



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL, SIGLO XXI**

**“CORRELACION GENOTIPO FENOTIPO EN UNA
FAMILIA MEXICANA CON SÍNDROME DE BECKWITH
WIEDEMANN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MÉDICO GENETISTA

PRESENTA

DR. EDGAR FABRICIO RICÁRDEZ MARCIAL

**Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa
Tutora de Tesis**

**M. en C. Carolina Barrientos Salcedo
Cotutora**

**Dra. Eunice López Muñoz
Asesor metodológico**

México, D.F. 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“CORRELACION GENOTIPO FENOTIPO
EN UNA FAMILIAMEXICANA
CON SINDROME DE BECKWITH WIEDEMANN”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MÉDICO GENETISTA

PRESENTA

DR. EDGAR FABRICIO RICÁRDEZ MARCIAL

**Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinosa
Tutora de Tesis**

**M. en C. Carolina Barrientos Salcedo
Cotutora**

**Dra. Eunice López Muñoz
Asesor metodológico**

DEDICATORIA

A MI ESPOSA

A MI HIJO

A MIS PADRES

A MIS HERMANAS

A MIS PROFESORES

AGRADECIMIENTOS

*AL DR FABIO A. SALAMANCA GÓMEZ
A LA DRA ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA
A LA M. EN C. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO
A LA DRA MARIA ANTONIETA ARAUJO SOLÍS
A LA M. EN C. ALICIA CERVANTES PEREDO
A LA DRA EUGENIA DOLORES RUIZ CRUZ
AL DR. JUAN CARLOS HUICOCHEA MONTIEL
A LA DRA EUNICE LÓPEZ MUÑOZ
AL DR JUAN JORGE PALACIOS CASADOS
A LA BIOL. MIRYAM GONZÁLEZ GONZÁLEZ
A LA BIOL. HILDA LOZA RODRIGUEZ
A MI AMIGA MARIE VERONICA VRATNY ZULETA*

CONTENIDO	Página
Resumen.....	6
Abstract.....	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	18
Planteamiento del problema	19
Hipótesis	21
Objetivos	22
Material y Métodos	23
Resultados	26
Discusión	33
Conclusiones	35
Bibliografía	36

RESUMEN

Introducción. El síndrome de Beckwith Wiedemann (SBW) se caracteriza por macrosomía, macroglosia, defectos en la pared abdominal e hipoglucemia (OMIM 130650). Usualmente es esporádico, pero también es heredado en forma Autosómica Dominante. Los pacientes con este síndrome tienen un riesgo mayor de desarrollar neoplasias, especialmente tumor de Wilms. La etiología de esta entidad radica en la alteración de patrones de impronta en genes del locus 11p15.5, los cuales participan en la regulación del crecimiento y la división celular.

Objetivo: Determinar si existe una correlación entre el fenotipo y la expresión de los genes *IGF2*, *CDKN1C* y *LIT1*, en los miembros de una familia afectados con SBW.

Material y Métodos: Se realizó el estudio clínico en 63 miembros de una familia, originaria de San Cristóbal de las Casas, Chiapas, en quienes se practicaron exploración física, cariotipo de alta resolución. El análisis molecular se realizó solo en la familia del caso propósitos, mediante RT-PCR.

Resultados: Sólo 12 miembros de esta familia tienen fenotipo compatible con SBW, predominando la macroglosia, la macrosomía y defectos en la pared abdominal. El cariotipo no reportó anormalidades. Se encontró expresión normal en los genes estudiados.

Conclusión: No se encontró correlación del fenotipo con el genotipo en este caso familiar. Se confirma la expresividad variable y patrón autosómico dominante característico. Por los hallazgos moleculares, asumimos que este involucrada una mutación puntual en *CDKN1C*, como esta reportado para estos casos.

Palabras clave: Beckwith Wiedemann, familiar, sin correlación.

ABSTRACT

Introduction: The Beckwith Wiedemann Syndrome (BWS) is characterized by overgrowth, macroglossia, abdominal wall defects, and hypoglycemia (OMIM130650). Usually it is sporadic, but it is also hereditary by Autosomal Dominant way. The patients with this syndrome have a higher risk to develop neoplasias, especially Wilms Tumor. The etiology of this entity is characterized by the alteration of the imprinting in genes from 11p15.5 locus, which participate in the growth regulation and cell division.

Objective: To determine if there exists a correlation between the phenotype and the expression of genes IGF2, CDKN1C and LIT1, in the members of a family affected with BWS.

Material and Methods: The clinic studies of 63 members of one family, originary from San Cristobal de las Casas, Chiapas, was done. Physical exploration and high resolution cariotype were performed to each member. The molecular analysis was only performed to the propósitus case family by means of RT-PCR.

Results: Only 12 members from this family have a phenotype compatible with BWS, with macroglossia, overgrowth and abdominal wall defects as predominant features. The cariotype did not report abnormalities. Normal expressions were found in the studied genes.

Conclusion: There was no correlation found between the phenotype and the genotype in this familiar case. The variable expression and the Autosomal Dominant inheritance were confirmed. Due to the molecular findings, we assume that a punctual mutation in CDKN1C is involved, as it is reported in these cases.

Key words: Beckwith Wiedemann, familiar, without correlation.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de Beckwith Widemann (SBW, OMIM 130650), es uno de los síndromes de sobrecrecimiento más comunes. Se estima que ocurre en 1 de cada 13,700 nacimientos, aunque la existencia de casos con una expresión mínima del fenotipo probablemente subestima la verdadera frecuencia de este síndrome. En México no contamos con información epidemiológica actualizada para SBW. (1)

TABLA 1

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DEL SÍNDROME DE BECKWITH WIEDEMANN	
CRANEOFACIAL	Reborde metópico palpable
	Fontanela amplia
	Occipucio prominente
	Macroglosia
	Nevus flammeus en la frente
	Surcos o fisuras lineales en el lóbulo de la oreja
	Muecas posteriores en el hélix
CARDIOVASCULAR	Cardiomiopatía
	Cardiomegalia
ABDOMEN	Onfalocelo (exónfalos)
	Diastasis de rectos
	Hepatomegalia
	Hipertrofia pancreática
GENITOURINARIO	Displasia medular renal
	Nefromegalia
	Sobrecrecimiento de genitales externos
	Criptorquidia
MUSCULOESQUELÉTICO	Edad ósea avanzada
METABÓLICO	Hipoglucemia neonatal
HISTOPTOLOGÍA	Citomegalia adrenocortical, hiperplasia hipofisiaria
NEOPLASIAS	Tumor de Wilms
	Hepatoblastoma, Gonadoblastoma, Neuroblastoma
	Carcinoma adrenal
CRECIMIENTO Y DESARROLLO	Retardo mental en relación con la hipoglucemia neonatal severa
	Hemihipertrofia
	Macrosomía

Esta entidad, cuyo diagnóstico es principalmente clínico, se apoya generalmente en los criterios de Elliot que requieren de tres características clínicas mayores, y dos o más menores, para confirmar SBW (1, 2). Como criterios mayores se han considerado la macroglosia, la macrosomía, defectos de pared abdominal, visceromegalias y tumores embrionarios que se presentan en los primeros 6 años de vida.

Los criterios menores incluyen la hipoglucemia en el periodo neonatal, anormalidades renales, pliegues y/o surcos en el pabellón auricular, *nevus flammeus* facial, hemihipertrofia y antecedente de polihidramnios y/o prematuridad. (2,4)

La clasificación de DeBaun es menos estricta y requiere dos o más de las cinco características clínicas más comunes como macroglosia, macrosomía, defectos de pared abdominal, hipoglucemia, pliegues o fosetas en pabellones auriculares (3, 4).

Se han propuesto, recientemente, otros criterios clínicos los cuales se resumen en la tabla 2. (4)

TABLA 2. CRITERIOS CLÍNICOS

Elliot et al, 1994	De Baun y Tucker, 1998	Weksberg et al, 2001
CRITERIOS MAYORES		
Macroglosia Macrosomía Defectos de pared abdominal Visceromegalias Tumores embrionarios	Macroglosia Macrosomía Hipoglucemia Pliegues o fosetas en orejas Defectos de pared abdominal	Macroglosia Macrosomía Hemihiperplasia Pliegues o fosetas en orejas Defectos de pared abdominal
CRITERIOS MENORES		
Hipoglucemia Malformación renal Pliegues o fosetas en orejas Nevus flammeus facial Hemihiperplasia Polihidramnios y prematuridad.		Tumor embrionario Visceromegalias Malformación renal
3 criterios mayores o 2 mayores y 3 o más menores	Al menos 2 de los 5 criterios	Al menos 3 criterios mayores o 2 mayores y 1 o más menores

Tomado de referencia 4.

Aunque se han reportado casos de deficiencia mental, ésta se relaciona con la hipoglucemia neonatal y no con una alteración en el sistema nervioso central, propia del síndrome. El conocimiento de la evolución del fenotipo hace necesario tomar en cuenta las modificaciones que sufren con la edad las características faciales, ya que debido al desarrollo, los adultos pierden muchas de estas características físicas. Sin embargo, la principal preocupación, a largo plazo, es el desarrollo de tumores de origen embrionario, principalmente el tumor de Wilms. Los niños con SBW tienen mayor riesgo para desarrollar tumor de Wilms en los primeros 5 a 7 años de la vida y se ha estimado en 12.5% en pacientes con hemihipertrofia (con o sin nefromegalia) y de 7.5% en quienes no la tienen, aunque esto ha variado a medida que se amplía el conocimiento sobre los diferentes mecanismos moleculares involucrados en la etiología del síndrome, como se describe más adelante (5).

El 15% de los casos con SBW tiene un modelo de herencia Autosómico Dominante (casos familiares), con expresividad variable y penetrancia incompleta, el resto de los casos son esporádicos (6).

La etiología de SBW se asocia con alteraciones en el fenómeno conocido como impronta por lo que está relacionado, en la mayoría de los casos, con la pérdida de impronta de varios genes ubicados cercanamente en la región cromosómica 11p15.5. Dichos genes están involucrados en la regulación del ciclo celular y el control del crecimiento (7,9).

La impronta genómica puede definirse como la expresión diferencial de los alelos de un gen dependiendo del progenitor del cual se hereda, esto es, que solo un alelo es expresado, ya sea el heredado por el padre o el de la madre, a diferencia de la forma bialélica en la cual se expresan la mayoría de los genes de nuestro genoma. Puede explicarse como una modificación epigenética al no alterarse la secuencia nucleotídica de los alelos, pero que tiene repercusión en el fenotipo. (7, 8, 9)

La evidencia de que ocurre impronta genómica durante el desarrollo normal surgió después de muchos años de estudiar *locus* individuales, regiones cromosómicas específicas y genoma en general. La impronta genómica reta dos hipótesis de la genética mendeliana aplicada a las enfermedades humanas: a) que los alelos materno y paterno son equivalentes y b) que dos copias íntegras de un gen se asocian siempre a funcionalidad correcta. Esto se observó claramente cuando se analizaron las regiones 11p15.5 y 15q11-q13. (7, 8, 9)

En las molas hidatiformes y en los teratomas completos de ovario, el genoma de éstos tiene un solo origen parental, lo que indica que el desbalance en el genoma paterno o materno conduce al desarrollo neoplásico principalmente. En cáncer, varios cromosomas presentan alteraciones específicas de un alelo parental por ejemplo, la pérdida de heterocigocidad en el tumor de Wilms, translocaciones en la leucemia mielocítica aguda, así como la amplificación génica en neuroblastoma. (7, 8, 9)

El síndrome de Beckwith-Wiedemann es una alteración que involucra sobrecrecimiento y cáncer, y están asociadas a pérdida de impronta genómica, así como rearrreglos cromosómicos de origen parental específico y disomía uniparental. La pérdida de impronta (LOI, por sus siglas en inglés) es un evento asociado al cáncer que involucra la pérdida de expresión alelo-específica. La LOI incluye la activación de la copia silenciosa de genes que promueven el crecimiento y el silenciamiento de la copia que se transcribe de forma normal de genes supresores de tumor. Existen varios genes y tumores que presentan LOI. Algunos de estos genes son *IGF2*, *H19*, *CDKN1*, *LIT1* y los tumores son Wilms, hepatoblastoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, uterino, cervical, esofágico, próstata, pulmón, colon, coriocarcinoma y tumor de células germinales. Lo que demuestra que la LOI es una alteración común en cánceres humanos. (7, 8, 9)

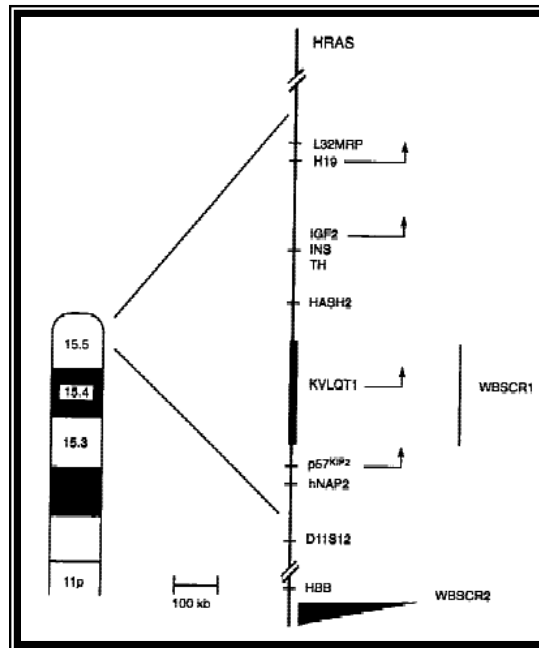


Figura 1. Mapa genético del brazo corto del cromosoma 11 en mamíferos. (Tomado de referencia 11).

La región cromosómica asociada a la etiología de este síndrome se encuentra en 11p15.5 (figura 1); los genes que se expresan solo en el alelo paterno son *IGF2* (*insulin growth factor* o factor de crecimiento similar a la insulina) y *KCNQOT1* (*LIT1*). Mientras que los genes *H19*, *CDKN1C* (*cyclin dependent kinase inhibitor*) y *KVLQT1* se expresan solo en el alelo materno (10, 11).

Dicha región se encuentra dividida en dos dominios, regulados por dos centros imprintadores (12). El dominio 1 (telomérico), contiene los genes imprintados *IGF2* y *H19*, y la región diferencialmente metilada DMR1, postulada como un centro imprintador que regula la expresión recíproca de ambos genes. El gen *H19* codifica para un transcrito no traducido, que funciona como supresor tumoral (10) y el gen *IGF2* para un factor de crecimiento. Ambos genes compiten por un potenciador común que se localiza corriente abajo del gen *H19*. (10, 11)

El DMR1 funciona como un aislador y en el cromosoma materno no está metilado, de tal modo que se une a una proteína con dedos de zinc llamada CTCF que bloquea el acceso

del potenciador al promotor de *IGF2*. Así, la copia materna de *H19* se activa y se transcribe. La metilación de la copia paterna de DMR1 evita que se una CTCF y el promotor de *IGF2* puede interactuar con el potenciador, por lo que *H19* no se transcribe, (figura 2). (10,11)

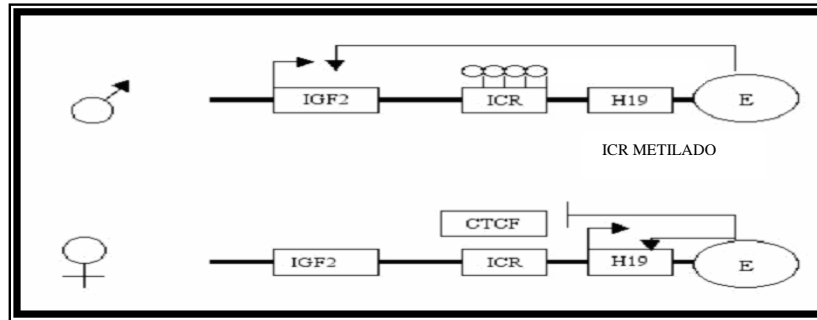


Figura 2. Metilación diferencial del dominio telomérico implicada en el silenciamiento de *H19* en el alelo heredado por vía paterna y del alelo materno de *IGF2*, lo que resulta en expresión de *H19* por vía materna y de *IGF2* en el alelo paterno. (Tomado de referencia 11)

La expresión del alelo materno de *IGF2*, que normalmente se encuentra inactivo (pérdida de impronta materna), ocurre en el 25 a 50% de los casos con SBW, principalmente en los casos esporádicos y con tumor de Wilms. Pocos casos están asociados con hipermetilación de *H19* y pérdida de la expresión materna. (10,11).

En el dominio 2 (centromérico), se encuentra *CDKN1C*, un gen que se expresa por vía materna y codifica para un inhibidor de CDK (p57), por lo que regula en forma negativa la proliferación celular. Mutaciones en este gen causan SBW y a menudo se asocian con la forma Autosómica Dominante del síndrome. (10,11).

También en este dominio se encuentra el gen *KVLQT1* cuyo producto forma parte de los canales de potasio y la pérdida de impronta en el mismo se relaciona con SBW (8, 9).

En el intrón 10 de *KVLQT1* se encuentra otro DMR llamado *KvDMR1* o DRM2. Aquí el alelo paterno no está metilado lo que permite la expresión de un transcrito largo llamado

KCNQ1OT1, también conocido como *LIT1*, que se transcribe en dirección antisentido a *KVLQT1*. La metilación materna de DMR2 promueve el silenciamiento de *KCNQ1OT1* (*LIT1*) y por lo tanto, la expresión de un número de genes maternalmente expresados incluyendo *KVLQT1* y *CDKN1C*. De acuerdo a esto, se ha descubierto que una delección en *KCNQ1OT1* (*LIT1*) y/o DMR2 cursa con una disminución en la expresión del mismo y la activación de *KVLQT1* y *CDKN1C*. Esto sugiere que el transcrito, regula la expresión de varios genes y, por lo tanto, junto con DMR2, pueden funcionar como reguladores de la impronta en el dominio 2 (figura 3). (13, 14, 16)

Consecuentemente, se ha descrito que en más de la mitad de los pacientes con SBW muestran expresión bialélica de *KCNQ1OT1* (*LIT1*), acompañado por la pérdida en la metilación del alelo materno de DMR2, convirtiéndose entonces en la alteración epigenética más común en SBW (10,11,24). La pérdida de la impronta en *KCNQ1OT1* (*LIT1*), involucra hipometilación y activación del alelo materno normalmente silenciado. Presumiblemente el blanco de esta pérdida de impronta en *KCNQ1OT1* (*LIT1*) es *CDKN1C*, como ya se había mencionado anteriormente, aunque no está claro de qué manera *LIT1* sirve como represor transcripcional de dicho gen o como un aislador que separa a éste de su potenciador. También se ha mencionado que la delección de la región diferencialmente metilada DMR2 lleva a la activación del alelo paterno de *CDKN1C* y *KVLQT1*, que son genes que forman parte del dominio 2. Similarmente una eliminación de las islas CpG de *KCNQ1OT1* (*LIT1*) lleva a la activación del alelo paterno de *KVLQT1* Y *CDKN1C*, (figura 3). (13,15)

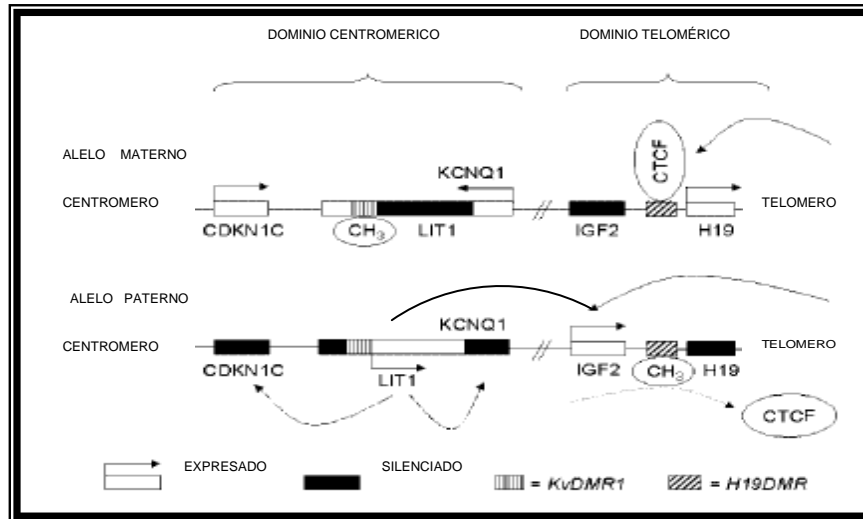


Figura 3. Expresión diferencial de IGF2, H19, CDKN1C (p57), KvLQT1 y LIT1. Tomado de referencia 41.

Algunos casos con SBW, con pérdida de la impronta en DMR2/KCNQ1OT1 (LIT1), también la presentan en IGF2, lo que apoya la posibilidad de interacciones regulatorias entre los dos dominios improntados. La pérdida de impronta en KCNQ1OT1 (LIT1) ha sido relacionada con la presencia del síndrome en gemelaridad monocigota (17). La desmetilación aislada del gen KCNQ1OT1 (LIT1) ha sido descrita en casos familiares con transmisión materna, también asociada con la presencia de tumores menos comunes o con una menor frecuencia que el tumor de Wilms, en pacientes con SBW (18,19).

También se ha relacionado a la etiología de este síndrome otro mecanismo de herencia no clásica conocido como disomía uniparental, que se presenta en el 10 a 15% de los casos y consiste en la presencia de ambos cromosomas homólogos heredados de un solo progenitor, generalmente del padre, así como otros rearrreglos cromosómicos que incluyen duplicaciones en el cromosoma 11 de origen paterno o translocaciones balanceadas heredadas por vía materna, que implican a la región 11p15.5, observados en 2% de los

casos (15, 20, 21). En la tabla 3, se resumen los mecanismos etiológicos descritos, y en la figura 4 se esquematizan.

TABLA 3. Mecanismos etiológicos en SBW y su frecuencia.

MECANISMO	FRECUENCIA
Anormalidades cromosómicas que involucren 11p15. translocaciones o inversiones heredadas maternalmente o duplicaciones heredadas paternalmente.	1-2% (ambos)
Isodisomía segmentaria paterna o disomía uniparental de 11p15	20% (esporádico)
Mutaciones en <i>CDKN1C</i>	40% (familiar)
LOI de <i>H19</i> o hipermetilación de <i>H19 DMR</i> , microdeleciones de <i>H19DMR</i>	5-10% (esporádico)
LOI de <i>LIT1</i> o hipometilación de <i>KvDMR1</i>	40-50% (ambos)
LOI de <i>IGF2</i>	20-30% (esporádico)
Desconocida	15-25%

Tomado de referencia 41.

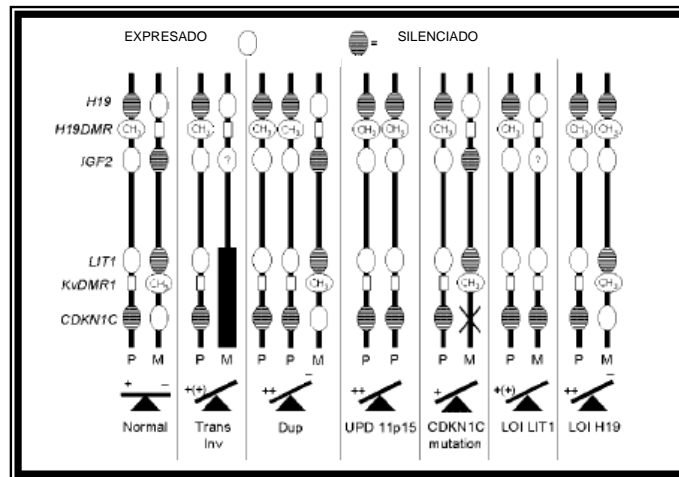


Figura 4. Representación esquemática de los principales mecanismos moleculares implicados en la etiología del Síndrome de Beckwith Wiedemann. Tomado de referencia 41.

Como se observa en la tabla 4, se han informado correlaciones genotipo-fenotipo en casos esporádicos, principalmente, donde se ha concluido que:

1. La pérdida de impronta en *IGF2*, ha sido relacionada con el sobrecrecimiento y la predisposición importante a tumores embrionarios (22, 23).
2. La hipermetilación de *H19*, ha sido asociada con la aparición de tumor de Wilms principalmente y en ocasiones con hepatoblastoma (24).
3. Las mutaciones en el gen *CDKN1C*, se relacionan con la presentación Autosómica Dominante del síndrome, así como con la presencia de onfalocele y/o paladar hendido. El neuroblastoma también se ha asociado con estas mutaciones (25, 26, 27).
4. La disomía uniparental paterna para 11p15, ha sido relacionada con hemihiperplasia aislada y tumor de Wilms (28).
5. La pérdida de impronta en *KCNQ1OT1 (LIT1)*, ha sido asociada con Hepatoblastoma, rabdiomiosarcoma, gonadoblastoma. (14, 15).
6. Existe mayor riesgo de desarrollar tumores, principalmente tumor de Wilms, cuando están involucrados los genes *IGF2*, *H19* o ambos (29).

TABLA 4. CORRELACIONES PREVIAS

CORRELACION GENOTIPO-FENOTIPO	
<i>IGF2</i>	Sobre-crecimiento y la predisposición importante a tumores embrionarios.
<i>H19</i>	Tumor de Wilms y hepatoblastoma.
<i>CDKN1C</i>	Herencia Autosómica Dominante, surcos en orejas, onfalocele y/o paladar hendido, neuroblastoma.
<i>DISOMÍA UNIPARENTAL</i>	Hemihiperplasia aislada y tumor de Wilms
<i>LIT1</i>	Hepatoblastoma, rabdiomiosarcoma, gonadoblastoma.
Alteración en DMR1	Mayor riesgo para desarrollar tumores, principalmente Tumor de Wilms

ANTECEDENTES

En nuestro país, no tenemos reportes recientes de estudios realizados en pacientes con SBW esporádico o de casos familiares. En esta familia, previamente se recabó la información clínica de 63 integrantes y se estudiaron las expresiones de *IGF2* y *H19* en los mismos, sin realizar una correlación genotipo-fenotipo. Los resultados mostraron expresión monoalélica para los dos genes en casos con SBW y controles familiares sin SBW.

Los individuos estudiados, no presentaron alteraciones cromosómicas numéricas, ni estructurales utilizando la técnica de bandeo GTG con un nivel de resolución de 550 bandas.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer es el término que se le da a una serie de padecimientos heterogéneos en su etiología, biología y evolución que tienen en común ser el resultado de la desregulación genética de los procesos celulares, por lo que los estudios moleculares son necesarios para tener más elementos diagnósticos, pronósticos y terapéuticos.

El cáncer en los niños tiene un comportamiento diferente que en los adultos, ya que en la mayoría de los adultos se relaciona con factores ambientales que promueven la alteración de los factores genéticos predisponentes. En cambio, en los niños, los factores genéticos son preponderantes y es bien conocida la coexistencia de neoplasias con malformaciones congénitas (síndromes genéticos). Además, en los niños, la velocidad de progresión tumoral es mayor y de esta forma los mecanismos moleculares de iniciación son diferentes con la edad, debido, entre otras cosas, a las características metabólicas de los tejidos en crecimiento rápido del periodo embrionario, fetal y post-natal temprano.

El tumor de Wilms es la neoplasia abdominal más frecuente en Pediatría y la mayoría de los casos se presentan antes de los 5 años de vida. Ocupa el cuarto lugar dentro de la Oncología pediátrica y más del 90% sobreviven después del diagnóstico, dependiendo del tipo histológico y estadio. En estudios más recientes se han propuesto diferentes riesgos para presentar tumor de Wilms en SBW, estos dependen de la etiología molecular, y se ha llegado a proponer hasta un 37%. (41)

En la práctica clínica, no todos los pacientes con este tipo de padecimiento tienen acceso a estudios moleculares, por lo que las conclusiones de una correlación genotipo-fenotipo, podrían orientar al clínico con respecto al mecanismo involucrado en el desarrollo del padecimiento y, por lo tanto, en el asesoramiento genético.

El diagnóstico temprano de SBW en el neonato, es necesario debido al riesgo incrementado para desarrollar tumor de Wilms principalmente. El conocimiento de los genes involucrados es importante para diferenciar entre pacientes con alto y bajo riesgo

para desarrollar este tumor u otras neoplasias asociadas al síndrome. Esto nos permitirá realizar tratamiento oportuno, vigilancia adecuada, mejor pronóstico, de acuerdo a los lineamientos establecidos en este sentido. (4)

Los casos familiares con SBW no son frecuentes, por lo que es conveniente reportar esta familia mexicana con una correlación entre su mecanismo etiológico y el fenotipo de sus integrantes, situación que clínicamente es relevante ya que la gran mayoría de las correlaciones reportadas han sido realizadas en casos esporádicos.

IGF2, *CDKN1C* y *LIT1* son los genes involucrados con mayor frecuencia en la etiología de este síndrome, con un papel importante en la aparición de tumores embrionarios, y que han sido ampliamente estudiados en correlaciones previas reportadas internacionalmente, ya sea para casos familiares o para los esporádicos, por eso, decidimos iniciar el abordaje de este estudio familiar, con el análisis de la expresión de estos genes.

¿Existe correlación entre el tipo de expresión de los genes *IGF2*, *CDKN1C* y *LIT1*, con el fenotipo observado en los integrantes de una familia nuclear mexicana con SBW?

Los resultados de este trabajo serán correlacionados con lo descrito para la población caucásica, con el objeto de conocer el comportamiento clínico y molecular del SBW en nuestra población.

HIPÓTESIS

Existe correlación entre el fenotipo y la expresión de los genes IGF2, CDKN1C Y LIT1, en los individuos de una familia afectados con síndrome de Beckwith Wiedemann

HIPÓTESIS NULA

No existe correlación entre la expresión génica y los defectos fenotipos que se observan en los individuos de una familia con síndrome de Beckwith-Wiedemann

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar si existe una correlación entre el fenotipo y la expresión de los genes *IGF2*, *CDKN1C* y *LIT1*, en los miembros de una familia afectados con SBW.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- ❖ Determinar el sexo más afectado
- ❖ Determinar la proporción de afectados en esta familia
- ❖ Determinar los hallazgos clínicos más frecuentes relacionados con el síndrome
- ❖ Determinar el tipo de tumor más frecuente
- ❖ Identificar alteraciones en la expresión del gen *IGF2*
- ❖ Identificar las alteraciones en la expresión del gen *CDKN1C*
- ❖ Identificar las alteraciones en la expresión del gen *LIT1*
- ❖ Establecer una correlación entre las alteraciones del genotipo y los hallazgos fenotípicos.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

I. A través de la consulta externa del Departamento clínico de Genética Médica del Hospital de Pediatría en CMN siglo XXI, se tuvo el primer contacto con el caso índice y a partir de éste se analizó la familia nuclear (padres y hermanos). Posteriormente, se estudió a la familia *in extenso* (parientes de primero, segundo y hasta tercer grado con datos clínicos compatibles con SBW). Se realizó historia clínica completa, incluyendo a individuos de ambos sexos y edades diferentes, todos de nacionalidad mexicana. La familia en estudio consta de 6 generaciones integrada por 94 individuos vivos, originaria de San Cristóbal de las Casas, Chiapas (figura 5). A partir de la cuarta generación se estudiaron a tres familias nucleares con rasgos fenotípicos de SBW. Estas familias están constituidas por la de la abuela del caso índice y las de los dos hermanos de la misma, incluyendo a los respectivos cónyuges, hijos y nietos, reduciendo el grupo de estudio a un total de 63 individuos quienes fueron sometidos a entrevistas clínicas, análisis antropométricos y tomas de muestra sanguínea, previo consentimiento informado por escrito.

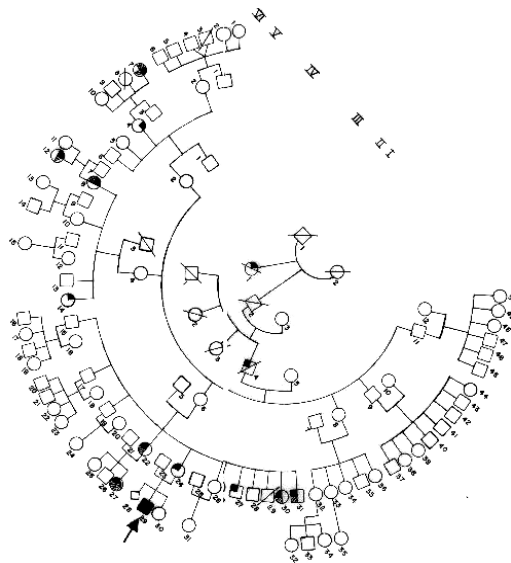


Figura 5. Árbol genealógico de la familia completa.

El estudio fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, (protocolo de investigación aprobado y registrado con el número 2002/718/035).

En cuanto a la exploración física, se buscó intencionadamente las características fenotípicas propias del síndrome y las de los diagnósticos diferenciales. Así mismo, se realizaron diversas medidas antropométricas relevantes para el mismo (30).

En este estudio, solo se realizó el análisis de la expresión de los genes *IGF2*, *CDKN1C* y *LIT1*, en la familia nuclear del caso índice.

Para el análisis estadístico de los resultados, se propuso el coeficiente de correlación Phi, con el objeto de encontrar una significancia estadística en la relación entre el fenotipo y el genotipo analizados.

Métodos

Análisis molecular de la expresión de los genes

Extracción de RNA y RT-PCR

Se extrajo RNA de una muestra de sangre periférica del caso índice, así como de sangre periférica del resto de la familia nuclear que aceptó participar en el estudio, por el método de Chomczynski (31) utilizando TRIZOL (Invitrogen, EUA).

El cDNA se obtuvo a través de la reacción de RT-PCR utilizando el equipo "1st strand cDNA synthesis" (Roche, USA). Se empleó 1 µ de RNA total con oligo dT a 25°C durante 10 minutos, 42°C 60 minutos y 99°C por 5 minutos. Para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada uno de los genes seleccionados, se utilizaron los siguientes iniciadores diseñados para este estudio, ver Tabla 5. (31)

TABLA 5. OLIGONUCLEÓTIDOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

IGF2-F	GAA ACA ATT GGC AAA ATA AAG	IGF2-R	CCA GTT TAC CCT GAA AAT TCC
CDKN1C-1F	GCC CTC TCC TCC TCT CCT TT	CDKN1C-1R	CAG CTC CTC GTG GTC CAC
LIT1-F	AAG AAA GTG TTG AGT GGT AA	LIT1-R	GAT GAT CTG AAA ATG GAA AAAA

La reacción de PCR se realizó con un programa de desnaturalización inicial a 94°C, por 10 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, a 63°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos, con una extensión final a 72°C por 10 minutos.

RESULTADOS.

1. Valoración clínica de los individuos.

En la generación I y II se describen antecedentes de macroglosia, sin ser corroborados por fallecimiento. A continuación se describen las tres familias estudiadas (figuras 6, 7, 8).

FAMILIA 1.

La primera familia está encabezada por IV:2 de 52 años de edad, quien es clínicamente sana y madre de tres mujeres y un varón. V.4 de 28 años, únicamente presentó macroglosia. VI.7 de 8 años de edad, con hélix doblado, alteraciones dentales, macroglosia, macrosomía y alteraciones de la pared abdominal;

VI.8 quien falleció al nacer, tuvo cardiomegalia, macroglosia y alteraciones de la pared abdominal.

El resto de los integrantes de esta familia no presentaron datos clínicos relevantes de SBW.

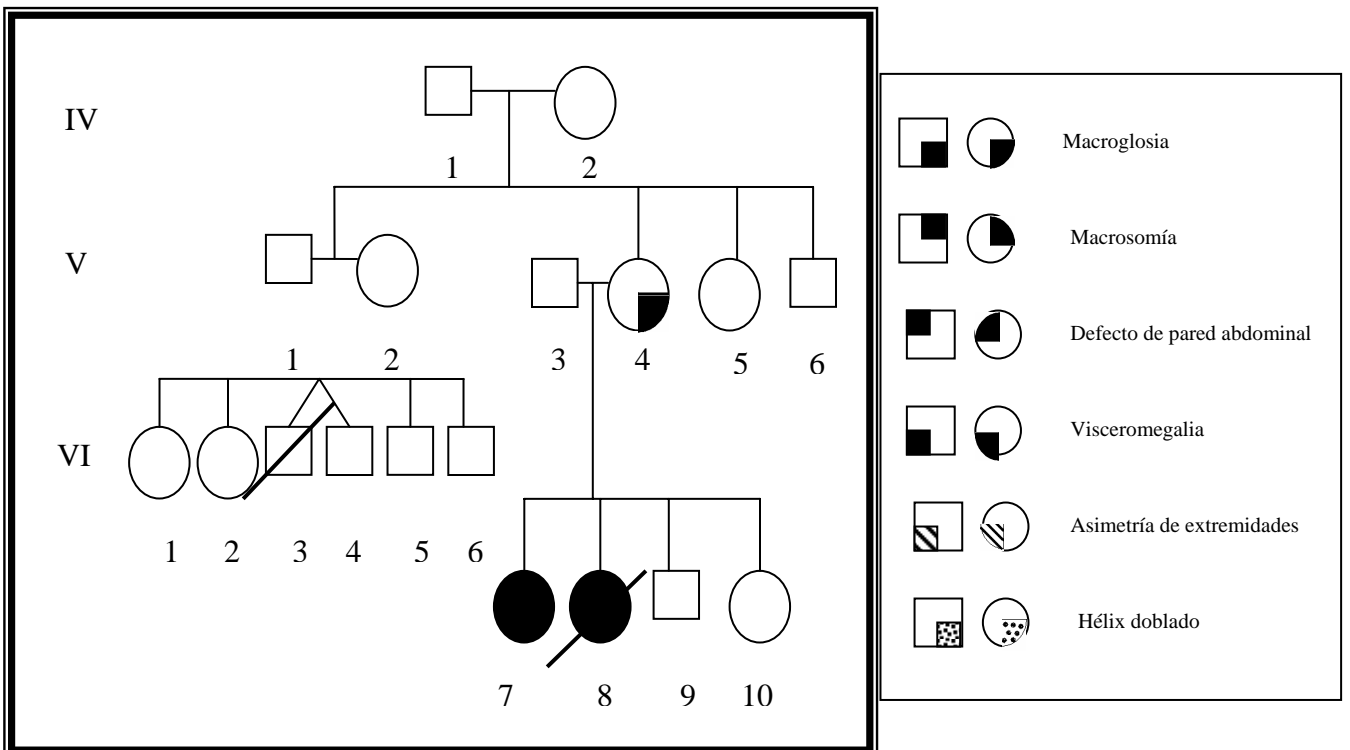


Figura 6. ARBOL GENEALÓGICO DE LA FAMILIA 1

FAMILIA 2.

IV.4 de 48 años de edad sólo presentó el hélix doblado en pabellones auriculares, tiene 5 hijos, 4 mujeres y un varón. V.8 de 31 años con macroglosia y macrosomía, la cual tiene dos hijas, una de ellas con 5 años de edad, VI.12, presentó cardiomegalia, macroglosia y alteraciones de la pared abdominal. V.14 de 17 años, sólo macroglosia.

El resto son clínicamente sanos.

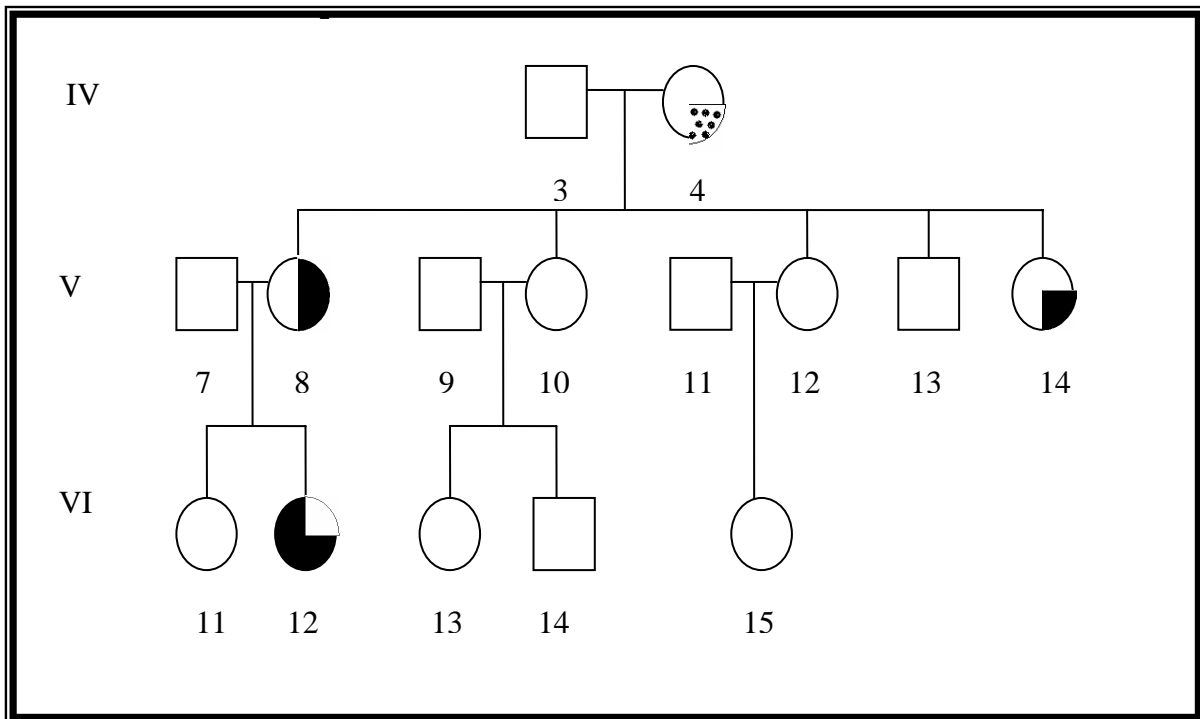


Figura 7. ARBOL GENEALÓGICO DE LA FAMILIA 2

FAMILIA 3.

IV.6, de 47 años de edad, tuvo cuatro hijas y siete hijos (uno de ellos falleció a los 10 años de edad (V-29)).

La hija V.22, de 26 años de edad, macroglosia y macrosomía; ella tiene dos hijas y un hijo. La hija VI.27, con menos de un año de edad, tiene visceromegalia, macroglosia, macrosomía, alteraciones abdominales y surco profundo entre trago y antitrago.

La señora V.24 de 25 años de edad, tiene macroglosia. Ella tuvo un aborto, una hija sana y un hijo VI.29 (caso índice o **propositus**) con criptorquidia derecha, macroglosia, microcefalia, nefromegalia y hepatomegalia, hernia umbilical, hipoglucemia, surcos en pabellones auriculares y hemangioma capilar. Presentó tumor de Wilms que ameritó nefrectomía izquierda y quimioterapia posterior.

El individuo V.26 tiene el hélix doblado en ambos pabellones auriculares como única manifestación clínica.

El hijo V.27 tiene macroglosia y asimetría de extremidades, no tiene hijos.

Los individuos V.30 y V.31 tienen 9 y 7 años de edad respectivamente y presentan macroglosia, macrosomía, y asimetría de extremidades. El primero tiene además, alteraciones dentales.

Los integrantes del resto de la familia no presentaron rasgos fenotípicos característicos del síndrome.

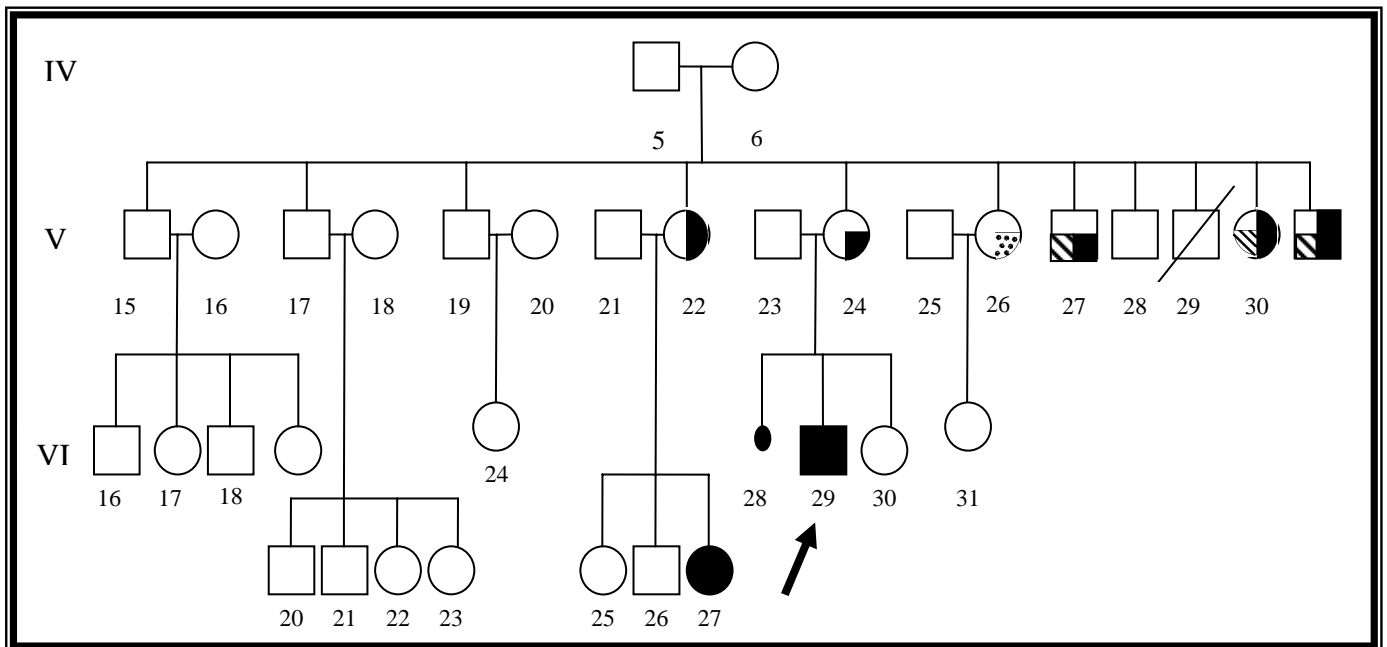


Figura 8. ARBOL GENEALÓGICO DE LA FAMILIA 3. Los individuos V23, V24, VI29 y VI30 conforman la familia a quien se estudio la expresión de los genes IGF2, CDKN1C y LIT1.

La expresividad variable del síndrome permitió la creación de tres grupos: el primero basado en los criterios diagnósticos de Elliot, el segundo de acuerdo a los criterios de DeBaun y en el tercero se incluyeron a los pacientes con un solo rasgo fenotípico. Tres de los pacientes cumplieron los criterios del primer grupo, cinco fueron agrupados de acuerdo a los criterios del segundo y cuatro tuvieron macroglosia únicamente.

En general, son doce los individuos con el fenotipo de SBW, la macroglosia está presente en todos, la macrosomía en siete individuos, defectos en la pared abdominal (onfalocele, hernia umbilical) en cuatro individuos, hemihipertrofia en tres de ellos, dos con surcos en el lóbulo de las orejas y dos con visceromegalias, hipoglucemia y tumor de Wilms solo en uno (Tabla 6, 7).

TABLA 6.

FENOTIPO	NUMERO	PORCENTAJE
Macroglosia	12	100
Macrosomía	7	58
Defectos de pared	4	33
Hemihiperplasia	3	25
Surcos en orejas	3	25
Visceromegalia	3	25
Hipoglucemia	1	8
Tumor de Wilms	1	8
n	12	100

2. RT-PCR de los genes:

Análisis molecular de IGF2

IGF2 se encuentra con expresión monoalélica.

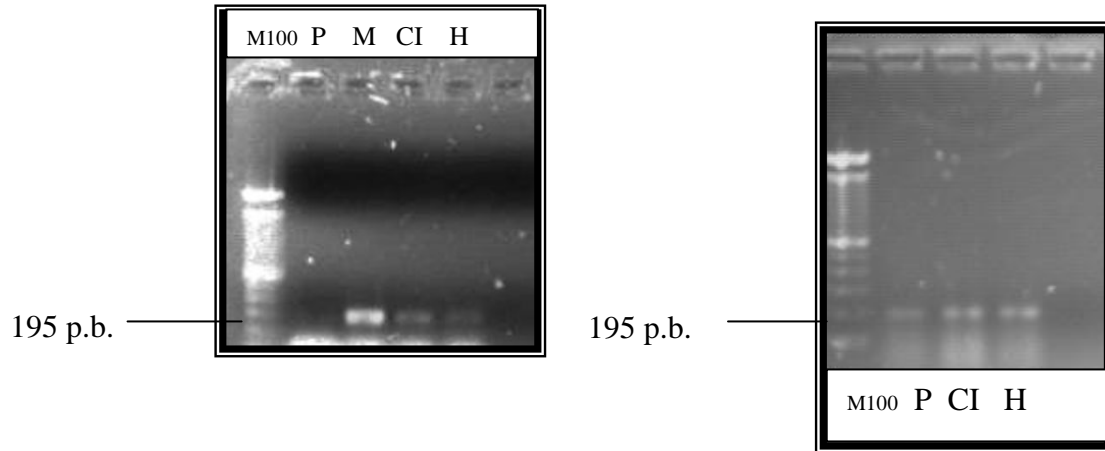


Figura 9. Corrimiento electroforético de los productos RT-PCR de IGF2 en muestras analizadas. M100= marcador de peso, P= Padre, M= madre, Hna= hermana, CI= caso índice. El fragmento esperado es de 195 p.b.

Análisis molecular de CDKN1C

Se encuentra expresado monoalélicamente.

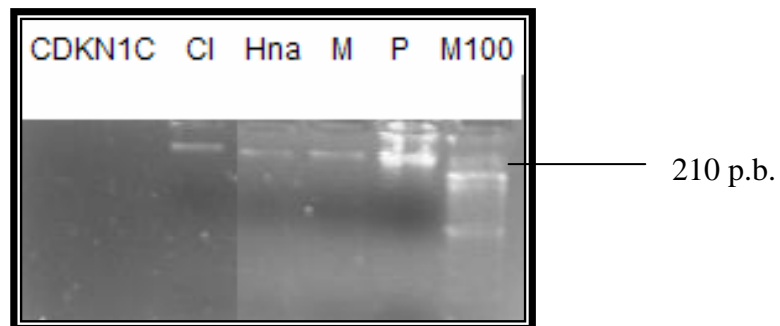


Figura 10. Corrimiento electroforético de los productos RT-PCR de CDKN1C en muestras analizadas. M100= marcador de peso, P= Padre, M= madre, Hna= hermana, CI= caso índice. El fragmento esperado es de 210 p.b.

Análisis molecular de LIT1

Se encuentra expresado monoalélicamente.

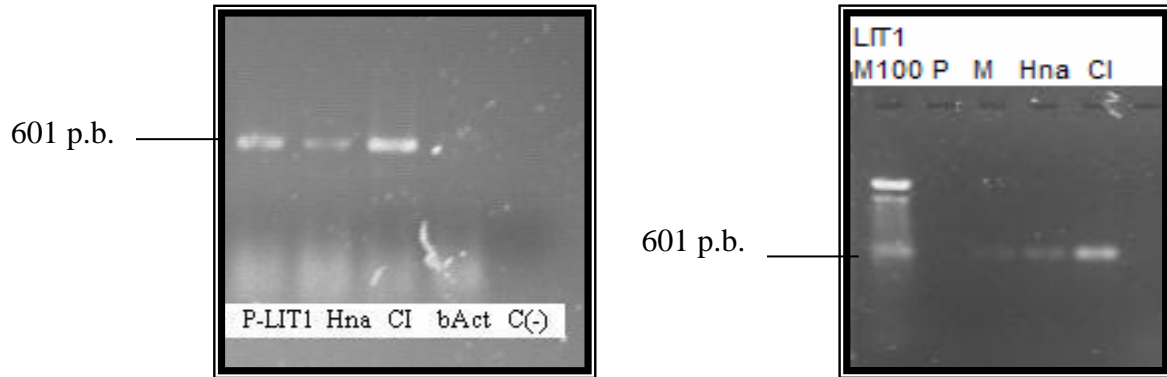


Figura 11. Corrimiento electroforético de los productos RT-PCR de LIT1 en muestras analizadas. M100= marcador de peso, P= Padre, M= madre, Hna= hermana, CI= caso índice. El fragmento esperado es de 601 p.b.

Análisis molecular de β actina

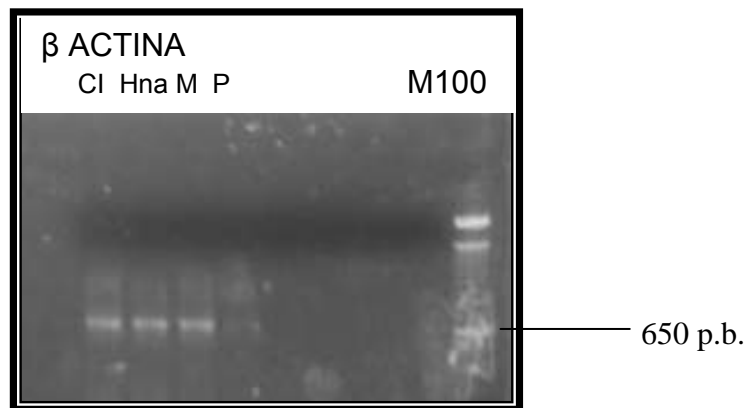


TABLA 7. Fenotipo presente en las familias estudiadas con SBW. El caso 7 es la madre del caso índice, y el caso 12, el caso índice.

FENOTIPO SBW	FAMILIAS												TOTAL	
	1		2			3							n=12	%
	CASO 1	CASO 2	CASO 3	CASO 4	CASO 5	CASO 6	CASO 7	CASO 8	CASO 9	CASO 10	CASO 11	CASO 12		
	V-4	VI-7	V-8	V-14	VI-12	V-22	V-24	V-27	V-30	V-31	VI-27	VI-29		
GÉNERO	F	F	F	F	F	F	F	M	F	M	F	M		
MACROGLOSIA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
MACROSOMIA		+	+			+			+	+	+	+	7	58
DEFECTOS PARED ABDOMINAL		+			+						+	+	4	33
HEMIHIPERTROFIA								+	+	+			3	25
SURCOS EN OREJAS		+									+	+	3	25
VISCEROMEGALIA					+						+	+	3	25
HIPOGLUCEMIA												+	1	8
HEMANGIOMA CAPILAR												+	1	8
TUMOR DE WILMS												+	1	8
CRIPTORQUIDIA												+	1	8
<i>IGF2</i> expresión monoalélica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
<i>H19</i> expresión monoalélica	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	12	100
<i>CDKN1C</i> expresión monoalélica								+				+	2	17
<i>LIT1</i> expresión monoalélica							+					+	2	17

DISCUSIÓN.

En 12 miembros de esta familia se encontraron características fenotípicas de SBW, predominando la macroglosia, la macrosomía y defectos de la pared abdominal como ha sido reportado en la literatura internacional, si embargo, el fenotipo se vuelve menos distintivo conforme se incrementa la edad. La discrepancia en el fenotipo es consistente entre los pacientes estudiados (Tabla 7). (32)

Por otra parte, se identificó sólo un caso con tumor de Wilms que representa el 8% del total de afectados.

La incidencia de anomalías entre los casos estudiados es muy similar a la reportada en la literatura internacional. Se ha propuesto recientemente una mezcla de diferentes modelos de herencia (33), sin embargo en este caso familiar se cumplen las características de una transmisión Autosómica Dominante, la cual ha sido descrita ampliamente para este síndrome. Particularmente, en esta familia, la transmisión materna es predominante. (32, 33)

Se han reportado anormalidades fenotípicas como factores predictivos para tumores embrionarios, estos son: visceromegalias, historia familiar, macrosomía al nacimiento y en menor grado los defectos de pared abdominal; en este sentido, solo el antecedente familiar y la macrosomía son destacables por su frecuencia en este familia. (35)

Se han informado pocos casos familiares del SBW, en los cuales, el antecedente familiar no es considerado como un criterio clínico relevante para la integración del diagnóstico de certeza (15, 25). Esta familia tiene varios integrantes con expresión mínima del fenotipo, pero la presencia de otros familiares afectados sin duda nos orienta al diagnóstico clínico del mismo. Por lo tanto consideramos que el antecedente de otro familiar afectado en un paciente con expresión fenotípica mínima para SBW debe ser considerado como un criterio mayor como lo es para otras entidades genéticas, tales como Neurofibromatosis o Marfan.

De acuerdo a los resultados moleculares obtenidos consideramos que la expresión de IGF2 es normal (monoalélica), así también la de LIT1 y CDKN1C, por lo que alteraciones a nivel de impronta en estos genes se descartan como factores etiológicos de SBW en esta familia en particular. Esto también es apoyado con los resultados de los estudios moleculares y citogenéticos realizados previamente.

Como objetivo principal de este trabajo, se planteó la necesidad de realizar una correlación fenotipo-genotipo, sin embargo al no encontrar alteraciones en la expresión de los genes estudiados no podemos establecer tal correlación ni una causa específica por el momento.

Al no encontrar evidencia de los cambios epigenéticos más frecuentes, postulamos que sea una mutación puntal en CDKN1C la causa de SBW, como ha sido descrito en otros casos familiares. (10, 15, 25, 26, 27, 34)

Se han descritos múltiples mutaciones puntuales que afectan de diferentes formas a *CDKN1C*, recientemente algunas heredadas maternalmente, como es el cambio de G por T en un tracto de poliG en el extremo 5' del intrón 3, lo que afecta el corte y empalme. (36) También *CDKN1C* puede ser reprimido por múltiples mecanismos incluyendo algunos que no involucran la metilación de su promotor. En SBW, los pacientes con una metilación normal en KvDMR1 y reducida expresión de *CDKN1C*, pueden presentar cambios epigenéticos a nivel de cromatina y otros descritos recientemente (37, 38, 39). Por otro lado, se ha propuesto al gen *ZAC*, como un regulador de la expresión de *CDKN1C*, a través de LIT1. mutaciones en este gen se han asociado con DM y alteraciones del crecimiento particularmente SBW. (40)

CONCLUSIONES

1. No existe correlación entre el genotipo estudiado y el fenotipo de los miembros afectados de esta familia.
2. El género más afectado es el femenino.
3. El 19% de los individuos estudiados tiene SBW, (12 casos).
4. Predominan la macroglosia, macrosomía y defectos de pared abdominal.
5. Únicamente se presentó un caso con tumor de Wilms.
6. La expresión de IGF2, CDKN1C y LIT1 es monoalélica, de acuerdo al patrón normal de expresión conocido para estos genes.
7. Se confirma la expresividad variable y modelo de herencia Autosómico Dominante así como la característica transmisión materna del síndrome.

PERSPECTIVA

Es probable que en la etiología del SBW, de este caso, este involucrada una o más mutaciones puntuales en CDKN1C, como esta reportado para los casos familiares, por lo que proponemos se realice, en un estudio posterior, la secuenciación completa del gen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Martínez y Martínez R. Clinical features in the Wiedemann Beckwith síndrome. Clin Genet 1996;50:272-274.
2. Elliott M, Bayly R, Cole T. Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. Clin Genet 1994; 46:168-74.
3. DeBaun MR, Tcker MA. Risk of cancer during the first four years of life in children from the Beckwith Wiedeman syndrome registry. J Pediatric 1998; 132: 398-400.
4. Badía P, Casanelles M, Navarro A. Guía clínica para el seguimiento de pacientes con síndrome de Beckwith Wiedemann. An Pediatr (Barc) 2006; 64: 252- 259.
5. Weksberg R, Squire JA. Molecular Biology of Beckwith Wiedemann syndrome. Med Pediat Oncol 1996;27:462-469.
6. Marcus Vinicius de MG, Silveira RE. Beckwith Wiedemann syndrome and isolated hemyhyperplasia. Sao Paulo Med J 2003; 121:133-138.
7. Yong HJ, Bressler J, Beaudet A. Epigenetics and Human Disease. Annu Rev Genomics Hum Genet 2004; 5:479-510.
8. Egger G, Liang G, Aparicio A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature 2004; 429: 457- 463.
9. Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. Semin Cell Dev Biol. 2003; 14:101-110.
10. Weksberg R, Smith A, Squire J. Beckwith–Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. Hum Mol Genet 2003; 12: R61–R68.

11. Madeline Li, Squire JA, Weksberg R. Molecular Genetics of Wiedemann-Beckwith Syndrome. *Am J Med Genet* 1998; 79:253–259.
12. Feinberg A. The two-domain hypothesis in Beckwith-Wiedemann syndrome. *The Journal of Clinical Investigation* 2000; 106: 739- 740.
13. Du M, Zhou W, Beatty L, Weksberg R, Zadowski M. The *KCNQ1OT1* (*LIT1*) promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5. *Genomics* 2004; 84: 288–300.
14. Horike S, Mitsuya K, Meguro M. Target disruption of the human *LIT1* locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2075-2083.
15. Cooper W, Luharia A, Evans G. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 2005; 13:1025–1032.
16. Niemitz EL, DeBaun MR, Fallon J. Microdeletion of *LIT1* in Familial Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Am J Hum Genet* 2004; 75:844–849.
17. Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O. Discordant *KCNQ1OT1* (*LIT1*) imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet*. 2002;11:1317-1325
18. Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O. Tumor development in the Beckwith–Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of *KCNQ1OT1* (*LIT1*). *Hum Mol Genet*. 2001; 10:2989-3000.
19. Blik J, Maas SM, Ruijter JM. Increased tumour risk for SBW patients correlates with aberrant *H19* and not *KCNQ1OT1* (*LIT1*) methylation: occurrence of *KCNQ1OT1* (*LIT1*) hypomethylation in familial cases of SBW. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:467-476.

20. Dutly F, Baumer A, Kayserili H. Seven Cases of Wiedemann-Beckwith Syndrome, Including the First Reported Case of Mosaic Paternal Isodisomy Along the Whole Chromosome 11. *Am J Med Genet* 1998; 79:347–353.
21. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet* 2000;38:497–507
22. Murrell A, Heeson S, Cooper W. An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 247-255.
23. Weksberg R, Shen DR, Fei YL. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature Genetics* 1993; 5: 143 – 150
24. Engel JR, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 2000; 37:921–926.
25. Wayne W, Hatada I, Ohishi S, Mukai T. Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (SBW) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 1999;36:518–523
26. Hatada I, Nabetani A, Morisaki H. New p57KIP2 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Genet.* 1997; 100:681-683.
27. Li M, Squire J, Shuman C. Imprinting Status of 11p15 Genes in Beckwith-Wiedemann Syndrome Patients with CDKN1C Mutations. *Genomics* 2001;74:370-376.
28. Shuman C, Steele L, Fei YL, Weksberg R. Paternal uniparental disomy of 11p15 is associated with isolated hemihyperplasia and expands Beckwith-Wiedemann syndrome spectrum. *Am J Hum Genet.* 2002; 71:477-485

29. Bliok J, Gicquel C, Maas S. Epigenotyping as a tool for the prediction of tumor risk and tumor type in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Pediatr* 2004; 145:796-799.
30. Moore E, Ward R, Escobar L. Heterogeneity in Wiedemann-Beckwith Syndrome: Anthropometric Evidence. *Am J Med Genet.*2000;90:283–290
31. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
32. Niikawa N, Ishikiriyama S, Takahashi S. The Wiedemann-Beckwith syndrome: Pedigree studies on five families with evidence for autosomal dominant inheritance with variable expressivity. *Am J Med Genet.* 1986; 24(1):41-55
33. Wangler MF, An P, Feinberg AP, Province M, Debaun MR. Inheritance pattern of Beckwith-Wiedemann syndrome is heterogeneous in 291 families with an affected proband. *Am J Med Genet A.* 2005 Aug 15;137(1):16-21.
34. Algar E, Brickell S, Deeble G. Analysis of *CDKN1C* in Beckwith Wiedemann Syndrome. *Human Mutation.* 2000; 15: 497-508.
35. Schneid H, Vazquez M, Vacher C. The Beckwith-Wiedemann Syndrome Phenotype and the Risk of Cancer. *Medical and Pediatric Oncology* 1997; 28:411–415.
36. Lew J, Fei Y, Aleck K, Blencowe B, Weksberg R. *CDKN1C* mutation in Wiedemann-Beckwith syndrome patients reduces RNA splicing efficiency and identifies a splicing enhancer. *Am J Med Genet A.* 2004 Jun 15; 127(3):268-76.
37. Diaz-Meyer N, Yang Y, Sait SN, Maher ER, Higgins MJ. Alternative mechanisms associated with silencing of *CDKN1C* in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet.* 2005; 42: 648-55.

38. John R, Ainscough J, Barton S. Distant cis-elements regulate imprinted expression of the mouse *p57kip2* (*Cdkn1c*) gene: implications for the human disorder, Beckwith Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1601-1609.
39. Higashimoto K, Soejima H, Saito T. Imprinting disruption of the CDKN1C/KCNQ10T1 domain: the molecular mechanisms causing Beckwith Wiedemann syndrome and cancer. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 306-312.
40. Arima T, Kamikihara T, Hayashida T. ZAC, LIT1 (KCNQ10T1) and p57KIP2 (CDKN1C) are in an imprinted gene network that may play a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nucleic Acids Research* 2005; 33: 2650- 2660.
41. Rump P, Zeegers MP, van Essen AJ. Tumor risk in Beckwith-Wiedemann syndrome: A review and meta-analysis. *Am J Med Genet A*. 2005 1; 136(1):95-104.