinología pediátrica, para controlar el crecimiento y valorar la indicación de terapia con hormona de crecimiento (rhGH); en nutrición, para evaluar la composición

corporal y la necesidad de intervención nutricional; y en genética clínica, para intentar realizar un diagnóstico molecular adecuado y un asesoramiento sobre el riesgo de recurrencia. Las demás comorbilidades exigirían la derivación a los especialistas correspondientes¹¹.

No existen propuestas concretas de seguimiento aunque sugerimos lo siguiente:

3.1. Al diagnóstico

- Valoración, estudio y asesoramiento genético que determine el riesgo de recurrencia (véase apartado 8).
- Informar a los padres de los problemas médicos asociados al SRS en su evolución y en función del mecanismo molecular implicado.
- Anamnesis y exploración física exhaustivas prestando especial atención a los siguientes aspectos: problemas de alimentación, sudoración nocturna (posibles hipoglucemias recurrentes), antropometría (peso, talla/longitud e índice de masa corporal) y malformaciones visibles (configuración craneofacial, del paladar y ocular, asimetría corporal y genitales).
- Determinación de niveles plasmáticos de factores de crecimiento (IGF-1 e IGF-BP3) y glucemia en ayunas. Se recomienda la determinación domiciliaria de glucemia capilar en ayunas y cuando se constate sudoración (nocturna).
- Valoración por los especialistas

en endocrinología y nutrición pediátrica. Interconsulta a otros especialistas en función de los hallazgos encontrados en el momento del diagnóstico (gastroenterología si reflujo gastroesofágico severo, neurología si retraso motor, oftalmología si anomalías oculares –estrabismo o ptosis palpebral-, cardiología si soplo, etc.).

3.2. En el primer año de la vida

- Constatación domiciliaria de las glucemias (en ayunas y cuando se constate sudoración), cuya periodicidad se establecerá en función de que haya tendencia real o no a padecerlas.
- Seguimiento antropométrico frecuente, fundamentalmente del peso, y valoración de la posible necesidad de nutrición enteral (sonda nasogástrica o gastrostomía) en función del hábito de succión, la composición corporal y la tasa de hipoglucemias nocturnas.
- Interconsulta a otros especialistas en función de los hallazgos encontrados en el seguimiento: reflujo gastroesofágico severo (gastroenterología), estrabismo o ptosis palpebral (oftalmología), asimetría corporal que afecte a los miembros inferiores o el tronco si ya existe deambulación (ortopedia).

3.3. En la infancia temprana (1-5 años)

- Constatación domiciliaria de las glucemias hasta el tercero o cuarto año de vida si previamente existían hipoglucemias.
- Seguimiento antropométrico de peso y talla, y de la asimetría:
 - Cada 3 meses, evaluación frecuente de la composición corporal que adecúe la terapia enteral a la edad del paciente.
 - Cada 6 meses, evaluación del crecimiento. Debe valorarse la terapia con rhGH si no existe *catch-up* con 4 años de edad, o antes si persistieran las hipoglucemias pese a la terapia nutricional.

Si se ha iniciado terapia con rhGH, seguimiento anual con edad ósea y analítica que recoja factores de crecimiento (IGF-1, IGF-BP3), función tiroidea (T4L, TSH), glucosa, insulina, HbA1C y lipidograma.

En el seguimiento de dicha terapia se han observado diferencias de eficacia y de niveles séricos de IGF-1 e IGF-BP3 entre los dos mecanismos moleculares implicados. Aquellos niños con hipometilación de ICR1 presentan niveles excesivamente elevados de IGF-1 y IGF-BP3, hallazgo que sugiere insensibilidad a IGF-1 en comparación con aquellos con UPD(7)mat y de origen idiopático. En consonancia con este hallazgo, se ha demostrado

una mejor respuesta en niños con UPD(7)mat que en aquellos con hipometilación de ICR1²², si bien, este hecho no ha podido ser demostrado en adultos que recibieron la misma terapia, por lo que requieren más estudios a largo plazo que establezcan diferencias en este punto¹⁰. Otros estudios parecen demostrar que la terapia con rhGH a corto plazo hasta una recuperación adecuada de la talla puede funcionar sin que esto resulte, como sucede en el resto de los PEG, en un *catch-down* tras su retirada¹².

- Seguimiento anual de una posible asimetría.
- Interconsulta a otros especialistas:
 - Valoración oftalmológica anual/bianual o en función de los hallazgos encontrados.
 - Valoración ortopédica si se constata por primera vez asimetría de los miembros inferiores o del tronco, o si ya existía pero ésta ha empeorado.
 - Valoración neurológica semestral o anual que vigile la adquisición de las habilidades motoras y cognitivas.
 - Valoración maxilofacial a partir de los 2 años de edad, y revisión anual posterior por maxilofacial/odontólogo.

3.4. En la infancia tardía (6-11 años)

- Seguimiento antropométrico de peso, talla y de asimetría de tronco o miembros inferiores, sobre todo en presencia de terapia con rhGH:
 - Cada 6 meses o cada año, evaluación del peso y de la composición corporal.
 - Cada año, evaluación antropométrica del crecimiento y, bianualmente, de edad ósea. Si existe terapia con rhGH, realización anual de edad ósea y analítica que recoja factores de crecimiento (IGF-1, IGF-BP3), función tiroidea (T4L, TSH), glucosa, insulina, HbA1C y lipidograma.
- Interconsulta a otros especialistas, como se ha indicado anteriormente y con la frecuencia establecida en función de las posibles anomalías detectadas.

3.5. En la adolescencia

- Seguimiento antropométrico de peso, talla, asimetría, desarrollo puberal y edad ósea anual:
 - Si existe terapia con rhGH, realización anual de edad ósea y analítica que recoja factores de crecimiento (IGF-1, IGF-BP3), función tiroidea (T4L, TSH), glucosa, insulina, HbA1C y lipidograma. La suspensión de la rhGH, si no se hecho previamente por falta de eficacia o como prueba que constate ausencia de

catch-down, debe realizarse con edad ósea de 14 años en mujer y 15-16 años en varones, o si la velocidad de crecimiento anual es menor de 2 cm/año.

- Interconsulta a otros especialistas, como se ha indicado anteriormente y con la frecuencia establecida en función de las posibles anomalías detectadas.

3.6. En la época adulta

Los problemas médicos en adultos con SRS reportados son muy escasos y la mayoría de ellos no precisan seguimiento de manera rutinaria, por lo que es poca la información disponible sobre la historia natural de la enfermedad en esta edad. Dado que hay evidencia en adultos PEG sobre la propensión a desarrollar problemas como diabetes, hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedades del corazón, hipercoagulabilidad y osteoporosis, se requieren más estudios que establezcan si existen diferencias entre aquellos que padecen SRS y el resto de los PEG²³.

4. Diagnóstico diferencial

Determinadas anomalías cromosómicas y síndromes monogénicos pueden presentar manifestaciones clínicas que se solapan con las del SRS (retraso del crecimiento pre- y postnatal, rasgos craneofaciales, problemas de alimentación, escasa respuesta al tratamiento con hormona del crecimiento, etc.), por lo que deben considerarse en el diagnóstico diferencial.

4.1. Delección subtelomérica 15q

Este síndrome es debido a la haploinsuficiencia de *IGF1R* localizado en 15q26.3. Características distintivas: es habitual el retraso psicomotor, posiblemente debido a la pérdida de genes contiguos, y la asociación de cardiopatía congénita atribuible a la pérdida de *NR2F2*, implicado en angiogénesis y en el desarrollo de estructuras cardiacas²⁴⁻²⁶.

4.2. Delección intersticial 12q14

El síndrome de microdelección 12q14 se caracteriza por retraso del crecimiento, retraso psicomotor y osteopoiquilosis (displasia ósea esclerosante benigna y asintomática). El retraso del crecimiento se atribuye a la haploinsuficiencia de *HMG2* y la osteopoikilosis al gen contiguo *LEMD3*^{26,27}.

4.3. Síndrome (nanismo) Mulibrey (MIM 253250)

Acrónimo del inglés *Muscle, liver, brain, eye*. Características distintivas: hallazgos oculares (manchas de pigmentación amarillenta en la retina), cardiacos (engrosamiento del pericardio que puede progresar a pericarditis constrictiva) y radiológicos (huesos largos finos con engrosamiento de la cortical y canal medular estrecho, silla turca en forma de jota). Causado por mutaciones en homocigosis del gen *TRIM3*^{728,29}.

4.4. Síndrome SHORT (MIM 269880)

Acrónimo del inglés *Short stature, hyperextensible joints and inguinal hernia, ocular depression, delays of tooth eruption*. Características distintivas: hallazgos oculares (anomalía de Axenfeld-Rieger), dentales (retraso de la erupción dental, hipodontia), rasgos faciales (ojos hundidos, nariz prominente, filtro corto y micrognatia, escasez de tejido graso facial), e hipoacusia neurosensorial (25%). Es frecuente la lipodistrofia y el desarrollo de diabetes tipo 2 a partir de la adolescencia debido a resistencia a la insulina. Se ha descrito nefrocalcinosis asociada (10%). Causado por mutaciones en heterocigosis del gen *PIK3R1*^{30,31}.

4.5. Síndrome 3-M (MIM 237750)

Acrónimo de la inicial de los tres primeros autores que lo describieron³². Características distintivas: estructura corporal compacta (cuello corto, discreto acortamiento de extremidades), macrocefalia (cabeza grande para el tamaño del cuerpo), rasgos faciales (forma de la cara más triangular con una frente menos prominente) y hallazgos radiológicos (huesos largos delgados con estrechamiento de la diáfisis, metáfisis ensanchadas y engrosamiento cortical). No es un diagnóstico fácil de realizar con confianza. Causado por mutaciones en homocigosis en los genes *CUL7* (~70%), *OBSL1* (25%) o *CCDC8* (5%)^{33,34}.

4.6. Síndrome Dubowitz (MIM 223370)

Inicialmente descrito por Dubowitz en 1965³⁵. Características distintivas: microcefalia, rasgos faciales (hendiduras palpebrales cortas, ptosis palpebral, hipertelorismo), anomalías cutáneas (eczema, pelo escaso, cejas poco pobladas), anomalías del paladar (hendiduras, insuficiencia velo faríngea), retraso psicomotor con trastornos del comportamiento (déficit de atención, hiperactividad). Estas manifestaciones se solapan a su vez con el **síndrome alcohólico fetal**. La evidencia disponible sugiere una herencia autosómica recesiva pero hasta el momento no se ha identificado el gen causante del síndrome Dubowitz³⁶.

4.7. Síndrome Floating-Harbor (MIM 136140)

El nombre procede de los hospitales donde se describieron los primeros casos en los años 70. Características distintivas: rasgos faciales (similares a SHORT, pero sin la ausencia de tejido graso facial de éste, nariz prominente con aletas nasales poco desarrolladas y columella pronunciada que sobresale por debajo del nivel de la narinas, filtro corto, labio superior fino), retraso psicomotor (50%) con retraso específico del desarrollo del lenguaje (100%). Causado por mutaciones en heterocigosis del gen *SRCAP*^{37,38}.

4.8. Síndrome Temple (véase capítulo 5)

Debido a disomía uniparental materna del cromosoma 14 o a epimutaciones en la región 14q32.2. Características distintivas: déficit de crecimiento pre- y post-natal, rasgos faciales (frente prominente, ojos almendrados, nariz con punta gruesa), hipotonía y retraso psicomotor, manos y pies pequeños. Es frecuente la tendencia a la obesidad tras el fallo de medro inicial. Se ha propuesto que el solapamiento de manifestaciones con SRS puede ser especialmente llamativo en aquellos casos debidos a epimutación³⁹.

4.9. Síndrome IMAGE (MIM 300290)

Acrónimo del inglés *Intrauterine growth retardation, Metaphyseal dysplasia, Adrenal hypoplasia congenita, Genital anomalies*. Descrito por Vilain et al. en 1999⁴⁰. Este síndrome se caracteriza por retraso del crecimiento intrauterino, en ocasiones acompañado de macrocefalia, frente prominente o anomalías genitales, por lo que guarda similitudes con el Silver-Russell⁴¹. Características distintivas: hipoplasia adrenal, una forma leve de displasia metafisaria e hipogonadismo hipogonadotrópico con criptorquidia y micropene. Causado por mutaciones de ganancia de función en el dominio de unión a PCNA del gen *CDKN1C*, en heterocigosis y de transmisión materna⁴¹.

4.10. Otras

Otras entidades con características

distintivas mucho más evidentes incluyen el **síndrome Bloom** (MIM 210900: trastorno de la reparación del ADN que asocia fotosensibilidad, eritema telangiectático y fragilidad cromosómica; causado por mutaciones en homocigosis del gen *RECQL3*) y al **enanismo primordial osteodisplásico tipo II** (MIM 210720: displasia esquelética que asocia acortamiento mesomélico de extremidades y hallazgos radiológicos característicos; causado por mutaciones en homocigosis del gen *PCNT*).

5. Alteraciones genéticas asociadas

Dado el amplio rango de rasgos clínicos asociados al síndrome de Silver-Russell, el diagnóstico clínico puede ser en ocasiones subjetivo, y necesita sustentarse en pruebas de laboratorio. Sin embargo, hay que destacar que sólo se conoce en torno al 50% de las causas genéticas o epigenéticas de este síndrome (Tabla 1).

Tabla 1: Resumen de los distintos mecanismos implicados en el SRS.		
Mecanismo	Región	% casos explicados
Hipometilación ICR1 (<i>H19</i>)	11p15	44
Duplicación		1-2
Disomía uniparental materna		Raro (1 caso)
	chr7	5-10
Otras alteraciones: translocaciones, deleciones, duplicaciones...	17q24-q25	1
	12q14	

5.1. Alteraciones en 11p15

Las alteraciones más frecuentes responsables del síndrome de Silver-Russell son epimutaciones (o duplicaciones) en la región cromosómica 11p15. En una primera instancia, se descubrió que la duplicación de esta región cromosómica de origen materno se asociaba con retraso de crecimiento, y más específicamente con rasgos del Silver-Russell⁴². Por analogía con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (véase capítulo 4), que igualmente puede deberse a la duplicación paterna de esta misma región, se analizó el estado de metilación en los centros de la impronta en 11p15. De esta forma se averiguó que la desmetilación del centro regulador de la impronta telomérico ICR1 (*imprinted control region 1*) es una causa frecuente del síndrome, entre el 38% y el 63% de los casos^{43,44}. Además, es importante destacar que esta pérdida de metilación en ICR1 habitualmente aparece en mosaico, lo que tiene importantes consecuencias para el asesoramiento genético de esta enfermedad, como se verá más adelante, así como desde el punto de vista clínico, ya que justifica la frecuente presencia de asimetría en el crecimiento (hemihipoplasia) o un cierto grado de expresividad variable de este síndrome, cuya manifestación más llamativa son aquellos casos de gemelos monozigóticos con gran disparidad fenotípica⁴⁵. Se ha sugerido que un grupo de pacientes con este tipo de epimutación en mosaico escape al diagnóstico molecular basado en el ADN de células sanguíneas, por lo que podría ser recomendable el estudio

de otros tipos de tejidos con diferente origen embrionario⁴⁶.

ICR1 es una región de metilación diferencial, de tal forma que la copia de origen paterno se encuentra completamente metilada, mientras que la copia materna ha de estar desmetilada. Además la región contiene siete sitios de unión al factor de transcripción CTCF, de tal forma que en la copia desmetilada (materna) la unión del factor CTCF favorece la expresión de *H19* y bloquea la expresión de *IGF2*. Por el contrario, el estado metilado de ICR1 en la copia paterna impide la unión a CTCF, facilitando indirectamente la expresión del factor de crecimiento *IGF2*. *IGF2* es un gen de expresión paterna que promueve el crecimiento y desarrollo fetal en tejidos derivados del endodermo y mesodermo⁴⁷. Por su parte, *H19* genera un transcrito no codificante que podría servir como precursor de microRNAs, y cuya función, aparte de competir por la expresión con *IGF2*, no está completamente definida⁴⁸.

Curiosamente, esta alteración de la impronta es complementaria a una de las causas del síndrome de Beckwith-Wiedemann, que consiste en la hipermetilación de esta misma región ICR1. Otras causas de este síndrome son la pérdida de metilación en la región ICR2 o mutaciones de pérdida de función del gen *CDKN1C*, gen de expresión materna cuyo patrón de impronta está regulado por ICR2 (véase capítulo 4). Recientemente se ha descrito un paciente con síndrome de Silver-Russell debido a una duplicación del dominio ICR2⁴⁹. Igualmente se

ha descrito otro paciente con disomía uniparental materna del cromosoma 11 en mosaico y metilación anómala de ICR2⁵⁰. Todo lo cual sugiere que ambos dominios de impronta en 11p15 pueden estar implicados en el desarrollo del síndrome, de forma complementaria con la etiología del Beckwith-Wiedemann. Además, como se menciona más arriba, determinadas mutaciones en el gen *CDKN1C* que afectan al dominio de unión a PCNA ocasionan el síndrome IMAGE.

5.2. Disomía uniparental materna del cromosoma 7

Otra causa recurrente del síndrome es la disomía uniparental (*uniparental disomy*, UPD) materna del cromosoma 7 [UPD(7)mat], presente en torno al 10% de pacientes con Silver-Russell⁵¹. Este tipo de disomía uniparental se describió inicialmente en un paciente con isodisomía que presentaba retraso del crecimiento y fibrosis quística debida a una mutación en el gen *CFTR* heredada de su madre en homocigosis. Por otra parte, la ausencia de un segmento común de isodisomía en pacientes con UPD(7)mat y retraso del crecimiento permite descartar una herencia recesiva⁵².

Actualmente hay dos regiones candidatas en el cromosoma 7 en las que se han centrado numerosos estudios, aunque por el momento no se han encontrado resultados concluyentes. En la región 7p11.2-p13 se han descrito duplicaciones asociadas a trastornos del crecimiento y rasgos de Silver-Russell.

En esta región se localiza el gen *GRB10* (*Growth factor Receptor Bound protein 10*) que está sometido a impronta según un patrón complejo específico de tejidos, y también específico de isoformas. Por ejemplo, en cerebro fetal se expresa exclusivamente la copia paterna, en trofoblasto de *villi* coriónico se expresa la copia materna, mientras que en otros tejidos fetales se expresan ambas copias por igual⁵³. De hecho se ha propuesto que es la sobreexpresión de este represor del crecimiento, y no la ausencia de expresión de un gen con impronta paterna, lo que causaría el síndrome por UPD(7)mat⁵⁴. De momento, no se han detectado mutaciones puntuales ni epimutaciones de *GRB10* en pacientes con el síndrome^{55,56}. Por otra parte, hay datos que sugieren la implicación de la región 7q32 en el síndrome, como son la presencia de tres genes sometidos a impronta (*MEST/PEG1*, *CPA4* y *COPG2*) y de dos RNAs no codificantes (*MESTIT1*, *COPG2IT1*), así como la descripción de varios casos con disomía uniparental materna restringida a esta región^{57,58}. No obstante, tampoco se han identificado alteraciones genéticas o defectos de la impronta aislados, por lo que sigue sin estar definida la implicación de estos genes en la etiología del síndrome.

Ocasionalmente, se han descrito pacientes aislados con rasgos sugestivos de Silver-Russell que presentan reordenamientos cromosómicos. Además de las duplicaciones en los cromosomas 7 y 11, ya mencionadas, se han descrito translocaciones cromosómicas equilibradas con

implicación de la región 17q24-q25 en dos pacientes distintos que, sin embargo, no comparten el punto de rotura⁵⁹. Otra alteración recurrente es la delección de menos de 3 Mb en la región cromosómica 12q14, descrita en algunos pacientes con síndrome de Silver-Russell o signos sugestivos del mismo^{27,60}. Esta misma delección se identificó en un paciente en nuestra propia serie asociada a signos de Silver-Russell (resultados no publicados).

6. Estudios moleculares

En algunos casos, los rasgos fenotípicos del paciente hacen sospechar que la causa genética del SRS pueda ser una pérdida de metilación en 11p15 o una UPD(7)mat (véase apartado 7). Sin embargo, si la orientación no es clara, se recomienda empezar por los estudios de metilación, dada la mayor incidencia de esta causa en el SRS (Figura 2).

Existen distintas técnicas para detectar cambios específicos de la metilación

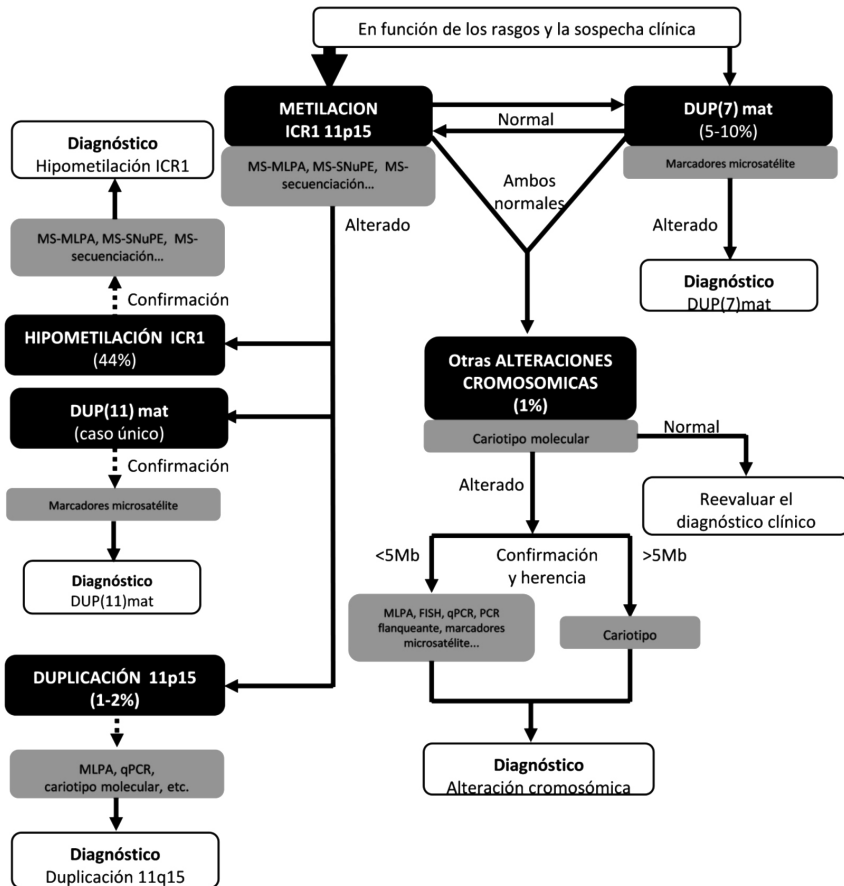


Figura 2: Algoritmo diagnóstico en el SRS (adaptado de Eggermann *et al.*, 2012⁶⁸)

(ver capítulo 1 de estas guías). Si se encuentra una alteración, algunas de estas técnicas, como el MS-MLPA, permiten diferenciar entre las posibles causas: una epimutación en el *locus* ICR1, una duplicación en 11p15, o sospechar una UPD(11)mat. Si no es así, se requerirá aplicar otros estudios complementarios que permitan discernir el mecanismo causante.

Si el resultado del estudio de metilación es normal, o cuando la UPD(7)mat supone la primera sospecha clínica, el estudio de segregación familiar (del paciente y padres) con marcadores microsatélites, siempre que sean informativos, permitirá confirmar o descartar una UPD(7)mat.

Por último, en caso de que ambas aproximaciones hayan sido negativas, es recomendable realizar un cariotipo molecular mediante CGH-array para descartar otras alteraciones cromosómicas. Si esta prueba detecta algún cambio de dosis, se pueden utilizar distintas técnicas confirmatorias en función del resultado. Si se trata de una microdelección o microduplicación de un tamaño inferior a 5 Mb, se pueden utilizar diferentes aproximaciones, como MLPA, qPCR o marcadores microsatélites, según la región afectada y las técnicas disponibles en el laboratorio. En caso de que la alteración sea visible en un cariotipo convencional, especialmente si es terminal, se recomienda realizar esta técnica y descartar que los progenitores sean portadores de una translocación cromosómica equilibrada.

Finalmente, si no hemos conseguido

confirmar la sospecha clínica, es recomendable reevaluar el caso y realizar un diagnóstico diferencial que permita reorientarlo.

7. Correlación genotipo-fenotipo

No se han publicado series amplias de pacientes que permitan establecer de forma inequívoca una correlación (epi)genotipo-fenotipo, debido tanto a la rareza de algunas causas, como al hecho de que el cuadro clínico en la edad adulta es menos evidente que en la primera infancia.

Las formas de SRS debidas a hipometilación de ICR1 suelen presentar manifestaciones “clásicas” y más severas, con menor peso y talla al nacimiento y menor índice de masa corporal. Es más frecuente en estos casos la asimetría corporal, la macrocefalia relativa y los rasgos faciales característicos⁶. Por el contrario, las formas de SRS debidas a UDP(7)mat suelen presentar manifestaciones más leves, con menor restricción del crecimiento y ausencia de macrocefalia^{2,51,52,61}.

En la serie más amplia descrita hasta el momento de pacientes con SRS y confirmación molecular, Wakeling et al.¹⁰ compararon el fenotipo de 40 casos debidos a hipometilación ICR1 con el de 24 casos debidos a UPD(7)mat. El 61% de los casos con hipometilación ICR1 presentaban manifestaciones clásicas de SRS, frente a tan solo el 20% de los casos con UPD(7)mat. La asimetría era más frecuente en los casos

con hipometilación en ICR1, reflejando posiblemente el mosaicismo de la hipometilación en los diferentes tejidos. También se observó en estos casos una menor tendencia a la restricción del crecimiento postnatal que en los casos de UPD(7)mat, quienes, por otro lado, muestran mejor respuesta al tratamiento con hormona del crecimiento²². Se observó retraso del desarrollo psicomotor, habitualmente en grado leve, en aproximadamente una tercera parte de todos los pacientes con SRS. Los casos debidos a UPD(7)mat son los que mostraron una mayor frecuencia de retraso global del desarrollo, y dificultades posteriores de aprendizaje, en un 65% frente a tan solo el 20% de los casos por hipometilación en ICR1¹⁰. El retraso del desarrollo del lenguaje se ha atribuido a la ausencia de una copia paterna del gen *FOXP2*, presuntamente sometido a impronta genética^{61,62}. Los problemas de alimentación y la falta de interés por la comida se observaron en ambos grupos, al igual que la hipersudoración nocturna. Curiosamente, se observó una mayor frecuencia de anomalías congénitas (hendidura del paladar, cardiopatía, anomalías urogenitales y esqueléticas) en los casos con hipometilación ICR1.

En cualquier caso, tanto los pacientes con hipometilación ICR1 como UPD(7)mat pueden no mostrar el fenotipo característico, por lo que el estudio genético molecular debe considerarse siempre ante un paciente con fenotipo sugestivo de SRS. La ausencia de retraso del crecimiento intrauterino no debe excluir la indicación de estudio en estos pacientes⁶³.

Por último, hay que tener en cuenta que algunas causas del síndrome pueden conllevar otras anomalías por la pérdida o ganancia de dosis en genes en aquellos casos ocasionados por duplicaciones o deleciones cromosómicas. Igualmente, la isodisomía uniparental del cromosoma 7 puede condicionar la aparición de otras enfermedades si se hereda (en este caso de la madre) una mutación recesiva en homocigosis; así se han descrito dos casos con fibrosis quística y otro con mutación del gen *COL1A2*⁶⁴.

8. Asesoramiento genético

La mayoría de los pacientes con el síndrome de Silver-Russell son casos esporádicos. Los escasos casos familiares suelen ser compatibles con una herencia autosómica dominante y una marcada variabilidad intrafamiliar⁶⁵. Tan sólo se han descrito dos parejas de hermanos con recurrencia de la desmetilación de ICR1, supuestamente debidos a mosaicismo germinal, y una aparente transmisión vertical de padre a hija por causas no aclaradas⁶⁶.

La pérdida de metilación en 11p15 aparece habitualmente en mosaico, lo cual se considera indicativo de un error epigenético que se produce de forma post-cigótica, por lo que difícilmente será transmisible⁴⁶. El riesgo de recurrencia es comparable al de la población general. De igual forma, todos los casos conocidos con UPD(7)mat son el resultado de una no-disyunción cromosómica durante

la meiosis materna, seguida de un rescate trisómico en el que se pierde el cromosoma de origen paterno, por lo que el riesgo de recurrencia tampoco se considera aumentado, asociándose sin embargo a edad materna avanzada⁶¹. En ninguno de los dos casos está indicado el diagnóstico prenatal.

La única excepción es la presencia de una translocación cromosómica equilibrada que pudiera favorecer una mayor predisposición a trisomía del cromosoma 7, y por tanto una posterior UPD(7)mat⁶⁷.

Una situación completamente distinta es la de aquellos casos debidos a un reordenamiento cromosómico, ya que los portadores de una delección, duplicación o translocación cromosómica causante del síndrome tendrán un riesgo *a priori* del 50% de transmitirla a su descendencia.

En los casos en los que no se logra identificar el defecto molecular, se debe ser prudente y asegurarse de descartar otras entidades sindrómicas mencionadas en el diagnóstico diferencial (véase apartado 4).

RESUMEN

El síndrome de Silver-Russell (SRS) es un trastorno genético de causa heterogénea que se caracteriza por restricción del crecimiento pre y postnatal, rasgos faciales característicos y asimetría corporal. La desnutrición y las hipoglucemias nocturnas constituyen las principales complicaciones médicas, especialmente en los primeros años de vida. El desarrollo cognitivo y pronóstico intelectual es habitualmente favorable en la mayoría de los casos de SRS. La orientación diagnóstica es fundamentalmente clínica e implica descartar otras entidades con manifestaciones clínicas similares que forman parte del diagnóstico diferencial.

Las epimutaciones de la región 11p15 y la disomía uniparental materna del cromosoma 7 explican la mitad de los casos del SRS; sin embargo, en cerca de un 40% de casos no se logra establecer una causa específica. El análisis molecular debe realizarse escalonadamente, teniendo en cuenta la frecuencia de las diferentes causas epigenéticas y genéticas.

Las formas de SRS debidas a epimutaciones de la región 11p15 suelen presentar manifestaciones clásicas y más severas. La mayoría de los casos de SRS son esporádicos y el riesgo de recurrencia es bajo en los casos debidos a epimutaciones de la región 11p15 y disomía uniparental materna del cromosoma 7, comparable con el de la población general.

REFERENCIAS

1. Eggermann T. Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:355-364.
2. Binder G, Begemann M, Eggermann T, Kannenberg K. Silver-Russell syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:153-160.
3. Silver HK, Kiyasu W, George J, Deamer WC. Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 1953;12:368-376.
4. Russell A. A syndrome of intra-uterine dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc R Soc Med* 1954;47:1040-1044.
5. Wollmann HA, Kirchner T, Enders H, Preece MA, Ranke MB. Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients. *Eur J Pediatr* 1995;154:958-968.
6. Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN et al. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3148-3154.
7. Price SM, Stanhope R, Garrett C, Preece MA, Trembath RC. The spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet* 1999;36:837-842.
8. Dias RP, Nightingale P, Hardy C et al. Comparison of the clinical scoring systems in Silver-Russell syndrome and development of modified diagnostic criteria to guide molecular genetic testing. *J Med Genet* 2013;50:635-639.
9. Davies PS, Valley R, Preece MA. Adolescent growth and pubertal progression in the Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child* 1988;63:130-135.
10. Wakeling EL, Amero SA, Alders M et al. Epigenotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2010;47:760-768.
11. Wakeling EL. Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child* 2011;96:1156-1161.
12. Christoforidis A, Maniadaki I, Stanhope R. Managing children with Russell-Silver syndrome: more than just growth hormone treatment? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:651-652.
13. Lee PA, Chernausk SD, Hokken-Koelega AC, Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age, April 24-October 1, 2001. *Pediatrics* 2003;111:1253-1261.
14. Toumba M, Albanese A, Azcona C, Stanhope R. Effect of long-term growth hormone treatment on final height of children with Russell-Silver syndrome. *Horm Res Paediatr* 2010;74:212-217.
15. Binder G, Liebl M, Woelfle J, Eggermann T, Blumenstock G, Schweizer R. Adult height and epigenotype in children with Silver-Russell syndrome treated with GH. *Horm Res Paediatr* 2013;80:193-200.
16. Ranke MB, Lindberg A. Height at start, first-year growth response and cause of shortness at birth are major determinants of adult height outcomes of short children born small for gestational age and Silver-Russell syndrome treated with growth hormone: analysis of data from KIGS. *Horm Res Paediatr* 2010;74:259-266.
17. Azcona C, Albanese A, Bareille P, Stanhope R. Growth hormone treatment in growth hormone-sufficient and -insufficient children with intrauterine growth retardation/Russell-Silver syndrome. *Horm Res* 1998;50:22-27.
18. Azcona C, Stanhope R. Hypoglycaemia and Russell-Silver syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18:663-670.
19. Rizzo V, Traggiai C, Stanhope R. Growth hormone treatment does not alter lower limb asymmetry in children with Russell-Silver syndrome. *Horm Res* 2001;56:114-116.
20. Andersson GM, Dahlgren J, Aring E, Kraemer M, Hellstrom A. Ophthalmological findings in children and adolescents with Silver-Russell syndrome. *Br J Ophthalmol* 2011;95:637-641.
21. Lai KY, Skuse D, Stanhope R, Hindmarsh P. Cognitive abilities associated with the Silver-Russell syndrome. *Arch Dis Child* 1994;71:490-496.
22. Binder G, Seidel AK, Martin DD et al. The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1402-1407.
23. Hall JG. Review and hypothesis: syndromes with severe intrauterine growth restriction and very short stature--are they related to the epigenetic mechanism(s) of fetal survival involved in

- the developmental origins of adult health and disease? *Am J Med Genet A* 2010;152A:512-527.
24. Davidsson J, Collin A, Bjorkhem G, Soller M. Array based characterization of a terminal deletion involving chromosome subband 15q26.2: an emerging syndrome associated with growth retardation, cardiac defects and developmental delay. *BMC Med Genet* 2008;9:2-
 25. Nakamura E, Makita Y, Okamoto T et al. 5.78 Mb terminal deletion of chromosome 15q in a girl, evaluation of NR2F2 as candidate gene for congenital heart defects. *Eur J Med Genet* 2011;54:354-356.
 26. Fokstuen S, Kotzot D. Chromosomal rearrangements in patients with clinical features of Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet A* 2014;164A:1595-1605.
 27. Spengler S, Schonherr N, Binder G et al. Submicroscopic chromosomal imbalances in idiopathic Silver-Russell syndrome (SRS): the SRS phenotype overlaps with the 12q14 microdeletion syndrome. *J Med Genet* 2010;47:356-360.
 28. Karlberg N, Jalanko H, Perheentupa J, Lipsanen-Nyman M. Mulibrey nanism: clinical features and diagnostic criteria. *J Med Genet* 2004;41:92-98.
 29. Avela K, Lipsanen-Nyman M, Idanheimo N et al. Gene encoding a new RING-B-box-Coiled-coil protein is mutated in mulibrey nanism. *Nat Genet* 2000;25:298-301.
 30. Koenig R, Brendel L, Fuchs S. SHORT syndrome. *Clin Dysmorphol* 2003;12:45-49.
 31. Dymont DA, Smith AC, Alcantara D et al. Mutations in PIK3R1 cause SHORT syndrome. *Am J Hum Genet* 2013;93:158-166.
 32. Miller JD, McKusick VA, Malvaux P, Temtamy S, Salinas C. The 3-M syndrome: a heritable low birthweight dwarfism. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1975;11:39-47.
 33. Huber C, Munnich A, Cormier-Daire V. The 3M syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011;25:143-151.
 34. Hanson D, Murray PG, Coulson T et al. Mutations in CUL7, OBSL1 and CCDC8 in 3-M syndrome lead to disordered growth factor signalling. *J Mol Endocrinol* 2012;49:267-275.
 35. Dubowitz V. Familial low birthweight dwarfism with an unusual facies and skin eruption. *J Med Genet* 1965;2:12-17.
 36. Stewart DR, Pemov A, Johnston JJ et al. Dubowitz syndrome is a complex comprised of multiple, genetically distinct and phenotypically overlapping disorders. *PLoS One* 2014;9:e98686-
 37. White SM, Morgan A, Da CA et al. The phenotype of Floating-Harbor syndrome in 10 patients. *Am J Med Genet A* 2010;152A:821-829.
 38. Hood RL, Lines MA, Nikkel SM et al. Mutations in SRCAP, encoding SNF2-related CREBBP activator protein, cause Floating-Harbor syndrome. *Am J Hum Genet* 2012;90:308-313.
 39. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* 2014;
 40. Vilain E, Le MM, Lecoindre C et al. IMAGE, a new clinical association of intrauterine growth retardation, metaphyseal dysplasia, adrenal hypoplasia congenita, and genital anomalies. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:4335-4340.
 41. Arboleda VA, Lee H, Parnaik R et al. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet* 2012;44:788-792.
 42. Eggermann T, Meyer E, Obermann C et al. Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? *J Med Genet* 2005;42:e26-
 43. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005;37:1003-1007.
 44. Blik J, Terhal P, van den Bogaard MJ et al. Hypomethylation of the H19 gene causes not only Silver-Russell syndrome (SRS) but also isolated asymmetry or an SRS-like phenotype. *Am J Hum Genet* 2006;78:604-614.
 45. Bailey W, Popovich B, Jones KL. Monozygotic twins discordant for the Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet* 1995;58:101-105.
 46. Eggermann T, Begemann M, Binder G, Spengler S. Silver-Russell syndrome: genetic basis and molecular genetic testing. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:19-
 47. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 1990;345:78-80.
 48. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007;13:313-316.
 49. Schonherr N, Meyer E, Roos A, Schmidt A, Wollmann HA, Eggermann T. The centromeric 11p15 imprinting centre is also involved in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2007;44:59-63.

50. Bullman H, Lever M, Robinson DO, Mackay DJ, Holder SE, Wakeling EL. Mosaic maternal uniparental disomy of chromosome 11 in a patient with Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2008;45:396-399.
51. Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 1995;4:583-587.
52. Preece MA, Price SM, Davies V et al. Maternal uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 1997;34:6-9.
53. Monk D, Arnaud P, Frost J et al. Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. *Hum Mol Genet* 2009;18:3066-3074.
54. Monk D, Wakeling EL, Proud V et al. Duplication of 7p11.2-p13, including GRB10, in Silver-Russell syndrome. *Am J Hum Genet* 2000;66:36-46.
55. Mergenthaler S, Hitchins MP, Blagitko-Dorfs N et al. Conflicting reports of imprinting status of human GRB10 in developing brain: how reliable are somatic cell hybrids for predicting allelic origin of expression? *Am J Hum Genet* 2001;68:543-545.
56. Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE. The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2008;45:193-199.
57. Hannula K, Lipsanen-Nyman M, Kontiokari T, Kere J. A narrow segment of maternal uniparental disomy of chromosome 7q31-qter in Silver-Russell syndrome delimits a candidate gene region. *Am J Hum Genet* 2001;68:247-253.
58. Eggermann T, Schonherr N, Jager S et al. Segmental maternal UPD(7q) in Silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 2008;74:486-489.
59. Dorr S, Midro AT, Farber C, Giannakudis J, Hansmann I. Construction of a detailed physical and transcript map of the candidate region for Russell-Silver syndrome on chromosome 17q23-q24. *Genomics* 2001;71:174-181.
60. Bruce S, Hannula-Jouppi K, Puoskari M et al. Submicroscopic genomic alterations in Silver-Russell syndrome and Silver-Russell-like patients. *J Med Genet* 2010;47:816-822.
61. Hannula K, Kere J, Pirinen S, Holmberg C, Lipsanen-Nyman M. Do patients with maternal uniparental disomy for chromosome 7 have a distinct mild Silver-Russell phenotype? *J Med Genet* 2001;38:273-278.
62. Feuk L, Kalervo A, Lipsanen-Nyman M et al. Absence of a paternally inherited FOXP2 gene in developmental verbal dyspraxia. *Am J Hum Genet* 2006;79:965-972.
63. Eggermann T, Gonzalez D, Spengler S, Arslan-Kirchner M, Binder G, Schonherr N. Broad clinical spectrum in Silver-Russell syndrome and consequences for genetic testing in growth retardation. *Pediatrics* 2009;123:e929-e931.
64. Eggerding FA, Schonberg SA, Chehab FF, Norton ME, Cox VA, Epstein CJ. Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation. *Am J Hum Genet* 1994;55:253-265.
65. Duncan PA, Hall JG, Shapiro LR, Vibert BK. Three-generation dominant transmission of the Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet* 1990;35:245-250.
66. Bartholdi D, Krajewska-Walasek M, Ounap K et al. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet* 2009;46:192-197.
67. Dupont JM, Cuisset L, Cartigny M et al. Familial reciprocal translocation t(7;16) associated with maternal uniparental disomy 7 in a Silver-Russell patient. *Am J Med Genet* 2002;111:405-408.
68. Eggermann T, Spengler S, Gogiel M, Begemann M, Elbracht M. Epigenetic and genetic diagnosis of Silver-Russell syndrome. *Expert Rev Mol Diagn* 2012;12:459-471.

Capítulo 4: SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN

Jair Tenorio^{1,2,3*}, Guiomar Pérez de Nanclares^{4*}, Julián Nevado^{1,2}, Irene Dapia^{1,2}, Gema Gordo^{1,2}, David Monk⁶, Pablo Lapunzina^{1,2,3}

¹INGEMM Instituto de Genética Médica y Molecular- IdiPAZ-Hospital Universitario La Paz, Madrid. ²CIBERER- Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, ISCIII, Madrid. ³RESSC y SOGRI- Registro Español de Síndromes de Sobrecrecimiento- Spanish Overgrowth Syndrome Registry Initiative, Madrid. ⁴Laboratorio de (Epi)Genética Molecular. Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, Instituto Nacional de Investigación BioAraba, Vitoria-Gasteiz. ⁵IdiBell, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Bellvitge, Cataluña.

* Ambos autores colaboraron por igual y deben considerarse co-primeros autores

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

1.1. Introducción

El Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) es una enfermedad genética que cursa principalmente con sobrecrecimiento físico durante los primeros años de vida. Los niños con BWS tienen alto peso al nacimiento y un crecimiento acelerado durante la primera infancia. Las personas con BWS suelen tener un desarrollo físico e intelectual dentro del rango de normalidad. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede mostrar algún retraso en la maduración neurológica, provocado por alteraciones de la glucemia durante el período perinatal

y/o anomalías cromosómicas de la región 11p (principalmente duplicaciones de origen paterno). Otro de los factores a tener en cuenta es una susceptibilidad mayor que la población general a desarrollar tumores; mientras que en la población general el riesgo de cáncer en menores de 14 años es de aproximadamente 1/15.000 niños, en el BWS el riesgo tumoral global es de 3-5%.

El BWS se debe a alteraciones genéticas complejas (mecanismos epigenéticos que alteran el imprinting, pequeñas deleciones y duplicaciones, mutaciones puntuales en genes de la región 11p, disomía uniparental, traslocación y reordenamientos cromosómicos, ver apartado 4). La frecuencia de cada mecanismo patogénico es diferente y el diagnóstico molecular final se realiza, en general, en centros especializados en estas patologías.

Tabla 1. Características clínicas observadas en el Síndrome de Beckwith- Wiedemann

Muy frecuentes	Poco frecuentes
Macrosomía Pliegues en lóbulos de la oreja Fosetas en helix posterior Macroglosia Onfalocèle Hernia umbilical Hipotonía Hipercrecimiento en la infancia Nefromegalia Hepatoesplenomegalia Hemihiperplasia Hipoglucemia	Diastasis de rectos Facies característica Pie equinovaro Nistagmo y estrabismo Tumores embrionarios Deficit de atención con hiperactividad
Frecuentes	Ocasionales
Citomegalia adrenocortical Polihidramnios Edad ósea avanzada Erupción prematura de los dientes Prematuridad Gemelaridad Malformación capilar (hemangioma plano)	Malformación anatómica cerebral Convulsiones Retraso mental leve/Fracaso escolar Escoliosis Cardiopatía congénita o arritmias Diabetes o prediabetes

1.2. Manifestaciones Clínicas

Existe un número importante de hallazgos en el BWS. Los más frecuentes se enumeran en la Tabla 1. Aunque no hay consenso absoluto sobre los criterios clínicos diagnósticos para el BWS, varios autores han sugerido diferentes criterios mayores y menores (Tabla 2).

1.2.1. Presentación prenatal y perinatal

La característica más común en BWS detectada antes del nacimiento es la macrosomía (90%) y el polihidramnios (50%)^{1,2}. El 50% de los pacientes nacen de forma prematura.

Otras características comunes son un cordón umbilical largo y una placenta que, de media, pesa casi el doble de lo esperable para la edad gestacional. Se han descrito características de BWS en cerca de un tercio de fetos/recién nacidos de embarazos asociados a displasia mesenquimal placentaria³.

1.2.2. Crecimiento

La macroglosia y la macrosomía, por lo general, están presentes desde el nacimiento (una longitud media al nacer de unos 52,6cm y peso de 4kg)⁴, aunque se han descrito algunos casos de aparición más tardía⁵. Al llegar a adultos, por lo general, se mantienen en la zona normal-alta, a pesar del rápido crecimiento durante la infancia. La velocidad de crecimiento suele ralentizarse sobre los 7-8 años de edad.

Si el paciente presenta hemihiperplasia (llamada erróneamente hemihipertrofia), se apreciará desde el nacimiento, pero conforme crezca podrá ser más o menos evidente. La hemihiperplasia puede afectar segmentos del cuerpo y/o órganos y tejidos concretos. Cuando hay varios segmentos implicados, la hemihiperplasia puede estar limitada a una región del cuerpo (ipsilateral) o incluir lados opuestos (contralateral)⁶.

Tabla 2. Criterios diagnósticos utilizados por varios autores para el Síndrome de Beckwith Wiedemann (modificada de Rump y colaboradores¹²²).

Características	Referencias		
	Elliott y cols ¹	DeBaun y Tucker ²⁶	Weksberg y cols ¹¹
Criterios mayores	-Defecto de pared abdominal anterior -Crecimiento pre o postnatal > p90	-Macroglosia -Peso nacimiento > p90 -Hipoglucemia en el período neonatal -Pliegues o fosetas en orejas -Defecto de pared abdominal (onfalocele, diastasis recti o hernia umbilical)	-Macroglosia -Macrosomia -Hemihiperplasia -Pliegues o fosetas en orejas -Defecto de pared abdominal (onfalocele, diastasis recti o hernia umbilical)
Criterios menores	-Pliegues o fosetas en orejas -Nevus flammeus facial -Hipoglucemia -Nefromegalia -Hemihiperplasia		-Tumor embrionario -Visceromegalia abdominal -Malformación renal
Definición de BWS	Al menos 3 criterios mayores ó 2 mayores y 3 ó más menores	Diagnóstico clínico hecho por un médico con al menos 2 de los 5 criterios	Al menos 3 criterios mayores ó 2 mayores y 1 ó más menores

1.2.3. Alteraciones metabólicas

La hipoglucemia neonatal está muy bien documentada^{7,8}; si es grave y no se detecta o no se trata existe un alto riesgo de secuelas durante el desarrollo. Es por ello que en embarazos de alto riesgo de BWS, bien por historia familiar o por detección de onfalocele durante las ecografías prenatales, es imprescindible el estudio de hipoglucemia en el neonato. La mayoría de las hipoglucemias son

leves y transitorias, sin embargo, se ha descrito algún caso de hipoglucemia persistente y resistente al tratamiento. De forma ocasional, la hipoglucemia puede detectarse más tardíamente (en el primer mes de vida).

Otros defectos metabólicos menos comunes que también pueden aparecer en pacientes con BWS incluyen hipotiroidismo, hiperlipidemia/hipercolesterolemia y policitemia^{8,9}.

También la hipercalciuria, incluso en

ausencia de anomalías renales, se ha observado en algunos pacientes con BWS. De hecho, en un trabajo de Goldman y colaboradores observaron que el 22% de los pacientes con BWS presentaban nefrocalcinosis, comparado con el 7-10% de la población general¹⁰.

1.2.4. Anomalías estructurales

Son comunes los defectos de la pared abdominal anterior, incluyendo onfalocele, hernia umbilical y diástasis de rectos^{11,12}.

Mucha de la información relacionada con los problemas cardiovasculares en BWS es anecdótica. La cardiomegalia se detecta con frecuencia en la infancia si se realiza una placa de tórax, pero habitualmente se resuelve sin tratamiento. Existen algunos casos aislados de cardiomiopatía.

Las anomalías renales incluyen displasia medular, sistema colector duplicado, nefrocalcinosis, nefrolitiasis, riñón esponjoso medular, quistes y nefromegalia^{10,13-16}.

Se han descrito algunos pacientes con BWS y alteraciones de la fosa cerebral, asociadas a alteraciones genéticas y epigenéticas concretas (ver apartado 6)^{17,18}.

También se han observado algunos casos con paladar hendido, asociado a alteraciones genéticas concretas (ver apartado 6)¹⁸⁻²⁰.

Otras características fenotípicas incluyen: prominencia de la metópica, fontanela grande, occipucio prominente, cara algo tosca, pliegues y surcos en las orejas, indentaciones posteriores

del hélix de la oreja, ojos prominentes, hepatomegalia, hiperplasia pancreática, genitales externos grandes, criptorquidia, edad ósea avanzada, displasia medular renal, malformación de Dandy Walker, citomegalia adrenocortical⁴.

1.2.5. Tumores

Los niños con BWS tienen un mayor riesgo de mortalidad asociada a neoplasia, especialmente al tumor de Wilms y hepatoblastoma, pero también al neuroblastoma, carcinoma adrenocortical y rhabdomyosarcoma, así como un amplio espectro de tumores, tanto benignos como malignos²¹.

El riesgo estimado para el desarrollo de tumores en pacientes con BWS es del 7,5%, con un rango entre el 4% y el 21%^{1,2,7,21-26}. Este riesgo incrementado para el desarrollo de tumores parece estar concentrado en los primeros ocho años de vida, habiéndose descrito la aparición de tumores posteriormente a esta edad en muy pocos casos.

Los pacientes con BWS tienen un mayor riesgo de mortalidad, principalmente como consecuencia de la prematuridad, macroglosia, hipoglucemia, tumores y, en raras ocasiones, cardiomiopatías, aunque gracias a las mejoras en el reconocimiento del síndrome y su tratamiento, el riesgo de mortalidad ha disminuido del 20% descrito clásicamente^{7,27}. En relación al riesgo tumoral y su seguimiento prospectivo, en la tabla 3 se presentan los riesgos generales (independientes del subtipo molecular) y las medidas de seguimiento consensuadas para su evaluación²⁸.

Tabla 3. Riesgo tumoral asociado a BWS y medidas de seguimiento consensuadas.

Tipo de tumor	Riesgo (% casos BWS)	Medidas de prevención
Tumor renal de Wilms	3%	Ecografía renal
Hepato-blastoma	1,6%	Alfafetoproteína plasmática
Neuroblas-toma	1,3%	Ecografía abdominal, catecolaminas en orina
Rabdomio-sarcoma	0,3%	RM abdominal

1.2.6. Desarrollo

El desarrollo en los niños con BWS es generalmente normal, salvo que presenten alguna anomalía cromosómica²⁹ o historia de hipoxia o hipoglucemia no tratada.

Se ha descrito que los desórdenes neurológicos, como trastornos del espectro autista, aparecen en una mayor frecuencia en los niños con BWS³⁰; sin embargo este diagnóstico estaba basado únicamente en la impresión de los progenitores. Son necesarios más trabajos con correctas determinaciones sobre el neurodesarrollo para poder estimar, realmente, la frecuencia de estos problemas neurológicos en el BWS:

El pronóstico es generalmente bueno tras la infancia. Sin embargo, pueden existir algunas complicaciones en la adolescencia/etapa adulta (displasia renal medular, subfertilidad en varones), en algunos casos asociadas al subtipo molecular³¹ (ver apartados 2 y 6).

2. Manejo clínico de los pacientes

2.1. Cuidados médicos generales recomendados para los pacientes con BWS

2.1.1. Evaluación Prenatal

Evidencias: Los embarazos múltiples tienen un riesgo sensiblemente mayor de aparición de BWS³². Éste se ve notablemente incrementado en los embarazos obtenidos con técnicas de reproducción asistida, principalmente por fecundación in vitro (FIV) o inyección intracitoplasmática (ICSI). Según datos disponibles en la literatura, las técnicas de reproducción asistida incrementan entre 4 y 5 veces el riesgo de aparición de BWS respecto a la población general³³⁻³⁹. Por lo tanto, si la frecuencia del BWS en la población general es de aproximadamente 1:14.000, entre los nacidos gracias a técnicas de reproducción asistida estaría en torno a 1:3.000.

Los fetos portadores de BWS pueden tener hallazgos ecográficos prenatales sugestivos de la enfermedad. Algunos hallazgos habituales son polihidramnios, onfalocele y macrosomía cuya frecuencia justifica un seguimiento estricto del embarazo y la programación del momento del parto, que en la mayoría de los casos acaba en cesárea programada⁴⁰⁻⁵¹.

Conducta: Si hay sospecha prenatal de BWS:

1- Considerar seguimiento por un equipo obstétrico experimentado y, si fuera posible, familiarizado con el BWS.

2- Considerar la realización de ecografías “dismorfológicas”, evaluando detalladamente la anatomía fetal, en particular la región craneofacial y el abdomen, en el que se medirán los órganos sólidos.

3- Programar una cesárea si existe onfalocelo o macrosomía fetal importante.

4- Alertar al equipo neonatal del posible diagnóstico, para que se tomen medidas que eviten la hipoglucemia neonatal.

2.1.2. Evaluación clínica postnatal

El neonatólogo o pediatra debe estar pendiente de los posibles hallazgos y/o complicaciones de los recién nacidos con BWS. Dado que dichos hallazgos pueden ser diversos, de gravedad variable, y diferentes según la edad de los pacientes, hemos dividido el seguimiento clínico por edades.

2.1.2.1. Nacimiento y primer año de vida

Evidencias: Los neonatos con BWS presentan riesgo de hipoglucemia, por lo que el nivel de glucosa en sangre debe ser evaluado de forma seriada para prevenir este importante problema^{52,53}. La mayoría de los niños no presentan retraso en la maduración neurológica, excepto un pequeño

grupo de pacientes que han sufrido hipoglucemias insuficientemente tratadas o aquellos que presentan una anomalía citogenética (duplicación de origen paterno) en la región 11p. El riesgo de tumores está incrementado 4 veces en pacientes con hemihiperplasia o nefromegalia, apareciendo en el abdomen en el 95% de los casos, y antes de los 4 años de vida. La mayoría de los tumores asociados al BWS son embrionarios y eventualmente susceptibles de ser diagnosticados con marcadores bioquímicos y/o mediante ecografía. El cribado de tumores en los primeros años de vida permite un diagnóstico precoz de cáncer mejorando la supervivencia de estos pacientes a corto y largo plazo^{26,54-61}. La macroglosia sintomática que cursa con dificultad respiratoria, infecciones incontrolables de la vía aérea superior, dificultad para alimentarse, etc., mejora con el tratamiento quirúrgico de reducción⁶²⁻⁷².

Examen físico: Una vez sospechado y/o confirmado el diagnóstico de BWS:

1- Realizar un examen físico completo incluyendo exploración abdominal completa en la primera consulta.

2- Examinar y supervisar el proceso de duelo y adaptación de los padres al diagnóstico de su hijo, valorando la necesidad de apoyo psicológico profesional a los padres.

3- Continuar los exámenes clínicos detallados incluyendo palpación abdominal cuidadosa cada 3-4 meses.

4- Consignar peso, talla y perímetro cefálico en cada consulta. Realizar una curva con cada uno de estos parámetros.

5- Evaluar la alimentación tanto en cantidad como en calidad.

6- Comprobar si existe macroglosia, la efectividad de la succión y de la deglución y el manejo de las secreciones y de la vía aérea.

7- Evaluar la presencia y/o aparición de hernias umbilicales o inguinales.

8- Realizar una exploración cardiológica. Si se constata miocardiopatía hipertrófica neonatal, continuar el seguimiento con el cardiólogo infantil, incluyendo radiografía de tórax anual.

9- Evaluar la función neurológica y el desarrollo psicomotor durante el primer año de vida.

Estudios complementarios:

1- Realizar un seguimiento riguroso y seriado de la glucemia en el período neonatal.

2- En caso de hipoglucemia persistente, descartar hiperinsulinismo mediante aproximación diagnóstica por etapas. Considerar consulta al endocrinólogo infantil. Descartar nesidioblastosis y/o implantación de medicación.

3- Realizar cariotipo, estudios de FISH para la región 11p y estudios

para descartar UPD. Si éstos son normales contactar con un centro especializado para realizar el diagnóstico molecular (aunque estos resultados pueden demorarse ya que muchos de dichos centros los realizan como estudios de investigación).

4- Realizar trimestralmente una determinación de alfafetoproteína, gonadotropina coriónica y catecolaminas en sangre.

5- Realizar ecografías abdominales trimestrales para el diagnóstico precoz de tumoración abdominal oculta.

6- Realizar un estudio de orina completa cada tres meses para detección precoz de tumor de Wilms.

7- Realizar una radiografía de tórax semestralmente.

8- Realizar una ecografía cerebral antes del alta neonatal mientras la fontanela esté permeable.

9- Realizar un TAC o resonancia magnética (RMN) de abdomen si existe nefromegalia o imagen sospechosa abdominal o torácica.

10- Evaluar la dentición con consulta al odontólogo.

Otros aspectos

1- Solicitar consulta de asesoramiento genético con un genetista. Eventualmente se completarían los estudios con análisis moleculares del niño y sus padres

- 2- Planear soporte educacional y psicológico de la familia
- 3- Si presenta retraso psicomotor comenzar con estimulación precoz.
- 4- Si existe macroglosia sintomática (dificultad ventilatoria, dificultad en la alimentación o infecciones respiratorias altas a repetición) consultar con el especialista maxilofacial la posibilidad de realizar una glosectomía parcial.

2.1.2.2. Entre 1 y 4 años de vida

Evidencias: El cribado de tumores en los primeros años de vida permite un diagnóstico temprano de cáncer y mejora la supervivencia a corto y largo plazo de estos pacientes.

El riesgo de tumores está incrementado 4 veces en aquellos pacientes con hemihiperplasia o nefromegalia. La edad media de la mayoría de los niños con BWS que desarrollarán un tumor está alrededor de los 2 años^{26,54-61}.

Examen físico:

- 1- Realizar un examen físico completo incluyendo evaluación abdominal completa en cada consulta.
- 2- Evaluación seriada del desarrollo psicomotor. Puede haber problemas en el área motora gruesa (inicio de la marcha, saltar, girar, correr,...). Considerar evaluación por el neurólogo infantil si existe hipotonía o si hay alteraciones persistentes de desarrollo psicomotor.

3- Continuar los exámenes clínicos detallados incluyendo palpación abdominal rigurosa cada 3-4 meses.

4- Consignar peso, talla y perímetro cefálico en cada consulta y completar cada una de las curvas de crecimiento somatométrico.

5- Puede haber erupción precoz de la dentición y debe informarse a la familia que esto es esperable por ser un hallazgo frecuente en el BWS.

6- Es imprescindible contar con un estudio de neuroimagen (TAC o RMN cerebral) en forma periódica (al menos cada 2 años).

7- Evaluar la alimentación tanto en cantidad como en calidad.

Estudios complementarios:

- 1- Realizar cariotipo, estudios de FISH para la región 11p y estudios moleculares que incluyan el estudio de UPD si no se hubieran realizado anteriormente
- 2- Realizar trimestralmente una determinación sérica de alfafetoproteína, gonadotropina coriónica y catecolaminas urinarias.
- 3- Realizar ecografías abdominales cada 3-4 meses para diagnóstico precoz de tumoración abdominal oculta.
- 4- Realizar un estudio de orina completa cada 3-4 meses.
- 5- Realizar un control de la edad ósea anualmente.

- 6- Realizar una radiografía de tórax semestralmente.
- 7- Realizar al menos otra ecografía cerebral mientras la fontanela esté permeable.
- 8- Realizar un TAC completo si existe nefromegalia o imagen sospechosa abdominal o torácica.
- 9- Evaluar la dentición con consulta al odontólogo.
- 10- Si la evolución del lenguaje no es la esperada, se debe realizar una audiometría o potenciales evocados auditivos.

Otros aspectos:

- 1- Solicitar, si es factible, consulta de asesoramiento genético con un genetista. Si aún no se han realizado, se completará el estudio con análisis moleculares del niño y sus padres
- 2- Evaluar la necesidad de ofrecer soporte educacional y psicológico a la familia
- 3- Si presenta retraso psicomotor, se comenzará con la estimulación precoz.
- 4- Considerar consulta con el Endocrinólogo infantil.

2.1.2.3. Entre los 4 y 10 años de vida

Evidencias: El riesgo de desarrollar tumores en los niños con BWS mayores de 4 años disminuye considerablemente en relación a edades más precoces. Casi el 95% de los pacientes con BWS

y tumores son menores de 4 años. Esta información debe ser transmitida a la familia para disminuir la ansiedad que genera la posibilidad de que su hijo sea incluido en un programa de seguimiento para despistaje de tumores^{26,54-61}.

Examen físico:

1- Realizar un examen físico completo incluyendo evaluación abdominal completa en cada evaluación anual.

2- Continuar los exámenes clínicos detallados incluyendo palpación abdominal rigurosa anualmente.

3- Consignar peso, talla y perímetro cefálico en cada consulta. Realizar una curva con cada uno de estos parámetros.

4- Evaluar la alimentación tanto en cantidad como en calidad.

5- Considerar una evaluación psicopedagógica previa al ingreso en educación primaria si persiste el retraso de la maduración psicomotora.

Estudios complementarios

1- Realizar cuantificaciones anuales de la glucemia.

2- Realizar semestralmente una maxilodeterminación sérica de alfafetoproteína, gonadotropina coriónica y catecolaminas.

3- Realizar ecografías abdominales en forma anual para diagnóstico precoz de tumoración abdominal oculta.

4- Realizar un estudio de orina

completo anualmente.

5- Realizar una radiografía de tórax anualmente.

6- Realizar TAC abdominal si existe nefromegalia o alguna imagen sospechosa en la región abdominal o torácica.

7- Evaluar la dentición con una consulta al odontólogo.

Otros aspectos

1- Solicitar, si es factible, consulta de asesoramiento genético con un genetista.

2- Eventualmente se completarían los estudios con análisis moleculares en el niño y sus padres.

3- Soporte educacional y psicológico a la familia.

2.1.2.4. Entre los 10 años de vida y la primera etapa de la juventud

Evidencias: Aunque existen casos aislados de aparición de tumores en pacientes con BWS durante la segunda década de la vida, el riesgo disminuye considerablemente a partir de esta edad, siendo innecesario un programa específico de seguimiento.

Examen físico:

1- Realizar un examen físico completo incluyendo una exploración abdominal cuidadosa en cada visita anual.

2- Consignar peso, talla y perímetro cefálico en cada consulta. Realizar una curva en cada uno de éstos parámetros.

3- Evaluar la alimentación tanto en cantidad como en calidad.

4- Considerar apoyo psicológico del paciente. Los niños y adolescentes con BWS tienen una autoestima baja, les cuesta relacionarse, pueden tener cambios incontrolados de carácter y son más vulnerables a daño emocional por parte de sus compañeros.

5- Considerar apoyo escolar continuo.

6- Evaluar su conducta para descartar posibles alteraciones psiquiátricas o neurosis.

7- Alertar a los padres sobre la posibilidad de traumatismos en la práctica de deportes debido a la torpeza motora.

Estudios complementarios

1- Realizar anualmente hemogramas (descartar enfermedad de células linfoproliferativas) y ecografías abdominales (tumores abdominales).

2- Realizar estudio de orina completa anualmente.

3- Evaluar la columna vertebral para descartar escoliosis y cifosis.

4- Realizar radiografía de tórax anualmente.

5- Evaluar la dentición con consulta al odontólogo.

6- Considerar la realización de un estudio de neuroimagen (TAC o RMN) cada 2-3 años.

Otros aspectos

- 1- Si no se hubiesen realizado, completar el estudio con análisis moleculares en el niño y sus padres.
- 2- Ofrecer soporte educacional y psicológico a la familia.

2.1.2.5. Adultos con BWS

Examen físico:

- 1- Realizar examen físico completo anual.

Estudios complementarios

- 1- Planear la realización anual de un estudio completo de laboratorio, incluyendo enzimas, y marcadores tumorales.

Otros aspectos

- 1- Insistir en los mecanismos de transmisión de la enfermedad y el riesgo en futuros hijos del paciente, si se ha podido determinar la subvariante molecular del BWS.

3. Diagnóstico diferencial

3.1. Síndrome de Weaver

Weaver y col. en 1974 describieron un síndrome caracterizado por aceleración del crecimiento en talla y de la edad ósea, características craneofaciales inusuales, voz grave y ronca, hipertonía y camptodactilia⁷³. Algunas comunicaciones posteriores sugirieron firmemente que se trataba de una entidad clínicamente reconocible y

distinta. Además de las características iniciales, los pacientes descritos presentaban hernias, piel redundante, retraso psicomotor, ensanchamiento de la región distal de los huesos, y mentón pequeño. Está causado por alteraciones en el gen *EZH2*, que codifica para una histona metiltransferasa⁷⁴.

3.2. Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel

El Síndrome de Simpson Golabi Behmel (SSGB) (MIM 312870) es una enfermedad genética que causa principalmente sobrecrecimiento físico durante los primeros años de vida. Los niños con SSGB presentan además algunos otros hallazgos clínicos distintivos tales como malformaciones múltiples de la línea media, anomalías cardíacas y vertebrales, facies tosca, macroglosia, organomegalia, y mayor riesgo de desarrollar retraso psicomotor y enfermedades neoplásicas. A diferencia de la mayoría de los Síndromes de Sobrecrecimiento, el SSGB es una enfermedad con herencia recesiva ligada al cromosoma X. Aunque algunos pacientes adultos con SSGB pueden llegar a tener su desarrollo físico e intelectual dentro del rango de normalidad, lo habitual es que siempre exista algún grado de discapacidad. Como comentamos anteriormente, otro de los factores a tener en cuenta es una probable susceptibilidad mayor que la población general a desarrollar algún tipo de tumor o cáncer (tumor de Wilms, embriomas atípicos, neuroblastoma, hepatoblastoma, etc). El defecto primario reside en un gen que mapea

en la región Xq26 y que codifica para un proteoglicano extracelular llamado glipticán-3 (*GPC3*) y en el que se han identificado mutaciones y deleciones en el gen. Este proteoglicano se cree puede jugar un rol importante en el control del crecimiento de los tejidos mesodérmicos y en la predisposición a desarrollar tumores^{75,76}.

3.3. Síndrome de Sotos

El síndrome de Sotos (SSo) es una patología autosómica dominante caracterizada por una apariencia facial típica, sobrecrecimiento (talla y circunferencia craneal ≥ 2 desviación estándar por encima de la media) y con frecuencia algún grado de discapacidad intelectual y/o problemas de aprendizaje. Muchos pacientes con SSo presentan además problemas de comportamiento, anomalías congénitas cardíacas, ictericia neonatal, anomalías renales, escoliosis, y convulsiones. El SSo es un síndrome de sobrecrecimiento relativamente común, con una incidencia estimada de 1:15.000 nacimientos. Las mutaciones y deleciones de *NSDI*, una histona metiltransferasa implicada en la regulación transcripcional, son las responsables de al menos el 75% de los casos de SSo. La gran mayoría de las anomalías del gen *NSDI* son de novo, y hay algunos casos que son familiares. El riesgo de recurrencia en progenitores normales es muy bajo⁷⁷. Además, se han descrito alteraciones en el gen *NFIX*, relacionadas con un fenotipo similar al Síndrome de Sotos conocido como “Sotos-Like” o Síndrome de Malan.

3.4. Síndrome de Perlman

El síndrome de Perlman es una enfermedad autosómica recesiva. Los niños son macrosómicos al nacimiento, presentan hipotonía y organomegalia. La cara presenta unos rasgos dismórficos característicos (labio superior invertido en forma de V, frente prominente, ojos hundidos, puente nasal ancho y plano, y orejas de implantación baja)⁷⁸. Pueden tener anomalías renales (nefromegalia e hidronefrosis), retraso en el desarrollo neurológico y alta mortalidad neonatal. El síndrome de Perlman también se asocia a un alto riesgo de desarrollar tumor de Wilms, con una incidencia del 64% en los niños que superan el periodo neonatal⁷⁹.

Está causado por mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *DIS3L2* (2q37.2)⁸⁰.

3.5. Síndrome de Costello

El síndrome de Costello puede ser muy similar al BWS durante el periodo neonatal, ya que estos pacientes también presentan macrosomía. Asimismo pueden presentar anomalías cardíacas, que incluyen defectos estructurales, como miocardiopatía hipertrófica, o arritmias. Con el paso del tiempo, los pacientes con síndrome de Costello muestran problemas para crecer, retraso en el desarrollo y otras características propias como rasgos faciales rudos⁸¹.

La causa molecular en el caso del Síndrome de Costello son las alteraciones en un gen de la vía de RAS, el *HRAS* (11p15.5).

3.6. Síndrome de Maroteaux-Lamy

El síndrome de Maroteaux-Lamy o mucopolisacaridosis de tipo VI en una enfermedad autosómica recesiva causada por una deficiencia en la enzima arilsulfatasa B⁸². En los primeros años de vida, los niños presentan un crecimiento acelerado y una edad ósea avanzada, lo que sugiere sobrecrecimiento. Sin embargo, sobre los 2-3 años de edad, las manifestaciones incluyen opacidad de la córnea, hepatoesplenomegalia, talla baja, disostosis, anomalías cardíacas, y adquisición de rasgos faciales más rudos⁸³.

Está causado por mutaciones en homocigosis o heterocigosis compuesta en el gen *ARSB* (5q14)⁸⁴.

4. Alteraciones genéticas asociadas

4.1. Región 11p15

Las alteraciones más frecuentes responsables del síndrome de Beckwith-Wiedemann son epimutaciones (alteraciones de la metilación) o deleciones o duplicaciones en la región cromosómica 11p15^{11,85,86}. Los genes responsables de BWS localizados en esta región incluyen el *IGF2*, *H19*, *CDKN1C*, *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*. En la figura 1 se observan la distribución y regulación de esta región.

El dominio 1 del cromosoma 11p15.5 está localizado en la zona más telomérica de la región de impronta y contiene a los genes *H19* e *IGF2*. *H19*, expresado desde el alelo materno, es un RNA que no se traduce y que parece

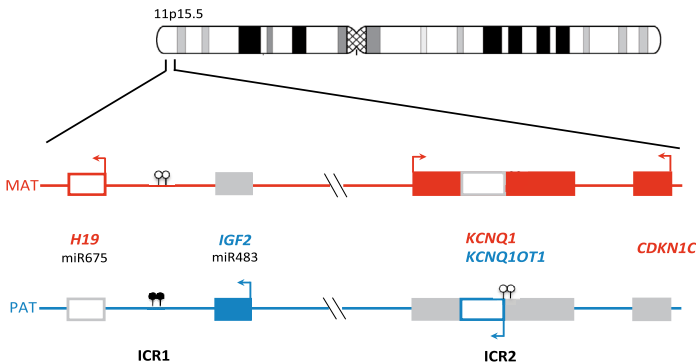


Figura 1: Orientación, expresión y ubicación de la región 11p15 implicados en la fisiopatología del BWS. En azul se muestran los genes de expresión paterna, en rojo los de materna y gris para los genes silenciados. La región 11p15.5 puede dividirse en dos dominios funcionales cuya impronta depende de dos regiones reguladoras de la impronta (ICR1 e ICR2). La metilación del ICR1 en el cromosoma paterno es responsable de la impronta recíproca en *IGF2* y *H19*, es decir, de la expresión de *IGF2* desde el alelo paterno y de *H19* desde el materno. En BWS la ganancia de metilación en ICR1 conlleva la inactivación de *H19* y la sobreexpresión de *IGF2*. La metilación de ICR2 en el cromosoma materno es responsable de la impronta del dominio centromérico. En el cromosoma paterno, la ausencia de metilación en ICR2 conlleva la expresión de *KCNQ1OT1*, que reprime a *KCNQ1* y *CDKN1C*. En el cromosoma materno, *KCNQ1OT1* está reprimido por la metilación de ICR2 y, por tanto, *KCNQ1* y *CDKN1C* pueden expresarse. En BWS, la pérdida de metilación materna en ICR2 conlleva la activación de *KCNQ1OT1* y el silenciamiento de *CDKN1C*.

funcionar como supresor tumoral. *IGF2* se expresa desde el alelo paterno y codifica para un factor de crecimiento fetal. Su sobreexpresión se considera determinante en el desarrollo de BWS. La expresión de ambos genes está regulado desde un centro de impronta llamado ICR1. ICR1 está metilado en el alelo paterno y desmetilado en el materno. ICR1 está ubicado en la posición 3' del gen *H19* y regula de forma recíproca la expresión de *H19* y *IGF2*; el imprinting silenciará la expresión de *H19* en el alelo paterno, permitiendo que *H19* se exprese en el alelo materno, con el DMR (*Differentially Methylated Region* o región diferencialmente metilada) no metilado. Además regulará la expresión paterna de *IGF2* funcionando como elemento aislante o *insulator*: ICR1 lleva, de hecho, una secuencia que constituye un sitio de unión para la proteína represora CTCF (*CCCTC-binding factor zinc finger protein*) que puede unirse al DNA no metilado del cromosoma materno e inhibir la interacción del alelo materno de *IGF2* con su *enhancer* ubicado corriente abajo de *H19*; con efecto de silenciar la expresión de *IGF2* en el alelo materno^{87,88}.

El dominio 2, localizado en una región más centromérica respecto del dominio 1, está constituido por los genes *CDKN1C*, *KCNQ1* y *KCNQ1OT1*. El gen *KCNQ1* codifica para una subunidad de un canal del potasio y está relacionado con diferentes tipos de síndromes de arritmia cardíaca. *KCNQ1* tiene imprinting paterno y se expresa en el alelo materno en muchos

tejidos, con la importante excepción del corazón⁸⁹. El gen *CDKN1C* codifica para la proteína p57Kip2, miembro de la familia de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CdK). *CDKN1C* se expresa en el alelo materno y actúa como regulador negativo de la proliferación celular y supresión de tumores⁹⁰.

La regulación de esta región está controlada por el centro regulador de la impronta ICR2, localizado en el intrón 10 de *KCNQ1*. ICR2 es una región diferencialmente metilada que contienen el promotor de *KCNQ1OT1*. *KCNQ1OT1* se transcribe en el alelo paterno en anti sentido respecto a *KCNQ1*, es un mRNA no-codificante de función todavía desconocida^{91,92}. En BWS, la pérdida de metilación en ICR2 conlleva la expresión bialélica de *KCNQ1OT1* y una expresión disminuida de *CDKN1C*⁹³. En algunos casos de BWS, esta pérdida de metilación en ICR2 se asocia con pérdida de la metilación en múltiples regiones a lo largo del genoma⁹⁴⁻⁹⁷.

4.2. Alteraciones en 11p15

Se han descrito diferentes mecanismos tanto epigenéticos como genéticos que, al afectar al dominio de 11p15.5, conllevan la aparición de BWS. Estos mecanismos alteran la importante contribución específica de alelo de esta región⁸⁵ e incluyen: pérdida de metilación en ICR2 (50% de los pacientes), disomía uniparental del cromosoma 11 (20% de los casos), ganancia de metilación en ICR (5%),

Tabla 4. Grupos genéticos y epigenéticos en el Síndrome de Beckwith Wiedemann (modificado de Cohen y colaboradores¹⁰⁸).

Grupo	Herencia	Frecuencia (%)	Cariotipo	ADN	ARN
A	Esporádico	50	Normal	Pérdida de metilación de <i>KvDMR1</i>	Pérdida de imprinting de <i>KvLQTI-AS</i>
B	Esporádico	25-50	Normal	Metilación normal de <i>H19</i>	Pérdida de imprinting de <i>IGF2</i>
C	Esporádico	10-20	Normal	Disomía uniparental paterna	
D	Esporádico	10-20	Normal	Desconocida	Desconocida
E	Esporádico	5-10	Normal	Mutación <i>p57^{KIP2}</i> (<i>CDKN1C</i>)	
F	Autosómico Dominante	5	Normal	Mutación <i>p57^{KIP2}</i> (<i>CDKN1C</i>)	
G	Autosómico Dominante	5	Normal	Desconocida	
H	Esporádico o Familiar	2	Normal	Metilación de H 19	Pérdida de imprinting de <i>IGF2</i>
I	Esporádico o Familiar	1	Duplicación 11p15		
J	Esporádico	1	Traslocación / inversión 11p151	Disrupción de <i>KvLQTI</i>	
K	Gemelos monocigóticos	Desconocida	Normal	Desconocida	Desconocida
L	Esporádico o Aut. Dominante, con transmisión materna	Desconocida	Normal	Microdelección del centro de imprinting de LIT1 y H19	

mutaciones en *CDKN1C* (5% de los casos esporádicos) y, más raramente, duplicaciones paternas, inversión materna o traslocaciones de la región 11p15.5 (menos del 1%)^{12,98}.

En algunos casos, las alteraciones en la metilación, principalmente las de ICR1, están asociadas a alteraciones

genómicas (microdelecciones o microduplicaciones)⁹⁹⁻¹⁰⁶.

La presencia de alteraciones epigenéticas que afectan tanto a ICR1 como a ICR2 sugiere, generalmente, la presencia de disomía paterna de la región 11p15.5⁸⁵. Se cree que esta disomía es consecuencia de una

recombinación somática postzigótica y, por tanto, en la mayoría de los casos tiene una distribución en mosaico¹⁰⁷.

En aproximadamente 10%-15% de los casos la etiología es desconocida^{11,86}. Esto puede ser debido, en parte, a que al existir mosaicismo somático, tanto la técnica como el tejido estudiado no sean los idóneos.

La tabla 4 presenta los distintos subgrupos genéticos y epigenéticos identificados en el BWS agrupados por su frecuencia relativa y mostrando que ésta es una entidad genéticamente heterogénea y con un efecto dependiente del origen parental de los genes heredados^{99,101,108-111}. A día de hoy hay 12 grupos o formas genéticas/epigenéticas diferentes, con distintas formas de herencia, diferentes genes y varios mecanismos moleculares implicados. La mayoría de los pacientes con BWS (alrededor del 90%) son esporádicos y sin ninguna anomalía cromosómica demostrable (grupos A-E y H-J). El resto (10%) muestran un patrón de herencia autosómico dominante con ligamiento en la región 11p15 (grupos F y G). Los reordenamientos cromosómicos relacionados con el BWS se observan en el 1-3% de los casos (grupos I y J). Translocaciones e inversiones de la región 11p15 son típicamente de herencia materna (Grupo J) mientras las duplicaciones son de origen paterno (Grupo I).

Las alteraciones genéticas y epigenéticas del BWS pueden afectar tanto a los genes supresores del crecimiento de origen materno

como los genes promotores del crecimiento de origen paterno. Aproximadamente un 10-20% de los pacientes con BWS presentan disomía uniparental (UPD) paterna (Grupo C). Todos los pacientes con UPD presentan mosaicismo somático, lo que demuestra que son necesarias ambas contribuciones parentales en la embriogénesis temprana y que la UPD aparece postzigóticamente, hallándose solo en algunos tejidos. En la UPD 11p15 paterna, el fenotipo de BWS y la predisposición tumoral es probablemente causada por la combinación de un aumento en la expresión de genes promotores del crecimiento (*IGF2*, de origen paterno) y una expresión disminuida o nula de genes supresores del crecimiento (ejemplo *H19*, de origen materno). Finalmente, el recientemente agregado grupo L incluye aquellos pacientes con microdeleciones del gen *KCNQ1OT1* (*LIT1*) o del centro de imprinting de los genes *IGF2/H19*, cuya frecuencia exacta es aún desconocida^{99,101,108-111}.

4.3. Otras alteraciones genéticas asociadas a BWS

Se ha sugerido que otros loci fuera de la región 11p15.5 pudieran jugar un papel en la etiología de BWS. Así, estudios moleculares han demostrado que *NALP2*, en el cromosoma 19, puede modular el imprinting en 11p15¹¹². Además, se ha encontrado una deleción en el cromosoma 7 en un paciente con características clínicas sugerentes

de BWS¹¹³. Esta delección incluía el gen *GRB10*, un gen improntado que parece jugar un papel en promover el crecimiento.

También se han descrito delecciones en 18q en pacientes con algunas características de BWS y retraso en el desarrollo¹¹⁴.

5. Estudios moleculares

Los estudios moleculares están orientados hacia la detección escalonada de las alteraciones moleculares observadas en el BWS.

Así, al igual que ocurre en otras enfermedades con defectos de impronta, el MS-MLPA es el método más robusto disponible clínicamente para detectar la mayoría de las alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas a BWS. Así, el MS-MLPA detecta a nivel genómico las delecciones y duplicaciones de la región crítica en 11p y a nivel epigenético las alteraciones del imprinting, tanto la hipometilación del ICR2 como la hipermetilación del ICR1 o la presencia de ambas alteraciones de la metilación como ocurre en los pacientes con disomía uniparental¹¹⁵. El mosaicismo somático asociado a la disomía puede llevar señales débiles en el MS-MLPA. Se recomienda confirmar la UPD por microsatélites cuando se observe metilación alterada simultáneamente en ICR1 e ICR2. También puede realizarse un estudio de SNParray. El estudio de array de SNPs informa sobre las disomías uniparentales y sobre todo localiza y cuantifica su porcentaje. Así, ante un caso de disomía uniparental

el SNParray es capaz de localizar el punto de rotura en el brazo corto del cromosoma 11 y además estimar el porcentaje de células afectadas por éste; ya que como se comenta más arriba, siempre es mosaico¹⁰⁷.

Además, la ausencia de identificación de alteración de la metilación o UPD en un tejido concreto (generalmente linfocitos) no es concluyente, especialmente en los pacientes que presentan hemihiperplasia. Es recomendable estudiar al menos dos tejidos o tipos celulares¹¹⁶.

El estudio cromosómico o cariotipo es necesario para la identificación de traslocaciones/inversiones de origen materno (ocurren en pocos casos) y también las duplicaciones paternas de la región 11p15.5. Las traslocaciones/inversiones, por lo general, afectan al gen *KCNQ1* y normalmente no son detectadas mediante MS-MLPA^{29,117}.

En aquellos casos en los que no se hayan identificado alteraciones en la metilación es recomendable el estudio por secuenciación del gen *CDKN1C* ya que pueden identificarse mutaciones en el 5% de los casos esporádicos y en el 40% de los casos familiares^{20,116}.

6. Correlación genotipo-fenotipo

Existe una cierta correlación genotipo-fenotipo en el BWS¹¹⁸. Esto implica que ante el diagnóstico confirmado de ciertas subformas moleculares, el fenotipo puede ser distinto al de otras. A la vez, ante el hallazgo clínico de ciertas

anomalías congénitas específicas o de hallazgos clínicos, el estudio molecular puede ser orientado de forma tal que pueda variarse el orden protocolizado de estudios solicitados.

Tabla 5. Hallazgos clínicos sugerentes de la posible alteración en 11p15.5 asociada. Se recomienda contemplar esta correlación genotipo-fenotipo de forma orientativa.	
Hallazgo clínico	Subforma molecular
Desarrollo de tumores	UPD(11p15)pat; hipermetilación ICR1
Hemihiperplasia	UPD(11p15)pat; Hipometilación ICR2; Hipermetilación ICR1
Onfalocele	Hipometilación ICR2; mutación <i>CDKN1C</i> .
Retraso psicomotor, discapacidad intelectual	Duplicaciones paternas 11p
Paladar hendido, anomalías genitales	Mutación <i>CDKN1C</i>

En la tabla 5 se muestra los hallazgos clínicos orientados en relación a las formas moleculares del BWS (no son excluyentes ni exclusivas de cada forma, sino que son los hallazgos más frecuentes u orientativos de cada subforma molecular).

- **Hemihiperplasia:** Asociada a UPD(11p15)pat en mosaico o, en menor frecuencia a alteraciones en ICR2 o ICR1^{86,111,119}.
- El **onfalocele** está asociado con mutaciones en *CDKN1C* o hipometilación en ICR2^{18,86,120}.
- El **paladar hendido** se asocia con

mutaciones en *CDKN1C*¹⁸⁻²⁰.

- Aparición de **tumores**^{39,57,85,110,111,121-124}
 - UPD(11p15)pat o hipermetilación en ICR1 asociados al mayor riesgo a desarrollar tumor de Wilms y hepatoblastoma (aproximadamente 30%)
 - Los pacientes con pérdida de metilación en ICR2 tienen un riesgo moderado (5%) a desarrollar tumores distintos al de Wilms.
 - Los pacientes con mutaciones en *CDKN1C* tienen muy bajo riesgo al desarrollo de tumores, aunque se han descrito unos pocos casos con neuroblastoma.
 - Los pacientes con alteraciones citogenéticas tienen muy bajo riesgo de desarrollo tumoral
 - Es importante tener en cuenta que en pacientes con diagnóstico claro de BWS en los que no se detectan alteraciones moleculares, el riesgo a desarrollar tumores es de aproximadamente el 20%. Esto es posiblemente debido al mosaicismo somático para la UPD(11p15)pat que hemos mencionado previamente
- El **retraso en el desarrollo** se asocia con duplicaciones paterna en 11p15 detectables mediante el estudio

citogenético^{29,30,86,125}, aunque también puede deberse a una grave hipoglucemia neonatal o a otras complicaciones perinatales como la prematuridad. Además, se han descrito algunos casos con retraso en el desarrollo y anomalías cerebrales asociadas, en algunas ocasiones, con hipometilación en ICR2 o mutaciones en *CDKN1C*^{17,18}.

- El *fenotipo severo* de BWS se asocia con niveles muy altos de mosaicismo para UPD(11p15.5) pat^{27,126}
- Las hermanas *gemelas* monocigóticas, discordantes para BWS presentan, por lo general, hipometilación en ICR2¹²⁷, mientras que los varones gemelos discordantes, mucho menos frecuentes, se asocian con una mayor variedad de alteraciones moleculares^{126,128}.
- Las *formas familiares* de BWS están causadas por mutaciones en *CDKN1C* o microdeleciones en ICR1 y, más esporádicamente, microduplicaciones en el ICR2^{11,19,85,86,100,101,115,129-131}. También se ha visto familias con traslocaciones o inversiones en 11p15.5.
- La *subfertilidad*, asociada o no al uso de técnicas de reproducción asistida, se asocia a un mayor riesgo de niños con BWS causado por hipometilación en ICR2³⁴⁻³⁸. Queda pendiente realizar estudios para concluir

qué aspectos específicos de esta subfertilidad o de tratamientos es el responsable de esta asociación.

7. Asesoramiento genético

La mayoría de los pacientes con el BWS son esporádicos (alteraciones en la metilación en ICR1 o ICR2, UPD(11p15)pat). Como hemos visto, la pérdida de metilación en 11p15 aparece habitualmente en mosaico, lo cual se considera indicativo de un error epigenético que se produce de forma postcigótica, por lo que difícilmente será transmisible. El riesgo de recurrencia es comparable al de la población general¹¹⁶.

Una situación completamente distinta es la de aquellos casos debidos a un reordenamiento cromosómico, ya que los portadores de una deleción, duplicación o translocación cromosómica causante del síndrome tendrán un riesgo a priori del 50% de transmitirla a su descendencia. Es decir, los escasos casos familiares suelen ser compatibles con una herencia autosómica dominante y con gran variabilidad intrafamiliar¹¹⁶.

Las alteraciones moleculares asociadas con un alto riesgo de recurrencia incluyen:

- (i) mutaciones en *CDKN1C* y traslocaciones o inversiones de la región 11p15.5 si el portador es la madre: el riesgo de recurrencia es del 50%^{7,20}. El riesgo es bajo si el portador es el padre, aunque se ha descrito al menos un caso de BWS

asociado a mutación en *CDKN1C* en el alelo paterno¹³⁰.

- (ii) duplicaciones en 11p15.5 de origen paterno: el riesgo de recurrencia no se ha definido claramente, pero será probablemente alto si el padre es portador de una traslocación¹²⁵.
- (iii) **m i c r o d e l e c i o n e s /** microduplicaciones en 11p15.5: se ha observado transmisión familiar en presencia de microdeleciones en ICR1 y, menos frecuentemente,

en ICR2, por lo que se recomienda realizar un estudio parental cuando se identifican estas alteraciones en el caso índice⁹⁹⁻¹⁰⁶

Por tanto, no es necesario el estudio molecular de los padres y otros miembros de la familia en presencia de UPD. Se recomienda el estudio de los progenitores si se identifican alteraciones genómicas (alteraciones cromosómicas, mutaciones en *CDKN1C*, o microduplicaciones o microdeleciones en 11p15.5).

RESUMEN

Aunque no existe consenso respecto a los criterios diagnósticos de Síndrome de Beckwith Wiedemann (BWS), los pacientes con esta enfermedad suelen identificarse al nacimiento por la presencia de macrosomía, macroglosia y onfalocelo o hernia umbilical. Muchos de estos niños pueden tener además todos o algunos de los siguientes hallazgos: asimetría (hemihiperplasia) de miembros, torso o cara, hipoglucemia, organomegalia, alteraciones de las orejas (apéndices auriculares, fosetas en el hélix o surcos en la región del lóbulo de la oreja) y tumores embrionarios. Ocasionalmente también pueden manifestar las siguientes características clínicas: paladar hendido, enfermedad congénita cardíaca, defectos en el sistema genitourinario y polidactilia.

La frecuencia del BWS es aproximadamente 1:14000 nacimientos.

El estudio molecular de la región 11p15 permite caracterizar el mecanismo genético subyacente, siendo el MS-MLPA la técnica de elección, dado que permite identificar la mayor parte de las alteraciones genéticas y epigenéticas asociadas a BWS.

Existe una cierta correlación fenotipo-(epi)genotipo, lo que permite identificar el riesgo de los pacientes a desarrollar tumores, y a identificar su riesgo de recurrencia.

REFERENCIAS

- Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 1994;46:168-74.
- Weng EY, Moeschler JB, Graham JM, Jr. Longitudinal observations on 15 children with Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1995;56:366-73.
- Wilson M, Peters G, Bennetts B, et al. The clinical phenotype of mosaicism for genome-wide paternal uniparental disomy: two new reports. *Am J Med Genet A* 2008;146A:137-48.
- Lapunzina P, del Campo M, Delicado A, et al. Guía clínica para el seguimiento de pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann. *An Pediatr* 2006;64:252-9.
- Chitayat D, Rothchild A, Ling E, et al. Apparent postnatal onset of some manifestations of the Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1990;36:434-9.
- Hoyme HE, Seaver LH, Jones KL, Procopio F, Crooks W, Feingold M. Isolated hemihyperplasia (hemihypertrophy): report of a prospective multicenter study of the incidence of neoplasia and review. *Am J Med Genet* 1998;79:274-8.
- Pettenati MJ, Haines JL, Higgins RR, Wappner RS, Palmer CG, Weaver DD. Wiedemann-Beckwith syndrome: presentation of clinical and cytogenetic data on 22 new cases and review of the literature. *Hum Genet* 1986;74:143-54.
- Engstrom W, Lindham S, Schofield P. Wiedemann-Beckwith syndrome. *Eur J Pediatr* 1988;147:450-7.
- Martinez y Martinez R, Ocampo-Campos R, Perez-Arroyo R, Corona-Rivera E, Cantu JM. The Wiedemann-Beckwith syndrome in four sibs including one with associated congenital hypothyroidism. *Eur J Pediatr* 1985;143:233-5.
- Goldman M, Shuman C, Weksberg R, Rosenblum ND. Hypercalciuria in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* 2003;142:206-8.
- Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010;18:8-14.
- Weksberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;137C:12-23.
- Borer JG, Kaefer M, Barnewolt CE, et al. Renal findings on radiological followup of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *The Journal of urology* 1999;161:235-9.
- Choyke PL, Siegel MJ, Oz O, Sotelo-Avila C, DeBaun MR. Nonmalignant renal disease in pediatric patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *AJR American journal of roentgenology* 1998;171:733-7.
- Wong CA, Cuda S, Kirsch A. A review of the urologic manifestations of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of pediatric urology* 2011;7:140-4.
- Mussa A, Peruzzi L, Chiesa N, et al. Nephrological findings and genotype-phenotype correlation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatr Nephrol* 2012;27:397-406.
- Gardiner K, Chitayat D, Choufani S, et al. Brain abnormalities in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet A* 2012;158A:1388-94.
- Romanelli V, Belinchor A, Benito-Sanz S, et al. CDKN1C (p57(Kip2)) analysis in Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) patients: Genotype-phenotype correlations, novel mutations, and polymorphisms. *Am J Med Genet A* 2010;152A:1390-7.
- Hatada I, Nabetani A, Morisaki H, et al. New p57KIP2 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet* 1997;100:681-3.
- Li M, Squire J, Shuman C, et al. Imprinting status of 11p15 genes in Beckwith-Wiedemann syndrome patients with CDKN1C mutations. *Genomics* 2001;74:370-6.
- Cohen MM, Jr. Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* 2005;8:287-304.
- DeBaun MR, Siegel MJ, Choyke PL. Nephromegaly in infancy and early childhood: a risk factor for Wilms tumor in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* 1998;132:401-4.
- Schneid H, Vazquez MP, Vacher C, Gourmelen M, Cabrol S, Le Bouc Y. The Beckwith-Wiedemann syndrome phenotype and the risk of cancer. *Medical and pediatric oncology* 1997;28:411-5.
- Sotelo-Avila C, Gonzalez-Crussi F, Fowler JW. Complete and incomplete forms of Beckwith-Wiedemann syndrome: their oncogenic potential.

- J Pediatr 1980;96:47-50.
25. Tan TY, Amor DJ. Tumour surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: a critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice. *Journal of paediatrics and child health* 2006;42:486-90.
 26. DeBaun MR, Tucker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from The Beckwith-Wiedemann Syndrome Registry. *J Pediatr* 1998;132:398-400.
 27. Smith AC, Shuman C, Chitayat D, et al. Severe presentation of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with high levels of constitutional paternal uniparental disomy for chromosome 11p15. *Am J Med Genet A* 2007;143A:3010-5.
 28. Gracia Bouthelier R, Lapunzina P. Follow-up and risk of tumors in overgrowth syndromes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2005;18 Suppl 1:1227-35.
 29. Slavotinek A, Gaunt L, Donnai D. Paternally inherited duplications of 11p15.5 and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1997;34:819-26.
 30. Kent L, Bowdin S, Kirby GA, Cooper WN, Maher ER. Beckwith Weidemann syndrome: a behavioral phenotype-genotype study. *American journal of medical genetics Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 2008;147B:1295-7.
 31. Greer KJ, Kirkpatrick SJ, Weksberg R, Pauli RM. Beckwith-Wiedemann syndrome in adults: observations from one family and recommendations for care. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1707-12.
 32. Clayton-Smith J, Read AP, Donnai D. Monozygotic twinning and Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1992;42:633-7.
 33. Maher ER. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet* 2005;14 Spec No 1:R133-8.
 34. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *Am J Hum Genet* 2004;75:526-8.
 35. Maher ER, Afnan M, Barratt CL. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? *Hum Reprod* 2003;18:2508-11.
 36. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le Bouc Y. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN10T gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:1338-41.
 37. Maher ER, Brueton LA, Bowdin SC, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART). *J Med Genet* 2003;40:62-4.
 38. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;72:156-60.
 39. Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ10T1. *Hum Mol Genet* 2001;10:2989-3000.
 40. Mulik V, Wellesley D, Sawdy R, Howe DT. Unusual prenatal presentation of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Prenatal diagnosis* 2004;24:501-3.
 41. Le Caignec C, Gicquel C, Gubler MC, et al. Sonographic findings in Beckwith-Wiedemann syndrome related to H19 hypermethylation. *Prenatal diagnosis* 2004;24:165-8.
 42. Pelizzo G, Conoscenti G, Kalache KD, Vesce F, Guerrini P, Cavazzini L. Antenatal manifestation of congenital pancreatoblastoma in a fetus with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Prenatal diagnosis* 2003;23:292-4.
 43. Fremond B, Poulain P, Odent S, Milon J, Treguier C, Babut JM. Prenatal detection of a congenital pancreatic cyst and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Prenatal diagnosis* 1997;17:276-80.
 44. Hillstrom MM, Brown DL, Wilkins-Haug L, Genest DR. Sonographic appearance of placental villous hydrops associated with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of ultrasound in medicine : official journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine* 1995;14:61-4.
 45. Hewitt B, Bankier A. Prenatal ultrasound diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 1994;34:488-90.
 46. Nowotny T, Bollmann R, Pfeifer L, Windt E. Beckwith-Wiedemann syndrome: difficulties with prenatal diagnosis. *Fetal diagnosis and therapy* 1994;9:256-60.
 47. Shah YG, Metlay L. Prenatal ultrasound diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of clinical ultrasound : JCU* 1990;18:597-600.
 48. Meizner I, Carmi R, Katz M, Insler V. In utero

- prenatal diagnosis of Beckwith-Wiedemann syndrome; a case report. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 1989;32:259-64.
49. Wieacker P, Wilhelm C, Greiner P, Schillinger H. Prenatal diagnosis of Wiedemann-Beckwith syndrome. *Journal of perinatal medicine* 1989;17:351-5.
 50. Lenke RR, Schmidt EK. Diagnosis of the Beckwith-Wiedemann syndrome in the second trimester of pregnancy. A case report. *The Journal of reproductive medicine* 1986;31:514-6.
 51. Nivelon-Chevallier A, Mavel A, Michiels R, Bethenod M. [Familial Wiedeman-Beckwith syndrome: prenatal echography diagnosis and histologic confirmation]. *Journal de genetique humaine* 1983;31 Suppl 5:397-402.
 52. Hussain K, Cosgrove KE, Shepherd RM, et al. Hyperinsulinemic hypoglycemia in Beckwith-Wiedemann syndrome due to defects in the function of pancreatic beta-cell adenosine triphosphate-sensitive potassium channels. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4376-82.
 53. DeBaun MR, King AA, White N. Hypoglycemia in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Seminars in perinatology* 2000;24:164-71.
 54. Clericuzio CL, Chen E, McNeil DE, et al. Serum alpha-fetoprotein screening for hepatoblastoma in children with Beckwith-Wiedemann syndrome or isolated hemihyperplasia. *J Pediatr* 2003;143:270-2.
 55. Hertel NT, Carlsen N, Kerndrup G, et al. Late relapse of adrenocortical carcinoma in Beckwith-Wiedemann syndrome. Clinical, endocrinological and genetic aspects. *Acta Paediatr* 2003;92:439-43.
 56. McNeil DE, Brown M, Ching A, DeBaun MR. Screening for Wilms tumor and hepatoblastoma in children with Beckwith-Wiedemann syndromes: a cost-effective model. *Medical and pediatric oncology* 2001;37:349-56.
 57. Blik J, Maas SM, Ruijter JM, et al. Increased tumour risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQ1OT1 methylation: occurrence of KCNQ1OT1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum Mol Genet* 2001;10:467-76.
 58. Choyke PL, Siegel MJ, Craft AW, Green DM, DeBaun MR. Screening for Wilms tumor in children with Beckwith-Wiedemann syndrome or idiopathic hemihypertrophy. *Medical and pediatric oncology* 1999;32:196-200.
 59. Lonergan GJ, Martinez-Leon MI, Agrons GA, Montemarano H, Suarez ES. Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and associated lesions of the kidney. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc* 1998;18:947-68.
 60. Di Cataldo A, Haupt R, Fabietti P, Schiliro G. Is intensive follow-up for early detection of tumors effective in children with Beckwith-Wiedemann syndrome? *Clin Genet* 1996;50:372-4.
 61. Smith PJ, Sullivan M, Algar E, Shapiro DN. Analysis of paediatric tumour types associated with hemihyperplasia in childhood. *Journal of paediatrics and child health* 1994;30:515-7.
 62. Giancotti A, Romanini G, Docimo R, Arcuri C. Clinical treatment of oral manifestations of Beckwith-Wiedeman syndrome in a child. *The Journal of clinical pediatric dentistry* 2003;27:377-80.
 63. Gasparini G, Saltarel A, Carboni A, Maggiulli F, Becelli R. Surgical management of macroglossia: discussion of 7 cases. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2002;94:566-71.
 64. Kotoku R, Kinouchi K, Fukumitsu K, Taniguchi A. [A neonate with Beckwith-Wiedemann syndrome who developed upper airway obstruction after glossopexy]. *Masui The Japanese journal of anesthesiology* 2002;51:46-8.
 65. Dios PD, Posse JL, Sanroman JF, Garcia EV. Treatment of macroglossia in a child with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 2000;58:1058-61.
 66. Kacker A, Honrado C, Martin D, Ward R. Tongue reduction in Beckwith-Weidemann syndrome. *International journal of pediatric otorhinolaryngology* 2000;53:1-7.
 67. Kopriva D, Classen DA. Regrowth of tongue following reduction glossoplasty in the neonatal period for Beckwith-Wiedemann macroglossia. *The Journal of otolaryngology* 1998;27:232-5.
 68. Mixer RC, Ewanowski SJ, Carson LV. Central tongue reduction for macroglossia. *Plastic and reconstructive surgery* 1993;91:1159-62.
 69. Weiss LS, White JA. Macroglossia: a review. *The Journal of the Louisiana State Medical Society : official organ of the Louisiana State Medical Society* 1990;142:13-6.
 70. Sokoloski PM, Ogle RG, Waite DE. Surgical correction of macroglossia in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Oral Surg* 1978;36:212-5.
 71. Rizer FM, Schechter GL, Richardson MA. Macroglossia: etiologic considerations and management techniques. *International journal of*

- pediatric otorhinolaryngology 1985;8:225-36.
72. Kveim M, Fisher JC, Jones KL, Gruer B. Early tongue resection for Beckwith-Wiedemann macroglossia. *Annals of plastic surgery* 1985;14:142-4.
 73. Weaver DD, Graham CB, Thomas IT, Smith DW. A new overgrowth syndrome with accelerated skeletal maturation, unusual facies, and camptodactyly. *J Pediatr* 1974;84:547-52.
 74. Tatton-Brown K, Murray A, Hanks S, et al. Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am J Med Genet A* 2013;161A:2972-80.
 75. Neri G, Gurrieri F, Zanni G, Lin A. Clinical and molecular aspects of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am J Med Genet* 1998;79:279-83.
 76. Shi W, Filmus J. A patient with the Simpson-Golabi-Behmel syndrome displays a loss-of-function point mutation in GPC3 that inhibits the attachment of this proteoglycan to the cell surface. *Am J Med Genet A* 2009;149A:552-4.
 77. Baujat G, Rio M, Rossignol S, et al. Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. *Am J Hum Genet* 2004;74:715-20.
 78. Perlman M, Levin M, Wittels B. Syndrome of fetal gigantism, renal hamartomas, and nephroblastomatosis with Wilms' tumor. *Cancer* 1975;35:1212-7.
 79. Greenberg F, Copeland K, Gresik MV. Expanding the spectrum of the Perlman syndrome. *Am J Med Genet* 1988;29:773-6.
 80. Astuti D, Morris MR, Cooper WN, et al. Germline mutations in DIS3L2 cause the Perlman syndrome of overgrowth and Wilms tumor susceptibility. *Nature genetics* 2012;44:277-84.
 81. van Eeghen AM, van Gelderen I, Hennekam RC. Costello syndrome: report and review. *Am J Med Genet* 1999;82:187-93.
 82. Maroteaux P, Leveque B, Marie J, Lamy M. [a New Dysostosis with Urinary Elimination of Chondroitin Sulfate B]. *Presse Med* 1963;71:1849-52.
 83. Azevedo AC, Schwartz IV, Kalakun L, et al. Clinical and biochemical study of 28 patients with mucopolysaccharidosis type VI. *Clin Genet* 2004;66:208-13.
 84. Litjens T, Brooks DA, Peters C, Gibson GJ, Hopwood JJ. Identification, expression, and biochemical characterization of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase mutations and relationship with clinical phenotype in MPS-VI patients. *Am J Hum Genet* 1996;58:1127-34.
 85. Cooper WN, Luharia A, Evans GA, et al. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2005;13:1025-32.
 86. Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D. Beckwith-Wiedemann syndrome: multiple molecular mechanisms. *Expert reviews in molecular medicine* 2006;8:1-19.
 87. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* 2000;405:486-9.
 88. Hark AT, Tilghman SM. Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Hum Mol Genet* 1998;7:1979-85.
 89. Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;15:181-5.
 90. Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, et al. p57KIP2, a structurally distinct member of the p21CIP1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 1995;9:650-62.
 91. Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, et al. A maternally methylated CpG island in KVLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8064-9.
 92. Lee MP, DeBaun MR, Mitsuya K, et al. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of insulin-like growth factor II imprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5203-8.
 93. Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K, et al. Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2003;40:797-801.
 94. Netchine I, Rossignol S, Azzi S, Brioude F, Le Bouc Y. Imprinted anomalies in fetal and childhood growth disorders: the model of Russell-Silver and Beckwith-Wiedemann syndromes. *Endocrine development* 2012;23:60-70.
 95. Azzi S, Rossignol S, Steunou V, et al. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet* 2009;18:4724-33.
 96. Blied J, Verde G, Callaway J, et al. Hypomethylation

- at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17:611-9.
97. Rossignol S, Steunou V, Chalas C, et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet* 2006;43:902-7.
 98. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet* 2003;12 Spec No 1:R61-8.
 99. Niemitz EL, DeBaun MR, Fallon J, et al. Microdeletion of LIT1 in familial Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 2004;75:844-9.
 100. Prawitt D, Enklaar T, Gartner-Rupprecht B, et al. Microdeletion of target sites for insulator protein CTCF in a chromosome 11p15 imprinting center in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4085-90.
 101. Sparago A, Cerrato F, Vernucci M, Ferrero GB, Silengo MC, Riccio A. Microdeletions in the human H19 DMR result in loss of IGF2 imprinting and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature genetics* 2004;36:958-60.
 102. Baskin B, Choufani S, Chen YA, et al. High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet* 2014;133:321-30.
 103. Beygo J, Citro V, Sparago A, et al. The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet* 2013;22:544-57.
 104. Abi Habib W, Azzi S, Brioude F, et al. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2014.
 105. Brioude F, Lacoste A, Netchine I, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome: growth pattern and tumor risk according to molecular mechanism, and guidelines for tumor surveillance. *Hormone research in paediatrics* 2013;80:457-65.
 106. Demars J, Shmela ME, Rossignol S, et al. Analysis of the IGF2/H19 imprinting control region uncovers new genetic defects, including mutations of OCT-binding sequences, in patients with 11p15 fetal growth disorders. *Hum Mol Genet* 2010;19:803-14.
 107. Romanelli V, Meneses HN, Fernandez L, et al. Beckwith-Wiedemann syndrome and uniparental disomy 11p: fine mapping of the recombination breakpoints and evaluation of several techniques. *Eur J Hum Genet* 2011;19:416-21.
 108. Cohen MMJ, Neri G, Weksberg R. *Overgrowth syndromes*. Oxford University Press 2002.
 109. Kang M. Inherited microdeletions that give rise to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Clin Genet* 2005;67:299-300.
 110. Bliok J, Gicquel C, Maas S, Gaston V, Le Bouc Y, Mannens M. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS). *J Pediatr* 2004;145:796-9.
 111. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 2002;70:604-11.
 112. Meyer E, Lim D, Pasha S, et al. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet* 2009;5:e1000423.
 113. Naik S, Riordan-Eva E, Thomas NS, et al. Large de novo deletion of 7p15.1 to 7p12.1 involving the imprinted gene GRB10 associated with a complex phenotype including features of Beckwith Wiedemann syndrome. *Eur J Med Genet* 2011;54:89-93.
 114. Lirussi F, Jonard L, Gaston V, et al. Beckwith-Wiedemann-like macroglossia and 18q23 haploinsufficiency. *Am J Med Genet A* 2007;143A:2796-803.
 115. Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) robustly detects and distinguishes 11p15 abnormalities associated with overgrowth and growth retardation. *J Med Genet* 2008;45:106-13.
 116. Eggermann T, Algar E, Lapunzina P, et al. Clinical utility gene card for: Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur J Hum Genet* 2014;22.
 117. Li M, Squire JA, Weksberg R. Molecular genetics of Wiedemann-Beckwith syndrome. *Am J Med Genet* 1998;79:253-9.
 118. Mussa A, Russo S, De Crescenzo A, et al. (Epi) genotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2015.
 119. Shuman C, Steele L, Fei YL, et al. Paternal

- uniparental disomy of 11p15 is associated with isolated hemihyperplasia and expands Beckwith-Wiedemann syndrome spectrum. *Am J Hum Genet* 2002; 71:477.
120. Engel JR, Smallwood A, Harper A, et al. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2000;37:921-6.
 121. Alsultan A, Lovell MA, Hayes KL, Allshouse MJ, Garrington TP. Simultaneous occurrence of right adrenocortical tumor and left adrenal neuroblastoma in an infant with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Pediatric blood & cancer* 2008;51:695-8.
 122. Rump P, Zeegers MP, van Essen AJ. Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A* 2005;136:95-104.
 123. Scott RH, Douglas J, Baskcomb L, et al. Constitutional 11p15 abnormalities, including heritable imprinting center mutations, cause nonsyndromic Wilms tumor. *Nature genetics* 2008;40:1329-34.
 124. Kuroiwa M, Sakamoto J, Shimada A, et al. Manifestation of alveolar rhabdomyosarcoma as primary cutaneous lesions in a neonate with Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr Surg* 2009;44:e31-5.
 125. Waziri M, Patil SR, Hanson JW, Bartley JA. Abnormality of chromosome 11 in patients with features of Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* 1983;102:873-6.
 126. Smith AC, Rubin T, Shuman C, et al. New chromosome 11p15 epigenotypes identified in male monozygotic twins with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:313-7.
 127. Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, et al. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2002;11:1317-25.
 128. Elalaooui SC, Garin I, Sefiani A, Perez de Nanclares G. Maternal Hypomethylation of KvDMR in a Monozygotic Male Twin Pair Discordant for Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Molecular syndromology* 2014;5:41-6.
 129. Blik J, Verde G, Callaway J, et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17:611-9.
 130. Lee MP, DeBaun M, Randhawa G, Reichard BA, Elledge SJ, Feinberg AP. Low frequency of p57KIP2 mutation in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 1997;61:304-9.
 131. Percesepe A, Bertucci E, Ferrari P, et al. Familial Beckwith-Wiedemann syndrome due to CDKN1C mutation manifesting with recurring omphalocele. *Prenatal diagnosis* 2008;28:447-9.

Capítulo 5: DISOMÍA UNIPARENTAL DEL CROMOSOMA 14 Y SÍNDROMES RELACIONADOS

Clara Serra-Juhé, Luis A. Pérez-Jurado

Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER); Instituto de Investigación Médica Hospital del Mar-IMIM, Barcelona

1. Introducción

Como ya se ha definido en el capítulo de conceptos generales (capítulo 1), la disomía uniparental (*uniparental disomy*, UPD) consiste en la presencia de dos cromosomas homólogos (o parte de ellos) provenientes del mismo progenitor en un genoma celular diploide, cuando en condiciones normales cada cromosoma homólogo se hereda de un progenitor distinto. La **UPD materna** (UPDmat) se refiere, para un par cromosómico determinado, a la presencia de dos cromosomas homólogos maternos con ausencia del cromosoma de origen paterno; la **UPD paterna** (UPDpat) consiste en la presencia de dos cromosomas homólogos provenientes del padre con ausencia del cromosoma materno. La UPD se denomina **heterodisomía** cuando los dos cromosomas homólogos heredados del mismo progenitor son distintos (procedentes de cada uno de los abuelos); si se hereda por duplicado

el mismo cromosoma (de un único abuelo), se denomina **isodisomía**.

La UPD del cromosoma 14 (UPD14) ocurre cuando una persona recibe los dos cromosomas 14 del mismo progenitor. Las UPDs no cambian la composición ni la dosis de los genes en la célula y no se asocian a repercusiones clínica salvo en dos circunstancias concretas: 1) en el caso de isodisomías, la UPD puede desenmascarar mutaciones recesivas siendo un único progenitor el portador; 2) cuando existen genes improntados en el cromosoma involucrado, como ocurre con el cromosoma 14.

La UPD14 tiene una **incidencia** relativamente elevada en comparación con la UPD que afecta otros cromosomas debido a que el cromosoma 14 es acrocéntrico y, por tanto, puede estar involucrado en translocaciones robertsonianas que ocurren entre cromosomas acrocéntricos. Estas cromosomopatías estructurales

aumentan el riesgo de UPD de los cromosomas implicados, y se estima que 1 de cada 1000 individuos en la población general es portador de una translocación robertsoniana¹. No obstante, la literatura disponible acerca de los cuadros clínicos asociados a la UPD14 es escasa debido, en parte, a la falta de reconocimiento de la entidad ya que, aunque su frecuencia no es despreciable, a menudo no se llega a filiar el cuadro con la causa que lo provoca¹.

2. Revisión clínica: UPD(14)mat y síndrome de Temple

2.1. Manifestaciones Clínicas

El cuadro clínico causado por la UPD(14)mat se describió por primera vez en 1991². Posteriormente, se han detectado otras alteraciones en la región 14q32, epimutaciones y microdeleciones, que causan un cuadro clínico muy parecido³. Por este motivo, se ha propuesto utilizar el término de síndrome de Temple para estas entidades⁴. Existe una detallada revisión clínica reciente de los 51 pacientes con síndrome de Temple descritos en la literatura hasta el momento⁴.

El retraso de crecimiento intrauterino está presente en el 75% de casos, con una media de peso al nacimiento de -1,88 desviaciones estándar (DE) y una longitud de -1,64DE respecto a los recién nacidos de la misma edad gestacional. El perímetro cefálico medio al nacimiento es de -0,8DE, presentando una leve macrocefalia relativa a la talla.

En el 30% de los casos el nacimiento ocurre de manera prematura, antes de las 37 semanas de gestación. El patrón de crecimiento postnatal se caracteriza por una talla relativamente conservada durante la infancia (-1DE), con un estirón puberal disminuido y corto. El 86% de los casos presentan pubertad de inicio precoz, siendo la edad media de la menarquía de 10 años y 2 meses. La talla final es baja, situándose en -2,04DE respecto a la media poblacional.

La hidrocefalia detectable durante los primeros meses de vida es una manifestación clínica característica del síndrome de Temple, si bien remite espontáneamente sin precisar medidas intervencionistas^{2,5,6}. Aunque no existe un claro patrón dismórfico, se han descrito algunas características faciales frecuentemente asociadas a este síndrome, que incluyen la frente ancha, la nariz corta con punta bulbosa y el filtro corto^{2,7,8}. En varios casos se han reportado además orejas rotadas posteriormente así como clinodactilia del quinto dedo. Casi la totalidad de casos presentan acromicria con manos y pies pequeños y la parte distal de los dedos algo afilada. Como anomalías adicionales presentes en algunos casos, 2 pacientes presentaron una fisura de paladar blando con úvula bífida², y 3 de 23 varones presentaron criptorquidia uni o bilateral^{2,7,8}.

Otra manifestación muy común (93%) durante la infancia es la hipotonía de predominio en tronco, que se asocia a un claro retraso en la adquisición de habilidades motoras (83%). La hipotonía, evidente desde el nacimiento, suele asociarse a una débil succión

con dificultades secundarias para la alimentación. Una cuarta parte de los pacientes descritos requirieron una sonda nasogástrica para su alimentación durante el periodo neonatal⁸⁻¹¹.

Aproximadamente la mitad de los pacientes presenta algún grado de discapacidad intelectual o problemas de aprendizaje leves. No obstante, una medición objetiva del cociente intelectual sólo está disponible para 6 casos, oscilando entre 75-95, lo que implica una inteligencia alrededor del límite bajo de la normalidad^{18,12-15}.

Aunque no se dispone de datos numéricos para todos ellos, más de la mitad de los pacientes desarrollan obesidad durante la infancia o adolescencia, con un índice de masa corporal elevado. Como complicaciones a nivel metabólico se ha descrito la aparición de diabetes mellitus (3 pacientes)^{9,13,16}, e hiperlipidemia (tanto hipertrigliceridemia en un caso como hipercolesterolemia en 4)^{6,9,13,17}. También se ha detectado una disfunción tiroidea en varios pacientes, incluyendo hipotiroidismo estable o transitorio, hipertiroidismo y tiroiditis autoinmune⁹. Dos adultos jóvenes desarrollaron un carcinoma papilar de tiroides^{9,18}.

Una cuarta parte de los pacientes presenta escoliosis progresiva durante la adolescencia, probablemente secundaria a la hipotonía y laxitud articular y agravada por la obesidad.

El cuadro clínico causado por la UPD del cromosoma 14 se asocia, como otras patologías debidas a disomía uniparental, a restricción de crecimiento intrauterino. Esta restricción de crecimiento se atribuye, en parte, a la posible

insuficiencia placentaria secundaria a una trisomía en mosaico en el tejido placentario, independientemente del cromosoma implicado¹⁹.

2.2. Manejo clínico de los pacientes

La hipotonía desde el periodo neonatal dificulta la succión y puede comprometer la correcta alimentación. Por este motivo, es necesario asegurar una adecuada nutrición para evitar complicaciones adicionales y garantizar un correcto crecimiento. En algunos casos puede requerirse sonda nasogástrica en el periodo neonatal. Debido al retraso de crecimiento pre- y post-natal que presentan estos pacientes, es necesario monitorizar en detalle la ganancia de peso, talla y perímetro craneal.

La hipotonía conlleva también un retraso en la adquisición de habilidades motoras. Está indicado que estos pacientes reciban estimulación precoz desde etapas tempranas, con el objetivo de mejorar el tono muscular y optimizar su desarrollo. Un porcentaje significativo de casos con UPD(14)mat presentan retraso psicomotor, dificultades de aprendizaje y discapacidad intelectual leve. Por tanto, además de la estimulación precoz desde el periodo neonatal, es relevante individualizar su educación y brindarles los distintos apoyos que pueden requerir para su correcto desarrollo y educación.

Superadas las dificultades de alimentación del periodo neonatal y la lactancia, existe un elevado riesgo de sobrepeso u obesidad en los pacientes con síndrome de Temple.

Consecuentemente, es relevante controlar la ingesta y promover hábitos saludables en relación a la alimentación y a la actividad física. El control de peso está especialmente indicado durante la infancia y la pubertad para evitar que se desarrolle obesidad y aparezcan otras complicaciones metabólicas.

La talla baja y la pubertad precoz son dos de las manifestaciones clínicas más frecuentes y características en estos pacientes. Hasta el momento, hay pocos datos sobre el impacto de los tratamientos dirigidos a mejorar ambas alteraciones. Se ha realizado tratamiento con hormona de crecimiento en dos pacientes, uno de los cuales presentaba déficit de GH objetivado por analítica hormonal. También se ha publicado la utilización de tratamiento hormonal para retrasar la pubertad en alguno de estos pacientes. No obstante, los datos disponibles sobre los potenciales beneficios a nivel de talla final de estos tratamientos son todavía insuficientes. Por tanto, no se puede hacer una recomendación global y cada caso deberá manejarse de una manera individualizada. Debido a la presencia de escoliosis en un porcentaje de estos pacientes (26%) está indicado su control clínico periódico por si se precisa intervención.

Teniendo en cuenta que se han descrito diversas patologías tiroideas (hipertiroidismo, hipotiroidismo, tiroiditis autoinmune y carcinoma papilar de tiroides) en pacientes con UPD(14)mat o delección paterna de la región 14q32^{9,18}, está claramente indicado hacer un seguimiento periódico de la función tiroidea en todos los casos, mediante anamnesis y determinación

de niveles de hormonas (TSH y T₄), así como valorar una ecografía tiroidea.

3. Revisión clínica: UPD(14)pat y síndrome de Kagami-Ogata

3.1. Manifestaciones clínicas

La UPD(14)pat fue descrita por primera vez en 1991²⁰ asociada a una constelación única de manifestaciones que incluyen alteraciones placentarias y del líquido amniótico (placentomegalia y polihidramnios), y múltiples anomalías del desarrollo fetal afectando al esqueleto torácico (costillas en forma de percha y abdomen en campana), las extremidades (cortas), rasgos faciales característicos (vello en la frente, filtro prominente, micrognatia, blefarofimosis), defectos de la pared abdominal y discapacidad intelectual^{21,22}. Como en la UPD(14)mat, se han encontrado epimutaciones y microdeleciones causantes de un cuadro clínico muy parecido a la UPD(14)pat³, por lo que se ha propuesto el término de síndrome de Kagami-Ogata para definir la UPD(14)pat y los cuadros clínicos relacionados²³. La serie más grande estudiada hasta el momento incluye 34 casos²³.

El polihidramnios a partir de la semana 25 de gestación es una manifestación constante²³⁻²⁶, requiriendo repetidas amniorreducciones, y es muy frecuente detectar una placentomegalia²³ (85%). La ecografía fetal detecta anomalías torácicas y abdominales en el 40% de los pacientes a partir de la semana 25

de gestación. El parto prematuro es relativamente frecuente²³⁻²⁶ (79%), y el 66% de los pacientes nacen mediante cesárea, indicada por el riesgo de distrés fetal y el polihidramnios.

El **crecimiento prenatal** es normal en relación a la talla e incrementado respecto al de la población general por lo que al peso se refiere (+2,3SD). A nivel postnatal, se evidencia un retraso de crecimiento en un tercio de los pacientes (<-2SD) con un peso relativamente conservado²³.

La totalidad de los pacientes presentan rasgos **dismórficos** que les confieren una apariencia facial característica²³⁻²⁶. El filtro prominente y los mofletes abultados parecen signos bastantes específicos del cuadro clínico; la mayoría también presenta hirsutismo en región frontal, un puente nasal deprimido, una mandíbula pequeña (micrognatia) y pterigium coli. En relación a **malformaciones mayores**, la totalidad de los pacientes presentan el tórax en forma de campana y las costillas en forma de percha²³⁻²⁶, así como una diástasis de los rectos abdominales, con presencia de onfalocele en un tercio de los casos²³. Debido a las malformaciones torácicas, la práctica totalidad de los pacientes requieren ventilación mecánica al nacimiento, e incluso una traqueotomía en muchos casos^{23,25,26}. La deformidad torácica puede causar un fallo respiratorio letal durante la infancia (12%). No obstante, en los pacientes que superan los primeros años de vida, ambas características se atenúan de manera importante durante la infancia, siendo casi irreconocibles superados los primeros años de vida. La clara mejoría

de las deformidades torácicas conduce, en consecuencia, a una mejoría de la función respiratoria. Considerando este hecho, el pronóstico es relativamente bueno en los pacientes que sobreviven el periodo infantil²³.

También se ha descrito una alta incidencia de **hepatoblastoma** únicamente en pacientes con UPD(14) pat. Los tres pacientes (9%) en los que se detectó antes de los 18 meses de vida un hepatoblastoma embrionario fallecieron, uno a causa del hepatoblastoma y los otros dos por causas no claramente relacionadas con el tumor (infección respiratoria y síndrome hemofagocítico)²³.

El **retraso psicomotor** desde etapas tempranas es una característica común en todos los pacientes con síndrome de Kagami-Ogata. Se manifiesta ya con retraso en la adquisición del control cefálico, siendo constante el retraso en la sedestación sin soporte y en la deambulación autónoma. Se ha realizado un cociente intelectual en 13 casos con este cuadro, obteniéndose valores entre 29 y 70 con una media de 55. Es decir, todos los pacientes presentan discapacidad intelectual en un rango que varía de leve a severa^{23,24}.

3.2. Manejo clínico de los pacientes

Las manifestaciones clínicas del síndrome de Kagami-Ogata aparecen ya durante la gestación, por lo que suele ser necesario un control estricto y frecuente a partir del segundo trimestre de embarazo. Puede ser preciso realizar amnio-reducciones

en más de una ocasión, debido al polihidramnios. El pronóstico general es incierto. En el momento del nacimiento, la disfunción respiratoria secundaria a las malformaciones torácicas características requiere ventilación mecánica en la totalidad de los casos, e incluso traqueotomía en los casos más severos (1/3). Ello condiciona que se precise también una sonda nasogástrica en el periodo neonatal para la nutrición de todos los pacientes. Cuando existe un onfalocele, es necesaria la intervención quirúrgica temprana.

El crecimiento intrauterino está preservado, aunque un tercio de los casos presentan un retraso de crecimiento postnatal. En consecuencia, está indicado el seguimiento clínico del peso y la talla de forma periódica, así como aportar suplementos nutricionales si se precisan.

Es importante la estimulación precoz en todos los casos para minimizar el retraso psicomotor y la discapacidad intelectual, así como otras terapias adicionales

(logopedia, fisioterapia) dependiendo del caso. Se debe individualizar la educación de estos pacientes, para adecuar la atención y apoyos que reciben.

Debido a la incidencia no despreciable (9%) de hepatoblastoma en los pacientes con UPD(14)pat, es necesario establecer controles periódicos dirigidos a la detección precoz de dicho tumor. El protocolo es similar al ya estipulado en otros cuadros con un elevado riesgo de tumores en la infancia, como el síndrome de Beckwith-Wiedemann (capítulo 4). El protocolo establece realizar una ecografía abdominal²⁷⁻³⁰ y una analítica para medir la concentración de alfa-fetoproteína en suero²⁹, cada 3 meses durante los primeros 4 a 5 años de vida. Los 3 casos descritos desarrollaron el hepatoblastoma entre los 3 y 13 meses, por lo que el periodo de mayor riesgo ocupa desde el nacimiento hasta los 18 meses de vida. No obstante, aunque no está protocolizado ni bien definido todavía por el escaso conocimiento de la historia natural del cuadro clínico durante la vida

Tabla 1. Manifestaciones clínicas y porcentaje de cada una de ellas en pacientes con el Síndrome de Temple (UPD14mat) y el Síndrome de Kagami-Ogata (UPD14pat).

UPD(14)pat		UPD(14)mat	
polihidramnios	100%	retraso de crecimiento intrauterino	79%
placentomegalia	82%	nacimiento prematuro	40%
rasgos dismórficos (filtro prominente y mejillas abultadas)	100%	hipotonía de tronco	91%
onfalocele	30%	hidrocefalia	
diástasis de rectos abdominales	100%	dificultades para alimentarse	40%
tórax en forma de campana	100%	retraso en la adquisición de habilidades motoras	83%
costillas en forma de percha	100%	discapacidad intelectual	50%
retraso psicomotor	100%	pubertad de inicio precoz	87%
retraso de crecimiento postnatal	30%	obesidad	50%
hepatoblastoma	13%	escoliosis	26%

adulto, ante la posibilidad de que siga habiendo un cierto mayor riesgo de otros tumores es lógicamente recomendable mantener un seguimiento clínico de estos pacientes de por vida, que incluya alguna prueba adicional orientada por la historia clínica cuando proceda.

La tabla 1 muestra una comparativa de los rasgos más característicos del fenotipo de los dos cuadros de UPD(14), el síndrome de Temple y **síndrome de Kagami-Ogata**.

4. Diagnóstico diferencial

4.1. Síndrome de Prader-Willi

El diagnóstico diferencial del síndrome de Temple se establece principalmente con otra entidad causada también por alteraciones de una región improntada: el síndrome de Prader-Willi (ver capítulo 7). El solapamiento clínico entre ambos síndromes es considerable, incluyendo talla baja, hipotonía, retraso psicomotor, cifosis o escoliosis y pies y manos pequeños. No obstante, la obesidad, los problemas de comportamiento y la discapacidad intelectual son más severas en el síndrome de Prader-Willi que en el síndrome de Temple. Además, los rasgos dismórficos son algo distintos entre ambas entidades, si bien pueden ser sutiles¹.

Algunos estudios han publicado datos sobre el rendimiento diagnóstico del estudio del UPD14 en pacientes con un diagnóstico clínico de sospecha de síndrome de Prader-Willi y ausencia de alteraciones detectables en la región 15q11-q13. En una primera cohorte de 33 pacientes, en 4 de ellos (12%)

se detectó una UPD(14)mat⁹. Todos presentaban bajo peso al nacimiento (-2SD), problemas de alimentación neonatal y obesidad desarrollada a partir de los 3 años. El estudio de una segunda cohorte de 78 pacientes detectó un patrón aberrante de metilación en 14q32 en 5 casos (6,4%), 4 con UPD(14)mat y uno con epimutación³¹. Los pacientes con la alteración de metilación en 14q32 presentaban hipotonía neonatal, dificultades de alimentación, pies y manos pequeñas y fueron referidos a la unidad durante la infancia.

Considerando la evolución de las manifestaciones clínicas de los síndromes de Prader-Willi y de Temple, el solapamiento entre ambas entidades es mucho más notorio durante la infancia. La mayor severidad de la obesidad y los problemas de aprendizaje, así como la aparición de trastornos graves de la conducta que ocurren en pacientes con síndrome de Prader-Willi, permite diferenciarlo con más facilidad del síndrome de Temple a medida que transcurre el tiempo y, sobre todo, en la adolescencia y edad adulta.

4.2. Síndrome similar al Prader-Willi (PWS-like)

Otra entidad a considerar en el diagnóstico diferencial del síndrome de Temple es el cuadro causado por la delección de la región 6q16.2, que incluye el gen *SIMI*. El fenotipo asociado a esta delección se ha descrito como parecido al síndrome de Prader-Willi, ya que presentan obesidad, hipotonía, discapacidad intelectual y extremidades cortas^{32,33}.

4.3. Síndrome de Silver-Russell

Existen diversas características solapantes entre el síndrome de Temple y otros trastornos de la impronta como el síndrome de Silver-Russell (capítulo 3). Ambos cuadros clínicos incluyen un retraso de crecimiento pre- y post-natal, una macrocefalia relativa con frente prominente y dificultades de alimentación en periodo neonatal e infancia. No obstante, rasgos frecuentes en el síndrome de Silver-Russell como las asimetrías corporales y manchas cutáneas no se han identificado en pacientes con UPD(14) mat³⁴. Debido al posible solapamiento de ambos cuadros clínicos, se ha buscado la existencia de alteraciones en la metilación de 14q32 en 85 pacientes que cumplían criterios clínicos de síndrome de Silver-Russell, habiendo descartado previamente epimutaciones en la región de *H19* y UPD del cromosoma 7. Se identificaron epimutaciones en 14q32 en dos casos (2,4%)³⁵.

4.4. Síndrome de Beckwith-Wiedemann

El síndrome de Kagami-Ogata presenta unas manifestaciones clínicas patognomónicas al nacimiento, como son el tórax en forma de campana, las costillas en forma de percha y la apariencia facial (filtro marcado y las mejillas abultadas). No obstante, superada la infancia, estas manifestaciones se atenúan volviéndose irreconocibles. Si no se llega al diagnóstico en periodo neonatal, el diagnóstico diferencial debe hacerse con otros cuadros polimalformativos que asocien discapacidad intelectual (leve a severa), características dismórficas,

riesgo incrementado de hepatoblastoma y onfalocele. Asimismo, el diagnóstico del síndrome de Kagami-Ogata tendría que considerarse en casos atípicos de síndrome de Beckwith-Wiedemann (capítulo 4), cuando no se ha detectado la alteración molecular causante. Ambas entidades tienen manifestaciones clínicas solapantes, incluyendo el riesgo incrementado de tumores embrionarios, los defectos de la pared abdominal y la placentomegalia²³.

5. Alteraciones genéticas asociadas

5.1. Disomía uniparental (UPD14) completa o segmentaria

Hay cuatro posibles mecanismos que explican la aparición de una UPD, es decir la presencia en todas o parte de las células de un individuo de dos cromosomas provenientes del mismo progenitor con ausencia del cromosoma del otro progenitor para un par cromosómico determinado³⁶⁻³⁸ (Figura 1).

Tres de los mecanismos se producen por un segundo evento corrector de una aneusomía en los gametos y/o cigoto, tras un fenómeno de no disyunción cromosómica durante la meiosis.

En primer lugar la UPD puede aparecer por **rescate trisómico**, es decir, por la pérdida de un cromosoma en un cigoto trisómico en las primeras mitosis del desarrollo. Es normal que las células disómicas tengan una ventaja selectiva respecto a las trisómicas que son menos

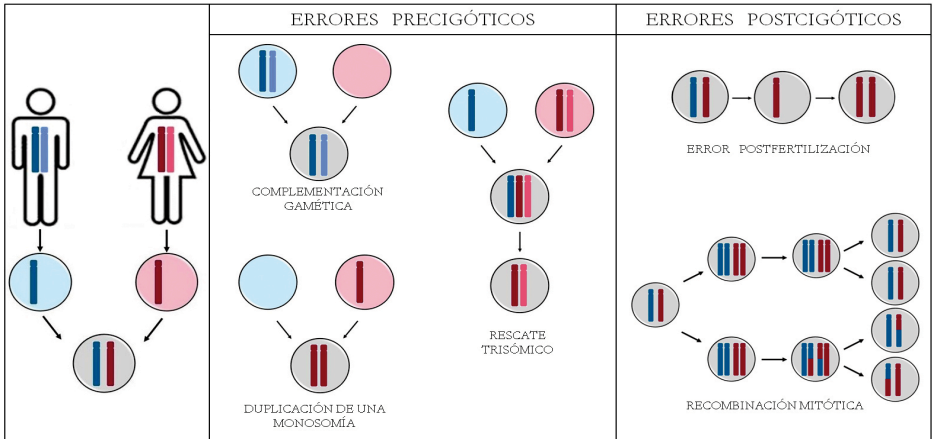


Figura 1: Mecanismos moleculares causantes de UPD. La aparición de una UPD puede deberse a un error precigótico, por un fenómeno de no disyunción cromosómica durante la meiosis, que conlleva un segundo evento (postcigótico) corrector de la aneuploidía en los gametos y/o cigoto. La UPD también puede deberse a un error postcigótico primario, es decir, a la pérdida de uno de los dos cromosomas del par 14 en una división mitótica y la duplicación del restante. Los errores postcigóticos más comunes ocurren por recombinación mitótica entre cromosomas homólogos, dando lugar a la generación de UPD segmentarias.

viabiles. En este caso el riesgo de UPD es de 1/3 si se pierde el cromosoma del progenitor que sólo ha aportado uno. Este mecanismo puede dar lugar tanto a una isodisomía como a una heterodisomía^{39,40}.

Otro posible mecanismo es la **duplicación de una monosomía** cuando se fertiliza un gameto nulisómico por uno monosómico y, posteriormente en las primeras mitosis, tiene lugar la duplicación del único cromosoma de este par presente en la célula. Este mecanismo siempre deriva en una isodisomía⁴¹.

Además existe la posibilidad de que ocurra una **complementación gamética**, la fertilización selectiva y compensatoria de un gameto nulisómico (que no contiene ningún cromosoma 14) por un gameto disómico para el mismo cromosoma (con dos cromosomas 14). En este caso, si el gameto disómico deriva de una no disyunción con los dos cromosomas distintos provenientes del mismo

progenitor ocurrirá una heterodisomía, aunque si la no disyunción fue entre cromátidas hermanas se presentará una isodisomía.

Por último, la UPD puede también deberse a un **error postfertilización**, es decir, a la pérdida de uno de los dos cromosomas del par 14 en una división mitótica y la duplicación del restante. En este caso, se trataría de una isodisomía ya que se duplica el único cromosoma del par 14 presente en la célula. Los errores postfertilización más comunes ocurren por recombinación mitótica entre cromosomas homólogos, dando lugar a la generación de UPD segmentarias normalmente terminales. En general, la UPD completa o segmentaria puede presentarse en mosaicismo cuando el error ha ocurrido en células somáticas^{42,43}.

Existe una asociación entre la **edad materna** avanzada y la incidencia de UPD, aunque son necesarios estudios más

exhaustivos para afirmarlo con rotundidad, considerando el bajo número de pacientes estudiados hasta el momento. Este dato está en concordancia con el hecho de que la generación de oocitos nulisómicos y/o disómicos por no disyunción en meiosis I es mucho más frecuente en mujeres y sobre todo en edades avanzadas. Por tanto, no es de extrañar que la aparición de UPD para cualquier cromosoma, cuando es de origen meiótico con rescate ulterior, ocurra más frecuentemente en gestaciones de madres de edad avanzada⁴⁴.

La UPD del cromosoma 14 puede ser esporádica y sin factor predisponente conocido, o asociarse a un reordenamiento cromosómico estructural en alguno de los progenitores que facilite la segregación anormal de los cromosomas durante la división celular. El cromosoma 14, como el resto de cromosoma acrocéntricos, puede estar involucrado en **translocaciones robertsonianas** además de otros reordenamientos estructurales como inversiones o translocaciones equilibradas, aumentando ligeramente la incidencia de UPD14 respecto a cromosomas no acrocéntricos. Un 20% de los casos descritos de UPD14 son secundarios a una translocación robertsoniana no homóloga, es decir, entre dos cromosomas de distinto par⁴⁵. Considerando que una translocación robertsoniana puede dar lugar a un gameto nulisómico o disómico, este tipo de reordenamiento cromosómico podría estar asociado a la UPD por complementación gamética, por duplicación de una monosomía o por rescate trisómico. Se estima que el riesgo de UPD en el feto tras la detección prenatal de una translocación robertsoniana equilibrada entre cromosomas no homólogos (heredada

o *de novo*) es del 0,6-0,8%. Este riesgo es lo suficientemente alto y las posibles consecuencias clínicas suficientemente serias, para que se recomiende el estudio de UPD en estas gestaciones^{46,47}.

5.2. Otras alteraciones genéticas

Como se ha mencionado, la disomía uniparental del cromosoma 14 no es la única alteración que puede causar los cuadros clínicos descritos. Se han descrito tanto **microdeleciones** como **epimutaciones** en la región 14q32 en pacientes con fenotipos muy parecidos a los causados por la UPD14, tanto en la materna como en la paterna.

En una cohorte de 26 pacientes con rasgos clínicos del síndrome de Kagami-Ogata se detectó que el 65,4% estaba causado por la UPD(14)pat, mientras que el 19,2% se debían a una microdeleción de la región en el cromosoma de origen materno y el 15,4% a una epimutación⁴⁸.

En la cohorte de mayor tamaño de pacientes con síndrome de Temple descrita hasta el momento, el 78% tenían UPD(14)mat, mientras que el 12% presentaban epimutación y el 10% restante una microdeleción de la región en el cromosoma de origen paterno⁴.

5.3. La región 14q32

Los distintos mecanismos moleculares que pueden producir el cuadro clínico (UPD, microdeleción o epimutación) convergen en la desregulación del grupo (clúster) de genes improntados localizados en la región 14q32 (Figura 2). Las bases

moleculares de ambos cuadros (UPDmat y UPDpat) y los genes directamente relacionados con las manifestaciones clínicas se han identificado mediante el estudio de pacientes con UPD segmentaria o microdeleciones. La región crítica se pudo definir mediante el estudio de un paciente con una UPD paterna segmentaria de 3.5 Mb en 14q32-q33 y fenotipo completo de síndrome de Kagami-Ogata²⁵.

El clúster de genes improntados en 14q32 contiene dos regiones diferencialmente metiladas (DMR), 5 genes (*DLK1*, *MEG3*, *DIO3*, *RTL1*, *MEG8*) y un transcrito antisentido (*RTL1as*). Algunos genes se expresan sólo desde la copia paterna (*paternally expressed genes*, PEG) y otros sólo desde la copia que proviene de la madre (*maternal expressed genes*, MEG). Por este motivo, el cuadro clínico asociado a disomía uniparental o deleción es distinto dependiendo de si son paternas o maternas.

Las dos DMRs son la región intergénica entre *DLK1* y *MEG3* (IG-DMR) y la región próxima a *MEG3* (*MEG3*-DMR). En condiciones normales, ambas regiones se encuentran hipermetiladas en la copia paterna e hipometiladas en la copia

heredada de la madre. Uno de los genes contenidos en la región, *RTL1*, codifica una proteína y también un transcrito antisentido *RTL1as* que regula a su vez la expresión de *RTL1*. La hipometilación normal del alelo materno conduce a la expresión de *MEG3*, *MEG8* y *RTL1as* que inhibe la expresión de *RTL1*. La hipermetilación normal del alelo paterno permite la expresión de *DLK1* y *RTL1*.

Cuando un individuo hereda los dos alelos de la madre (UPD materna), ambas regiones DMR se encuentran hipometiladas y, consecuentemente, hay una expresión de *MEG3*, *MEG8* y *RTL1as* más elevada que en condiciones normales y una ausencia de expresión de *DLK1* y *RTL1*. Inversamente, en la UPD paterna, la hipermetilación de las DMR conduce a la sobreexpresión de *DLK1*, *RTL1* y a la ausencia de expresión de *MEG3*, *MEG8* y *RTL1as*.

6. Estudios moleculares

Dado que epimutaciones y microdeleciones de la región cromosómica 14q32 causan cuadros clínicos indistinguibles de los causados por UPDs, es de gran utilidad disponer

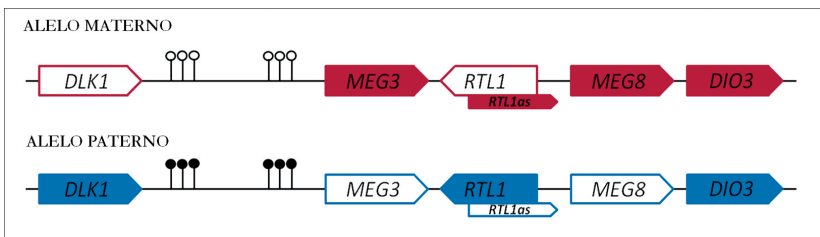


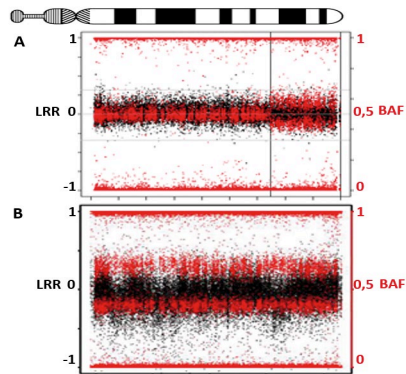
Figura 2: Esquema de la región improntada 14q32. Hay dos regiones diferencialmente metiladas dependiendo del progenitor del cual se hereda el cromosoma: la región intergénica entre *DLK1* y *MEG3* (IG-DMR) y la región próxima a *MEG3* (*MEG3*-DMR). En condiciones normales, el alelo paterno se encuentra hipermetilado y el alelo materno hipometilado. La hipometilación del alelo materno conduce a la expresión de *MEG3*, *MEG8* y *RTL1as* que inhibe la expresión de *RTL1*; la hipermetilación del alelo paterno permite la expresión de *DLK1* y *RTL1*.

de pruebas moleculares que permitan detectar los tres tipos de alteraciones genéticas. Aunque existen diversas tecnologías de utilidad, actualmente hay dos pruebas moleculares de uso clínico habitual para el estudio del estado de metilación de la región desde ADN obtenido de cualquier tejido (normalmente células de la sangre): la PCR específica de metilación y el MLPA específico de metilación (MS-MLPA). Ambas técnicas detectan el grado de metilación en la región y, por tanto, permiten identificar tanto UPD como microdeleciones y epimutaciones. Para las dos pruebas de metilación mencionadas no es necesario disponer de ADN parental (para más detalle sobre las técnicas, consultar el capítulo 1). El MS-MLPA se postula como la técnica más completa para el estudio de los tres tipos de alteraciones asociadas a los cuadros clínicos ya que permite realizar en paralelo un estudio del número de copias de la región y del estado de metilación. Esta técnica presenta dos limitaciones: no permite diferenciar entre UPD y epimutación, ya que en ambas alteraciones se detecta un patrón de metilación anómalo con un patrón de dosis normal y tampoco es posible diferenciar entre isodisomía y heterodisomía, aunque hasta el momento no se ha demostrado que ese dato tenga relevancia clínica.

Aparte de los dos estudios mencionados, existen otras técnicas que permiten la confirmación y caracterización de algunas de las alteraciones que pueden causar el cuadro clínico. El estudio de marcadores polimórficos de ADN (microsatélites o SNPs) en muestras del

probando y de ambos padres permite detectar el origen parental de cada uno de los cromosomas.

Figura 3: Detección de UPD mediante array de SNPs. (A) UPD segmentaria terminal en mosaico del cromosoma 14. Se pueden apreciar unos valores de LRR que se corresponden a dosis normal (dos copias) y una desviación respecto al valor esperado (0.5) en la dosis relativa de cada alelo en los SNPs heterocigotos (BAF) debido a la isodisomía en mosaico. (B) UPD en mosaico de la totalidad del cromosoma 14.



El genotipado de alta resolución con arrays de SNPs permite detectar deleciones en las regiones estudiadas e identificar isodisomías. En este caso se detecta una región con dosis normal (dos copias) pero con pérdida de heterocigosidad ya que se ha heredado el mismo cromosoma por duplicado. Se pueden detectar incluso UPD segmentarias en mosaicismo, cuando la UPD está presente en al menos un 7-10% de las células, al observarse una desviación respecto al valor esperado (0.5) en la dosis relativa de cada alelo en los SNPs heterocigotos (Figura 3). Los arrays de hibridación genómica comparada (aCGH) también permiten detectar y caracterizar variaciones en número de copia de las regiones implicadas.

En los casos en los cuales la UPD se asocia a la presencia de una translocación robertsoniana (familiar o *de novo*) en la cual está involucrado el cromosoma 14 un estudio de cariotipo permite identificar esta alteración cromosómica y sospechar una UPD, pero no corroborarla.

7. Correlación genotipo-fenotipo

Actualmente, los pacientes descritos con síndrome de Temple y síndrome de Kagami-Ogata debido a distintos mecanismos moleculares son casi indistinguibles clínicamente. Es probable que a medida que aumente el número de pacientes diagnosticados con dichos cuadros clínicos se detecten diferencias clínicas dependiendo de la causa molecular subyacente.

En los cuadros clínicos causados por UPD hay dos factores a considerar que pueden actuar como **modificadores** del fenotipo. En primer lugar, cuando la enfermedad está causada por una isodisomía, mutaciones relacionadas con enfermedades **autosómicas recesivas** podrían aparecer en homocigosis agravando el cuadro clínico, aunque esta probabilidad es baja. Una comparación de las características clínicas entre casos con isodisomía y heterodisomía no logró detectar diferencias evidentes entre los grupos¹¹.

Otro factor relevante y posible modificador del fenotipo es la presencia en **mosaico** de **trisomía del cromosoma 14**, posible cuando el mecanismo mutacional es el rescate trisómico. En estos casos, parte del fenotipo podría deberse a mosaicismo

residual por la trisomía en la placenta o en el feto. Se han descrito varios casos de mosaicismo por trisomía 14 con fenotipos mucho más severos que el correspondiente a la UPD14^{49,50}. En una serie de 15 casos de trisomía en mosaico para el cromosoma 14, con un porcentaje de trisomía muy variable (4-70%), 6 de los pacientes fallecieron en los primeros 4 meses de vida, y una proporción importante tenía malformaciones congénitas mayores⁵¹. Las características clínicas más frecuentes incluían retraso de crecimiento, retraso psicomotor, cardiopatía congénita, raíz nasal ancha, orejas displásicas o de implantación baja, micrognatia, cuello corto y, en varones, micropene y criptorquidia^{51,52}. También se detectó asimetría corporal en el 66% de pacientes, que podría deberse a la distribución asimétrica en mosaico de la línea celular trisómica⁵¹.

Como se ha mencionado, aunque los cuadros clínicos de los pacientes con isodisomía y heterodisomía son muy parecidos, se han detectado algunas diferencias en la frecuencia de hidrocefalia y laxitud con hipertextensibilidad de articulaciones¹¹. Estas manifestaciones clínicas son más frecuentes en pacientes con heterodisomía que en pacientes con isodisomía. Considerando que en una heterodisomía uno de los posibles mecanismos causantes es un rescate trisómico, podría contemplarse la trisomía 14 en mosaico como causa de estos signos.

Con relación al síndrome de Kagami-Ogata, parece haber mínimas variaciones fenotípicas dependiendo

de la alteración molecular causante del cuadro clínico²³. En el grupo de pacientes con microdelección la duración de la gestación fue menor de manera estadísticamente significativa, así como la duración de la intubación durante el periodo neonatal. También hay una menor frecuencia de vello en la frente en pacientes con epimutación.

En relación a la contribución al fenotipo de los distintos genes incluidos en la región 14q32, debido a que generalmente las UPD afectan a una región amplia del cromosoma, es difícil establecer correlaciones genotipo-fenotipo. De hecho, la mayor contribución al conocimiento de la región y al papel desempeñado por cada uno de los genes procede de la caracterización de microdelecciones^{3,24,53}. La detección y caracterización detallada de microdelecciones de la región, concretamente dos familias con microdelecciones afectando al clúster mencionado (una en su totalidad y la otra parcialmente)⁵⁴, han permitido identificar algunos de los genes principales en la etiopatogenia de ambos cuadros.

En una familia con dos casos de síndrome de Kagami-Ogata típico y dos casos de síndrome de Temple con talla baja moderada, se detectó una delección de 109kb afectando *DLKI*, *MEG3* y ambas regiones DMR, heredada de la madre y del padre, respectivamente. En estudios con modelos murinos, se ha descrito la “paternalización” del alelo materno en los casos con delección de la IG-DMR. Por tanto, en este caso, la delección en el alelo materno provocaría la “paternalización” del alelo heredado

de la madre. No obstante, debido a que *DLKI* está incluido en la región deleccionada, su expresión no se vería aumentada ya que sólo hay una copia. La “paternalización” del alelo materno sí provocaría una sobreexpresión de *RTL1* ya que este gen no está incluido en la región deleccionada (por tanto, hay dos copias) y no habría expresión de su inhibidor *RTL1as* debido a la “paternalización” del alelo materno. Por tanto, la sobreexpresión de *RTL1* parecería ser el principal mecanismo responsable del fenotipo del síndrome de Kagami-Ogata. En los casos con delección heredada del padre, según los estudios en modelos murinos, no habría cambios en el nivel de metilación. Considerando que *DLKI* está incluido en la delección, su expresión se vería reducida, mientras que *RTL1* tendría unos niveles de expresión comparables a los controles. Por consiguiente, el cuadro clínico de síndrome de Temple con talla baja moderada en esta familia estaría causado por la haploinsuficiencia de *DLKI*.

En la segunda familia descrita, la delección incluye toda la región improntada de 14q32⁵⁵. Resulta especialmente interesante el hecho de que el cuadro clínico asociado a la delección del alelo materno es más leve en este caso que en el anterior, cuando la delección es de mayor tamaño. Si la delección afecta a toda la región improntada, hay una ausencia de *RTL1as* que comporta un aumento de *RTL1*. No obstante, este aumento es menor que en la familia anterior debido a que en este caso, como la delección incluye *RTL1*, sólo hay una

copia de este gen. Por tanto, niveles moderadamente altos de RTL1 se asocian a un cuadro clínico más leve en el caso del síndrome de Kagami-Ogata. En esta familia, el paciente que hereda la deleción del padre presenta un síndrome de Temple con talla muy baja, probablemente debido a la pérdida de *DKLI* y *RTL1*.

Por tanto, a partir de estos estudios, se ha podido determinar que la pérdida de *DLKI* del alelo paterno se asocia a un cuadro con menor afectación de la talla, mientras que la deleción en este alelo de *DKLI* y *RTL1* se asocia a un fenotipo más severo. Asimismo, se ha podido comprobar que cuando la deleción afecta al alelo materno, el cuadro clínico es más severo si la alteración no incluye *RTL1* ya que los niveles de dicha proteína son más elevados que en deleciones de mayor tamaño.

Recientemente, se ha propuesto la implicación adicional de genes de fuera de la región improntada en el desarrollo de discapacidad intelectual en pacientes con síndrome de Temple¹⁸. Comparando pacientes con deleciones del alelo paterno de la región 14q32 de distinto tamaño^{3,56}, se ha delimitado la región responsable del fenotipo cognitivo que incluye cuatro genes: *WARS*, *SLC52A47*, *SLC25A29* y *YY1*. Considerando datos funcionales y de expresión⁵⁷ y el hecho de que una mutación puntual *de novo* de cambio de sentido en *YY1* se ha asociado a discapacidad intelectual⁵⁸, la afectación de *YY1* se ha propuesto principal responsable de la discapacidad intelectual en estos pacientes.

8. Asesoramiento genético

El riesgo de recurrencia de la patología y, por tanto, el asesoramiento genético, depende directamente de la causa molecular subyacente al cuadro clínico. Cuando el cuadro clínico está causado por una UPD es muy relevante diferenciar el riesgo de recurrencia entre los casos en los cuales la UPD se asocia a un reordenamiento cromosómico estructural y los casos esporádicos. Si la UPD no se asocia a reordenamientos estructurales cromosómicos, el riesgo de recurrencia para los pacientes y sus familiares es muy bajo, equiparándose al de la población general. El riesgo de recurrencia en los casos de UPD asociados a reordenamientos cromosómicos estructurales en los cuales está involucrado el cromosoma 14 es algo mayor, pero menor del 1%. A parte del riesgo de recurrencia de la UPD, dependiendo del reordenamiento cromosómico el riesgo de aneusomías totales o segmentarias del cromosoma 14 u otros cromosomas implicados en el reordenamiento es relevante, pudiendo dar lugar a patologías severas, subfertilidad o abortos de repetición.

El riesgo de recurrencia del cuadro clínico cuando se asocia a epimutaciones es similar al de la población general. Asimismo, el riesgo de recurrencia para las microdeleciones es bajo si el reordenamiento ha sido *de novo*, es decir, si ninguno de los progenitores es portador de la microdeleción. En estos casos, el riesgo de recurrencia para la pareja es ligeramente más elevado que el de la población general por la

posibilidad de **mosaicismo germinal**.

En cambio, el riesgo de recurrencia para las deleciones puede ser elevado cuando el progenitor es portador de una microdeleción en heterocigosis, ya que el riesgo de transmitirla a la descendencia es del 50%. Es muy importante tener presente que las manifestaciones de la enfermedad a transmitir (síndrome de Temple o de Kagami-Ogata) dependen del sexo del progenitor transmisor, considerando que es un trastorno en una región improntada. Es decir, que una mujer con una deleción en el cromosoma heredado del padre con un cuadro clínico de talla baja y pubertad precoz tiene un riesgo del 50% de transmitir a la descendencia la deleción que causaría una clínica mucho más severa relacionada con el síndrome de Kagami-Ogata. Por tanto, en los casos en los cuales el progenitor transmisor es la madre, el riesgo de síndrome de Kagami-Ogata es del 50% independientemente del sexo de la criatura; cuando el padre es el progenitor transmisor el riesgo de transmisión del síndrome de Temple es del 50%. Es de gran importancia que la familia comprenda que, un diagnóstico de síndrome de Kagami-Ogata confiere riesgo para el mismo síndrome pero también para el síndrome de Temple en otros familiares, y viceversa.

En parejas en las cuales uno de los dos es portador de una microdeleción de la región 14q32, con riesgo de transmitir la deleción a la descendencia del 50%, es posible ofrecer tanto diagnóstico prenatal como diagnóstico preimplantacional. El progenitor que tiene la microdeleción también

presentará manifestaciones clínicas, pero dependiendo del origen parental puede no presentar el mismo cuadro clínico que tiene riesgo de transmitir. Independientemente de este hecho, si la microdeleción está identificada, la pareja puede optar tanto a una gestación espontánea y posterior diagnóstico prenatal, como a una fecundación *in vitro* y posterior análisis de los embriones por diagnóstico preimplantacional.

9. UPD14 en mosaicismo somático y riesgo de cáncer

Dado que los mecanismos mutacionales que llevan a la génesis de UPD14 implican con frecuencia la ocurrencia de un evento somático (en cigoto o en divisiones mitóticas posteriores), la aparición de UPD14 en mosaicismo es probablemente un fenómeno relativamente común. De hecho, a pesar de que la recombinación mitótica es infrecuente, el número de mitosis que acontecen durante toda la vida de un individuo es tan elevado que es muy probable que diversas células adquieran UPDs segmentarias para diversos cromosomas. No obstante, su detección puede no ser factible hasta que alcance a un porcentaje suficiente de células, lo cual puede correlacionar también con que implique alguna significación biológica contribuyendo a un fenotipo. Recientemente, la UPD del cromosoma 14 en mosaico se ha descrito, al igual que otros muchos reordenamientos cromosómicos, en sangre y otros tejidos de la población, con mayor frecuencia

según avanza la edad. El mosaicismo clonal para estos reordenamientos es detectable en sangre de sujetos adultos con una frecuencia del 1% a los 60 años y del 2.5% a los 80. Además de con cáncer hematológico, la detección de mosaicismo clonal se ha relacionado con un riesgo aumentado de tumores sólidos. Concretamente, la UPD14

en mosaico se ha descrito con una frecuencia incrementada en pacientes con cáncer no-hematológico, con una razón de probabilidades (*odds ratio*) de 3.32, principalmente para cáncer de vejiga y riñón⁵⁹, lo que supone una evidencia adicional de la posible contribución de alguno de los genes improntados en 14q al riesgo de cáncer.

RESUMEN

La disomía uniparental del cromosoma 14 (UPD14) ocurre cuando una persona recibe los dos cromosomas 14 del mismo progenitor, dando origen a los síndromes de Temple (UPD14mat) o de Kagami-Ogata (UPD14pat). Ambos síndromes pueden presentarse también en pacientes con microdeleciones y epimutaciones de la región crítica en 14q32. Son dos cuadros causados por alteraciones recíprocas en una región genómica improntada.

El síndrome de Temple se caracteriza por retraso del crecimiento de origen prenatal, rasgos faciales (frente ancha, nariz corta con punta bulbosa y filtro corto), acromicria e hipotonía, con escasa afectación intelectual.

El síndrome de Kagami-Ogata se manifiesta prenatalmente con placentomegalia y polihidramnios, y cursa con malformaciones esqueléticas (torácicas y extremidades cortas) junto con rasgos faciales característicos (vello en la frente, filtro prominente, micrognatia, blefarofimosis), defectos de la pared abdominal y discapacidad intelectual.

Por ahora son pocos los pacientes descritos, en parte por la falta de reconocimiento de estos síndromes, aunque ya existen algunas correlaciones genotipo-fenotipo y pautas de seguimiento.

REFERENCIAS

- Falk MJ, Curtis C a., Bass NE, Zinn AB, Schwartz S. Maternal uniparental disomy chromosome 14: Case report and literature review. *Pediatr Neurol* 2005; 32: 116–20.
- Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 1991; 28: 511–4.
- Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M et al. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 2008; 40: 237–42.
- Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJG, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet* 2014; 51: 495–501.
- Antonarakis SE, Blouin JL, Maher J, Avramopoulos D, Thomas G, Talbot CC. Maternal uniparental disomy for human chromosome 14, due to loss of a chromosome 14 from somatic cells with t(13;14) trisomy 14. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 1145–52.
- Healey S, Powell F, Battersby M, Chenevix-Trench G, McGill J. Distinct phenotype in maternal uniparental disomy of chromosome 14. *Am J Med Genet* 1994; 51: 147–9.
- Robinson WP, Bernasconi F, Basaran S, Yüksel-Apak M, Neri G, Serville F et al. A somatic origin of homologous Robertsonian translocations and isochromosomes. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 290–302.
- Hordijk R, Wierenga H, Scheffer H, Leegte B, Hofstra RM, Stolte-Dijkstra I. Maternal uniparental disomy for chromosome 14 in a boy with a normal karyotype. *J Med Genet* 1999; 36: 782–5.
- Mitter D, Buiting K, von Eggeling F, Kuechler A, Liehr T, Mau-Holzmann UA et al. Is there a higher incidence of maternal uniparental disomy 14 [upd(14)mat]? Detection of 10 new patients by methylation-specific PCR. *Am J Med Genet A* 2006; 140: 2039–49.
- Berends MJ, Hordijk R, Scheffer H, Oostervijk JC, Halley DJ, Sorgedraeger N. Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet* 1999; 84: 76–9.
- Fokstuen S, Ginsburg C, Zachmann M, Schinzel A. Maternal uniparental disomy 14 as a cause of intrauterine growth retardation and early onset of puberty. *J Pediatr* 1999; 134: 689–95.
- Pentao L, Lewis RA, Ledbetter DH, Patel PI, Lupski JR. Maternal uniparental isodisomy of chromosome 14: association with autosomal recessive rod monochromacy. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 690–9.
- Manzoni MF, Pramparo T, Stroppolo A, Chiaio F, Bosi E, Zuffardi O et al. A patient with maternal chromosome 14 UPD presenting with a mild phenotype and MODY. *Clin Genet* 2000; 57: 406–8.
- Sanlaville D, Aubry MC, Dumez Y, Nolen MC, Amiel J, Pinson MP et al. Maternal uniparental heterodisomy of chromosome 14: chromosomal mechanism and clinical follow up. *J Med Genet* 2000; 37: 525–8.
- Tohyama J, Yamamoto T, Hosoki K, Nagasaki K, Akasaka N, Ohashi T et al. West syndrome associated with mosaic duplication of FOXP1 in a patient with maternal uniparental disomy of chromosome 14. *Am J Med Genet A* 2011; 155A: 2584–8.
- Kayashima T, Katahira M, Harada N, Miwa N, Ohta T, Yoshiura K-I et al. Maternal isodisomy for 14q21-q24 in a man with diabetes mellitus. *Am J Med Genet* 2002; 111: 38–42.
- Splitt MP, Goodship JA. Another case of maternal uniparental disomy chromosome 14 syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 72: 239–40.
- Graziano C. New cases of Temple syndrome caused by 14q32 deletion. In: 10th international meeting on CNVs and Genes in Intellectual Disability and Autism. 2015.
- Eggermann T, Zerres K, Eggermann K, Moore G, Wollmann HA. Uniparental disomy: clinical indications for testing in growth retardation. *Eur J Pediatr* 2002; 161: 305–12.
- Wang JC, Passage MB, Yen PH, Shapiro LJ, Mohandas TK. Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 Robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 1069–74.
- Sutton VR, Shaffer LG. Search for imprinted regions on chromosome 14: comparison of maternal and paternal UPD cases with cases of chromosome 14 deletion. *Am J Med Genet* 2000; 93: 381–7.
- Chu C, Schwartz S, McPherson E. Paternal uniparental isodisomy for chromosome 14 in a

- patient with a normal 46,XY karyotype. *Am J Med Genet A* 2004; 127A: 167–71.
23. Kagami M, Kurosawa K, Miyazaki O, Ishino F, Matsuoka K, Ogata T. Comprehensive clinical studies in 34 patients with molecularly defined UPD(14)pat and related conditions (Kagami–Ogata syndrome). *Eur J Hum Genet* 2015; : 1–11.
 24. Rosenfeld JA, Fox JE, Descartes M, Brewer F, Stroud T, Gorski JL et al. Clinical features associated with copy number variations of the 14q32 imprinted gene cluster. *Am J Med Genet A* 2015; 167A: 345–53.
 25. Irving MD, Buiting K, Kanber D, Donaghuie C, Schulz R, Offiah A et al. Segmental paternal uniparental disomy (patUPD) of 14q32 with abnormal methylation elicits the characteristic features of complete patUPD14. *Am J Med Genet Part A* 2010; 152: 1942–50.
 26. Cotter PD, Kaffe S, McCurdy LD, Jhaveri M, Willner JP, Hirschhorn K. Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* 1997; 70: 74–9.
 27. Beckwith JB. Nephrogenic rests and the pathogenesis of Wilms tumor: developmental and clinical considerations. *Am J Med Genet* 1998; 79: 268–73.
 28. Tan TY, Amor DJ. Tumour surveillance in Beckwith-Wiedemann syndrome and hemihyperplasia: a critical review of the evidence and suggested guidelines for local practice. *J Paediatr Child Health* 2006; 42: 486–90.
 29. Clericuzio CL, Chen E, McNeil DE, O'Connor T, Zackai EH, Medne L et al. Serum alpha-fetoprotein screening for hepatoblastoma in children with Beckwith-Wiedemann syndrome or isolated hemihyperplasia. *J Pediatr* 2003; 143: 270–2.
 30. Zarate YA, Mena R, Martin LJ, Steele P, Tinkle BT, Hopkin RJ. Experience with hemihyperplasia and Beckwith-Wiedemann syndrome surveillance protocol. *Am J Med Genet A* 2009; 149A: 1691–7.
 31. Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M et al. Maternal uniparental disomy 14 syndrome demonstrates Prader-Willi syndrome-like phenotype. *J Pediatr* 2009; 155: 900–903.e1.
 32. Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, Gimelli S, Marelli S, Verheij J et al. Detailed phenotypic-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 1443–9.
 33. Varela MC, Simões-Sato AY, Kim CA, Bertola DR, De Castro CIE, Koiffmann CP. A new case of interstitial 6q16.2 deletion in a patient with Prader-Willi-like phenotype and investigation of SIM1 gene deletion in 87 patients with syndromic obesity. *Eur J Med Genet* 2006; 49: 298–305.
 34. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K, Nakabayashi K, Sano S, Fuke T et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 1062–7.
 35. Netchine I, Rossignol S, Dufourg M-N, Azzi S, Rousseau A, Perin L et al. 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3148–54.
 36. Engel E, DeLozier-Blanchet CD. Uniparental disomy, isodisomy, and imprinting: probable effects in man and strategies for their detection. *Am J Med Genet* 1991; 40: 432–9.
 37. Engel E. [A new genetic concept: the uniparental disomy and its potential effect, the isodisomy (author's transl)]. *J génétique Hum* 1980; 28: 11–22.
 38. Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter DH, Hejtmanic JF et al. Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 1988; 42: 217–26.
 39. Purvis-Smith SG, Saville T, Manass S, Yip MY, Lam-Po-Tang PR, Duffy B et al. Uniparental disomy 15 resulting from “correction” of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 1348–50.
 40. Cassidy SB, Lai LW, Erickson RP, Magnuson L, Thomas E, Gendron R et al. Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 701–8.
 41. Petersen MB, Bartsch O, Adelsberger PA, Mikkelsen M, Schwinger E, Antonarakis SE. Uniparental isodisomy due to duplication of chromosome 21 occurring in somatic cells monosomic for chromosome 21. *Genomics* 1992; 13: 269–74.
 42. Henry I, Puech A, Riesewijk A, Ahnine L, Mannens M, Beldjord C et al. Somatic mosaicism for partial paternal isodisomy in Wiedemann-Beckwith syndrome: a post-fertilization event. *Eur J Hum Genet* 1993; 1: 19–29.
 43. Henry I, Bonaiti-Pellier C, Chehensse V, Beldjord C, Schwartz C, Utermann G et al. Uniparental paternal disomy in a genetic cancer-predisposing syndrome. *Nature* 1991; 351: 665–7.

44. Pellestor F, Andréo B, Anahory T, Hamamah S. The occurrence of aneuploidy in human: lessons from the cytogenetic studies of human oocytes. *Eur J Med Genet*; 49: 103–16.
45. Shaffer LG, McCaskill C, Adkins K, Hassold TJ. Systematic search for uniparental disomy in early fetal losses: the results and a review of the literature. *Am J Med Genet* 1998; 79: 366–72.
46. Sensi A, Cavani S, Villa N, Pomponi MG, Fogli A, Gualandi F et al. Nonhomologous Robertsonian translocations (NHRTs) and uniparental disomy (UPD) risk: an Italian multicentric prenatal survey. *Prenat Diagn* 2004; 24: 647–52.
47. Ruggeri A, Dulcetti F, Miozzo M, Grati FR, Grimi B, Bellato S et al. Prenatal search for UPD 14 and UPD 15 in 83 cases of familial and de novo heterologous Robertsonian translocations. *Prenat Diagn* 2004; 24: 997–1000.
48. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T. Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 928–32.
49. Fujimoto A, Allanson J, Crowe CA, Lipson MH, Johnson VP. Natural history of mosaic trisomy 14 syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 44: 189–96.
50. Von Sneidern E, Lacassie Y. Is trisomy 14 mosaic a clinically recognizable syndrome?—case report and review. *Am J Med Genet A* 2008; 146A: 1609–13.
51. Fujimoto A, Allanson J, Crowe CA, Lipson MH, Johnson VP. Natural history of mosaic trisomy 14 syndrome. *Am J Med Genet* 1992; 44: 189–96.
52. Fagerberg CR, Eriksen FB, Thormann J, Østergaard JR. Trisomy 14 mosaicism: clinical and cytogenetic findings in an adult. *Clin Dysmorphol* 2012; 21: 45–7.
53. Beygo J, Elbracht M, de Groot K, Begemann M, Kanber D, Platzer K et al. Novel deletions affecting the MEG3-DMR provide further evidence for a hierarchical regulation of imprinting in 14q32. *Eur J Hum Genet* 2014; 23: 1–9.
54. Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 2008; 3: 181–7.
55. Ogata T, Kagami M. Molecular Mechanisms Leading to the Phenotypic Development in Paternal and Maternal Uniparental Disomy for Chromosome 14. *Clin Pediatr Endocrinol* 2008; 17: 103–11.
56. Rosenfeld JA, Fox JE, Descartes M, Brewer F, Stroud T, Gorski JL et al. Clinical features associated with copy number variations of the 14q32 imprinted gene cluster. *Am J Med Genet Part A* 2015; 167: 345–53.
57. Jolly LA, Nguyen LS, Domingo D, Sun Y, Barry S, Hancarova M et al. HCFC1 loss-of-function mutations disrupt neuronal and neural progenitor cells of the developing brain. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 3335–47.
58. Vissers LELM, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Stehouwer M, de Vries P et al. A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* 2010; 42: 1109–12.
59. Jacobs KB, Yeager M, Zhou W, Wacholder S, Wang Z, Rodriguez-Santiago B et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. *Nat Genet* 2012; 44: 651–8.

Capítulo 6: SÍNDROME DE ANGELMAN

Miriam Guitart¹, Cristina Camprubí², Conchita Fernandez³, Blanca Gener⁴, Elisabeth Gabau⁵

¹Laboratorio de Genética. UDIAT-CD. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona. ²GenIntegral, CSETC-Cardedeu, Barcelona. ³Neurología, Servicio de Pediatría. Hospital de Sabadell, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona. ⁴Servicio de Genética. Hospital Universitario Cruces. Instituto de Investigación BioCruces Cruces-Barakaldo, Bizkaia. ⁵Genética Clínica. Servicio de Pediatría. Hospital de Sabadell. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona.

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

El síndrome de Angelman (AS) (MIM 105830) es un trastorno del neurodesarrollo de origen genético caracterizado por una discapacidad intelectual (DI) grave, con nulo o mínimo uso del lenguaje, asociado a epilepsia con alteraciones en trazado de electroencefalograma (EEG), trastorno del equilibrio y movimiento, un fenotipo físico y conductual característicos y trastorno del sueño¹. La incidencia del AS es alrededor de 1 por cada 15,000 individuos^{2,3}.

La orientación diagnóstica la realizan el pediatra, neuropediatra y/o genetista clínico, en base a los criterios clínicos consensuados por Williams y col.⁴ (Tabla 1). Posteriormente se confirma

el diagnóstico mediante test genéticos (el 10% de AS es aún de etiología desconocida). La edad media de diagnóstico aún está por encima de los 18 meses de edad debido a la inespecificidad de la clínica en el primer año de vida.

En un paciente, sin antecedentes patológicos relevantes, con retraso grave del desarrollo global de etiología no filiada y la presencia de los siguientes hallazgos clínicos de forma combinada, son muy sugestivos de AS: (1) Trastorno del sueño; (2) Fenotipo conductual característico (sonrisa frecuente, fascinación por el agua, frecuente aleteo, hiperexcitabilidad, dispersión) (Figuras 1A y 1B); (3) Trastorno motor (temblor, sacudidas, ataxia); (4) Desaceleración de curva de perímetro cefálico; y (5) Patrón EEG característico⁵.

Tabla 1: Criterios clínicos del AS descritos por Williams y colaboradores⁴

A.- CONSISTENTES (100%)

- Retraso del desarrollo, funcionalmente severo
- Trastorno del movimiento o del equilibrio, usualmente temblores de las extremidades o ataxia.
- Fenotipo conductual: combinación de carcajadas/sonrisa, apariencia feliz, hiperexcitable, frecuente aleteo, conducta hiperactiva, tendencia a la dispersión
- Afectación grave del lenguaje, ninguna o mínimo uso de palabras, con mejor lenguaje receptivo y comunicación no verbal

B.- FRECUENTES (más del 80%)

- Estancamiento en el crecimiento del perímetro cefálico resultando una microcefalia (absoluta o relativa) a los 2 años de edad
- La microcefalia es más importante en las deleciones 15q11.2-q13
- Crisis comiciales de inicio antes de los 3 años de edad. La epilepsia mejora con la edad, pero puede aparecer en la edad adulta.
- EEG Patológico, con patrón característico descrito en la guía: El EEG patológico puede estar presente antes de los 2 años de edad, puede preceder a otros criterios clínicos y no tiene correlación con las crisis comiciales clínicas.

C. ASOCIADOS (20-80%)

- Occipucio aplanado
- Surco occipital
- Protusión lingual
- Movimientos de la lengua: Trastornos de succión/deglución
- Problemas de la alimentación durante la infancia
- Prognatismo
- Boca grande, espacio interdental aumentado
- Babeo frecuente
- Movimientos masticatorios frecuentes con la boca
- Estrabismo
- Hipopigmentación de piel y ojos comparados con otros miembros de la familia
- Hiperreflexia en Extremidades inferiores
- Brazos levantados y semiflexionados durante la marcha
- Hipersensibilidad al calor
- Trastorno del ciclo sueño-vigilia y disminución de la necesidad de dormir
- Atracción y fascinación por el agua, “arrugar, estrujar” objetos como papel y plásticos
- Trastornos de Alimentación
- Obesidad en niños mayores
- Escoliosis
- Estreñimiento

Abreviaturas:

EEG: Electroencefalograma

1.1. Trastornos neurológicos

1.1.1. Epilepsia

Característica clínica frecuente (>80%) dentro del consenso de criterios diagnósticos clínicos. En el 75% de los pacientes el inicio de la crisis ocurre antes de los 3 años de vida⁶⁻⁸. Un 5-20% de los casos no presentan crisis, pero es necesario mantener igualmente una alta sospecha durante su seguimiento.

El AS se suele presentar como un síndrome epiléptico generalizado y los tipos de crisis más frecuentes corresponden a: mioclonias (contracciones breves, repetitivas y sin ritmo de diferentes músculos), ausencias atípicas (episodios de “desconexión” de segundos de duración con discreta pérdida de tono muscular), atónicas (pérdida brusca del tono con caída al suelo), y tónico-clónicas generalizadas (se inicia con pérdida de conciencia, seguida de aumento del tono generalizado y posteriormente movimientos rítmicos generalizados con estado postcrítico final). A menudo presentan epilepsias graves que requieren politerapia^{6,7,9}. La epilepsia suele ser más grave en los primeros años y mejora con la pubertad, aunque en la edad adulta puede ocurrir de nuevo un empeoramiento^{6,7,10}.

Los estatus epilépticos son frecuentes (hasta un 91%) y a menudo recurrentes. El estatus epiléptico no convulsivo es el más habitual. Se puede manifestar por una disminución del estado de alerta, estatus de ausencias atípicas, caídas cefálicas recurrentes o movimientos mioclónicos erráticos^{6,7,11}. Los espasmos en flexión son poco comunes⁶.



Figura 1: (A) Niña de 4 años con delección 15q11-q13, puede observarse hipopigmentación, boca grande y sonriente y microcefalia. (B) Niña de 15 años con mutación en el gen *UBE3A* con las características reseñables de boca grande y sonriente.

Los episodios de risa paroxística tan frecuentes en este síndrome no son de origen epiléptico.

1.1.2. Electroencefalograma (EEG)

Más del 80% de los pacientes presentan EEG patológicos. Se han descrito tres tipos de trazados de EEG en el AS: patrón theta, patrón delta y de puntas a 3-4 Hz en áreas posteriores¹². Esta clasificación aún se mantiene siendo reportada en múltiples series hasta el momento actual^{9,13,14}.

- Patrón theta: patrón difuso y persistente, de alta amplitud y actividad de base 4-6 Hz. Desaparece frecuentemente a los 12 años de edad.
- Patrón delta (Figura 2A): ritmo de base (2-3 Hz) de alta amplitud (>500 microvoltios) predominantemente en áreas anteriores. Este patrón aumenta su frecuencia con la edad¹³ y es el más común en el AS.
- Patrón de puntas en áreas posteriores (Figura 2B): puntas

y ondas de alta amplitud a 3-4 Hz de actividad de base. Este patrón también es muy frecuente e incluso en algunas series lo describen como el más prevalente en el AS¹². Esta actividad se desencadena con el cierre pasivo de ojos del paciente (sabiendo que en este tipo de pacientes puede ser complicada la realización de esta técnica).

Uno o más patrones de los descritos son evidentes hasta en el 90% de los pacientes y pueden estar presentes independientemente de que el paciente presente crisis epilépticas. En los pacientes más jóvenes las alteraciones en trazado del EEG son más frecuentes que en los adolescentes, y éstas pueden incluso aparecer antes de los 12 meses de edad aunque el paciente no haya presentado crisis comiciales^{12,13}. Este estudio complementario podría ser muy útil en el diagnóstico precoz ante un lactante con retraso psicomotor global inespecífico. Aun así se debe tener en cuenta que estos patrones no son específicos y que también los podemos encontrar en otros síndromes neurogenéticos como el síndrome de Rett (véase apartado 3)^{15,16}.

1.1.3. Capacidad Cognitiva y Lenguaje

En el 100% de los casos existe un retraso en el desarrollo cognitivo durante el primer año de vida, evidenciándose entre los 2-5 años de edad un déficit cognitivo grave asociado a una baja capacidad de atención e hiperactividad¹⁷.

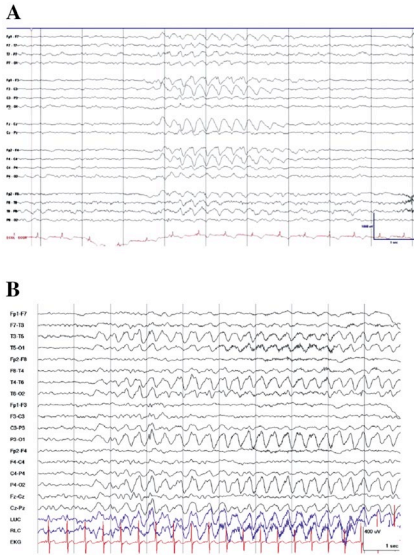


Figura 2: Patrones de EEG característicos. (A) Patrón delta predominantemente en áreas anteriores. (B) Patrón de puntas y ondas de alta amplitud a 3-4 Hz de actividad en áreas posteriores.

El lenguaje expresivo está gravemente afectado variando entre una ausencia total de lenguaje oral y la emisión de menos de 10 palabras, situándose la edad media de la aparición de la primera palabra en los 53 meses. Frente a la afectación tan grave del lenguaje expresivo la comprensión está más preservada. El mecanismo fisiopatológico que subyace en esta afectación del lenguaje aún se desconoce pero recientes estudios sugieren trastornos en la mielinización^{18,19}.

1.1.4. Fenotipo conductual

Casi todos los pacientes presentan una apariencia feliz, sonrisa frecuente y episodios de carcajadas. Tienen tendencia a la dispersión e hiperactividad con fácil excitabilidad.

Muestran fascinación por el agua y les gusta llevarse objetos a la boca preferiblemente de goma y/o plástico. Respecto a la sensibilidad ésta se encuentra incrementada para el calor y disminuida para el dolor²⁰.

El fenotipo conductual del AS se aproxima en varios aspectos al autismo. La capacidad de atención acostumbra a ser extraordinariamente reducida, lo cual dificulta mucho la interacción social puesto que impide captar información sobre el pensamiento de los demás. A ello se une la gran impulsividad, que genera conductas disociadas del contexto. Otros síntomas como las conductas obsesivas y las estereotipias, muy propios del autismo, son prevalentes en este síndrome; por todo ello en algunos casos puede ser difícil su diagnóstico relacionado con el AS y siempre se ha de tener en cuenta como un posible trastorno comórbido.

1.1.5. Retraso desarrollo motor

Los pacientes presentan un retraso en la adquisición de ítems de desarrollo motor. La sedestación libre se adquiere prácticamente en todos los casos con retraso, con intervalos extremos de edad que oscilan desde los 6 meses hasta los 36 meses²¹.

El primer desplazamiento autónomo está poco descrito en la literatura, pero el gateo parece que la mayoría lo consigue alrededor de los 2 años. La mayor parte de los pacientes consiguen la deambulación entre los 2 y los 5 años. Sin embargo, algunos niños con mayor grado de ataxia o trastorno del movimiento no consiguen la marcha

hasta pasados los 9-10 años, y un 10% no consigue la deambulaci3n aut3noma^{5,21}.

Existen algunos casos de empeoramiento del trastorno motor en la 5^a o 6^a d3cada de la vida con aparici3n de diston3a o Parkinsonismo²².

1.1.6. Trastorno de la marcha

- Ni3os con menor afectaci3n motora: marcha con tendencia al equinismo y cierta antepulsi3n (como si persiguieran su centro de gravedad). Esta tendencia aumenta al correr, acompa3andose de una elevaci3n de los brazos y flexi3n de los antebrazos, a veces con “aleteo”.
- Los pacientes con mayor espasticidad en extremidades inferiores manifiestan el patr3n descrito como t3pico en el AS. Consiste en una ampliaci3n de la base de sustentaci3n y piernas r3gidas con tendencia al apoyo en los pies en valgo. Este patr3n de las extremidades inferiores se acompa3a de la postura t3pica de brazos en candelabro con flexi3n del codo, pronaci3n y flexi3n de la mu3eca (*puppet like*)⁵.

1.1.7. Trastorno del tono y movimiento

Entre los 6 y 24 meses presentan en general una hipoton3a de predominio axial y en algunos casos se evidencia un aumento de tono en las extremidades de predominio distal con reflejos osteotendinosos exaltados.

El trastorno del movimiento t3pico de estos ni3os forma parte de los criterios

diagn3sticos consistentes, es decir est3n presentes en el 100% de los pacientes. Antes de los 2 a3os de edad se objetiva un movimiento irregular, brusco como sacudidas, que fragmenta la movilidad del movimiento voluntario. Su intensidad es variable y aumenta en la mayor3a de los casos con el movimiento o la intenci3n motora. Los padres describen un empeoramiento en relaci3n a situaciones de estr3s o problemas de salud. Estos movimientos analizados en un estudio mediante electromiograf3a y EEG^{23,24} se describen como un tipo peculiar r3pido de mioclonus cortical.

1.1.8. Trastorno del sue3o

Los pacientes presentan una disminuci3n de las necesidades de dormir y ciclos de vigilia-sue3o anormales. La prevalencia de trastornos del sue3o en el AS es del 40%- 80% y son m3s frecuentes que en pacientes con d3ficit cognitivo de otra etiolog3a. El insomnio puede afectar a todas las fases del sue3o, 35%-60% presentan problemas para conciliar el sue3o, y con el mismo porcentaje se presentan problemas para mantenerlo, teniendo despertares frecuentes que lo fragmentan^{25,26}.

1.1.9. Microcefalia

Est3 presente en el 80% de los pacientes, present3ndose como una desaceleraci3n del per3metro cef3lico en los primeros meses de vida⁵.

1.2. Alteraciones musculoesqueléticas

1.2.1. Escoliosis

Se encuentra en un 20% en la infancia y este porcentaje aumenta hasta un 50% en la edad adulta, ya que tiende a empeorar durante la adolescencia, siendo la progresión rápida en pacientes no ambulantes²⁷.

1.2.2. Otros problemas ortopédicos

La presencia de espasticidad en extremidades inferiores, con la edad, puede producir acortamiento de los tendones de Aquiles e isquiotibiales. Por este motivo la incidencia de retracciones osteotendinosas (marcha flexión de rodillas) es mayor en la edad adulta. Los pacientes no deambulantes tienen mayor riesgo de complicaciones como subluxación o luxación de caderas. En los pacientes adultos existe una mayor incidencia de retracciones osteotendinosas (marcha flexión de rodillas) o deformidades (escoliosis). En los grupos de mayor edad, un tercio de pacientes no son deambulantes²⁸.

1.3. Otros problemas médicos

1.3.1. Problemas de alimentación y gastrointestinales

Los problemas de alimentación son frecuentes en el lactante y niño pequeño, aunque no son graves. La existencia de una lengua protuyente y/o una falta de coordinación buco-lingual, condicionan problemas para la succión y/o deglución, con dificultades

para el amamantamiento, frecuentes regurgitaciones e incluso reflujo gastroesofágico²⁹.

El reflujo gastroesofágico hay que tenerlo en cuenta a cualquier edad, y la falta de coordinación buco-lingual puede producir babeo importante.

Más frecuentemente en la adolescencia puede aparecer obesidad por un aumento de apetito y poca movilidad y ello conlleva a un estreñimiento también importante.

1.3.2 Hipopigmentación

El fenotipo de piel blanca, ojos claros y cabello rubio es más frecuente, pero sobre todo en las delecciones (véase apartado 7).

1.3.3. Problemas oftalmológicos

El estrabismo es especialmente frecuente en los niños hipopigmentados, ya que la pigmentación normal de la retina es necesaria para el desarrollo normal del nervio óptico. El queratocono se presenta más en adultos³⁰.

1.3.4. Otitis Media

Debido a una angulación anormal de la trompa de Eustaquio que dificulta el drenaje del oído medio suelen presentar mayor frecuencia de otitis.

1.3.5. Problemas respiratorios

Secundarios a la existencia de un reflujo gastroesofágico y/o a la inmovilización y/o escoliosis grave.

1.3.6. Dentición

Los dientes son normales, pero la boca de gran tamaño hace que estén separados

y la protusión lingual puede ocasionar deformidad de los mismos³¹.

2. Manejo clínico y tratamiento

El diagnóstico precoz es importante para: (1) conocer un pronóstico que permitirá a las familias realizar una planificación vital y a los profesionales elaborar estrategias terapéuticas lo más tempranas y adecuadas a las dificultades específicas que presentan estos pacientes; y (2) ofrecer a la familia un consejo para el manejo del paciente.

Remitir al paciente a un centro de atención precoz de su zona de residencia es el lugar ideal para empezar a realizar el tratamiento y seguimiento multidisciplinar (psicólogos, fisioterapeutas y logopedas).

2.1. Epilepsia

A las familias se les explicará cómo es la semiología de las crisis más frecuentes (ver apartado 1.1.1.) para que puedan reconocerlas. Ante la sospecha de crisis les pediremos que las graben en vídeo (si les fuera posible) y contacten con su neurólogo de referencia.

Si ya precisan fármacos antiepilépticos, el valproato y el clonazepam son los más efectivos (cada uno por separado y combinados). Otros fármacos efectivos son el levetiracetam, clobazam, lamotrigina, topiramato y etosuximida.

Los fármacos que pueden producir un empeoramiento de las crisis son la carbamazepina, oxcarbazepina y vigabatrina^{6,7}. Es frecuente que la

epilepsia sea refractaria al tratamiento antiepiléptico. Sólo un 23% responden a su primer o segundo fármaco y un 47%-77% requieren politerapia^{32,33}.

Otras alternativas terapéuticas como la dieta cetogénica y el estimulador del nervio vago están siendo reportadas con buenas respuestas en algunos casos^{33,34}. Los pacientes con AS no son candidatos a cirugía de la epilepsia.

2.2. Trastorno motor

Precisará tratamiento con fisioterapia y traumatología para mejorar la función y prevenir o retrasar la aparición de retracciones o deformidades.

- Técnicas de fisioterapia: para mejorar el control postural, tono y equilibrio, así como la motricidad fina y oro-facial.
- Técnicas ortopédicas: ortesis (férulas antiequino, corsés, etc...).
- Tratamiento farmacológico:
 - Para la espasticidad puede estar indicada la inyección de toxina botulínica.
 - Ante un mioclonus cortical probar piracetam.
 - En los adultos que desarrollan distonía y Parkinsonismo se ha descrito una buena respuesta a levodopa.
- Adaptaciones: sillas para mejor control postural, medios de desplazamiento, material de juego o alimentación.

2.3. Déficit cognitivo y trastorno del lenguaje

Los pacientes pese a sus dificultades a nivel cognitivo tienen capacidad de aprender, aunque su ritmo de aprendizaje sea lento. El logopeda es muy importante en etapas tempranas para el abordaje de la comunicación; asesorando e implementando con técnicas de comunicación aumentativa/alternativa. Estos sistemas facilitadores para mejorar su relación con el entorno y su autonomía se inician en la primera infancia pero es recomendable que se sigan utilizando en la edad adulta.

2.4. Trastorno del sueño

Puede ser útil el uso de la melatonina, principalmente cuando el problema más importante reside en la conciliación del sueño. Suele ser menos eficaz cuando el trastorno está en el mantenimiento del sueño con despertares frecuentes. Además de técnicas conductuales, para una buena higiene del sueño se deben descartar otros factores intercurrentes que estén produciendo estos despertares como las apneas del sueño y la epilepsia³⁵.

2.5. Trastornos de conducta

Intentar prevenir posibles problemas de conducta con normas educativas claras y constantes, rutinas estables, anticipar cambios, fomentar autonomía al máximo y trabajar la comunicación. Las conductas de agresividad y/o ansiedad importantes no controladas pueden llegar a requerir psicofármacos.

2.6. Otros problemas médicos

2.6.1. Problemas de alimentación y gastrointestinales

Si el babeo es muy importante pueden llegar a precisar medicamentos como la escopolamina o las inyecciones de toxina botulínica en las glándulas salivales. Una intervención temprana de logopeda para trabajar aspectos de succión/deglución consigue una mejora. Si se sospecha de reflujo gastroesofágico (regurgitaciones, escasa ganancia ponderal, neumonías de repetición) se recomienda derivar a gastroenterología. El reflujo suele responder bien al tratamiento habitual postural, dieta fraccionada, utilización de leches y comidas espesantes, y medicamentos procinéticos y antiácidos.

En adultos deben sospecharse problemas ante un disconfort inexplicable, pérdida de apetito y/ problemas en la alimentación.

El estreñimiento requiere dieta rica en fibra y si es necesario agentes lubricantes.

2.6.2. Hipopigmentación

Cremas de protección solar.

2.6.3. Problemas oftalmológicos

En el estrabismo se requiere valoración en oftalmología que utilizan parches oclusivos y en algunos casos pueden llegar a necesitar cirugía de los músculos extraoculares. Corrección de cualquier déficit visual mediante gafas.

2.6.4. Otitis Media

Si se produce un acúmulo de secreciones

en oído medio pueden cronificarse comprometiendo la audición; en estos casos será necesaria la intervención quirúrgica para colocación de drenajes transtimpánicos.

2.6.5. Problemas respiratorios

Despistaje de la causa de neumonías de repetición como son las aspiraciones durante la alimentación.

Fisioterapia respiratoria en pacientes inmovilizados y/o con escoliosis importantes.

2.6.6. Dentición

Mantener una buena higiene dental para evitar la placa bacteriana y medidas correctoras cuando sean necesarias.

3. Diagnóstico diferencial

En aproximadamente el 10% de los pacientes con un diagnóstico clínico de AS no se encuentra una alteración genética específica del mismo. Se han descrito algunos cuadros similares al AS, pero que clínica y molecularmente constituyen entidades diferentes³⁶.

En general, todos estos cuadros comparten con el AS manifestaciones clínicas inespecíficas: retraso psicomotor o discapacidad intelectual moderada o grave, hipotonía, déficit o ausencia de lenguaje, hipotonía, marcha atáxica, epilepsia, microcefalia y una disposición risueña. Su correcta caracterización permitirá establecer un diagnóstico preciso, dilucidar el pronóstico y ofrecer un adecuado asesoramiento genético.

3.1. Síndrome de Phelan-Mcdermid (MIM 606232)

Se debe a la haploinsuficiencia del gen *SHANK3* localizado en 22q13.3. La hipotonía puede persistir hasta la edad adulta. Los problemas de alimentación durante la infancia, el umbral alto del dolor y la tendencia a la hipertermia son característicos. El crecimiento es normal o rápido. Presentan una barbilla prominente, párpados abotargados (lo que les confiere un aspecto somnoliento) con pestañas largas, orejas y manos grandes, y uñas de los pies displásicas. Las convulsiones afectan al 25% de los pacientes. Los rasgos de trastorno del espectro autista (TEA) son más acusados con la edad^{37,38}.

3.2. Síndrome de Koolen-de Vries (MIM 610443)

Deleciones en 17q21.31 y mutaciones heterocigotas en el gen *KANSL1*, causan el fenotipo clínico. Es similar al AS por el retraso importante del lenguaje y del habla y, por la conducta risueña. Sin embargo la DI suele ser leve o moderada. Los rasgos faciales que contribuyen a su diferenciación son: macrocefalia relativa, forma alargada de la cara, punta de la nariz bulbosa, fisuras palpebrales ascendentes, ptosis o blefarofimosis. Puede asociar anomalías congénitas (cardiopatía, criptorquidia) y alteraciones de la pigmentación³⁹⁻⁴².

3.3. Síndrome de haploinsuficiencia *MBD5* (MIN 156200)

La haploinsuficiencia del gen *MBD5* en 2q23.1 da lugar a una DI moderada o grave, retraso o ausencia de lenguaje, marcha atáxica, trastorno del ritmo del sueño, movimientos estereotipados, epilepsia y ataques de risa inapropiados (20%). No está establecido un patrón distintivo de rasgos faciales. Se acompaña de anomalías esqueléticas menores en manos y pies (braquidactilia, dedos afilados)^{43,44}.

3.4. Síndrome de Kleefstra (MIM 610253)

Causado por la haploinsuficiencia del gen *EHMT1* en 9q34.3. Presentan hipotonía y, una tercera parte, epilepsia. Rasgos característicos: hipoplasia mediofacial, prognatismo, cejas arqueadas, sinofridia, eversión del labio inferior y tendencia a la obesidad. Asocia anomalías genitales en los varones (micropene, criptorquidia), cardiopatía congénita o arritmias y desarrollo de trastornos psiquiátricos (agresividad, psicosis, apatía/catatonia, autismo). Puede ocurrir regresión en la adolescencia o en la edad adulta⁴⁵⁻⁴⁷.

3.5. Síndrome de Pitt-Hopkins (MIM 610954)

Se debe a alteraciones del gen *TCF4* en 18q21.2. El fenotipo facial es característico: protusión de la parte inferior de la cara, ojos hundidos, mejillas llenas, puente nasal ancho,

punta nasal prominente, *filtrum* corto, boca ancha, labios gruesos, dientes separados, y pabellones auriculares carnosos y en copa. Es habitual la microcefalia postnatal y, la coexistencia de anomalías oculares (estrabismo, miopía) y cerebrales inespecíficas (hipoplasia del cuerpo calloso). El lenguaje es escaso o ausente y el fenotipo conductual puede ser similar al del AS. Los episodios de hiperventilación y apnea no son constantes y ocurren más frecuentemente en mayores de 6 años⁴⁸⁻⁵⁰.

3.6. Síndrome de Mowat-Wilson (MIM 235730)

Debido a la haploinsuficiencia y a mutaciones puntuales en el exón 8 del gen *ZEB2* en 2q22.3. Cursa con DI moderada o grave, ausencia de lenguaje, anomalías congénitas múltiples y rasgos dismórficos. Asocia microcefalia postnatal, cardiopatía, anomalías del cuerpo calloso, genitourinarias, oftalmológicas, atresia de coanas o talla baja. El 50% padece enfermedad de Hirschsprung. Los rasgos faciales distintivos son: cejas grandes despobladas en la región medial y pabellones auriculares levantados con una depresión central similar a la pasta *orecchiette* o a los eritrocitos. Además, presentan cara cuadrada o alargada, hipertelorismo, ojos grandes hundidos, columela prominente, punta nasal redonda, perfil nasal convexo y barbilla puntiaguda con tendencia al prognatismo. Las convulsiones aparecen más frecuentemente hacia los dos años⁵¹⁻⁵³.

3.7. Síndrome de Christianson (MIM 300243)

Causado por mutaciones en el gen *SLC9A6* en Xq26.3. Los varones afectados presentan DI grave, microcefalia postnatal, ausencia de lenguaje y episodios espontáneos de risa. La epilepsia debuta entre los 4 meses y los 3 años. Puede asociarse a oftalmoplegia externa. Son frecuentes el estrabismo, la tendencia a mantener la boca abierta y el babeo excesivo. La atrofia cerebelosa, la pérdida de funciones motoras a partir de la de la primera década de vida, la pérdida de masa muscular y las deformidades espinales, son rasgos claramente diferenciadores con el AS^{54,55}.

3.8. Síndrome de Rett y cuadros relacionados

Se incluyen los cuadros clínicos derivados de alteraciones de los genes *MECP2*, *FOXG1* y *CDKL5*⁵⁶⁻⁶⁰.

3.8.1. Síndrome de Rett típico y atípico (MIM 312750)

El síndrome de Rett típico se debe a mutaciones heterocigotas en el gen *MECP2* en Xq28. Ocurre un periodo de regresión seguido por otro de recuperación/estabilización, y los siguientes criterios: (1) Pérdida parcial o completa del lenguaje verbal; (2) Pérdida parcial o completa del uso propositivo de las manos; (3) Marcha dispráxica; (4) Estereotipias o automatismo de manos (lavado, frotarse, apretarse). La deceleración postnatal del crecimiento del perímetro craneal es muy frecuente, pero no imprescindible.

Las formas atípicas se caracterizan por el periodo de regresión, dos cualesquiera de los criterios previos y 5/11 criterios de soporte: anomalías de la ventilación en vigilia, bruxismo en vigilia, cifo y/o escoliosis, manos y pies fríos, respuesta disminuida al dolor, comunicación ocular intensa, alteración del ritmo del sueño, retraso de crecimiento, anomalías vasomotoras periféricas, tono muscular anormal, risa inapropiada o episodios de gritos. Se pueden deber a mutaciones en *MECP2*, *FOXG1* o *CDKL5*.

La epilepsia está presente en el 60% de los pacientes.

3.8.2. Síndrome *CDKL5* (MIM 300672)

Mutaciones y deleciones del gen *CDKL5* en Xp22.13 causan en mujeres, y con mayor gravedad en varones, una encefalopatía epiléptica de inicio en los primeros 4 meses de vida. La mitad puede experimentar una remisión hacia los 3 años. Otros presentan una epilepsia intratable. No existe un periodo de regresión, ni presentan un contacto ocular intenso ni fenómenos vasomotores.

3.8.3. Síndrome de haploinsuficiencia *FOXG1* (MIM 613454)

Las anomalías heterocigotas en el gen *FOXG1* en 14q12 cursan con DI grave, ausencia de lenguaje, microcefalia postnatal, retraso del crecimiento y crisis epilépticas. Prácticamente ningún individuo desarrolla la deambulación. Puede asociarse a anomalías cerebrales.

3.8.4. Síndrome de duplicación *MECP2* (MIM 300260)

La duplicación del gen *MECP2* en varones puede causar hipotonía, DI grave, ausencia de lenguaje, marcha atáxica, espasticidad progresiva de las piernas y posterior pérdida de la deambulación, regresión e infecciones respiratorias. Frecuentemente las convulsiones son de origen tardío. Las mujeres portadoras pueden ser asintomáticas o presentar DI.

3.9. Síndrome *MEF2C* (MIM 613443)

La haploinsuficiencia del gen *MEF2C*, en 5q14.3, causa un cuadro clínico muy similar al síndrome de Rett debido a que dicho gen está en la misma ruta de síntesis proteica que *MECP2* y *CDKL5*. Las anomalías cerebrales (agenesia del cuerpo calloso) son frecuentes^{61,62}.

3.10. Deficiencia de adenilosuccinato liasa (MIM 103050)

Es un defecto del metabolismo de las purinas de herencia autosómica recesiva causado por mutaciones en el gen *ADSL* en 22q13.1. La forma clínica más frecuente es la grave, caracterizada por retraso psicomotor, microcefalia, convulsiones de inicio precoz y ausencia de contacto ocular. Las formas leves-moderadas pueden presentar una clínica con características similares al AS. La epilepsia es comúnmente resistente al tratamiento. La hipotonía axial y generalizada se combina con una hipertensión periférica.

Puede asociar atrofia cortical, del cuerpo

calloso o vermix cerebeloso, anomalías de la sustancia blanca que recuerdan a la leucomalacia periventricular y lisencefalia^{63,64}.

3.11. Síndrome de alfa talasemia / discapacidad intelectual ligada al cromosoma X (MIM 301040)

Se debe a mutaciones del gen *ATRX* en Xq21.1. Las mujeres portadoras son física e intelectualmente asintomáticas. Los varones presentan DI grave o profunda, microcefalia, hipotonía y trastorno del comportamiento. Los rasgos faciales característicos son: hipoplasia mediofacial, epicanto, puente nasal plano, nariz pequeña y triangular, boca caracterizada por el labio superior en tienda, labio inferior lleno y evertido, y protusión de la lengua. La mayoría asocia anomalías genitales (criptorquidia, hipospadias o genitales ambiguos) y esqueléticas (pies planos o equinos, cifo y/o escoliosis, anomalías de pared torácica). Un tercio presenta epilepsia. En algunos individuos afectos, se pueden encontrar inclusiones de hemoglobina H en un frotis de sangre periférica^{65,66}.

3.12. Síndrome de deficiencia *HERC2*

Descrito en la población Amish. Mutaciones en homocigosis del gen *HERC2* en 15q13.1, causan un defecto en la actividad del gen *UBE3A*

ocasionando un cuadro similar al AS, aunque la DI puede ser leve^{67,68}.

4. Alteraciones genéticas asociadas

Desde 1997 el AS^{69,70} se considera una enfermedad monogénica causada por anomalías genéticas que afectan a la copia materna del gen *UBE3A*. El gen *UBE3A* pertenece a un *cluster* de genes regulado por impronta genómica, localizado en la región cromosómica 15q11-q13.

4.1. Región cromosómica 15q11-q13

La región cromosómica 15q11-q13 está flanqueada por duplicones, segmentos repetitivos que originan deleciones mediante puntos de rotura (BP: *break points*). Se conocen tres BP principales, dos más próximos a centrómero, BP1 y BP2, y uno distal BP3⁷¹⁻⁷⁴. Se han descrito BP secundarios en posición más telomérica a BP3, denominados BP4, BP5 y BP6⁷⁵.

En la región cromosómica 15q11-q13, entre BP2 y BP3, se encuentra un dominio de 4 Mb regulado por impronta que contiene cinco genes de expresión paterna, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2* (expresión paterna en tejido cerebral) y *SNURF-SNRPN*, y dos genes de expresión materna, el gen *UBE3A* y el gen *ATP10A* (Figura 3A). La expresión monoalélica de *UBE3A* es específica de algunas regiones del cerebro y cerebelo y es bialélica en el resto de tejidos (Figura 3B). La región 15q11-q13 también incluye genes de expresión bialélica, no

sometidos a impronta. En posición más telomérica se encuentran el gen *OCA2* (gen del albinismo oculocutáneo tipo II) y subunidades de los receptores del ácido gammaaminobutírico (GABA) (*GABRB3*, *GABRA5* y *GABRG3*). En posición más centromérica, entre BP1 y BP2, se encuentran los genes *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* y *GCP5* (Figuras 3A y 3B).

El locus *SNURF-SNRPN* (*Upstream Reading Frame-Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*) es policistrónico⁷⁶. Contiene múltiples copias de snoRNAs codificadas en regiones intrónicas de esta compleja unidad de transcripción. Diferentes transcritos alternativos del locus *SNURF-SNRPN* son predominantes en el cerebro y se solapan a *UBE3A* con una orientación antisentido. A diferencia de los genes de expresión paterna y del gen *ATP10A* de expresión materna, la expresión materno-específica de *UBE3A* en el cerebro no se regula mediante metilación del DNA. El silenciamiento de la copia paterna de *UBE3A* en el cerebro es consecuencia de la expresión del transcrito más largo de *SNURF-SNRPN* en una orientación antisentido⁷⁷⁻⁸² (Figura 3A).

4.2. Gen *UBE3A*

El gen *UBE3A*, localizado en la región 15q11-q13, codifica la proteína E6-AP (*Human Papillomavirus E6-Associated Protein*), de 865 aminoácidos y con un peso molecular de 100 kD. La proteína E6-AP es una E3 ubiquitin-proteína ligasa, miembro de la familia proteica que presenta 350 aminoácidos

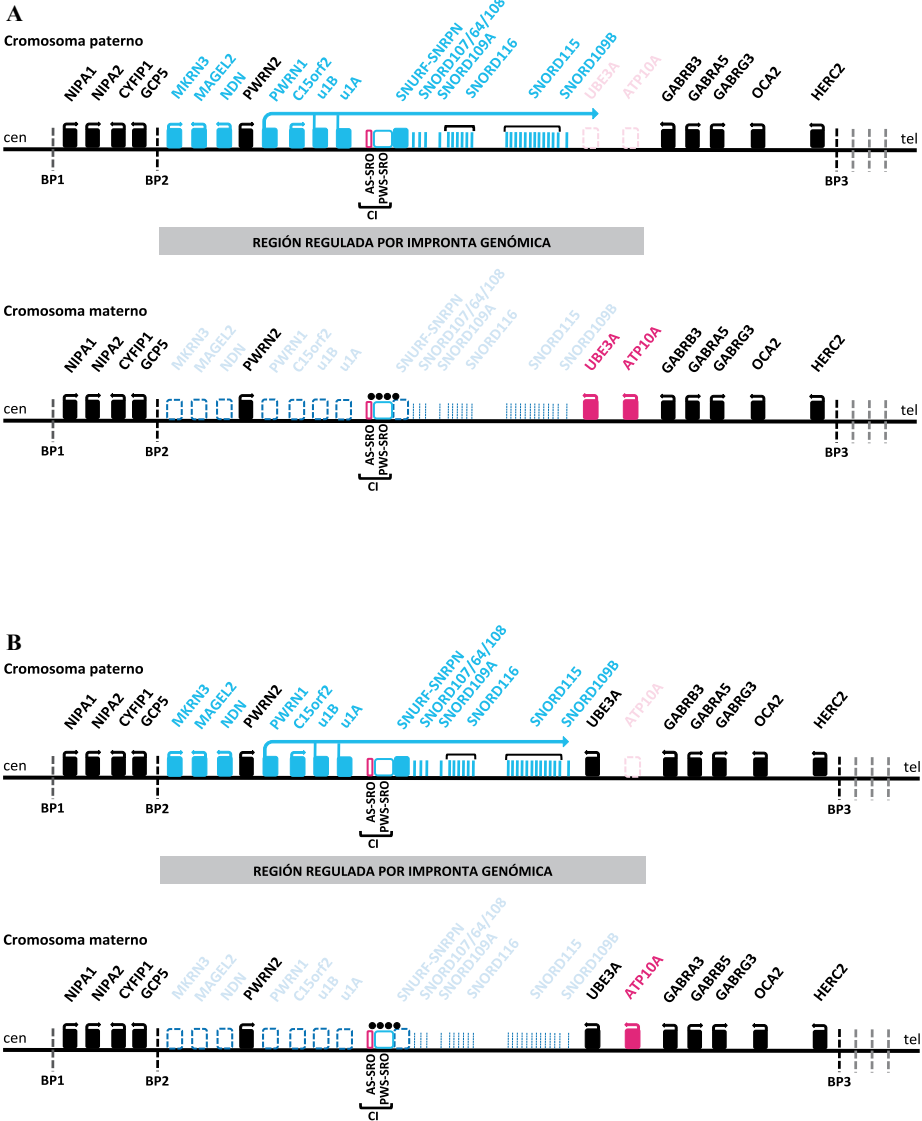


Figura 3: Esquema de la región cromosómica 15q11-q13 y patrón de expresión de los genes contenidos en esta región en determinadas regiones del cerebro y cerebelo (**A**) y en el resto de tejidos (**B**). Se representan el cromosoma 15 paterno (parte superior de la figura) y el cromosoma 15 materno (parte inferior de la figura) y se indica la región de 4Mb regulada por impronta genómica. Las dos regiones *AS-SRO* y *PWS-SRO* que constituyen el IC se indican en recuadros blancos enmarcados con línea rosa y azul, respectivamente. Recuadros azul: genes de expresión paterna; recuadros rosas: genes de expresión materna; recuadros negros: genes de expresión bialélica; líneas verticales en azul: snoRNAs contenidos en el transcrito *SNURF-SNRPN*; flechas horizontales: orientación de la transcripción; en blanco enmarcados con líneas discontinuas atenuadas: genes no expresados en uno u otro cromosoma; líneas discontinuas verticales en azul: snoRNAs no expresados en el cromosoma materno; líneas negras verticales discontinuas: *BPs* más frecuentes; líneas grises verticales discontinuas: *BPs* menos frecuentes. Círculos negros: metilación del DNA.

en su extremo C-terminal, formando el denominado dominio hect (*Homologous to the E6-AP carboxyl terminus*)⁸³. En la vía de degradación proteica dependiente de ubiquitina intervienen tres enzimas: los enzimas E1 activadores de ubiquitina, los E2 conjugadores de ubiquitina y los E3 ubiquitin-protein ligasas. Esta vía es utilizada por la célula para la degradación proteica de sustratos específicos. Los enzimas E3 con dominio hect son importantes para el reconocimiento del sustrato y transferencia de ubiquitina del complejo E2-ubiquitina al sustrato⁸³⁻⁸⁵. La acumulación de algunas proteínas diana de E6-AP se ha propuesto como una causa potencial para el AS de etiología desconocida⁸⁶. Éste podría ser el caso de p53, p27, Pbl/ECT2, alfa-sinucleinas, Arc, ephexin-5 y Rpn10, que son sustratos de E6-AP en el cerebro y están implicados en procesos relevantes, tales como el crecimiento neuronal, la migración en la corteza, el control de los niveles de superficie de los receptores del ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), control del número de sinapsis excitatorias y la densidad de las espinas dendríticas⁸⁷. Recientemente, Rpn10 se ha sugerido como el principal sustrato para la degradación a través de la ubiquitinización mediada por E6-AP⁸⁸. En el año 1999 fue descrita una segunda función, independiente de esta primera, como coactivador de receptores hormonales nucleares⁸⁹, estando E6-AP también involucrada en la transcripción de hormonas esteroideas como receptores de glucocorticoides. Al ser interrumpidas las vías de señalización de estos receptores, el eje hipotálamo-

hipófisis-suprarrenal se altera, lo que resulta en una mayor susceptibilidad al estrés y la ansiedad⁹⁰ y en deterioro cognitivo en modelos de ratón de AS⁹¹. El conocimiento de proteínas con las que E6-AP forma complejo, de genes diana que son activados por el mismo y de proteínas diana de la función ubiquitin ligasa de E6-AP, desvelan un importante papel de esta proteína en la fisiología del sistema nervioso central⁹².

La estructura genética del gen *UBE3A* actualmente conocida, fue descrita por Kishino y Wagstaff en 1998⁹³, así como la de dos pseudogenes, *UBE3AP1* y *UBE3AP2*, localizados en los cromosomas 2 y 21, respectivamente. El gen *UBE3A* está constituido por 16 exones, y los exones 1-6 forman parte de la región 5'-no traducida. En el marco abierto de lectura (*Open Reading Frame; ORF*) de E6-AP (Isoforma I) el exón 7 aporta únicamente sus dos últimos nucleótidos (AT) al codón de inicio (AUG), el cual se completa al realizar el *splicing* entre los exones 7 y 8.

4.3. El centro regulador de la impronta (IC) en 15q11-q13

El IC de la región cromosómica 15q11-q13 presenta dos regiones críticas necesarias para el cambio de impronta en la línea germinal. La primera, llamada *Prader-Willi Syndrome-Smallest Region of deletion Overlap* (PWS-SRO), incluye la región promotora y el exón 1 del gen *SNURF-SNRPN* y se ha definido por el solapamiento de deleciones presentes en las familias Síndrome

de Prader-Willi (PWS). La segunda, llamada *Angelman Syndrome-Smallest Region of deletion Overlap* (AS-SRO) es la región común delecionada en las familias AS⁹⁴⁻⁹⁶ (Figuras 3A y 3B). En el cromosoma 15 materno, la región cromosómica 15q11-q13 está metilada causando la inactivación de los genes de expresión paterna y permitiendo la expresión de *UBE3A*. En el cromosoma paterno la expresión del largo transcrito *SNURF-SNRPN* impide la transcripción de *UBE3A* en el cerebro^{77,78,82} (Figura 3A). El gen *ATP10A* se consideró un posible candidato a causar el AS ya que presenta un patrón de expresión similar a *UBE3A*, pero hasta la actualidad no se han encontrado evidencias de esta posible relación^{97,98}.

4.4. Mecanismos moleculares

El 90% de los casos son causados por cuatro mecanismos principales: deleción de la región 15q11-q13, mutaciones puntuales en el gen *UBE3A*, disomía uniparental paterna del cromosoma 15 [UPD(15)pat] y defecto en la impronta. En una baja frecuencia las reorganizaciones cromosómicas afectan a la región 15q11-q13. El AS también puede estar causado por deleciones totales o parciales del gen *UBE3A*⁹⁹⁻¹⁰². En un 10% de casos con diagnóstico clínico de AS, no se han identificado ninguna de las causas genéticas conocidas. En estos casos se recomiendan revisiones clínicas dado que existen diferentes patologías que se manifiestan con fenotipos similares al AS descritos (ver apartado 3).

* **Deleción de la región 15q11-q13** (Figura 4A); es la causa más frecuente encontrándose en el 70%-75% de los pacientes. El 90% de estas deleciones se originan por recombinación homóloga desigual entre uno de los puntos de rotura proximales BP1 o BP2 y el más distal BP3^{71,72}. Concretamente el 50% de estas deleciones se dan entre BP2 y BP3 (deleción tipo II) y el 40% se dan entre BP1 y BP3 (deleción tipo I). Menos del 10% de las deleciones ocurren entre los puntos BP1/BP2 y los puntos más distales BP4, BP5 y BP6⁷⁵.

* **Mutación en la copia materna del gen *UBE3A*** (Figura 4B); es la segunda causa más frecuente (10%) del AS y puede ser *de novo* o familiar. La **deleción total o parcial del gen *UBE3A*** (Figura 4C) es causa del AS, aunque aparece con muy baja frecuencia, menos del 5%⁹⁹⁻¹⁰². Las técnicas de análisis de secuencia no cuantitativas utilizadas para estudiar la presencia de variaciones nucleotídicas en el gen *UBE3A*, no permiten identificar la deleción total o parcial del gen, por lo que su frecuencia puede estar infravalorada.

* **UPD(15)pat** (Figura 4D); su frecuencia es baja (2-5% de los casos) y son mayoritariamente isodisomías. Dado que la no disyunción en meiosis masculina es un fenómeno raro, éstas se originan, probablemente, por una no-disyunción materna seguida de una duplicación postzigótica del cromosoma 15 paterno^{103,104}.

* **Defecto de impronta de la región 15q11-q13** (Figuras 4E y 4F); ocurre con una frecuencia baja,

similar a pat15UPD. En este caso los cromosomas de origen materno y paterno están presentes, pero se ha establecido una impronta incorrecta (Figura 4E). La mayoría de los defectos de impronta (85%) son por errores epigenéticos, considerados esporádicos. En un 27% de los casos, estos errores epigenéticos en el cromosoma materno pueden ser postzigóticos y presentarse en mosaico¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. El 15% de los casos AS causados por un defecto de impronta se originan por deleciones de la región *AS-SRO* (Figura 4F). Estos últimos mayoritariamente son familiares, con un riesgo de recurrencia del 50%¹⁰⁵.

* Con una incidencia muy baja (<1%) la causa puede ser una **reorganización cromosómica que afecte a la región 15q11-q13** alterando el patrón de la impronta.

A pesar de que el defecto de impronta de la región 15q11-q13 sea una causa de AS de muy baja frecuencia, en el año 2002, Cox y colaboradores¹⁰⁹ describieron dos casos de AS concebidos por técnicas de reproducción asistida causados por un defecto de impronta. Un año más tarde, se describió otro caso más de AS causado por un defecto de impronta también concebido con reproducción

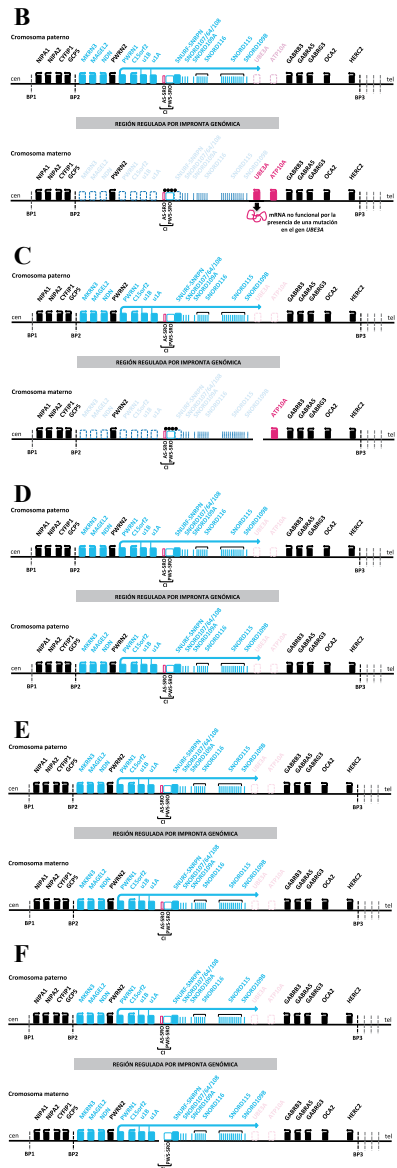
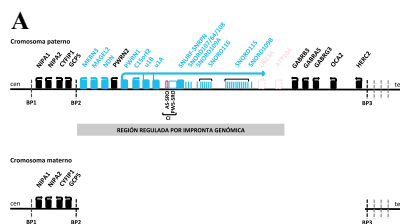


Figura 4: Esquema de las causas genéticas del AS. Delección 15q11-q13 en el cromosoma 15 materno (A); Mutación en el gen *UBE3A* en el cromosoma materno (B); Delección total o parcial del gen *UBE3A* en el cromosoma materno (C); Disomía paterna del cromosoma 15 (D); Defecto de impronta por anomalía epigenética (ausencia de metilación) en el cromosoma 15 materno (E); Defecto de impronta por delección del *AS-SRO* en el cromosoma 15 materno (F).

asistida¹¹⁰. Los procesos de estimulación ovárica^{111,112}, maduración *in vitro* de ovocitos¹¹¹ o el cultivo *in vitro* de embriones^{113,114} podrían interferir en la impronta genómica. Este conocimiento apunta a un moderado incremento en el riesgo del desarrollo de síndromes relacionados con anomalías en la impronta genómica en la población de niños concebidos mediante reproducción asistida. Además, a partir de datos epidemiológicos obtenidos de madres de pacientes con AS, se ha demostrado una correlación entre infertilidad y la presencia de defecto de impronta en la descendencia¹¹⁵.

5. Estudios moleculares

Conocer la causa genética del AS es imprescindible para orientar un pronóstico clínico y poder ofrecer un consejo genético.

Anterior al conocimiento del gen causante del AS, en el año 1996, la *American Society of Human Genetics (ASHG)*, conjuntamente con el *American College of Medical Genetics (ACMG)*, propusieron las aproximaciones necesarias para el diagnóstico del AS y del PWS¹¹⁶. Este algoritmo inicialmente propuesto se ha completado teniendo en cuenta el conocimiento actual de las posibles causas del AS y el desarrollo y mejora de las técnicas moleculares. Frente a la sospecha clínica del AS y teniendo en cuenta la frecuencia de las diferentes causas genéticas, es recomendable iniciar el estudio molecular analizando la metilación del DNA del IC de la región cromosómica 15q11-q13. El estudio del cariotipo del

paciente permitirá identificar posibles reorganizaciones cromosómicas que afecten a la región crítica 15q11-q13.

- Los **estudios de metilación del DNA** permiten valorar el patrón de metilación en la región IC. El exón1/región promotora de *SNURF-SNRPN* presenta una isla CpG diferencialmente metilada; no metilada en el alelo paterno y metilada en el alelo materno (ver Figura 3A y 3B). El patrón de metilación característico del AS se identifica por la ausencia del alelo metilado (materno) y presencia del alelo no metilado (paterno). Con ello se identifican el 80% de los casos AS, aquellos causados por una delección de la región 15q11-q13, por una UPD(15)pat o por un defecto de impronta (ver Figuras 4A y 4C-F). La aplicación de técnicas complementarias permite diferenciar entre estas etiologías.

Como se menciona en el capítulo 1 de estas guías, los estudios de metilación del DNA se basan en la aplicación de la técnica de MLPA específica de metilación, *Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA)*[®] o bien en la amplificación por PCR específica de metilación, *Methylation Specific-PCR (MS-PCR)*.

* La **metodología MS-MLPA**[®] es de gran utilidad porque analiza varias causas genéticas con una única metodología. Permite la identificación de la metilación del IC a la vez que detecta la

variación en número de copias de *loci* de la región cromosómica 15q11-q13, cubriendo desde el gen *NIPA* hasta *APAB7*, de manera semicuantitativa^{117,118}. El *kit* comercial ME028 de *MRC Holland*, contiene 32 sondas específicas de la región crítica 15q11-q13 y 14 sondas control de fuera de 15q11-q13 (cromosoma 15 y otros cromosomas). Además, algunas de las sondas internas se diseñan complementarias a la región *AS-SRO* del IC para poder cuantificar la dosis génica e identificar posibles deleciones que afecten únicamente a la región *AS-SRO* del IC. Con esta estrategia, es posible identificar la presencia de metilación en solo un alelo (50%; patrón normal), presencia de metilación en los dos alelos (100%; patrón de metilación característico del PWS) o ausencia de metilación (0%; patrón de metilación característico del AS).

Con un patrón de metilación característico de AS y la presencia de la mitad del número de copias en los *loci* de la región 15q11-q13, es posible concluir que la deleción es la causa del AS, diferenciándose la tipo I, II o deleción atípica. La ausencia de metilación junto a un resultado compatible con la presencia de deleción en la región *AS-SRO* y una dosis normal en el resto de *loci* internos de la región 15q11-q13, permite concluir que el AS está causado por un

defecto de impronta resultante de deleción en el IC. Si se obtiene un resultado normal en cuanto al número de copias de todos los *loci* de la región 15q11-q13 y un patrón de metilación AS, debe realizarse un estudio de microsátélites para diferenciar el AS causado por una UPD(15)pat de un defecto de impronta por un error epigenético de novo (Figura 5). Al tratarse de una técnica cuantitativa, la *MS-MLPA*[®] permite la identificación del defecto de impronta en mosaico.

* En el estudio del patrón de metilación con la metodología *MS-PCR*, la presencia de una banda de amplificación específica del alelo paterno no metilado y ausencia de la banda de amplificación correspondiente al materno metilado, indica que el paciente es afecto de AS causado por deleción de la región cromosómica 15q11-q13, o por UPD(15)pat o bien por un defecto de impronta. Para poder discernir la causa es necesario realizar estudios complementarios. La sensibilidad de detección de ambos alelos es importante para poder detectar un defecto de impronta en mosaico con un diseño adecuado de oligonucleótidos¹¹⁹.

- La técnica de **FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)** con sondas específicas de la región, permite identificar la deleción de la región 15q11-q13.

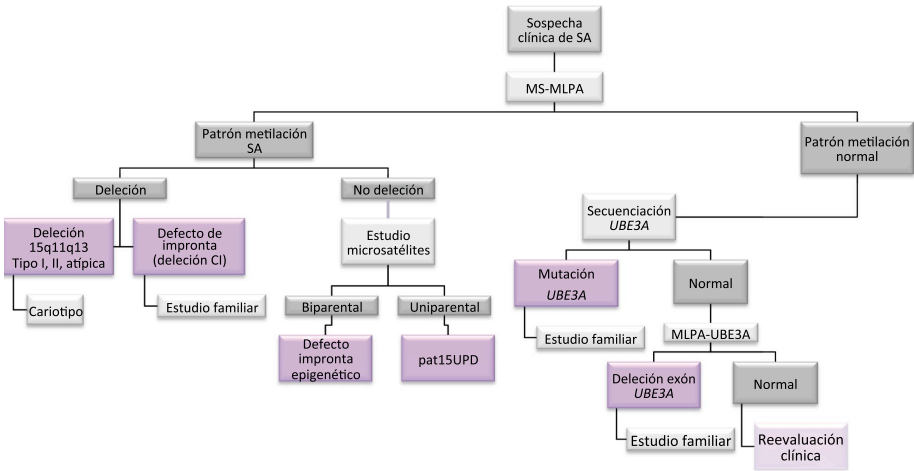


Figura 5: Algoritmo diagnóstico del AS mediante MS-MLPA como técnica de elección para el análisis del patrón de metilación y de delecciones. El algoritmo se completa mediante el estudio de microsatélites o el análisis de la secuencia del gen *UBE3A*.

- En la actualidad la técnica de **microarray de hibridación genómica comparada (aCGH)**, utilizada en genética clínica para el análisis de variantes de número de copias (delecciones y duplicaciones), permite diagnosticar los distintos tipos de delección tanto las comunes como las atípicas y conocer su tamaño.
- El **estudio de microsatélites** permite diferenciar entre la UPD(15)pat (herencia uniparental) o un defecto de impronta (herencia biparental). Los **microarrays de alta densidad con polimorfismos de nucleótido único (SNP)** pueden proporcionar información sobre la presencia de UPD además de informar sobre las delecciones.
- Si con el estudio de microsatélites se ha observado herencia biparental, y por tanto indicativo del defecto de impronta como causa genética del AS, y previamente se ha utilizado la técnica de *MS-PCR*, es importante realizar un **estudio cuantitativo de la región AS-SRO del IC** que permita identificar una posible delección del *AS-SRO* como origen del defecto de impronta o descartarlo y concluir que la causa del AS es un defecto de impronta epigenético esporádico.
- El **estudio del gen *UBE3A*** se realizará en caso de obtenerse un patrón de metilación normal (presencia del alelo metilado/

materno y no metilado/paterno). Debido a la estructura genómica del gen *UBE3A* y a la presencia de pseudogenes de elevada homología, en el estudio de la secuencia del gen *UBE3A* se analiza el *ORF* del gen utilizando oligonucleótidos específicos de regiones intrónicas con las que los pseudogenes no comparten homología. En caso de no identificarse una mutación que permita el diagnóstico y ante una clínica muy consistente del AS debe plantearse complementar el estudio cuantitativo por MLPA® del gen para identificar posibles deleciones totales o parciales de *UBE3A* como causa genética (kit P336 de *MRC Holland*).

Por último, en el 10% de casos con diagnóstico clínico de AS, que no se identifique ninguna de las causas genéticas conocidas, estaría indicado analizar el cariotipo molecular (aCGH) y un estudio de mutaciones del panel de genes asociados con fenotipos similares al AS descritos (ver apartado 3).

6. Posibles terapias moleculares

En la actualidad y al igual que sucede en la mayoría de síndromes de causa genética, no existe un tratamiento curativo para el AS. Los tratamientos actuales se centran en terapias que permiten tratar los síntomas sin poder erradicar la causa que puede conllevar a

revertir el fenotipo anómalo.

Sin embargo, los avances en biomedicina y, en concreto en la terapia molecular, pueden cambiar las perspectivas para el tratamiento del AS dadas las características genéticas del síndrome. En concreto, el hecho de que exista un gen diana (el gen *UBE3A*) y que además está presente una copia o alelo del gen potencialmente funcional, hacen del AS un firme candidato a la posible aplicación de terapias moleculares.

Ante una terapia molecular para estos pacientes se deben tener en cuenta dos premisas importantes: 1) conseguir un tratamiento muy dirigido y específico que actúe sobre el gen *UBE3A* y no sobre otros genes del genoma y 2) debe superarse la barrera hematoencefálica y acceder al cerebro, principal órgano diana. Además también es necesario que presente una baja toxicidad y no sea un tratamiento invasivo.

Como se ha indicado previamente, el AS está causado por la ausencia o la no funcionalidad de la proteína E6AP, codificada por el gen *UBE3A*, en el cerebro, donde este gen es únicamente funcional a partir del alelo materno. Las anomalías genéticas del gen *UBE3A* que afectan su expresión causan el fenotipo AS. Sin embargo, el paradigma de que la copia paterna del gen *UBE3A* está intacta aunque inactiva, abre la posibilidad de un tratamiento molecular basado en conseguir activar la copia paterna del gen en el cerebro¹²⁰. El mecanismo molecular por el cual se produce la inactivación del gen *UBE3A* es a través de la expresión del transcrito no codificante del locus *SNURF-SNRPN*

(*long non-coding RNA*) que tiene una dirección antisentido y solapante al gen *UBE3A* a cuya función se le denomina *UBE3A antisense transcript (UBE3A-ATS)*. El bloqueo de la copia paterna del gen *UBE3A* en el cerebro, incrementa las posibilidades de tratamiento con moléculas que actúen impidiendo la expresión del transcrito *UBE3A-ATS*.

Conseguir un tratamiento eficaz que actúe inhibiendo a *UBE3A-ATS* es el foco actual de grupos de investigación dedicados al desarrollo de posibles terapias del AS. Cabe recordar las múltiples y complejas funciones que tiene la proteína E6-AP, entre ellas la de actuar como enzima E3 ligasa de ubiquitinas^{84,85} de múltiples proteínas celulares que no serían degradadas, y como coactivador transcripcional de receptores hormonales nucleares^{89,92}. Además los enzimas E3 ligasa de ubiquitina también participan en la monoubiquitinización asociada a la señalización celular, y adicionalmente se atribuyó su posible papel en la sinapsis neuronal y en la potenciación a largo plazo en el hipocampo¹²¹⁻¹²³.

Es difícil el desarrollo de tratamientos que actúen sobre las dianas de E6-AP y en la actualidad solo se conoce un ensayo clínico dirigido a mejorar el sistema serotoninérgico afectado en el AS, mediante el tratamiento con levodopa, transportador de la dopamina. Este tratamiento se había utilizado para tratar a dos pacientes adultos con AS, los cuales mejoraron respecto al temblor y la rigidez. La levodopa podría normalizar la proteína alfa quinasa II calmodulina (α CaMKII), reduciendo la inhibición de la fosforilación que

se produce por el déficit de E6-AP¹²⁴. Por otro lado, parece que los problemas conductuales también podrían mejorar, pues están relacionados con una señalización anómala de la dopamina, que es dependiente de la proteína α CaMKII^{125,126}.

Algunos ensayos han utilizado fármacos que actúan modulando la expresión génica, al ser agentes que actúan sobre la metilación del DNA (5-azacitidina) y sobre determinadas modificaciones de las proteínas histonas (inhibidor de las deacetilasas de histonas), o el inhibidor de la topoisomerasa (topotecan), que dieron resultados positivos en la activación de *UBE3A* en experimentos realizados en modelo murino AS¹²⁷⁻¹²⁹. Pero estos tratamientos no son específicos y los fármacos actúan y modifican la expresión de múltiples genes del genoma que pueden dar lugar a efectos no deseados.

No solamente se ha de conocer el efecto e importancia de los fármacos sino que se ha de poner énfasis en la administración del tratamiento y su liberación en el cerebro. Las inyecciones intracraneales pueden tener efecto sobre regiones muy discretas, además de ser necesarias inyecciones sucesivas para prolongar el efecto del tratamiento. Una solución podría ser el uso de vectores virales portadores del gen *UBE3A*, pero su eficacia depende de su estabilidad y/o inserción en el genoma, mecanismo complejo en células neuronales que no se dividen.

Otra estrategia que se investiga es el uso de proteínas artificiales con actividad de factor de transcripción (*Artificial*

Transcription Factors; ATFs)^{120,130}. Aunque se considera una estrategia terapéutica prometedora, por haber conseguido conferir especificidad en la activación o inactivación de genes específicos¹³¹, todavía existen limitaciones en su formato de administración.

Finalmente, la estrategia de terapia molecular que despunta más prometedora, dada su eficacia, especificidad, ausencia de efectos adversos y resultados obtenidos tras su administración *in vitro* e *in vivo* en modelo murino de AS, es el uso de oligonucleótidos antisentido (*antisense oligonucleotides; ASOs*). Es decir, el uso de una secuencia específica de oligonucleótidos complementaria al transcrito *long non coding RNA* para silenciar a *UBE3A-ATS* del cromosoma 15 paterno. En este sentido Meng y col.¹³² han publicado recientemente resultados exitosos en la inactivación de *UBE3A-ATS*, obtenidos tras el tratamiento con *ASOs* en ratones AS mediante inyecciones intracraneales. Han observado un restablecimiento parcial de la proteína E6AP en neuronas consiguiendo una mejora de los rasgos cognitivos asociados al AS, pero no logran la recuperación de otras características fenotípicas. El conseguir una completa mejoría del fenotipo podría depender del momento de la administración del tratamiento con *ASOs*, antes del período ventana crítico de desarrollo, de la necesidad de un tratamiento más prolongado que influya en la restructuración de la red neuronal o de un nivel de inducción de la actividad del gen *UBE3A* más elevado.

En resumen, los resultados obtenidos hasta el momento actual en la investigación de un posible tratamiento del AS, así como de otras enfermedades que afectan al Sistema Nervioso Central y de genética similar, apuntan al tratamiento con *ASOs* por ser una terapia bien tolerada, admite la administración en el cerebro, por su distribución en el tejido pos administración y por sus efectos a largo término¹²⁹.

7. Correlación genotipo-fenotipo

Según los distintos mecanismos moleculares las características clínicas difieren en severidad y en frecuencia de presentación. Hay una gradación en la severidad clínica de acuerdo con su genotipo, siendo de mayor a menor gravedad los casos con delección, etiología desconocida, mutación en *UBE3A*, UPD(15)pat y defecto de impronta, respectivamente¹³³. La edad del diagnóstico es más precoz en los pacientes con delección respecto a los pacientes con mutación en *UBE3A* y UPD(15)pat/defecto de impronta (14 meses vs 24 meses). Los pacientes con delección tienden a ser más bajos y delgados respecto a la población general; estas características suelen ser más marcadas en la delección tipo I, mientras que los pacientes con UPD(15)pat o defecto de impronta tienden a ser más altos y con mayor peso. En el grupo con mutación en *UBE3A* el crecimiento es variable^{5,133}.

La delección respecto a las otras

etiologías moleculares se asocia a un fenotipo más complejo caracterizado por convulsiones graves, más frecuentes y éstas aparecen antes de los tres años, por lo que se requiere más medicación para su control. Los pacientes con deleción cumplen criterios de autismo, tienden a presentar mayor frecuencia de problemas motores, las edades de sedestación y de marcha autónoma suelen verse retrasadas, algunos casos no llegan a andar y en los que andan, la ataxia es frecuente. También hay una ausencia completa del lenguaje verbal, mayor frecuencia de microcefalia y las conductas masticatorias son más comunes respecto al grupo sin deleción^{5,133,134}.

Se ha sugerido que la ausencia de los tres genes que componen las subunidades del receptor aminobutírico (*GABRB3*, *GABRA5*, *GABRG3*), localizados distalmente a *UBE3A*, esté implicada en la génesis de la epilepsia¹³⁵.

La hipopigmentación ocurre con mayor frecuencia en los pacientes con deleción. El gen *OCA2* es responsable del albinismo oculocutáneo II de herencia autosómica recesiva, pero también puede tener un comportamiento semidominante favoreciendo la hipopigmentación en la deleción. Pacientes con mutación en *UBE3A* también pueden presentar hipopigmentación y ello se atribuye a una alteración de la pigmentación debido a una probable regulación del receptor de melanocortina-1^{100,136}.

Hay algunas diferencias fenotípicas entre la deleción tipo I y II siendo más grave en la deleción de mayor longitud

(tipo I). Se asocia a características más graves del trastorno del espectro autista y mayor aversión a estímulos sensoriales. Sin embargo en las habilidades cognitivas y en la conducta adaptativa no hay diferencias entre las dos clases de deleciones^{137,138}. Hay cuatro genes, *NIPA1*, *NIPA2*, *CYFIP1* y *GCP5* que están ausentes en la deleción tipo I y que pueden ser responsables de estas diferencias. En particular *CYFIP1* es el gen más relevante por codificar para una diana de la proteína FMR1 del retraso mental X frágil, asociado a TEA¹³⁹.

Pacientes con mutación en *UBE3A* alcanzan una puntuación más alta en los test cognitivos, en las habilidades motoras fina y gruesa y en el lenguaje receptivo respecto a la deleción. Pueden llegar a utilizar unas 20 palabras. También suelen tener mayor facilidad para desarrollar sistemas de comunicación alternativos, como el lenguaje de signos¹⁴⁰. Sin embargo, en niños menores de cinco años no se encuentran diferencias en las habilidades del lenguaje respecto a los distintos mecanismos moleculares¹⁴¹.

Los síntomas en los pacientes con UPD(15)pat y defecto de impronta son más moderados y con un fenotipo más atípico respecto a las otras etiologías. Un 46% de los niños muestran un aumento del índice de masa corporal⁵. A partir del primer año de vida puede manifestarse una conducta hiperfágica, que es más moderada que en el PWS. La sobreexpresión de los genes paternos *SNURF-SNRPN* subyace en el origen de la obesidad temprana^{5,140,142}. En el defecto de impronta en mosaico

el fenotipo es el más moderado de todos los distintos tipos de alteración molecular^{143,144}.

8. Asesoramiento genético

Para poder ofrecer un correcto asesoramiento genético, se debe determinar el mecanismo que ha ocasionado el AS en el paciente (Figura 6).

* En la **delección** 15q11-q13 el riesgo de recurrencia es muy bajo, inferior al 1%¹⁴⁵. Sin embargo, se recomienda el cariotipo para descartar una reorganización cromosómica aunque sea extremadamente rara (<1%). Cuando la madre sea portadora de una reorganización equilibrada, el riesgo de recurrencia se estima del 5%-50%, en función de la reorganización.

* En el caso de la **UPD(15)pat** el riesgo de recurrencia es bajo, inferior al 1%¹⁴⁶.

Sin embargo, se recomienda el cariotipo para descartar una translocación robertsoniana heredada del padre en los casos de isodisomía. El riesgo de recurrencia sería del 100%.

* La mayoría de casos con **defecto de impronta epigenético** y aproximadamente el 70% **con mutación en UBE3A** son esporádicos, siendo el riesgo de recurrencia muy bajo, inferior al 1%. Aproximadamente el 10-15% de los pacientes con delección del IC y en el 29% con mutación en el gen *UBE3A* son familiares¹⁴⁷. Es necesario realizar un estudio de la madre para determinar si dicha alteración ha sido heredada. En esta situación el riesgo de recurrencia sería del 50%. Si la madre es portadora de la delección en el IC, o de una mutación en el gen *UBE3A*, es necesario estudiar a su padre (abuelo materno del caso índice). Si éste es portador, se debe considerar a los hermanos de la madre posibles portadores. Para las hermanas de la madre portadora también existiría

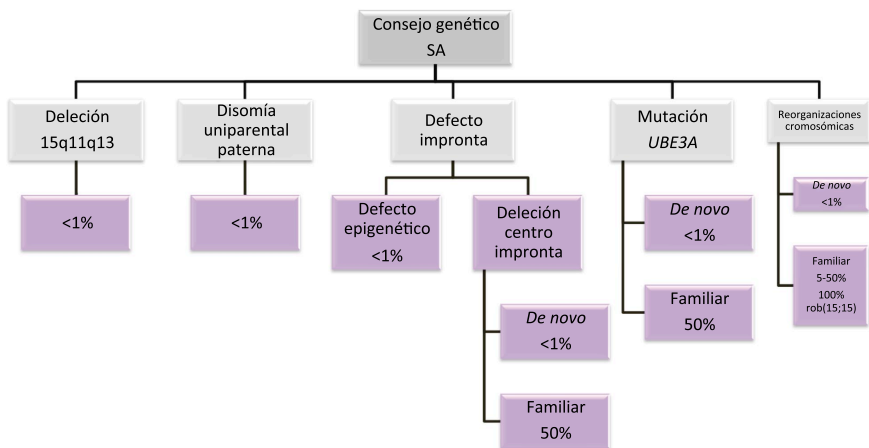


Figura 6: Riesgo de recurrencia en función del mecanismo etiológico del AS.

el mismo riesgo del 50% para la descendencia y para los hermanos, éstos podrían transmitir la alteración a la descendencia, hijos o hijas, en estado de portador sano^{148,149}.

El diagnóstico prenatal se recomienda para posteriores embarazos independientemente de la causa genética y de que el riesgo de recurrencia sea considerado bajo ya que se han descrito casos familiares con delección

o mutación en *UBE3A* sugiriendo la presencia de un mosaicismo germinal en la madre^{148,150-152}. En función de la alteración se realizará el test de metilación o bien un análisis mutacional específico en el gen *UBE3A*, en una muestra de ADN procedente de vellosidad corial (12-13 semanas de gestación) o bien de líquido amniótico (a partir de la 14 semana de gestación).

RESUMEN

El síndrome de Angelman (AS) (MIM 105830) es un trastorno del neurodesarrollo de origen genético caracterizado por una discapacidad intelectual grave, con nulo o mínimo uso del lenguaje, asociado a epilepsia con alteraciones en trazado de electroencefalograma, trastorno del equilibrio y movimiento, y trastorno del sueño. Es característico el fenotipo físico (microcefalia y boca grande) y conductual (sonrisa frecuente, fascinación por el agua, frecuente aleteo, hiperexcitabilidad, y dispersión). La incidencia del AS es alrededor de 1 por cada 15,000 individuos.

El AS es de herencia monogénica causado por anomalías genéticas que afectan a la copia materna del gen *UBE3A*. Este gen pertenece a un *cluster* de genes regulado por impronta genómica de la región cromosómica 15q11-q13. Hay cuatro mecanismos principales que causan el AS: delección de la región 15q11-q13 en la copia materna (70-75%), mutaciones en *UBE3A* (10%), disomía uniparental paterna del cromosoma 15 (2-5%) y defecto en la impronta (2-5%). No se conoce la causa genética en un 10%. El estudio de metilación de *SNURF-SNRPN* y la secuenciación de *UBE3A* permiten el diagnóstico en el 90% de los casos.

Hay diferencias fenotípicas según el mecanismo molecular, siendo de mayor gravedad la delección y de menor la disomía uniparental paterna y el defecto de impronta. La delección tipo I y II se asocia a un fenotipo más complejo caracterizado por convulsiones graves, más frecuentes y más tempranas. El diagnóstico precoz es importante para evitar estudios complementarios innecesarios y establecer un pronóstico que permita a las familias una planificación de vida y a los profesionales iniciar: (I) estrategias terapéuticas más adecuadas (fisioterapia en el desarrollo psicomotor durante los primeros años y en la edad adulta para evitar retracciones y deformidades osteoarticulares y técnicas de comunicación alternativas lo más precoz posible y necesarias durante toda la vida) y (ii) previsión de respuesta a diferentes fármacos (como elección de fármacos antiepilépticos e inductores del sueño).

La mayoría de casos son esporádicos siendo el riesgo de recurrencia muy bajo, pero en los genotipos con mutación de *UBE3A* y delección del centro de impronta se encuentran casos familiares. Para la madre portadora el riesgo de recurrencia en la descendencia es del 50% y en los hermanos varones portadores, la alteración se transmite en el 50% de la descendencia en estado de portador sano.

REFERENCIAS

1. Hart H. 'Puppet' children. A report on three cases (1965). *Dev Med Child Neurol* 2008;50:564-
2. Kyllerman M. On the prevalence of Angelman syndrome. *Am J Med Genet* 1995;59:405-4.
3. Buckley RH, Dinno N, Weber P. Angelman syndrome: are the estimates too low? *Am J Med Genet* 1998;80:385-390.
4. Williams CA, Beaudet AL, Clayton-Smith J et al. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet A* 2006;140:413-418.
5. Tan WH, Bacino CA, Skinner SA et al. Angelman syndrome: Mutations influence features in early childhood. *Am J Med Genet A* 2011;155A:81-90.
6. Galvan-Manso M, Campistol J, Conill J, Sanmarti FX. Analysis of the characteristics of epilepsy in 37 patients with the molecular diagnosis of Angelman syndrome. *Epileptic Disord* 2005;7:19-25.
7. Valente KD, Koiffmann CP, Fridman C et al. Epilepsy in patients with angelman syndrome caused by deletion of the chromosome 15q11-13. *Arch Neurol* 2006;63:122-128.
8. Buoni S, Grosso S, Pucci L, Fois A. Diagnosis of Angelman syndrome: clinical and EEG criteria. *Brain Dev* 1999;21:296-302.
9. Laan LA, Renier WO, Arts WF et al. Evolution of epilepsy and EEG findings in Angelman syndrome. *Epilepsia* 1997;38:195-199.
10. Clayton-Smith J, Laan L. Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 2003;40:87-95.
11. Espay AJ, Andrade DM, Wennberg RA, Lang AE. Atypical absences and recurrent absence status in an adult with Angelman syndrome due to the UBE3A mutation. *Epileptic Disord* 2005;7:227-230.
12. Boyd SG, Harden A, Patton MA. The EEG in early diagnosis of the Angelman (happy puppet) syndrome. *Eur J Pediatr* 1988;147:508-513.
13. Minassian BA, DeLorey TM, Olsen RW et al. Angelman syndrome: correlations between epilepsy phenotypes and genotypes. *Ann Neurol* 1998;43:485-493.
14. Vendrame M, Loddenkemper T, Zarowski M et al. Analysis of EEG patterns and genotypes in patients with Angelman syndrome. *Epilepsy Behav* 2012;23:261-265.
15. Laan LA, Vein AA. A Rett patient with a typical Angelman EEG. *Epilepsia* 2002;43:1590-1592.
16. Korff CM, Kelley KR, Nordli DR, Jr. Notched delta, phenotype, and Angelman syndrome. *J Clin Neurophysiol* 2005;22:238-243.
17. Beckung E, Steffenburg S, Kyllerman M. Motor impairments, neurological signs, and developmental level in individuals with Angelman syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2004;46:239-243.
18. Peters SU, Kaufmann WE, Bacino CA et al. Alterations in white matter pathways in Angelman syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2011;53:361-367.
19. Wilson BJ, Sundaram SK, Huq AH et al. Abnormal language pathway in children with Angelman syndrome. *Pediatr Neurol* 2011;44:350-356.
20. Barry RJ, Leitner RP, Clarke AR, Einfeld SL. Behavioral aspects of Angelman syndrome: a case control study. *Am J Med Genet A* 2005;132A:8-12.
21. Roig M, Tallada M, Sarret E, Querali A, Macaya A. The early stages of Angelman's disease. Association of Child Neurology Nurses: Presentation of Abstracts. *Ann Neurol* 1993;34(3):485-486 (abstract 137).
22. Harbord M. Levodopa responsive Parkinsonism in adults with Angelman Syndrome. *J Clin Neurosci* 2001;8:421-422.
23. Guerrini R, De Lorey TM, Bonanni P et al. Cortical myoclonus in Angelman syndrome. *Ann Neurol* 1996;40:39-48.
24. Goto M, Saito Y, Honda R et al. Episodic tremors representing cortical myoclonus are characteristic in Angelman syndrome due to UBE3A mutations. *Brain Dev* 2015;37:216-222.
25. Didden R, Korzilius H, Smits MG, Curfs LM. Sleep problems in individuals with Angelman syndrome. *Am J Ment Retard* 2004;109:275-284.
26. Bruni O, Ferri R, D'Agostino G, Miano S, Roccella M, Elia M. Sleep disturbances in Angelman syndrome: a questionnaire study. *Brain Dev* 2004;26:233-240.
27. Larson AM, Shinnick JE, Shaaya EA, Thiele EA, Thibert RL. Angelman syndrome in adulthood. *Am J Med Genet A* 2015;167A:331-344.

28. Laan LA, den Boer AT, Hennekam RC, Renier WO, Brouwer OF. Angelman syndrome in adulthood. *Am J Med Genet* 1996;66:356-360.
29. Boyce HW, Bakheet MR. Sialorrhea: a review of a vexing, often unrecognized sign of oropharyngeal and esophageal disease. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:89-97.
30. Sandanam T, Beange H, Robson L, Woolnough H, Buchholz T, Smith A. Manifestations in institutionalised adults with Angelman syndrome due to deletion. *Am J Med Genet* 1997;70:415-420.
31. Thomson AK, Glasson EJ, Bittles AH. A long-term population-based clinical and morbidity profile of Angelman syndrome in Western Australia: 1953-2003. *Disabil Rehabil* 2006;28:299-305.
32. Ruggieri M, McShane MA. Parental view of epilepsy in Angelman syndrome: a questionnaire study. *Arch Dis Child* 1998;79:423-426.
33. Thibert RL, Conant KD, Braun EK et al. Epilepsy in Angelman syndrome: a questionnaire-based assessment of the natural history and current treatment options. *Epilepsia* 2009;50:2369-2376.
34. Thibert RL, Pfeifer HH, Larson AM et al. Low glycemic index treatment for seizures in Angelman syndrome. *Epilepsia* 2012;53:1498-1502.
35. Coppola G, Iervolino G, Mastro Simone M, La TG, Ruiu F, Pascotto A. Melatonin in wake-sleep disorders in children, adolescents and young adults with mental retardation with or without epilepsy: a double-blind, cross-over, placebo-controlled trial. *Brain Dev* 2004;26:373-376.
36. Tan WH, Bird LM, Thibert RL, Williams CA. If not Angelman, what is it? A review of Angelman-like syndromes. *Am J Med Genet A* 2014;164A:975-992.
37. Phelan K, McDermid HE. The 22q13.3 Deletion Syndrome (Phelan-McDermid Syndrome). *Mol Syndromol* 2012;2:186-201.
38. Sarasua SM, Boccutto L, Sharp JL et al. Clinical and genomic evaluation of 201 patients with Phelan-McDermid syndrome. *Hum Genet* 2014;133:847-859.
39. Zollino M, Orteschi D, Murdolo M et al. Mutations in KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome phenotype. *Nat Genet* 2012;44:636-638.
40. Egger JI, Wingbermuhle E, Verhoeven WM et al. Hypersociability in the behavioral phenotype of 17q21.31 microdeletion syndrome. *Am J Med Genet A* 2013;161A:21-26.
41. Koolen DA, Kramer JM, Neveling K et al. Mutations in the chromatin modifier gene KANSL1 cause the 17q21.31 microdeletion syndrome. *Nat Genet* 2012;44:639-641.
42. Digilio MC, Bernardini L, Capolino R et al. Hypopigmented skin patches in 17q21.31 microdeletion syndrome: expanding the spectrum of cutaneous findings. *Clin Dysmorphol* 2014;23:32-34.
43. van Bon BW, Koolen DA, Brueton L et al. The 2q23.1 microdeletion syndrome: clinical and behavioural phenotype. *Eur J Hum Genet* 2010;18:163-170.
44. Talkowski ME, Mullegama SV, Rosenfeld JA et al. Assessment of 2q23.1 microdeletion syndrome implicates MBD5 as a single causal locus of intellectual disability, epilepsy, and autism spectrum disorder. *Am J Hum Genet* 2011;89:551-563.
45. Kleefstra T, Brunner HG, Amiel J et al. Loss-of-function mutations in euchromatin histone methyl transferase 1 (EHMT1) cause the 9q34 subtelomeric deletion syndrome. *Am J Hum Genet* 2006;79:370-377.
46. Kleefstra T, van Zelst-Stams WA, Nillesen WM et al. Further clinical and molecular delineation of the 9q subtelomeric deletion syndrome supports a major contribution of EHMT1 haploinsufficiency to the core phenotype. *J Med Genet* 2009;46:598-606.
47. Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM et al. Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol* 2012;2:202-212.
48. Zweier C, de Jong EK, Zweier M et al. CNTNAP2 and NRXN1 are mutated in autosomal-recessive Pitt-Hopkins-like mental retardation and determine the level of a common synaptic protein in Drosophila. *Am J Hum Genet* 2009;85:655-666.
49. Van Balkom ID, Vuijk PJ, Franssens M, Hoek HW, Hennekam RC. Development, cognition, and behaviour in Pitt-Hopkins syndrome. *Dev Med Child Neurol* 2012;54:925-931.
50. Marangi G, Ricciardi S, Orteschi D et al. Proposal of a clinical score for the molecular test for Pitt-Hopkins syndrome. *Am J Med Genet A* 2012;158A:1604-1611.
51. Garavelli L, Mainardi PC. Mowat-Wilson syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:42-
52. Saunders CJ, Zhao W, Ardinger HH. Comprehensive ZEB2 gene analysis for Mowat-Wilson syndrome in a North American cohort: a suggested approach to molecular diagnostics. *Am J Med Genet A* 2009;149A:2527-2531.

53. Wenger TL, Harr M, Ricciardi S et al. CHARGE-like presentation, craniosynostosis and mild Mowat-Wilson Syndrome diagnosed by recognition of the distinctive facial gestalt in a cohort of 28 new cases. *Am J Med Genet A* 2014;164A:2557-2566.
54. Gilfillan GD, Selmer KK, Roxrud I et al. SLC9A6 mutations cause X-linked mental retardation, microcephaly, epilepsy, and ataxia, a phenotype mimicking Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;82:1003-1010.
55. Pescosolido MF, Stein DM, Schmidt M et al. Genetic and phenotypic diversity of NHE6 mutations in Christianson syndrome. *Ann Neurol* 2014;76:581-593.
56. Watson P, Black G, Ramsden S et al. Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 2001;38:224-228.
57. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG et al. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 2010;68:944-950.
58. 5Bijlsma EK, Collins A, Papa FT et al. Xq28 duplications including MECP2 in five females: Expanding the phenotype to severe mental retardation. *Eur J Med Genet* 2012;55:404-413.
59. Guerrini R, Parrini E. Epilepsy in Rett syndrome, and C. *Epilepsia* 2012;53:2067-2078.
60. Caumes R, Boespflug-Tanguy O, Villeneuve N et al. Late onset epileptic spasms is frequent in MECP2 gene duplication: electroclinical features and long-term follow-up of 8 epilepsy patients. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18:475-481.
61. Zweier M, Gregor A, Zweier C et al. Mutations in MEF2C from the 5q14.3q15 microdeletion syndrome region are a frequent cause of severe mental retardation and diminish MECP2 and CDKL5 expression. *Hum Mutat* 2010;31:722-733.
62. Novara F, Rizzo A, Bedini G et al. MEF2C deletions and mutations versus duplications: a clinical comparison. *Eur J Med Genet* 2013;56:260-265.
63. Perez-Duenas B, Sempere A, Campistol J et al. Novel features in the evolution of adenylosuccinate lyase deficiency. *Eur J Paediatr Neurol* 2012;16:343-348.
64. Jurecka A, Zikanova M, Kmoch S, Tylki-Szymanska A. Adenylosuccinate lyase deficiency. *J Inher Metab Dis* 2015;38:231-242.
65. Gibbons R. Alpha thalassaemia-mental retardation, X linked. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:15-
66. Lacoste C, Leheup B, Agouti I, Mowat D, Giuliano F, Badens C. Mutations of codon 2085 in the helicase domain of ATRX are recurrent and cause ATRX syndrome. *Clin Genet* 2014;86:502-503.
67. Puffenberger EG, Jinks RN, Wang H et al. A homozygous missense mutation in HERC2 associated with global developmental delay and autism spectrum disorder. *Hum Mutat* 2012;33:1639-1646.
68. Harlalka GV, Baple EL, Cross H et al. Mutation of HERC2 causes developmental delay with Angelman-like features. *J Med Genet* 2013;50:65-73.
69. Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997;15:70-73.
70. Matsuura T, Sutcliffe JS, Fang P et al. De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet* 1997;15:74-77.
71. Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W et al. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 1999;65:370-386.
72. Christian SL, Fantes JA, Mewborn SK, Huang B, Ledbetter DH. Large genomic duplicons map to sites of instability in the Prader-Willi/Angelman syndrome chromosome region (15q11-q13). *Hum Mol Genet* 1999;8:1025-1037.
73. Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res* 2000;10:319-329.
74. Ji Y, Eichler EE, Schwartz S, Nicholls RD. Structure of chromosomal duplicons and their role in mediating human genomic disorders. *Genome Res* 2000;10:597-610.
75. Sahoo T, Bacino CA, German JR et al. Identification of novel deletions of 15q11q13 in Angelman syndrome by array-CGH: molecular characterization and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 2007;15:943-949.
76. Farber C, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B. The chromosome 15 imprinting centre (IC) region has undergone multiple duplication events and contains an upstream exon of SNRPN that is deleted in all Angelman syndrome patients with an IC microdeletion. *Hum Mol Genet* 1999;8:337-343.
77. Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaue L,

- Lalande M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* 1998;19:15-16.
78. Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* 2001;73:316-322.
 79. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kiefmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* 2001;10:2687-2700.
 80. Yamasaki K, Joh K, Ohta T et al. Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet* 2003;12:837-847.
 81. Landers M, Bancescu DL, Le ME et al. Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3480-3492.
 82. Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G et al. SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 2004;114:553-561.
 83. Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:2563-2567.
 84. Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature* 1995;373:81-83.
 85. Huang L, Kinnucan E, Wang G et al. Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science* 1999;286:1321-1326.
 86. Philpot BD, Thompson CE, Franco L, Williams CA. Angelman syndrome: advancing the research frontier of neurodevelopmental disorders. *J Neurodev Disord* 2011;3:50-56.
 87. Mabb AM, Judson MC, Zylka MJ, Philpot BD. Angelman syndrome: insights into genomic imprinting and neurodevelopmental phenotypes. *Trends Neurosci* 2011;34:293-303.
 88. Lee SY, Ramirez J, Franco M et al. Ube3a, the E3 ubiquitin ligase causing Angelman syndrome and linked to autism, regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn10. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2747-2758.
 89. Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL et al. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol Cell Biol* 1999;19:1182-1189.
 90. Godavarthi SK, Dey P, Maheshwari M, Jana NR. Defective glucocorticoid hormone receptor signaling leads to increased stress and anxiety in a mouse model of Angelman syndrome. *Hum Mol Genet* 2012;21:1824-1834.
 91. Conrad CD. Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Rev Neurosci* 2008;19:395-411.
 92. El HJ, Nawaz Z. E6AP in the brain: one protein, dual function, multiple diseases. *Mol Neurobiol* 2014;49:827-839.
 93. Kishino T, Wagstaff J. Genomic organization of the UBE3A/E6-AP gene and related pseudogenes. *Genomics* 1998;47:101-107.
 94. Buiting K, Saitoh S, Gross S et al. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 1995;9:395-400.
 95. Horsthemke B, Dittrich B, Buiting K. Imprinting mutations on human chromosome 15. *Hum Mutat* 1997;10:329-337.
 96. Buiting K, Lich C, Cottrell S, Barnicoat A, Horsthemke B. A 5-kb imprinting center deletion in a family with Angelman syndrome reduces the shortest region of deletion overlap to 880 bp. *Hum Genet* 1999;105:665-666.
 97. Meguro M, Kashiwagi A, Mitsuya K et al. A novel maternally expressed gene, ATP10C, encodes a putative aminophospholipid translocase associated with Angelman syndrome. *Nat Genet* 2001;28:19-20.
 98. Herzing LB, Kim SJ, Cook EH, Jr., Ledbetter DH. The human aminophospholipid-transporting ATPase gene ATP10C maps adjacent to UBE3A and exhibits similar imprinted expression. *Am J Hum Genet* 2001;68:1501-1505.
 99. Bürger J, Horn D, Tönnies H, Neitzel H, Reis A. Familial interstitial 570 kbp deletion of the UBE3A gene region causing Angelman syndrome but not Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 2002;111:233-237.
 100. Boyes L, Wallace AJ, Krajewska-Walasek M, Chrzanowska KH, Clayton-Smith J, Ramsden S. Detection of a deletion of exons 8-16 of the UBE3A gene in familial Angelman syndrome using a semi-

- quantitative dosage PCR based assay. *Eur J Med Genet* 2006;49:472-480.
101. Lawson-Yuen A, Wu BL, Lip V, Sahoo T, Kimonis V. Atypical cases of Angelman syndrome. *Am J Med Genet A* 2006;140:2361-2364.
 102. Sato K, Iwakoshi M, Shimokawa O et al. Angelman syndrome caused by an identical familial 1,487-kb deletion. *Am J Med Genet A* 2007;143A:98-101.
 103. Robinson WP, Kuchinka BD, Bernasconi F et al. Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 1998;7:1011-1019.
 104. Robinson WP, Christian SL, Kuchinka BD et al. Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clin Genet* 2000;57:349-358.
 105. Buiting K, Gross S, Lich C, Gillissen-Kaesbach G, el-Maarri O, Horsthemke B. Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with an imprinting defect. *Am J Hum Genet* 2003;72:571-577.
 106. Gillissen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B. A previously unrecognised phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* 1999;7:638-644.
 107. Dupont JM, Le TD, Rabineau D et al. Unexpected Angelman syndrome molecular defect in a girl displaying clinical features of Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 1999;36:652-654.
 108. De Molfetta GA, Felix TM, Riegel M, Ferraz VE, de Pina Neto JM. A further case of a Prader-Willi syndrome phenotype in a patient with Angelman syndrome molecular defect. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:1011-1014.
 109. Cox GF, Bürger J, Lip V et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;71:162-164.
 110. Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003;72:218-219.
 111. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 2007;22:26-35.
 112. Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, Bonvissuto AC, Mann MR. Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010;19:36-51.
 113. Fernández-Gonzalez R, Ramirez MA, Bilbao A, De Fonseca FR, Gutierrez-Adan A. Suboptimal in vitro culture conditions: an epigenetic origin of long-term health effects. *Mol Reprod Dev* 2007;74:1149-1156.
 114. Market-Velker BA, Fernandes AD, Mann MR. Side-by-side comparison of five commercial media systems in a mouse model: suboptimal in vitro culture interferes with imprint maintenance. *Biol Reprod* 2010;83:938-950.
 115. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, Sutcliffe A, Varon R, Horsthemke B. Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005;42:289-291.
 116. ASHG/ACMG. Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: Report of the ASHG/ACMG Test and Technology Transfer Committee. *Am J Hum Genet* 1996;58:1085-1088.
 117. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes* 2007;21:208-215.
 118. Bittel DC, Kibiriyeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test* 2007;11:467-475.
 119. Horsthemke B, Lich C, Buiting K et al. Problems in detecting mosaic DNA methylation in Angelman syndrome. *Eur J Hum Genet* 2003;11:913-915.
 120. Bailus BJ, Segal DJ. The prospect of molecular therapy for Angelman syndrome and other monogenic neurologic disorders. *BMC Neurosci* 2014;15:76-
 121. Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL et al. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating arc. *Cell* 2010;140:704-716.
 122. Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM et al. EphB-mediated degradation of the RhoA GEF Ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell* 2010;143:442-455.
 123. Baudry M, Kramar E, Xu X et al. Ampakines promote spine actin polymerization, long-term

- potentiation, and learning in a mouse model of Angelman syndrome. *Neurobiol Dis* 2012;47:210-215.
124. Picconi B, Gardoni F, Centonze D et al. Abnormal Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II function mediates synaptic and motor deficits in experimental parkinsonism. *J Neurosci* 2004;24:5283-5291.
 125. van Woerden GM, Harris KD, Hojjati MR et al. Rescue of neurological deficits in a mouse model for Angelman syndrome by reduction of alphaCaMKII inhibitory phosphorylation. *Nat Neurosci* 2007;10:280-282.
 126. Riday TT, Dankoski EC, Krouse MC et al. Pathway-specific dopaminergic deficits in a mouse model of Angelman syndrome. *J Clin Invest* 2012;122:4544-4554.
 127. Huang HS, Allen JA, Mabb AM et al. Topoisomerase inhibitors unsilence the dormant allele of Ube3a in neurons. *Nature* 2012;481:185-189.
 128. King IF, Yandava CN, Mabb AM et al. Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 2013;501:58-62.
 129. Powell WT, Coulson RL, Gonzales ML et al. R-loop formation at Snord116 mediates topotecan inhibition of Ube3a-antisense and allele-specific chromatin decondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:13938-13943.
 130. Blancafort P, Beltran AS. Rational design, selection and specificity of artificial transcription factors (ATFs): the influence of chromatin in target gene regulation. *Comb Chem High Throughput Screen* 2008;11:146-158.
 131. Tan S, Guschin D, Davalos A et al. Zinc-finger protein-targeted gene regulation: genomewide single-gene specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11997-12002.
 132. Meng L, Ward AJ, Chun S, Bennett CF, Beaudet AL, Rigo F. Towards a therapy for Angelman syndrome by targeting a long non-coding RNA. *Nature* 2015;518:409-412.
 133. Moncla A, Malzac P, Voelckel MA et al. Phenotype-genotype correlation in 20 deletion and 20 non-deletion Angelman syndrome patients. *Eur J Hum Genet* 1999;7:131-139.
 134. Lossie AC, Whitney MM, Amidon D et al. Distinct phenotypes distinguish the molecular classes of Angelman syndrome. *J Med Genet* 2001;38:834-845.
 135. Dan B, Boyd SG. Angelman syndrome reviewed from a neurophysiological perspective. The UBE3A-GABRB3 hypothesis. *Neuropediatrics* 2003;34:169-176.
 136. Low D, Chen KS. UBE3A regulates MC1R expression: a link to hypopigmentation in Angelman syndrome. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:944-952.
 137. Peters SU, Horowitz L, Barbieri-Welge R, Taylor JL, Hundley RJ. Longitudinal follow-up of autism spectrum features and sensory behaviors in Angelman syndrome by deletion class. *J Child Psychol Psychiatry* 2012;53:152-159.
 138. Sahoo T, Peters SU, Madduri NS et al. Microarray based comparative genomic hybridization testing in deletion bearing patients with Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *J Med Genet* 2006;43:512-516.
 139. Abekhoukh S, Bardoni B. CYFIP family proteins between autism and intellectual disability: links with Fragile X syndrome. *Front Cell Neurosci* 2014;8:81-
 140. Mertz LG, Thaulov P, Trillingsgaard A et al. Neurodevelopmental outcome in Angelman syndrome: genotype-phenotype correlations. *Res Dev Disabil* 2014;35:1742-1747.
 141. Gentile JK, Tan WH, Horowitz LT et al. A neurodevelopmental survey of Angelman syndrome with genotype-phenotype correlations. *J Dev Behav Pediatr* 2010;31:592-601.
 142. Brennan ML, Adam MP, Seaver LH et al. Increased body mass in infancy and early toddlerhood in Angelman syndrome patients with uniparental disomy and imprinting center defects. *Am J Med Genet A* 2015;167A:142-146.
 143. Inazlican H, Zeschnick M, Claussen U et al. Somatic mosaicism in patients with Angelman syndrome and an imprinting defect. *Hum Mol Genet* 2004;13:2547-2555.
 144. Camprubi C, Coll MD, Villatoro S et al. Imprinting center analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients with typical and atypical phenotypes. *Eur J Med Genet* 2007;50:11-20.
 145. Stalker HJ, Williams CA. Genetic counseling in Angelman syndrome: the challenges of multiple causes. *Am J Med Genet* 1998;77:54-59.
 146. Van BG, Fryns JP. Angelman syndrome (AS, MIM 105830). *Eur J Hum Genet* 2009;17:1367-1373.
 147. Sadikovic B, Fernandes P, Zhang VW et al. Mutation Update for UBE3A variants in Angelman

- syndrome. *Hum Mutat* 2014;35:1407-1417.
148. Buiting K, Barnicoat A, Lich C, Pembrey M, Malcolm S, Horsthemke B. Disruption of the bipartite imprinting center in a family with Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 2001;68:1290-1294
149. Bürger J, Buiting K, Dittrich B et al. Different mechanisms and recurrence risks of imprinting defects in Angelman syndrome. *Am J Hum Genet* 1997;61:88-93.
150. Kokkonen H, Leisti J. An unexpected recurrence of Angelman syndrome suggestive of maternal germline mosaicism of del(15)(q11q13) in a Finnish family. *Hum Genet* 2000;107:83-85.
151. Malzac P, Webber H, Moncla A et al. Mutation analysis of UBE3A in Angelman syndrome patients. *Am J Hum Genet* 1998;62:1353-1360.
152. Sánchez J, Fernández R, Madruga M, Bernabeu-Wittel J, Antinolo G, Borrego S. Somatic and germline mosaicism of deletion 15q11.2-q13 in a mother of dizygotic twins with Angelman syndrome. *Am J Med Genet A* 2014;164A:370-376.

Capítulo 7: SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Elisabeth Gabau¹, Neus Baena², Assumpta Caixàs³, Ramon Novell⁴, Miriam Guitart²

¹Genética Clínica. Servicio de Pediatría. Hospital de Sabadell. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona. ²Laboratorio de Genética. UDIAT-CD. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona. ³Endocrinología. Servicio de Endocrinología y Nutrición. Hospital de Sabadell. Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Barcelona. ⁴Psiquiatría. Servicio Especializado en Salud Mental y Discapacidad Intelectual. Parc Hospitalari Martí i Julià, IAS – Servei Català de la Salut, Salt, Girona.

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

1.1. Introducción

En el año 1993, Holm y colaboradores establecieron un consenso de criterios clínicos para identificar a los pacientes afectados de síndrome de Prader-Willi (PWS)¹. Pocos años más tarde, en el 2001, debido a que el test genético era fácilmente reproducible permitiendo el diagnóstico en todos los casos de PWS, y el diagnóstico precoz es muy importante para el manejo del paciente, fue necesario modificar el consenso anterior, simplificando los criterios clínicos (tabla 1)².

1.2. Manifestaciones clínicas

1.2.1. Hipotonía

Las manifestaciones clínicas características del PWS son las siguientes:

La hipotonía prenatal resulta en la disminución del movimiento fetal, posición anormal del feto durante el parto, y el aumento de la incidencia de parto asistido o cesárea. El peso y la longitud del recién nacido están dentro del rango normal, pero de un 15-20% menor que sus hermanos³.

La hipotonía neonatal causa pocos movimientos y letargia en el lactante, llanto débil, los reflejos pueden estar ausentes o disminuidos. En la mayoría de los casos ocasiona dificultades para la alimentación debido a la mala succión. La hipotonía es de origen central y mejora con el tiempo³.

Tabla 1. Signos que difieren según la edad del paciente y justifican realizar el test genético para descartar el PWS.

Nacimiento hasta los 2 años
Hipotonía con succión pobre (período neonatal)
De 2 a 6 años
La hipotonía con historia de succión pobre Retraso global del desarrollo
De 6 a 12 años
Historia de hipotonía con succión pobre (la hipotonía puede persistir) Retraso global del desarrollo Comer en exceso con obesidad central si no se controla
De 13 años a la edad adulta
Déficit cognitivo, discapacidad intelectual leve Comer en exceso con obesidad central si no se controla Hipogonadismo hipotalámico y/o problemas de conducta característicos

1.2.2. Retraso madurativo

En el 90% y el 100% de los niños con PWS, se observa retraso del desarrollo motor (sedestación 12 meses, marcha libre 24 meses). El retraso de lenguaje es común en el PWS, las primeras palabras pueden aparecer más allá de los 4-5 años y pueden expresarse con dificultad no sólo por la alteración cognitiva si no que también por la hipotonía y las malformaciones anatómicas de los órganos relacionados con la producción oral. En general tienen un lenguaje comprensivo superior al expresivo y ello les genera frustración aumentando las dificultades de relación con sus compañeros⁴. La discapacidad intelectual (DI) se hace presente en la edad escolar. En la mayoría de los

pacientes con PWS la DI es leve.

1.2.3. Hiperfagia

La hiperfagia, es un síntoma constante en los pacientes con PWS, sino se controla conduce a obesidad mórbida, responsable de los graves problemas de salud en adultos PWS. Es interesante constatar que se conocen más fases nutricionales de las dos clásicas (después de dificultades para comer y falta de aumento ponderal, aparece la hiperfagia que conduce a la obesidad), un estudio de Miller y colaboradores encontró que la transición entre las fases de nutrición es mucho más compleja, con siete fases diferentes nutricionales (Tabla 2)^{5,6}.

Fases	Edad media	Clínica
0	Prenatal-recién nacido	Disminución de los movimientos fetales y menor peso al nacer que los hermanos
1a	0-9 meses	Hipotonía con dificultad para alimentarse y poco apetito
1b	9-25 m	Alimentación y apetito mejorado; creciendo apropiadamente
2a	2,1-4,5 años	Peso creciente sin aumento del apetito o exceso de calorías
2b	4,5-8 años	Aumento del apetito y calorías, pero puede sentirse saciado
3	8 años-adulto	Hiperfagia, rara vez se sienten saciados
4	adulto	Apetito insaciable

La hiperfagia en el PWS parece ser secundaria a una disfunción hipotalámica que resulta en falta de saciedad. Son comunes las conductas para la búsqueda de alimentos. Tienen una gran dificultad para vomitar, dato importante de conocer en los servicios de urgencias (ante una ingesta tóxica en estos pacientes realizar siempre lavado gástrico).

La causa de la hiperfagia no es del todo conocida. Se cree que existe una alteración a nivel hipotalámico, en el núcleo arcuato, que es el centro del hambre y la saciedad con un balance de hormonas y péptidos más hacia la producción de hambre y la ausencia de señal de saciedad. En este núcleo existen dos tipos bien diferenciados de grupos neuronales que son modulados por señales periféricas procedentes del tracto gastrointestinal. En estudios post mortem en el PWS, se ha podido observar una reducción del número total de neuronas (38%) y, concretamente, de las que producen oxitocina (42%), en el núcleo paraventricular. También se han observado valores plasmáticos elevados de GABA en comparación con sujetos control de la misma edad y peso corporal, sin embargo los receptores GABA-A hipotalámicos son normales⁷. A nivel periférico, existen dos tipos de señales de control del apetito, las que informan al sistema nervioso central acerca de cuál es la adiposidad del organismo como la leptina y la insulina y las de saciedad como el PYY, el polipéptido pancreático (PP), la colecistocinina (CKK), la oxintomodulina y el *glucagón-like peptide1* (GLP-1) secretados tras la

ingesta, que comportan el cese de la misma⁸. Por último, la ghrelina, es una señal de hambre. El PWS es el único modelo de obesidad que cursa con valores elevados de ghrelina que disminuyen menos del que cabría esperar tras la ingesta. No obstante si se inhibe esta hormona, los pacientes siguen teniendo hambre, lo que hace pensar que el mecanismo no es único y es mucho más complejo. Otras hormonas como la leptina y la insulina tampoco parecen candidatas a la explicación de la ausencia de saciedad. La relativa hipoinsulinemia podría contribuir aunque sólo levemente. El PP es un péptido anorexígeno. En individuos con PWS, los valores basales de PP están disminuidos, así como la respuesta postprandial, por lo que esta alteración podría contribuir a explicar la hiperfagia de este síndrome. Este péptido ya está disminuido incluso en niños con PWS de menos de cinco años. El péptido YY se secreta en todo el tracto gastrointestinal tras la ingesta, particularmente en la porción final. En el PWS, este péptido está disminuido en ayunas y su pico postprandial está disminuido^{8,9}. Los niveles de GLP-1 están normales. No existen estudios que hayan evaluado los niveles de oxintomodulina. Existen pocos estudios que evalúen CCK y con resultados contradictorios⁸.

Faltan más investigaciones para entender qué alteraciones hormonales subyacen en la génesis de la hiperfagia en el PWS⁶.

A la obesidad también contribuye la disminución de gasto energético en

reposo como resultado de disminución de la actividad y la disminución de la masa corporal magra (principalmente músculos), en comparación con individuos no afectados³. La obesidad y sus complicaciones son las principales causas de morbilidad y mortalidad en las personas PWS (Figura 1).



Figura 1: Fenotipo característico del PWS mostrando talla baja, obesidad, manos y pies pequeños.

1.2.4. Rasgos fenotípicos

Los pacientes con PWS presentan rasgos faciales característicos (frente estrecha, ojos almendrados, labio superior delgado y en tienda), así como manos y pies muy pequeños. La hipopigmentación del cabello, los ojos y la piel es común en aquellos que presentan PWS por delección, debido a la pérdida de una copia del gen *OCA2* (la alteración de las dos copias del gen da lugar al albinismo tirosinasa-

positivo) (Figura 2).



Figura 2: Fotografía de dos pacientes con PWS por delección 15q11-q13. Puede apreciarse la hipopigmentación de la piel y en uno de los dos incluso cabello

Es frecuente que presenten talla baja, debida a una deficiencia de hormona del crecimiento (GH), y desarrollo puberal incompleto. Los pacientes con PWS presentan déficit de GH en más el 90% de los casos¹⁰.

El hipogonadismo se inicia en el período prenatal, se observa hipogonitalismo en el recién nacido, más evidente en varones, habrá un desarrollo incompleto de la pubertad, y en el adulto poca o inexistente actividad sexual e infertilidad. El hipogonadismo no sólo es de origen central (hipotalámico) sino que también coexiste hipogonadismo primario tal y como se demuestra con la ausencia de hipogonadotropinismo en algunos casos y unos niveles de inhibina B anormalmente baja en ambos sexos^{11,12}.

1.2.5. Otras alteraciones endocrinológicas

Hasta un 25% de las personas con PWS presenta hipotiroidismo central⁶.

La presencia de insuficiencia

suprarrenal central se ha demostrado en el 60% de los niños PWS, tras la administración de metirapona; la insuficiencia suprarrenal se había relacionado con la muerte súbita (alta incidencia en PWS), especialmente con cuadros infecciosos¹³. Estudios posteriores han encontrado que la función del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal era normal, lo que sugiere que la insuficiencia suprarrenal clínicamente significativa en el PWS es rara¹⁴.

Hasta un 25% de los adultos con PWS (particularmente aquellos con obesidad importante) tienen diabetes tipo 2, con una edad media de inicio de 20 años. El PWS no se asocia a una mayor incidencia de DM tipo 1. Estudios con resonancia magnética demuestran que los pacientes con PWS presentan poca grasa visceral en relación a la gran masa grasa periférica. Se ha descrito también una disminución de los receptores de insulina. También presentan relativamente menos insulinemia y menos resistencia a la insulina que sus homólogos obesos sin PWS y se cree que es debido a esta disminución relativa de la grasa visceral¹⁵.

1.3. Características conductuales

En el 70%-90% de las personas con PWS, ya de pequeños, se hace evidente un perfil de comportamiento característico con rabietas, terquedad, comportamiento manipulador, compulsividad, y dificultad con el cambio en la rutina. En un 19% se observan características de trastorno

espectro autista (TEA), también se ha reportado trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH)⁶. Los trastornos de conducta empeoran con la edad y aumento de masa corporal, en adultos se ha reportado de 10-20% de casos con psicosis en pacientes PWS por disomía o defecto del centro de impronta¹⁶.

En los primeros años (hasta edad pre-escolar) muestran una conducta afable, colaboradora, mostrándose risueños y contentos en su entorno aunque con cierta letargia, relacionada con la hipotonía. A partir de los 5 años aproximadamente (edad en la que empieza el desarrollo madurativo de la flexibilidad mental, entre otras funciones cognitivas) hasta la pre-adolescencia, esa conducta afectuosa y moldeable pasa a ser más rígida e inflexible. Esta rigidez junto con el incremento de pensamientos perseverantes suele precipitar la pérdida de control emocional (pasando de lloros a chillidos y viceversa) hasta poder manifestar conductas agresivas (bien sea contra ellos mismos o contra otros). Las dificultades de integración social empiezan a hacerse evidentes⁶.

En la adolescencia se les describe conductualmente como caprichosos, manipuladores, tercos, obstinados, pudiendo aparecer (o incrementarse) las conductas de hurto, generalmente relacionadas con la comida o con dinero para poder comprarla. La presencia de pensamientos y verbalizaciones perseverantes se incrementan y junto con ello, las dificultades para marcar los límites cada vez se hacen más evidentes. Estas verbalizaciones

repetitivas suelen ser conductas poco toleradas por el entorno (son molestas para la persona que las escucha, suelen aparecer cuando se les ha negado algo y mantienen durante horas un tema que debería estar zanjado y que puede acabar en explosión conductual).

En los adultos, las alteraciones conductuales persisten y con ello los altos niveles de frustración por desadaptación social junto con sentimientos de inutilidad.

Uno de los problemas conductuales más frecuentes en el PWS son los denominados *tantrums* o berrinches, que suele iniciarse con pequeños signos (morderse el labio, cerrar fuertemente los ojos) seguido de un cambio en la expresión facial más marcado que da lugar a los gritos, chillidos e insultos. En la mayoría de los casos el ciclo continúa con la destrucción de objetos y autoagresiones y/o heteroagresiones, finalizando con lloros y sollozos.

El tipo de enfermedades mentales que presentan las personas con PWS son las mismas que observamos en la población general, sin embargo, las circunstancias propias del sujeto y el nivel de funcionamiento cognitivo puede alterar la manifestación de los síntomas. Así, se tiende a sobrestimar los trastornos psicóticos, atribuyéndose a esta categoría todos aquellos problemas de la conducta cuya causa desconocemos, y a despreciar los trastornos del estado de ánimo, la ansiedad y de la personalidad entre otros. Los datos relacionados con el estudio recientemente finalizado sobre la conectividad funcional cerebral en las redes de motivación para la

comida en pacientes adultos con PWS, sugieren que el trastorno mental más prevalente es el Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC). Así, un 70% presenta características de TOC de predominio compulsivo, seguido de los trastornos del sueño (70%), del trastorno psicótico (20%), trastorno de ansiedad generalizado (20%) y las fobias (10%)¹⁷.

En varios estudios se describe la aparición de episodios psicóticos agudos en adultos jóvenes con PWS¹⁸⁻²². Estos episodios generalmente son de inicio súbito e incluyen síntomas depresivos. Aunque la mayoría responden bien a los psicofármacos, algunos muestran una tendencia a la desorganización del pensamiento que persiste a lo largo del tiempo. Descheemaeker *et al*,²³ realizaron un estudio de seguimiento durante 15 años mediante un equipo multidisciplinar, a 53 personas con el diagnóstico de PWS (31 niños y adolescentes y 22 adultos). Observaron que las personas con Prader Willi que manifestaban episodios psicóticos en la adolescencia eran descritos en la infancia como niños activos y extrovertidos pero manifestaban conductas del espectro autista durante la primera etapa escolar, con una discapacidad intelectual de moderada a severa. Por otra parte, las personas que desarrollaban trastornos afectivos, eran descritos en su infancia como niños pasivos e introvertidos y, presentaban un comportamiento menos perturbado durante la primera etapa escolar, con una capacidad intelectual de normal a límite.

La presencia de sintomatología afectiva y ansiosa, también han sido descritas en la literatura con elevada frecuencia²⁴⁻²⁷.

Dykens y Cassidy²⁷, describieron que a medida que se iban haciendo mayores en edad, se observaba un aumento de la angustia interna y la aparición progresiva de los síntomas depresivos, tales como la retracción social, el aislamiento, el pesimismo, etc.

En la literatura se ha descrito que la mayoría de las personas afectas de PWS están “obsesionadas”, en diferente grado, por la comida. Cualquier artículo sobre la psicopatología en el síndrome de Prader Willi, estaría incompleto sin la mención del trastorno en la comida. La hiperfagia en este grupo de pacientes implica una alteración en la respuesta de la saciedad²⁸.

Otras obsesiones y compulsiones no relacionadas con la comida, observadas en personas con PWS son: acumular objetos, ordenar y clasificar objetos por tamaños, colores o hasta que consideran que “están en su sitio”; necesitan decir o nombrar cosas (por ejemplo preguntas repetitivas); preocuparse por la simetría y exactitud; hacer y deshacer acciones una y otra vez. Contrariamente a lo observado en personas sin discapacidad, raramente son causantes de malestar o de ser “resistidas” por mecanismos de autocontrol. A pesar de ello, y visto el elevado nivel de irritabilidad que comporta la no realización de las mismas, creemos que pueden ser consideradas formas atípicas de un Trastorno Obsesivo Compulsivo y, por tanto, beneficiarse de un tratamiento cognitivo conductual y farmacológico con Inhibidores de la Recaptación de Serotonina (ISRS) entre otros¹⁷.

1.4. Otras características clínicas

Los pacientes PWS tienen mayor riesgo de presentar problemas respiratorios durante el sueño, así como otros trastornos del sueño. Los trastornos respiratorios del sueño (TRS) que pueden presentar son: apneas/hipopneas obstructivas, apneas centrales, hipoventilación. Otros trastornos del sueño que pueden presentar son anomalías en la estructura del sueño como inicio del sueño en REM y excesiva somnolencia diurna; además pueden presentar cataplejía (pérdida del tono desencadenado por emociones fuertes)²⁹.

La causa de este trastorno es multifactorial: intervienen factores anatómicos (vía aérea estrecha, maxilares estrechos, paladar ojival, hipertrofia amigdalal, obesidad. También factores neuromusculares: hipotonía, cifoescoliosis, patrón restrictivo pulmonar, también una respuesta anormal a la hipoxia e hipercapnia y un trastorno central del control respiratorio.

La sospecha debe confirmarse mediante una polisomnografía. Esta prueba es recomendable antes de empezar el tratamiento con GH, al mes y medio, a los 6 meses y al año. También si aparece aumento de peso importante o nuevos síntomas sugestivos.

El estrabismo es frecuente al aparecer en un 60%-70% de los pacientes PWS; la displasia de cadera en el 10%-20%. La escoliosis es una patología frecuentemente asociada al PWS,

con una prevalencia que varía según diferentes estudios del 30 al 70%, varía en la edad de inicio y gravedad. A diferencia de la escoliosis idiopática, afecta por igual a varones y a hembras y es sobretodo lumbar o tóracolumbar tipo 5 y 6 según la clasificación del sistema Lenke³⁰. Es debida en parte a la hipotonía y a la obesidad. Se suele asociar a cifosis sobre todo si coexiste obesidad. Algunos estudios asocian el empeoramiento de la escoliosis al tratamiento con hormona de crecimiento (GH) aunque probablemente no se trate más que de su evolución natural en la mayoría de los casos y su cese no está justificado por esta razón³¹. Hasta el 50% de los individuos afectados pueden tener infecciones respiratorias recurrentes.

Los individuos PWS presentan más riesgo para⁶:

- Osteoporosis debido a su baja densidad mineral ósea relacionada con el déficit de hormonas sexuales y de GH y también a su escasa actividad física por su hipotonía y obesidad³². Los marcadores de remodelado óseo están aumentados³³ y en consecuencia el riesgo de fractura.
- Edema de piernas y ulceración (especialmente en los obesos)
- Pellizcar la piel (*skin picking*)
- Alteración de la termorregulación
- Disminución del flujo de saliva, saliva más espesa
- En algún estudio se han descrito defectos del esmalte dentario en los pacientes con PWS y aparición

frecuente de caries³⁴.

- Convulsiones (en el 10% -20%)

En adultos, las complicaciones relacionadas con la obesidad y la cuestión de la autonomía personal siguen planteando problemas importantes^{3,6,35}.

Diferentes estudios reportan alteraciones en la neuroimagen de individuos PWS, existe algún tipo de anomalía en el 67%, como puede ser ventriculomegalia, cierre incompleto insular, reducción de la altura de la hipófisis, entre otras³⁶.

Los problemas respiratorios y otras enfermedades febriles fueron las causas más frecuentes de muerte en los niños, y los problemas cardiovasculares relacionados con la obesidad y las causas gástricas o la apnea del sueño eran más frecuentes en los adultos³⁷.

2. Manejo clínico de los pacientes

El manejo de los pacientes afectados del Síndrome de Prader-Willi (PWS), requiere de una atención multidisciplinaria, debido a los problemas nutricionales, médicos y conductuales que presentan. Los padres, la familia, así como la participación de la sociedad son fundamentales para la atención integral de las personas con PWS.

En los últimos años hemos observado un avance muy significativo en el manejo de los pacientes afectados de PWS, especialmente con el uso de la hormona de crecimiento y con las estrategias para

prevenir la aparición de la obesidad. Los programas individualizados de atención precoz y escolar, así como las estrategias en el manejo de la conducta han dado resultados muy positivos. No obstante nos falta aún mucho camino en el conocimiento de este trastorno tan complejo, especialmente la causa de la hiperfagia, un tratamiento farmacológico de la misma sería de gran utilidad para la prevención de la obesidad y seguramente para mejorar la conducta.

2.1. Hipotonía

Se presenta en el período prenatal con disminución de los movimientos fetales, posición anómala del feto (presentación de nalgas). Por lo general presenta necesidad de asistencia médica al parto y aumento de cesáreas

En los primeros meses, el lactante se mueve poco, duerme mucho, el llanto es débil y presenta dificultades para aumentar de peso por una succión débil. Será necesario aumentar la frecuencia de la toma de alimento, o el uso de tetinas especiales o el uso de sondas alimentarias en algunos casos, esta sonda no suele ser necesaria más allá de los 4-6 meses, cuando inicie la alimentación con cuchara y tenga más fuerza. Por este motivo no se recomienda el uso de botón gástrico como primera opción³⁸. Es importante seguir con un control estricto para recibir una adecuada nutrición, asegurar una ingesta adecuada de grasa diaria para el desarrollo cerebral es crítico.

La hipotonía es de origen central.

Aunque mejora, va a persistir toda la vida de forma leve a moderada. Recomendamos programas de estimulación precoz y promover la actividad física.

La escoliosis, va a ser el problema ortopédico más importante. Se requiere un equipo multidisciplinar con experiencia en el manejo de la escoliosis asociada a enfermedad neuromuscular y con el PWS.

2.2. Hiperfagia y obesidad

La hiperfagia es de origen hipotalámico y hay una falta de la sensación de saciedad, conduciendo a una conducta relacionada con la búsqueda de comida. La obesidad es central y resulta de estas conductas combinadas con un metabolismo bajo y una baja actividad física. Las complicaciones de la obesidad son las causas más importantes de morbilidad y mortalidad.

Es importante un buen consejo nutricional; dado que el requerimiento calórico es bajo, seguir dietas restrictivas; control de vitaminas y minerales, especialmente calcio y vitamina D.

Se debería monitorizar crecimiento mensualmente hasta los 2 años; cada tres meses de 2 a 6 años; cada seis meses siempre.

En la actualidad, no existe ningún fármaco específico para el tratamiento de la hiperfagia en el PWS. A veces, dado su carácter obsesivo con la comida, los fármacos inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, pueden

ser útiles (ej: fluoxetina). El topiramato también ha demostrado cierta utilidad sobre todo para estos rasgos de obsesión. Existen fármacos en fase de estudio, como la ghrelina desacilada que puede ser prometedor³⁹. El manejo, de momento, debe ser más conductual y de control del entorno para evitar el acceso fácil a la comida. La educación de la familia respecto a la conducta alimentaria es muy importante para obtener buenos resultados^{40,41}.

Se recomienda realizar ejercicio físico.

No puede recomendarse el uso de la cirugía bariátrica en estos pacientes de forma generalizada, dado que los resultados en cuanto a pérdida de peso son menores que en obesos sin PWS y se asocia a una elevada tasa de complicaciones con una elevada mortalidad a corto y a largo plazo. No obstante, en caso de obesidades extremas con comorbilidades graves que comprometan la expectativa vital del paciente a largo plazo, se puede considerar la cirugía una opción válida. Sería preferible utilizar técnicas malabsortivas y mantener una vigilancia intensiva para detectar las posibles complicaciones, así como un control dietético y un seguimiento estrecho posterior para evitar la reganancia ponderal⁴².

2.3. Talla baja

Sin tratamiento la talla media final es de 155 cm hombres y 148 cm mujeres. A la talla baja contribuye el déficit en hormona de crecimiento y la falta de brote puberal³.

Por tanto, los efectos beneficiosos del tratamiento con GH son: aumento de la talla final (aunque ésta seguirá siendo baja), mejoría de la composición corporal con disminución de la masa grasa y aumento de la masa magra, disminución de peso o de la relación peso-talla, mejoría del tono y la fuerza muscular que se refleja por una mayor capacidad en hacer actividades físicas (correr, ir en bicicleta, subir escaleras), aumento del gasto energético en un 25%⁴³. Desde el año 2003 se añade alguna restricción para su uso como la presencia de obesidad severa (exceso de peso/altura >200%) o problemas respiratorios como las apneas del sueño u obstrucción de la vía aérea superior. La dosis aceptada es de 1mg/m²/día (0,034 mg/Kg/día)⁴⁴.

Debe realizarse una polisomnografía antes de empezar el tratamiento con GH, al mes y medio, a los 6 meses y al año

Es necesario evaluar la existencia de problemas previos al inicio del tratamiento, así como durante el mismo para detectar precozmente su empeoramiento o aparición y poderlo tratar. No es necesario suspender la GH, sólo disminuir la dosis en algunos casos graves y ver evolución⁴⁴.

En los adultos con PWS, en nuestro país, no está indicado el tratamiento con GH.

2.4. Hipogonadismo

El hipogonadismo es hipogonadotrópico y se manifiesta con hipoplasia genital, desarrollo puberal incompleto e

infertilidad. La adrenarquia precoz se observa en el 20% de pacientes; la criptorquidia uni- o bilateral en el 80–90% de los varones³.

Se recomienda la intervención quirúrgica durante el primer o segundo año de vida. Raramente se ha observado degeneración maligna testicular en el PWS.

En la pubertad, se sugiere la administración de tratamiento hormonal sustitutivo, para la prevención de la osteoporosis, tratamiento que hace falta individualizar en cada paciente. El tratamiento se suele iniciar a los 11-12 años en las chicas y a los 12-13 años en los chicos. La decisión de tratar el hipogonadismo en las chicas dependerá también del grado de madurez e independencia, de la capacidad de llevar una buena higiene con la menstruación y del grado de comportamiento obsesivo que ésta les genere. Los chicos adolescentes con PWS se pueden tratar con dosis bajas de testosterona transdérmica (gel o parche, preferiblemente) con aumento progresivo de dosis cada 3-6 meses para conseguir unos niveles de testosterona dentro de los límites bajos de la normalidad. También se pueden tratar con gonadotropina coriónica (hCG). Este tratamiento provoca un aumento de la producción de su propia testosterona, aumenta el volumen testicular y la masa magra sin provocar cambios de carácter ni agresividad⁷.

2.5. Desarrollo psicomotor

El retraso motor es constante

consiguiendo la mayoría la sedestación a los 12 m y la marcha a los 24 m, también es frecuente el retraso de lenguaje al que contribuye los problemas fonatorios, el retraso cognitivo se sitúa en el rango de leve en la mayoría (CI: 60–70⁶). La intervención precoz con programas individualizados (fisioterapia, logopedia, habilidades sociales,...) permite conseguir alguna mejoría.

2.6. Trastornos de conducta y psiquiátricos

Hay un patrón de conducta característico a partir de la infancia en forma de rabietas, rigidez, manipuladores, conductas compulsivas, TEA (25%), TDAH,...⁶. La educación parental es muy importante puesto que la intervención sobre la conducta va a depender de la habilidad de los cuidadores para facilitarle un entorno lo suficientemente estructurado para que actúe como controlador de la impulsividad, y en la habilidad para dejar su mente estructurada de tal forma que las dificultades cognitivas no se conviertan en un obstáculo. Las últimas investigaciones sugieren que una intervención basada en la enseñanza de estrategias a los cuidadores para no permitir que el niño con PWS establezca rutinas, podría minimizar las explosiones conductuales durante la adolescencia y la etapa adulta. Se recomienda atención psicológica y, en algunos casos, medicación psicotrópica.

El trastorno mental está presente en el 5–10% de los adultos jóvenes³, por lo que la evaluación y el seguimiento psiquiátrico son uno de los elementos clave en el PWS.

2.7. Alteraciones de la respiración

La debilidad muscular torácica, la hipotonía, la disminución del tono muscular en la vía aérea superior, la obesidad y la escoliosis van a ser factores que contribuyen a la presentación de apnea obstructiva del sueño; apnea central del sueño; ronquera; somnolencia durante el día; infecciones respiratorias de repetición³. La valoración por los especialistas de otorrinolaringología y/o neumología, el control de la obesidad y el estudio del sueño mediante polisomnografía permitirán controlar estas manifestaciones.

2.8. Otras características

Para el manejo de la osteoporosis se recomienda:

- tratamiento con suficiente aporte de calcio y vitamina D en la dieta y si los niveles de vitamina D no llegan a los deseados (>30 ng/mL), se debe suplementar con esta vitamina por vía oral.
- actividad física.
- en la adolescencia el tratamiento sustitutivo con hormonas sexuales juega un papel crucial en el mantenimiento de la densidad mineral ósea.
- El tratamiento con GH en la infancia también es beneficiosa en este sentido para mejorar la hipotonía y así poder contribuir a aumentar la actividad física y en consecuencia la masa ósea.

- En la edad adulta, se deben realizar controles anuales de calcio y vitamina D en sangre y cada 2 años o más, una densitometría ósea.

El tratamiento para el estrabismo es igual al de la población general

En el caso del manejo bucodental, ante la presencia de saliva escasa y espesa:

- La higiene bucal es muy importante
- El uso de pasta dentífrica y otros productos para la salivación es beneficioso.
- La ortodoncia generalmente se hace necesaria y el tiempo de duración puede ser complicado debido a su periodo de crecimiento prolongado.
- Poca sensación de sed, lo que contribuye a la densidad elevada de la saliva y les hace más propensos a deshidratarse en épocas de temperaturas elevadas. Es necesario educarles a tomar agua regularmente durante el día.

La disminución de la sensibilidad al dolor, se observa en muchos niños, el interés reside en que problemas importantes pueden pasar desapercibidos como por ejemplo una fractura.

La termorregulación puede no ser normal, es más frecuente la hipertermia que la hipotermia, se observa en enfermedades leves y durante las anestias. También puede observarse sin causa aparente.

Presentan incapacidad para el vómito, por ello la administración de jarabe

de ipecacuana para provocar el vómito tras una ingestión accidental no suele ser efectivo y varias dosis producen toxicidad.

El hurgarse las heridas es un trastorno de conducta. Lo mejor es ignorarlo y darle actividades en que necesite usar las manos. Alternativamente, ponerles ropa protectora. En algunos casos puede llegar a requerir tratamiento farmacológico.

Para el despistaje de la diabetes se debe realizar una determinación de glucosa en sangre venosa en ayunas, en la analítica de rutina que se vaya haciendo anualmente. La HbA1c también puede ser útil. No es necesaria la realización de un test de tolerancia oral a la glucosa si los dos parámetros anteriores son normales. El tratamiento de la diabetes debe seguir las indicaciones de las guías recomendadas por las sociedades internacionales para el tratamiento de la diabetes tipo 2 con obesidad⁴⁵. El buen control de la diabetes reduce el riesgo de la aparición de complicaciones crónicas renales, retinianas y vasculares.

La HTA puede aparecer en un 38% de los pacientes adultos¹⁵. No existen datos sobre el fármaco de elección, se seguirán las pautas habituales según las guías de HTA.

3. Diagnóstico diferencial

La clínica del PWS es muy rica y variada, cambiando a lo largo de la vida del paciente, serán muchos los síndromes que pueden confundirse

con parte del fenotipo del PWS. La evaluación clínica por un experto, es necesaria para indicar las pruebas genéticas y evitar gastos innecesarios⁶.

3.1. Hipotonía neonatal

Además de los síndromes detallados a continuación, podemos encontrar casos de sepsis neonatal o depresión sistema nervioso central.

3.1.1. Distrofia miotónica congénita tipo 1 (MIM 160900)

Antes del nacimiento puede presentarse con polihidramnios y movimientos fetales reducidos; al nacer presentan debilidad generalizada grave, hipotonía, afectación respiratoria y hasta en un 50% se observa pies equinovaros u otras contracturas. La mortalidad por insuficiencia respiratoria es alta, en los que sobreviven la discapacidad intelectual es común (50-60%), hay una mejoría importante de la función motora, pueden andar, comer y respirar. La causa reside en la expansión del triplete CTG del gen *DMPK* por encima de 1000 repeticiones^{6,46}.

Otras neuropatías y miopatías, incluyendo la **atrofia muscular espinal (MIM 253300)**, en la mayoría de estas situaciones se añade a la hipotonía la disminución del trabajo respiratorio del recién nacido, hecho no observado en el PWS⁶.

3.1.2. Síndrome de Angelman (MIM 105830)

Al nacer puede presentarse con hipotonía

neonatal e hipopigmentación de piel y cabello, luego se hace evidente una discapacidad intelectual grave, con afectación del habla, ataxia y fenotipo conductual específico con apariencia feliz, carcajadas y fácil excitabilidad. La epilepsia y la microcefalia son comunes⁴⁷.

La causa del Síndrome de Angelman, reside en la ausencia de expresión de la copia materna del gen *UBE3A*, localizado en la región 15q11-q12 (ver capítulo 6) sometida a impronta genómica, región cromosómica común para los síndromes de Angelman y Prader-Willi.

3.1.3. Síndrome X-Frágil (MIM 300624)

Se caracteriza por discapacidad intelectual moderada en varones y leve en mujeres afectadas. El trastorno de espectro autista es común. El diagnóstico diferencial con el PWS se plantea por la hipotonía neonatal que pueden presentar⁴⁸. Más del 99% de los individuos con síndrome de X frágil tienen una mutación por un aumento del número de repeticiones de trinucleótidos CGG (normalmente >200) lo que provoca la metilación del gen *FMRI* y la ausencia de la proteína FMRP.

3.2. Hipotonía en la infancia

3.2.1. Síndrome de Rett (MIM 312750)

En la infancia, **los trastornos relacionados con *MECP2*** se pueden presentar con hipotonía, obesidad, y

ginecomastia, así como la discapacidad intelectual. A partir de las edades de seis a 18 meses, las niñas afectadas entran en un corto período de falta de progreso seguida de rápida regresión en las habilidades lingüísticas y motrices. El sello distintivo de la enfermedad es la pérdida del uso de las manos con propósito y su sustitución por movimientos estereotipados repetitivos de las mismas. Las personas afectadas carecen de los problemas característicos de succión, hipogonadismo y la apariencia facial de PWS⁶.

3.3. Discapacidad intelectual, obesidad sin hipogonadismo

3.3.1. Síndrome de Angelman (MIM 105830)

Un subgrupo presenta obesidad, por ello delante de un niño con hipotonía muscular, obesidad y discapacidad intelectual, hay que diferenciar entre las dos entidades⁴⁹.

3.3.2. Síndrome X-Frágil (MIM 300624)

Hay un pequeño grupo con hiperfagia y obesidad aunque sin hipogonadismo^{48,50}.

3.3.3. Disomía uniparental cromosoma 14 materna (MIM 616222)

Se caracteriza por bajo peso al nacer, hipotonía y retraso motor, dificultades para la alimentación. En el 49% hay obesidad, y a diferencia del PWS hay una pubertad precoz⁵¹ (para más información, ver capítulo 5)

3.3.4. Albright hereditary osteodystrophy (MIM 103580)

Comparten con el PWS la talla baja, la obesidad, y el retraso intelectual, pero no presentan hipotonía y la apariencia facial característica es diferente (ver capítulo 8)⁶.

3.4. Discapacidad intelectual, obesidad con hipogonadismo

3.4.1. Síndrome de Bardet-Biedl (MIM 209900)

Pertenece al grupo de las ciliopatías, de transmisión autosómica recesiva, genéticamente heterogéneo, se caracteriza por retinitis pigmentosa, obesidad, disfunción renal, polidactilia, trastornos de la conducta e hipogonadismo. Los avances mediante secuenciación de próxima generación (NGS) han permitido identificar 17 genes que permiten confirmar molecularmente al 80% de los pacientes⁵².

3.4.2. Síndrome de Cohen (MIM 216550)

El aspecto facial es muy característico con fisuras palpebrales oblicuas hacia abajo, surco nasolabial corto, grandes incisivos centrales, dedos afilados, y discapacidad intelectual. La microcefalia, la retinopatía pigmentaria progresiva, la miopía severa y la neutropenia intermitente también están presentes. Se debe a mutaciones en el gen *COH1* de herencia autosómica

recesiva. Muy frecuente en la población finlandesa. La obesidad, aunque se menciona con frecuencia como un hallazgo característico, es insignificante⁵³.

3.4.3. Síndrome de Borjeson-Forsman-Lehmann (MIM 301900)

Se caracteriza por déficit cognitivo severo, epilepsia, hipogonadismo, marcada obesidad, hipotonía infantil, falta de crecimiento y baja estatura. Se distingue por la severidad de la discapacidad intelectual, la presencia de nistagmus, y la apariencia facial característica con prominentes arcos superciliares, ptosis y los ojos hundidos. Se debe a mutaciones en el gen *PHF6* localizado en el cromosoma X, la herencia es ligada al cromosoma X. Las mujeres portadoras por lo general no se ven afectadas o muy poco.

3.4.4. Síndrome de Alstrom (MIM 203800)

Es un trastorno autosómico recesivo caracterizado por una distrofia de conos y bastones progresiva que conduce a ceguera, hipoacusia neurosensorial, obesidad infantil, hiperinsulinemia y diabetes mellitus tipo 2 asociada a *acantosis nigricans*, discapacidad intelectual en el 50% de los individuos. En el 70% de los casos hay miocardiopatía dilatada. La enfermedad renal grave aparece en el adulto. Mutaciones en el gen *ALMS1*⁵⁴.

3.5. Alteraciones cromosómicas en individuos con fenotipo PWS-like

Se han identificado las siguientes alteraciones cromosómicas en pacientes con fenotipo similar al del PWS: del 1p36; del 2q37.3; del 6q16.2; del 3q27.3; del 10q26; dup 3p25.3.3p26.2; dup Xq27.2-ter

4. Alteraciones genéticas asociadas

El Síndrome de Prader Willi (PWS) está causado por anomalías genéticas que afectan a la expresión de genes de la copia paterna de la región cromosómica 15q11-q13. Esta región se halla regulada por el mecanismo de la impronta genómica, ello conlleva a que la ausencia de expresión de los genes de origen paterno no pueda ser complementada por estos mismos genes de origen materno debido a que se encuentran silenciados por factores epigenéticos^{55,56}.

4.1. Región cromosómica 15q11-q13

La región 15q11-q13, con una longitud de alrededor 6Mb, se encuentra flanqueada por duplicones, secuencias de repetición de corta longitud, que originan tres puntos de rotura (BP: *break points*) comunes, dos proximales (BP1 y BP2) y uno distal (BP3). Esta región se puede dividir virtualmente en tres partes de acuerdo con los puntos de

rotura. La región proximal sin impronta, entre BP1 y BP2, contiene cuatro genes de expresión biparental, *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* y *GCP5*. La región con dominio de impronta ocupa 4Mb, entre BP2 y BP3, contiene cinco genes de expresión paterna, *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *C15orf2* (expresión paterna en tejido cerebral fetal)^{57,58} y *SNURF-SNRPN* (*Upstream Reading Frame-Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N*) que incluye varios *small nucleolar-RNA* (snoRNAs), *SNORD64*, *SNORD107*, *SNORD108*, *SNORD109A*, *SNORD109B*, *SNORD116* y *SNORD115*; y dos genes *UBE3A* y *ATP10* de expresión materna (Figura 3A). La expresión monoalélica de *UBE3A* es específica de algunas regiones del cerebro y cerebelo y en el resto de tejidos es bialélica (Figura 3B). La región distal sin impronta, entre BP2 y BP3, incluye genes de expresión bialélica, como las tres subunidades de los receptores del ácido gammaminobutírico (*GABRB3*, *GABRA5* y *GABRG3*), *OCA2* (gen del albinismo oculocutáneo tipo II) y *HERC2*⁶ (Figura 3A y 3B).

4.2. El centro regulador de la impronta en 15q11-q13

El IC de la región cromosómica 15q11-q13 presenta dos regiones críticas que son necesarias para el cambio de impronta en la línea germinal. La primera, de 4,3 kb denominada PWS -*Smallest Region of deletion Overlap* (PWS-SRO), incluye la región promotora y el exón 1 del gen *SNURF-SNRPN* y se ha definido

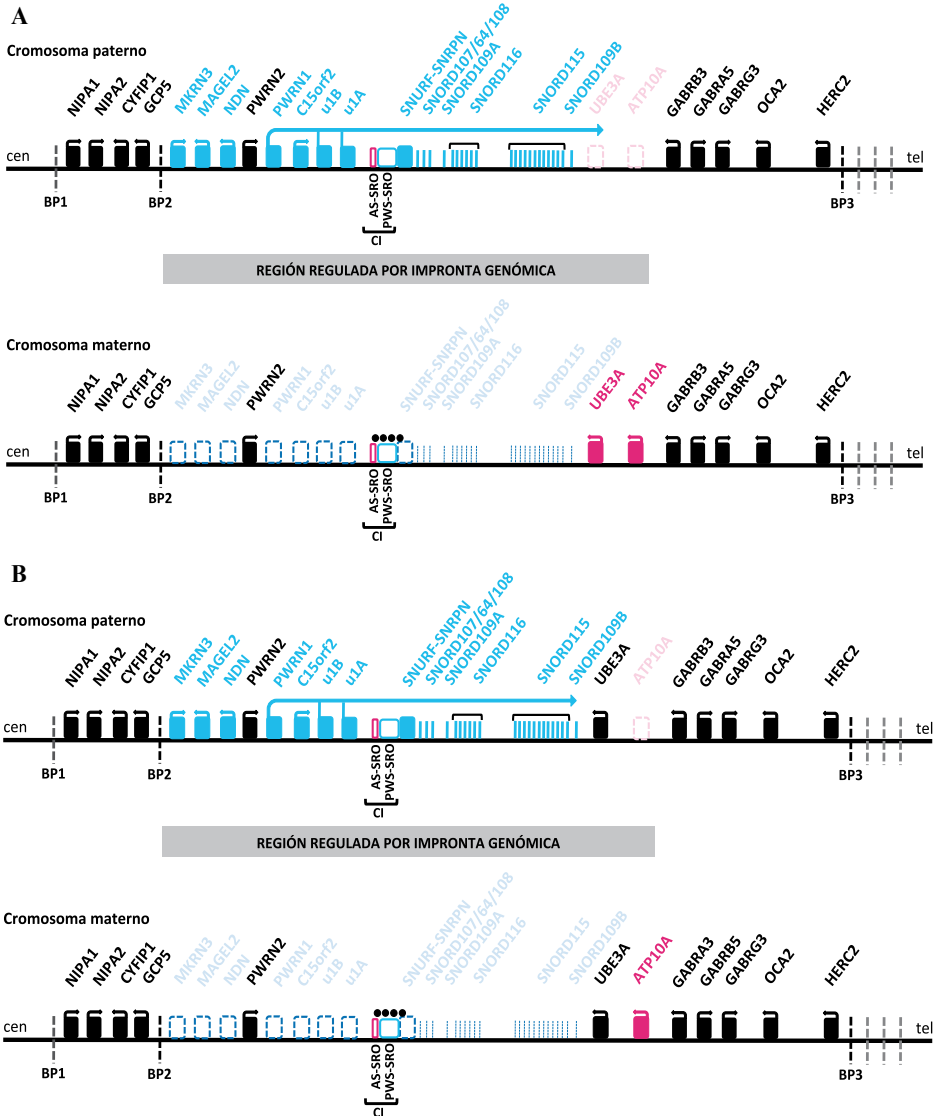


Figura 3: Esquema de la región cromosómica 15q11-q13 y patrón de expresión de los genes contenidos en esta región en **(A)** determinadas regiones del cerebro y cerebelo y **(B)** en el resto de tejidos. Se representan el cromosoma 15 paterno (parte superior de la figura) y el cromosoma 15 materno (parte inferior de la figura) y se indica la región de 2 Mb regulada por impronta genómica. Las dos regiones AS-SRO y PWS-SRO que constituyen el IC se indican en recuadros blancos enmarcados con línea rosa y azul, respectivamente. Recuadros azul: genes de expresión paterna; recuadros rosa: genes de expresión materna; recuadros negros: genes de expresión bialélica; líneas verticales en azul: snoRNAs contenidos en el transcrito SNURF-SNRPN; flechas horizontales: orientación de la transcripción; en blanco enmarcados con líneas discontinuas de color atenuado: genes no expresados en uno u otro cromosoma; líneas discontinuas verticales en azul: snoRNAs no expresados en el cromosoma materno; líneas negras verticales discontinuas: BPs más frecuentes; líneas grises verticales discontinuas: BPs menos frecuentes. Círculos negros: metilación del DNA.

por el solapamiento de deleciones presentes en el IC en familias PWS. La segunda, de 880 pb llamada *Angelman Syndrome-Smallest Region of deletion Overlap* (AS-SRO) es la región común delecionada en familias con AS. En el cromosoma 15 materno, el IC de la región cromosómica 15q11-q13 está metilado causando la inactivación de los genes de expresión paterna y permitiendo por tanto la expresión de *UBE3A*, mientras que en el cromosoma paterno la expresión del largo transcrito *SNURF-SNRPN* de más de 600kb se inicia en el exón 1 de *SNURF* y se extiende hasta *UBE3A*, impidiendo la transcripción de *UBE3A* en el cerebro⁵⁹⁻⁶¹ (Figura 3A). A diferencia de los genes de expresión paterna y del gen *ATP10A* de expresión materna, la expresión materno-específica de *UBE3A* en el cerebro no se regula mediante metilación del DNA. Diversos trabajos demostraron que el silenciamiento de la copia paterna de este gen en el cerebro es consecuencia de la expresión antisentido de este largo transcrito⁵⁹⁻⁶⁴ (Figura 3A).

El PWS se ha considerado un síndrome genómico o multigénico causado por la pérdida funcional de los genes sometidos a impronta, con expresión paterna. Sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que el gen *SNORD116* es determinante en el desarrollo de las características principales del fenotipo PWS^{65,66}, aunque no se descarta que otros genes adicionales como *MAGEL2* puedan contribuir^{67,68}. Muchas de las manifestaciones del PWS son causadas por una deficiencia funcional del hipotálamo⁶⁹, pero aún no se conoce

bien su relación con los genes críticos del PWS de la región con impronta.

El gen *MKRN3* codifica una proteína con dedos de zinc RING (C3HC4) y diversos dedos de zinc C3H, por lo que se le predice una posible función de ribonucleoproteína⁷⁰. La sobre-expresión del gen *NDN* en experimentos *in vitro* provoca supresión de la proliferación celular, sugiriendo un papel en la promoción de la diferenciación y la supervivencia de neuronas postmitóticas⁷¹. *MAGEL2* codifica una proteína de la familia *MAGE* (*Melanoma Associated Antigen*) implicada en las vías de señalización de la modulación y degradación proteica, citoesqueleto y transcripción con expresión en neuronas. Recientemente, se han descrito mutaciones puntuales en el gen *MAGEL2* del cromosoma paterno en cuatro pacientes con distintas características de PWS y autismo. Entre ellos hay un caso de PWS típico y el resto presentan varios de los criterios clínicos frecuentes, como la hipotonía neonatal, dificultades de alimentación, hiperfagia, hipogonadismo y discapacidad intelectual⁶⁸.

El gen más complejo es el locus *SNURF-SNRPN*, es policistrónico ya que codifica dos polipéptidos además de formar parte del IC de la región 15q11-q13 y contener los snoRNAs codificados en regiones intrónicas de esta compleja unidad de transcripción. Los exones 1-3 codifican para *SNURF* de función desconocida y los exones 4-10 codifican para la proteína SmN implicada en el *splicing* del mRNA en el cerebro⁷². Los distintos snoRNAs presentan una copia única a

excepción de *SNORD115* y *SNORD116* que presentan múltiples copias en tándem. En general los snoRNA están involucrados en la modificación del ARN ribosómico^{73,74} aunque se desconoce las dianas sobre las que actúan y en la regulación génica.⁷⁵ Este largo transcrito también contiene en la región distal exones *IPW* alternativos (*IPW116* y *IPW115*) específicos de neuronas^{76,77}.

Como hemos mencionado, se ha podido acotar que el gen *SNORD116* es un factor clave en la etiología del PWS. Se han descrito distintas translocaciones recíprocas que implican al gen *SNORD116*⁷⁸ y tres casos con microdeleciones (175-236kb) que incluyen dicho gen^{65,66,79}. Los tres pacientes presentan los criterios clínicos típicos del PWS, como la hipotonía, hipogonadismo, problemas de alimentación en la infancia, hiperfagia a los dos años, discapacidad intelectual y problemas de conducta. Sin embargo, también manifiestan otras características atípicas como una elevada talla en el percentil 95, perímetro craneal por encima del rango normal, o sin el gestalt facial de PWS. En cuanto a *SNORD115* parece poco probable que regule el procesamiento del pre-mRNA del receptor de serotonina (5HT2C) como se había reportado hasta el momento⁸⁰.

4.3. Mecanismos moleculares

Los mecanismos moleculares principales que originan el PWS son tres:

* Deleción de la región 15q11-q13 (Figura 4A) en el cromosoma 15 de origen paterno, se encuentra en la mayoría de los casos (65-75%). Incluye el dominio completo con impronta y otros genes sin impronta^{81,82}. La deleción es bastante común, ocurre en una frecuencia cerca del 1/10000 recién nacidos y se produce como consecuencia de una recombinación homóloga desigual entre los bloques de secuencias repetitivas de 250-400kb que definen los puntos de rotura comunes. Hay dos tipos de deleciones, la deleción tipo I (BP1-BP3) de mayor longitud, alrededor de 6Mb, se encuentra en el 60% de los casos y la deleción tipo II (BP2-BP3) con una longitud alrededor de 4Mb en un 30%. En pocas ocasiones se han reportado deleciones atípicas de mayor longitud que pueden extenderse hasta puntos de rotura más distales, BP4 o BP5⁸³.

* Disomía uniparental materna [UPD(15)mat] (Figura 4B), los dos cromosomas 15 proceden de la madre y ninguno del padre, ocurre en el 20-30% de los casos. A menudo se origina por una no disyunción meiótica, que puede incrementarse con la edad materna, dando lugar a un oocito disómico para el cromosoma 15, después de la fertilización el embrión trisómico puede ser letal a menos que haya una pérdida del cromosoma 15 paterno post zigótica. Este proceso llamado

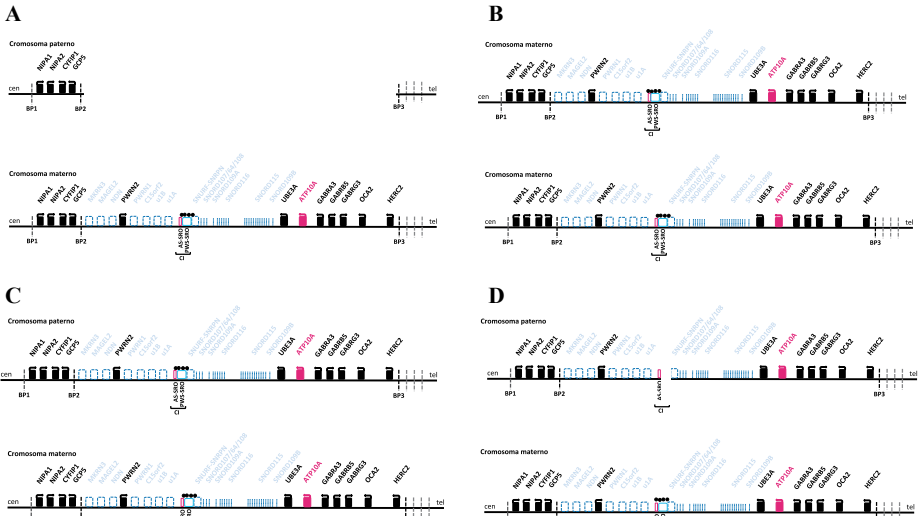


Figura 4: Esquema de las causas genéticas del PWS: **(A)** Delección 15q11-q13 en el cromosoma 15 paterno; **(B)** UPD(15)mat; **(C)** Defecto de impronta por anomalía epigenética (ausencia de metilación) en el cromosoma 15 paterno; **(D)** Defecto de impronta por delección del PWS-SRO en el cromosoma 15 paterno.

rescate de la trisomía ha sido bien documentado durante el diagnóstico prenatal, detectándose un mosaicismo para la trisomía 15 confinado a placenta⁸⁴⁻⁸⁶. Existen otros mecanismos más raros que pueden producir una UPD(15) mat por isodisomía en donde todos los genes son idénticos. Se forma a partir de una nulisomía del cromosoma 15 causada por no disyunción meiótica seguida de una duplicación post zigótica, por una translocación robertsoniana, por un isocromosoma o como consecuencia de cromosomas marcadores extras^{87,88}.

* Defecto de la impronta (Figura 4C), ocurre en el 1-3% de los casos. En este caso están presentes los cromosomas de origen materno y paterno pero se ha establecido una impronta genómica incorrecta.

El cromosoma paterno lleva una impronta materna silenciando los genes de expresión paterna en la región 15q11-q13. La mayoría de los defectos de impronta (85%) son ocasionados por errores epigenéticos. No se han encontrado cambios en la secuencia del DNA, y posiblemente se deba a un error en el proceso de borrado de la impronta materna durante la espermatogénesis en el padre⁵⁶. El mosaicismo somático es raro, solo hay tres casos reportados, y posiblemente resulta de un error post zigótico. En el 15% restante el defecto de impronta se origina por pequeñas delecciones (7.5-100kb) en el IC, PWS-SRO (Figura 4D). Son familiares en el 50% de los casos transmitiéndose a través del padre no afectado portador de la delección en el cromosoma

materno. La delección no permite restablecer la impronta paterna⁷⁸.

Con una frecuencia muy baja <1% la causa puede ser una reorganización cromosómica que afecte la región 15q11-q13 con alteración de la expresión paterna del gen *SNURF-SNRPN*.

4.4. Modelos animales

La creación de modelos animales ha sido de gran ayuda para conocer las implicaciones de los distintos genes en el amplio espectro fenotípico del PWS. Así, modelos de ratón con déficit de cada uno de los genes principales, *Snrpn-IC*, *Necdin*, *Magel2* y *Snord116* permiten confirmar que el fenotipo PWS es causado por la pérdida de expresión de varios genes y no de uno solo⁸⁹. Por ejemplo, ratones mutantes para *Snrpn-IC* son pequeños e hipotónicos al nacimiento, con retraso de crecimiento, retraso mental y problemas conductuales^{90,91}. Ratones con déficit de *Necdin* muestran un incremento del rascado de la piel y, alteraciones en el centro respiratorio que inducen un cambio de la frecuencia respiratoria con aparición de apneas frecuentes y una respuesta menguada a la hipoxia, comportamiento similar a la de neonatos con PWS⁹². En ratones *Magel2* hay una disfunción del eje hipotálamo-pituitaria con una disminución de las neuronas productoras de oxitocina que se relaciona con los problemas de succión en el neonato, ansiedad en el adulto y conducta anómala⁹³. Los ratones con delección de *Snord116* presentan un

retraso de crecimiento significativo que no es debido a un déficit aparente de la hormona de crecimiento. Podría tratarse de un efecto secundario a la desregulación del hipotálamo que generaría el fenotipo conductual de hiperfagia debido a una insensibilidad a la saciedad, consistente con niveles elevados de ghrelina⁹⁴.

Los estudios de expresión génica están evidenciando la importancia de *SNORD116*. Análisis de *Snord116* en tejido diseccionado de hipotálamo de ratón mediante hibridación *in situ* y PCR cuantitativa determinaron que la región que controla la ingesta de alimentos y regula el equilibrio energético es el núcleo arcuato. Estos resultados apoyan que *Snord116* pueda estar relacionado con los síntomas del trastorno del apetito y la obesidad⁹⁵. Por otro lado, la cuantificación de la expresión de genes codificantes y no codificantes (microRNA y snoRNA) en células linfoblastoides de pacientes PWS y pacientes con obesidades de distinta etiología, pone de manifiesto que en el PWS hay menos genes con expresión alterada respecto a las otras entidades. Esta disminución de la expresión corresponde a los transcritos de *SNRPN* (*PARI*, *IPW* y *SNORD116*)^{96,97}. Recientemente se ha observado que la estructura funcional de *SNORD116*, un *long non coding RNA* (*lncRNA*), regula la transcripción de genes importantes implicados en la transcripción y en el metabolismo diurno. Es interesante la observación de que la pérdida del *lncRNA* altera la homeostasis de la energía circadiana en ratones con *Snord* delecionado⁹⁸. En

este sentido, muchas de las hormonas hipotalámicas muestran una relación con el ritmo circadiano.

Un aspecto muy significativo es la reducción del número de neuronas productoras de oxitocina (42%) en los núcleos paraventriculares y supraópticos del hipotálamo⁹⁹. El modelo de ratón deficiente en el gen *Magel2* muestra que la alteración de oxitocina desde el nacimiento provoca cambios anatómicos y funcionales con consecuencias a largo plazo en aspectos conductuales del reconocimiento e interacción social y de las habilidades de aprendizaje. Toda esta información demuestra que la oxitocina está claramente implicada en el fenotipo, iniciándose tratamientos en animales y en humanos. La respuesta a la administración diaria de oxitocina durante la primera semana del nacimiento fue impedir la aparición de problemas conductuales en modelos animales. Ello ha sugerido que el tratamiento con oxitocina en el periodo crítico del desarrollo del cerebro puede ser una nueva aproximación para la terapia del trastorno del neurodesarrollo^{100,101}. Ensayos clínicos con administración de oxitocina intranasal obtienen resultados dispares. En el primero ensayo, se trataron con una única dosis a 24 pacientes con una edad media de 24 años y parece que algunos aspectos mejoraron tales como la confianza en los otros, menor tristeza y disminución de la conducta disruptiva¹⁰². Mientras que en el segundo ensayo no se observó ningún efecto en 30 pacientes de 12 a 30 años tratados con la misma dosis del ensayo anterior

en dos tandas durante 8 semanas¹⁰³. Son necesarias más investigaciones para explorar el sistema de administración de la oxitocina y es conveniente iniciar el tratamiento más precozmente.

Los avances en el conocimiento de la historia natural y los datos recientes en genética, acotando los genes más relevantes, abren nuevas perspectivas para entender la disfunción metabólica y endocrina y posiblemente la vía para tratamientos de terapia génica.

5. Estudios moleculares

El conocimiento de la causa genética del PWS es imprescindible para poder orientar un pronóstico clínico, iniciar el tratamiento con hormona de crecimiento y ofrecer un consejo genético ya que el riesgo de recurrencia varía en función del mecanismo etiológico. En el año 1996, la *American Society of Human Genetics (ASHG)*, conjuntamente con el *American College of Medical Genetics (ACMG)*, ya propusieron las aproximaciones necesarias para el diagnóstico del AS y del PWS¹⁰⁴. El algoritmo inicialmente propuesto se ha completado de acuerdo con el desarrollo y mejora de las técnicas moleculares. Frente a la sospecha clínica del PWS y teniendo en cuenta la frecuencia de las diferentes causas genéticas, es recomendable iniciar el estudio molecular analizando la metilación del DNA del IC de la región cromosómica 15q11-q13.

El test de metilación permite confirmar el diagnóstico de PWS en casi el 100% de los casos. Además diferencia el

PWS del AS, siendo ello importante para algunos casos de Angelman diagnosticados clínicamente de Prader Willi por presentar características clínicas similares como la hipotonía, dificultades en la alimentación, retraso del desarrollo y obesidad^{105,106}.

- Los **estudios de metilación del DNA** permiten valorar el patrón de metilación en las islas CpG de las región promotoras diferencialmente metiladas de los genes *SNURF-SNRPN* y *NDN*; no metiladas en el alelo paterno y metiladas en el alelo materno (Figura 3A y 3B). El patrón de metilación característico del PWS se identifica por la presencia del alelo metilado (materno) y ausencia del alelo no metilado (paterno). Con ello se identifican el 99% de los casos PWS, aquellos causados por una delección de la región 15q11-q13, por una UPD(15)mat o por un defecto de impronta (ver Figuras 4A-4D). La aplicación de técnicas complementarias permite diferenciar entre estas etiologías.

Los estudios de metilación del DNA se basan en la aplicación de la técnica de MLPA específica de metilación, *Methylation Specific-Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MS-MLPA)* o bien en la amplificación por PCR específica de metilación, *Methylation Specific-PCR (MS-PCR)*:

- **MS-MLPA**, es el método de elección debido a las ventajas que presenta el poder analizar varias causas genéticas con una

única metodología. Permite la identificación de la metilación de dos genes, *SNURF-SNRPN* y *NDN*, a la vez que detecta cambios en el número de copias de numerosos loci de la región cromosómica 15q11-q13, desde el gen *TUBGCP5* hasta *APAB2*, de manera semicuantitativa^{107,108}. El kit comercial ME028 de *MRC Holland*, contiene 32 sondas específicas de la región crítica 15q11-q13 y 14 sondas control de fuera de la región (cromosoma 15 y otros cromosomas). Se pueden identificar distintas delecciones: tipo I, tipo II, y entre las atípicas la tipo III que incluye el gen *APBA2* y aquellas de menor tamaño que contienen al gen *SNORD116*. Asimismo, algunas de las sondas internas se diseñan complementarias a la región *AS-SRO* del IC a fin de poder cuantificar la dosis génica e identificar posibles delecciones que afecten únicamente a la región *AS-SRO* del IC. Además, es posible identificar la metilación en solo un alelo (patrón normal), o metilación en los dos alelos (patrón característico del PWS) o ausencia de metilación (patrón de característico del AS).

Con un resultado indicativo del 100% de metilación y la mitad del número de copias de los loci dentro de la región crítica 15q11-q13 respecto al control, es posible concluir que la delección de la región 15q11-q13 es la causa del PWS. La presencia de la mitad

de copias en la región *PWS-SRO* y una dosis normal en el resto de sondas internas de la región 15q11-q13, permite concluir que el PWS está causado por un defecto de impronta resultante de delección en el IC. Si se obtiene un número de copias normal en todos los *loci* analizados dentro de la región 15q11-q13 y un patrón de metilación compatible con el PWS debe realizarse un estudio de microsatélites (polimorfismos del DNA) para diferenciar el PWS causado por una UPD(15)mat de un defecto de impronta causado por un error epigenético *de novo* (Figura 5). Al tratarse de una técnica cuantitativa, la *MS-MLPA* permite la identificación del defecto de impronta en mosaico.

- **MS-PCR**, para la detección de la metilación del gen *SNURF*: un resultado positivo de PWS se identifica con la presencia de una banda de amplificación específica del alelo materno metilado y ausencia de la banda de amplificación correspondiente al alelo paterno no metilado. Para determinar la etiología el estudio se debe proseguir mediante técnicas complementarias. La sensibilidad de detección de ambos alelos es importante para poder detectar defecto de impronta en mosaico con el diseño de oligonucleótidos adecuado⁹⁶.

- La **técnica de FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*)** con sondas específicas de la región, permite identificar la delección de la región

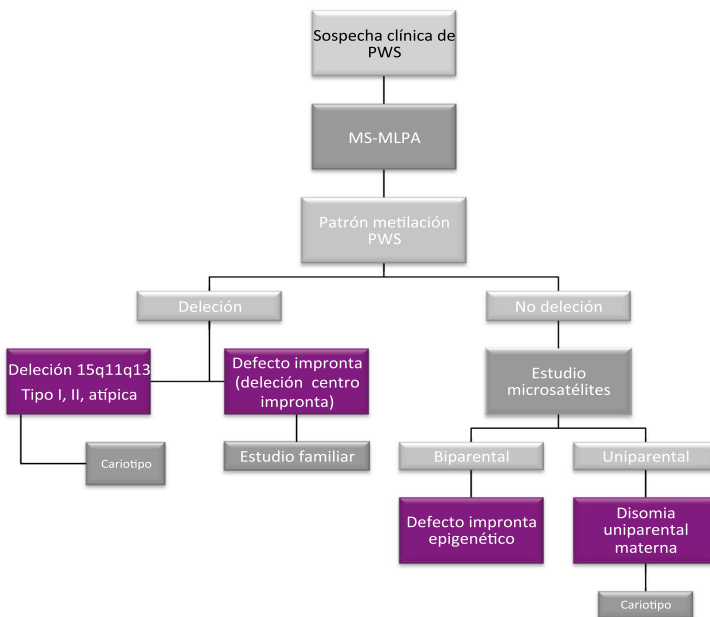


Figura 5: Algoritmo diagnóstico del PWS mediante MS-MLPA como técnica de análisis del patrón de metilación y de delecciones. El algoritmo se completa mediante el análisis de microsatélites.

15q11-q13. En la actualidad la técnica de microarray de hibridación genómica comparada (aCGH), utilizada en genética clínica para el análisis de variantes de número de copias (deleciones y duplicaciones), permite diagnosticar los distintos tipos de deleción tanto las comunes como las atípicas y conocer su tamaño.

- Para el **análisis de microsatélites** se utilizan distintos loci internos de la región 15q11-q13 y externos a la misma. Esta técnica permite diferenciar si ambos cromosomas 15 provienen del mismo origen parental (dos cromosomas maternos) o de origen biparental (cromosomas materno y paterno). Cuando el PWS es causado por una UPD(15)mat, esta puede ser por heterodisomía (los dos alelos maternos) o por isodisomía (el mismo alelo duplicado). Los microarrays de alta densidad con polimorfismos de nucleótido único (SNP) pueden proporcionar información sobre la presencia de isodisomía, además de informar sobre las deleciones. Si previamente se ha descartado la deleción del IC, se tratará de un caso esporádico por un defecto de impronta epigenético.

6. Correlación genotipo-fenotipo

La expresión clínica de los pacientes con Síndrome de Prader-Willi es heterogénea, afecta a múltiples sistemas y la mayoría de las afectaciones están

relacionadas con una disfunción hipotalámica. Según el mecanismo genético, las características clínicas pueden variar en severidad y en frecuencia de presentación.

6.1. Deleción en 15q11

Los pacientes con deleción son los que presentan el fenotipo más grave ya que se ha perdido un gran fragmento de ADN donde, además de los genes asociados con el PWS y regulados por impronta genómica, se encuentran otros genes. Una sola copia de estos otros genes explicaría que los pacientes con deleción de tipo I, la de mayor tamaño, presenten más problemas psicológicos, de comportamiento, menor habilidad en la lectura, matemáticas e integración visual motora que los pacientes con deleción de tipo II. La diferencia entre estas dos deleciones es un fragmento de aproximadamente 500Kb, distancia entre el BP1 y el BP2, en la que se han localizado los genes, *NIPAI*, *NIPA2*, *CYFIP1* y *GCP5*, no regulados por impronta, que estarían implicados en las diferencias fenotípicas entre los pacientes con deleción de tipo I respecto a las otras causas genéticas¹⁰⁹.

En los pacientes con deleción, el coeficiente intelectual es ligeramente más bajo, en cambio la habilidad por los rompecabezas es mayor que el grupo con UPD(15)mat. La conducta de rascarse la piel, agresión, hiperfagia, así como un umbral alto para el dolor y alteraciones articulares son más frecuentes y severas en los pacientes con deleción¹¹⁰. Comparando los casos con deleción tipo I y deleción tipo II

se encuentran pequeñas diferencias con un comportamiento adaptativo peor, mayor compulsividad y menor habilidad intelectual en las de tipo I¹¹¹. Estas diferencias se deben a los genes no regulados por impronta genómica, incluyendo el gen *CYFIP1* que está implicado en el desarrollo y mantenimiento de las estructuras neuronales¹¹². También se ha descrito una mayor severidad de los problemas conductuales y psicológicos con comportamiento obsesivo-compulsivo y un déficit mayor en las habilidades adaptativas en los casos con delección tipo I respecto a los casos con delección tipo II o UPD(15)mat^{113,114}.

De acuerdo con la mayoría de estudios publicados la hipopigmentación está asociada a los casos con delección por la pérdida del locus P (*Pink eye dilution*) localizado distalmente en la región crítica del albinismo oculocutáneo tipo II (OCA2). Hasta un 27% de los pacientes pueden no presentar hipopigmentación, la delección del locus P sería necesaria pero no suficiente para producir hipopigmentación en el grupo de pacientes con delección¹¹⁵.

Dykens *et al.*¹¹⁶ compararon a 23 personas con PWS debido a UPD(15) mat emparejados por edad y sexo con 23 pacientes con PWS debido a delección paterna. Observaron que los pacientes con delección paterna mostraban mayores puntuaciones en conductas mal adaptativas, niveles significativamente mayores de problemas y mayor estrés en relación a las conductas compulsivas. Así como, estaban más aislados, comían con mayor exceso, mostraban más

conductas de acaparamiento y acumulación, presentaban onicofagia y, eran más propensos a estar de mal humor y a pellizcarse. Symons *et al.*,¹¹⁷ también reportaron que los pellizcos a la piel eran más frecuentes en el grupo de pacientes con delección paterna.

Torrado *et al.*, evaluaron los desórdenes del sueño mediante estudios polisomnográficos en pacientes PWS, mostrando que el grupo de pacientes con delección presentaban más desaturaciones $\geq 10\%$ asociadas a eventos centrales (apnea/hiponea central)¹¹⁵.

Se han descrito un 8% de delecciones atípicas, de menor o mayor tamaño, que podrían dilucidar el papel relevante de algunos genes de la región 15q11.2¹¹⁸. Se ha reportado un paciente con una delección de *SNURF-SNRPN* en mosaico que ha permitido corroborar que el gen *SNORD116* tiene el rol más importante en la patogénesis del PWS¹¹⁹.

6.2. Disomía

En los pacientes con UPD(15)mat, a diferencia de los pacientes con delección, no ha ocurrido la pérdida física de ADN, sino la pérdida funcional de genes regulados por impronta genómica que se encuentran silenciados por metilación. Otros genes dentro de esta región no se ven afectados y su expresión biparental o doble dosis puede explicar una manifestación ligeramente moderada del fenotipo¹²⁰.

Los individuos con UPD(15)mat presentan problemas de alimentación

de menor intensidad, un mayor coeficiente intelectual verbal y mayor habilidad para el cálculo numérico¹²¹. Los pacientes con UPD(15)mat y con defecto de la impronta a menudo desarrollan trastornos psiquiátricos, psicosis afectiva (76-100%) o trastornos del espectro autista en edad adolescente-adulta, mientras que en la deleción se manifiesta la depresión¹²². El origen de esta importante diferencia puede ser debida a una expresión elevada del gen *UBE3A* en el grupo de UPD(15)mat y defecto de impronta.

La alteración molecular en el centro de la impronta, bien por deleción o por defecto epigenético, causa un efecto muy parecido a la UPD(15)mat.

La utilización de estudios de imagen funcional mostró un mecanismo neuronal asociado a diferentes fenotipos de comportamiento en los subtipos genéticos de PWS. Las personas con deleción presentan problemas de comportamiento más graves que

aquellos con UPD(15)mat y además presentan una actividad cerebral aumentada y más extendida antes y después de comer que los pacientes con UPD(15)mat¹²³. También se ha descrito un menor volumen de sustancia gris en la corteza prefrontal, temporal y media en pacientes con deleción, mientras que los pacientes con UPD(15)mat el volumen de materia gris es inferior afectando al área orbitofrontal, límbica. Una disminución de materia gris en los ganglios basales en individuos con UPD(15)mat podría explicar la conducta obsesivo-compulsiva, así como podría desempeñar un papel en las habilidades cognitivas disminuidas^{124,125}. Recientemente Lukoshe et al. han estudiado la complejidad cortical utilizando la resonancia magnética con un nuevo enfoque en 3-D, el índice de girificación (LGI) que es la relación entre el área superficial del cerebro y el perímetro cerebral¹²⁶. Este índice es una buena medida de la

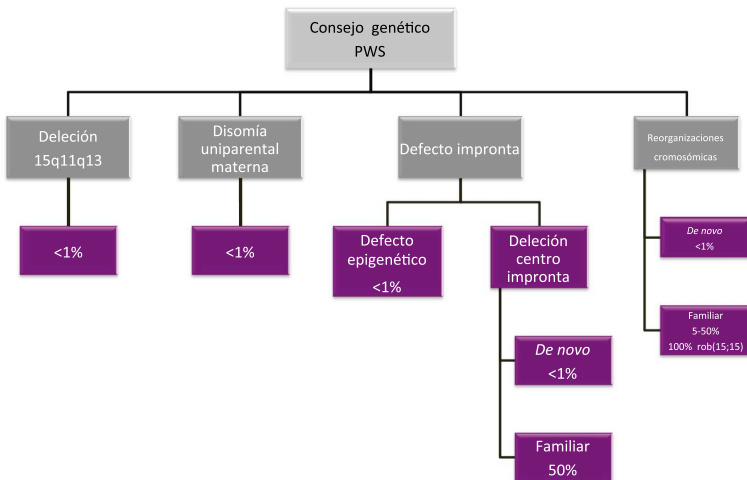


Figura 6: Riesgo de recurrencia en función del mecanismo etiológico del PWS.

organización intracortical así como de la conectividad cortico-cortical. Dos regiones en cada hemisferio tenían LGI inferiores en niños con PWS, en comparación con los controles sanos. Las regiones con menor LGI también tuvieron significativamente menor superficie cortical en niños con PWS. No se encontraron diferencias en el grosor cortical de los grupos entre el PWS y controles sanos. Los niños con UPD(15)mat presentaban LGI más bajas en el hemisferio derecho que los pacientes con deleción.

7. Asesoramiento genético

Para poder ofrecer un correcto consejo genético se debe determinar el mecanismo que ha ocasionado el PWS en el paciente. La mayoría son esporádicos aunque se han reportado raramente algunos casos familiares (Figura 6).

En los casos con una deleción 15q11-q13 o con una UPD(15)mat el riesgo de recurrencia es bajo, inferior al 1%⁷⁸. Sin embargo, en menos del 1% de los casos, la deleción deriva de una reorganización cromosómica equilibrada paterna, por lo que se recomienda realizar un cariotipo. El riesgo de recurrencia se estima del 5-50%, en función de la reorganización.

La mayoría de los pacientes con defecto de impronta son esporádicos (defecto epigenético) y por tanto el riesgo de recurrencia estimado es inferior al 1%. Mientras que en el defecto de impronta por deleción del IC, el 10-15% de casos son familiares. Es necesario realizar un estudio del padre para determinar si dicha alteración ha sido heredada, en esta situación el riesgo de recurrencia sería del 50%. Si el padre es portador de la deleción en el IC se debe estudiar a su madre (abuela paterna del caso índice). Si ésta fuese portadora, se debería considerar a las hermanas posibles portadoras. Para los hermanos del padre portadores también existiría el mismo riesgo del 50% para la descendencia. Para las hermanas, éstas podrían transmitir la alteración a la descendencia, hijos o hijas, en estado de portadores sanos^{6,78,127}.

El diagnóstico prenatal se recomienda para posteriores embarazos independientemente de la causa genética y de que el riesgo de recurrencia sea considerado bajo ya que se han descrito casos familiares con deleción intersticial o defecto de impronta por deleción, sugiriendo la presencia de un mosaicismo germinal de deleción en el padre^{6,78}. Se realizará el test de metilación en una muestra de ADN procedente de vellosidad corial (12-13 semanas de gestación) o bien de líquido amniótico (a partir de la 14 semana de gestación).

RESUMEN

El síndrome de Prader-Willi (PWS) es una enfermedad genética de discapacidad intelectual asociada a múltiples manifestaciones en otros sistemas del organismo.

Los pacientes afectados de PWS muestran hipotonía severa en el período neonatal que ocasiona dificultades para la alimentación. Posteriormente presentan hiperfagia, lo que conduce a una obesidad mórbida si no se controla. El hipogonadismo, la talla baja y los trastornos cognitivos conductuales están presentes en todos los individuos.

La prevalencia es de 1:10.000-1:30.000 recién nacidos, la mayoría de los casos de presentación esporádica.

El diagnóstico clínico es consistente, pero debe confirmarse mediante test genético, el PWS se debe a la ausencia de los genes que por impronta genómica se expresan en el alelo paterno en la región 15q11-q13.

El diagnóstico debe ser precoz para establecer un manejo efectivo y de larga duración y con ello conseguir mejor salud y calidad de vida para los pacientes.

El tratamiento con hormona de crecimiento ha supuesto un avance importante al mejorar el crecimiento, la composición corporal y la capacidad física del individuo.

REFERENCIAS

1. Holm VA, Cassidy SB, Butler MG et al. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* 1993;91:398-402.
2. Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordan MA, Cassidy SB. The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria. *Pediatrics* 2001;108:E92-
3. Cassidy SB, McCandless SE. Prader Willi syndrome. 2010;3:
4. Brun C. ¿Qué dificultades del habla y del lenguaje pueden presentar? 2013;106-110.
5. Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC et al. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2011;155A:1040-1049.
6. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med* 2012;14:10-26.
7. Giménez-Palop O. ¿Se debe tratar el hipogonadismo? 2013;
8. Caixàs A, Giménez-Palop O. Mecanismos de regulación del metabolismo energético. 2008;1-18.
9. Giménez-Palop O, Caixàs A. Evolución y perspectivas terapéuticas del síndrome de Prader-Willi en el adulto. En: Actualizaciones en endocrinología pediátrica. Editorial JC Ediciones Médicas SL 2008;99-113.
10. Corripio R. ¿Existe déficit de GH en los pacientes con SPW? 2013;
11. Eldar-Geva T, Hirsch HJ, Benarroch F, Rubinstein O, Gross-Tsur V. Hypogonadism in females with Prader-Willi syndrome from infancy to adulthood: variable combinations of a primary gonadal defect and hypothalamic dysfunction. *Eur J Endocrinol* 2010;162:377-384.
12. Hirsch HJ, Eldar-Geva T, Benarroch F, Rubinstein O, Gross-Tsur V. Primary testicular dysfunction is a major contributor to abnormal pubertal development in males with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:2262-2268.
13. de Lind van Wijngaarden RF, Otten BJ, Festen DA et al. High prevalence of central adrenal insufficiency in patients with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1649-1654.
14. Farholt S, Sode-Carlson R, Christiansen JS, Ostergaard JR, Hoybye C. Normal cortisol response to high-dose synacthen and insulin tolerance test in children and adults with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E173-E180.
15. Caixàs A. ¿Puede aparecer diabetes en el SPW? 2013;
16. Vogels A, De HM, Descheemaeker MJ et al. Psychotic disorders in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2004;127A:238-243.
17. Novell R, Esteba S, Caixàs A et al. Characteristics of repetitive behaviour related to OCD or OCS disorder in people with Prader Willi Syndrome. 8th IPWSO Conference 2013;
18. Clarke DJ. Prader-Willi syndrome and psychoses. *Br J Psychiatry* 1993;163:680-684.
19. Clarke DJ, Webb T, Bachmann-Clarke JP. Prader-Willi syndrome and psychotic symptoms: report of a further case. *Irish Journal of Psychological Medicine* 1995;12:27-29.
20. Clarke D, Boer H, Webb T et al. Prader-Willi syndrome and psychotic symptoms: Case descriptions and genetic studies. *J Intellect Disabil Res* 1998;42:440-450.
21. Beardsmore A, Dorman T, Cooper SA, Webb T. Affective psychosis and Prader-Willi syndrome. *J Intellect Disabil Res* 1998;42:463-471.
22. Verhoeven WM, Curfs LM, Tuinier S. Prader-Willi syndrome and cycloid psychoses. *J Intellect Disabil Res* 1998;42:455-462.
23. Descheemaeker MJ, Vogels A, Govers V et al. Prader-Willi syndrome: new insights in the behavioural and psychiatric spectrum. *J Intellect Disabil Res* 2002;46:41-50.
24. Whitman BY, Accardo P. Emotional symptoms in Prader-Willi syndrome adolescents. *Am J Med Genet* 1987;28:897-905.
25. Stein DJ, Keating J, Zar HJ, Hollander E. A survey of the phenomenology and pharmacotherapy of compulsive and impulsive-aggressive symptoms in Prader-Willi syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1994;6:23-29.
26. Dykens EM, Hodapp RM, Walsh K, Nash LJ. Adaptive and maladaptive behavior in Prader-Willi syndrome. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 1992;31:1131-1136.
27. Dykens EM, Cassidy SB. Correlates of maladaptive behavior in children and adults with Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet* 1995;60:546-549.

28. Holland AJ, Treasure J, Coskeran P, Dallow J. Characteristics of the eating disorder in Prader-Willi syndrome: implications for treatment. *J Intellect Disabil Res* 1995;39 (Pt 5):373-381.
29. Larramona E. ¿Cómo se manejan los problemas del sueño en el SPW? 2013;
30. Nakamura Y, Murakami N, Iida T et al. The characteristics of scoliosis in Prader-Willi syndrome (PWS): analysis of 58 scoliosis patients with PWS. *J Orthop Sci* 2015;20:17-22.
31. Nakamura Y, Murakami N, Iida T, Asano S, Ozeki S, Nagai T. Growth hormone treatment for osteoporosis in patients with scoliosis of Prader-Willi syndrome. *J Orthop Sci* 2014;19:877-882.
32. Butler MG, Haber L, Mernaugh R, Carlson MG, Price R, Feurer ID. Decreased bone mineral density in Prader-Willi syndrome: comparison with obese subjects. *Am J Med Genet* 2001;103:216-222.
33. Vestergaard P, Kristensen K, Bruun JM et al. Reduced bone mineral density and increased bone turnover in Prader-Willi syndrome compared with controls matched for sex and body mass index—a cross-sectional study. *J Pediatr* 2004;144:614-619.
34. Bailleur-Forestier I, Verhaeghe V, Fryns JP, Vinckier F, Declercq D, Vogels A. The oro-dental phenotype in Prader-Willi syndrome: a survey of 15 patients. *Int J Paediatr Dent* 2008;18:40-47.
35. Driscoll DJ, Miller JL, Schwartz S, Cassidy SB. Prader-Willi Syndrome. 1993;
36. Iughetti L, Bosio L, Corrias A et al. Pituitary height and neuroradiological alterations in patients with Prader-Labhart-Willi syndrome. *Eur J Pediatr* 2008;167:701-702.
37. Schrandt-Stumpel CT, Curfs LM, Sastrowijoto P, Cassidy SB, Schrandt JJ, Fryns JP. Prader-Willi syndrome: causes of death in an international series of 27 cases. *Am J Med Genet A* 2004;124A:333-338.
38. Guallarte MP. ¿Cuáles son los problemas nutricionales de los niños con SPW en los primeros años de vida? 2013;
39. Ozca Özcan B, Neggess SJ, Miller AR et al. Does des-acyl ghrelin improve glycemic control in obese diabetic subjects by decreasing acylated ghrelin levels? *Eur J Endocrinol* 2014;170:799-807.
40. Goldstone AP, Holland AJ, Hauffa BP, Hokken-Koelega AC, Tauber M. Recommendations for the diagnosis and management of Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4183-4197.
41. Quiles J. Alimentación. 1999;63-76.
42. Caixàs A, Bueno M, Couto Y. Cirugía bariátrica en el Síndrome de Prader-Willi. 2015;2;
43. Corripio R. ¿Qué efectos tiene la GH en la composición corporal en el SPW? 2013;
44. Pérez-Sánchez J. ¿Cuáles son las indicaciones de tratamiento con GH en el SPW, cuál es la posología? ¿Qué efectos tiene la GH en la talla en el SPW? 2013;
45. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care* 2012;35:1364-1379.
46. Meola G. Clinical aspects, molecular pathomechanisms and management of myotonic dystrophies. *Acta Myol* 2013;32:154-165.
47. Gillessen-Kaesbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B. A previously unrecognized phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* 1999;7:638-644.
48. de Vries BB, Fryns JP, Butler MG et al. Clinical and molecular studies in fragile X patients with a Prader-Willi-like phenotype. *J Med Genet* 1993;30:761-766.
49. Kirkilionis AJ, Chudley AE, Gregory CA, Hamerton JL. Molecular and clinical overlap of Angelman and Prader-Willi syndrome phenotypes. *Am J Med Genet* 1991;40:454-459.
50. Nowicki ST, Tassone F, Ono MY et al. The Prader-Willi phenotype of fragile X syndrome. *J Dev Behav Pediatr* 2007;28:133-138.
51. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet* 2014;51:495-501.
52. Scheidecker S, Etard C, Pierce NW et al. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J Med Genet* 2014;51:132-136.
53. Kolehmainen J, Wilkinson R, Lehesjoki AE et al. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. *Am J Hum Genet* 2004;75:122-127.
54. Milani D, Cerutti M, Pezzani L, Maffei P, Milan G, Esposito S. Syndromic obesity: clinical implications of a correct diagnosis. *Ital J Pediatr* 2014;40:33-
55. Bittel DC, Butler MG. Prader-Willi syndrome: clinical genetics, cytogenetics and molecular biology.

- Expert Rev Mol Med 2005;7:1-20.
56. Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, Nicholls RD. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol Hum Reprod* 1997;3:321-332.
 57. Buiting K, Nazlican H, Galetzka D, Wawrzik M, Gross S, Horsthemke B. C15orf2 and a novel noncoding transcript from the Prader-Willi/Angelman syndrome region show monoallelic expression in fetal brain. *Genomics* 2007;89:588-595.
 58. Wawrzik M, Unmehopa UA, Swaab DF, van de Nes J, Buiting K, Horsthemke B. The C15orf2 gene in the Prader-Willi syndrome region is subject to genomic imprinting and positive selection. *Neurogenetics* 2010;11:153-161.
 59. Rougeulle C, Cardoso C, Fontes M, Colleaux L, Lalonde M. An imprinted antisense RNA overlaps UBE3A and a second maternally expressed transcript. *Nat Genet* 1998;19:15-16.
 60. Runte M, Huttenhofer A, Gross S, Kieffmann M, Horsthemke B, Buiting K. The IC-SNURF-SNRPN transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for UBE3A. *Hum Mol Genet* 2001;10:2687-2700.
 61. Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G et al. SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum Genet* 2004;114:553-561.
 62. Yamasaki K, Niikawa N. [Prader-Willi syndrome]. *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu* 2001;481-483.
 63. Chamberlain SJ, Brannan CI. The Prader-Willi syndrome imprinting center activates the paternally expressed murine Ube3a antisense transcript but represses paternal Ube3a. *Genomics* 2001;73:316-322.
 64. Landers M, Bancescu DL, Le ME et al. Regulation of the large (approximately 1000 kb) imprinted murine Ube3a antisense transcript by alternative exons upstream of Snurf/Snrpn. *Nucleic Acids Res* 2004;32:3480-3492.
 65. Sahoo T, del GD, German JR et al. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 2008;40:719-721.
 66. De Smith AJ, Purmann C, Walters RG et al. A deletion of the HBII-85 class of small nucleolar RNAs (snoRNAs) is associated with hyperphagia, obesity and hypogonadism. *Hum Mol Genet* 2009;18:3257-3265.
 67. Buiting K, Kanber D, Horsthemke B, Lohmann D. Imprinting of RB1 (the new kid on the block). *Brief Funct Genomics* 2010;9:347-353.
 68. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F et al. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013;45:1405-1408.
 69. Swaab DF. Prader-Willi syndrome and the hypothalamus. *Acta Paediatr Suppl* 1997;423:50-54.
 70. Jong MT, Carey AH, Caldwell KA et al. Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. *Hum Mol Genet* 1999;8:795-803.
 71. Kobayashi S, Kohda T, Ichikawa H et al. Paternal expression of a novel imprinted gene, Peg12/Frat3, in the mouse 7C region homologous to the Prader-Willi syndrome region. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290:403-408.
 72. Ozcelik T, Leff S, Robinson W et al. Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region. *Nat Genet* 1992;2:265-269.
 73. Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M et al. Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:14311-14316.
 74. Bazeley PS, Shepelev V, Talebizadeh Z et al. snoTARGET shows that human orphan snoRNA targets locate close to alternative splice junctions. *Gene* 2008;408:172-179.
 75. Bratkovic T, Rogelj B. Biology and applications of small nucleolar RNAs. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:3843-3851.
 76. Chamberlain SJ, Lalonde M. Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11-q13. *Neurobiol Dis* 2010;39:13-20.
 77. Martins-Taylor K, Hsiao JS, Chen PF et al. Imprinted expression of UBE3A in non-neuronal cells from a Prader-Willi syndrome patient with an atypical deletion. *Hum Mol Genet* 2014;23:2364-2373.
 78. Buiting K. Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:365-376.
 79. Duker AL, Ballif BC, Bawle EV et al. Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010;18:1196-1201.

80. Galiveti CR, Raabe CA, Konthur Z, Rozhdvestvensky TS. Differential regulation of non-protein coding RNAs from Prader-Willi Syndrome locus. *Sci Rep* 2014;4:6445-
81. Butler MG, Palmer CG. Parental origin of chromosome 15 deletion in Prader-Willi syndrome. *Lancet* 1983;1:1285-1286.
82. Ledbetter DH, Riccardi VM, Airhart SD, Strobel RJ, Keenan BS, Crawford JD. Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* 1981;304:325-329.
83. Calounova G, Hedvicakova P, Silhanova E, Kreckova G, Sedlacek Z. Molecular and clinical characterization of two patients with Prader-Willi syndrome and atypical deletions of proximal chromosome 15q. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1955-1962.
84. Cassidy SB, Lai LW, Erickson RP et al. Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy. *Am J Hum Genet* 1992;51:701-708.
85. Purvis-Smith SG, Saville T, Manass S et al. Uniparental disomy 15 resulting from «correction» of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet* 1992;50:1348-1350.
86. Robinson WP, Kuchinka BD, Bernasconi F et al. Maternal meiosis I non-disjunction of chromosome 15: dependence of the maternal age effect on level of recombination. *Hum Mol Genet* 1998;7:1011-1019.
87. Robinson WP, Langlois S, Schuffenhauer S et al. Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. *Prenat Diagn* 1996;16:837-844.
88. Robinson WP, Wagstaff J, Bernasconi F et al. Uniparental disomy explains the occurrence of the Angelman or Prader-Willi syndrome in patients with an additional small inv dup(15) chromosome. *J Med Genet* 1993;30:756-760.
89. Bervini S, Herzog H. Mouse models of Prader-Willi Syndrome: a systematic review. *Front Neuroendocrinol* 2013;34:107-119.
90. Yang T, Adamson TE, Resnick JL et al. A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat Genet* 1998;19:25-31.
91. Bressler J, Tsai TF, Wu MY et al. The SNRPN promoter is not required for genomic imprinting of the Prader-Willi/Angelman domain in mice. *Nat Genet* 2001;28:232-240.
92. Zanella S, Barthelemy M, Muscatelli F, Hilaire G. Necdin gene, respiratory disturbances and Prader-Willi syndrome. *Adv Exp Med Biol* 2008;605:159-164.
93. Schaller F, Watrin F, Sturny R, Massacrier A, Szeppetowski P, Muscatelli F. A single postnatal injection of oxytocin rescues the lethal feeding behaviour in mouse newborns deficient for the imprinted *Mage2* gene. *Hum Mol Genet* 2010;19:4895-4905.
94. Ding F, Li HH, Zhang S et al. *SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85)* deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice. *PLoS One* 2008;3:e1709-
95. Zhang Q, Bouma GJ, McClellan K, Tobet S. Hypothalamic expression of *snoRNA Snord116* is consistent with a link to the hyperphagia and obesity symptoms of Prader-Willi syndrome. *Int J Dev Neurosci* 2012;30:479-485.
96. Horsthemke B, Nazlican H, Husing J et al. Somatic mosaicism for maternal uniparental disomy 15 in a girl with Prader-Willi syndrome: confirmation by cell cloning and identification of candidate downstream genes. *Hum Mol Genet* 2003;12:2723-2732.
97. Butler MG. Commentary. *Clin Chem* 2015;61:55-
98. Powell WT, Coulson RL, Crary FK et al. A Prader-Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. *Hum Mol Genet* 2013;22:4318-4328.
99. Martin A, State M, Koenig K et al. Prader-Willi syndrome. *Am J Psychiatry* 1998;155:1265-1273.
100. Meziane H, Schaller F, Bauer S et al. An Early Postnatal Oxytocin Treatment Prevents Social and Learning Deficits in Adult Mice Deficient for *Mage2*, a Gene Involved in Prader-Willi Syndrome and Autism. *Biol Psychiatry* 2014;
101. Tauber M, Diene G, Mimoun E et al. Prader-Willi syndrome as a model of human hyperphagia. *Front Horm Res* 2014;42:93-106.
102. Tauber M, Mantoulan C, Copet P et al. Oxytocin may be useful to increase trust in others and decrease disruptive behaviours in patients with Prader-Willi syndrome: a randomised placebo-controlled trial in 24 patients. *Orphanet J Rare Dis* 2011;6:47-
103. Einfeld SL, Smith E, McGregor IS et al. A double-blind randomized controlled trial of oxytocin nasal spray in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2014;164A:2232-2239.
104. ASHG/ACMG. Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: Report of the ASHG/ACMG Test and Technology Transfer Committee. *Am J Hum Genet* 1996;58:1085-1088.
105. Brennan ML, Adam MP, Seaver LH et al. Increased body mass in infancy and early toddlerhood in Angelman syndrome patients with uniparental

- disomy and imprinting center defects. *Am J Med Genet A* 2015;167A:142-146.
106. Williams CA, Driscoll DJ, Dagi AI. Clinical and genetic aspects of Angelman syndrome. *Genet Med* 2010;12:385-395.
 107. Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test* 2007;11:467-475.
 108. Dikow N, Nygren AO, Schouten JP et al. Quantification of the methylation status of the PWS/AS imprinted region: comparison of two approaches based on bisulfite sequencing and methylation-sensitive MLPA. *Mol Cell Probes* 2007;21:208-215.
 109. Poyatos D, Campubi C, Gabau E et al. [Prader-Willi syndrome patients: study of 77 patients]. *Med Clin (Barc)* 2009;133:649-656.
 110. Cassidy SB, Forsythe M, Heeger S et al. Comparison of phenotype between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15. *Am J Med Genet* 1997;68:433-440.
 111. Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. Impact of molecular mechanisms, including deletion size, on Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet* 2005;67:47-52.
 112. Dykens EM, Roof E. Behavior in Prader-Willi syndrome: relationship to genetic subtypes and age. *J Child Psychol Psychiatry* 2008;49:1001-1008.
 113. Butler MG, Bittel DC, Kibiryeva N, Talebizadeh Z, Thompson T. Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy. *Pediatrics* 2004;113:565-573.
 114. Varela MC, Lopes GM, Koiffmann CP. Prader-Willi syndrome with an unusually large 15q deletion due to an unbalanced translocation t(4;15). *Ann Genet* 2004;47:267-273.
 115. Torrado M, Araoz V, Baialardo E et al. Clinical-etiological correlation in children with Prader-Willi syndrome (PWS): an interdisciplinary study. *Am J Med Genet A* 2007;143A:460-468.
 116. Dykens EM, Cassidy SB, King BH. Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion versus maternal uniparental disomy. *Am J Ment Retard* 1999;104:67-77.
 117. Symons FJ, Butler MG, Sanders MD, Feurer ID, Thompson T. Self-injurious behavior and Prader-Willi syndrome: behavioral forms and body locations. *Am J Ment Retard* 1999;104:260-269.
 118. Kim SJ, Miller JL, Kuipers PJ et al. Unique and atypical deletions in Prader-Willi syndrome reveal distinct phenotypes. *Eur J Hum Genet* 2012;20:283-290.
 119. Anderlid BM, Lundin J, Malmgren H, Lehtihet M, Nordgren A. Small mosaic deletion encompassing the snoRNAs and SNURF-SNRPN results in an atypical Prader-Willi syndrome phenotype. *Am J Med Genet A* 2014;164A:425-431.
 120. Webb T, Whittington J, Clarke D, Boer H, Butler J, Holland A. A study of the influence of different genotypes on the physical and behavioral phenotypes of children and adults ascertained clinically as having PWS. *Clin Genet* 2002;62:273-281.
 121. Copet P, Jauregi J, Laurier V et al. Cognitive profile in a large French cohort of adults with Prader-Willi syndrome: differences between genotypes. *J Intellect Disabil Res* 2010;54:204-215.
 122. Whittington J, Holland A, Webb T. Relationship between the IQ of people with Prader-Willi syndrome and that of their siblings: evidence for imprinted gene effects. *J Intellect Disabil Res* 2009;53:411-418.
 123. Holsen LM, Zarcone JR, Chambers R et al. Genetic subtype differences in neural circuitry of food motivation in Prader-Willi syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2009;33:273-283.
 124. Ogura K, Fujii T, Abe N et al. Small gray matter volume in orbitofrontal cortex in Prader-Willi syndrome: a voxel-based MRI study. *Hum Brain Mapp* 2011;32:1059-1066.
 125. Honea RA, Holsen LM, Lepping RJ et al. The neuroanatomy of genetic subtype differences in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2012;159B:243-253.
 126. Lukoshe A, Hokken-Koelega AC, van der Lugt A, White T. Reduced cortical complexity in children with Prader-Willi Syndrome and its association with cognitive impairment and developmental delay. *PLoS One* 2014;9:e107320-
 127. Ramsden SC, Clayton-Smith J, Birch R, Buiting K. Practice guidelines for the molecular analysis of Prader-Willi and Angelman syndromes. *BMC Med Genet* 2010;11:70-

Capítulo 8:

PSEUDOHIPOPARATIROIDISMO

Beatriz Lecumberri¹, Intza Garin², Guiomar Pérez de Nanclares²

¹Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario La Paz, Madrid ²Laboratorio de (Epi) Genética Molecular. Hospital Universitario Araba-Txagorritxu, Instituto Nacional de Investigación BioAraba, Vitoria-Gasteiz

1. Revisión clínica: principales aspectos diagnósticos

1.1. Introducción

Los términos pseudohipoparatiroidismo (PHP) y osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO, *Albright Hereditary Osteodystrophy*) engloban un grupo heterogéneo de enfermedades raras, que presentan un amplio espectro de expresión fenotípica, relacionadas con alteraciones genéticas y/o epigenéticas en el locus *GNAS*. Su prevalencia estimada es 0.79 por 100.000 habitantes (según series de Orphanet, Noviembre 2008). Reportado por primera vez en 1942 por Albright *et al.*¹, el PHP constituyó el primer síndrome de resistencia hormonal descrito, y actualmente incluye una serie de trastornos metabólicos caracterizados por la presencia de resistencia a la acción de la PTH. En pacientes con función renal normal, Albright

constató la presencia de hipocalcemia e hiperfosfatemia junto con una respuesta calcémica y fosfatúrica reducida a la inyección de extracto de paratiroides bovina comparada con la observada en pacientes con hipoparatiroidismo primario, lo que le llevó a sospechar una resistencia a la PTH como defecto subyacente. Esta hipótesis fue confirmada posteriormente mediante estudios que demostraron hiperplasia paratiroidea y elevación de PTH sérica en pacientes con PHP no tratados^{2,3}.

El fenotipo específico que presentaban estos pacientes, consistente en talla baja, obesidad central, cara redonda, cuello corto y braquidactilia, es lo que se conoce como osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO, *Albright Hereditary Osteodystrophy*). Trabajos posteriores revelaron que la mayoría de los pacientes con AHO también presentaban osificaciones subcutáneas y retraso mental^{4,5}. Diez años más tarde, Albright y cols. describieron un nuevo síndrome al que llamaron

pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP) en el que los pacientes presentaban fenotipo AHO sin evidencia de resistencia a la PTH y que podía aparecer tanto en familias con PHP como de forma aislada⁶. Más adelante se descubrió que la forma familiar de PHP presentaba una herencia autosómica dominante⁷⁻⁹ bajo fenómeno de impronta¹⁰⁻¹².

Un gran avance en el conocimiento de la fisiopatología del PHP fue el supuesto por la identificación del receptor de PTH y la vía de transducción de su señal^{7,8}. Dado que la PTH está acoplada a la proteína estimulante G (Gs) que activa la formación de AMPc, la medición de los niveles AMPc séricos y urinarios tras la inyección de PTH bovina permitió la diferenciación entre PHP tipo 1 (PHP1), en el cual se observaba una respuesta disminuida de la AMPc, y PHP tipo 2 (PHP2), en el que esta respuesta está conservada, pero cuya deficiente respuesta fosfatúrica indicaba un defecto distal a la generación del AMPc, dentro de la vía de transducción de señal mediada por PTH en las células diana¹³.

Hasta el momento únicamente se han reportado unos pocos casos de pacientes con PHP tipo 2^{13,14}, y el defecto molecular de este subtipo es todavía desconocido. En base al hecho de que el tratamiento sustitutivo con calcio y vitamina D es capaz de normalizar la respuesta fosfatúrica a la PTH en algunos de estos pacientes^{10-12,15}, se ha propuesto como hipótesis que el PHP2 pudiera ser un defecto adquirido, secundario al déficit de vitamina D aunque esta teoría no podido ser

confirmada todavía. También se ha considerado como un tipo de PHP2 la acrodisostosis con resistencia hormonal asociada a alteraciones en el gen *PRKARIA*^{16,17} (véase apartado 4).

En esta guía nos centraremos en el PHP tipo 1 (PHP1), cuyos subtipos, peculiaridades clínicas y determinantes moleculares están más investigados y mejor aclarados en el momento actual. No obstante, datos recientes relativos a nuevas correlaciones genotipo-fenotipo en pacientes con PHP1¹⁸⁻²¹, han reabierto el debate acerca de la idoneidad de las clasificaciones clásicas clínico-genéticas del PHP utilizadas hasta el momento y apuntan hacia una nueva clasificación²² basada en una identificación y descripción más detallada de los defectos moleculares, genéticos y epigenéticos subyacentes en cada individuo afecto.

1.2. PHP tipo 1

Como ya se ha comentado, el PHP1 se caracteriza por resistencia a la PTH (niveles de PTH elevados en presencia de hipocalcemia e hiperfosfatemia) asociado a respuesta de AMPc alterada a PTH exógena. Clásicamente se ha clasificado en función de la presencia (PHP1A y PHP1C) o ausencia de AHO (PHP1B) (Tabla 1).

1.3. Subtipos clínicos de PHP

Los pacientes que heredan la alteración genética de la madre, desarrollan todos los signos de AHO junto con resistencias a múltiples hormonas, mientras que los pacientes que la

Tabla 1: Clasificación clásica del pseudohipoparatiroidismo en función de la presencia/ausencia de resistencia hormonal y del fenotipo de osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO).

Tipo	PTH sérica	AHO	Calcemia	Fosfatemia	Administración exógena de PTH		Actividad G α	Resistencia hormonal	Defecto GNAS
					Respuesta del AMPc urinario	Fosfatúria			
PHP1A	↑	Sí	↓	↑	↓	↓	↓	PTH/TSH/Gn	Mutación materna
PHP1B	↑	No	↓	↑	↓	↓	Normal	PTH/TSH	Impronta
PHP1C	↑	Sí	↓	↑	↓	↓	Normal	PTH/TSH/Gn	Mutación materna
PHP2	↑	No	↓	↑	Normal	↓	Normal	PTH	¿?
PPHP	Normal	Sí	Normal	Normal	Normal	Normal	↓	No	Mutación paterna

heredan del padre desarrollan AHO sin evidencia de obesidad y sin resistencias hormonales. Este patrón de herencia es concordante con la presencia de un fenómeno de imprinting paterno tejido-específico en el gen causante de la enfermedad (*GNAS*), y con el hecho de que el principal producto proteico de este gen (*G α*), muestra una expresión predominante materna en diversos tejidos endocrinos humanos¹⁰⁻¹².

El PHP1A y PHP1C son clínicamente idénticos, ya que ambos comparten la presencia de AHO y resistencias a diversas hormonas²³. Sin embargo, los pacientes con PHP1A tienen una deficiencia parcial (alrededor del 50%) en la actividad de *G α* en las membranas de varios tipos celulares (eritrocitos, fibroblastos, plaquetas) debido a una reducción en los niveles de RNA mensajero y de proteína²⁴⁻²⁶, mientras que este defecto no ha sido reportado en pacientes con PHP1C^{3,27} (Tabla 1), aunque estos resultados podrían explicarse más por limitaciones en el ensayo utilizado que por diferencias biológicas reales²⁸.

Los pacientes con PPHP coexisten generalmente con aquellos con PHP1A en la misma familia. Tienen un defecto del 50% aproximadamente en la actividad de *G α* en la membranas celulares^{27,29}, pero, a diferencia de los pacientes con PHP1A muestran una respuesta normal del AMPc urinario a la PTH exógena²⁷.

El término PHP1B se refiere clásicamente a la enfermedad caracterizada por resistencia renal a PTH en ausencia de otras anomalías endocrinológicas o físicas y en presencia de una actividad normal de *G α* ¹². No obstante, se ha reportado tanto una actividad disminuida en *G α* ³⁰, como la presencia de resistencia a la TSH en cohortes amplias de pacientes con PHP1B^{31,32}, en los cuales la secreción de GH parecía estar conservada³². Sin embargo, existen dos casos aislados de pacientes con resistencia a la GHRH^{32,33}. De forma análoga a lo reportado en el PHP1A, los efectos a largo plazo de los niveles elevados de PTH sobre el hueso son todavía controvertidos. A pesar de que algunos autores han reportado

una aceleración de la reabsorción perióstica y la aparición de osteítis fibrosa quística^{34,35}, también se ha descrito el hallazgo de osteoesclerosis en pacientes con PHP de subtipo no especificado³⁶⁻³⁸ y en dos hermanos con PHP1B familiar³⁹, lo que sugiere que la PTH puede aumentar el grosor de la cortical a través de sus efectos anabólicos en el hueso endocortical de estos pacientes.

El defecto es frecuentemente esporádico, pero también puede presentarse ocasionalmente como familiar, con un patrón de herencia autosómico dominante (AD-PHP1B). Al igual que ocurre en el PHP1A, la resistencia hormonal sólo aparece al heredar el defecto por vía materna, mientras que la transmisión por vía paterna del mismo defecto no se asocia con anomalías endocrinológicas. No se han encontrado diferencias clínicas entre las formas esporádica y familiar⁴⁰ y ambos se han relacionado con alteraciones en el imprinting del locus *GNAS* (ver apartados 5 y 7). En todos los casos la respuesta del AMPc urinario a la PTH exógena está disminuida²⁵, indicando un defecto en la vía de señalización proximal a la generación de AMPc.

1.4. El fenotipo de Osteodistrofia hereditaria de Albright

1.4.1. Braquidactilia

La braquidactilia, descrita clásicamente como acortamiento de los metacarpos III, IV y V y la falange distal del I, es

la característica más típica, y, junto con las calcificaciones subcutáneas, la más específica del fenotipo AHO. Sin embargo, en una gran mayoría de pacientes puede no ser clara, ya que el acortamiento de los dedos de la mano es un hallazgo relativamente frecuente en población normal. Las radiografías anteroposteriores de la mano izquierda pueden utilizarse para medir las longitudes de los metacarpos y falange distal, y los Z-scores de la longitud de cada hueso pueden ayudar a construir el patrón metacarpofalángico^{41,42} (Figura 1).

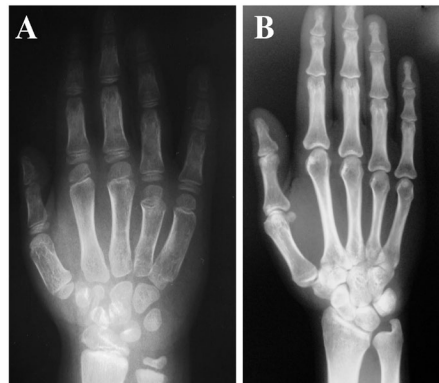


Figura 1: Radiografía de la mano derecha de (A) una niña con PHP1A causado por una delección intragénica en *GNAS* y (B) una mujer con AD-PHP1B con pérdida de la metilación en el exón A/B asociada a delección en *STX16*.

Además, hay que tener en cuenta que este acortamiento puede no ser detectado hasta los seis años de edad⁴³.

La densidad mineral ósea en los pacientes es rigurosamente normal, aunque los pacientes parecen tener una cierta tendencia a presentar complicaciones reumatológicas como osteoartritis y deslizamiento de la epífisis femoral^{44,45}.

1.4.2. Retraso mental

El retraso mental también ha sido propuesto como parte de las características clínicas de AHO desde su primera descripción. Varias líneas de evidencia sugieren que grados variables de retraso mental pueden ser una manifestación de AHO y PHP1A. Aunque la frecuencia y severidad de estos signos no está bien establecida, con una aparente discrepancia entre su prevalencia en adultos (27%) y en población pediátrica (64%)⁴⁶, parece que las alteraciones cognitivas son más prevalentes en pacientes con PHP1A que con PHP1B⁴⁷.

Es precisa todavía la realización de una revisión sistemática de la prevalencia y severidad de este déficit mediante la utilización de tests estandarizados en poblaciones amplias de pacientes. Su posible correlación con la presencia de calcificaciones intracraneales, duración, grado y momento de aparición de hipocalcemia, y coexistencia de otros déficits hormonales asociados al PHP1A, como hipotiroidismo está por determinar. Se desconoce todavía qué

impacto puede tener en el desarrollo intelectual en humanos la afectación diferencial en el sueño REM/no REM y deterioro cognitivo asociado a él demostrados en ratones con pérdida de imprinting en *Gnas*⁴⁸.

1.4.3. Calcificaciones intracraneales

La presencia de calcificaciones intracraneales, bilaterales y simétricas principalmente ubicadas en los ganglios de la base y cerebelo, entidad también conocida como enfermedad de Fahr, se ha descrito en hasta el 50% de los pacientes con PHP⁴⁹⁻⁵¹ (Figura 2) y PPHP⁵², en la mayoría de los casos asociada a rasgos físicos sugestivos de AHO.

La enfermedad de Fahr, observada inicialmente por Delacour en 1850⁵³ y puesta en relación con el hipoparatiroidismo por primera vez por Eaton⁵⁴, suele deberse a trastornos en el metabolismo fosfocálcico, pero también puede ser originada por otras causas metabólicas, infecciosas o genéticas. En pacientes con hipoparatiroidismo

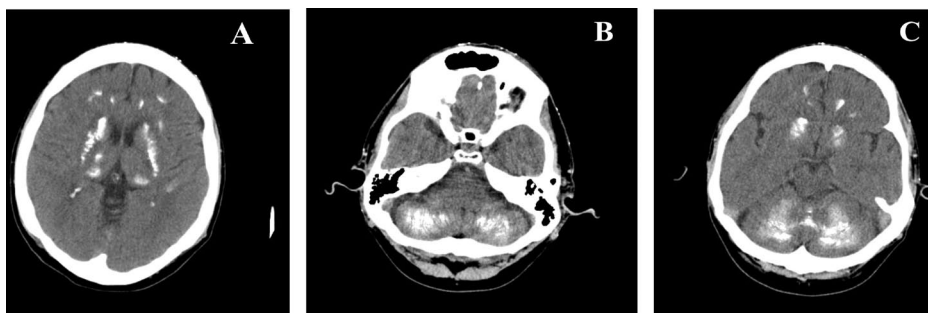


Figura 2: TAC cerebral de un paciente con PHP1B, donde se observan (A) Calcificaciones múltiples intracraneales, bilaterales y simétricas, localizadas en tálamo, núcleos lenticulares, núcleos caudados, cápsulas internas, sustancia profunda frontoparietal y en menor grado temporal y occipital. (B) y (C) Calcificaciones difusas en la periferia de ambos hemisferios cerebelosos, vermis y núcleos dentados junto con signos de atrofia cerebelosa llamativa para la edad del paciente (48 años).

idiopático, su aparición se correlaciona con la duración de la hipocalcemia y la presencia de calcificación del plexo coroideo, convulsiones y cataratas, y su progresión depende del cociente calcio/fósforo sérico durante el seguimiento⁵⁵.

Las calcificaciones intracraneales pueden producir alteraciones neurocognitivas y psiquiátricas así como síntomas extrapiramidales, incluyendo parkinsonismo, coreoatetosis y disquinesias^{51,56}, y problemas en la marcha (ataxia cerebelosa) y en el habla de severidad variable. Existe un caso reportado de parkinsonismo en un paciente con PHP, sin evidencia de calcificaciones en los ganglios basales detectables en TAC⁵⁷, en el cual los autores proponen otros mecanismos que expliquen estos síntomas, como defectos en la transmisión sináptica producidos por la actividad alterada de *Gsa*. En otra paciente de 7 años, la detección de calcificaciones en ganglios basales y sustancia blanca subcortical del lóbulo frontal junto con alteraciones en el movimiento de los brazos, sin ningún rasgo físico sugestivo de AHO y en presencia de calcio sérico normal, permitió establecer la sospecha de PHP 6 años antes de la aparición de hipocalcemia⁵⁸. Por último, la hemorragia intracerebral puede ser la primera manifestación de un PHP con enfermedad de Fahr, como fue el caso de un niño de 4 años que debutó con hemiparesia brusca e hipertensión⁵⁹.

1.4.4. Osificaciones subcutáneas

Los nódulos calcificados pueden encontrarse frecuentemente en la

exploración física de pacientes con AHO^{18,60,61}. Se trata de verdaderas osificaciones heterotópicas intramembranas, habitualmente limitadas a tejido subcutáneo, siendo su número y extensión muy variables. En un subgrupo de pacientes, más frecuentemente entre aquellos con PPHP, pueden progresar hacia tejidos profundos, como el músculo, imitando la heteroplasia ósea progresiva (POH)⁶². La sintomatología dependerá de la localización de las lesiones. La aparición de osificaciones en el ligamento posterior de la columna vertebral así como el desarrollo de hiperostosis vertebral puede en casos raros favorecer la aparición de síntomas de compresión medular⁶³. El desarrollo precoz de cataratas en pacientes con PHP también se ha puesto en relación con el desbalance fosfocálcico propio de la enfermedad.

1.4.5. Obesidad

La obesidad, a pesar de haberse incluido clásicamente entre los signos de AHO, parece estar más relacionada con PHP1A que con AHO^{64,65}.

Estudios en ratones sugieren que la obesidad pudiera ser consecuencia, al menos en parte, de los efectos directos de las alteraciones en *Gsa* a nivel de los centros del hambre/saciedad hipotalámicos ya que se ha demostrado que *Gsa* está sometido al fenómeno de imprinting en el núcleo paraventricular del hipotálamo, y las mutaciones maternas en *Gsa* alteran la estimulación del gasto energético mediada por las melanocortinas⁶⁶.

Este balance energético positivo debido a una reducción en el gasto energético (incluido el empleado en la termogénesis inducida por los alimentos), más que a un aumento en la ingesta, parece jugar un papel importante en el desarrollo de obesidad tanto en niños como en adultos con PHP1A⁶⁷. A nivel clínico, el motivo de la primera consulta médica solicitada en edad infantil en pacientes con PHP1A, y en algunos con PHP1B, es la obesidad y un leve retraso psicomotriz^{18,19}. En el contexto de este primer estudio por obesidad, la detección de un hipotiroidismo subclínico leve puede preceder a la aparición de hipocalcemia y diagnóstico de PHP.

1.4.6. Talla baja

La talla baja es una característica propia del fenotipo AHO⁶⁸, siendo común identificarla en pacientes adultos^{64,69}. La mayoría de los niños con PHP1A presentan talla normal hasta que sufren

un cierre rápido y prematuro de las epífisis entre los 10 y los 15 años. Este cierre prematuro se debe tanto a la haploinsuficiencia de $Gs\alpha$ que afecta a la señalización de la PTH/PTHrP en los condrocitos^{70,71} como a la resistencia a GHRH⁷² (ver apartados 1.5.3 y 2.1.3).

1.5. Resistencia multihormonal

Los pacientes con PHP1 presentan resistencia a múltiples hormonas que tienen su mecanismo de señalización basado en la proteína G. Son muchas las hormonas que usan receptores acoplados a la proteína $Gs\alpha$ y adenilatociclasa para generar AMPc (PTH TSH, LH, FSH, GHRH, ADH, glucagón, ACTH y calcitonina, entre otras)⁷³. Para su funcionamiento, la hormona se une a su receptor, situado en la membrana plasmática, el cual está acoplado a una proteína G. La proteína G estimuladora (Gs) es miembro de la superfamilia

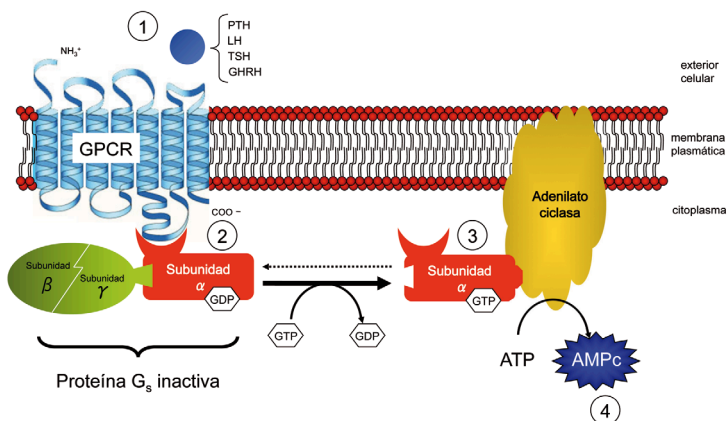


Figura 3: Esquema del mecanismo de acción de hormonas mediado por receptores acoplados a proteína Gs. La unión de la hormona a su receptor (1) provoca la activación de la subunidad α de la proteína Gs (2), que interactuará con la adenilato ciclasa (3), produciendo la síntesis de AMPc (4), que funcionará como segundo mensajero transmitiendo la información procedente del estímulo hormonal. Tras la activación de la adenilato ciclasa, la subunidad α de la proteína Gs vuelve a su estado basal

de proteínas G heterotriméricas: la subunidad alfa específica que se une al nucleótido guanina del grupo GTP/GDP e interacciona con los receptores y efectores específicos; las subunidades β y γ que forman el complejo necesario para la activación de G α por los receptores⁷⁴. La función de la proteína Gs es transmitir señales desde los receptores de la superficie celular hasta los efectores intracelulares (como la enzima adenilatociclasa en el caso de la PTH) que generan segundos mensajeros (AMPc)⁷⁵ (Figura 3).

1.5.1. Resistencia a la PTH

La resistencia renal a la PTH, constituye la alteración clínica más típica y evidente y parece afectar únicamente al túbulo proximal. En la mayoría de los casos se presenta como hipocalcemia, hiperfosfatemia, y niveles séricos elevados de PTH, aunque algunos pacientes con PHP1A permanecen normocalcémicos de por vida a pesar de la resistencia a PTH¹². Normalmente se desarrolla durante los primeros años de vida, y la hiperfosfatemia y elevación de PTH suelen preceder generalmente a la hipocalcemia¹⁸. La hiperfosfatemia, junto con la resistencia renal a la PTH produce un defecto en la síntesis de 1,25-dihidroxivitamina D, que a su vez favorece también la hipocalcemia. Debido a los diferentes lugares de acción de los efectos anticalciúricos (en el túbulo distal) y fosfatúricos (en el túbulo proximal) de la PTH, y a diferencia de los pacientes con hipoparatiroidismo, en aquellos con PHP la acción anticalciúrica de la

PTH permanece intacta, lo que explica la normocalciuria y el mantenimiento de una adecuada función renal de por vida, en ausencia de litiasis renal¹².

A pesar de que la respuesta esquelética a la PTH parece intacta tanto en PHP1A como PHP1B, y de que en algunos pacientes con PHP1 se ha descrito enfermedad ósea por hiperparatiroidismo^{12,34,35,76-79}, algunos autores han demostrado una densidad mineral ósea (DMO) regional normal junto con un aumento de la DMO total en cohortes amplias de niños, adolescentes y adultos con PHP1A⁴⁴. Aunque estos resultados no son concluyentes, y son opuestos a los reportados en series más pequeñas de pacientes, indicarían que los pacientes con PHP1A pueden tener un riesgo de fracturas normal o incluso reducido.

La resistencia a otras hormonas, además de a la PTH, que actúan a través de receptores acoplados a proteínas G, como la TSH, gonadotropinas y GHRH, es típica en pacientes con PHP1A, por lo que estos pacientes pueden desarrollarlas con una severidad y evolución en el tiempo variables, aunque también se han descrito en pacientes con PHP1B y recientemente en una paciente con PPHP^{12,18,25,65,80-82}.

1.5.2. Resistencia a la TSH

La resistencia a TSH está presente en casi todos los pacientes con PHP1A, y también en algunos con PHP1B^{18,82,83}. Normalmente se manifiesta clínicamente durante la niñez o adolescencia¹², aunque

ocasionalmente puede ser detectada también en el screening neonatal^{82,84-86}. Generalmente es leve, con mínimas elevaciones de TSH y niveles de hormona tiroidea normales o discretamente disminuidos. El bocio y los anticuerpos antitiroideos suelen estar ausentes (aunque en algunos casos coexisten anticuerpos antitiroideos positivos), lo que encaja con un déficit en la señalización de la TSH. La elevación de la TSH puede aparecer años antes de la hipocalcemia y constituir el motivo de primera consulta en pediatría tanto en pacientes con PHP1A como con PHP1B^{82,84}.

1.5.3. Otras resistencias hormonales

La **resistencia a la GnRH**, bien parcial o total, se ha reportado en varios pacientes con PHP1A⁸⁷⁻⁸⁹. Existe evidencia clínica de hipogonadismo, especialmente en mujeres, y suele manifestarse como retraso en la maduración sexual, o maduración incompleta, amenorrea u oligomenorrea, con o sin infertilidad acompañante⁸⁷. Estas pacientes suelen ser ligeramente hipoestrogénicas, pero hasta el momento ningún estudio ha sido capaz de demostrar de forma consistente la presencia de niveles elevados de gonadotropinas GnRH basales o tras estímulo. Por el contrario, se han descrito también unos pocos casos de pubertad precoz paradójica en pacientes con PHP⁹⁰.

La **deficiencia de prolactina** también ha sido reportada en pacientes con PHP1A⁹⁰, aunque el mecanismo subyacente para esta alteración todavía es desconocido.

La **resistencia a GHRH** y deficiencia de GH asociada, se ha descrito también en grandes subgrupos de pacientes con PHP1A, y parece más frecuente en adultos que en niños^{72,91,92}. Aunque las respuestas de AMPc a glucagón e isoproterenol están reducidas en estos pacientes, la respuesta fisiológica final es normal (aumento en la glucosa sérica), lo que indica que este aumento parcial en AMPc es suficiente para producir la máxima respuesta fisiológica.

Existe únicamente un caso reportado de resistencia a GHRH en un paciente diagnosticado con PHP1C⁹³, en el que también se detectó una respuesta lipolítica defectuosa a la epinefrina, lo que podría sugerir cierto papel de la resistencia a GHRH en el desarrollo de su obesidad mórbida. Adicionalmente, también se observó una respuesta muy efectiva en esta paciente al tratamiento con un antagonista del receptor cannabinoide tipo 1, lo que pondría de manifiesto el valor de estos antagonistas en revertir las anormalidades típicas de estos casos, como un tono simpático atenuado o la hipoactividad del receptor 4 de la melanocortina, mecanismos que se han propuesto como causantes de la obesidad e hiperfagia en paciente con PHP1A.

La **resistencia a la insulina** ha sido demostrada en pacientes adultos con PHP1A, tanto diabéticos como no diabéticos junto con una tendencia a la alteración en la función de las células β pancreáticas⁹⁴. Aunque la obesidad predispone a la resistencia a la insulina, en modelos animales de PHP1A el desarrollo de resistencia insulínica e

intolerancia a la glucosa aparece antes que la obesidad, fenómeno que se ha puesto en relación con la señalización defectuosa de las melanocortinas a nivel central^{66,67}. Los pacientes con PHP1A tienen mayor riesgo de desarrollar diabetes que individuos de la misma edad y grado de adiposidad⁹⁴.

No se ha detectado resistencia a vasopresina, ACTH ni CRH en pacientes con PHP1A, si bien ocasionalmente se ha descrito resistencia a la calcitonina^{72,95-98}. Finalmente existen casos reportados de alteraciones en la olfacción en pacientes con PHP1A, pero no con PPHP o PHP1B⁹⁹.

1.6. Otras manifestaciones

Existen una serie de procesos que han sido descritos en pacientes con PHP/PPHP, pero cuya asociación con las alteraciones genéticas o epigenéticas en GNAS no está demostrada. Aunque hasta el momento no se consideran características típicas del PHP y su aparición en estos pacientes pudiera ser por puro azar, se aconseja tenerlas en cuenta a la hora de plantear los diagnósticos diferenciales.

Por ejemplo, a pesar de que la actividad de $G\alpha$ en las plaquetas está reducida en pacientes con PHP1A, la aparición de trastornos de la coagulación ha sido reportada hasta el momento en pocos pacientes con PHP. La presencia de púrpura trombopénica idiopática (PTI) junto con anemia severa ha sido descrita en una paciente con PHP1A y síndrome de Evans (PTI y anemia

hemolítica severa)¹⁰⁰, y en dos hermanas con PHP y cirrosis familiar de origen desconocido¹⁰¹. La PTI aislada ha sido reportada en varios miembros de dos familias independientes que incluían miembros con PHP1A y PHP1B¹⁹, en concreto en una paciente con PHP1B (caso 6) y uno de sus hermanos, y en la madre y una prima materna de otro paciente con PHPB (caso 1) que portaba una disomía uniparental paterna (UPD) de 20q. En este paciente, el segundo en el que se reportó una UPD en 20q, se ha detectado recientemente un descenso significativo en la actividad del Factor de Von Willebrand, por la que todavía permanece en estudio por Hematología (datos no publicados, casuística personal de las autoras). Curiosamente los dos primeros casos reportados de UPD en 20q¹⁹ desarrollaron hiperbilirrubinemia neonatal que requirió tratamiento con fototerapia. En sentido opuesto a la púrpura trombopénica, en un paciente con obesidad mórbida, y marcada hipofunción de la $G\alpha$ plaquetaria, se encontró una hiperreactividad plaquetaria y estado protrombótico secundario, asociado a los niveles extremadamente bajos de AMPc¹⁰².

Además de la púrpura trombopénica^{19,100,101}, encontramos diversas lesiones cutáneas¹⁰³⁻¹⁰⁵ y cirrosis familiar¹⁰¹, y otras reportadas menos frecuentemente en pacientes con PHP/PPHP, como las calcificaciones esclerocoroidales, bloqueo aurículo-ventricular, pancreatitis aguda, diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis de Hashimoto, síndrome de Turner, hiperaldosteronismo, lupus eritematoso sistémico, silla turca

vacía, malformación de Chiari tipo 1 e insuficiencia adrenal primaria^{89,106-114}. Además, también se han identificado dos casos de astrocitoma^{104,105}, uno de melanoma cutáneo¹⁰⁴, un carcinoma adrenal¹¹⁵, y un tumor exocrino pancreático en una paciente con PPHP y antecedente de diabetes neonatal que resolvió espontáneamente¹⁹.

2. Morbilidad asociada/ Tratamiento

2.1. Hormonas

2.1.1. Control del metabolismo fosfocálcico: resistencia a PTH

El tratamiento de la resistencia a la PTH persigue los siguientes objetivos: (1) mantener los niveles de calcemia dentro de los rangos normal-bajo (2.0–2.5 mM), (2) evitar la hipercalcia (en niños, excreción de calcio urinario <6 mg/kg/día o ratio calcio urinario/creatinina urinaria <0.3 mM/mM), y (3) evitar la resorción ósea debido a los niveles elevados de PTH.

En niños, el tratamiento óptimo es la 1 α -hidroxí vitamina D (calcitriol o alfacalcidol), ajustada a la velocidad de crecimiento más que al peso (dosis más altas durante los periodos de gran crecimiento como infancia y pubertad)⁶⁹. Debe tenerse en cuenta que en estos pacientes hay poco o ningún riesgo de incremento en la excreción urinaria de calcio en tratamiento con calcitriol o alfacalcidol, por lo que el tratamiento puede ser habitualmente más intensivo que el instaurado en el hipoparatiroidismo.

No hay recomendaciones específicas para la terapia de 25-OH-vitamina D; sin embargo, tanto la actividad residual de la proteína Gs α en algunos pacientes como la observación de que la 25-OH-vitamina D facilita la absorción de calcio en pacientes hipocalcémicos¹¹⁶ sugieren que el mantenimiento de 25-OH-vitamina D en rangos de normalidad puede ayudar al control de la enfermedad.

Se recomiendan los suplementos de calcio (250–1,000 mg en función de la edad) durante el primer año tras el diagnóstico de la resistencia a la PTH. Los adultos, generalmente, consiguen mantener su calcemia y PTH con los suplementos de 25-OH-vitamina D y calcio⁶⁹.

Se deben monitorizar de forma regular los niveles de calcio, creatinina y PTH sérica y calcio urinario (micción única en niños pequeños, orina 24-horas a partir de los 5 años), y ecografía renal para ajustar el tratamiento.

2.1.2. Control del hipotiroidismo e hipogonadismo: resistencia a TSH y gonadotropinas

La resistencia a la TSH en pacientes con PHP1A se trata con levotiroxina oral de acuerdo al peso hasta alcanzar niveles normales de T4 libre. A excepción de durante el embarazo, los pacientes con PHP1B parecen no requerir tratamiento para controlar su resistencia a la TSH⁶⁹. Durante los embarazos, los especialistas deben intentar mantener los valores de TSH por debajo de 2.5 UI/l durante el primer trimestre, de acuerdo a las

guías internacionales¹¹⁷, y corregir la hipocalcemia por todos los medios. En caso de hipocalcemia materna descontrolada o deficiencia de vitamina D, los recién nacidos tendrían un alto riesgo de presentar hiperparatiroidismo neonatal e hipercalcemia. La resistencia a la TSH puede estar presente desde el nacimiento. Por tanto, el tratamiento con tiroxina debe empezar en los neonatos con altos niveles de TSH (aproximadamente 10 µg/kg/día), incluso antes del resultado del estudio genético¹¹⁸.

En caso de ser necesario, el tratamiento con hormonas sexuales debe indicarse siguiendo los mismos criterios, dosis y seguimiento que aquellos seguidos para cualquier otra forma de hipogonadismo.

2.1.3. Control de la talla baja: resistencia a GH

Desde la primera demostración de la deficiencia de GH en pacientes con PHP1A¹¹⁹, confirmada más adelante en estudios posteriores³³, hasta la fecha, no existen datos concluyentes que indiquen cuándo debe utilizarse tratamiento sustitutivo con GH en pacientes con déficit de GH. De hecho, el impacto relativo de la deficiencia de GH en la talla de adulto en PHP1 es incierto. En estos pacientes, la talla baja es el resultado muy probablemente de la combinación de múltiples factores que incluyen fusión prematura de las placas de crecimiento y ausencia de estirón puberal subsiguiente, además de la deficiencia de GH. El hecho de que los pacientes con PPHP se caractericen también por talla baja, como sus familiares

con PHP1A, aunque no desarrollen alteraciones endocrinológicas parece cuestionar del papel del déficit de GH como determinante de la talla final en PHP1A. En concreto, el cierre epifisario prematuro, probablemente relacionado con alteraciones en la señalización PTH/PTHrp en los condrocitos, es un importante factor que causa talla baja y braquidactilia tanto en PHP1A como PPHP^{70,71}. Sin embargo, un primer estudio piloto llevado a cabo en 8 niños prepuberales con PHP1A demostró un aumento significativo en la velocidad de crecimiento de estos pacientes, al menos antes de la pubertad, y confirmó que el tratamiento con GH debe iniciarse pronto debido al breve periodo de tiempo durante el cual puede potencialmente constituir una terapia efectiva⁷². No obstante, es precisa una investigación más amplia y profunda (incluyendo ensayos clínicos) que puedan orientar a los endocrinólogos a la hora de diagnosticar y tratar correctamente a estos pacientes tan pronto como sea posible con el fin obtener el máximo beneficio alcanzable.

2.2. Manifestaciones clínicas

Los trastornos del movimiento, cognitivos y psiquiátricos, asociados o no a la presencia de calcificaciones intracraneales, pueden mejorar en algunos casos con tratamiento médico específico, por lo que se aconseja solicitar evaluación inicial y en caso de ser necesario asegurar seguimiento

a largo plazo por parte de los servicios correspondientes (neurología y psiquiatría).

No existen tratamientos específicos para las manifestaciones de AHO.

El tratamiento de las osificaciones heterotópicas es uno de los principales retos de esta enfermedad. En general, se aconseja no reseca las osificaciones pequeñas y no problemáticas, dado que a menudo reaparecen tras la operación. Se ha descrito el uso de anti-inflamatorios no esteroideos, tiosulfatos o bisfosfonatos; por similitud con las osificaciones posteriores a un reemplazo de cadera, estos fármacos podrían valorarse en el caso de recurrencia dolorosa¹²⁰. Las osificaciones subcutáneas más grandes o molestas, pueden ser extirpadas. En el caso de que las osificaciones profundas lleguen a producir compresión medular⁶³ la descompresión quirúrgica precoz es necesaria para evitar secuelas permanentes y lograr la completa recuperación funcional.

Desde el momento del diagnóstico de PHP1A, se recomienda iniciar medidas dietéticas y de estilo de vida para prevenir la obesidad, así como programas de atención temprana para reforzar las funciones cognitivas. Aunque actualmente no están comercializados, antagonistas del receptor de cannabinoides tipo 1 se han empleado como tratamiento ocasional de la obesidad⁹³.

En relación a las morbilidades asociadas, se ha detectado una alta incidencia global de síndrome del

túnel carpiano (STC) en pacientes con PHP (67%) tanto en niños como en adultos, y una media de edad de aparición del STC 10 años más joven que en población general (31.8 vs 40 años, respectivamente), incluyendo 5 pacientes de 14 años o menos¹²¹. El hallazgo de STC no parece estar asociado con el índice de masa corporal, tratamiento previo con GH, presencia de braquidactilia o mutaciones específicas en *GNAS*. Por ello se aconseja realizar anamnesis dirigida sobre la presencia de síntomas sugestivos de STC ya al diagnóstico del PHP en todos los pacientes, y solicitar las pruebas específicas en caso de sospecha clínica. La correcta detección y abordaje quirúrgico precoz del STC puede hacer desaparecer los síntomas incapacitantes asociados y mejorar significativamente la calidad de vida de estos pacientes¹²¹.

3. Manejo clínico de los pacientes

En la práctica clínica, la AHO es difícil de diagnosticar debido a que algunas de las características clínicas típicas no son evidentes al nacimiento y en el periodo perinatal y pueden ser muy variadas después. En los casos de PHP1A y PHP1B, se requiere la realización de determinaciones analíticas hormonales, aunque también pueden resultar engañosas, porque las alteraciones endocrinológicas pueden aparecer en diferentes estadios de la vida y ser muy variables en cuanto a severidad¹⁸.

En general los pacientes deben ser monitorizados analíticamente al menos

anualmente (determinación de PTH, calcio, fosfato y TSH en sangre y de calcio urinario)¹²². En los niños se debe prestar una atención especial a la altura, velocidad de crecimiento y desarrollo puberal, psicológico e intelectual^{47,55}. Evidencias recientes sugieren que, independientemente de la curva de crecimiento, debería descartarse la existencia de un déficit de GH, mediante la utilización de tests de provocación específicos, para en caso de detectarse el déficit, iniciar el tratamiento con GH lo más rápido posible^{72,91,92,119}. Debe vigilarse también el peso e IMC e iniciar un plan de dieta y ejercicio si estuviera indicado. Anualmente los pacientes debieran tener un examen físico detallado, y si fuera necesario también estudios psicológicos específicos, para la detección y seguimiento de la presencia/evolución de las características específicas de AHO (especialmente de las calcificaciones heterotópicas y retraso mental).

Los problemas en la esfera de las relaciones interpersonales (con los padres, parejas, etc) y en el estado de ánimo (tendencia a la introversión, agresividad ocasional) son frecuentes en estos pacientes, por lo que se aconseja ofrecer seguimiento y apoyo psicológico a medio/largo plazo al paciente y también a los miembros su entorno más cercano, si fuera necesario. Como se ha comentado en secciones previas, al diagnóstico se aconseja preguntar acerca de la presencia de síntomas sugestivos de STC, y la evaluación inicial debe incluir examen radiológico de braquidactilia. Posteriormente los pacientes con PHP1 deben ser también

estudiados periódicamente para descartar la aparición de cualquier otra endocrinopatía asociada, en especial hipotiroidismo e hipogonadismo. Dado que una de las causas de primera consulta en pacientes con PHP tanto 1A como 1B en edad pediátrica es la detección de hipotiroidismo subclínico¹⁸, algunos autores aconsejan monitorizar a medio/largo plazo los niveles séricos de calcio, fósforo y PTH en niños que consultan por hipotiroidismo subclínico de causa no filiada, para evitar el desarrollo de hipocalcemia franca en aquellos con PHP⁸². De forma complementaria, debido a la disminución a la sensibilidad a la insulina, tendencia a la alteración de la función pancreática y mayor riesgo de desarrollar diabetes demostrado en pacientes con PHP1A⁹⁴, se aconseja realizar un seguimiento periódico de la glucosa y HbA1c e intervenciones orientadas a mejorar la sensibilidad a la insulina en estos pacientes.

4. Diagnóstico diferencial

Debido a que las características fenotípicas de los pacientes con PHP (obesidad, talla baja, braquidactilia, discapacidad intelectual) aparecen también en otros síndromes, y con una severidad variable, el diagnóstico diferencial clínico puede ser amplio y el diagnóstico definitivo requiere en muchos casos de los resultados de un estudio genético detallado (ver secciones 5 a 8 del presente capítulo). Por otra parte, algunos trastornos leves en el metabolismo fosfocálcico pueden remedar alteraciones bioquímicas típicas del PHP en sus estadios iniciales.

4.1. Hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D

En relación al hiperparatiroidismo secundario al déficit de vitamina D es preciso recordar que una vez detectado e indicado el tratamiento adecuado, los niveles de vitamina D suelen normalizar antes que los de la PTH, por lo que si la reposición del déficit de vitamina D se ha iniciado recientemente pueden coexistir todavía niveles de PTH elevados con valores de vitamina D normales. Esta situación puede dar lugar a interpretaciones erróneas en relación a la causa del hiperparatiroidismo, que a veces derivan en solicitudes de estudio genético de PHP innecesarias.

En la mayoría de estos casos las dudas diagnósticas se resuelven repitiendo el estudio bioquímico al cabo de unos meses y confirmando la normalización de los niveles de PTH. Otro dato que puede ayudar en el diagnóstico diferencial en estos pacientes es el valor neto de la PTH. Niveles muy elevados no suelen ser habituales en los hiperparatiroidismos únicamente causados por déficit de vitamina D, y deben orientar hacia otras etiologías (con las que además también puede coexistir el déficit de vitamina D).

Por otra parte, aunque la hipocalcemia está presente en la mayoría de los pacientes con PHP al diagnóstico, debe tenerse en cuenta que en estadios iniciales de la enfermedad pueden coexistir niveles elevados de PTH junto con niveles todavía normales de calcio en las determinaciones hechas en periodos en los que el paciente está

asintomático^{18,61}, y que el déficit de vitamina D es relativamente frecuente al diagnóstico en pacientes con PHP de cualquier subtipo.

4.2. Crisis convulsivas

Con respecto a las crisis de hipocalcemia, uno de los problemas diagnósticos que con más frecuencia se daban en el pasado era su confusión con otras entidades como crisis epilépticas^{19,123-126} o incluso crisis de hipoglucemia. Existen casos de pacientes erróneamente diagnosticados de epilepsia y tratados para ella durante varios años, antes de confirmarse la presencia de un PHP. El uso de antiepilépticos pudo favorecer también el desarrollo de un déficit de vitamina D en algunos de estos casos¹⁵. La poca accesibilidad a la determinación de la PTH en determinados entornos, sobre todo en medios rurales, y la similitud de las ondas cerebrales observadas en los electroencefalogramas de pacientes con crisis epilépticas y con crisis convulsivas por hipocalcemia¹²⁷, pueden explicar en parte estas confusiones. La ausencia de respuesta a los antiepilépticos habituales y el hallazgo del patrón bioquímico típico del PHP en análisis realizados durante las crisis llevaron finalmente al diagnóstico correcto en la mayoría de los casos^{128,129}.

Por todo ello, se aconseja siempre determinación de los niveles de calcio y fósforo, como mínimo (y a ser posible también de PTH) ante cualquier crisis convulsiva de causa desconocida en todo paciente que sea atendido de

urgencia por este motivo. El retraso en la detección de un PHP impide el inicio de tratamiento adecuado, pone en riesgo la vida del paciente, que sufrirá nuevos eventos convulsivos cada vez con más frecuencia y probablemente más severos, y favorece la aparición y desarrollo de calcificaciones intracerebrales y el avance de la discapacidad intelectual secundaria a ellas, debido a la hipocalcemia mantenida a largo plazo⁵⁵.

4.3. Síndromes fenotípicos similares

Las características clínicas del PPHP pueden encontrarse también en familias en las que no existen miembros con PHP1A, apareciendo como un defecto aislado¹³⁰. En estos casos el diagnóstico es especialmente complicado, dado que muchas de los rasgos físicos del AHO son inespecíficos y están presentes en otros síndromes.

4.3.1. Síndrome AHO-like (OMIM 600430)

El síndrome AHO-like está causado por pequeñas deleciones terminales en el cromosoma 2¹³¹⁻¹³³. Si bien el fenotipo que presentan los pacientes es similar al de PHP (cara redondeada, talla baja, braquidactilia y un cierto retraso mental)¹³⁴⁻¹³⁶, existen otros rasgos distintivos como pueden ser la ausencia de alteración en el metabolismo fosfocálcico, presencia de malformaciones mayores en el 30% de los casos, anomalías cardíacas en el 20%, (principalmente coartación o hipoplasia del arco

aórtico¹³⁷), anomalías gastrointestinales y renales¹³⁴, malformaciones genitourinarias (riñón en herradura, hipospadias, hipoplasia o disgenesia gonadal, útero bífido o testículos sin descender)¹³⁸ y malformaciones del sistema nervioso central¹³⁴.

4.3.2. Acrodisostosis

La acrodisostosis, también conocida como síndrome de Graham-Arklesso de Maroteaux-Malamut, engloba un grupo de displasias óseas congénitas poco frecuente caracterizado por braquidactilia generalizada de las manos y pies con epifisis en forma de cono, disostosis, y anomalías faciales: cara ancha y redondeada con hipoplasia maxilonasal y aplanamiento del puente nasal. Además, el tamaño del cráneo está reducido y hay un engrosamiento de la calota. El fallo en el crecimiento es progresivo, apreciándose, sobre todo, en la edad adulta. Las radiografías muestran una maduración avanzada de los huesos y una disminución de la distancia interpedicular en la columna lumbar¹³⁹.

El PHP y la acrodisostosis se han confundido durante mucho tiempo a pesar de que en 1968 Maroteaux y Malamut las describieron como dos entidades diferentes basándose en su clínica¹⁴⁰. La razón de esta confusión es la similitud que tienen las dos patologías a nivel clínico: fenotipo AHO o similar, braquidactilia, retraso mental, en ocasiones, y resistencia multihormonal (PTH y TSH preferentemente)¹⁷. La resistencia multihormonal no aparece siempre en la

acrodistososis, ya que existen, al menos dos tipos de acrodistososis, siendo precisamente ésta la característica diferenciadora¹⁷. Así, la acrodistososis con resistencia multihormonal o ACRDYS1 (OMIM#101800 o ADOHR), está causada por mutaciones inactivantes en heterozigosis en el gen *PRKARIA*^{16,141-143}, mientras que la acrodistososis sin resistencia hormonal (ACRDYS2, OMIM#6146139), aparece tras alteraciones en el gen *PDE4D*^{141,144,145}. La ausencia de calcificaciones subcutáneas e intracerebrales y el mayor grado de acortamiento de los huesos de la mano, puede ayudar en el diagnóstico diferencial con el PHP/PPHP/AHO^{17,146}.

4.3.3. Braquidactilia aislada

Hasta el momento se han identificado numerosas formas, algunas asociadas a estatura baja. Puede aparecer como una malformación aislada, asociada a otras anomalías sutiles o dentro del cuadro de un síndrome malformativo complejo. Los numerosos tipos de braquidactilia aislada son raros, excepto los tipos A3 y D. La identificación de braquidactilia aislada en individuos sin alteraciones en el metabolismo fosfocálcico es un hecho relativamente frecuente en la práctica clínica. Se conoce el gen responsable de la anomalía para la mayoría de braquidactilias aisladas (con herencia principalmente autosómica dominante, penetrancia y expresividad variable) y para algunas de las formas sindrómicas. El diagnóstico es clínico, antropométrico y radiológico¹⁴⁶. La cirugía plástica está indicada únicamente si la braquidactilia afecta

a la función global de la mano o por razones estéticas, pero generalmente no es necesaria.

4.3.4. Síndrome trico-rino-falángico (OMIM#190350)

Dentro de los síndromes que pueden presentar dificultades en cuanto a su diferenciación fenotípica con el PHP/PPHP destaca, entre otros, el síndrome trico-rino-falángico tipo I (TRPS-I). Ambos son síndromes raros monogénicos que comparten algunas características físicas, como rasgos dismórficos, talla baja, braquidactilia y obesidad. Los rasgos típicos del TRPS-I pueden ser muy leves e incluyen pelo fino, escaso y de lento crecimiento en cuero cabelludo, cejas casi ausentes, punta bulbosa de la nariz y surco nasolabial largo y plano¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Existe una familia y un caso aislado reportados¹⁵⁰ que inicialmente fueron diagnosticados de PHP1A/PPHP, en base al fenotipo (braquidactilia, obesidad) y a la presencia de un hiperparatiroidismo normocalcémico con niveles normales de vitamina D en uno de los casos, pero en los que el estudio genético descartó alteraciones tanto genéticas como epigenéticas en *GNAS*. Posteriormente, una reevaluación física dirigida más específica, permitió establecer la sospecha de TRPS-I y el estudio genético identificó una mutación en el gen *TRPS1* (8q24.12). Una correcta y detallada exploración física, que evalúe la presencia de los rasgos típicos de TRPS-I, como pelo escaso y nariz bulbosa en forma de pera, puede ayudar a despejar la duda diagnóstica

en pacientes con este síndrome y seleccionar correctamente el locus genético a estudiar para confirmar el diagnóstico.

4.3.5. Síndrome de Gorlin (OMIM#109400)

Durante los años 60 se reportaron varios casos de calcificaciones subcutáneas y respuesta fosfatúrica defectuosa a la PTH exógena en pacientes con síndrome de Gorlin (SG) también llamado síndrome de carcinoma nevoide de células basales^{151,152}. Sin embargo, estudios posteriores no han sido capaces de demostrar la existencia de una resistencia a la PTH en pacientes con SG¹⁵³⁻¹⁵⁵. El SG se caracteriza por la presencia de carcinomas múltiples de células basales (CCB), queratoquistes odontogénicos mandibulares, predisposición a meduloblastomas de aparición precoz, e hiperqueratosis palmoplantar, junto con ciertas características óseas (braquicefalia, talla baja) y calcificaciones intracerebrales que pueden remedar las típicas de AHO. Se trata de un síndrome raro, de herencia autosómica dominante con penetrancia completa y expresividad variable, producido por mutaciones en el gen *PTCH1* (9q22).

La presencia de CCB suele ser útil para orientar la sospecha diagnóstica y solicitud del estudio genético específico correspondiente. No obstante, en pacientes con PHP/PPHP además de las calcificaciones subcutáneas también se han descrito afecciones dermatológicas de distinta naturaleza, como dermatitis

seborréica y atópica, nevus de splitz, melanomas, colagenomas e incluso hipoplasia dérmica aislada^{104,105,156,157}, por lo que una correcta caracterización anatomopatológica de dichas lesiones es obligatoria en casos de duda diagnóstica, y la presencia de estas lesiones no descarta la coexistencia de un PHP.

Aunque hasta el momento no se han descrito casos de meduloblastomas, sí existen dos pacientes reportados con PHP y astrocitomas cerebelosos^{158,159}, uno de ellos en una niña de 3 años y medio con PHP1A.

4.3.6. Distrofia miotónica

Por otra parte, las características bioquímicas del PHP2 se han descrito también en un subgrupo de pacientes con distrofia miotónica, en el que se encontraban con más frecuencia calcificaciones y osificaciones ectópicas, retraso mental y cataratas¹⁶⁰. En estos pacientes el grado de resistencia a la PTH se correlacionaba con el grado de expansión de las repeticiones CTG típicas de la enfermedad en el gen de la proteína quinasa.

5. Alteraciones genéticas asociadas

El Pseudohipoparatiroidismo está asociado a alteraciones genéticas y epigenéticas en el locus *GNAS*, localizado en el brazo largo del cromosoma 20 (20q13).

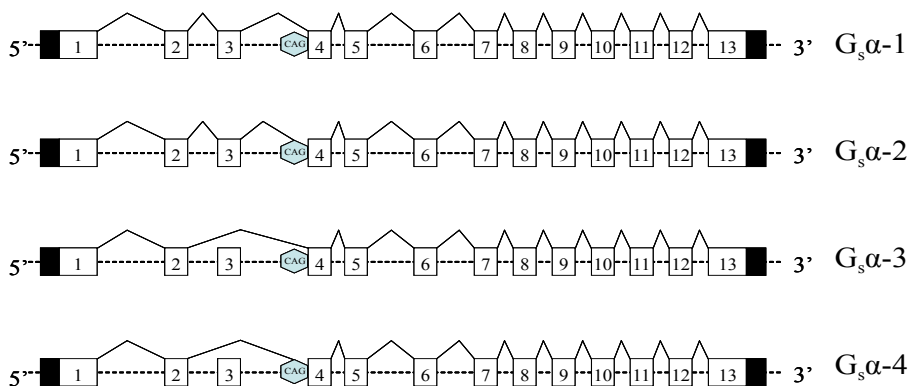


Figura 4: Representación esquemática de las cuatro isoformas que resultan del empalme alternativo de los exones del gen *GNAS*. Los cuadrados blancos representan los exones, los cuadrados negros las regiones no traducidas del primer y último exón (UTR), la línea punteada los intrones y las líneas continuas el empalme de los distintos exones. Dibujo no a escala.

5.1. Estructura de la región 20q13

5.1.1. El gen *GNAS*

La subunidad alfa de la proteína G estimuladora ($G_s\alpha$) se encuentra codificada por el gen *GNAS* (*Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating*), descrito por primera vez en 1988 por Kozasa y colaboradores¹⁶¹, y originalmente definido por los 13 exones que codifican para la proteína $G_s\alpha$ ¹⁶¹.

El gen presenta cuatro dominios funcionales: el dominio con actividad GTPasa codificado por los exones 1 y 2; el dominio de unión a la Adenilatociclasa codificado por los exones 4 y 5; el dominio de cambio conformacional dependiente de GTP (exón 9) y finalmente el dominio de unión al receptor codificado por los exones 12 y 13^{162,163}. Además, existen dos formas largas ($G_s\alpha$ -1 y $G_s\alpha$ -2) y dos formas cortas ($G_s\alpha$ -3 y $G_s\alpha$ -4)

que resultan del empalme alternativo con la inclusión o no del exón 3, un exón que codifica para 15 aminoácidos localizado en el dominio hélice de $G_s\alpha$, el cual no está presente en otras subunidades $G\alpha$ ^{161,164}. El uso de un aceptor de empalme alternativo en el exón 4 permite la unión de un residuo extra de serina en $G_s\alpha$ -2 y $G_s\alpha$ -4 (Figura 4.).

5.1.2. El locus *GNAS*

El locus *GNAS* es uno de los más complejos del genoma humano, debido a que genera diferentes transcritos expresados a partir del alelo paterno, materno o ambos que comparten los exones comunes 2-13¹². Estos transcritos utilizan cuatro primeros exones alternativos que empalman con el exón común 2 del gen *GNAS* (Figura 5).

El primer exón alternativo aguas abajo es el exón 1 $G_s\alpha$, que codifica para la proteína $G_s\alpha$, de 395 aminoácidos,

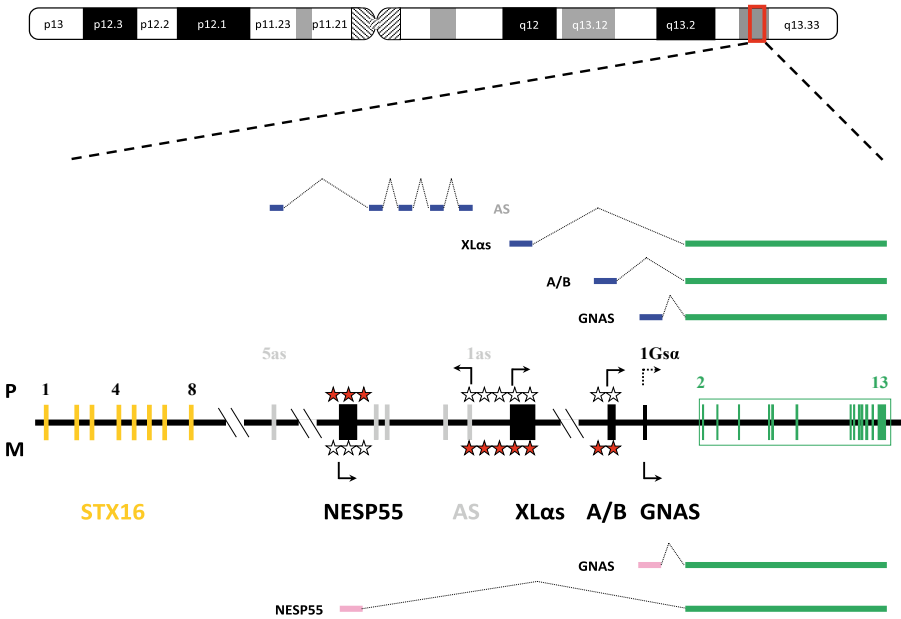


Figura 5: Organización e imprinting en el locus GNAS. Se muestra la organización general y patrones de imprinting paterno (arriba) y materno (abajo) del locus GNAS. Los exones que generan transcritos en la hebra 5'-3' (NESP55, XL, A/B, and Gas) aparecen como cajas negras; los exones comunes del 2 al 13 como cajas verdes; los cinco exones del transcrito antisentido (AS) como cajas grises y los ocho exones de STX16 como cajas naranjas. Los promotores de los transcritos sentidos y antisentido (flechas), así como los distintos patrones de splicing de los transcritos paternos (azul) y materno (rosa) aparecen encima o debajo de los exones paterno y materno, respectivamente. La flecha punteada en la transcripción de Gas desde el alelo paterno representa que este promotor está completamente activo en la mayoría de los tejidos, pero en algunos, como el túbulo renal proximal, estaría silenciado. Las regiones diferencialmente metiladas (DMR) se muestran como estrellas (roja, metilada; blanca, no metilada).

mientras que el exón alternativo que se encuentra más aguas arriba (a 49kb del exón 1) produce el transcrito codificante para la proteína similar a la cromogranina NESP55¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. Es una cromogranina ácida localizada en tejido neuroendocrino, como la médula adrenal, hipófisis e hipotálamo¹⁶⁸. Esta distribución en el cerebro coincide con el patrón del sistema de transmisión de la norepinefrina, epinefrina y serotonina¹⁶⁹. Toda la secuencia codificante para NESP55 se encuentra incluida en este primer exón y por lo tanto los exones del 2 al 13

se encuentran incluidos en la región 3'UTR (*UnTranslated Region*) del transcrito NESP55^{166,167,170}.

Otro primer exón alternativo está localizado unas 11kb aguas abajo de NESP55 y a unas 35kb aguas arriba del exón 1 G_{α} , este transcrito codifica para XLαs, una isoforma de G_{α} con una larga extensión amino terminal^{171,172}, produciendo una proteína ácida de 78-kDa^{67,68}. La región aminoterminal alternativa de XLαs, está codificada por su exón, mientras que la región carboxilo-terminal, idéntica a la de G_{α} , está codificada por los exones 2

al 13 y es requerida para la unión del nucleótido Guanina y la asociación del complejo $G\beta$ - $G\gamma$, mientras que el exón XLas es crítico para su unión a la membrana¹⁷³.

Estudios bioquímicos indican que XLas tiene varias propiedades en común con $G_s\alpha$, incluyendo la estimulación de la adenilato ciclasa¹⁷⁴. Pero, al contrario que $G_s\alpha$, no hay evidencias de que XLas esté activada por los receptores transmembrana que activan a $G_s\alpha$ ¹⁷⁴. Por tanto, XLas puede ser un estimulador de la adenilato ciclasa activado por una vía alternativa.

La región comprendida entre NESP55 y XLas está muy bien conservada tanto en el humano como en el ratón¹⁷⁵. En particular, hay una región altamente conservada, aproximadamente a 3kb aguas arriba del exón XLas, que es un exón para el transcrito antisentido que atraviesa el exón NESP55 en dirección opuesta, llamado NESPas o GNAS-AS^{175,176}. En humanos presenta 5 exones, el 5as localizado aguas arriba, y los cuatro restantes aguas debajo de NESP55.

El cuarto exón alternativo está localizado 2,5kb aguas arriba del exón 1 $G_s\alpha$ y genera transcritos en la hebra sentido. El exón 1 alternativo, llamado A/B¹⁷⁷ o 1A^{178,179}, empalma con el exón común 2 mediante el uso de dos donadores de empalme alternativo. No hay un comienzo consenso de traducción AUG en el exón A/B, y se asume que el transcrito resultante del exón A/B no es traducido^{178,180}.

5.2. Impronta del locus GNAS

También a nivel de impronta el locus GNAS es un locus complejo, con una elevada complejidad transcripcional y un complicado patrón de impronta, permitiendo la expresión de varios productos génicos del alelo materno y otros del alelo paterno¹² (Figura 5). La pérdida de expresión de las proteínas codificadas por el gen GNAS, localizado en esta región, puede explicar en gran parte los distintos fenotipos¹⁸¹.

El locus GNAS presenta 3 DMRs en las que están incluidos los exones NESP55, XLas, A/B y AS (Figura 5). La DMR en la que se encuentra inmerso el exón NESP55 se establece en la postfertilización y está metilada en el alelo paterno, por lo que NESP55 y sus transcritos asociados sólo se expresan a partir del alelo materno^{165,166,176}. Mientras que la DMR donde está localizado el exón A/B y la DMR en la que están incluidos los exones AS y XLas se establecen durante la gametogénesis y están metiladas en el alelo materno por lo que sus transcritos sólo se expresan a partir del alelo paterno^{166,171,175,176}. La excepción es el exón 1 $G_s\alpha$, que aunque se encuentra inmerso en una isla CpG cercana pero diferente a la del exón A/B, no presenta metilación diferencial en los alelos parentales^{165,171,182}. Curiosamente estudios clínico-genéticos de pacientes con Osteodistrofia Hereditaria de Albright^{10,183} sugieren que $G_s\alpha$ presenta impronta tejido específico, estando expresado bialélicamente en la mayoría de tejidos, y sólo a partir del alelo

materno en algunos tejidos, como en el túbulo renal proximal, tiroides, gónadas e hipófisis^{182,184,185}. Sin embargo, en los tejidos donde $G_s\alpha$ está improntado, la impronta no es absoluta y hay cierta expresión del alelo paterno^{185,186}. Por otra parte, estudios recientes de Klenke y colaboradores sugieren que, incluso en los tejidos de expresión bialélica, existe una modesta expresión preferencial del alelo materno¹⁸⁷.

5.3. Mutaciones en el gen *GNAS*

En el gen *GNAS* se han descrito tanto mutaciones germinales como somáticas, activantes e inactivantes, cada una asociada con distintas entidades clínicas.

5.3.1. Mutaciones activantes

Las mutaciones en los residuos Arg201 o Gln227 inhiben la actividad GTPasa, generando la activación constitutiva de $G_s\alpha$. Estas mutaciones son dominantes, y las proteínas que las portan se denominan oncogén *gsp*¹⁸⁸.

Las mutaciones activantes en el gen *GNAS* se han descrito en tumores endocrinos y no endocrinos debido a que el AMPc estimula tanto la proliferación como la secreción hormonal^{189,190}. En concreto se han descrito mutaciones somáticas en Arg201 o Gln227 en adenomas hipofisarios secretores de GH^{188,191}, adenomas hipofisarios secretores de ACTH^{192,193}, tumores hipofisarios no funcionantes¹⁹⁴, tumores tiroideos¹⁹⁵, tumor de células de Leydig¹⁹⁶, tumores de célula de la granulosa ovárica¹⁹⁷,

carcinoma de células renales¹⁹⁸, carcinoma hepatocelular¹⁹⁹ y síndromes mielodisplásicos²⁰⁰. Las mutaciones en el codón 201 (Arg a Cys o His) son más frecuentes que las del 227 (Gln a Arg, His, Lys o Leu).

Por otro lado el síndrome de McCune Albright (MAS) presenta mutaciones somáticas activantes en la Arg201, pudiendo cambiar a cisteína o histidina (o incluso serina o glicina). Esta mutación se producen en el desarrollo temprano, produciendo un mosaicismo con una amplia distribución de células mutadas²⁰¹. Este síndrome fue descrito en colaboración por McCune²⁰² y Albright²⁰³ y se define como un desorden esporádico caracterizado por una tríada de pubertad precoz periférica, manchas cutáneas café con leche de bordes irregulares y displasia fibrosa ósea poliostótica, que puede asociarse a otras endocrinopatías. La mayoría de los pacientes con MAS presentan una o dos de las características de la tríada, o una de estas características junto a otras anomalías endocrinas o no endocrinas.

Finalmente la displasia fibrosa ósea es una lesión osteofibrosa intramedular benigna con dos patrones morfológicos en función del número de huesos implicados: monostótica (85%) o poliostótica (15%). Esta última se ha integrado al síndrome de McCune-Albright cuando se asocia a hiperpigmentación cutánea y trastornos endocrinológicos como pubertad precoz. En algunos casos se han encontrado mutaciones somáticas *de novo* en *GNAS*, principalmente R201C y R201H²⁰⁴, aunque también se han descrito la R201S²⁰⁵ y Q227L²⁰⁶.

5.3.2. Mutaciones inactivantes

Los primeros trabajos de mutaciones germinales inactivantes en *GNAS* son de 1990^{207,208}. Desde entonces se han descrito más de 200 mutaciones a lo largo de todo el gen, por lo general específicas de cada familia, si bien existe un *hot-spot* en el exón 7 consistente en la delección de cuatro nucleótidos (c.565_568delGACT) y, proporcionalmente, un mayor número de mutaciones en el exón 1 (www.lovd.nl/*GNAS*)²⁰⁹.

Los tipos de mutaciones incluyen mutaciones de cambio de sentido (*missense*), sin sentido (*nonsense*), inserciones y delecciones que modifican el lugar de corte y empalme del pre-ARN o introducen nuevos codones de parada, inversiones²¹⁰ y delecciones intragénicas^{211,212} o delecciones constitucionales de parte²¹² o todo²¹³ el brazo largo del cromosoma 20, región cromosómica en la que está localizado el locus *GNAS* (para revisión de las mutaciones, consultar Elli et al²¹⁴ o Lemos y Thakker²⁰⁹).

Las mutaciones pueden ser tanto *de novo* como heredadas. En función del alelo portador de la mutación, y debido al fenómeno de imprinting mencionado

previamente, las manifestaciones clínicas asociadas serán diferentes. Así, las mutaciones en el alelo materno se asocian con PHP1A/PHP1C, mientras que las paternas se observan en pacientes con PPHP/POH^{10,182,215-218} (ver apartado 7).

La mayoría de las mutaciones en *Gsα* no se expresan debido a la inestabilidad del ARN mutado o a la localización subcelular alterada. Por lo tanto, los tejidos accesibles de los pacientes con PHP1A, tales como los fibroblastos de la piel y eritrocitos, parecen revelar una reducción de la actividad del ARNm o de la proteína cercana al 50%^{219,220}. Además, los ensayos bioquímicos de reconstitución de membranas celulares derivadas de los pacientes con membranas celulares que carecen de proteína *Gsα* funcional, como la de eritrocitos de pavo, muestran una reducción aproximada del 50% en la generación de AMPc inducido por hormona^{24,221}. Sin embargo, dado que en estos experimentos se utilizan análogos de GTP no hidrolizables como estímulos en los ensayos de actividad de *Gsα*, sólo son válidos para aquellos mutantes cuyo problema está en la estimulación de la adenilatociclasa y no para aquellos

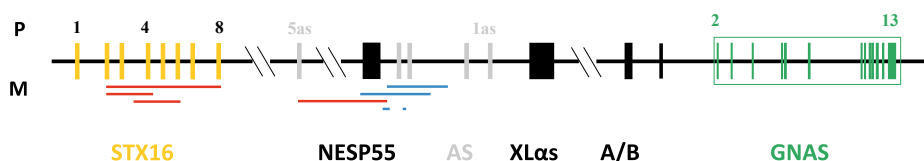


Figura 6: Localización de las microdelecciones que afectan a la metilación de diferentes DMRs de *GNAS*. Las delecciones maternas en *STX16* y *NESP55* provocan una pérdida de metilación aislada en A/B (señaladas con una línea roja). Las delecciones maternas en los exones 3 y 4 de *GNAS-AS* causan una alteración de la metilación en todos los DMRs de *GNAS* (líneas azules), así como las microdelecciones de 40 y 33pb identificadas en los intrones 4 y 3 de *GNAS-AS*.

relacionados con la unión de G_sα al receptor, mostrando los ensayos una funcionalidad del 100%^{223,222}.

5.4. Alteración de la impronta en el locus GNAS

La pérdida de metilación en el exón A/B, en ocasiones combinada con defectos epigenéticos en alguno de los otros DMR del locus GNAS, se ha asociado con PHP1B¹⁷⁹.

La forma familiar de la enfermedad (AD-PHP1B) está causada,

principalmente, por pérdida de la metilación exclusivamente en el exón A/B, asociada a deleciones en heterozigosis de origen materno en el gen *STX16*, siendo las más frecuentes las de 3kb o 4,4kb^{223,224}, aunque se ha descrito alguna de mayor tamaño²²⁵. En seis familias con AD-PHP1B se han descrito deleciones en *NESP55* y *AS*, en el caso de la última, asociada a alteración de la impronta en todo el locus *GNAS* (Figura 6)²²⁶⁻²²⁹.

La forma esporádica de PHP1B (spor-PHP1B) presenta alteración del patrón de metilación a lo largo de todo el locus *GNAS*, sin que se hayan

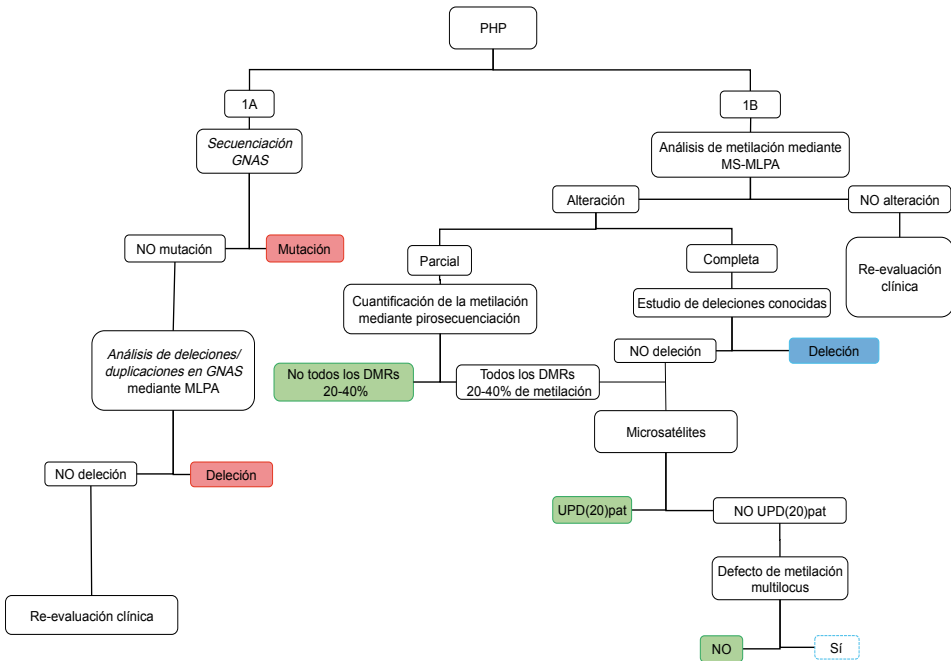


Figura 7: Algoritmo para el diagnóstico genético en función de la sospecha clínica. La presencia de una alteración estructural en *GNAS* (rojo), se asocia con PHP1A y un riesgo de recurrencia del 50% (PHP1A si el progenitor es mujer y PPHP si es varón). Las deleciones en *STX16*/*NESP*/*AS* (azul) son responsables de AD-PHP1B, con un riesgo de recurrencia del 50% (PHP1B si el progenitor es mujer). Las alteraciones en la metilación sin causa genética conocida (verde) se asocian con la forma esporádica de PHP1B.

identificado, hasta la fecha, elementos responsables de esta alteración, por lo que la mayoría de ellos serán debidos a errores estocásticos del mantenimiento de la metilación en los primeros estadios del desarrollo embrionario²³⁰. En algunos casos, se ha descrito disomía paterna de parte o todo el brazo largo del cromosoma 20 [UPD(20)pat]^{19,231-235}. La descripción de dos familias independientes que incluían miembros tanto con PHP1A por mutaciones codificantes en *GNAS*, como con spor-PHP1B, por defectos de metilación en *GNAS* (uno de ellos con una [UPD(20)pat]), reveló por primera vez la coexistencia de alteraciones de diferente naturaleza (genéticas y epigenéticas) en el mismo gen como causantes de enfermedad dentro de una misma familia¹⁹. En base a los hallazgos encontrados en estas dos familias y posteriormente en otras tres más, se ha propuesto la posibilidad de una forma autosómica recesiva como causa de esta alteración completa de la metilación²³⁶.

En un pequeño porcentaje de pacientes con spor-PHP1B se han descrito alteraciones en otros loci diferentes a *GNAS*, sin que por el momento se haya podido identificar la(s) causa(s) genética subyacente, si es que existe^{234,237,238}.

Estudios genéticos recientes de nuestro grupo han identificado que pacientes con diagnóstico clínico de PHP1A presentan alteraciones epigenéticas similares a los pacientes con AD-PHP1B²⁰. Estos hallazgos han sido corroborados por grupos independientes^{128,239,240}, pudiendo

hablarse de un solapamiento entre ambos diagnósticos y sugiriendo que el fenotipo de AHO puede ser el resultado de alteraciones tanto genéticas como epigenéticas.

6. Estudios Moleculares

La elección del método de estudio molecular por el que empezar viene determinada por la sospecha clínica (Figura 7).

El **estudio mediante secuenciación del gen *GNAS*** se realizará inicialmente en pacientes con sospecha de PHP1A²⁴¹. En caso de no identificarse una mutación que permita el diagnóstico del PHP1A y ante una clínica muy consistente, debe plantearse complementar el estudio cuantitativo del gen mediante MLPA[®] para identificar posibles deleciones totales o parciales de *GNAS* como causa genética²¹². Si continúa siendo negativo, valorar revisar diagnósticos diferenciales (apartado 4).

Para el estudio de pacientes con sospecha de PHP1B, se recomienda empezar mediante **MS-MLPA** (kit ME031, MRC Holland, Amsterdam) que permite la caracterización de los defectos en la impronta, así como las deleciones en *STX16* y la región común a las deleciones en *AS* descritas hasta la fecha²⁴¹. Una vez detectada la alteración en la impronta, es recomendable validarlo mediante técnicas independientes^{241,242}.

En los pacientes con alteración en el patrón de metilación en todos los DMR, debe procederse a descartar la UPD(20) pat mediante el uso de microsatélites²⁴¹.

Dado que hasta la fecha sólo se han descrito isodisomías²³¹⁻²³⁵, también es posible emplear el SNP array.

Si el paciente no presenta disomía, podría valorarse analizar el estado de metilación en otros loci improntados. Aunque por el momento no se conozca la causa de este defecto multilocus, es importante tener en cuenta que quizá se identifique en un futuro próximo.

7. Correlaciones Genotipo-Fenotipo

7.1. Mutaciones en el gen GNAS

Como hemos visto, las mutaciones inactivantes son las responsables del PHP1A y del PPHP. De hecho, el PPHP y PHP1A ocurren dentro de una misma familia¹⁰⁻¹². Un análisis más detallado de varias de estas familias puso de manifiesto que la herencia de cada trastorno sigue un modelo de impronta, es decir, el fenotipo de la descendencia es determinado por el sexo del progenitor que transmite el defecto molecular, en lugar de por su fenotipo¹⁸¹. De acuerdo con este modelo de herencia bajo el fenómeno de impronta, si el defecto genético se hereda del padre lleva a un fenotipo AHO sin resistencia a la hormona, es decir PPHP, ya sea su padre PHP1A o PPHP; mientras que si el defecto genético se hereda de la madre, genera un fenotipo AHO y una resistencia a la hormona paratiroidea, es decir PHP1A, ya sea su madre PHP1A o PPHP^{10,11}. En otras palabras, la resistencia a la

hormona se desarrolla sólo cuando la mutación en *Gsα* se hereda de la madre, mientras que el fenotipo de AHO se desarrolla cuando la mutación en *Gsα* se hereda de cualquiera de los progenitores. Este modelo de herencia con fenómeno de impronta para la resistencia a la hormona es coherente con el modelo de impronta del locus *GNAS* y la evidencia de que *Gsα* muestra una expresión predominantemente materna en determinados tejidos como túbulo renal proximal, hipófisis y tiroides^{182,184,185}, mencionado previamente.

Si bien las mutaciones inactivantes en *GNAS* pueden encontrarse en cualquiera de los exones (con mayor frecuencia en el exón 1 y mutación *hot-spot* en el 7)^{209,214}, hasta la fecha sólo hay una mutación identificada en el exón 3²⁴³. Esta ausencia de mutaciones en el exón 3 puede deberse a que el procesamiento del RNA que conlleva la ausencia de este exón, genera una proteína *Gsα* funcional (formas *Gsα*-3 y 4, figura 4). De hecho, en la familia descrita por Thiele y colaboradores, los portadores de la mutación en el exón 3 presentaban una actividad *Gsα* del 70-75% de los normales (en lugar de la reducción del 50%) y el fenotipo era más leve que en el resto de los pacientes con PHP1A²⁴³.

Recientemente, Turan y colaboradores han descrito el caso de una paciente de 13,5 años con talla baja, resistencia a GHRH y a PTH, no asociada a déficit de vitamina D. Clínicamente, presentaba fenotipo de AHO con la mencionada talla baja, acortamiento bilateral del III y IV metacarpiano, cara redondeada

y osificaciones subcutáneas. Si bien todo indicaba que podía tratarse de un PHP1A, la mutación, *de novo*, estaba presente en el alelo paterno, siendo, por tanto el primer caso con mutación en el alelo paterno (PPHP) con resistencia hormonal⁸¹. Existen casos previos con alteración en el alelo paterno y resistencia a GHRH²⁴⁴ o a PTH^{157,213,245-247}, aunque en alguno de estos últimos faltaban datos relevantes como los niveles de vitamina D. Son necesarios más estudios para valorar las implicaciones de estos hallazgos.

Curiosamente, existe una mutación *missense* (A366S) que se ha asociado en dos varones a PHP1A y testotoxicosis^{248,249}. Al parecer esta sustitución conlleva la activación constitutiva de la adenilato ciclasa al generar una liberación acelerada del GDP y, manteniendo unido, por tanto, el GTP a G α durante más tiempo. Sin embargo, mientras que esta proteína mutada es estable a la reducida temperatura de los testículos, es termolábil a 37°C, lo que conlleva una menor actividad de G α en el resto de los tejidos, explicando así el fenotipo de estos pacientes.

Respecto al PPHP, que se utiliza para describir los pacientes que tienen las características clínicas de PHP1A pero una bioactividad de G α normal⁷ (Tabla 1), algunos investigadores sugerimos que los pacientes subtipados como PPHP representan un subgrupo de pacientes PHP1A que portan mutaciones en los exones 12 y 13, que corresponden con el dominio de unión al receptor de G α , (de ahí su actividad G α normal en ensayos de los

bioactividad)²⁵⁰.

Las mutaciones en el alelo paterno también se asocian a POH^{217,218}, una rara enfermedad autosómica dominante caracterizada por osificaciones dérmicas de comienzo en la infancia, seguidas de un aumento en la formación de hueso en músculo y fascia⁶². Aunque una reciente revisión de todas las mutaciones descritas en GNAS muestra que las mutaciones deletéreas (mutaciones *nonsense* y *frameshift*) son más frecuentes en pacientes con POH que con PPHP/PHP1A²⁰⁹, ante un paciente con alteración en su alelo paterno, no es posible saber cuál de las dos entidades presentará dado que las mismas mutaciones pueden encontrarse en PPHP y POH^{209,217,218}. De hecho, dado que el fenotipo de AHO es muy variable e incluye las osificaciones subcutáneas y que la base genética es la misma, y que en algunos pacientes con POH ha sido posible identificar algunas características similares al AHO e incluso resistencias hormonales²¹⁸, hay quienes han postulado que el POH representa el final del espectro de las características asociadas a AHO²¹⁸. Otro dato apoyando este espectro común es que los pacientes con mutaciones en el alelo paterno, tanto asociadas a PPHP como POH, presentan retraso del crecimiento intrauterino¹³⁰, particularmente cuando afectan a los exones 2-13²⁵¹.

Se han descrito tres series importantes de pacientes (italiana, española y alemana) intentando establecer correlaciones entre el tipo de mutación y/o su localización y distintas características clínicas^{18,61,214}. Las

principales conclusiones de estos trabajos son que si bien no existe una correlación entre la edad al diagnóstico, la gravedad de la resistencia hormonal o las características del fenotipo AHO y el tipo de mutación o su localización^{18,61,214}, los pacientes con alteraciones en el exón 1 presentan una mayor prevalencia de osificaciones ectópicas²¹⁴, siendo esta diferencia más acusada cuando son portadores de mutaciones deletéreas, independientemente del exón afectado⁶¹. Además, en la serie alemana también se observa una mayor frecuencia de braquimetacarpia en pacientes portadores de mutaciones deletéreas⁶¹, lo que atribuyen a que, dado que la presencia de braquimetacarpia en pacientes con PHP es dependiente de la edad⁴³, puede que ésta se manifieste más tardíamente en pacientes con mutaciones *missense*.

7.2. Alteración de la impronta en el locus GNAS

Los pacientes con alteraciones en el patrón de metilación del locus GNAS presentan, como hemos mencionado, PHP1B. En este caso los pacientes cursan, por lo general, con resistencia a la PTH (y algunos casos a la TSH) en ausencia de otras resistencias hormonales.

Existe un único trabajo en el que se comparan las características clínicas y analíticas de los pacientes con la forma esporádica y la forma autosómica dominante de PHP1B⁴⁰. Observaron que no todos los individuos portadores de la alteración en *STX16* (AD-PHP1B)

presentaban manifestaciones clínicas en el momento del diagnóstico genético, habiendo sido reclutados por ser familiares de un paciente con PHP1B, lo que permitió su identificación para un correcto seguimiento clínico. De hecho, los análisis realizados tras su estudio genético revelaban que todos los varones y la mayoría de las mujeres presentaban resistencia a la PTH, asociada o no a alteración en el calcio y fósforo.

La edad al diagnóstico de los pacientes con spor-PHP1B era similar a los pacientes con AD-PHP1B. En las mujeres, los valores de PTH al diagnóstico eran más altos en las que presentaban spor-PHP1B tanto respecto a las mujeres con AD-PHP1B como a los varones con spor-PHP1B. Si bien sería necesario confirmarlo en series más amplias, los autores proponen que la diferencia entre ambos sexos podría deberse a posibles efectos de los esteroides sexuales sobre la acción de PTH en riñón y hueso.

Por su parte, Bréhin y colaboradores estudiaron la relación entre la pérdida de metilación en el exón A/B y el aumento del crecimiento intrauterino y observaron que los pacientes con AD-PHP1B presentaban un mayor peso y talla que sus hermanos, y mucho mayor que la media poblacional. Estas diferencias eran aún más importantes en el caso de hijos de portadoras asintomáticas. En el caso del spor-PHP1B, su peso y talla estaba también ligeramente por encima de la media, pero no tan marcado como en el caso de los AD-PHP1B²⁵².

Algunos pacientes con PHP1B debido a disomía son más grandes al nacimiento,

presentando macrosomía, macrocefalia y talla alta^{233,235}.

7.3. Mutación versus metilación

Apenas existen trabajos donde se comparen ambas alteraciones moleculares en la misma serie. Dentro de los datos publicados podemos observar que los pacientes con alteraciones en la secuencia se diagnostican a una edad más temprana que los que presentan alteración en la metilación¹⁸, probablemente causado por la diferencia en la actividad Gsa que ambos presentan³⁰.

Asimismo, los pacientes con mutaciones presentan mayor sintomatología asociada a la hipocalcemia, como tetania, temblores, cataratas y anomalía dental¹⁸. Todo ello podría ser consecuencia de la menor tolerancia a la hipocalcemia en estos pacientes²⁵³.

En cuanto a las características clínicas asociadas al fenotipo AHO, las osificaciones subcutáneas no están presentes en los pacientes con alteración en la metilación¹⁸ y la obesidad y la braquidactilia es menos marcada en este grupo en comparación con los pacientes con alteración en la secuencia^{18,20}.

8. Asesoramiento Genético

8.1. PPH1A

Las mutaciones identificadas en el caso índice pueden ser transmitidas en el 50% de los casos. Si la

mutación es transmitida por una mujer a su descendencia, ésta presentará riesgo a desarrollar pseudohipoparatiroidismo1A (es decir, fenotipo de Albright en presencia de alteraciones hormonales como PTH, TSH y gonadotropinas). Sin embargo, si es un varón el que transmite la alteración, los hijos e hijas, en general, no presentarán alteraciones hormonales, pudiendo cursar tanto con PPHP como con POH.

Por tanto, la identificación de una alteración en el caso índice confirma tanto el diagnóstico clínico y ofrecen la posibilidad de estudios predictivos y prenatales. El estudio preimplantacional es posible²⁵⁴, pero ha de tenerse en cuenta la gravedad de la resistencia a gonadotropinas y la normativa legal del país

Los familiares no portadores de la alteración genética familiar, pueden ser excluidos de seguimiento clínico²⁴¹.

En caso de resultado negativo para el estudio de mutaciones puntuales en el caso índice, debiera continuarse el estudio descartando alteraciones en la metilación en el locus GNAS^{20,128,239,240} o deleciones/duplicaciones en GNAS²¹².

En ausencia de resultados moleculares concluyentes, los familiares tendrán un seguimiento clínico regular.

8.2. PPH1B

Todos los estudios sugieren que la enfermedad aparece por pérdida de impronta en el exón A/B, sea ésta aislada o incluyendo el resto de DMRs

del locus GNAS. Como hemos visto esta alteración en la impronta puede estar causada por microdeleciones²²³⁻²²⁹. Estas microdeleciones pueden ser transmitidas en el 50% de los casos. La enfermedad se presenta sólo cuando la microdelección (bien en STX16, bien en NESP55/AS) es heredada por línea materna. Al heredarse la microdelección, la descendencia presenta pérdida en la metilación, que es la causa de la aparición de la enfermedad. El cuadro clínico es más leve, no presentándose fenotipo de Albright (o si existe es muy leve), y sólo se han encontrado alteraciones hormonales a nivel de PTH y TSH. Si la microdelección es heredada del padre, no tendrá consecuencias en esa generación, y sólo aparecerá pérdida en la metilación (y por tanto cuadro de pseudohipoparatiroidismo) cuando sea transmitida por una mujer en cualquiera de las generaciones posteriores.

En los casos asociados a disomía paterna, la probabilidad de transmitir la enfermedad es la misma que en la población general, salvo que sea

debida a reordenamiento por algún tipo de alteración cromosómica en los progenitores (cuyo riesgo de recurrencia dependería de dicho defecto genético).

En algunos casos, en los que hay alteración del patrón de metilación pero no se detectan microdeleciones asociadas ni se identifica ninguna otra causa genética subyacente, no podemos precisar el riesgo de transmisión de la enfermedad. Por lo cual sólo podemos decir que la enfermedad, en el individuo estudiado, es causada por la alteración en el patrón de metilación, pero el riesgo en las generaciones siguientes es incierto.

AGRADECIMIENTOS

Guiomar Pérez de Nanclares está parcialmente financiada por el programa I3SNS del Ministerio de Sanidad Español (CP03/0064; SIVI 1395/09). Las tres autoras son miembros de la *European COST action – European Network for Human Congenital Imprinting Disorders* (BM1208)

RESUMEN

El pseudohipoparatiroidismo (PHP) es una rara enfermedad endocrina caracterizada por resistencia a la PTH en presencia de hipocalcemia e hiperfosfatemia. Pacientes con PHP1A generalmente presentan otras resistencias hormonales y muestran un fenotipo característico que se conoce como osteodistrofia hereditaria de Albright (AHO). Este mismo fenotipo también está presente en pacientes diagnosticados de pseudopseudohipoparatiroidismo (PPHP), que no tienen resistencia hormonal. Por otra parte, los pacientes con PHP1B, presentan, preferentemente, resistencia a la PTH y no tienen fenotipo de Albright.

Desde el punto de vista genético, el PHP1 está causado por alteraciones en el locus GNAS. Este locus está sometido al fenómeno de imprinting, lo que tiene consecuencias importantes a la hora de establecer un patrón de herencia y un adecuado consejo genético.

Así, los pacientes con PHP1A y PPHP presentan mutaciones inactivantes en heterocigosis en el alelo materno o paterno, respectivamente, afectando a cualquiera de los trece exones codificantes de la proteína $Gs\alpha$. Por su parte, el PHP1B se debe a alteraciones en el patrón de metilación del locus GNAS. En algunos casos, esas pérdidas de metilación se asocian con microdeleciones en *STX16/NESP55* o *GNAS-AS* que son transmitidas por la madre (o se encuentran en el alelo materno) y hablamos de la forma autosómica dominante de la enfermedad. En la mayoría de los casos, se desconoce la causa de esa alteración en la metilación.

REFERENCIAS

- Albright F, Burnett CH, Smith PH, Parson W. Pseudohypoparathyroidism- an example of "Seabright syndrome". *Endocrinology* 1942;30:922-32.
- Tashjian AH, Jr., Frantz AG, Lee JB. Pseudohypoparathyroidism: assays of parathyroid hormone and thyrocalcitonin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966;56:1138-42.
- Mann JB, Alterman S, Hills AG. Albright's hereditary osteodystrophy comprising pseudohypoparathyroidism and pseudo-pseudohypoparathyroidism. With a report of two cases representing the complete syndrome occurring in successive generations. *Ann Intern Med* 1962;56:315-42.
- Eyre WG, Reed WB. Albright's hereditary osteodystrophy with cutaneous bone formation. *ArchDermatol* 1971;104:634-42.
- Farfel Z, Friedman E. Mental deficiency in pseudohypoparathyroidism type I is associated with Ns-protein deficiency. *AnnInternMed* 1986;105:197-9.
- Albright F, Forbes AP, Henneman PH. Pseudo-pseudohypoparathyroidism. *TransAssoc Am Physicians* 1952;65:337-50.
- Farfel Z, Brothers VM, Brickman AS, Conte F, Neer R, Bourne HR. Pseudohypoparathyroidism: inheritance of deficient receptor-cyclase coupling activity. *ProcNatlAcadSciUSA* 1981;78:3098-102.
- Fitch N. Albright's hereditary osteodystrophy: a review. *AmJMedGenet* 1982;11:11-29.
- Weinberg AG, Stone RT. Autosomal dominant inheritance in Albright's hereditary osteodystrophy. *JPediatr* 1971;79:996-9.
- Davies SJ, Hughes HE. Imprinting in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Med Genet* 1993;30:101-3.
- Wilson LC, Oude Luttikhuis ME, Clayton PT, Fraser WD, Trembath RC. Parental origin of Gs alpha gene mutations in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Med Genet* 1994;31:835-9.
- Weinstein LS, Yu S, Warner DR, Liu J. Endocrine manifestations of stimulatory G protein alpha-subunit mutations and the role of genomic imprinting. *EndocrRev* 2001;22:675-705.
- Drezner M, Neelon FA, Lebovitz HE. Pseudohypoparathyroidism type II: a possible defect in the reception of the cyclic AMP signal. *N Engl J Med* 1973;289:1056-60.
- Beaudoing A, Jalbert P, Jaillard M, Bost M, Nigri MM. Albright's hereditary osteodystrophy. 3 cases of type II. *AnnPediatri(Paris)* 1970;17:245-59.
- Akin L, Kurtoglu S, Yildiz A, Akin MA, Kendirici M. Vitamin D deficiency rickets mimicking pseudohypoparathyroidism. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology* 2010;2:173-5.
- Linglart A, Menguy C, Couvineau A, et al. Recurrent PRKARIA mutation in acrodysostosis with hormone resistance. *NEnglJMed* 2011;364:2218-26.
- Silve C, Clauser E, Linglart A. Acrodysostosis. *HormMetab Res* 2012.
- Fernandez-Rebollo E, Lecumberri B, Gaztambide S, Martinez-Indart L, Perez de NG, Castano L. Endocrine profile and phenotype-(epi) genotype correlation in Spanish patients with pseudohypoparathyroidism. *JClinEndocrinolMetab* 2013;98:E996-1006.
- Lecumberri B, Fernandez-Rebollo E. Coexistence of two different pseudohypoparathyroidism subtypes (Ia and Ib) in the same kindred with independent Gs{alpha} coding mutations and GNAS imprinting defects. *J Med Genet* 2009.
- Perez de Nanclares G, Fernandez-Rebollo E, Santin I, et al. Epigenetic defects of GNAS in patients with pseudohypoparathyroidism and mild features of Albright's hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2370-3.
- Brix B, Werner R, Staedt P, Struve D, Hiort O, Thiele S. Different pattern of epigenetic changes of the GNAS gene locus in patients with pseudohypoparathyroidism type Ic confirm the heterogeneity of underlying pathomechanisms in this subgroup of pseudohypoparathyroidism and the demand for a new classification of GNAS-related disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E1564-70.
- Mantovani G, Elli FM, Spada A. GNAS Epigenetic Defects and Pseudohypoparathyroidism: Time for a New Classification? *HormMetab Res* 2012.
- Linglart A, Carel JC, Garabedian M, Le T, Mallet E, Kottler ML. GNAS1 lesions in pseudohypoparathyroidism Ia and Ic: genotype phenotype relationship and evidence of the maternal transmission of the hormonal resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:189-97.

24. Farfel Z, Brickman AS, Kaslow HR, Brothers VM, Bourne HR. Defect of receptor-cyclase coupling protein in pseudohypoparathyroidism. *N Engl J Med* 1980;303:237-42.
25. Levine MA, Downs RW, Jr., Moses AM, et al. Resistance to multiple hormones in patients with pseudohypoparathyroidism. Association with deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein. *Am J Med* 1983;74:545-56.
26. Radeke HH, Auf'mkolk B, Juppner H, Krohn HP, Keck E, Hesch RD. Multiple pre- and postreceptor defects in pseudohypoparathyroidism (a multicenter study with twenty four patients). *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:393-402.
27. Levine MA, Jap TS, Mauseth RS, Downs RW, Spiegel AM. Activity of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein is reduced in erythrocytes from patients with pseudohypoparathyroidism and pseudopseudohypoparathyroidism: biochemical, endocrine, and genetic analysis of Albright's hereditary osteodystrophy in six kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:497-502.
28. Thiele S, de SL, Werner R, et al. Functional characterization of GNAS mutations found in patients with pseudohypoparathyroidism type Ic defines a new subgroup of pseudohypoparathyroidism affecting selectively Gsalpha-receptor interaction. *HumMutat* 2011;32:653-60.
29. Fischer JA, Bourne HR, Dambacher MA, et al. Pseudohypoparathyroidism: inheritance and expression of deficient receptor-cyclase coupling protein activity. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1983;19:747-54.
30. Zazo C, Thiele S, Martin C, et al. Gsalpha activity is reduced in erythrocyte membranes of patients with pseudohypoparathyroidism due to epigenetic alterations at the GNAS locus. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011;26:1864-70.
31. Liu J, Erlichman B, Weinstein LS. The stimulatory G protein alpha-subunit Gs alpha is imprinted in human thyroid glands: implications for thyroid function in pseudohypoparathyroidism types 1A and 1B. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4336-41.
32. Mantovani G, Bondioni S, Linglart A, et al. Genetic analysis and evaluation of resistance to thyrotropin and growth hormone-releasing hormone in pseudohypoparathyroidism type 1b. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:3738-42.
33. Sano S, Iwata H, Matsubara K, Fukami M, Kagami M, Ogata T. Growth hormone deficiency in monozygotic twins with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b. *Endocrine journal* 2015.
34. Eubanks PJ, Stabile BE. Osteitis fibrosa cystica with renal parathyroid hormone resistance: a review of pseudohypoparathyroidism with insight into calcium homeostasis. *Arch Surg* 1998;133:673-6.
35. Murray TM, Rao LG, Wong MM, et al. Pseudohypoparathyroidism with osteitis fibrosa cystica: direct demonstration of skeletal responsiveness to parathyroid hormone in cells cultured from bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 1993;8:83-91.
36. Burnstein MI, Kottamasu SR, Pettifor JM, Sochett E, Ellis BI, Frame B. Metabolic bone disease in pseudohypoparathyroidism: radiologic features. *Radiology* 1985;155:351-6.
37. Jacobson HG. Dense bone--too much bone: radiological considerations and differential diagnosis. Part II. *Skeletal radiology* 1985;13:97-113.
38. Balkissoon AR, Hayes CW. Case 14: intramedullary osteosclerosis. *Radiology* 1999;212:708-10.
39. Sbrocchi AM, Rauch F, Lawson ML, et al. Osteosclerosis in two brothers with autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type 1b: bone histomorphometric analysis. *Eur J Endocrinol* 2011;164:295-301.
40. Linglart A, Bastepe M, Juppner H. Similar clinical and laboratory findings in patients with symptomatic autosomal dominant and sporadic pseudohypoparathyroidism type 1b despite different epigenetic changes at the GNAS locus. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:822-31.
41. Poznanski AK, Garn SM, Nagy JM, Gall JC, Jr. Metacarpophalangeal pattern profiles in the evaluation of skeletal malformations. *Radiology* 1972;104:1-11.
42. De Sanctis L, Vai S, Andreo MR, Romagnolo D, Silvestro L, de SC. Brachydactyly in 14 genetically characterized pseudohypoparathyroidism type 1a patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1650-5.
43. Viragh K, Toke J, Sallai A, Jakab Z, Racz K, Toth M. Gradual development of brachydactyly in pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1945-6.
44. Long DN, Levine MA, Germain-Lee EL. Bone mineral density in pseudohypoparathyroidism type 1a. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4465-75.
45. Linglart A. [Consequences of PTH resistance on adult bone]. *Archives de pediatrie : organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 2007;14:546-8.

46. Wilson LC. Albright's hereditary osteodystrophy. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19 Suppl 2:671-3.
47. Mouallem M, Shaharabany M, Weintrob N, et al. Cognitive impairment is prevalent in pseudohypoparathyroidism type Ia, but not in pseudopseudohypoparathyroidism: possible cerebral imprinting of G α h. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68:233-9.
48. Gnas imprinting differentially affects REM/NREM sleep and cognition in mice. *PLoS Genet* 2012;8:e1002706.
49. Manyam BV. What is and what is not 'Fahr's disease'. *Parkinsonism & related disorders* 2005;11:73-80.
50. Steinbach HL, Young DA. The roentgen appearance of pseudohypoparathyroidism (PH) and pseudopseudohypoparathyroidism (PPH). Differentiation from other syndromes associated with short metacarpals, metatarsals, and phalanges. *The American journal of roentgenology, radium therapy, and nuclear medicine* 1966;97:49-66.
51. Pearson DW, Durward WF, Fogelman I, Boyle IT, Beasall G. Pseudohypoparathyroidism presenting as severe Parkinsonism. *Postgraduate medical journal* 1981;57:445-7.
52. Nyland H, Skre H. Cerebral calcinosis with late onset encephalopathy. Unusual type of pseudopseudohypoparathyroidism. *Acta neurologica Scandinavica* 1977;56:309-25.
53. Delancour A. Ossification des capillaires du cerveau. *Annales medico-psychologiques* 1850;2:458-61.
54. Eaton LC, J.D.; Love, J.G. Symmetrical cerebral calcification, particularly of the basal ganglia, demonstrable roentgenographically; calcification of the finer cerebral blood vessels. *Arch Neurol Psychiatry* 1939;4:921-42.
55. Goswami R, Sharma R, Sreenivas V, Gupta N, Ganapathy A, Das S. Prevalence and progression of basal ganglia calcification and its pathogenic mechanism in patients with idiopathic hypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;77:200-6.
56. Thomas KP, Muthugovindan D, Singer HS. Paroxysmal kinesigenic dyskinesias and pseudohypo-parathyroidism type Ib. *Pediatric neurology* 2010;43:61-4.
57. Evans BK, Donley DK. Pseudohypoparathyroidism, parkinsonism syndrome, with no basal ganglia calcification. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1988;51:709-13.
58. Montenegro AC, Gelsenke T, Carvalho EH, Bandeira F, Sougey E. First description of pseudohypoparathyroidism with frontal lobe calcification and normal serum calcium at the initial manifestation in an otherwise healthy seven-year-old girl. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 2011;55:349-52.
59. Swami A, Kar G. Intracranial hemorrhage revealing pseudohypoparathyroidism as a cause of Fahr syndrome. *Case reports in neurological medicine* 2011;2011:407567.
60. Riepe FG, Ahrens W, Krone N, et al. Early manifestation of calcinosis cutis in pseudohypoparathyroidism type Ia associated with a novel mutation in the GNAS gene. *Eur J Endocrinol* 2005;152:515-9.
61. Thiele S, Werner R, Grotzinger J, et al. A positive genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with Pseudohypoparathyroidism Type Ia and Pseudo-pseudohypoparathyroidism and 33 newly identified mutations in the GNAS gene. *Molecular genetics & genomic medicine* 2015;3:111-20.
62. Kaplan FS, Craver R, MacEwen GD, et al. Progressive osseous heteroplasia: a distinct developmental disorder of heterotopic ossification. Two new case reports and follow-up of three previously reported cases. *JBone Joint SurgAm* 1994;76:425-36.
63. Chen H, Tseng F, Su D, Tsai K. Multiple intracranial calcifications and spinal compressions: rare complications of type Ia pseudohypoparathyroidism. *J Endocrinol Invest* 2005;28:646-50.
64. Long DN, McGuire S, Levine MA, Weinstein LS, Germain-Lee EL. Body mass index differences in pseudohypoparathyroidism type Ia versus pseudopseudohypoparathyroidism may implicate paternal imprinting of G α h(s) in the development of human obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1073-9.
65. Germain-Lee EL. Short stature, obesity, and growth hormone deficiency in pseudohypoparathyroidism type Ia. *Pediatric endocrinology reviews : PER* 2006;3 Suppl 2:318-27.
66. Chen M, Wang J, Dickerson KE, et al. Central nervous system imprinting of the G protein G(s) alpha and its role in metabolic regulation. *Cell Metab* 2009;9:548-55.
67. Shoemaker AH, Lomenick JP, Saville BR, Wang W, Buchowski MS, Cone RD. Energy expenditure in obese children with pseudohypoparathyroidism type Ia. *Int J Obes (Lond)* 2013;37:1147-53.
68. Mantovani G. Clinical review: Pseudohypoparathyroidism: diagnosis and treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3020-30.

69. Linglart A, Maupetit-Mehouas S, Silve C. GNAS-Related Loss-of-Function Disorders and the Role of Imprinting. *Hormone research in paediatrics* 2013;119-29.
70. Bastepe M, Weinstein LS, Ogata N, et al. Stimulatory G protein directly regulates hypertrophic differentiation of growth plate cartilage in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:14794-9.
71. Sakamoto A, Chen M, Kobayashi T, Kronenberg HM, Weinstein LS. Chondrocyte-specific knockout of the G protein G(s)alpha leads to epiphyseal and growth plate abnormalities and ectopic chondrocyte formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2005;20:663-71.
72. Mantovani G, Maghnie M, Weber G, et al. Growth hormone-releasing hormone resistance in pseudohypoparathyroidism type ia: new evidence for imprinting of the Gs alpha gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4070-4.
73. Spiegel AM. Hormone resistance caused by mutations in G proteins and G protein-coupled receptors. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12 Suppl 1:303-9.
74. Olate J, Allende JE. Structure and function of G proteins. *PharmacolTher* 1991;51:403-19.
75. Malbon CC, Berrios M, Guest SJ, et al. Signal transduction via G-protein-linked receptors: physiological regulation from the plasma membrane to the genome. *Chin J Physiol* 1991;34:105-20.
76. Kidd GS, Schaaf M, Adler RA, Lassman MN, Wray HL. Skeletal responsiveness in pseudohypoparathyroidism. A spectrum of clinical disease. *Am J Med* 1980;68:772-81.
77. Cohen RD, Vince FP. Pseudohypoparathyroidism with raised plasma alkaline phosphatase. *Arch Dis Child* 1969;44:96-101.
78. Kolb FO, Steinbach HL. Pseudohypoparathyroidism with secondary hyperparathyroidism and osteitis fibrosa. *J Clin Endocrinol Metab* 1962;22:59-70.
79. Tollin SR, Perlmutter S, Aloia JF. Serial changes in bone mineral density and bone turnover after correction of secondary hyperparathyroidism in a patient with pseudohypoparathyroidism type Ib. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2000;15:1412-6.
80. Wemeau JL, Balavoine AS, Ladsous M, Velayoudom-Cephise FL, Vlaeminck-Guillem V. Multihormonal resistance to parathyroid hormone, thyroid stimulating hormone, and other hormonal and neurosensory stimuli in patients with pseudohypoparathyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19 Suppl 2:653-61.
81. Turan S, Thiele S, Tafaj O, et al. Evidence of hormone resistance in a pseudo-pseudohypoparathyroidism patient with a novel paternal mutation in GNAS. *Bone* 2015;71:53-7.
82. Molinaro A, Tiosano D, Takatani R, et al. TSH elevations as the first laboratory evidence for pseudohypoparathyroidism type Ib (PHP-Ib). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2014.
83. Balavoine AS, Ladsous M, Velayoudom FL, et al. Hypothyroidism in patients with pseudohypoparathyroidism type Ia: clinical evidence of resistance to TSH and TRH. *EurJEndocrinol* 2008;159:431-7.
84. Levine MA, Jap TS, Hung W. Infantile hypothyroidism in two sibs: an unusual presentation of pseudohypoparathyroidism type Ia. *J Pediatr* 1985;107:919-22.
85. Pohlenz J, Ahrens W, Hiort O. A new heterozygous mutation (L338N) in the human Gsalpha (GNAS1) gene as a cause for congenital hypothyroidism in Albright's hereditary osteodystrophy. *Eur J Endocrinol* 2003;148:463-8.
86. Pinsker JE, Rogers W, McLean S, Schaefer FV, Fenton C. Pseudohypoparathyroidism type Ia with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:1049-52.
87. Mantovani G, Spada A. Resistance to growth hormone releasing hormone and gonadotropins in Albright's hereditary osteodystrophy. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19 Suppl 2:663-70.
88. Wolfsdorf JI, Rosenfield RL, Fang VS, Kobayashi R, Razdan AK, Kim MH. Partial gonadotrophin-resistance in pseudohypoparathyroidism. *Acta endocrinologica* 1978;88:321-8.
89. Chaubey SK, Sangla KS. A sporadic case of pseudohypoparathyroidism type I and idiopathic primary adrenal insufficiency associated with a novel mutation in the GNAS1 gene. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 2014;20:e202-6.
90. Rossodivita A, Miceli Sopo S, D'Alessio E, Valentini P. Gonadotropin-dependent sexual precocity in a boy affected by pseudohypoparathyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13 Suppl 1:845-7.
91. Germain-Lee EL, Groman J, Crane JL, Jan de Beur SM, Levine MA. Growth hormone deficiency in pseudohypoparathyroidism type Ia: another

- manifestation of multihormone resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4059-69.
92. de Sanctis L, Bellone J, Salerno M, et al. GH secretion in a cohort of children with pseudohypoparathyroidism type Ia. *J Endocrinol Invest* 2007;30:97-103.
 93. Al-Salameh A, Despert F, Kottler ML, Linglart A, Carel JC, Lecomte P. Resistance to epinephrine and hypersensitivity (hyperresponsiveness) to CB1 antagonists in a patient with pseudohypoparathyroidism type Ic. *Eur J Endocrinol* 2010;162:819-24.
 94. Muniyappa R, Warren MA, Zhao X, et al. Reduced insulin sensitivity in adults with pseudohypoparathyroidism type Ia. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1796-801.
 95. Moses AM, Weinstock RS, Levine MA, Breslau NA. Evidence for normal antidiuretic responses to endogenous and exogenous arginine vasopressin in patients with guanine nucleotide-binding stimulatory protein-deficient pseudohypoparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:221-4.
 96. Faull CM, Welbury RR, Paul B, Kendall-Taylor P. Pseudohypoparathyroidism: its phenotypic variability and associated disorders in a large family. *The Quarterly journal of medicine* 1991;78:251-64.
 97. Tsai KS, Chang CC, Wu DJ, Huang TS, Tsai IH, Chen FW. Deficient erythrocyte membrane Gs alpha activity and resistance to trophic hormones of multiple endocrine organs in two cases of pseudohypoparathyroidism. *Taiwan yi xue hui za zhi Journal of the Formosan Medical Association* 1989;88:450-5.
 98. Vlaeminck-Guillem V, D'Herbomez M, Pigny P, et al. Pseudohypoparathyroidism Ia and hypercalcitoninemia. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3091-6.
 99. Weinstock RS, Wright HN, Spiegel AM, Levine MA, Moses AM. Olfactory dysfunction in humans with deficient guanine nucleotide-binding protein. *Nature* 1986;322:635-6.
 100. Pavone P, Pratico AD, Castellano-Chiodo D, Ruggieri M. Pseudohypoparathyroidism Ia with Evans syndrome. *Journal of pediatric hematology/oncology* 2008;30:628-30.
 101. Thanner F, Kuhner U, Pfeifer U. [Familial liver cirrhosis in pseudohypoparathyroidism in young children (author's transl)]. *Dtsch Med Wochenschr* 1978;103:519-23.
 102. Freson K, Izzi B, Jaeken J, et al. Compound Heterozygous Mutations in the GNAS Gene of a Boy with Morbid Obesity, TSH resistance, Pseudohypoparathyroidism, and a Pro-Thrombotic State. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4844-9.
 103. Paties CT, Borroni G, Rosso R, Vassallo G. Relapsing eruptive multiple Spitz nevi or metastatic spitzoid malignant melanoma? *The American Journal of dermatopathology* 1987;9:520-7.
 104. Baldini MT, Leo E, Belli F, Testori A, Bartoli C, Rovati M. [Association of pseudohypoparathyroidism and skin melanoma: description of a case]. *Il Giornale di chirurgia* 1988;9:591-3.
 105. Kakinuma Y, Endo H, Tsukahara T, Futoeda T, Saito Y, Shinkai H. Collagenoma with pseudohypoparathyroidism. *The British journal of dermatology* 2000;143:1122-4.
 106. Shields JA, Shields CL. CME review: sclerochoroidal calcification: the 2001 Harold Gifford Lecture. *Retina* 2002;22:251-61.
 107. Rahmat N, Venables P. Sinus pauses and high-grade atrioventricular block in Albright's hereditary osteodystrophy with pseudopseudohypoparathyroidism. *BMJ case reports* 2013;2013.
 108. Feyles F, Mussa A, Peiretti V, et al. Iatrogenic acute pancreatitis due to hypercalcemia in a child with pseudohypoparathyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:149-52.
 109. Saikia B, Arora S, Puliyeel JM. Pseudohypoparathyroidism with diabetes mellitus and hypothyroidism. *Indian pediatrics* 2012;49:989-91.
 110. Zeng WH, Xu JJ, Jia MY, Ren YZ. Pseudohypoparathyroidism with Hashimoto's thyroiditis and Turner syndrome: a case report. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2014;30:694-6.
 111. Battaia L, Pedrazzoli M, Pachor ML, Bambara LM, Corrocher R. [Pseudohypoparathyroidism associated with hyperaldosteronism and polyglobulia]. *Minerva medica* 1984;75:821-34.
 112. Hara K, Suzuki T, Imai F, Tanaka M, Ohno S, Matuo H. [A case of pseudohypoparathyroidism type I with systemic lupus erythematosus]. *Ryumachi [Rheumatism]* 1989;29:200-6.
 113. Shapiro S, Herzog P, Sarto G. Pseudopseudohypoparathyroidism, empty sella syndrome, and hypopituitarism in a young woman. *Obstetrics and gynecology* 1977;49:6-8.
 114. Martinez-Lage JF, Guillen-Navarro E, Lopez-Guerrero AL, Almagro MJ, Cuartero-Perez B, de la Rosa P. Chiari type I anomaly in pseudohypoparathyroidism type Ia: pathogenetic

- hypothesis. Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery 2011;27:2035-9.
115. Courvoisier B. [Clinical reports: pseudohypoparathyroidism, pituitary nanism, and adrenal carcinoma]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift Supplementum* 1982;13:31-47.
 116. Heaney RP, Barger-Lux MJ, Dowell MS, Chen TC, Holick MF. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4111-6.
 117. De Groot L, Abalovich M, Alexander EK, et al. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:2543-65.
 118. LaFranchi SH. Approach to the diagnosis and treatment of neonatal hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2959-67.
 119. Mantovani G, Ferrante E, Giavoli C, et al. Recombinant Human GH Replacement Therapy in Children with Pseudohypoparathyroidism Type Ia: First Study on the Effect on Growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:5011-7.
 120. Macfarlane RJ, Ng BH, Gamie Z, et al. Pharmacological treatment of heterotopic ossification following hip and acetabular surgery. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2008;9:767-86.
 121. Joseph AW, Shoemaker AH, Germain-Lee EL. Increased prevalence of carpal tunnel syndrome in albright hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:2065-73.
 122. Wemeau JL. Monitoring of hypo- and pseudohypoparathyroidism. *Ann Endocrinol (Paris)* 2015;76:185-6.
 123. Isikay S, Akdemir I, Yilmaz K. Pseudohypoparathyroidism presenting with ventricular arrhythmia: a case report. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2012;4:42-4.
 124. Cho MJ, Ban KH, Park JA, Lee HD. Congestive heart failure: an unusual presentation of pseudohypoparathyroidism. *Pediatric emergency care* 2013;29:826-8.
 125. Massing JL, Weber E, Baille N, Dusselier L, Zakari I. [Severe cardiac insufficiency and type Ib pseudohypoparathyroidism]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2000;93:869-73.
 126. Ritter C, Gobel CH, Liebig T, Kaminsky E, Fink GR, Lehmann HC. An epigenetic cause of seizures and brain calcification: pseudohypoparathyroidism. *Lancet* 2015;385:1802.
 127. Guberman A, Jaworski ZF. Pseudohypoparathyroidism and epilepsy: diagnostic value of computerized cranial tomography. *Epilepsia* 1979;20:541-53.
 128. Unluturk U, Harmanci A, Babaoglu M, et al. Molecular diagnosis and clinical characterization of pseudohypoparathyroidism type-Ib in a patient with mild Albright's hereditary osteodystrophy-like features, epileptic seizures, and defective renal handling of uric acid. *Am J Med Sci* 2008;336:84-90.
 129. Hmami F, Chaouki S, Benmiloud S, et al. [Seizures revealing phosphocalcic metabolism abnormalities]. *Revue neurologique* 2014;170:440-4.
 130. Pereda A, Gonzalez Oliva E, Riano-Galan I, Perez de Naulares G. [Pseudopseudohypoparathyroidism vs progressive osseous heteroplasia in absence of family history]. *Medicina clinica* 2015.
 131. Phelan MC, Rogers RC, Clarkson KB, et al. Albright hereditary osteodystrophy and del(2)(q37.3) in four unrelated individuals. *Am J Med Genet* 1995;58:1-7.
 132. Weinstein LS. Albright hereditary osteodystrophy, pseudohypoparathyroidism, and Gs deficiency. In: Spiegel AM, ed. *G proteins, receptors and disease*. New Jersey; 1998:23-56.
 133. Wilson LC, Leverton K, Oude Luttikhuis ME, et al. Brachydactyly and mental retardation: an Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome localized to 2q37. *Am J Hum Genet* 1995;56:400-7.
 134. Casas KA, Mononen TK, Mikail CN, et al. Chromosome 2q terminal deletion: report of 6 new patients and review of phenotype-breakpoint correlations in 66 individuals. *Am J Med Genet A* 2004;130:331-9.
 135. Chassaing N, De Mas P, Tauber M, et al. Molecular characterization of a cryptic 2q37 deletion in a patient with Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype. *Am J Med Genet A* 2004;128:410-3.
 136. Reddy KS, Flannery D, Farrer RJ. Microdeletion of chromosome sub-band 2q37.3 in two patients with abnormal situs viscerum. *Am J Med Genet* 1999;84:460-8.
 137. Falk RE, Casas KA. Chromosome 2q37 deletion: clinical and molecular aspects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2007;145:357-71.
 138. Viot-Szoboszalai G, Amiel J, Doz F, et al. Wilms' tumor and gonadal dysgenesis in a child with the 2q37.1 deletion syndrome. *Clin Genet* 1998;53:278-80.
 139. Robinow M, Pfeiffer RA, Gorlin RJ, et al. Acrodysostosis. A syndrome of peripheral dysostosis, nasal hypoplasia, and mental retardation. *Am J Dis*

- Child 1971;121:195-203.
140. Maroteaux P, Malamut G. [Acrodysostosis]. *Presse Med* 1968;76:2189-92.
 141. Linglart A, Fryssira H, Hiort O, et al. PRKAR1A and PDE4D Mutations Cause Acrodysostosis but Two Distinct Syndromes with or without GPCR-Signaling Hormone Resistance. *JClinEndocrinolMetab* 2012.
 142. Muhn F, Klopocki E, Graul-Neumann L, et al. Novel mutations of the PRKAR1A gene in patients with acrodysostosis. *ClinGenet* 2013.
 143. Nagasaki K, Iida T, Sato H, et al. PRKAR1A Mutation Affecting cAMP-Mediated G Protein-Coupled Receptor Signaling in a Patient with Acrodysostosis and Hormone Resistance. *JClinEndocrinolMetab* 2012.
 144. Lynch DC, Dymant DA, Huang L, et al. Identification of novel mutations confirms PDE4D as a major gene causing acrodysostosis. *Human mutation* 2013;34:97-102.
 145. Michot C, Le GC, Goldenberg A, et al. Exome Sequencing Identifies PDE4D Mutations as Another Cause of Acrodysostosis. *AmJHumGenet* 2012.
 146. Pereda A, Garin I, Garcia-Barcina M, et al. Brachydactyly E: isolated or as a feature of a syndrome. *Orphanet journal of rare diseases* 2013;8:141.
 147. Weaver DD, Cohen MM, Smith DW. The tricho-rhino-phalangeal syndrome. *J Med Genet* 1974;11:312-4.
 148. Seitz CS, Ludecke HJ, Wagner N, Brocker EB, Hamm H. Trichorhinophalangeal syndrome type I: clinical and molecular characterization of 3 members of a family and 1 sporadic case. *Archives of dermatology* 2001;137:1437-42.
 149. Ludecke HJ, Schaper J, Meinecke P, et al. Genotypic and phenotypic spectrum in tricho-rhino-phalangeal syndrome types I and III. *Am J Hum Genet* 2001;68:81-91.
 150. Pereda A, Azriel S, Bonet M, et al. Pseudohypoparathyroidism vs. tricho-rhino-phalangeal syndrome: patient reclassification. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:1089-94.
 151. Murphy KJ. Subcutaneous calcification in the naevoid basal-cell carcinoma syndrome: response to parathyroid hormone and relationship to pseudo-hypoparathyroidism. *Clinical radiology* 1969;20:287-93.
 152. Chopra IJ, Nugent CA. Concurrence of features of pseudohypoparathyroidism, pseudopseudohypoparathyroidism and basal-cell nevus syndrome. *Am J Med Sci* 1970;260:171-83.
 153. Kaufman RL, Chase LR. Basal cell nevus syndrome: normal responsiveness to parathyroid hormone. *Birth defects original article series* 1971;7:149-56.
 154. Murphy KJ. Subcutaneous bone formation in the naevoid basal-cell carcinoma syndrome: normal urinary cyclic AMP response to parathyroid hormone infusion. *Clinical radiology* 1975;26:37-9.
 155. Breytenbach HS, Gericke GS, Muller CJ, et al. [Clinical characteristics and genetic identity of the basal cell nevus syndrome (Gorlin-Goltz syndrome)]. *South African medical journal = Suid-Afrikaanse tydskrif vir geneeskunde* 1975;49:544-50.
 156. Klaassens M, Blom EW, Schrander JJ, et al. Unique skin changes in a case of Albright hereditary osteodystrophy caused by a rare GNAS1 mutation. *The British journal of dermatology* 2010;162:690-4.
 157. Lau K, Willig RP, Hiort O, Hoeger PH. Linear skin atrophy preceding calcinosis cutis in pseudo-pseudohypoparathyroidism. *Clinical and experimental dermatology* 2012;37:646-8.
 158. Sobotta SB, Huebner A, Haase M, et al. Albright's hereditary osteodystrophy associated with cerebellar pilocytic astrocytoma: coincidence or genetic relationship? *Horm Res* 2001;55:196-200.
 159. Markov LL. Bilateral symmetrical striopallidodentate calcification associated with pseudohypoparathyroidism demonstrated in a patient with cerebellar astrocytoma. *Neurosurgery* 1991;28:609-12.
 160. Kinoshita M, Komori T, Ohtake T, Takahashi R, Nagasawa R, Hirose K. Abnormal calcium metabolism in myotonic dystrophy as shown by the Ellsworth-Howard test and its relation to CTG triplet repeat length. *Journal of neurology* 1997;244:613-22.
 161. Kozasa T, Itoh H, Tsukamoto T, Kaziro Y. Isolation and characterization of the human Gs alpha gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:2081-5.
 162. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol* 2001;145:543-59.
 163. Ahmed SF, Dixon PH, Bonthron DT, et al. GNAS1 mutational analysis in pseudohypoparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1998;49:525-31.
 164. Bray P, Carter A, Simons C, et al. Human cDNA clones for four species of G alpha s signal transduction protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:8893-7.
 165. Hayward BE, Moran V, Strain L, Bonthron DT. Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 1998;95:15475-80.
166. Peters J, Wroe SF, Wells CA, et al. A cluster of oppositely imprinted transcripts at the *Gnas* locus in the distal imprinting region of mouse chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3830-5.
 167. Kelsey G, Bodle D, Miller HJ, et al. Identification of imprinted loci by methylation-sensitive representational difference analysis: application to mouse distal chromosome 2. *Genomics* 1999;62:129-38.
 168. Bauer R, Weiss C, Marksteiner J, Doblinger A, Fischer-Colbrie R, Laslop A. The new chromogranin-like protein NESP55 is preferentially localized in adrenaline-synthesizing cells of the bovine and rat adrenal medulla. *Neuroscience letters* 1999;263:13-6.
 169. Bauer R, Ischia R, Marksteiner J, Kapeller I, Fischer-Colbrie R. Localization of neuroendocrine secretory protein 55 messenger RNA in the rat brain. *Neuroscience* 1999;91:685-94.
 170. Ischia R, Lovisetti-Scamihorn P, Hogue-Angeletti R, Wolkersdorfer M, Winkler H, Fischer-Colbrie R. Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J Biol Chem* 1997;272:11657-62.
 171. Hayward BE, Kamiya M, Strain L, et al. The human *GNAS1* gene is imprinted and encodes distinct paternally and biallelically expressed G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:10038-43.
 172. Kehlenbach RH, Matthey J, Huttner WB. XL alpha s is a new type of G protein. *Nature* 1994;372:804-9.
 173. Pasolli HA, Klemke M, Kehlenbach RH, Wang Y, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. I. Tissue distribution and subcellular localization. *J Biol Chem* 2000;275:33622-32.
 174. Klemke M, Pasolli HA, Kehlenbach RH, Offermanns S, Schultz G, Huttner WB. Characterization of the extra-large G protein alpha-subunit XLalphas. II. Signal transduction properties. *J Biol Chem* 2000;275:33633-40.
 175. Hayward BE, Bonthron DT. An imprinted antisense transcript at the human *GNAS1* locus. *Hum Mol Genet* 2000;9:835-41.
 176. Li T, Vu TH, Zeng ZL, et al. Tissue-specific expression of antisense and sense transcripts at the imprinted *Gnas* locus. *Genomics* 2000;69:295-304.
 177. Swaroop A, Agarwal N, Gruen JR, Bick D, Weissman SM. Differential expression of novel Gs alpha signal transduction protein cDNA species. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4725-9.
 178. Liu J, Yu S, Litman D, Chen W, Weinstein LS. Identification of a methylation imprint mark within the mouse *Gnas* locus. *Mol Cell Biol* 2000;20:5808-17.
 179. Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, Weinstein LS. A *GNAS1* imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type IB. *J Clin Invest* 2000;106:1167-74.
 180. Ishikawa Y, Bianchi C, Nadal-Ginard B, Homcy CJ. Alternative promoter and 5' exon generate a novel Gs alpha mRNA. *J Biol Chem* 1990;265:8458-62.
 181. Bastepe M. The *GNAS* locus and pseudohypoparathyroidism. *Adv Exp Med Biol* 2008;626:27-40.
 182. Campbell R, Gosden CM, Bonthron DT. Parental origin of transcription from the human *GNAS1* gene. *JMedGenet* 1994;31:607-14.
 183. Weinstein LS, Yu S. The Role of Genomic Imprinting of Galpha in the Pathogenesis of Albright Hereditary Osteodystrophy. *Trends Endocrinol Metab* 1999;10:81-5.
 184. Mantovani G, Ballare E, Giammona E, Beck-Peccoz P, Spada A. The gsalpha gene: predominant maternal origin of transcription in human thyroid gland and gonads. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4736-40.
 185. Hayward BE, Barlier A, Korbonits M, et al. Imprinting of the G(s)alpha gene *GNAS1* in the pathogenesis of acromegaly. *J Clin Invest* 2001;107:R31-R6.
 186. Yu S, Yu D, Lee E, et al. Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (*Gsalpha*) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the *gsalpha* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8715-20.
 187. Klenke S, Siffert W, Frey UH. A novel aspect of *GNAS* imprinting: higher maternal expression of Galphas in human lymphoblasts, peripheral blood mononuclear cells, mammary adipose tissue, and heart. *Molecular and cellular endocrinology* 2011;341:63-70.
 188. Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. GTPase inhibiting mutations activate the alpha chain of Gs and stimulate adenylyl cyclase in human pituitary tumours. *Nature* 1989;340:692-6.
 189. Vallar L, Spada A, Giannattasio G. Altered Gs and adenylyl cyclase activity in human GH-secreting pituitary adenomas. *Nature* 1987;330:566-8.
 190. Lyons J, Landis CA, Harsh G, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. *Science* 1990;249:655-9.

191. Landis CA, Harsh G, Lyons J, Davis RL, McCormick F, Bourne HR. Clinical characteristics of acromegalic patients whose pituitary tumors contain mutant Gs protein. *JClinEndocrinolMetab* 1990;71:1416-20.
192. Williamson EA, Ince PG, Harrison D, Kendall-Taylor P, Harris PE. G-protein mutations in human pituitary adrenocorticotrophic hormone-secreting adenomas. *EurJClinInvest* 1995;25:128-31.
193. Riminucci M, Collins MT, Lala R, et al. An R201H activating mutation of the GNAS1 (G α) gene in a corticotroph pituitary adenoma. *MolPathol* 2002;55:58-60.
194. Tordjman K, Stern N, Ouaknine G, et al. Activating mutations of the Gs α -gene in nonfunctioning pituitary tumors. *JClinEndocrinolMetab* 1993;77:765-9.
195. Suarez HG, du Villard JA, Caillou B, Schlumberger M, Parmentier C, Monier R. gsp mutations in human thyroid tumours. *Oncogene* 1991;6:677-9.
196. Libe R, Fratticci A, Lahlou N, et al. A rare cause of hypertestosteronemia in a 68-year-old patient: a Leydig cell tumor due to a somatic GNAS (guanine nucleotide-binding protein, α -stimulating activity polypeptide 1)-activating mutation. *JAndrol* 2012;33:578-84.
197. Kalfa N, Ecochard A, Patte C, et al. Activating mutations of the stimulatory g protein in juvenile ovarian granulosa cell tumors: a new prognostic factor? *JClinEndocrinolMetab* 2006;91:1842-7.
198. Kalfa N, Lumbroso S, Boulle N, et al. Activating mutations of G α in kidney cancer. *J Urol* 2006;176:891-5.
199. Nault JC, Fabre M, Couchy G, et al. GNAS-activating mutations define a rare subgroup of inflammatory liver tumors characterized by STAT3 activation. *JHepatol* 2012;56:184-91.
200. Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *NEnglJMed* 2011;364:2496-506.
201. Happle R. The McCune-Albright syndrome: a lethal gene surviving by mosaicism. *Clin Genet* 1986;29:321-4.
202. McCune DJ. Osteitis fibrosa cystica; the case of nine year old girl who also exhibits precocious puberty, multiple pigmentation of the skin and hyperthyroidism. *Am J Dis Child* 1936;. 52:743-4.
203. Albright F, Butler AM, Hampton AO, Smith P. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females. Report of five cases. *N Engl J Med* 1937;216:727-46.
204. Riminucci M, Fisher LW, Shenker A, Spiegel AM, Bianco P, Gehron RP. Fibrous dysplasia of bone in the McCune-Albright syndrome: abnormalities in bone formation. *AmJPathol* 1997;151:1587-600.
205. Candelieri GA, Roughley PJ, Glorieux FH. Polymerase chain reaction-based technique for the selective enrichment and analysis of mosaic arg201 mutations in G α s from patients with fibrous dysplasia of bone. *Bone* 1997;21:201-6.
206. Idowu BD, Al-Adnani M, O'Donnell P, et al. A sensitive mutation-specific screening technique for GNAS1 mutations in cases of fibrous dysplasia: the first report of a codon 227 mutation in bone. *Histopathology* 2007;50:691-704.
207. Patten JL, Johns DR, Valle D, et al. Mutation in the gene encoding the stimulatory G protein of adenylate cyclase in Albright's hereditary osteodystrophy. *N Engl J Med* 1990;322:1412-9.
208. Weinstein LS, Gejman PV, Friedman E, et al. Mutations of the Gs α -subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:8287-90.
209. Lemos MC, Thakker RV. GNAS mutations in Pseudohypoparathyroidism type 1a and related disorders. *Human mutation* 2015;36:11-9.
210. Fernandez-Rebollo E, Barrio R, Perez-Nanclares G, et al. New mutation type in pseudohypoparathyroidism type 1a. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008.
211. Fernandez-Rebollo E, Garcia-Cuartero B, Garin I, et al. Intragenic GNAS deletion involving exon A/B in pseudohypoparathyroidism type 1A resulting in an apparent loss of exon A/B methylation: potential for misdiagnosis of pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:765-71.
212. Garin I, Elli FM, Linglart A, et al. Novel Microdeletions Affecting the GNAS Locus in Pseudohypoparathyroidism: Characterization of the Underlying Mechanisms. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E681-7.
213. Aldred MA, Aftimos S, Hall C, et al. Constitutional deletion of chromosome 20q in two patients affected with albright hereditary osteodystrophy. *Am J Med Genet* 2002;113:167-72.
214. Elli FM, deSanctis L, Ceoloni B, et al. Pseudohypoparathyroidism type 1a and pseudo-pseudohypoparathyroidism: the growing spectrum of GNAS inactivating mutations. *Human mutation* 2013;34:411-6.
215. Weinstein LS. The role of tissue-specific imprinting as a source of phenotypic heterogeneity in human disease. *BiolPsychiatry* 2001;50:927-31.

216. Weinstein LS, Liu J, Sakamoto A, Xie T, Chen M. Minireview: GNAS: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5459-64.
217. Shore EM, Ahn J, Jan dB, et al. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med* 2002;346:99-106.
218. Adegbite NS, Xu M, Kaplan FS, Shore EM, Pignolo RJ. Diagnostic and mutational spectrum of progressive osseous heteroplasia (POH) and other forms of GNAS-based heterotopic ossification. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1788-96.
219. Levine MA, Ahn TG, Klupt SF, et al. Genetic deficiency of the alpha subunit of the guanine nucleotide-binding protein Gs as the molecular basis for Albright hereditary osteodystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:617-21.
220. Carter A, Bardin C, Collins R, Simons C, Bray P, Spiegel A. Reduced expression of multiple forms of the alpha subunit of the stimulatory GTP-binding protein in pseudohypoparathyroidism type Ia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:7266-9.
221. Levine MA, Downs RW, Jr., Singer M, Marx SJ, Aurbach GD, Spiegel AM. Deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein in erythrocytes from patients with pseudohypoparathyroidism. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;94:1319-24.
222. Linglart A, Mahon MJ, Kerachian MA, et al. Coding GNAS mutations leading to hormone resistance impair in vitro agonist- and cholera toxin-induced adenosine cyclic 3',5'-monophosphate formation mediated by human XLalphas. *Endocrinology* 2006;147:2253-62.
223. Bastepe M, Frohlich LF, Hendy GN, et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib is associated with a heterozygous microdeletion that likely disrupts a putative imprinting control element of GNAS. *J Clin Invest* 2003;112:1255-63.
224. Linglart A, Gensure RC, Olney RC, Juppner H, Bastepe M. A novel STX16 deletion in autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib redefines the boundaries of a cis-acting imprinting control element of GNAS. *Am J Hum Genet* 2005;76:804-14.
225. Elli FM, de Sanctis L, Peverelli E, et al. Autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib: a novel inherited deletion ablating STX16 causes loss of imprinting at the A/B DMR. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:E724-8.
226. Bastepe M, Frohlich LF, Linglart A, et al. Deletion of the NESP55 differentially methylated region causes loss of maternal GNAS imprints and pseudohypoparathyroidism type Ib. *Nature genetics* 2005;37:25-7.
227. Chillambhi S, Turan S, Hwang DY, Chen HC, Juppner H, Bastepe M. Deletion of the noncoding GNAS antisense transcript causes pseudohypoparathyroidism type Ib and biparental defects of GNAS methylation in cis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3993-4002.
228. Richard N, Abeguile G, Coudray N, et al. A new deletion ablating NESP55 causes loss of maternal imprint of A/B GNAS and autosomal dominant pseudohypoparathyroidism type Ib. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E863-7.
229. Rezwani FI, Poole RL, Prescott T, Walker JM, Karen Temple I, Mackay DJ. Very small deletions within the NESP55 gene in pseudohypoparathyroidism type Ib. *Eur J Hum Genet* 2015;23:494-9.
230. Liu J, Nealon JG, Weinstein LS. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type Ib. *Hum Mol Genet* 2005;14:95-102.
231. Bastepe M, Lane AH, Juppner H. Paternal uniparental isodisomy of chromosome 20q--and the resulting changes in GNAS1 methylation--as a plausible cause of pseudohypoparathyroidism. *Am J Hum Genet* 2001;68:1283-9.
232. Bastepe M, Altug-Teber O, Agarwal C, Oberfield SE, Bonin M, Juppner H. Paternal uniparental isodisomy of the entire chromosome 20 as a molecular cause of pseudohypoparathyroidism type Ib (PHP-Ib). *Bone* 2011;48:659-62.
233. Fernandez-Rebollo E, Lecumberri B, Garin I, et al. New mechanisms involved in paternal 20q disomy associated with pseudohypoparathyroidism. *Eur J Endocrinol* 2010;163:953-62.
234. Maupetit-Mehouas S, Azzi S, Steunou V, et al. Simultaneous hyper- and hypomethylation at imprinted loci in a subset of patients with GNAS epimutations underlies a complex and different mechanism of multilocus methylation defect in pseudohypoparathyroidism type Ib. *Human mutation* 2013;34:1172-80.
235. Dixit A, Chandler KE, Lever M, et al. Pseudohypoparathyroidism type Ib due to paternal uniparental disomy of chromosome 20q. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E103-8.
236. Fernandez-Rebollo E, Perez de Nanclares G, Lecumberri B, et al. Exclusion of the GNAS locus in PHP-Ib patients with broad GNAS methylation changes: evidence for an autosomal recessive form of PHP-Ib? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2011;26:1854-63.

237. Perez-Nanclares G, Romanelli V, Mayo S, et al. Detection of Hypomethylation Syndrome among Patients with Epigenetic Alterations at the GNAS Locus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1060-E7.
238. Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V, et al. Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum Mutat* 2013;34:595-602.
239. Mantovani G, de SL, Barbieri AM, et al. Pseudohypoparathyroidism and GNAS epigenetic defects: clinical evaluation of albright hereditary osteodystrophy and molecular analysis in 40 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:651-8.
240. Mariot V, Maupetit-Mehouas S, Sinding C, Kottler ML, Linglart A. A maternal epimutation of GNAS leads to Albright osteodystrophy and PTH resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:661-5.
241. Mantovani G, Linglart A, Garin I, Silve C, Elli FM, de Nanclares GP. Clinical utility gene card for: pseudohypoparathyroidism. *Eur J Hum Genet* 2013;21.
242. Garin I, Mantovani G, Aguirre U, et al. European guidance for the molecular diagnosis of pseudohypoparathyroidism not caused by point genetic variants at GNAS: an EQA study. *Eur J Hum Genet* 2015;23:438-44.
243. Thiele S, Werner R, Ahrens W, et al. A disruptive mutation in exon 3 of the GNAS gene with albright hereditary osteodystrophy, normocalcemic pseudohypoparathyroidism, and selective long transcript variant G α -L deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:1764-8.
244. Manfredi R, Zucchini A, Azzaroli L, Manfredi G. Pseudopseudohypoparathyroidism associated with idiopathic growth hormone deficiency. Role of treatment with biosynthetic growth hormone. *J Endocrinol Invest* 1993;16:709-13.
245. Lebrun M, Richard N, Abeguile G, et al. Progressive osseous heteroplasia: a model for the imprinting effects of GNAS inactivating mutations in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3028-38.
246. Schuster V, Kress W, Kruse K. Paternal and maternal transmission of pseudohypoparathyroidism type Ia in a family with Albright hereditary osteodystrophy: no evidence of genomic imprinting. *J Med Genet* 1994;31:84.
247. Ward S, Sugo E, Verge CF, Wargon O. Three cases of osteoma cutis occurring in infancy. A brief overview of osteoma cutis and its association with pseudopseudohypoparathyroidism. *The Australasian journal of dermatology* 2011;52:127-31.
248. Iiri T, Herzmark P, Nakamoto JM, van DC, Bourne HR. Rapid GDP release from Gs alpha in patients with gain and loss of endocrine function. *Nature* 1994;371:164-8.
249. Nakamoto JM, Zimmerman D, Jones EA, et al. Concurrent hormone resistance (pseudohypoparathyroidism type Ia) and hormone independence (testotoxicosis) caused by a unique mutation in the G alpha s gene. *Biochem Mol Med* 1996;58:18-24.
250. Thiele S, de Sanctis L, Werner R, et al. Functional characterization of GNAS mutations found in patients with pseudohypoparathyroidism type Ic defines a new subgroup of pseudohypoparathyroidism affecting selectively G α -receptor interaction. *Human mutation* 2011;32:653-60.251. Richard N, Molin A, Coudray N, Rault-Guillaume P, Juppner H, Kottler ML. Paternal GNAS mutations lead to severe intrauterine growth retardation (IUGR) and provide evidence for a role of XLalphas in fetal development. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1549-56.
251. Brehin AC, Colson C, Maupetit-Mehouas S, et al. Loss of Methylation at GNAS Exon A/B Is Associated With Increased Intrauterine Growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:E623-31.
252. Marguet C, Mallet E, Basuyau JP, Martin D, Leroy M, Brunelle P. Clinical and biological heterogeneity in pseudohypoparathyroidism syndrome. Results of a multicenter study. *Horm Res* 1997;48:120-30.
253. Lietman SA, Goldfarb J, Desai N, Levine MA. Preimplantation genetic diagnosis for severe albright hereditary osteodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:901-4.

Capítulo 9: CAUSAS Y CONSECUENCIAS DE LOS DEFECTOS DE METILACIÓN EN MÚLTIPLES LOCI EN TRASTORNOS ASOCIADOS A LA IMPRONTA GENÓMICA

Marta Sanchez-Delgado¹, Alex Martin Trujillo¹, Isabel Iglesias-Platas², David Monk¹

¹Imprinting and Cancer group, Cancer Epigenetic and Biology Program, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, Hospital Duran i Reynals, Barcelona. ²Servicio de Neonatología. Sant Joan de Déu. BCNatal. Hospital Sant Joan de Déu y Clinic. Universidad de Barcelona, Barcelona

1. Introducción

La impronta genómica es un mecanismo epigenético que modula la expresión de un número específico de genes. A diferencia de la mayoría de genes autosómicos en los que tanto el alelo materno como el paterno son equitativamente activos, los genes improntados sólo expresan uno de sus dos alelos según el origen parental del mismo^{1,2}.

La metilación del ADN es esencial para la regulación de la expresión alélica de los genes regulados por impronta genómica^{3,4}. Estos genes son el ejemplo clásico de memoria epigenética de origen parental a largo plazo, ya que se mantiene durante toda la vida de un individuo. Las Regiones

Diferencialmente Metiladas (DMRs, *Differentially Methylated Regions*) derivadas de los gametos retienen la metilación del alelo materno o paterno, resultando en una copia completamente metilada y otra no metilada⁵⁻¹⁰ y son responsables de la coordinación de este tipo de expresión alélica. Gracias a los avances en las técnicas y tecnologías utilizadas, se han descrito de manera exhaustiva los perfiles de metilación de los gametos femenino y masculino, revelando que los *loci* regulados por impronta genómica representan únicamente una pequeña fracción de las diferencias de metilación entre las dos líneas germinales^{8,10}.

Como hemos visto a lo largo de los capítulos previos, numerosos síndromes humanos complejos (incluyendo

Diabetes Mellitus Transitoria Neonatal [TND], síndrome de Angelman [AS], síndrome de Prader-Willi [PWS], síndrome de Beckwith-Wiedemann [BWS], síndrome de Silver-Russell [SRS] y pseudohipoparatiroidismo [PHP] 1B) se asocian a la pérdida de impronta genómica en *loci* específicos. Durante la última década se ha incrementado la evidencia de que la pérdida de impronta genómica puede no ser un evento aislado en un locus asociado a una enfermedad dada, sino que los pacientes con trastornos relacionados con la impronta genómica (comúnmente conocidos como IDs del inglés *Imprinting Disorders*) pueden tener defectos en otros *loci* que afecten otras DMRs reguladas por impronta genómica^{8,11-13}. Para comprender cómo estas anomalías pueden afectar a más de un dominio regulado por impronta genómica, debemos entender cómo se establece y mantiene la metilación del ADN asociada a este mecanismo y cómo interactúan esta metilación y las modificaciones de histonas en la protección selectiva de la impronta genómica durante la reprogramación preimplantacional. La interrupción de estos procesos es la que conduce a estas enfermedades complejas.

1.1. Regiones diferencialmente metiladas

La mayoría de los genes improntados se encuentran organizados en grupos y regulados por Regiones de Control de la Impronta genómica (ICRs). Estos elementos de regulación en

cis se manifiestan como DMRs, que son regiones ricas en islas CpG y otras marcas epigenéticas como la modificación de histonas¹.

Los primeros indicios de la importancia de la metilación del ADN en la regulación de este tipo de expresión monoalélica se obtuvieron a partir de diversos estudios de transgénicos¹⁴⁻¹⁶ que a su vez sirvieron como base para la identificación de DMRs^{17,18}). Sin embargo, la confirmación definitiva se deriva de un conjunto de ensayos en ratón en los que, mediante mutación dirigida, la inactivación de ADN metiltransferasas resulta en la expresión bialélica de los genes bajo influencia de la impronta genómica debido a la ausencia de metilación alélica^{4,19,20}. Por tanto, la evidencia hasta la fecha sugiere que la metilación de las citosinas que marca uno de los alelos parentales en estas DMRs es uno de los elementos principales en la expresión específica del origen parental de los genes improntados. En humanos, únicamente se ha podido demostrar que actúan como ICRs un subconjunto de estas DMRs debido a que para ello se requiere, además de mutaciones dirigidas en ratón, la existencia de deleciones humanas espontáneas de estas regiones que alteren la expresión genética regulada por la impronta²¹⁻²⁵.

Todas las ICRs descritas hasta la fecha presentan metilación del ADN establecida durante la gametogénesis por los complejos DNMT3L/DNMT3A o B en los ovocitos en crecimiento en las hembras y en espermatozoides en los machos en el modelo murino, y se mantiene durante el desarrollo

somático por DNMT1-UHRF1^{3,4,26-28}). La mayoría de ICRs contienen islas CpGs con metilación de origen materno que se solapan con los promotores, mientras que las pocas ICR con metilación de origen paterno que se han identificado se encuentran en regiones intergénicas con islas CpG pequeñas. Además de las DMRs presentes en las ICRs, algunas DMRs se adquieren durante el desarrollo embrionario. La metilación de estas DMRs secundarias, también conocidas como somáticas, son reguladas por la ICR más cercana (DMR germinal o primaria), suelen regular la expresión monoalélica de un único gen y su metilación acostumbra a ser específica de tejido^{2,5,29-31}.

1.2. Modificaciones alélicas de histonas

Diversos estudios de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP – por sus siglas en inglés)

de todo el genoma han mostrado el enriquecimiento alélico de un conjunto de modificaciones estándar, tanto permisivas (asociadas a expresión génica) como represivas (asociadas a represión génica), de las histonas en las DMRs³²⁻³⁵. El alelo metilado de estas regiones se encuentra enriquecido en la trimetilación de diferentes residuos de lisina en las histonas H3 y H4 (H3K9me3, H3K64me3 y H4K20me3), de forma que se parece a la heterocromatina pericéntrica. Por el contrario, el alelo no metilado está enriquecido en H3K4me3, que impide la adquisición de metilación del ADN³⁵⁻³⁸) (Figura 1). En caso de hallarse transcripcionalmente activos, los alelos no metilados también se encuentran hiperacetilados en H3K9 y H4K16^{39,40}. Los estudios del estado de la cromatina en ratones obtenidos de hembras *Dnmt3l*^{-/-} y que por lo tanto, carecen de metilación del ADN en el alelo materno, muestran que ésta se encuentra

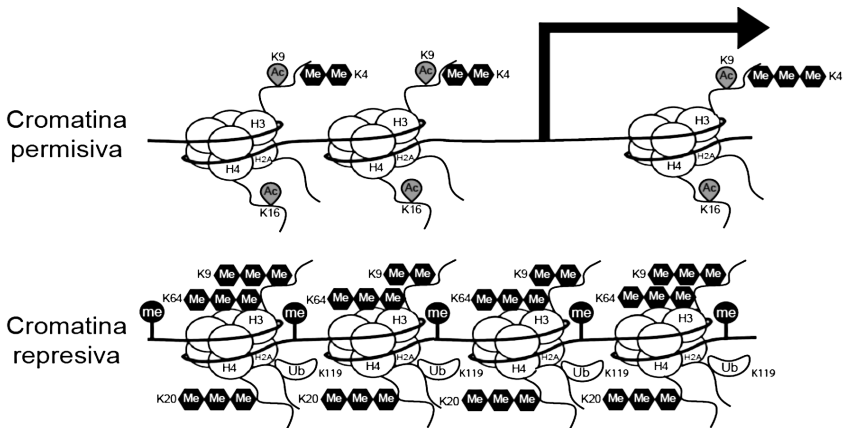


Figura 1: Conformación opuesta de la cromatina en DMRs improntadas. El alelo metilado de la mayor parte de las regiones improntadas se encuentra asociado con modificaciones represivas de las histonas, tales como H3K9me2/3, H3K64me3, H4K20me3 y ubiquitinización (Ub) de H2AK119, mientras que el alelo no metilado está asociado a modificaciones de carácter permisivo como la H3K4me2/3 y la acetilación de la K9 y K16 de la histona H3.

desprovista de marcas represivas, indicando que la metilación del ADN es esencial para el establecimiento de las modificaciones alélicas de histonas durante el desarrollo temprano³⁴.

Además de las modificaciones permisivas y represivas en los alelos opuestos de una DMR, en *loci* bajo influencia de la impronta genética se ha observado cromatina bivalente caracterizada por la expresión específica en cerebro^{41,42}. Los dominios bivalentes se encuentran marcados por H3K4me3 y H3K27me3 en el mismo nucleosoma, lo que indica que es un promotor silente preparado para la transcripción^{43,44}. Los dominios bivalentes monoalélicos actúan como otras regiones, excepto por el hecho de encontrarse localizados únicamente en el alelo no metilado. El dominio

bivalente monoalélico asociado con las DMRs de *Grb10/GRB10* y *Nap115* regula de manera negativa la expresión cuando las marcas H3K4me3 y H3K27me3 se encuentran presentes de manera conjunta, pero la cromatina del tejido cerebral se encuentra marcada únicamente por H3K4me3, siendo este tejido el único que expresa los transcritos regulados por impronta genómica^{34,41,42,45}.

2. Ciclo vital de la Impronta genómica

Como se ha mencionado con anterioridad, la impronta genómica se establece de manera diferencial en los gametos. Justo después de la fertilización en el ratón y en el estadio de dos células en el humano, se produce

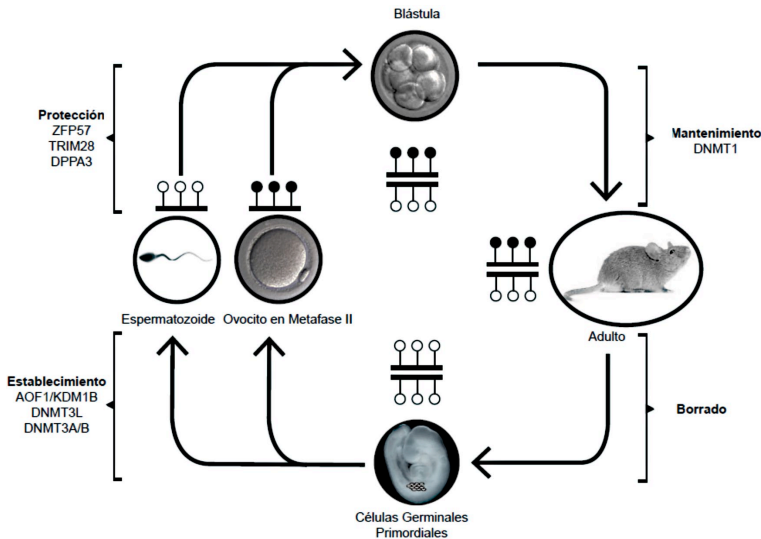


Figura 2: Ciclo vital de los cambios epigenéticos en los loci improntados de ratón. La metilación diferencial se establece en la línea germinal y durante la reprogramación preimplantacional son protegidas por los factores de mantenimiento ZFP57 y DPPA3. A partir de ese momento, la metilación se mantiene mediante la acción semiconservada de DNMT1-UHRF1. En las células germinales primordiales del embrión en desarrollo, la metilación del ADN en las DMR improntadas se borra y el nuevo patrón se reestablece de acuerdo al sexo del embrión.

un proceso de reprogramación epigenética que afecta a la mayoría de regiones excepto a aquellas reguladas por impronta genómica, cuya metilación asimétrica se mantiene en el cigoto en cada división de sus células somáticas^{10,46}) (Figura 2). Más adelante, durante el desarrollo fetal, cuando las células germinales primordiales (CGPs) entran en la cresta gonadal, las marcas epigenéticas, incluyendo las ICRs, se eliminan y se restablece un nuevo perfil de metilación de manera específica según el sexo del feto¹. Durante este proceso interactúa una red compleja de diversos factores que incluye la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, la transcripción y los ARN no codificantes (ARNnc).

El proceso de restablecimiento de la impronta genómica es esencial para el desarrollo del nuevo individuo. La eliminación de la metilación existente en las CGPs se produce por desmetilación pasiva dependiente de replicación⁴⁷ y por la oxidación mediada por TET de la metilación del ADN a 5-hidroximetilcitosina (5hmC)^{48,49}. Por otro lado, la remetilación se produce de manera asincrónica en las diferentes DMRs durante la gametogénesis de un mismo individuo y además, el momento de adquisición de ésta metilación es diferente entre sexos: en varones se produce antes del nacimiento, mientras que en el caso de las hembras, tiene lugar en los ovocitos detenidos en meiosis después del nacimiento^{9,10,33,50}. Estudios en ratón muestran que estos perfiles de metilación del ADN (tanto el materno como el paterno) son establecidos por Dnmt3a junto con su cofactor Dnmt3l^{3,4}.

Aunque Dnmt3l carece de actividad citosina-metiltransferasa, la ausencia de metilación del ADN materno en las DMRs germinales en ovocitos Dnmt3l^{-/-} y su descendencia, demuestra su papel clave en este proceso^{3,6,7}. Por el momento no está claro cómo Dnmt3l puede modular la metilación *de novo* del ADN en las DMRs, aunque existen varias teorías; Dnmt3l podría regular la actividad de Dnmt3a estimulando de manera directa su actividad enzimática o mediante la unión de Dnmt3l a H3K4 sin metilar (H3K4me0) y el posterior reclutamiento de Dnmt3a^{36,51}. Estudios bioquímicos han mostrado que el dominio ADD de DNMT3L interacciona con la histona H3, pero únicamente cuando su lisina 4 se encuentra no metilada³⁶. Por otro lado, el complejo DNMT3A-DNMT3L tiene menor afinidad por la cromatina con H4K4me2/3, modificación histónica opuesta a la metilación del ADN. Además, los ratones *Aof1*^{-/-}, demetilasa específica de H3K4 que actúa en la línea germinal (también conocida como *Kdm1b*), tienen defectos de metilación en algunas DMRs asociados a impronta genómica (*Mest*, *Grb10*, *Plagl1* o *Impact*)⁵². Debido a la similitud entre los fenotipos de los ratones *Aof1*^{-/-} y la descendencia de las hembras de ratón Dnmt3l^{-/-}, (defectos en el desarrollo y letalidad embrionaria compatibles con defectos en la adquisición de la impronta genómica), la teoría de que DNMT3L module la actividad enzimática de DNMT3A mediante su unión a H3K4me0 coge fuerza^{3,52,53}) (Figura 3).

Recientemente muchos estudios

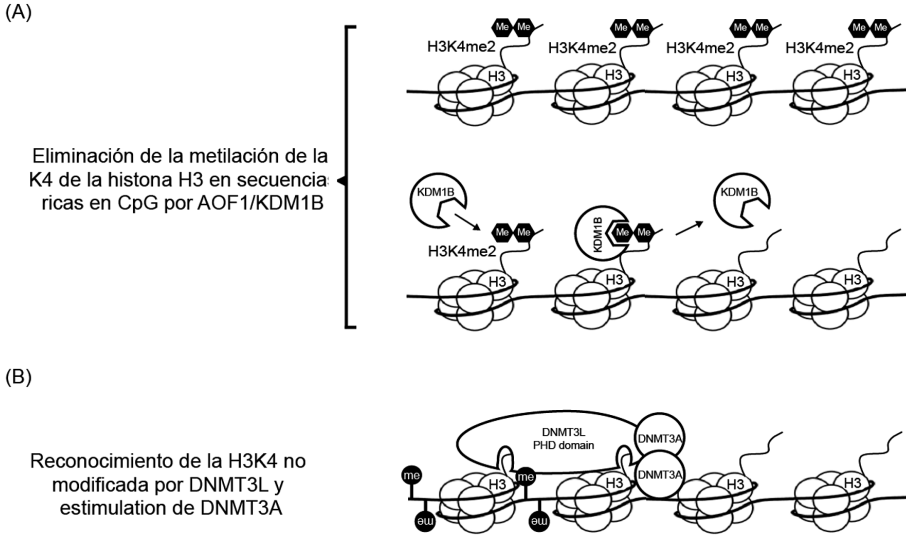


Figura 3: Acción de KDM1B y posterior reconocimiento de la H3K4 sin modificar por el complejo DNMT3L-DNMT3A. (A) La enzima KDM1B desmetila la H3K4me2, una modificación histónica que impide la metilación del ADN. **(B)** Después de la desmetilación, la cola de la histona H3K4me0 es reconocida por el dominio PHD-like de DNMT3L, que a su vez recluta la enzima DNMT3A.

han relacionado la transcripción con la adquisición de la metilación del ADN en la línea germinal femenina, sugiriendo que la transcripción activa puede contribuir a este proceso^{46,54,55}. En la impronta genómica, el establecimiento de la metilación del ADN en algunas DMRs maternas requiere la transcripción a su través, presumiblemente para la creación de un entorno de cromatina abierta que permita el acceso de la maquinaria de metilación *de novo* a las secuencias diana⁵⁵. Experimentos por truncamiento de los *loci Igf2r*, *Gnas* y *Snrpn*, mediante la interrupción de la transcripción debido a la inserción de un casete de polyA⁺, han mostrado que la ausencia de transcritos largos específicos de ovocitos (o la de su transcripción activa) conlleva la falta de

adquisición de la adecuada metilación del ADN⁵⁴⁻⁵⁶.

Además de las modificaciones de histonas y la transcripción, también se ha descrito la participación de un tipo específico de ARNnc, los ARNpi, en la adquisición de la metilación del ADN paternal en la DMR germinal *Rasgfr1*, específica del ratón⁵⁷. En contraste con el dogma general para las DMRs germinales, la metilación del ADN *de novo* en la DMR germinal *Rasgfr1* no se basa en la actuación de Dnmt3a, sino de Dnmt3b, que participa principalmente junto con las proteínas PIWI en la metilación *de novo* del ADN de retrotransposones en las células germinales masculinas⁵⁷.

De manera general cabe destacar que en las células germinales la metilación

de novo del ADN se establece por las proteínas DNMT, tanto en los *loci* regulados por la impronta genómica como en el resto de regiones^{3,4,6,7,46,53}). Además, debemos de tener en cuenta para los estudios a gran escala, que de las diferencias en metilación entre los dos gametos, las cuales afectan a un 35% de sus genomas^{6,9,10}, únicamente una pequeña fracción representa los *loci* bajo influencia de la impronta genómica. A pesar de la existencia de modificaciones de histonas y de la transcripción a través de las DMRs, todavía no está claro como las DNMTs son capaces de distinguir estas regiones. Una opción sería que las propiedades intrínsecas de las DMRs, tales como las características de secuencia, podrían ser específicas para las DMR reguladas por impronta genómica. Estudios de secuenciación han descrito en algunas de ellas un patrón de periodicidad para el dinucleótido CpG, un dinucleótido cada 8-10pb⁵⁸. Sin embargo, este patrón no puede ser la característica clave, debido a que se encuentra presente tanto en la isla CpG metilada como en la no metilada⁶. Por lo tanto, las características de la secuencia de las DMRs pueden facilitar la actividad del complejo DNMT3A/DNMT3L, pero no son suficientes para discriminar las DMRs del resto del genoma.

2.1. Diferencias en el establecimiento de la impronta entre ratones y humanos

En estudios sobre el análisis del perfil de la expresión génica en ovocitos

humanos en metafase II no se detectó la expresión del gen *DNM3TL*, sugiriendo que la metilación *de novo* que tiene lugar en la célula germinal femenina se realiza sin la participación de esta proteína, contrariamente a lo observado en ratones donde DNMT3L tiene un papel fundamental, posiblemente regulando la actividad de las DNMTs *de novo*^{3,4,59,60}. Posteriormente, de forma similar a lo que ocurre en el ratón, el nivel de metilación global aumenta en el estadio de blástula temprana coincidiendo con la detección de ARN mensajero de los transcritos de *DNMT3A* y *B*⁵⁹. Como se explicará más adelante, datos obtenidos a partir del estudio de unos pocos casos raros en familias portadoras de mutaciones recesivas en el gen *NLRP7* han mostrado que este gen podría estar relacionado con un establecimiento ausente o defectuoso de la metilación en la línea germinal. Como se discute de forma más extensa más tarde en este mismo capítulo, esta proteína, presente de forma abundante en el ovocito, carece de ortólogo en ratón⁶¹.

2.2. Mantenimiento de la metilación alélica

En el embrión preimplantacional, la metilación parental específica, es decir, la transmitida desde los gametos al embrión, se borra debido a la reprogramación epigenética, concretamente, a una desmetilación global que afecta a todo el genoma y cuyo resultado es una blástula prácticamente carente de metilación^{7,62}. Para resistir a esta desmetilación

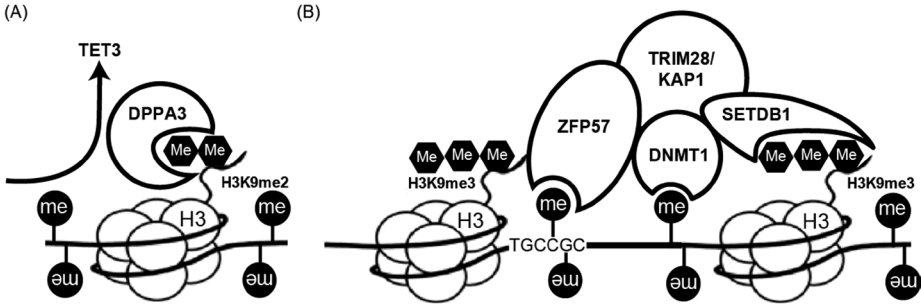


Figura 4: Representación esquemática de los complejos implicados en la protección de la metilación asociada con la impronta genómica durante la reprogramación pre-implantacional. (A) DPPA3 se une de forma específica a las regiones metiladas y enriquecidas en H3K9me2. Esta unión resulta en la protección de la metilación del ADN frente a la desmetilación mediada por TET3, que tiene lugar principalmente en el pronúcleo de origen materno. **(B)** Las DMRs improntadas que contienen el motivo compuesto por el hexanucleótido TGCCmetGC están protegidas frente al proceso de desmetilación pre-implantacional por el complejo proteico ZFP57-TRIM28. La metilación del ADN y la de H3K9me3 están mantenidas en estas regiones por DNMT1 y SETDB1, respectivamente.

masiva, tanto la impronta materna como la paterna necesitan estar protegidas. Dos proteínas han sido implicadas en el mantenimiento de la metilación materna y paterna en las DMRs, una es DPPA3 (también conocida como PGC7/Stella) y la otra es la proteína con dedos de zinc y caja KRAB, ZFP57. Ambas proteínas están conservadas entre ratones y humanos^{63,64} (Figura 4).

Contrariamente a la oleada de desmetilación que tiene lugar en el embrión pre-implantacional, existe otra de metilación *de novo* en el momento de la implantación durante la cual el alelo no metilado de las DMRs ha de estar protegido. Además de su función como aislador, CTCF también puede proteger secuencias genómicas frente a la metilación del ADN⁶⁵. Sorprendentemente, mutaciones en el sitio de unión de OCT4 en la ICR *H19*, localizada en la región intergénica *IGF2-H19* del cromosoma 11, han

desvelado un posible rol de esta proteína en la protección de la metilación, aparte de su papel descrito anteriormente como inductor de pluripotencia.

Últimamente, se ha demostrado que prácticamente todos los alelos no metilados en las DMRs están enriquecidos en H3K4me2/3, la cual, como se ha mencionado con anterioridad, previene la metilación de ADN^{33,34,36,52}. El análisis comparativo exhaustivo de la metilación de las DMRs tanto en ratones como en humanos ha identificado diferencias en la longitud de algunas de estas regiones entre ovocitos maduros y tejidos embrionarios. Este dinamismo asociado al desarrollo es más manifiesto en las DMR metiladas paternalmente que en aquellas que adquieren metilación en el ovocito, y además, sugiere que la protección frente la metilación de las DMRs durante la reprogramación peri-implantacional no es total^{8,66}.

3. Trastornos de la impronta y anomalías en la metilación del ADN

La secuencia completa del genoma humano está disponible desde 2004^{67,68}. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales los genes son selectivamente silenciados no se han comprendido del todo aún. Las alteraciones de las marcas epigenéticas tanto globales como en regiones específicas en distintas enfermedades, pueden causar o contribuir al desarrollo de un gran número de trastornos complejos. Concretamente, la desregulación de la impronta genómica ha sido ampliamente caracterizada en los ID. Pero, la implicación de la impronta genómica en la enfermedad no está limitada únicamente a los ID, sino que la alteración de la expresión alelo-específica ha sido descrita en otros trastornos de tipo multifactorial tales como el cáncer o trastornos metabólicos⁶⁹⁻⁷².

Como se ha señalado anteriormente, durante el ciclo vital de la impronta genómica, las marcas de la impronta han de ser establecidas de acuerdo con el sexo del individuo tras el borrado de las marcas pre-existentes y han de ser mantenidas a lo largo de toda la vida. Una alteración en cualquiera de estos procesos clave puede dar lugar a una impronta genómica anómala mediante la reactivación del alelo originalmente silenciado o el silenciamiento del alelo previamente activo. Una vez haya tenido lugar un error en la metilación asociada a la impronta genómica, esta

metilación anómala será mantenida durante el desarrollo somático y estará presente en múltiples tejidos, ya que el perfil de metilación es fielmente copiado durante la replicación del ADN.

Como hemos visto en los capítulos previos, una impronta genómica defectuosa se puede dar como consecuencia de una alteración en el perfil de metilación de las DMRs o de mutaciones en proteínas que actúan en *trans* y están implicadas en este proceso epigenético. Aparte de las causas epigenéticas, una impronta anómala se asocia a menudo a alteraciones genéticas como deleciones cromosómicas, duplicaciones, disomías uniparentales (UPD) o mutaciones puntuales⁷³. Actualmente se desconoce si los defectos de metilación asociados a los ID son debidos a epimutaciones primarias producto de alteraciones del perfil de metilación en las DMRs improntadas, o bien consecuencia de epimutaciones secundarias como resultado de una mutación en un factor implicado en el establecimiento o mantenimiento de la metilación improntada⁷⁴.

3.1. Diferentes etiologías moleculares de los IDs

Los trastornos de la impronta genómica engloban a un grupo de enfermedades humanas caracterizadas por una alteración del perfil normal de dicho mecanismo epigenético. La frecuencia de la causa subyacente, ya sea de origen epigenético o genético/citogenético, depende de cada trastorno en particular.

Por ejemplo, aproximadamente el 50% de los casos de BWS presentan una pérdida de metilación (LOM) en la región promotora de *KCNQ1OT1* mientras que tan sólo el 1% se debe a alteraciones citogenéticas. Por el contrario, en el AS y PWS únicamente el 5% de los casos están asociados a una alteración del perfil de metilación,

siendo las deleciones la causa más frecuente, responsable del 70% de los casos. Los datos más recientes sobre la prevalencia de los IDs y la frecuencia de la etiología molecular responsable de cada uno están recogidos en los capítulos dedicados a ellos a lo largo de este libro (Tabla 1).

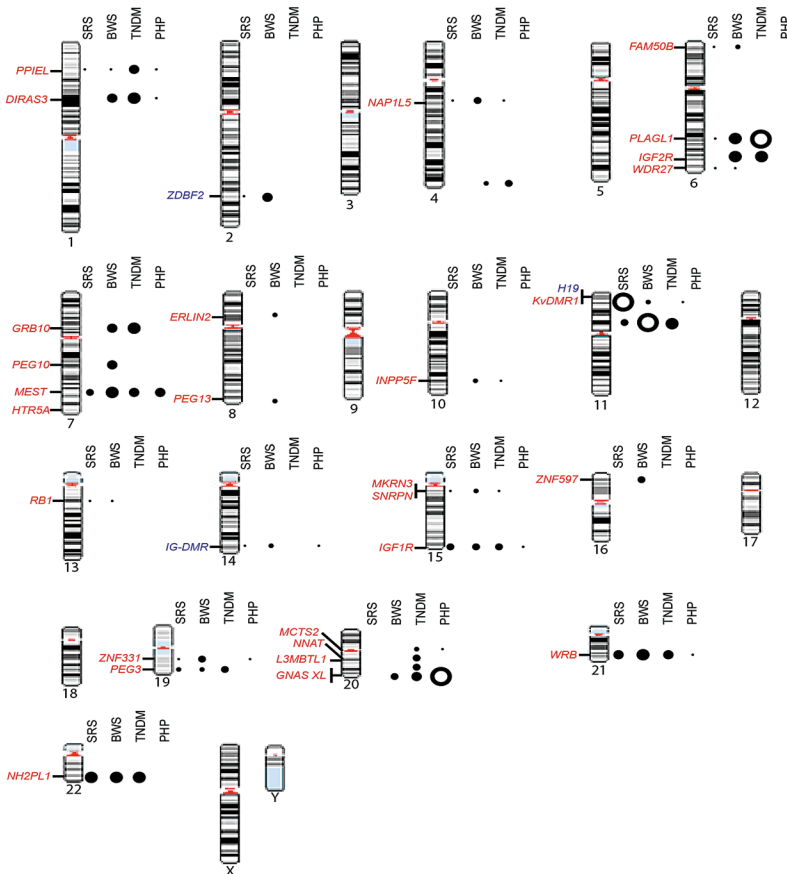


Figura 5: Cariotipo humano que muestra la posición de los dominios sometidos al control de la impronta genómica y la frecuencia de hipometilación de éstos en pacientes con ID con defectos de la impronta genómica en múltiples loci. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de hipometilación de cada loci improntado. Los círculos blancos representan las DMRs primarias asociadas con cada ID. Puede existir cierta imprecisión en esta representación debido a que únicamente se han tenido en cuenta los datos de estudios que evalúan un mínimo de 10 DMRs improntadas y a la distinta cobertura empleada en las diferentes técnicas moleculares utilizadas, la representación puede ser imprecisa. En azul se indican las DMR derivadas de la línea germinal masculina y en rojo las de la femenina.

A pesar de que la mayoría de estas enfermedades están asociadas a una alteración (epi)genética de un único locus improntado, recientemente se ha observado la afectación del perfil de metilación en múltiples DMRs improntadas en pacientes con los siguientes IDs: TND, BWS, SRS y PHP1B (Figura 5). Sin embargo, se desconoce la causa genética subyacente asociada con la gran mayoría de estos casos, así como la extensión exacta del defecto en la metilación ya que tan sólo se han evaluado unas pocas DMRs improntadas.

4. Defectos de la impronta en múltiples loci por ID

4.1. Cromosoma 6- TND

La Diabetes Mellitus Transitoria Neonatal (TND) (OMIM 601410) es una enfermedad rara que se diagnostica generalmente entre los primeros días a semanas de vida extrauterina y es causada por la pérdida de la impronta genómica del dominio *PLAGL1*⁷⁵. La mayoría de pacientes son niños a término que presentan una restricción del crecimiento intrauterino severa con un peso al nacer que oscila entre 1,5 y 2,5 Kg y Diabetes Mellitus Neonatal, caracterizada por hiperglucemia y glucosuria sin cetoacidosis⁷⁶. Normalmente, los pacientes de TND necesitan tratamiento insulínico durante los tres primeros meses de vida, tras el cual, en la mitad de los casos la enfermedad remite, mientras que la

otra mitad presenta recaídas después de un periodo aproximado de 14 años, coincidiendo con la adolescencia o madurez temprana. Dentro de este último grupo, la mayoría de los casos manifiesta una diabetes permanente con sintomatología compatible con diabetes de tipo I⁷⁷. Una descripción completa de las características clínicas de TND se puede encontrar en el capítulo 2.

A nivel molecular, la TND está causada por una sobre-expresión de los genes de expresión paterna *PLAGL1* y *HYMAI*. Esta sobre-expresión puede ser debida a tres mecanismos diferentes: disomía uniparental paterna del cromosoma 6 [pat(6)UPD, 41% de los casos], duplicación paterna de la región 6q24 (29%) o hipometilación del alelo materno de la DMR improntada asociada a *PLAGL1* (30%)⁷⁸⁻⁸⁰. Además, curiosamente, la mitad de los pacientes con defectos de la metilación también presentan hipometilación en otras DMRs de metilación materna. Esta afectación múltiple fue descrita por Mackay y sus colaboradores como Síndrome de Hipometilación Materna (HIL, *hypomethylation at imprinted loci*)⁸¹. Dos años más tarde de la descripción de este síndrome, una investigación llevada a cabo por el mismo grupo mostró que la mitad de los casos de TND acompañada de hipometilación en múltiples loci presentaban mutaciones recesivas en el gen *ZFP57*. Resulta interesante que los individuos con HIL sin alteraciones genéticas en *ZFP57* mostraban un fenotipo más severo que aquellos individuos que sí las presentaban, detectándose frecuentemente en los casos más severos hipometilación en las DMRs asociadas a *DIRAS3*, *IGF2R*,

MEST, *KCNQ1OT1*, *IGF1R*, *ZNF331*, *WRB* and *NHP2L1*^{13,82}. No obstante, cabe señalar que los *loci* afectados y su frecuencia podrían variar en función de las investigaciones realizadas, pues las conclusiones expuestas anteriormente son el resultado obtenido a partir del análisis de metilación de genoma completo de únicamente dos cohortes independientes de pacientes con ID.

A nivel fenotípico, los casos de TND que presentan una pérdida de metilación en múltiples *loci* son prácticamente imposibles de distinguir de otros subgrupos de TND^{81,83}, aunque los pacientes con HIL muestran con mayor frecuencia manifestaciones clínicas no asociadas a la diabetes, como dificultad en el aprendizaje, hipotonía, macroglosia, hernia umbilical y cardiopatías congénitas⁸²⁻⁸⁴. De los 14 casos descritos con mutaciones en *ZFP57*, todos ellos presentan una progresión clásica del trastorno, sugiriendo que no existe una correlación evidente entre los *loci* afectados y la gravedad del fenotipo. Las diferencias de fenotipo entre los individuos con HIL con mutaciones en *ZFP57* y el grupo con HIL idiopático podrían ser debidas a mutaciones recesivas adicionales en estas familias, ya que presentan un alto grado de consanguinidad.

4.2. Cromosoma 11p15- BWS

El síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (OMIM 130650) es un trastorno del crecimiento caracterizado por macrosomía, macroglosia, visceromegalia, pliegues en el lóbulo de las orejas, hipoglucemia,

hemihipertrofia, defectos en la pared abdominal y un riesgo incrementado de padecer tumores infantiles⁸⁵. Como se ha descrito en el capítulo 4, las alteraciones moleculares subyacentes a este síndrome implican dos dominios improntados distintos, ambos localizados en el cromosoma 11. La alteración molecular más frecuente es la hipometilación esporádica de la DMR asociada a *KCNQ1OT1* (también conocida como *KvDMR1*, *ICR2*). No obstante, la hipometilación de esta región no es la única alteración epigenética responsable de este síndrome, ya que también puede ser debido a una ganancia de metilación, pero esta vez en la DMR intergénica H19 *ICR*. El resto de casos de BWS presentan anomalías citogenéticas raras así como mutaciones en el gen *CDKN1C*⁸⁶⁻⁸⁹.

La primera confirmación molecular de LOM en múltiples *loci* corresponde a Arima y sus colaboradores en 2005, con la descripción de dos individuos con TND que presentan hipometilación tanto en la DMR *PLAGL1* como en *KvDMR1*, la región principal asociada a BWS⁹⁰. En este mismo estudio, resultó interesante observar que los dos pacientes de TND presentaban una etiología molecular diferente, uno de ellos una *pat(6)UPD*, y el otro la clásica mutación asociada a la DMR *PLAGL1*. Este último padecía, además de la clásica sintomatología asociada a TND, una hernia umbilical y macroglosia, manifestaciones observadas frecuentemente en pacientes con BWS.

Partiendo de este estudio, varios grupos han confirmado el defecto de metilación en múltiples *loci* en diferentes cohortes

de pacientes de BWS, con una frecuencia aproximada de un 30% en aquellos con alteración del perfil de metilación en la región *KvDMR1*^{13,82,91-95}. Sin embargo, esta pérdida de metilación en DMRs adicionales no es exclusiva de pacientes con hipometilación de *KvDMR1*, ya que dos estudios recientes la han descrito en pacientes con hipermetilación de *H19 ICR*^{96,97}. Los defectos de metilación en múltiples *loci* improntados observados en las cohortes de BWS presentan notables diferencias con los observados en pacientes con TND, ya que se dan tanto pérdidas como ganancias de metilación en DMRs maternas y paternas. Las DMRs de metilación paterna asociadas a los genes *ZBDF2*, *NESP* y *ZNF597/NAA60* presentan ganancia de metilación en un subgrupo de pacientes de BWS^{82,96}. Esta adquisición de metilación se podría atribuir a una pérdida de metilación concomitante de DMRs cercanas que presentan metilación de origen materno, como las DMRs asociadas a *GPR1-AS*, *GNAS* y *ZNF597*, y que, como se ha descrito, son capaces de regular la metilación de estas DMRs somáticas de un modo jerárquico^{8,98,99}.

A pesar de que las técnicas utilizadas para determinar los defectos de metilación en múltiples *loci* asociados a la impronta genómica varían entre laboratorios, las DMRs que están alteradas con más frecuencia en pacientes de BWS son aquellas asociadas a los genes *PLAGL1*, *GRB10*, *MEST*, *GNAS*, *IGF2R* y *ZNF331*^{13,82,100}. Resulta interesante destacar que la región maternalmente metilada localizada en el intrón 2 del gen *IGF2R* puede estar tanto hiper como hipometilada en pacientes de

BWS y TND^{13,82,100}. Es probable que este fenómeno sea el resultado de un suceso estocástico ya que esta alteración también ha sido observada, aunque con una baja frecuencia, en individuos control¹⁰⁰.

Varios estudios han mostrado que las DMRs asociadas a SBW, *H19 ICR* y *KvDMR1*, pueden estar hipometiladas en el mismo paciente. Estas observaciones *a priori* contradictorias significarían que este individuo podría padecer un retraso en el crecimiento, tal y como se observa en pacientes de SRS, debido a la hipometilación de la primera región, o por el contrario, podría presentar una macrosomía debido a la hipometilación de *KvDMR1*^{82,92,93}. Se desconoce el motivo por el cual un síndrome se manifiesta y el otro no. Esta cuestión llevó a Azzi y colaboradores a plantear que la región con una mayor hipometilación es la que ocasiona el fenotipo dominante⁹³. Esta propuesta está respaldada por el hecho que pacientes de BWS con hipometilación adicional en la región *PLAGL1* y *GNAS* no tienen historia clínica relacionada con TND o pseudohipoparatiroidismo, respectivamente^{82,92,93}. La mayoría de pacientes de BWS con defectos en múltiples *loci* improntados (MLMD) no presentan ninguna manifestación clínica adicional^{93,100}. No obstante, dos estudios con una gran cantidad de información fenotípica, mostraron que el retraso en el desarrollo, el control anormal de la glucemia y la presencia de malformaciones congénitas adicionales eran ligeramente más prevalentes en pacientes con alteración de múltiples *loci* improntados que en el resto^{82,95}.

4.3. Cromosoma 11p15- SRS

El síndrome de Silver Russell (SRS) (OMIM 180860) es un trastorno clínicamente heterogéneo caracterizado por una severa restricción del crecimiento intrauterino y un crecimiento postnatal deficiente. Aproximadamente el 40% de los pacientes de SRS presenta una hipometilación de *H19* ICR, región paternalmente metilada de 6 kb, situada entre los genes *H19* e *IGF2*¹⁰¹, mientras que un 10% presenta una mat(7)UPD¹⁰². Se han descrito defectos en múltiples *loci* improntados en un 15% de los casos de SRS que presentan hipometilación de *H19* ICR y en ellos se detecta alteración de la metilación de un conjunto común de DMRs. Estas DMRs son aquéllas que están asociadas a los genes *DIRAS3*, *PLAGL1*, *GRB10*, *MEST*, *IG-DMR*, *ZNF331*, *WRB* and *NH2PL*^{13,82,93,103,104}. Por tanto, al igual que sucede en pacientes de BWS con MLMD, los pacientes de SRS presentan alteración de DMRs adicionales tanto maternas como paternas. Curiosamente, la hipometilación observada en pacientes de SRS es a menudo menos pronunciada que la observada en otros IDs con MLMD¹³. Esta observación es probablemente debida al alto grado de mosaicismo descrito en SRS¹⁰⁵.

Recientemente, se han descrito pacientes de SRS con hipometilación en las DMRs asociadas a *H19* y *KvDMR1*. En 2010, Begemann y sus colaboradores llevaron a cabo el análisis molecular de tres casos que presentaban hipometilación en ambas regiones. Curiosamente, uno de ellos tenía además afectada la DMR asociada a *MEST*¹⁰³. En este estudio, también llamaba la atención que, aparte

de que uno de estos pacientes presentaba una hernia umbilical, en ninguno de ellos se identificaron manifestaciones clínicas propias del BWS. En la mayoría de casos, por tanto, no se pueden distinguir a nivel fenotípico aquellos pacientes SRS que presentan hipometilación únicamente en la DMR intergénica *H19* de aquellos que presentan afectación de varios *loci*^{82,93}. Algunos trabajos, sin embargo, apuntan a que los pacientes de SRS con MLMD podrían presentar una menor alteración del crecimiento (microsomía) y un incremento de la prevalencia en retraso del desarrollo y otras anomalías congénitas^{92,95}.

Recientemente, se han descrito epimutaciones en el dominio improntado de la región 14q32.2, concretamente, en *IG-DMR* y en la DMR asociada al promotor del gen *MEG3* en dos individuos con SRS. Esta región ha estado tradicionalmente asociada al síndrome de Temple¹⁰⁶ (ver capítulo 5). A pesar de ello, estos dos individuos manifestaban un fenotipo típico de SRS¹². Estos dos síndromes comparten características fenotípicas como bajo peso al nacimiento, relativa macrocefalia, asimetría corporal y dificultades en la alimentación. Es interesante que se haya descrito también hipometilación de las dos DMRs mencionadas anteriormente en otro paciente de SRS, pero con mat(7)UPD en lugar de hipometilación de la región *H19* ICR¹⁰⁷. Aunque este hecho podría representar una coincidencia casual, este hallazgo apunta la posibilidad de que los dos mecanismos moleculares que dan lugar a un mismo fenotipo ocurran en paralelo, quizá mediante una interacción física entre estos dos

dominios improntados tal y como se ha descrito para otros dominios regulados por impronta¹⁰⁸. La existencia un posible mecanismo de metilación que actúe en *trans* sobre varias DMRs localizadas en cromosomas distintos, tal y como sugiere el caso anterior, no descartaría la identificación de más casos con MLMD en pacientes con UPD.

4.4. Cromosoma 15q11-AS/PWS

Los síndromes de Angelman (AS) (OMIM 105830) y de Prader-Willi (PWS) (OMIM 176270) representan dos afecciones genéticas distintas causadas por alteraciones en el dominio improntado localizado en la región 15q11-13. Ambos trastornos son frecuentemente causados por deleciones intersticiales heterocigotas que dan lugar a fenotipos distinguibles dependiendo de su origen parental. Mientras que el AS está asociado con la falta de herencia materna del dominio 15q11-13 debido a deleciones de origen maternal, pat(125)UPD y alteraciones de la impronta o bien con mutaciones en el gen *UBE3A*, el PWS está asociado con la pérdida de la herencia paterna del mismo intervalo genómico ya sea por deleción de origen paterno o mat(15)UPD (véase capítulos 6 y 7 para una completa descripción). Además de estas dos condiciones existe una tercera. Varios estudios han descrito un total de cuatro casos clínicos con características fenotípicas compatibles con el PWS pero con un diagnóstico molecular propio del AS. Esta condición se conoce como “Praderman”¹⁰⁹⁻¹¹¹. Estos cuatro pacientes presentaban una pérdida parcial de la

metilación de la DMR asociada al gen *SNRPN*. Únicamente se ha descrito un caso de AS con MLMD que presenta hipometilación en *KvDMRI* y las DMRs asociadas a *PEG3* y *GNAS* con un fenotipo complejo donde se solapan características de BWS y SRS¹¹². Hasta la fecha, no se ha descrito ningún paciente de AS que presente hipometilación de la DMR *SNRPN* y MLMD. Esto puede ser debido a que este tipo de alteración es poco frecuente en AS, ya que únicamente han sido descritos cuatro pacientes de AS con hipometilación de DMR *SNRPN* hasta el momento⁸². La baja frecuencia de hipometilación de la DMR *SNRPN* destaca también en otros IDs con MLMD. En este contexto, en los últimos años tan sólo se han descrito cinco casos con esta alteración, dos casos de SRS^{13,93}, dos de BWS^{13,82} y un caso aislado de TND¹³.

4.5. Cromosoma 20q13-PHP-IB

El pseudohiperparatiroidismo (PHP) (OMIM 603233) es una enfermedad rara y heterogénea caracterizada por hipocalcemia, hiperfosfatemia y unos elevados niveles de hormona paratiroidea o parathormona (PTH). Los pacientes con PHP se puede clasificar en diferentes grupos (1A, 1B, 1C y 2) atendiendo a su mecanismo patogénico y fenotipo (véase capítulo 8). La forma más común de esta enfermedad es la 1B (OMIM 603233) caracterizada por una resistencia a la PTH y, en algunos casos, a la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH) sin osteodistrofia hereditaria de Albright. La mayoría de casos de

Tabla 1. Diferentes etiologías moleculares de los IDs y frecuencia de los defectos de impronta genómica de múltiples loci. Los trastornos congénitos conocidos asociados con defectos en los loci improntados, sus frecuencias, y los hallazgos moleculares y clínicos asociados. (LOM – pérdida de metilación; GOM – ganancia de metilación; SI – Sin información; UPD: disomía uniparental; RCIU: retraso del crecimiento intrauterino; dup: duplicación)

Enfermedad	Región Cromosómica	Alteraciones moleculares	Frecuencias estimadas	Defectos en múltiples loci	Características clínicas
Diabetes Mellitus Neonatal Transitoria (TND) (OMIM 601410)	6q24	UPD(6)mat pat(6q)dup LOM en <i>PLAGL1</i> Mutaciones en <i>ZFP57</i>	40% 30% 30% 50%	- - - ~50%	Diabetes transitoria, RCIU, hiperglucemia sin cetoacidosis, macroglosia, onfalocelo
Síndrome de Silver-Russell (SRS) (OMIM 180860)	7	UPD(7)mat	7-10%	1 caso	Retraso en el crecimiento pre y postnatal, macrocefalia, hemihipotrofia, cara triangular, dificultades en la alimentación
	11p15.5	UPD(11)mat mat(11p15)dup LOM en <i>H19</i> Mutaciones en <i>CDKN1C</i> Diploidia uniparental materna	Casos raros Casos raros ~40% Algunas familias n=1	- - ~15% - -	
Síndrome de Birk Barel (OMIM 612292)	8q24	Mutaciones en <i>KCNK9</i>	Algunas familias	-	Retraso en el desarrollo, disfagia, hipotonía, hiperinsulinismo transitorio
Retraso del crecimiento intrauterino, displasia metafisaria, hipoplasia adrenal congénita y anomalías genitales (Síndrome IMAGE) (OMIM 614732)	11p15.5	Mutaciones en <i>CDKN1C</i>	Algunas familias	-	Retraso en el crecimiento pre y postnatal, displasia metafisaria, hipoplasia adrenal congénita, dificultades en la alimentación, hipoglucemia y anomalías genitales

Tabla 1. Diferentes etiologías moleculares de los IDs y frecuencia de los defectos de impronta genómica de múltiples *loci*. Los trastornos congénitos conocidos asociados con defectos en los loci improntados, sus frecuencias, y los hallazgos moleculares y clínicos asociados. (LOM – pérdida de metilación; GOM – ganancia de metilación; SI – Sin información; UPD: disomía uniparental; RCIU: retraso del crecimiento intrauterino; dup: duplicación)

Enfermedad	Región Cromosómica	Alteraciones moleculares	Frecuencias estimadas	Defectos en múltiples <i>loci</i>	Características clínicas
Síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (OMIM 130650)	11p15.5	UPD(11)pat	20%	-	Sobrecrecimiento pre y postnatal, organomegalia, macroglosia, onfalocele, hipoglucemia neonatal, hemihipertrofia, incremento en el riesgo del desarrollo de tumores
		Diploidia uniparental paterna	~ 10%	-	
		GOM en <i>H19</i>	5%	-	
		LOM en <i>KvD-MR1</i>	50%	~30%	
		Mutaciones en <i>CDKN1C</i>	5%	-	
Mutación en <i>NLRP2</i>	Una familia	Severo			
Síndrome de Temple (OMIM 616222)	14q32	UPD(14)mat	80%	-	Retraso en el crecimiento pre y postnatal, hipotonía, dificultades en la alimentación durante la infancia, obesidad troncular, escoliosis, pubertad precoz
		del14q32	9%	-	
		LOM en <i>MEG3</i>	11%	Sí	
Síndrome de Kagami-Ogata (OMIM 608149)	14q32	UPD(14)pat	65%	-	RCIU, polihidramnios, defectos en la pared abdominal y torácica, tórax en forma de campana, costillas ensanchadas en la parte inferior
		del14q32	20%	-	
		GOM en <i>MEG3</i>	15%	Sí	

Tabla 1. Diferentes etiologías moleculares de los IDs y frecuencia de los defectos de impronta genómica de múltiples *loci*. Los trastornos congénitos conocidos asociados con defectos en los loci improntados, sus frecuencias, y los hallazgos moleculares y clínicos asociados. (LOM – pérdida de metilación; GOM – ganancia de metilación; SI – Sin información; UPD: disomía uniparental; RCIU: retraso del crecimiento intrauterino; dup: duplicación)

Enfermedad	Región Cromosómica	Alteraciones moleculares	Frecuencias estimadas	Defectos en múltiples <i>loci</i>	Características clínicas
Síndrome de Angelman (AS) (OMIM 105830)	15q11-13	UPD(15)pat del15q11q13	1-2% 75%	- -	Discapacidad intelectual, microcefalia, carencia de habla, risa sin motivo, ataxia, convulsiones
		LOM en <i>SNRPN</i> Mutaciones en <i>UBE3A</i>	~3% 5-10%	1 caso -	
Síndrome Prader-Willi (PWS) (OMIM 176270)	15q11-13	UPD(15)mat del15q 11q13 GOM en <i>SNRPN</i>	25-30% 70-75% ~1%	- - 1 caso	Retraso en el crecimiento postnatal, retraso mental leve, hipotonía neonatal, hipogonadismo, hipopigmentación, obesidad/hiperfagia
Pubertad precoz central 2 (PPCB2) (OMIM 615346)	15q11-13	Mutaciones en <i>MKRN3</i>	Familias raras	-	Pubertad precoz
Mola hidatiforme recurrente familiar (MHR) (OMIM 231090)	19q13.4	Mutaciones en <i>NLRP7</i>	~70 familias	Severo	Proliferación anormal del trofoblasto sin tejido fetal reconocible
Pseudohipoparatiroidismo (PHP) (OMIM 603233)	20q13	UPD(20)pat Defectos de metilación en <i>GNAS</i>	Se desconoce	~12.5%	Resistencia a PTH y otras hormonas; Osteodistrofia hereditaria de Albright, osificaciones subcutáneas, trastornos de la conducta alimentaria, crecimiento anormal

Tabla 1. Diferentes etiologías moleculares de los IDs y frecuencia de los defectos de impronta genómica de múltiples *loci*. Los trastornos congénitos conocidos asociados con defectos en los loci improntados, sus frecuencias, y los hallazgos moleculares y clínicos asociados. (LOM – pérdida de metilación; GOM – ganancia de metilación; SI – Sin información; UPD: disomía uniparental; RCIU: retraso del crecimiento intrauterino; dup: duplicación)

Enfermedad	Región Cromosómica	Alteraciones moleculares	Frecuencias estimadas	Defectos en múltiples <i>loci</i>	Características clínicas
mat(20)UPD	20	UPD(20)mat	Casos raros	-	Retraso en el crecimiento pre y postnatal, insuficiencia en el crecimiento

PHP1B presentan una paternalización de la DMR maternalmente metilada localizada en el dominio improntado GNAS en el cromosoma 20, sugiriendo que la pérdida de la impronta es la base patogénica de este trastorno^{113,114}. Los defectos de metilación de múltiples *loci* tienen lugar de forma rara en pacientes esporádicos, pero cuando se dan, se observa hipo- e hipermetilación tanto en DMRs de metilación paterna como materna^{82,115,116}. No se ha descrito que estos defectos de metilación adicionales tengan efecto sobre el ritmo de crecimiento, índice de masa corporal o medidas bioquímicas. Las únicas características atípicas observadas en pacientes de PHP1B con MLMD han sido hipercolesterolemia en un paciente que presentaba hipometilación en la DMR asociada al gen *MEST* y, restricción del crecimiento y baja estatura en un paciente con hipometilación de las DMRs asociadas a *IGF2R* y *ZNF331*⁸².

5. Mosaicismo de metilación en IDs

El mosaicismo somático se define como

la coexistencia de dos poblaciones de células genéticamente distintas en un mismo individuo o un mismo tejido, procedentes del mismo cigoto pero derivadas de una alteración postzigótica. A nivel clínico, el mosaicismo ha sido a menudo subestimado debido a que las discretas diferencias que puede provocar en las características físicas han sido tradicionalmente atribuidas a la variación normal existente entre individuos. Sin embargo, Fraga y sus colaboradores mostraron que el mosaicismo a nivel de metilación del ADN representa el mecanismo principal en la aparición de discrepancias fenotípicas entre gemelos monocigóticos¹¹⁷.

Antes de que se realizaran estudios en cohortes de IDs basados en la metilación, prácticamente casi todos los casos de mosaicismo somático fueron identificados gracias a la detección de anomalías visibles, normalmente aquellas que implicaban hipertrofia o pigmentación anormal y que, a nivel molecular, estaban asociadas a la presencia de UPD¹¹⁸⁻¹²⁰. Sin embargo, estudios posteriores más detallados

del ADN derivado de diferentes tejidos mostraron que los pacientes con IDs presentan diferentes grados de mosaïcismo a nivel de metilación del ADN según el tipo celular¹⁰⁵. La mayoría de los defectos de metilación, tanto los asociados a defectos en una única región como aquellos asociados a MLMD, presentan mosaïcismo somático. Únicamente unos pocos casos de IDs debidos a epimutación presentan una absoluta hipo- o hipermetilación en las DMRs afectadas^{82,92}.

De forma parecida a la detección de UPDs somáticas, la contaminación por células normales disminuye la frecuencia observada de mosaïcismo relativo a epimutaciones. Además, el nivel de mosaïcismo en sangre no siempre refleja el nivel existente en otros tejidos, llevando a generar falsos resultados negativos^{105,121}. El porcentaje de mosaïcismo tampoco está necesariamente correlacionado con la gravedad del fenotipo ya que una epimutación puede tener un impacto mayor sobre el fenotipo según la regulación y el nivel de la expresión en los tejidos¹⁰⁵. Por ejemplo, la expresión del gen *IGF2* es alta en la parte mesodérmica de la lengua, pero prácticamente es indetectable en células sanguíneas circulantes⁹⁷. Por lo tanto, se podría predecir que la expresividad clínica será mayor si se existe un mayor porcentaje de células epimutadas en tejidos con expresión activa del gen involucrado, en este caso la lengua, que en aquellos en los que es silente, como la sangre. Esto es precisamente lo que Alders y sus colaboradores describieron cuando observaron un perfil de

metilación anómalo en tejido de lengua extirpado pero no en los linfocitos del mismo individuo en tres pacientes de BWS⁹⁷.

Se han descrito también perfiles de metilación aberrante en gemelos monozigóticos discordantes, donde uno de los dos gemelos padecía un ID clásico mientras que el otro no. Dos estudios de BWS en los que se llevó a cabo un análisis molecular minucioso pusieron de relieve que la hipometilación de *KvDMR1* propia de este síndrome únicamente estaba presente en sangre en los dos hermanos, mientras que en el resto de tejidos analizados no estaba presente en el hermano sano^{82,92}. Este hecho podría ser debido a la circulación sanguínea parcialmente compartida en la etapa intrauterina¹²². Este fenómeno también se ha descrito en gemelos discordantes en SRS, donde el perfil de metilación anormal fue observado en sangre en los dos hermanos, mientras que la alteración fue exclusivamente observada en saliva y fibroblastos de piel en el hermano afectado¹⁰³.

6. Mayor incidencia de defectos en múltiples loci tras la utilización de técnicas de reproducción asistida

En algunos países occidentales, del 1-3% de todos los nacimientos son concebidos siguiendo técnicas de reproducción asistida (TRA) como la inyección citoplasmática

de espermatozoides (ICSI) y la fecundación *in vitro* (FIV)¹²³. Durante los últimos 35 años, estas técnicas se han utilizado ampliamente con resultados exitosos y presumiblemente de manera segura. Sin embargo, se desconocen los mecanismos moleculares implicados en el éxito o fracaso de los embarazos por TRA. Las primeras investigaciones sugieren que los niños nacidos como resultado de TRA tienen un mayor riesgo de padecer enfermedades con etiología epigenética incluyendo los trastornos de la impronta genómica, y en los últimos años se han identificado diversos pacientes AS con hipometilación en la DMR de *SNRPN* y otros con BWS con LOM de *KCNQ1OT1*¹²⁴⁻¹²⁷. En un extenso estudio epidemiológico con seguimiento molecular se encontró que la frecuencia del uso de TRA en enfermos con BWS y SRS era mayor de lo esperable. Además, mediante la determinación exhaustiva de los perfiles de metilación de estos pacientes, se pudo observar que los defectos de impronta genómica en múltiples *loci* eran más prevalentes en casos de TRA en comparación a aquellos concebidos de manera natural⁹⁴. Otros autores muestran un incremento en la aparición de hipometilación en *KCNQ1OT1* después de TRA, de forma que un 37,5% de los pacientes BWS fruto de embarazos mediante TRA muestran anomalías en la metilación frente a un 6,4% de pacientes concebidos de manera natural¹²⁸. Estudios posteriores con la misma cohorte de pacientes con BWS también revelaron más defectos múltiples en la impronta genómica (en más de un *loci*) en el grupo

concebido mediante TRA¹⁰⁰. Estas observaciones, sin embargo, no se replicaron en dos estudios adicionales en los cuales se observó una frecuencia similar de errores epigenéticos entre pacientes concebidos mediante TRA y naturales^{91,92}. Cabe señalar que estos estudios, de forma similar a la mayoría de ensayos de metilación en múltiples DMRs reguladas por impronta genómica, cuantificaron diferentes regiones, y quizá por esta razón obtuvieron resultados diferentes, ya que puede que no todas las DMR se vean afectadas de la misma manera. De todos modos, se ha de destacar que esta asociación entre la utilización de técnicas de reproducción asistida y defectos epigenéticos en la descendencia no tiene por qué ser debida al proceso de manipulación de los gametos mediante la utilización de estas técnicas. Es posible que los defectos epigenéticos puedan hallarse de manera intrínseca en los gametos de los pacientes con problemas de fertilidad que optan por tener descendencia mediante TRA o bien que la combinación de los dos factores de riesgo pueda generar este incremento en la incidencia de defectos en múltiples *loci*¹²⁹.

7. Búsqueda de mutaciones en factores con mecanismos de actuación en trans

Con el fin de identificar los insultos genéticos subyacentes responsables

de los defectos en la impronta genómica en múltiples loci, existen numerosos estudios donde se han realizado cribados mutacionales de genes candidatos. En ellos se han secuenciado genomas de pacientes con defectos en la impronta genómica en busca de mutaciones en alguna o todas de las regiones codificantes de *ZFP57*, *DNMT3L*, *DNMT1*, *MBD3*, *DPPA3*, *NLRP7*, *NLRP7*, *KHDC3L* y *TRIM28*^{92,96,103,105,130}. Se han identificado muy pocas variantes patológicas, a excepción de los pacientes con TND con pérdida de metilación en múltiples loci, el 50% de los cuales tienen una mutación recesiva en *ZFP57*^{74,82}.

7.1. La proteína *ZFP57* es necesaria para la protección de la metilación regulada por impronta genómica

El gen *ZFP57* codifica una proteína de dedos de zinc con un dominio denominado *krüppel-associated box domain* (KRAB) que se localiza en la región 6q22.1 en humano, y en la 17qB1 en ratón. A diferencia de muchos genes ZNF, *ZFP57* no forma parte de ninguna gran agrupación con otros miembros de la misma familia¹³¹. En el ratón, las mutaciones de origen materno que resultan en la pérdida de la proteína *ZFP57* en el cigoto en desarrollo (F1 *Zfp57*^{-/-} de madres *Zfp57*^{+/-}) son parcialmente letales, mientras que la eliminación de la función tanto en la madre como

en el cigoto (F1 *Zfp57*^{-/-} de madres *Zfp57*^{-/-}) causan letalidad embrionaria completa⁶⁴. En células madre embrionarias de ratón (mES – *por sus siglas en inglés*), *ZFP57* y *TRIM28* se unen a todas las DMRs conocidas reguladas por impronta genómica, sugiriendo que *ZFP57* recluta al complejo correpresor que incluye la metiltransferasa de H3K9 SETDB1 y la proteína de la heterocromatina HP1g hacia secuencias diana específicas¹³². En consonancia con esta teoría, se ha observado que *ZFP57* es necesario para el mantenimiento de la metilación alélica del ADN (en las regiones *Ig*-DMR, *Snrpn*, *Peg1*, *Peg3*, *Nnat*, *Gnas*, *Rasgrfl* y *Kcnqlot1* pero no en *H19 oIgf2r/Airn*) y la metilación histórica de H3K9me3 en las DMRs asociadas a impronta genómica^{64,132}.

Se han descrito pacientes con mutaciones homocigotas o heterocigotas compuestas en *ZFP57* en un total de 13 familias^{74,82,133,134} que habían sido identificadas por presentar TND como resultado de la hipometilación en la DMR de *PLAGL1* y por tener además pérdida de metilación adicional en otras regiones maternalmente metiladas de genes regulados por impronta genómica^{13,74,82}. En la mayoría de casos, los defectos de metilación parecen ser mosaicos, indicando que *ZFP57* se encuentra involucrado en el mantenimiento de la metilación en las regiones reguladas por impronta genómica durante la reprogramación preimplantacional, de manera similar a como actúa en ratón. Sin embargo, pese al análisis detallado del perfil

de metilación de todo el genoma obtenido mediante chips, únicamente un pequeño subconjunto de DMRs (*PLAGL1*, *GRB10* e invariablemente *PEG3*, *NAP1L5*, *GNAS* y *NHP2L1*) muestran pérdida de metilación^{13,74,82}. A pesar de que la proteína *ZFP57* de ratón y humana son funcionalmente intercambiables *in vitro*¹³⁵, estos datos sugieren una redundancia funcional parcial, en humanos, con otros miembros de la superfamilia ZFP.

7.2. Modelos de mutaciones en el gen *ZFP57* humano

La proteína *ZFP57* humana consta de 516 aminoácidos, mientras que la homóloga en ratón tiene únicamente 421, ya que contiene sólo 5 de los 7 dedos de zinc Cys2His2 (ZFs por sus siglas en inglés) de los descritos en el humano. Por lo tanto, estas proteínas comparten relativamente poca identidad aminoacídica a excepción de las regiones que comprenden el dominio KRAB-A y los ZFs comunes (el tercero y cuarto en humano, y el primero y segundo en ratón). Se piensa que estos ZFs homólogos dan a la proteína su especificidad de unión al ADN. Experimentos de ChIP-seq en mES han revelado que *ZFP57* se une a la secuencia hexanucleotica TGC-5mC-GC¹³².

En un modelo celular inducido de *Zfp57*^{-/-} mES, se ha demostrado que *ZFP57* humana puede unirse a la TRIM28 de ratón y mantener la metilación de ADN asociada a la impronta genómica¹³⁵. Del mismo

modo, los experimentos de análisis de cambio de movilidad electroforética *in vitro* (EMSA - *electrophoretic mobility shift analysis*) han mostrado que la *ZFP57* humana, específicamente los dominios ZF3 y ZF4, pueden unirse a secuencias de ADN que contengan el motivo de hexanucleótido de la DMR *PLAGL1*, de forma que el dominio ZF4 regula la interacción dependiente de metilación con el ADN¹³⁶. Además, estos experimentos EMSA utilizando las mutaciones de cambio de sentido p.R248H y p.H277N descritas en pacientes, demuestran que dichas mutaciones causan pérdida de la capacidad de unión al ADN¹³⁶. También es probable que la mutación descrita p.H438D, que cambia un aminoácido altamente conservado dentro del dominio ZF7 pudiera anular la unión al ADN si después del cambio, el dominio es también funcional, así como alterar la estructura local de la proteína, afectando a su interacción con otros factores en el complejo *ZFP57*-KAP1. Las mutaciones sin sentido y las pequeñas deleciones que pueden generar codones de terminación prematuros, generan probablemente formas truncadas de la proteína altamente patológicas, algunas de las cuales podrían tener los dominios KRAB y ZF1-4 intactos. Sin embargo, las características clínicas de estos pacientes son indistinguibles de los que tienen una mutación en los dominios ZF3-4, lo que sugiere que los productos proteicos de estos genes mutantes son igualmente no funcionales^{74,82,134}.

7.3. Casos extremos de defectos de la impronta genómica en múltiples loci – Molas hidatiformes.

La mola hidatiforme (MH) es un embarazo humano aberrante caracterizado por una proliferación excesiva y anormal del trofoplasto. La forma esporádica es la más común y afecta a 1 de cada 600 embarazos en los países occidentales¹³⁷. Con menor frecuencia, algunas mujeres pueden desarrollar de forma recurrente molas completas, parciales o abortos espontáneos, indicando que estas condiciones tienen etiologías solapantes. Los embarazos molares se detectan en primer lugar mediante ecografía y un nivel extremadamente alto de la gonadotropina coriónica humana (b-GCH) en sangre. El diagnóstico definitivo se hace mediante un examen histopatológico del producto de concepción. Las MHs completas no contienen más tejidos embrionarios que las vellosidades de la placenta, mientras que las MHs parciales presentan normalmente una proliferación moderada del trofoblasto y pueden contener otros tejidos incluyendo amnios, corion o cualquier otro tejido embrionario. Las MHs esporádicas completas más comunes suelen ser diploides y de origen androgenético con dos copias del genoma paterno. Este hecho puede ser consecuencia de la fecundación de un ovocito anucleado por un espermatozoide que se endorreplica, o bien por dos espermatozoides

diferentes. Alternativamente, las molas androgenéticas pueden ser resultado de una fertilización normal, seguida de una pérdida del ADN materno y una endorreplicación del genoma paterno. Las MHs esporádicas parciales son en su mayoría eventos triploides dispérmicos, que resultan en dos copias diferentes del genoma paterno y una copia del genoma materno. El análisis detallado de microsatélites polimórficos puede dar información sobre el tipo de MH, junto con la inmunohistoquímica para *CDKN1C*, un gen regulado por impronta genómica y expresado maternalmente, el producto del cual se expresa en el núcleo de los citotrofoblastos y que por lo tanto, permite la discriminación de MHs parciales y completas¹³⁸.

7.4. Las MHs biparentales se han asociado a mutaciones en *NLRP7*

Ocasionalmente, las MHs pueden ser recurrentes y familiares (OMIM 231090)¹³⁹. Mediante un detallado mapeo de homocigosidad y un cribado de mutaciones a nivel de todo el genoma se han identificado dos *loci*, 19q13.4 y 6q13, donde se encuentran los genes causantes: *NLRP7* (con dominios: NACHT, PYD y una repetición rica en leucinas) y *KHDC3L* (anteriormente conocido como C6ORF221), respectivamente^{140,141}. Aproximadamente el 70% de casos de mujeres afectadas por este tipo de MHs se ha asociado a mutaciones recesivas en *NLRP7*^{142,143}, con unas

50 mutaciones diferentes descritas en pacientes con ambos alelos *NLRP7* defectuosos. Las aberraciones genéticas en el gen *KHDC3L* son mucho menos frecuentes, con sólo 7 familias descritas, representando únicamente el 10% de los pacientes sin alteración en *NLRP7*^{144,145}.

NLRP7 no tiene ortólogo en ratón, pero se cree que se originó a partir de una duplicación de *NLRP2*, el factor más cercano de su misma familia génica¹⁴⁶. Curiosamente, *NLRP2* ha sido descrito como responsable de un caso familiar aislado de BWS basado en la presencia de una mutación de cambio de marco de lectura en homocigosis en una madre asintomática y en sus dos hijos afectados con BWS. Tras el análisis de metilación, estos pacientes de BWS presentaron defectos de metilación en múltiples *loci*, incluyendo las DMRs *KCNQ1OT1* y *MEST*¹⁴⁷. Sin embargo, desde la publicación de este artículo, no se ha vuelto a describir ningún otro caso de IDs con mutaciones en *NLRP2*, lo que convierte este hallazgo en un evento causal raro^{82,105,115}.

7.5. Defectos de metilación en tejidos molares asociados a mutaciones en *NLRP7*

Los cribados de metilación en los tejidos molares con *NLRP7* mutado sugieren que únicamente se encuentran afectadas las DMRs de metilación materna (pérdida de metilación en *KCNQ1OT1*, *PLAGL1*, *GNAS*, *PEG10*, *PEG3*) mientras que la DMR

de *H19* con metilación derivada del espermatozoide se encuentra aparentemente preservada^{148,149}. Queda por determinar si las DMRs maternalmente metiladas y reguladas por impronta genómica se encuentran sólo afectadas en MHs asociadas a mutaciones en *NLRP7/2-KHDC3*, o si los genes específicos de placenta y regulados por impronta genómica que han sido descritos últimamente contribuyen a la patología de las MHs⁸.

Recientemente, se han descrito en una familia dos fetos y un niño con características similares al síndrome de Silver-Russell que mostraban defectos de metilación en mosaico, incluyendo *loci* metilados maternal y paternalmente (como *GNAS*, *KCNQ1*, *L3MBTL*, *MEG3*, *NAP1L5*, *NNAT*, *PLAGL1*, *RBI* y *ZNF597*) en múltiples tejidos. Mediante un cribado mutacional se ha identificado en la madre un cambio p.A719V en *NLRP7*. Sin embargo no está claro si esta sustitución es la responsable de las aberraciones epigenéticas extremas descritas. Este cambio de base en el ADN es una variante de baja frecuencia tanto en la base de datos de los 1000 Genomas como en la dbSNP y la madre ha heredado el cambio de su madre, indicando que han sido necesarios más procesos estocásticos no identificados además de la transmisión materna de c.2156C>T¹³⁰.

El papel exacto del complejo NLRP-KHDC3L en la regulación de la metilación por impronta genómica sigue siendo un misterio, especialmente desde que fueron publicados estudios

de inmunotinción en los que se describe de manera detallada la localización de estas dos proteínas en embriones humanos tempranos y en ovocitos. Esta colocalización ha resultado ser exclusiva en citoesqueleto, dentro del complejo materno subcortical y no en el núcleo donde podría asociarse con la cromatina e influir en la metilación^{142,150}. Curiosamente, la inmunotinción para las metiltransferasas *de novo* DNMT3A y DNMT3B en ovocitos humanos muestra una localización citoplasmática similar⁶⁰, indicando que quizá el complejo NLRP-KHDC3L y las metiltransferasas únicamente se transloquen al núcleo durante el desarrollo temprano del ovocito. Una vez en el núcleo, este complejo poco abundante podría asociarse a secuencias específicas del ADN mediante interacción directa con el regulador de la cromatina YY1¹⁵¹. De manera consistente con el papel de YY1 en este proceso, este factor de transcripción con dedos de zinc se une a muchas DMRs asociadas a impronta genómica en ratón, de forma que ratones *Yy1*^{-/-} han mostrado pérdida de metilación en las DMRs de *Peg3* y *Xist*¹⁵². Estas dos DMRs contienen una secuencia más larga que el motivo de reconocimiento consensode YY1, teniendo dos bases adicionales (GG o GC) en su extremo 5' en comparación con el motivo conocido (CGCCATnTT). Estas bases adicionales son reconocidas por el ZF1 de YY1 y se sabe que incrementan su afinidad de unión al ADN y tal vez participen en la unión al ADN metilado¹⁵³.

8. Limitaciones de las técnicas para la identificación de pérdida de metilación en múltiples *loci*

Los hallazgos ambiguos tanto clínicos como de metilación en los IDs muestran las limitaciones de las pruebas actuales de metilación de un solo locus. Los estudios que han utilizado enfoques moleculares más amplios como los chips de metilación de alta densidad^{8,13}, muestran que existe un solapamiento considerable en las DMRs adicionales afectadas en las diferentes IDs. Además, como ha sido descrito anteriormente, las pruebas en múltiples *loci* nos han permitido resolver fenotipos complejos y solapados asociados con el síndrome de Temple y el SRS¹².

Un requisito previo importante para el análisis diagnóstico integral de los IDs es la identificación y definición de un conjunto estandarizado de DMRs reguladas por la impronta genómica. Hasta la fecha se han descrito en el ser humano 54 regiones de metilación alélica localizadas dentro de los dominios controlados por impronta genómica, 30 de los cuales son DMRs primarias, que heredan la metilación directamente de los gametos respectivos⁸. Con la excepción de unos pocos estudios, para la mayoría de cohortes se han descrito los perfiles de metilación de un número limitado de DMRs reguladas por este mecanismo. Además, en las cohortes analizadas mediante las mismas plataformas de chips de alta densidad, se han seguido

diferentes estrategias bioinformáticas y por lo tanto, los resultados no son directamente comparables¹¹.

Además de las técnicas utilizadas, la definición de hipometilación también es inconsistente entre los diferentes estudios. Por ejemplo, algunos estudios definen metilación aberrante como un valor de metilación fuera de dos desviaciones estándar (DE) de un conjunto de muestras control. Sin embargo, dependiendo de la reproducibilidad de la prueba molecular, esto podría representar sólo un pequeño porcentaje de las diferencias en metilación. Por ejemplo, un 36% de metilación en la DMR de *H19* en SRS se encuentra por debajo de 2 DE cuando se utiliza el ensayo de metilación específico de alelo Taqman¹⁰⁵, mientras que otros estudios utilizan un valor residual absoluto, como 25%. Del mismo modo, en un

paciente con PHP1B se ha descrito una hipometilación en la DMR de *L3MBTL1*, que presentaba un 44% de metilación en el análisis realizado mediante la misma técnica Taqman de alta sensibilidad, debido a que se encontraba fuera del rango de muestras control¹¹⁶.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Monk está subvencionado por la Fundació La Marató de TV3 (101130) y el Ministerio de Educación y Ciencia español (BFU2011-27658). DM es un investigador con Ramón y Cajal y miembro de la European COST action – *European Network for Human Congenital Imprinting Disorders* (BM1208).

RESUMEN

Con la evaluación de los perfiles de metilación de varios trastornos de la impronta genómica, se ha establecido que, con la excepción de pacientes con TND, los defectos de la impronta genómica en múltiples loci no se encuentran limitados a las DMRs de metilación materna, sino que también pueden afectar a los loci de metilación paterna. Dada la coexistencia de alteración de metilación en las dos DMRs de metilación paterna y el estado de mosaicismo de estos defectos en la mayoría de casos, se confirma que estas aberraciones en la metilación suceden después de la fertilización en la mayoría de casos, como consecuencia del fallo en el mantenimiento de la metilación por impronta genómica durante la desmetilación preimplantacional. El proceso de reprogramación que borra la mayoría de las regiones metiladas en los gametos, a excepción de las reguladas por impronta genómica, es complejo, y existen únicamente unos pocos factores protectores conocidos que actúen en trans. Los defectos en la impronta genómica que afectan a más de un locus en humano nos proporcionan una oportunidad única para identificar los mecanismos reguladores del mantenimiento de las diferencias alélicas de metilación y los factores involucrados en el ciclo vital de la impronta genómica.

REFERENCIAS

1. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet* 2011;12:565-575.
2. Barlow DP, Bartolomei MS. Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6.
3. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 2001;294:2536-2539.
4. Kaneda M, Okano M, Hata K et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004;429:900-903.
5. Xie W, Barr CL, Kim A et al. Base-resolution analyses of sequence and parent-of-origin dependent DNA methylation in the mouse genome. *Cell* 2012;148:816-831.
6. Smallwood SA, Tomizawa S, Krueger F et al. Dynamic CpG island methylation landscape in oocytes and preimplantation embryos. *Nat Genet* 2011;43:811-814.
7. Kobayashi H, Sakurai T, Imai M et al. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet* 2012;8:e1002440-
8. Court F, Tayama C, Romanelli V et al. Genome-wide parent-of-origin DNA methylation analysis reveals the intricacies of human imprinting and suggests a germline methylation-independent mechanism of establishment. *Genome Res* 2014;24:554-569.
9. Okae H, Chiba H, Hiura H et al. Genome-wide analysis of DNA methylation dynamics during early human development. *PLoS Genet* 2014;10:e1004868-
10. Guo H, Zhu P, Yan L et al. The DNA methylation landscape of human early embryos. *Nature* 2014;511:606-610.
11. Prickett AR, Ishida M, Bohm S et al. Genome-wide methylation analysis in Silver-Russell syndrome patients. *Hum Genet* 2015;134:317-332.
12. Kagami M, Mizuno S, Matsubara K et al. Epimutations of the IG-DMR and the MEG3-DMR at the 14q32.2 imprinted region in two patients with Silver-Russell syndrome-compatible phenotype. *Eur J Hum Genet* 2014;
13. Docherty LE, Rezwan FI, Poole RL et al. Genome-wide DNA methylation analysis of patients with imprinting disorders identifies differentially methylated regions associated with novel candidate imprinted genes. *J Med Genet* 2014;51:229-238.
14. Sapienza C, Peterson AC, Rossant J, Balling R. Degree of methylation of transgenes is dependent on gamete of origin. *Nature* 1987;328:251-254.
15. Swain JL, Stewart TA, Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell* 1987;50:719-727.
16. Reik W. Genomic imprinting and genetic disorders in man. *Trends Genet* 1989;5:331-336.
17. Ferguson-Smith AC, Sasaki H, Cattanaach BM, Surani MA. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature* 1993;362:751-755.
18. Stoger R, Kubicka P, Liu CG et al. Maternal-specific methylation of the imprinted mouse Igf2r locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* 1993;73:61-71.
19. Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 1993;366:362-365.
20. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99:247-257.
21. Sutcliffe JS, Nakao M, Christian S et al. Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 1994;8:52-58.
22. Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, Schellander K, Wagner EF, Barlow DP. Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997;389:745-749.
23. Smilich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV et al. A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:8064-8069.
24. Williamson CM, Turner MD, Ball ST et al. Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. *Nat Genet* 2006;38:350-355.
25. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G et al. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet* 2008;40:237-242.
26. Biniszkievicz D, Gribnau J, Ramsahoye B et al. Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol* 2002;22:2124-2135.

27. Howell CY, Bestor TH, Ding F et al. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001;104:829-838.
28. Sharif J, Muto M, Takebayashi S et al. The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* 2007;450:908-912.
29. Lopes S, Lewis A, Hajkova P et al. Epigenetic modifications in an imprinting cluster are controlled by a hierarchy of DMRs suggesting long-range chromatin interactions. *Hum Mol Genet* 2003;12:295-305.
30. Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ et al. The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 2010;6:e1000992-
31. Nakabayashi K, Trujillo AM, Tayama C et al. Methylation screening of reciprocal genome-wide UPDs identifies novel human-specific imprinted genes. *Hum Mol Genet* 2011;20:3188-3197.
32. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007;448:553-560.
33. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J* 2007;26:720-729.
34. Henckel A, Nakabayashi K, Sanz LA, Feil R, Hata K, Arnaud P. Histone methylation is mechanically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Hum Mol Genet* 2009;18:3375-3383.
35. Henckel A, Chebli K, Kota SK, Arnaud P, Feil R. Transcription and histone methylation changes correlate with imprint acquisition in male germ cells. *EMBO J* 2012;31:606-615.
36. Ooi SK, Qiu C, Bernstein E et al. DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* 2007;448:714-717.
37. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;460:473-478.
38. Di C, V, Mohn F, Ryan DP et al. Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. *Elife* 2014;3:e01632-
39. Gregory RI, O'Neill LP, Randall TE et al. Inhibition of histone deacetylases alters allelic chromatin conformation at the imprinted U2af1-rs1 locus in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2002;277:11728-11734.
40. Gregory RI, Randall TE, Johnson CA et al. DNA methylation is linked to deacetylation of histone H3, but not H4, on the imprinted genes Snrpn and U2af1-rs1. *Mol Cell Biol* 2001;21:5426-5436.
41. Sanz LA, Chamberlain S, Sabourin JC et al. A mono-allelic bivalent chromatin domain controls tissue-specific imprinting at Grb10. *EMBO J* 2008;27:2523-2532.
42. Monk D, Arnaud P, Frost J et al. Reciprocal imprinting of human GRB10 in placental trophoblast and brain: evolutionary conservation of reversed allelic expression. *Hum Mol Genet* 2009;18:3066-3074.
43. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:315-326.
44. Voigt P, LeRoy G, Drury WJ, III et al. Asymmetrically modified nucleosomes. *Cell* 2012;151:181-193.
45. Monk D, Arnaud P, Frost JM et al. Human imprinted retrogenes exhibit non-canonical imprint chromatin signatures and reside in non-imprinted host genes. *Nucleic Acids Res* 2011;39:4577-4586.
46. Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 2012;484:339-344.
47. Hill PW, Amouroux R, Hajkova P. DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. *Genomics* 2014;104:324-333.
48. Hackett JA, Sengupta R, Zyllicz JJ et al. Germline DNA demethylation dynamics and imprint erasure through 5-hydroxymethylcytosine. *Science* 2013;339:448-452.
49. Dawlaty MM, Breiling A, Le T et al. Combined deficiency of Tet1 and Tet2 causes epigenetic abnormalities but is compatible with postnatal development. *Dev Cell* 2013;24:310-323.
50. Lucifero D, Mann MR, Bartolomei MS, Trasler JM. Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004;13:839-849.
51. Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem* 2004;279:27816-27823.
52. Ciccone DN, Su H, Hevi S et al. KDM1B is a histone H3K4 demethylase required to establish maternal genomic imprints. *Nature* 2009;461:415-418.
53. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002;129:1983-1993.
54. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air

- RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 2002;415:810-813.
55. Chotalia M, Smallwood SA, Ruf N et al. Transcription is required for establishment of germline methylation marks at imprinted genes. *Genes Dev* 2009;23:105-117.
 56. Smith EY, Futtner CR, Chamberlain SJ, Johnstone KA, Resnick JL. Transcription is required to establish maternal imprinting at the Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome locus. *PLoS Genet* 2011;7:e1002422-
 57. Watanabe T, Tomizawa S, Mitsuya K et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse *Rasgrfl* locus. *Science* 2011;332:848-852.
 58. Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X. Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 2007;449:248-251.
 59. Huntriss J, Hinkins M, Oliver B et al. Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, preimplantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev* 2004;67:323-336.
 60. Petrusa L, Van d, V, De RM. Dynamic regulation of DNA methyltransferases in human oocytes and preimplantation embryos after assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod* 2014;20:861-874.
 61. Zhang P, Dixon M, Zucchelli M et al. Expression analysis of the NLRP gene family suggests a role in human preimplantation development. *PLoS One* 2008;3:e2755-
 62. Smith ZD, Chan MM, Humm KC et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. *Nature* 2014;511:611-615.
 63. Nakamura T, Arai Y, Umehara H et al. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol* 2007;9:64-71.
 64. Li X, Ito M, Zhou F et al. A maternal-zygotic effect gene, *Zfp57*, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell* 2008;15:547-557.
 65. Engel N, Thorvaldsen JL, Bartolomei MS. CTCF binding sites promote transcription initiation and prevent DNA methylation on the maternal allele at the imprinted *H19/Igf2* locus. *Hum Mol Genet* 2006;15:2945-2954.
 66. Tomizawa S, Kobayashi H, Watanabe T et al. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. *Development* 2011;138:811-820.
 67. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
 68. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 2004;431:931-945.
 69. Monk D. Deciphering the cancer imprintome. *Brief Funct Genomics* 2010;9:329-339.
 70. Perry JR, Day F, Elks CE et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature* 2014;514:92-97.
 71. Hoggart CJ, Venturini G, Mangino M et al. Novel approach identifies SNPs in *SLC2A10* and *KCNK9* with evidence for parent-of-origin effect on body mass index. *PLoS Genet* 2014;10:e1004508-
 72. Small KS, Hedman AK, Grundberg E et al. Identification of an imprinted master trans regulator at the *KLF14* locus related to multiple metabolic phenotypes. *Nat Genet* 2011;43:561-564.
 73. Horsthemke B. Epimutations in human disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310:45-59.
 74. Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM et al. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in *ZFP57*. *Nat Genet* 2008;40:949-951.
 75. Gardner RJ, Mackay DJ, Mungall AJ et al. An imprinted locus associated with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 2000;9:589-596.
 76. Diatloff-Zito C, Nicole A, Marcelin G et al. Genetic and epigenetic defects at the 6q24 imprinted locus in a cohort of 13 patients with transient neonatal diabetes: new hypothesis raised by the finding of a unique case with hemizygotic deletion in the critical region. *J Med Genet* 2007;44:31-37.
 77. Temple IK, Gardner RJ, Mackay DJ, Barber JC, Robinson DO, Shield JP. Transient neonatal diabetes: widening the understanding of the etiopathogenesis of diabetes. *Diabetes* 2000;49:1359-1366.
 78. Temple IK, Gardner RJ, Robinson DO et al. Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23. *Hum Mol Genet* 1996;5:1117-1121.
 79. Gardner RJ, Mungall AJ, Dunham I et al. Localisation of a gene for transient neonatal diabetes mellitus to an 18.72 cR3000 (approximately 5.4 Mb) interval on chromosome 6q. *J Med Genet* 1999;36:192-196.
 80. Arima T, Drewell RA, Arney KL et al. A conserved imprinting control region at the *HYMAI/ZAC* domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 2001;10:1475-1483.

81. Mackay DJ, Boonen SE, Clayton-Smith J et al. A maternal hypomethylation syndrome presenting as transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 2006;120:262-269.
82. Court F, Martin-Trujillo A, Romanelli V et al. Genome-wide allelic methylation analysis reveals disease-specific susceptibility to multiple methylation defects in imprinting syndromes. *Hum Mutat* 2013;34:595-602.
83. Mackay DJ, Eggermann T, Buiting K et al. Multilocus methylation defects in imprinting disorders. *Biomol Concepts* 2015;6:47-57.
84. Boonen SE, Porksens S, Mackay DJ et al. Clinical characterisation of the multiple maternal hypomethylation syndrome in siblings. *Eur J Hum Genet* 2008;16:453-461.
85. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:343-354.
86. Lee MP, Hu RJ, Johnson LA, Feinberg AP. Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 1997;15:181-185.
87. Reik W, Brown KW, Schneid H, Le BY, Bickmore W, Maher ER. Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum Mol Genet* 1995;4:2379-2385.
88. Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y et al. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 1996;14:171-173.
89. Begemann M, Spengler S, Gogiel M et al. Clinical significance of copy number variations in the 11p15.5 imprinting control regions: new cases and review of the literature. *J Med Genet* 2012;49:547-553.
90. Arima T, Kamikihara T, Hayashida T et al. ZAC, LIT1 (KCNQ1OT1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Res* 2005;33:2650-2660.
91. Rossignol S, Steunou V, Chalas C et al. The epigenetic imprinting defect of patients with Beckwith-Wiedemann syndrome born after assisted reproductive technology is not restricted to the 11p15 region. *J Med Genet* 2006;43:902-907.
92. Blik J, Verde G, Callaway J et al. Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17:611-619.
93. Azzi S, Rossignol S, Steunou V et al. Multilocus methylation analysis in a large cohort of 11p15-related foetal growth disorders (Russell Silver and Beckwith Wiedemann syndromes) reveals simultaneous loss of methylation at paternal and maternal imprinted loci. *Hum Mol Genet* 2009;18:4724-4733.
94. Hiura H, Okae H, Miyauchi N et al. Characterization of DNA methylation errors in patients with imprinting disorders conceived by assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 2012;27:2541-2548.
95. Poole RL, Docherty LE, Al SA et al. Targeted methylation testing of a patient cohort broadens the epigenetic and clinical description of imprinting disorders. *Am J Med Genet A* 2013;161A:2174-2182.
96. Maeda T, Higashimoto K, Jozaki K et al. Comprehensive and quantitative multilocus methylation analysis reveals the susceptibility of specific imprinted differentially methylated regions to aberrant methylation in Beckwith-Wiedemann syndrome with epimutations. *Genet Med* 2014;16:903-912.
97. Alders M, Maas SM, Kadouch DJ et al. Methylation analysis in tongue tissue of BWS patients identifies the (EP)I genetic cause in 3 patients with normal methylation levels in blood. *Eur J Med Genet* 2014;57:293-297.
98. Kobayashi H, Yanagisawa E, Sakashita A et al. Epigenetic and transcriptional features of the novel human imprinted lncRNA GPR1AS suggest it is a functional ortholog to mouse Zdbf2linc. *Epigenetics* 2013;8:635-645.
99. Liu J, Nealon JG, Weinstein LS. Distinct patterns of abnormal GNAS imprinting in familial and sporadic pseudohypoparathyroidism type 1B. *Hum Mol Genet* 2005;14:95-102.
100. Tee L, Lim DH, Dias RP et al. Epimutation profiling in Beckwith-Wiedemann syndrome: relationship with assisted reproductive technology. *Clin Epigenetics* 2013;5:23-
101. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S et al. Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nat Genet* 2005;37:1003-1007.
102. Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F et al. Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 1995;4:583-587.
103. Begemann M, Spengler S, Kanber D et al. Silver-Russell patients showing a broad range of ICR1 and ICR2 hypomethylation in different tissues. *Clin Genet* 2011;80:83-88.
104. Fuke T, Mizuno S, Nagai T et al. Molecular and clinical studies in 138 Japanese patients with Silver-Russell syndrome. *PLoS One* 2013;8:e6105-

105. Azzi S, Blaise A, Steunou V et al. Complex tissue-specific epigenotypes in Russell-Silver Syndrome associated with 11p15 ICR1 hypomethylation. *Hum Mutat* 2014;35:1211-1220.
106. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet* 2014;51:495-501.
107. Begemann M, Spengler S, Kordass U, Schroder C, Eggemann T. Segmental maternal uniparental disomy 7q associated with DLK1/GTL2 (14q32) hypomethylation. *Am J Med Genet A* 2012;158A:423-428.
108. Zhao Z, Tavoosidana G, Sjolinder M et al. Circular chromosome conformation capture (4C) uncovers extensive networks of epigenetically regulated intra- and interchromosomal interactions. *Nat Genet* 2006;38:1341-1347.
109. Gillissen-Kaeschbach G, Demuth S, Thiele H, Theile U, Lich C, Horsthemke B. A previously unrecognized phenotype characterised by obesity, muscular hypotonia, and ability to speak in patients with Angelman syndrome caused by an imprinting defect. *Eur J Hum Genet* 1999;7:638-644.
110. De Molfetta GA, Felix TM, Riegel M, Ferraz VE, de Pina Neto JM. A further case of a Prader-Willi syndrome phenotype in a patient with Angelman syndrome molecular defect. *Arq Neuropsiquiatr* 2002;60:1011-1014.
111. Camprubi C, Coll MD, Villatoro S et al. Imprinting center analysis in Prader-Willi and Angelman syndrome patients with typical and atypical phenotypes. *Eur J Med Genet* 2007;50:11-20.
112. Baple EL, Poole RL, Mansour S et al. An atypical case of hypomethylation at multiple imprinted loci. *Eur J Hum Genet* 2011;19:360-362.
113. Liu J, Litman D, Rosenberg MJ, Yu S, Biesecker LG, Weinstein LS. A GNAS1 imprinting defect in pseudohypoparathyroidism type 1B. *J Clin Invest* 2000;106:1167-1174.
114. Bastepe M, Pincus JE, Sugimoto T et al. Positional dissociation between the genetic mutation responsible for pseudohypoparathyroidism type 1b and the associated methylation defect at exon A/B: evidence for a long-range regulatory element within the imprinted GNAS1 locus. *Hum Mol Genet* 2001;10:1231-1241.
115. Perez-Nanclares G, Romanelli V, Mayo S et al. Detection of hypomethylation syndrome among patients with epigenetic alterations at the GNAS locus. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:E1060-E1067.
116. Maupetit-Mehouas S, Azzi S, Steunou V et al. Simultaneous hyper- and hypomethylation at imprinted loci in a subset of patients with GNAS epimutations underlies a complex and different mechanism of multilocus methylation defect in pseudohypoparathyroidism type 1b. *Hum Mutat* 2013;34:1172-1180.
117. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:10604-10609.
118. Henry I, Puech A, Riesewijk A et al. Somatic mosaicism for partial paternal isodisomy in Wiedemann-Beckwith syndrome: a post-fertilization event. *Eur J Hum Genet* 1993;1:19-29.
119. Monk D, Hitchens M, Russo S, Preece M, Stanier P, Moore GE. No evidence for mosaicism in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet* 2001;38:E11-
120. West PM, Love DR, Stapleton PM, Winship IM. Paternal uniparental disomy in monozygotic twins discordant for hemihypertrophy. *J Med Genet* 2003;40:223-226.
121. Bertoin F, Letouze E, Grignani P et al. Genome-Wide Paternal Uniparental Disomy as a Cause of Beckwith-Wiedemann Syndrome Associated with Recurrent Virilizing Adrenocortical Tumors. *Horm Metab Res* 2014;
122. Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O et al. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2002;11:1317-1325.
123. Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M. Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003;361:1975-1977.
124. Cox GF, Burger J, Lip V et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002;71:162-164.
125. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;72:156-160.
126. Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, Siffroi JP, Flahault A, Le BY. In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* 2003;72:1338-1341.
127. Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB et al. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* 2003;72:218-219.
128. Lim D, Bowdin SC, Tee L et al. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies.

- Hum Reprod 2009;24:741-747.
129. Laurentino S, Beygo J, Nordhoff V et al. Epigenetic germline mosaicism in infertile men. *Hum Mol Genet* 2015;24:1295-1304.
 130. Caliebe A, Richter J, Ammerpohl O et al. A familial disorder of altered DNA-methylation. *J Med Genet* 2014;51:407-412.
 131. Seetharam A, Stuart GW. A study on the distribution of 37 well conserved families of C2H2 zinc finger genes in eukaryotes. *BMC Genomics* 2013;14:420-
 132. Quenneville S, Verde G, Corsinotti A et al. In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions. *Mol Cell* 2011;44:361-372.
 133. Boonen SE, Mackay DJ, Hahnemann JM et al. Transient neonatal diabetes, ZFP57, and hypomethylation of multiple imprinted loci: a detailed follow-up. *Diabetes Care* 2013;36:505-512.
 134. Boyraz M, Ulucan K, Taskin N, Akcay T, Flanagan SE, Mackay DJ. Transient neonatal diabetes mellitus in a Turkish patient with three novel homozygous variants in the ZFP57 gene. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5:125-128.
 135. Takikawa S, Wang X, Ray C, Vakulenko M, Bell FT, Li X. Human and mouse ZFP57 proteins are functionally interchangeable in maintaining genomic imprinting at multiple imprinted regions in mouse ES cells. *Epigenetics* 2013;8:1268-1279.
 136. Baglivo I, Esposito S, De CL et al. Genetic and epigenetic mutations affect the DNA binding capability of human ZFP57 in transient neonatal diabetes type 1. *FEBS Lett* 2013;587:1474-1481.
 137. Hoffner L, Surti U. The genetics of gestational trophoblastic disease: a rare complication of pregnancy. *Cancer Genet* 2012;205:63-77.
 138. Jun SY, Ro JY, Kim KR. p57kip2 is useful in the classification and differential diagnosis of complete and partial hydatidiform moles. *Histopathology* 2003;43:17-25.
 139. Judson H, Hayward BE, Sheridan E, Bonthron DT. A global disorder of imprinting in the human female germ line. *Nature* 2002;416:539-542.
 140. Murdoch S, Djuric U, Mazhar B et al. Mutations in NALP7 cause recurrent hydatidiform moles and reproductive wastage in humans. *Nat Genet* 2006;38:300-302.
 141. Parry DA, Logan CV, Hayward BE et al. Mutations causing familial biparental hydatidiform mole implicate c6orf221 as a possible regulator of genomic imprinting in the human oocyte. *Am J Hum Genet* 2011;89:451-458.
 142. Wang CM, Dixon PH, Decordova S et al. Identification of 13 novel NLRP7 mutations in 20 families with recurrent hydatidiform mole; missense mutations cluster in the leucine-rich region. *J Med Genet* 2009;46:569-575.
 143. Dixon PH, Trongwongsa P, Abu-Hayyah S et al. Mutations in NLRP7 are associated with diploid biparental hydatidiform moles, but not androgenetic complete moles. *J Med Genet* 2012;49:206-211.
 144. Reddy R, Akoury E, Phuong Nguyen NM et al. Report of four new patients with protein-truncating mutations in C6orf221/KHDC3L and colocalization with NLRP7. *Eur J Hum Genet* 2013;21:957-964.
 145. Nguyen NM, Slim R. Genetics and Epigenetics of Recurrent Hydatidiform Moles: Basic Science and Genetic Counselling. *Curr Obstet Gynecol Rep* 2014;3:55-64.
 146. Duenez-Guzman EA, Haig D. The evolution of reproduction-related NLRP genes. *J Mol Evol* 2014;78:194-201.
 147. Meyer E, Lim D, Pasha S et al. Germline mutation in NLRP2 (NALP2) in a familial imprinting disorder (Beckwith-Wiedemann Syndrome). *PLoS Genet* 2009;5:e1000423-
 148. Kou YC, Shao L, Peng HH et al. A recurrent intragenic genomic duplication, other novel mutations in NLRP7 and imprinting defects in recurrent biparental hydatidiform moles. *Mol Hum Reprod* 2008;14:33-40.
 149. Hayward BE, De VM, Talati N et al. Genetic and epigenetic analysis of recurrent hydatidiform mole. *Hum Mutat* 2009;30:E629-E639.
 150. Akoury E, Zhang L, Ao A, Slim R. NLRP7 and KHDC3L, the two maternal-effect proteins responsible for recurrent hydatidiform moles, co-localize to the oocyte cytoskeleton. *Hum Reprod* 2015;30:159-169.
 151. Mahadevan S, Wen S, Wan YW et al. NLRP7 affects trophoblast lineage differentiation, binds to overexpressed YY1 and alters CpG methylation. *Hum Mol Genet* 2014;23:706-716.
 152. Kim JD, Kang K, Kim J. YY1's role in DNA methylation of Peg3 and Xist. *Nucleic Acids Res* 2009;37:5656-5664.
 153. Kim J, Kim J. YY1's longer DNA-binding motifs. *Genomics* 2009;93:152-158.

Capítulo 10: LA VOZ DEL PACIENTE



ASEBEWI

Asociación Española del Síndrome de
BECKWITH-WIEDEMANN



asa

asociación del síndrome de angelman



AESPW

Asociación Española
para el Síndrome de Prader Willi





ASEBEWI

Asociación Española del Síndrome de
BECKWITH-WIEDEMANN



Teléfono de contacto: 656679317

* Representantes zonales:

- Andalucía y Murcia: valen.oro@hotmail.com
- Castilla La Mancha: joseluis_on@hotmail.es
- Castilla y León: carlos5668g@hotmail.com
- Cataluña: jlzaragoza2000@yahoo.es
- Extremadura: javiercito1967@hotmail.com
- Resto: Familia Martín Escalona. pamarev2005@yahoo.es

www.asebewi.org

¿QUIÉNES SOMOS?

Somos una asociación que se creó en 2007, y que actualmente está formada por más de 40 familias procedentes de toda España, en las que alguno de sus miembros ha sido diagnosticado con el síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW).

¿CUÁLES SON NUESTROS OBJETIVOS?

Queremos compartir experiencias y ayudar tanto a los pacientes con SBW como a sus familiares con todos los medios que estén a nuestro alcance, difundiendo información médica adecuada y contrastada y fomentando hábitos de vida y terapias que contribuyan a mejorar la calidad de vida de los afectados.

¿POR QUÉ CREAMOS LA ASOCIACIÓN?

Estar asociados nos permite compartir experiencias que difícilmente podríamos compartir de otro modo. Las familias con niños mayores van transmitiendo sus experiencias y conocimientos a los recién diagnosticados, y de este modo se consigue tranquilizar y apoyar de un modo muy efectivo. Además, y dado el gran número de especialidades médicas que es necesario coordinar para el adecuado tratamiento del SBW, la asociación nos permite intercambiar experiencias médicas y conocer a los profesionales de referencia en cada especialidad.



ASEBEWI

Asociación Española del Síndrome de
BECKWITH-WIEDEMANN



También estamos trabajando para la existencia de un protocolo médico contrastado en España que incluya el seguimiento y tratamiento del SBW.

¿QUÉ ACTIVIDADES REALIZAMOS?

Realizamos una junta ordinaria anual, normalmente en el mes de Mayo en Madrid, y desde 2009 organizamos también unas jornadas de convivencia durante un fin de semana de Septiembre fuera de Madrid, en el que tenemos oportunidad de estrechar lazos, y compartir nuestras inquietudes con más tranquilidad –y con menos formalidad- que en la junta ordinaria.

Intentamos que en ambas ocasiones asistan a las juntas o encuentros profesionales de referencia que nos aporten sus conocimientos y experiencia en el SBW.



asa
asociación del síndrome de angelman

Inscrita como Asociación Nacional sin ánimo de lucro Registro de Asociaciones: N° 585697
C. de Madrid: Registro de Acción Social y Servicios Sociales N° E2515.5 C. de Madrid: N° de
Registro S3444

C/Dos de Mayo, nº 6

28701 San Sebastián de los Reyes - MADRID

Tfno: 670 90 90 07

C.I.F.: G61295051

E-mail: info@angelman-asa.org

WEB: www.angelman-asa.org

Perfil de Facebook: Asociación Síndrome de Angelman

Página de Facebook: A.S.A. ASOCIACIÓN SÍNDROME DE ANGELMAN - ESPAÑA

Página para venta de manualidades: Abalorios y otras manualidades ASA

Twitter: [@angelmanasa](https://twitter.com/angelmanasa)

El Síndrome de Angelman (SA) es una enfermedad neurogenética de características clínicas bien definidas. Está entre las consideradas “enfermedades raras”, debido a su baja prevalencia (1 caso por cada 20.000 nacidos vivos, aproximadamente). Fue descrita por primera vez en el año 1965 por el pediatra inglés Harry Angelman. En España, los primeros diagnósticos se obtuvieron hace aproximadamente 25 años.

Sin pretender explicar aquí cuáles son los mecanismos genéticos que producen el SA (esta tarea corresponde a los médicos y genetistas, y lo hacen de manera magistral), sí queremos recoger aquí cuáles son las principales características y manifestaciones clínicas del SA, ya que es con lo que tenemos que convivir los afectados y sus familiares.



asa
asociación del síndrome de angelman

CONSISTENTE (100% DE LOS CASOS):

- Retraso funcionalmente severo en el desarrollo, tanto a nivel motor como a nivel cognitivo.
- Ausencia total de lenguaje oral o uso de un número mínimo de palabras, no siempre con sentido comunicativo. No obstante, es sabido que las habilidades para comprender el lenguaje oral son mucho mayores que las habilidades expresivas del mismo. Sí tienen capacidades de comunicación no verbal, que es necesario potenciar.
- Problemas de movimiento y equilibrio, normalmente ataxia (rigidez) al caminar y movimientos temblorosos en los miembros. Eso hace que en muchas ocasiones el caminar sea vacilante, inestable, errático o con movimientos rápidos y torpes.
- Tienen una conducta muy peculiar: cualquier combinación de risa/sonrisa frecuente, apariencia de felicidad, personalidad fácilmente excitable, a menudo con aleteo de manos, hiperactividad, poco tiempo de atención mantenida...

FRECUENTE (MÁS DEL 80% DE LOS CASOS):

- Microcefalia
- Crisis convulsivas, que comienzan normalmente antes de los 3 años de edad. De todas formas, la epilepsia en el SA es de varios tipos, lo que hace más difícil su control.
- Electroencefalograma anormal, con un modelo característico de ondas de gran amplitud y picos lentos.

ASOCIADO (ENTRE EL 20 Y EL 80% DE LOS CASOS):

- Estrabismo
- Babeo frecuente
- Lengua prominente
- Prognatismo
- Problemas de alimentación durante la infancia
- Trastornos del sueño, muy severos en ocasiones
- Atracción por el agua, llegando a la fascinación.



asa
asociación del síndrome de angelman

La Asociación del Síndrome de Angelman (ASA) nació en Barcelona en el año 1996, precisamente por la unión de un pequeño grupo de padres de los primeros niños diagnosticados con SA en nuestro país. Ante el gran desconocimiento que había entonces acerca del síndrome, decidieron crear esta Asociación de ámbito local, persiguiendo los siguientes fines:

- Dar soporte humano e informativo a todas las familias afectadas.
- Asesorar a padres, profesionales e instituciones acerca del síndrome.
- Promover actividades de formación, investigación e intercambio de proyectos.
- Colaborar con instituciones públicas y privadas en los estudios y/o trabajos conjuntos que favorezcan el conocimiento de esta problemática.
- Contribuir a la divulgación de los conocimientos del síndrome.
- Promover el intercambio internacional de las personas relacionadas con el cuidado de personas con SA para compartir experiencias y proyectos.
- Mejorar la calidad de vida de los afectados con SA y sus familias.
- Alcanzar la máxima integración social.

Muy largo ha sido el camino recorrido desde entonces y muchas las metas alcanzadas, pero **nuestro objetivo prioritario ha sido y será siempre el de dar soporte humano a las familias afectadas, especialmente a los nuevos diagnosticados**. Es muy duro recibir el diagnóstico de que tu hijo o hija tiene el Síndrome de Angelman y, en ocasiones, los médicos no actúan con el tacto necesario ni disponen de la información que los padres necesitan en esos momentos. Muchas veces es la primera vez que se encuentran con este tipo de diagnóstico y se remiten a la literatura, dando en muchas ocasiones a los padres un pronóstico extremadamente pesimista de lo que va a ser la vida de sus hijos. Cierto que el SA es grave, pero cada niño es un mundo y nadie puede saber a priori lo que llegará a conseguir en un futuro.

Por eso, en ASA consideramos que es muy importante el contacto lo antes posible con otros padres de niños afectados. Todos los que formamos la Asociación somos padres y madres que ya hemos pasado por momentos como el diagnóstico y montones de dificultades y problemas más; tenemos, por tanto, una empatía y una experiencia que ningún médico podrá aportar jamás.



asa
asociación del síndrome de angelman

Contamos con una serie de familias de referencia por zonas geográficas, familias que están dispuestas a ser ese primer contacto con los nuevos diagnosticados, escucharles, ayudarles y guiarles en el largo camino que inician.

Una vez bien definido y establecido ese objetivo, nos centramos en ir desarrollando el resto de objetivos fundacionales.

En el año 2004, ante el creciente número de casos diagnosticados, se decidió convertir la Asociación en una entidad de ámbito estatal, trasladándose la sede social a Madrid. Tras varios años de cambios de sede y de junta directiva, los mayores avances se han logrado en estos últimos años.

Formamos ASA actualmente unas 170 familias (además de socios indirectos, como pueden abuelos, tíos, amigos, etc). Y es precisamente gracias a la gran implicación de los socios, organizando eventos o participando activamente en ellos, que se han logrado una serie de cosas muy importantes:

DAR UNA GRAN VISIBILIDAD AL SÍNDROME DE ANGELMAN Y A LA ASOCIACIÓN

En este sentido, la Asociación está llevando a cabo una incesante actividad de organización de eventos, con el fin último de recaudar fondos para diversos proyectos.

Y todas estas actividades nos están permitiendo poder aparecer en programas de radio, de televisión, prensa escrita, ediciones digitales, semanarios, etc.....Especialmente, cuando pusimos en marcha nuestra campaña “Danos cobertura con tu viejo móvil”, tuvo un gran impacto en los medios de comunicación a nivel nacional.

En otras ocasiones los eventos que se organizan son a nivel local (actividades deportivas, charlas informativas en colegios, mercadillos en diversos puntos del país, etc). Pero también en estos casos alcanzan gran visibilidad, gracias al uso que hacemos de las redes sociales (actualmente Facebook y Twitter).

El fin último es que el síndrome de angelman sea cada vez menos desconocido, de manera que los profesionales (médicos, terapeutas, profesores, etc) que se enfrenten a él sepan cómo afrontarlo para atender mejor a nuestros hijos.



asa
asociación del síndrome de angelman

PROMOVER ACTIVIDADES DE FORMACIÓN

Consideramos este punto de suma importancia. Y, a su vez, lo desglosamos en dos.

- **FORMACIÓN A LOS PROFESIONALES:** nos referimos a todas aquellas personas, no familiares, que de alguna u otra forma trabajan con nuestros hijos. Es muy importante que los profesionales conozcan qué es el SA, cómo se trabaja con él, a qué se enfrentan. Para ello, organizamos de manera bianual Jornadas Profesionales de formación, donde se abordan diversos temas (médicos, genéticos, conductuales, etc). Se trata de jornadas abiertas a todos y gratuitas.
- **FORMACIÓN A LOS PADRES:** ya a finales de 2014 pusimos en marcha dos proyectos para formar a los padres en algunas de las cuestiones que más nos preocupan: la comunicación y los problemas de conducta. Para ello, desde ASA se están financiando (a veces el 100%) una serie de cursos y talleres dirigidos a los padres y que abordan precisamente esas dos cuestiones. Tenemos diversos cursos programados por todo el país y a lo largo de todo el año.
Asimismo, se están preparando también proyectos nuevos para ampliar la oferta de talleres y cursos.

RECAUDACIÓN DE FONDOS

Todos los objetivos que nos hemos marcado se quedarían en simples ideas si no hubiéramos puesto en marcha también diversas iniciativas para recaudar fondos. Estas iniciativas parten en muchas ocasiones de los propios socios, que cuentan con todo el apoyo de ASA necesario para llevarlos a cabo. Y también nacen iniciativas de la propia junta directiva.

Las principales vías de obtención de fondos que tenemos son:

- Campaña de recogida de móviles usados, que luego son vendidos a una empresa. La pusimos en marcha en octubre de 2012 y aún continúa, si bien a un ritmo menor.
- Venta de manualidades elaboradas en la Asociación por algunas madres de niños afectados. Se venden a través de nuestra página web y especialmente a través de stands en los mercadillos y demás eventos que se organizan.



asa
asociación del síndrome de angelman

- Presentamos proyectos concretos a subvenciones que van publicándose. **Desde diciembre de 2014 ASA está considerada una entidad de utilidad pública, lo cual permite que podamos acceder a subvenciones que hasta ahora nos estaban vetadas.**
- Donaciones particulares (más atractivas ahora que son desgravables fiscalmente por la condición de entidad de utilidad pública).

Todos los fondos recaudados por las distintas vías mencionadas, se destinan a las siguientes actividades:

- Al propio funcionamiento ordinario de la Asociación (gastos de teléfono, seguros, material corporativo, etc).
- A financiar las actividades de formación que estamos llevando a cabo y las nuevas que pondremos en marcha.
- A financiar diferentes proyectos de investigación, centrándonos en:
 - ** Investigación del Dr. Ugo Mayor, en España, que trata de averiguar cómo funciona el cerebro de un paciente con SA, para posteriormente buscar una cura.
 - ** Envío de dinero a la Foundation for Angelman Syndrome Therapeutics (FAST) en Estados Unidos, para que a través del grupo FIRE (formado por varios investigadores) se puedan financiar las investigaciones más prometedoras en la búsqueda de una cura para el SA.
 - ** Financiación del Ensayo Clínico con Minociclina llevado a cabo en el año 2014 por la Unidad Monográfica del Síndrome de Angelman en el Hospital Universitario Puerta de Hierro en Majadahonda (Madrid).
 - ** Financiación de un proyecto de la Corporación Sanitaria Parc Tauli, que trata de desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico del SA, de manera que puedan desaparecer algún día los casos clínicos.



AESPW

**Asociación Española
para el Síndrome de Prader Willi**

Cl. Río Ter nº2- bajo
28913 Leganés (Madrid)
Tel. 915336829 - 620911488
praderwillisindrome@gmail.com
www.aespw.org

La Asociación Española para el Síndrome de Prader-Willi, es una entidad no lucrativa constituida el 25 de Febrero de 1995, declarada de Utilidad Pública el 24 de Noviembre de 2006. El domicilio social de esta entidad está sito en Madrid, aunque su ámbito de actuación corresponde a todo el territorio nacional, por eso estamos en contacto con familias, personas afectadas por el síndrome y profesionales que trabajan con ambos, en todas las comunidades autónomas del país.

Si estáis interesados/as en contactar con nosotros podéis hacerlo a través de nuestros teléfonos o del correo electrónico, contamos en nuestra entidad con una psicóloga con amplia experiencia en el síndrome y en el desarrollo de trabajos en el entorno educativo, familiar y clínico. Estaremos encantados de atenderos y acompañaros. La ayuda mutua en situaciones tan complejas es de crucial importancia.

El objeto fundamental de la AESPW es la protección, asistencia, previsión educativa e integración social de las personas afectadas por el Síndrome de Prader-Willi y sus familias; siendo los fines estatutarios de la misma. A grandes rasgos los objetivos específicos se concretaría en:



AESPW

**Asociación Española
para el Síndrome de Prader Willi**

- Apoyar a las familias de las personas afectadas por el síndrome, para conseguir la mejora de las condiciones de vida de dichas personas, bien directamente, o en apoyo a proyectos, que inspirados o generados por terceras personas, físicas o jurídicas, apoyen tal actuación.
- Promover la integración escolar y social de las personas afectadas por el Síndrome de Prader-Willi.
- Instar a los diferentes poderes públicos la realización de una política coherente de prevención, educación, tratamiento, rehabilitación, asistencia, integración y desarrollo de las personas afectadas por el Síndrome de Prader-Willi.
- Promover actitudes sociales positivas hacia las personas afectas del síndrome, incidiendo en la divulgación de sus problemas, soluciones, modos y formas de integración social, tratamientos, rehabilitaciones y desarrollo.
- Promover la divulgación de las actividades realizadas por el movimiento asociativo, tendente a la mejora de la calidad de vida y la integración social de las personas afectadas por el Síndrome de Prader-Willi y sus familias.



Asociación Española de PHP

asociacionpacientesphp@gmail.com

La Asociación Española de Pseudohipoparatiroidismo, es una entidad no lucrativa constituida el 4 de julio de 2015. Estamos interesados en entrar en contacto con familias, personas afectadas por el síndrome y profesionales que trabajan en esta área en todas las comunidades autónomas del país. Si estáis interesados/as en contactar con nosotros podéis hacerlo a través de nuestro correo electrónico y podremos daros datos de nuestro grupo privado en Facebook o de nuestra página en Facebook.

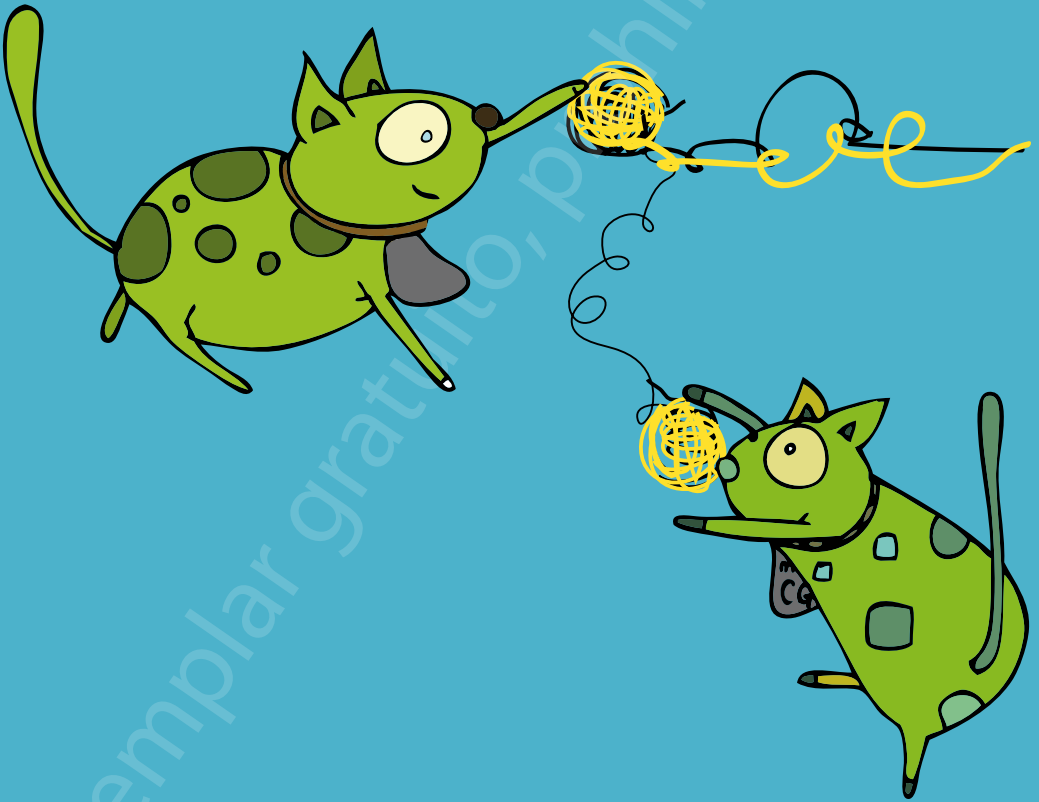
Los fines de la Asociación son los siguientes:

1. Servir de punto de encuentro de pacientes y familiares de la enfermedad rara PSEUDOHIPOPARATIROIDISMO (PHP) en todas sus variantes.
2. Ofrecer apoyo integral a pacientes con PHP y sus familiares
3. Difundir información médica adecuada y contrastada sobre PHP, y especialmente sobre su diagnóstico, tratamiento y pruebas de seguimiento adecuadas
4. Fomentar hábitos de vida y terapias adecuadas que mejoren la calidad de vida de los pacientes con PHP y sus familiares.
5. Buscar la ayudas necesarias, tanto públicas como privadas, para favorecer la investigación en PHP.

Y para su consecución se desarrollarán las siguientes actividades:

- Creación de un foro de comunicación en internet (blog, web, twitter y página de Facebook para dar a conocer la enfermedad., grupos cerrados donde pacientes y familiares puedan comentar sus intereses particulares, ...)
- Creación de un dossier con las principales características clínicas de la enfermedad para ser distribuido entre los distintos especialistas encargados del seguimiento médico de los asociados.
- Obtener asesoramiento médico y psicológico para los pacientes y sus familiares.
- Organización de charlas impartidas por expertos en esta enfermedad con periodicidad anual.
- Desarrollar distintas actividades para recaudar fondos para su investigación.
- Comunicación con otras asociaciones de los familiares y pacientes con PHP a nivel internacional.

¿Quién no ha oído alguna vez el dicho “eres más raro que un perro verde”?
Así se sienten o hacemos sentir a los pacientes con enfermedades raras.
Con la elaboración de este libro nuestro objetivo es ayudar a desentrañar
el ovillo de los complejos mecanismos (epi)genéticos responsables de
unas enfermedades especialmente infrecuentes, las enfermedades
de impronta, en la que un “terrible grupo metilo” (mCG) juega un
importante papel.
Confiamos resulte de utilidad para profesionales, pacientes y familias.



La impresión de esta obra ha sido posible gracias
a la colaboración de las siguientes instituciones:

