



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
Servicio de Genética

**“ ESTUDIO DE IMPRONTA GENÓMICA:
ANÁLISIS DE PATRONES DE
METILACIÓN ALELO ESPECÍFICA DE LA
REGIÓN 15q11-q13 EN LOS SÍNDROMES DE
PRADER-WILLI/ ANGELMAN ”**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA

P R E S E N T A :

AZUCENA SÁNCHEZ ORTEGA

TUTOR: D. EN C. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCIA



MÉXICO, DISTRITO FEDERAL

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

- Al departamento de Genética del Hospital General de México por las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.
- A mi tutora la Dra. Gloria Queipo por todo su apoyo, dedicación, entusiasmo y orientación en la realización de este proyecto.
- A la Dra. Susana Kofman por haberme dado su apoyo y la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.
- A ti Eli, por tu ayuda incondicional.
- A todo el equipo de Diferenciación Sexual.
- Este proyecto de tesis se realizó bajo el financiamiento:
 1. UNAM, como parte del MEGAPROYECTO. “Nuevas estrategias epidemiológicas y Genómicas de la salud” con No. SDELPTID 051.
 2. CONACYT 45209.
 3. PAPIIT IN225706-3.
 4. DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN.

DEDICATORIA

“ Con la buena educación es el hombre una criatura mansa y divina; pero sin ella es el más feroz de los animales. La educación y la enseñanza mejoran a los buenos y hacen buenos a los malos “

- Hasta siempre hijitos, los amo.

“ Hay un pasado que se fue para siempre, pero hay un futuro que todavía es nuestro”

- A mi mejor amigo y amor de mi vida, Jaime.

“ La familia bien consolidada es como un diamante indestructible”

- No sé como pagarte todo tu esfuerzo y ayuda. Te amo mamita.

“ Un buen maestro sólo puede enseñar los caminos al éxito”

- Gracias por su apoyo incondicional, Mamá Eli y Papá Fachito.

CONTENIDO

1. Antecedentes	
1.1. Antecedentes Históricos	1
1.2. Aspectos Clínicos de los síndromes de Prader-Willi/Angelman	2
1.2.1. Incidencia	2
1.2.2. Historia Natural	3
1.2.3. Aspectos psicológicos	5
1.2.4. Criterios diagnósticos	7
1.2.5. Etiología	9
1.2.5.1. Deleciones	11
1.2.5.2. Disomía Uniparental	12
1.2.5.3. Defectos de la impronta	12
1.2.6. Biología Molecular	13
1.2.7. Correlación Fenotipo-Genotipo	14
1.2.8. Impronta Genómica	16
1.2.9. Pruebas diagnósticas	20
1.2.9.1. Cariotipo de alta resolución	20
1.2.9.2. Hibridación de fluorescencia <i>in situ</i> (FISH)	20
1.2.9.3. Genescan para detección de UPD	21
1.2.9.4. PCR metilación específica (MS-PCR)	21
1.2.10 Diagnóstico diferencial	23
1.2.11. Tratamiento	24
1.2.12. Asesoramiento genético	25

2. Planteamiento del problema y justificación	26
3. Hipótesis	27
4. Objetivos	28
Objetivo general	
Objetivos secundarios	
5. Sujetos y métodos	29
5.1. Criterios de inclusión	
5.2. Análisis citogenético con bandas GTG	31
5.3. Análisis por Hibridación <i>in situ</i> (FISH)	31
5.4. Extracción de ADN	34
5.4.1. Análisis espectrofotométrico, para cuantificación de ADN	35
5.4.2. Técnica de electroforesis	36
5.5. PCR metilación específica (MS-PCR)	37
6. Resultados	41
7. Discusión	49
8. Referencias	52

1.- ANTECEDENTES

1.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Para aquéllos que les guste el arte, en el museo del Prado, existe una pintura de Juan Carreño de Miranda que fue pintada en 1680. Es una niña de 6 años, que pesaba 120 lb (54.4 kg) tenía manos y pies pequeños y boca triangular. Éste, pintaba para el rey Carlos II, todas las cosas que eran anormales y entre una de éstas pintó ésta a la que llamó “la monstrua”, se cree que esta niña probablemente tenía síndrome de Prader-Willi (PWS). En 1956, Labbart y Willi describieron en Suiza un síndrome caracterizado por: obesidad, talla baja y acromicria que generalmente estaba precedido por hipotonía infantil, en niños y jóvenes se observó hipoplasia de escroto y testículos criptorquídicos retenidos en la región inguinal o abdominal. Como antecedente se describió llanto débil, dificultad para la succión y retraso psicomotor, a estas manifestaciones clínicas se aunó la aparición de diabetes mellitus juvenil. En 1961 estos autores conjuntamente con Falcon presentaron formalmente el PWS en el 8vo. Congreso Internacional de Pediatría. En 1981, el doctor David Ledbetter y colegas, reportaron un descubrimiento decisivo; algunos pacientes (75%) con datos clínicos compatibles con PWS presentaban una deleción en la región proximal del brazo corto del cromosoma 15 paterno.

El síndrome de Angelman (AS) fue descrito en 1965 por Harry Angelman, quien reportó los hallazgos clínicos en tres niños con incapacidad para el aprendizaje, ataxia, movimientos espasmódicos, alteraciones en el área del lenguaje y risa fácilmente provocada, éstos presentaron crisis epilépticas con un patrón electroencefalográfico característico y una facies dismórfica sutil. Esta condición originalmente fue reconocida como síndrome de la “marioneta feliz. En 1987 Magenis y cols, identificaron una deleción del cromosoma en la misma región que el PWS (15q11-q13), sin embargo, en estos casos la deleción era de origen materno.



La Monstrua, 1680
Museo Nacional del Prado
Madrid, España

1.2. ASPECTOS CLÍNICOS DE LOS SÍNDROME DE PRADER-WILLI/ ANGELMAN

1.2.1. INCIDENCIA

Estudios epidemiológicos de individuos con PWS indican una incidencia de aproximadamente 1 en 25,000 (Burd L y cols., 1990; Akelfeldt y cols., 1991; Whittington JE y cols., 2001; Butler y cols., 2002; Smith A y cols., 2003). Es probable que estos valores se encuentren subestimados, ya que muchos pacientes no son diagnosticados en edades tempranas. Se estima que la incidencia real sea de aproximadamente 1/10,000 a 1/15,000, con una prevalencia de 350,000 a 400,000 a nivel mundial, ocurriendo en ambos sexos y en todos los grupos étnicos.

El PWS es considerado como el síndrome genético más común que lleva a la obesidad.

Hay una relación bien documentada de la morbi-mortalidad y la presencia de complicaciones relacionadas con la obesidad en los pacientes con PWS. Las complicaciones más graves incluyen, insuficiencia cardiorrespiratoria, diabetes mellitus y apnea obstructiva del sueño. Recientemente se reportó que el índice de mortalidad en el PWS es del 3% (Butler JV y cols., 2002; Schrandt-Stumpel y cols., 2004; Stevenson DA y cols., 2004). Por otro lado la incidencia para AS ha sido estimada entre 1/10,000 a 1/40,000, afectando hombres y mujeres por igual (Petersen MB y cols., 1995; Buckley RH y cols., 1998).

1.2.2. HISTORIA NATURAL

SÍNDROME DE PRADER-WILLI

Las características cardinales del PWS incluyen, hipotonía neonatal, dificultades para la alimentación, hipogonadismo hipogonadotrópico, hiperfagia y obesidad en la infancia temprana. El PWS puede ser dividido en dos estadios Tabla 1 (Butler, y cols., 2005).

Estadio 1		Estadio 2	
PRENATAL	NEONATAL E INFANCIA	NIÑEZ TEMPRANA	ADOLESCENCIA Y ADULTOS
■ Hipomotilidad fetal	■ Hipotonía	■ Talla baja	■ Talla baja
■ Presentaciones pélvicas	■ Frontal estrecho	■ Manos y pies pequeños	■ Manos y pies pequeños
	■ Criptorquidia	■ Piel, cabello y ojos claros	■ Escoliosis
	■ Hipogonadismo	■ Ojos almendrados	■ Osteoporosis
	■ Problemas de alimentación	■ Estrabismo	■ Retraso de la pubertad
	■ Pobre succión	■ Miopía	■ Diabetes Mellitus
	■ Saliva espesa	■ Hiperfagia	■ Depresión
	■ Llanto débil	■ Obesidad	■ Somnolencia
	■ Inestabilidad de la temperatura	■ Alteraciones del comportamiento	

Tabla 1: Características clínicas del Síndrome de Prader-Willi

HIPOTONÍA

El PWS se caracteriza por hipotonía severa y dificultades para la alimentación en la infancia temprana. La hipotonía infantil es un hallazgo casi universal y es de origen central, ésta mejora con el tiempo, aunque se ha visto que los adultos son levemente hipotónicos. Un estudio reportó, que en un grupo de niños RN hasta los 2 años que cursaban con hipotonía severa de etiología desconocida sólo se confirmó PWS en un 45% por técnicas moleculares (Aughton DJ y cols., 1990; Gillissen-Kaesbach y cols., 1995).

RETRASO PSICOMOTOR

El retraso en el desarrollo psicomotor está presente en el 90-100% de los individuos con PWS con un promedio de lo doble a lo observado en un individuo normal (se sientan a los 12 meses, caminan a los 24 meses).

En el área del lenguaje también se ha observado que suele aparecer también con cierto retraso. La adquisición de nuevo vocabulario puede ser buena, aunque la estructuración de frases suele ser simple y poco compleja.

HIPOGONADISMO

En ambos sexos el hipogonadismo se manifiesta como hipoplasia genital desde el nacimiento. En los varones se puede encontrar micropene, pero la característica principal es un escroto hipoplásico, el cual es pequeño, pobremente rugoso y pigmentado. La criptorquidia uni o bilateral está presente en aproximadamente el 80- 90% de los individuos. El hipogonadismo es de origen hipotalámico y éste causa retraso e incompleto desarrollo puberal. La pubertad precoz ocurre aproximadamente en el 20%. La infertilidad es la regla aunque se han reportado 2 casos de reproducción femenina (Akefeldt A y cols., 1999; Schulze A y cols., 2001).

TALLA BAJA

La talla promedio para varones es de 1.55 cm y 1.48 cm para mujeres. Las manos y pies crecen lentamente y generalmente están por debajo de la percentila 5, con un promedio en la talla del pie en las mujeres de 20.3 cm y para hombres de 22.3 cm (Cassidy SB y cols., 1996).

SÍNDROME DE ANGELMAN

Este síndrome se caracteriza por retraso mental severo, compromiso neurológico, facies característica que incluye: microcefalia con occipucio plano, prognatismo, boca amplia con lengua protruyente, ojos de implantación profunda e hipopigmentación de ojos y cabello.

El desarrollo fetal, peso y perímetro cefálico al nacimiento son usualmente normales y el diagnóstico se sospecha en la infancia temprana, al hacerse evidente; el retraso psicomotor, hipotonía muscular y una afección severa en el lenguaje (Williams, Angelman y cols., 1995; Williams, Zori y cols 1995). Se presentan convulsiones típicamente entre el primero y los tres años de vida, éstas pueden ser desde crisis de ausencia, mioclonías parciales complejas hasta estatus epiléptico. El patrón electroencefalográfico es característico y muestra actividad delta trifásica. El promedio de la deambulación en estos pacientes es entre los dos y medio y seis años de edad y a esta edad se inicia la risa excesiva y ausencia del habla que es tan característica del síndrome. (Zori y cols., 1992).

1.2.3. ASPECTOS PSICOLÓGICOS

ESTRUCTURA COGNITIVA

El nivel cognitivo de las personas afectadas por este síndrome se ve comprometido, no parece estar correlacionado con factores como la edad, el sexo o el peso del individuo, virtualmente todos los niños con PWS tienen algún grado de deterioro intelectual, el cuál va desde un estado limítrofe hasta retraso mental moderado (Tabla 2).

Afectación (%)		Rango
5%	C.I normal	(>85)
27%	C.I límite	(70-85)
34%	Retraso mental leve	(55-69)
27%	Retraso mental moderado	(40-55)
6%	Retraso mental profundo	(<40)

Tabla 2: Parámetros de coeficiente intelectual (C.I)

ASPECTOS FAVORABLES	ASPECTOS DESFAVORABLES
Memoria a largo plazo	Procesamiento secuencial
Compresión y decodificación lectora	Aritmética
Vocabulario expresivo	Memoria visual a corto plazo
Organización perceptiva	Memoria motora a corto plazo
Habilidad de reconocimiento y relación espacial	

Tabla 3: Áreas cognitivas, descritas por Dykens

FENOTIPO CONDUCTUAL

Los problemas del comportamiento son comunes y varían con la edad. Niños entre 3 a 4 años, no manifiestan problemas de conducta, se caracterizan por ser niños risueños, afables fácilmente confortables.

Entre los 4 a 5 años y hasta aproximadamente los 10 años aparecen las rabietas, la terquedad, las discusiones. Son niños muy argumentativos, con buena memoria a largo plazo (jamás olvidan algo que se les haya prometido) y de una estructura mental muy rígida (raramente se les hará cambiar de opinión o ceder). En esta edad las conductas hiperfágicas se gravan a medida que el individuo adquiere mayor independencia, y por lo tanto tienen acceso a la comida con más facilidad.

A partir de los 10 años los principales problemas de conducta se relacionan con la obtención de comida. En la adolescencia se añaden, problemas de hipersensibilidad a las críticas del entorno y una tendencia muy marcada a la baja autoestima. También es frecuente la poca energía (agravada por la obesidad) a menudo estas características propician cuadros depresivos.

Estudios con personas adultas demuestran que en ambientes controlados los problemas de conducta remiten un poco y se vuelven más susceptibles de intervención, respondiendo mejor a las estrategias de manejo (Dykens EM y cols., 2003).

En cuanto a la psicopatología asociada, los pacientes con PWS tienen mayor riesgo a sufrir algunas enfermedades mentales y entre las cuales se mencionan:

- Trastorno obsesivo-compulsivo: Los afectos de este síndrome suelen tener temas o ideas recurrentes, principalmente con la comida y el almacenamiento de ésta. En algunas ocasiones se puede desencadenar el auténtico cuadro obsesivo que debe ser tratado como tal con los especialistas. En cuanto a las compulsiones, las más frecuentes son la hiperfagia, automutilación y las conductas coleccionistas y de almacenamiento.
- Trastorno depresivo: En edades infantiles son poco frecuentes y parece ser que es más prevalente en niños que en niñas. En edades jóvenes y adultas son algo más frecuentes, la prevalencia parece ser igual en los dos sexos y como a menudo sucede en las personas que tienen déficit intelectual pueden manifestarse no en forma de tristeza y estado de ánimo bajo sino con agresividad e irritabilidad como respuesta a una situación altamente frustrante que no comprenden del todo.
- Cuadros psicóticos: Se han descrito varios casos de cuadros psicóticos en personas que padecen este síndrome. Generalmente el inicio es agudo y con abundancia de síntomas positivos. La resolución varía, hay casos descritos con remisión completa después del brote y otros en que el trastorno se cronifica.

1.2.4. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

SÍNDROME DE PRADER WILLI

Los criterios diagnósticos clínicos fueron desarrollados por un consenso antes de la disponibilidad de una prueba de laboratorio sensible y específica (Holm y cols., 1993).

Criterios Mayores (1 punto)

- 1.- Hipotonía neonatal e infantil de tipo central, con dificultad de la succión, que mejora con la edad
- 2.- Problemas de alimentación en la infancia con necesidad de alguna técnica especial de alimentación y pobre ganancia de peso
- 3.- Inicio de ganancia ponderal muy rápida entre los 12 meses y 6 años, lo que determina obesidad de tipo central.
- 4.- Dismorfias faciales con dolicocefalia en la infancia, cara estrecha o diámetro bifrontal estrecho, ojos almendrados, boca pequeña con labio superior delgado, boca en carpa (tres o más de estas características son requeridas).
- 5.- Hipogonadismo, (dependen de la edad)
 - a. Hipoplasia genital (en masculinos: hipoplasia escrotal, criptorquidia, pene pequeño y/o testículos pequeños; en femeninos: ausencia o hipoplasia severa de labios mayores y/o clítoris)
 - b. Maduración gonadal incompleta o retrasada con pubertad tardía, signos después de los 16 años (en hombres: gónadas pequeñas, decremento del vello corporal y facial, pérdida del cambio de la voz; en mujeres: amenorrea o períodos menstruales infrecuentes)
- 6.- Retraso psicomotor en niños menores de 6 años, retraso psicomotor leve a moderado o problemas de aprendizaje en niños más grandes
- 7.- Hiperfagia / obsesión por los alimentos o por la comida extraña
- 8.- Defecto citogenético o molecular de la región 15q 11-q13 (>650 bandas, preferentemente confirmado por FISH, disomía uniparental materna 15 o prueba de metilación alterada.

Criterios menores (0.5 puntos)

- 1.- Movimientos fetales disminuidos o letargia o llanto débil en la infancia, que mejoran con la edad.
- 2.- Problemas conductuales característicos como: rabietas, conductas obsesivas-compulsivas, testarudez, rigidez, cleptomanía y mitomanía.
- 3.- Alteraciones del sueño o apnea del sueño
- 4.- Talla baja
- 5.- Hipopigmentación
- 6.- Manos pequeñas (percentila 25), y/ o pies pequeños (percentila 10) para la talla
- 7.- Manos estrechas con borde ulnar recto
- 8.- Anormalidades oculares (estrabismo o miopía)
- 9.- Saliva gruesa y viscosa
- 10.- Disartria
- 11.- Grataje de la piel (Skin picking)

Criterios de soporte (no puntos)

- 1.- Alto umbral al dolor
- 2.- Disminución del reflejo nauseoso
- 3.- Inestabilidad térmica en la infancia o sensibilidad de la temperatura alterada en niños más grandes o adultos
- 4.- Escoliosis y/o cifosis
- 5.- Pubarca temprana (vello púbico o axilar antes de los 8 años)
- 6.- Osteoporosis
- 7.- Habilidades inusuales con rompecabezas
- 8.- Estudios neuromusculares normales

Para el diagnóstico se requieren:

- En niños menores de 3 años: 5 puntos (mínimo 3 criterios mayores)
- En niños mayores de 3 años: 8 puntos (mínimo 4 criterios mayores)

SÍNDROME DE ANGELMAN

Los criterios diagnósticos fueron establecidos con consenso por Williams y cols en 1995.

Consistentes (100%)	Frecuentes (>80%)	Asociados (20-80%)
RPM severo	Crecimiento del perímetro cefálico desproporcionado o retrasado, que usualmente resulta en microcefalia (absoluta o relativa) a los 2 años de edad	Occipucio plano, hendidura occipital
Alteraciones del habla (mínimo o nulo uso de palabras)	Convulsiones, edad de inicio antes de los 3 años	Lengua protruyente
Habilidades receptivas y no verbales de la comunicación, menos afectadas que las habilidades verbales		
Alteraciones de la marcha o equilibrio (usualmente ataxia) y/o movimientos involuntarios de los miembros	EEG anormal, patrón característico, de gran amplitud y baja intensidad facilitados al cerrar los ojos (ondas delta y trifásicas)	Problemas de alimentación durante la infancia
Comportamiento característico: combinación de risa y/o sonrisa frecuente, apariencia de felicidad, personalidad fácilmente excitable, aleteo de manos, hiperactividad, déficit de atención		<p>Prognatismo</p> <p>Macrostomía Dientes espaciados</p> <p>Babeo frecuente</p> <p>Alteraciones de la masticación</p> <p>Estrabismo</p> <p>Hipopigmentación de anexos cutáneos</p> <p>REM hiperactivos</p> <p>Sensibilidad incrementada al calor</p> <p>Alteraciones del sueño</p> <p>Atracción o fascinación por el agua o superficies brillantes</p>

1.2.5. ETIOLOGÍA

El brazo largo del cromosoma 15 (15q11-q13) contiene un grupo de genes que tienen expresión diferencial dependiendo del origen parental (Figura 5). Este patrón peculiar de expresión es consecuencia de un proceso llamado impronta genómica (como se comentará más adelante).

La mayoría de estos genes son expresados únicamente en la copia paterna., aunque se han reconocido dos genes que tienen solamente expresión en la copia materna.

La pérdida de expresión de los alelos paterno o materno se traducirá en PWS o AS respectivamente. Los PWS/AS son un prototipo de síndromes de microdelección (Lupski, 1998). Estas dos enfermedades han servido como modelos biológicos para entender los mecanismos como la disomía uniparental (UPD) y alteraciones en la impronta genómica (Driscoll y cols., 1992). Los mecanismos moleculares que conducen a estos padecimientos son heterogéneos (Figuras 1 y 2), la mayoría de los pacientes son portadores de deleciones, las cuales son de novo, éstas representan aproximadamente el 70% de los casos de PWS y AS. En ambos síndromes, la región afectada es la misma, pero en los pacientes con PWS la deleción siempre estará en el cromosoma paterno, mientras que en el AS, será en el cromosoma materno. El segundo hallazgo más frecuente en el PWS es la UDP materna, un hallazgo recíproco se observa en algunos pacientes con AS en donde la UDP es paterna. La minoría de pacientes con PWS o AS tienen aparentemente 2 cromosomas 15 de origen biparental, pero en realidad, éstos son portadores de la misma impronta. Todos estos mecanismos pueden ser detectados por estudios de metilación., con excepción de mutaciones en UBE3A (Takeo Kubota y cols., 1997).

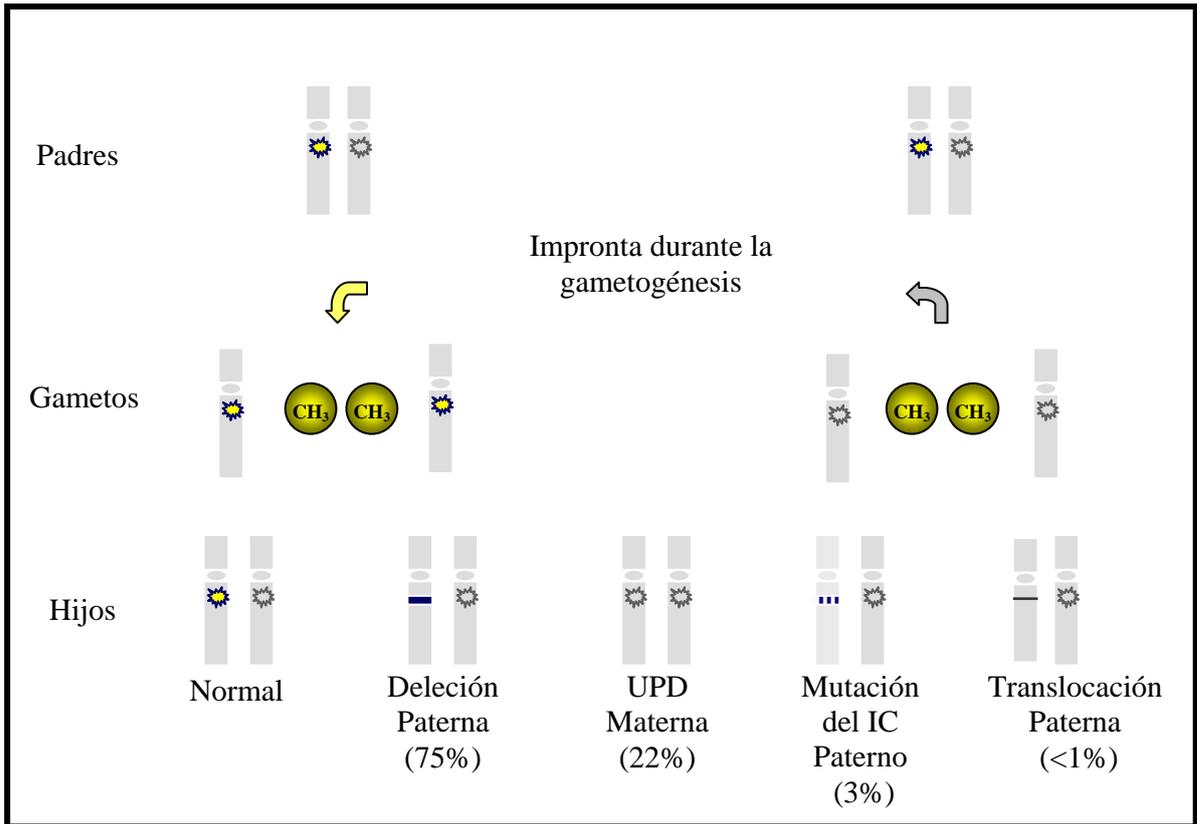


Figura 1: Mecanismos moleculares del Síndrome de Prader-Willi

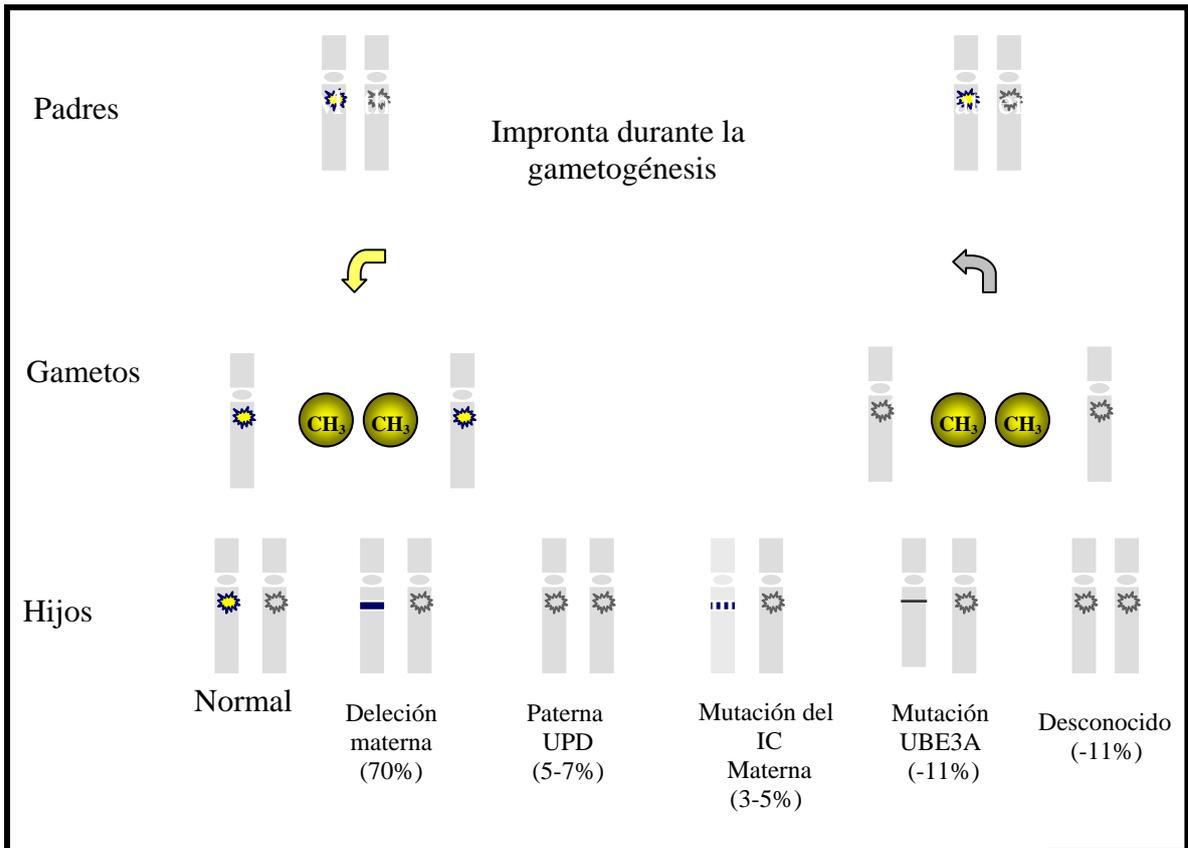


Figura 2: Mecanismos moleculares del Síndrome de Angelman

1.2.5.1. DELECCIONES

Las deleciones *de novo* de 15q11-q13 ocurren en aproximadamente 70-75% de los pacientes con PWS y AS. En ambos síndromes, la región afectada es la misma, pero en el PWS la deleción es siempre en el cromosoma paterno mientras que en el AS ésta siempre será en el cromosoma materno. Las deleciones comprenden aproximadamente 4 Mb. La mayoría de estas deleciones ocurren como consecuencia del entrecruzamiento no homólogo entre secuencias de DNA duplicadas que flanquean esta región.

En el 95% de los pacientes con PWS y AS típicamente se han descrito 2 tipos de deleciones, las que abarcan la región BP1 (D15S541) hasta BP3 (D15S1002) la deleción tipo I se extiende desde BP1 hasta BP3 y la deleción tipo II tiene una extensión de BP2 hasta BP3 (Christian SL, y cols., 1995).

En 5% de los casos, el punto de ruptura distal es BP4 (D15s165). Se ha descrito un punto más de ruptura (BP5) en un caso con una inv dup(15) cromosoma marcador y en algunos casos de duplicaciones intersticiales y triplicaciones del cromosoma 15q11-q13. La deleción tipo I es de aproximadamente 5Mb, la deleción tipo II es más pequeña y abarca aproximadamente 500 Kb (Bolton PF y cols., 2001) (Figura 3).

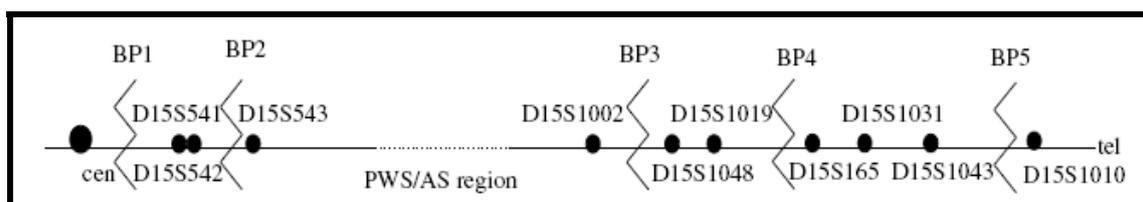


Figura 3: Diagrama esquemático que muestra la posición de los microsatélites usados para investigar los tipos de deleciones en los pacientes con PWS, las líneas en zigzag indican los puntos de ruptura observados. BP: punto de ruptura

DUPLICACIONES Y TRIPLICACIONES DEL CROMOSOMA 15q11-q13

Se conoce que el brazo corto del cromosoma 15 es susceptible de presentar rearrreglos estructurales, como deleciones, duplicaciones intersticiales, triplicaciones y en la formación de cromosomas supermarcadores (SMC 15). La mayoría de las deleciones son de un tamaño uniforme. En contraste, los puntos de ruptura de las duplicaciones intersticiales aún no se han definido claramente (Siân E. Roberts y cols., 2002).

1.2.5.2. DISOMÍA UNIPARENTAL (UPD)

La UPD ocurre cuando un producto recibe ambas copias de un cromosoma o un segmento cromosómico de sólo alguno de los padres. La disomía puede constar de dos copias del mismo cromosoma (isodisomía) o un par de cromosomas homólogos derivados de un mismo progenitor (heterodisomía). Los mecanismos de producción son:

- 1.- La formación de un cigoto por complementación gamética, uno disómico y otro nulisómico.
- 2.- Un cigoto trisómico en las divisiones mitóticas tempranas con pérdida de un cromosoma por rezago anafásico. Lo anterior podría originar un mosaico con UPD y una disomía biparental normal.

La UPD incrementa en la mayoría o en todos los casos como resultado de una combinación de errores en la mitosis y/o meiosis. En dos tercios de los casos, se deben a un evento primario de no disyunción meiótica seguida por una trisomía de rescate, los cuáles parecen vincularse a la edad materna avanzada, éstos pueden detectarse en un principio como mosaicos trisómicos durante el diagnóstico prenatal, ya sea por estudio citogenético en amniocentesis o en la muestra de biopsia de vellosidades coriales (Bernard Horsthemke, 2005). El segundo hallazgo en frecuencia en el PWS es la disomía uniparental materna (matUPD), es decir los pacientes, tienen dos copias del cromosoma 15 materno, con pérdida de la copia paterna. Un hallazgo recíproco ocurre en los pacientes con AS, los cuáles tendrán dos copias paternas del cromosoma 15 con pérdida de la copia materna (patUPD).

1.2.5.3. DEFECTOS EN LA IMPRONTA

Algunos pacientes con PWS y AS tienen aparentemente dos cromosomas 15 normales de origen biparental, pero uno de ellos es portador de la misma impronta (expresión diferencial génica entre el alelo heredado del padre y el heredado de la madre). Esto puede ocurrir de novo sin mutaciones en el DNA o como consecuencia de una microdelección que afecta el centro improntador. El 95% de los defectos en el centro improntador (CI) son microdelecciones dentro de *SNRPN* (Arabella Smith y cols., 2002). La región del CI es una estructura bipartita, el primero es requerido para el mantenimiento de la impronta paterna durante la embriogénesis temprana. El segundo elemento es requerido para la impronta materna en la línea germinal femenina (Bernard Horsthemke, 2005) (Figura 4).

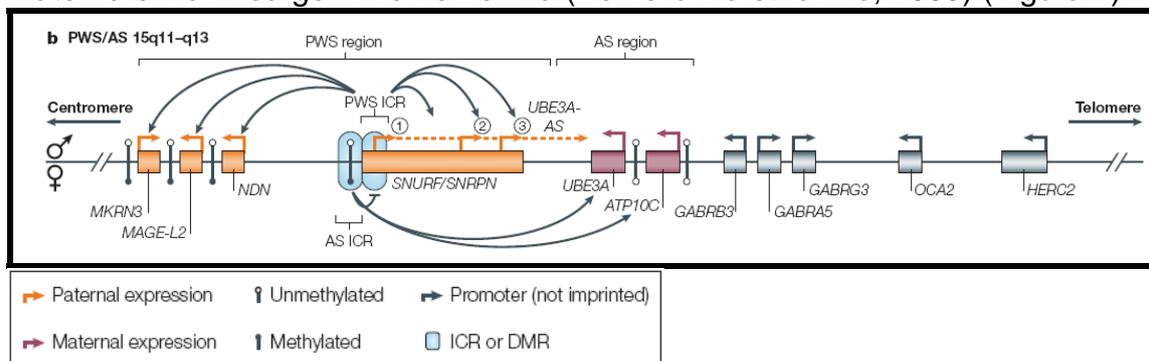


Figura 4: estructura bipartita del centro improntador

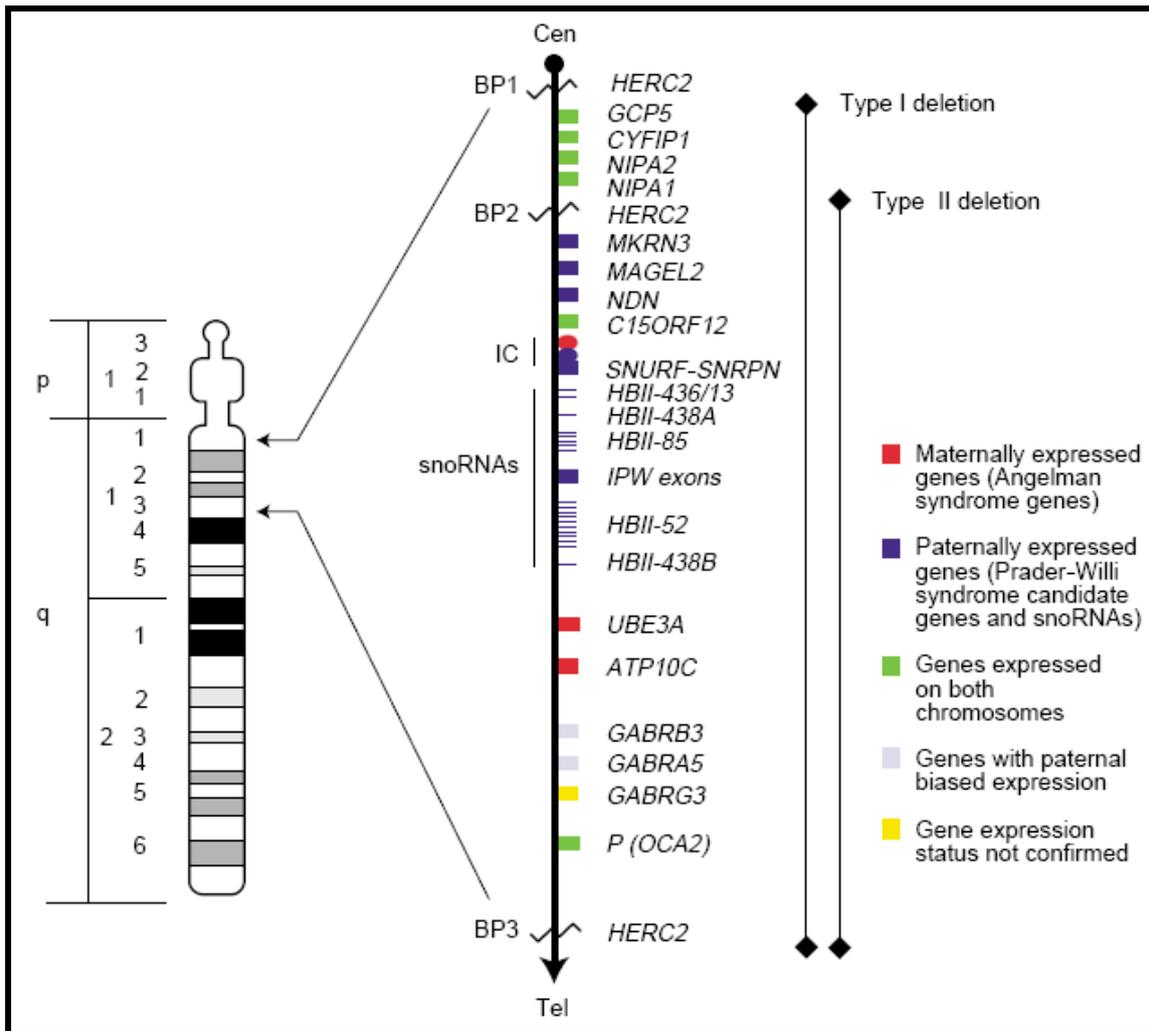


Figura 5: Ideograma del cromosoma 15 mostrando los genes localizados en 15q11-q13 y su expresión diferencial.

1.2.6. BIOLOGÍA MOLECULAR: GENES CANDIDATOS PARA LOS SÍNDROMES DE PRADER-WILLI Y ANGELMAN

En la región crítica de PWS/AS se han descrito varios genes, con expresión diferencial parental.

- **SNRPN** (small nuclear ribonucleoprotein N). Estudios basados en ratones y humanos, la expresión de este gen es exclusivamente paterna y codifica para una ribonucleoproteína nuclear pequeña, que es una proteína asociada a ribosoma, cuyas funciones son el control del splicing y por lo tanto podría estar involucrado en el control de la síntesis de algunas proteínas, *SNRPN* se sabe está improntado en cerebro, el foco de la mayoría de las alteraciones vistas en el PWS (Ozcelik y cols., 1992).

- **SNURF**, es una proteína bifuncional que posee una actividad de unión al DNA.
- **SNURF-SNRPN**, un gen complejo, que codifica para cinco clases de RNA pequeños nucleolares (snoRNAs).
- **IPW**, el cual se piensa sea un RNA transcrito, éste no codifica alguna proteína.
- **PAR1, PAR4, AR5 y PAR7**, transcritos anónimos.
- Gen **P**, el cuál codifica para una tirosinasa-albinismo positivo, esta deleción esta asociada con la hipopigmentación vista en un tercio de los individuos con PWS.
- **GABRB3, GABRA5 y GABRG3**, todos genes de la subunidad del receptor GABA.
- **E6AP (UBE3A)**, gen improntado en el cerebro, codifica para una proteína ligasa de ubiquitina, se piensa, tiene un rol importante en la ubiquitinación de las proteínas cerebrales, un proceso que las marca a la degradación, se expresa predominantemente en hipocampo y células de Purkinje cerebelares, mostrando impronta tejido específico. Este gen comprende 16 exones con región codificante que abarca desde los exones 8-16. Se han detectado mutaciones puntuales a todo lo largo de la región codificante, no encontrándose puntos calientes, la mayoría de las mutaciones ocurren de novo, alrededor del 20% las madres podrían ser portadoras de alguna mutación.
- **ATP10C**, un gen expresado maternamente dentro del intervalo más común de deleción responsable para AS.
- **NECDIN (NDN)**, el cuál codifica una proteína de unión al DNA, probablemente involucrado en el control del ciclo celular y apoptosis.
- **MAGEL2**, tiene impronta materna y con expresión preferencial en tejido cerebral. Se piensa está involucrado en el control del ciclo celular y apoptosis.
- **MKRN3**, (Markorin 3, previamente referido como **ZNF127**) es un factor de transcripción, con función desconocida, expresado únicamente por el alelo paterno.
- Se han encontrado varios y nuevos genes improntados y transcritos de función desconocida.

1.2.7. CORRELACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO

Existen algunas diferencias clínicas entre individuos con PWS con deleción 15q y aquéllos con UDP materna. Los individuos con UDP materna, son menos susceptibles a tener una apariencia facial típica, hipopigmentación o habilidades con los rompecabezas (Cassidy y cols.,1995; Gillessen-Kaesbach y cols., 1995; Dykens y cols., 1999 - 2003); por lo contrario tienen CI más alto y leves problemas del comportamiento, sin embargo, la psicosis y el autismo son más comunes en estos pacientes (Roof y cols., 2000; Veltman y cols., 2004). Un reporte sugiere que, individuos con deleciones tipo I, tienen más problemas de comportamiento que aquéllos con deleciones tipo II. Datos más recientes sugieren que los pacientes con PWS con deleciones tipo I, tienen un fenotipo más severo que aquellos pacientes que muestran deleciones tipo II, donde se incluyen: comportamiento auto-agresivo, déficits de atención, comportamiento obsesivo compulsivo, dificultades para leer (Butler MG y cols., 2004- 2005).

1.2.8. IMPRONTA GENÓMICA

La impronta se ha definido como el marcaje epigenético del genoma de un organismo diploide con respecto a su origen parental. La impronta es un mecanismo epigenético particularmente importante en los mamíferos y parecería estar relacionado en la regulación de la transferencia de nutrientes de la madre al feto y al recién nacido. Esta hipótesis es apoyada por el hecho de que los genes improntados tienden a afectar el crecimiento *in utero* y el comportamiento después del nacimiento.

La impronta genómica es un proceso descrito primero en plantas y ahora conocido en humanos, es un evento epigenético por lo que el fenotipo es modificado dependiendo del sexo. En los últimos años el Proyecto del Genoma Humano ha tenido un gran avance, lo que resultó en la publicación del primer borrador de su secuencia hace 4 años. Sin embargo aún queda por dilucidar la estructura y funcionamiento de la mayoría de los genes que lo constituyen. Las células somáticas de un organismo multicelular tienen básicamente la misma información genética, no obstante, cada uno de los tipos celulares que forman parte del organismo tienen una estructura y función características. Esto se debe a la expresión diferencial del genoma, la cuál es regulada principalmente por mecanismos epigenéticos.

El término epigenética se ha definido como “los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN”. Así un mecanismo epigenético puede ser entendido como un sistema complejo para utilizar selectivamente la información genética, activando y desactivando diversos genes funcionales. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina que regula la expresión génica.

La metilación del ADN se ha observado en diversas especies de bacterias, algunos hongos, plantas y organismos superiores. En las bacterias, la metilación es parte de un mecanismo de defensa para reducir la cantidad de transferencia génica horizontal entre las especies. En los mamíferos, la metilación del ADN y su significado funcional es un área activa de investigación. Este proceso afecta las interacciones ADN-proteínas, pueden alterar la estructura y replicación del ADN, la expresión de los genes y la diferenciación celular, la latencia de virus celulares y la inactivación transcripcional de los elementos genéticos móviles, además de aumentar el riesgo de las mutaciones espontáneas, lo que hace de este tema un tópico de gran relevancia (Mauricio RD y cols., 2004).

METILACIÓN DEL ADN EN MAMÍFEROS

En el genoma de los vertebrados la única modificación epigenética en la molécula del ADN se produce por la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. La mayoría de las 5-metil citosinas (5mC) en el ADN de los mamíferos están presentes en los dinucleótidos 5'-CpG-3' y en la cadena complementaria en el dinucleótido 3'-GpC-5'. También pueden estar metiladas secuencias no CpG como 5'-CpNpG-3' o no simétricas como 5'-CpA-3' y 5'-CpT-3', pero con menor frecuencia.

En las células humanas somáticas humanas, la 5mC constituye el 1% del total de las bases del ADN y afecta un alto porcentaje de todos los dinucleótidos CpG en el genoma. La presencia de la 5mC produce un cambio conformacional en la doble cadena del ADN, lo cuál podría actuar como una señal específica para otras moléculas que intervienen en la regulación de la expresión génica. El estado de metilación de los residuos de citosina le puede conferir una variación espacial y temporal a la estructura de la cromatina, habiéndose demostrado que generalmente existe una correlación inversa entre los niveles de metilación del ADN y la expresión génica.

Los dinucleótidos CpG no están distribuidos uniformemente en el genoma humano. En 98% del genoma, los CpG están presentes en promedio una vez por cada 80 dinucleótidos, existiendo regiones de 200 pb a varias kilobases que tienen una frecuencia cinco veces mayor de dinucleótidos CpG (>60% de CG), denominadas "islas CpG". Aproximadamente 60 a 90% de todas las secuencias CpG dispersas en el genoma están metiladas, mientras que las correspondientes a las islas CpG se localizan en la mayoría de los genes de mantenimiento celular no lo están (Reik W. y cols., 2001; Keith D Robertson, 2005).

ESTABLECIMIENTO DE PATRONES DE METILACIÓN

Un prerequisite para entender las funciones de la metilación del ADN es conocer la existencia de patrones heredables del estado de metilación en el genoma de los mamíferos. Los patrones de metilación en las células somáticas son generalmente estables y heredables, sin embargo, son reprogramados ampliamente en las células germinales y durante el desarrollo embrionario temprano, siendo la metilación de *nov*o particularmente activa en estos estadios. En general el genoma de las células germinales femeninas se encuentra menos metilado que el de las masculinas. El patrón de metilación de los gametos es borrado por una desmetilación generalizada cerca del estadio de 8 células. A partir de entonces la metilación del ADN adquiere patrones específicos durante el desarrollo embrionario y se establece el patrón de metilación de las células somáticas. Se ha sugerido que los patrones de metilación de las islas CpG pueden servir para compartimentar al genoma en zonas transcripcionalmente activas e inactivas. La metilación de *nov*o también puede ocurrir en las células somáticas adultas, un número significativo de las islas CpG son susceptibles de metilación progresiva en ciertos tejidos durante el proceso de envejecimiento o en los procesos neoplásicos. Sin embargo la velocidad a la que ocurren estos cambios parece ser muy lenta. Se ha observado que existen patrones de metilación anormales en muchos tipos de cáncer, los cuáles conducen principalmente a la inactivación de genes supresores de tumores y a la inestabilidad del genoma. Diferentes líneas de investigación sugieren que los patrones de metilación del ADN son vitales para el desarrollo normal de los vertebrados (Reik W. y cols., 2001).

FUNCIONES DE LA METILACIÓN

La metilación del ADN constituye un marcador epigenético que identifica la cadena molde durante la replicación del ADN y el origen parental de las regiones improntadas, regula a los transposones, la impronta genómica y la expresión génica. Generalmente la metilación en elementos reguladores de los genes tales como promotores, potenciadores, aislantes y represores suprimen su función. La metilación en regiones no codificantes, como la heterocromatina centromérica, parece ser crucial para mantener la conformación e integridad de los cromosomas. También se ha sugerido que la metilación constituya un mecanismo de defensa del genoma contra elementos genéticos móviles (Mauricio RD y col., 2004).

GENES IMPRONTADOS EN EL HUMANO

Los genes improntados presentan características genéticas y epigenéticas comunes. La mayoría se localizan físicamente ligados en agrupamiento con otros genes improntados, esta agrupación sugiere una regulación coordinada de los genes contenidos en un dominio cromosómico. Por la analogía con la inactivación del cromosoma X, en algunas regiones sujetas a impronta se han identificado centros de impronta (IC, imprinting center) o elementos de control de la impronta. Generalmente no hay homología en las proteínas codificadas por los genes improntados, pero existen relaciones funcionales en algunos genes implicados en el crecimiento y desarrollo fetal. Las regiones improntadas, frecuentemente son ricas en islas CpG y cerca o incluso dentro de ellas contienen grupos de secuencias repetidas directas. La modificación epigenética más importante en la impronta es la metilación de dinucleótidos CpG que define regiones con metilación diferente (DMR, differentially methylated region), las cuáles son específicas para cada alelo parental. Los genes improntados también pueden diferir con respecto a la estructura de la cromatina y al estado de acetilación y metilación de las histonas. En algunos genes, las DMR se establecen en las células germinales femeninas y masculinas y el patrón de metilación es mantenido durante todos los estadios del desarrollo, mientras que en otros genes las DMR son reprogramadas significativamente durante el desarrollo (Reik W. y cols., 2001).

La herencia de este marcaje epigenético conduce a la expresión génica diferencial. Sin embargo, ha resultado difícil identificar las señales que participan en la herencia y la reprogramación de la metilación del ADN en la impronta, recientemente se ha sugerido que alguna de estas señales pudieran estar dadas por el código de histonas, principalmente la metilación en el aminoácido K4 o K9 de la histona H3 (Keith D Robertson, 2005).

ENFERMEDADES POR DEFECTOS EN LA METILACIÓN

Los patrones de metilación del ADN son importantes para regular de manera adecuada la expresión de los genes y asegurar un desarrollo normal del ser humano, por lo que su alteración se relaciona con enfermedad. Los cambios en la expresión génica pueden deberse a problemas en la maquinaria encargada de producir y mantener la metilación, tales como las mutaciones en los genes que codifican para las ADN metiltransferasas, o en aquellos que codifican para las proteínas de unión al ADN metilado o por cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN o en los complejos remodeladores de la cromatina que conducen a cambios en su patrón de metilación. Otras enfermedades humanas, como los síndromes de Beckwith Wiedemann y de Prader Willi/Angelman, están asociados con cambios en la dosis funcional de genes sujetos a impronta genómica, y pueden originarse por diferentes mecanismos que incluyen microdeleciones o duplicaciones de la región improntada, disomía uniparental y alteraciones en los mecanismos de regulación epigenética. Aproximadamente se conocen 80 genes improntados en el humano y este número está continuamente en aumento (Keith D. Robertson ,2005).

1.2.9. PRUEBAS DIAGNÓSTICAS PARA LOS SÍNDROMES DE PRADER-WILLI Y ALNGELMAN

Los PWS/AS son enfermedades complejas, cuyo diagnóstico es difícil de establecer tan sólo por hallazgos clínicos y cuyas bases genéticas son heterogéneas.

Se han utilizando varias metodologías para el diagnóstico de estas entidades. A continuación se menciona el principio de cada una de ellas (Tablas 4 y 5) (ACME 1997).

1.2.9.1. CARIOTIPO DE ALTA RESOLUCIÓN

El cariotipo de alta resolución (>650 bandas) puede detectar deleciones intersticiales, en únicamente 1% de los casos, por lo que un cariotipo de alta resolución normal no descarta el diagnóstico. El cariotipo es usualmente una rutina como parte de la evaluación de estos pacientes, pudiéndose detectar alteraciones cromosómicas (Delach y cols., 1994).

1.2.9.2. HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

Se considera el estudio de elección para detectar el 70% de los pacientes con deleciones de la región crítica. El uso de una sonda de secuencia única que hibrida en la región a estudiar para detectar presencia o ausencia de la región crítica permitiendo una exclusión entre los casos que se originan a partir de una deleción intersticial y esos casos en los cuáles la deleción se debe a una translocación desbalanceada.

Es importante mencionar que además de usar la sonda para la detección de la deleción es necesario utilizar como control interno secuencias de DNA específicas para el cromosoma en estudio, en este caso se utilizó un coctel con una sonda centromérica para el cromosoma 15 (D15Z1) y para la región 15q22 (gen PLM).

Se reporta en la literatura que el análisis por FISH está científica y clínicamente comprobado siendo una prueba herramienta sensible y específica para la detección de las deleciones 15q11-q13, encontradas en los pacientes de PWS y AS (Delach y cols., 1994).

1.2.9.3. GENESCAN PARA DETECCIÓN DE UPD

El estudio detecta el 22% de los casos. En esta técnica se usan marcadores informativos, para investigar la transmisión del cromosoma 15 de cada padre al niño y determinar si éste demuestra herencia biparental, si tiene únicamente los marcadores maternos será un individuo con PWS y si tiene solamente los marcadores paternos, será un individuo afectado con AS.

1.2.9.4. PCR METILACIÓN ALELO ESPECÍFICA (MS-PCR)

Este estudio es capaz de detectar 99% de los pacientes con PWS y 80% de los casos del AS. Como ya se mencionó anteriormente existe un estado de metilación diferencial en varios sitios de la región crítica de PWS/AS, en la cuál el homólogo materno está metilado, mientras que el homólogo paterno no está metilado y por lo tanto transcripcionalmente activo. Independiente del mecanismo molecular por el cuál se da la enfermedad, existe un sitio diferencialmente metilado en la isla CpG del gen *SNRPN* localizado en la región crítica. Se ha observado que más del 96% de todos los dinucleótidos CpG están metilados en el cromosoma materno, mientras que ninguno, en el cromosoma paterno, esta característica permite realizar un ensayo de PCR metilación específica (MS-PCR) para la detección de PWS y AS.

Con esta técnica, el ADN tratado con bisulfito, se induce una modificación química de las citosinas a uracilos excepto cuando las citosinas están metiladas. La 5-metilcitosina es resistente al bisulfito y por lo tanto permanece sin cambios. Esto permite que después del estudio con PCR utilizando primers específicos para la región se observe un patrón de bandas características.

Por consiguiente, un individuo normal mostrará un alelo metilado y otro no metilado, uno producto del cromosoma materno metilado y otro producto del cromosoma paterno no metilado. Los pacientes con PWS, mostrarán únicamente la banda materna y los pacientes con AS mostrarán la banda paterna (Takeo Kubota y cols., 1997; Zeschngk y cols., 1997).

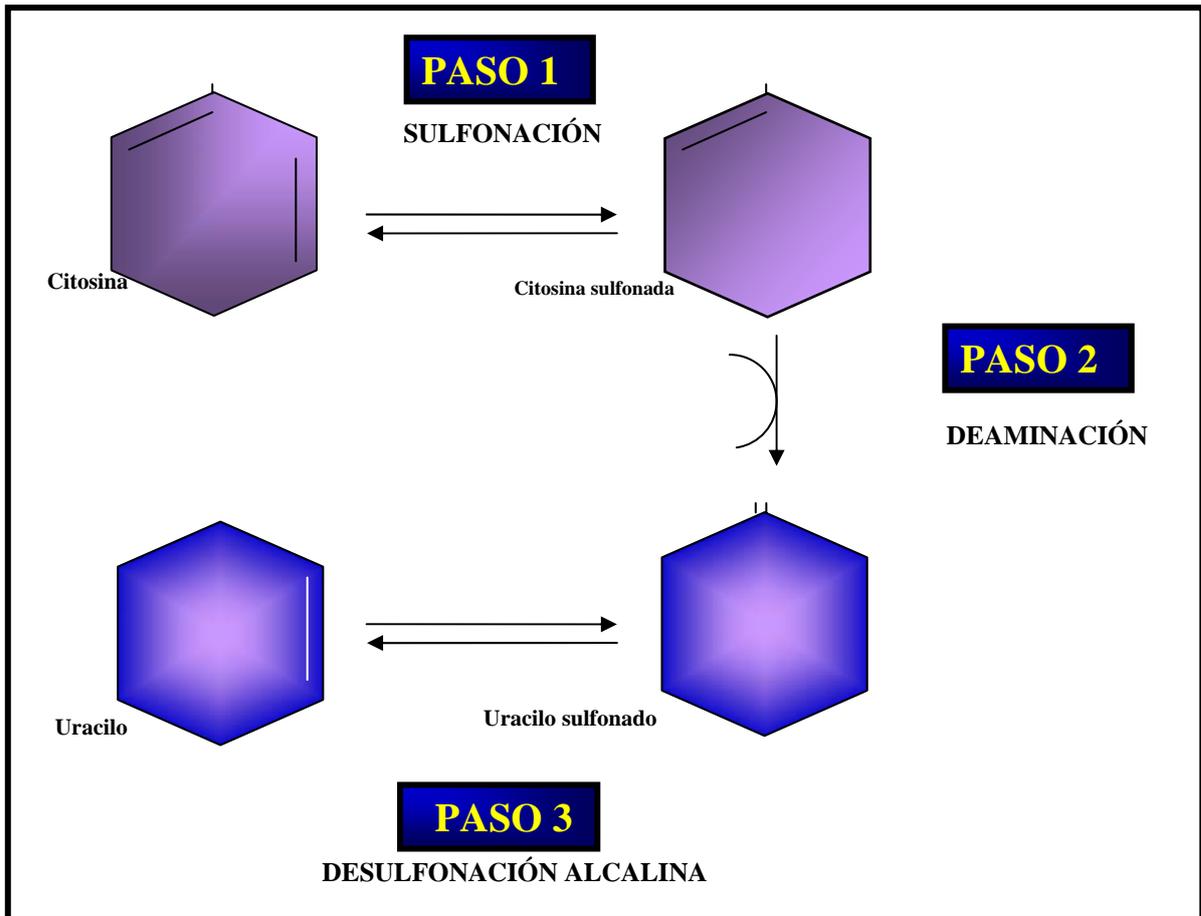


Figura 6: Diagrama de la modificación de citosinas por bisulfito de sodio

MÉTODO DIAGNÓSTICO	ALTERACIÓN DETECTADA	SENSIBILIDAD
Análisis de metilación	Metilación anormal	99%
FISH/ PCR cuantitativa	Deleción de PWCR	70%
Genescan	UDP de PWCR	25%
Secuenciación	Defecto en el centro imprintador	< 1%

Tabla 4. Estudios moleculares utilizados para el diagnóstico de PWS
PWCR: Región crítica de Prader-Willi

MÉTODO DIAGNÓSTICO	ALTERACIÓN DETECTADA	SENSIBILIDAD
Análisis de metilación	Metilación anormal	80%
FISH	Deleción de ASCR	70%
Genescan	UDP de ASCR	7%
Secuenciación	Defecto en el centro imprintador	3%
Secuenciación	Mutación en UBE3A	11%

Tabla 5. Estudios moleculares utilizados para el diagnóstico de AS
ASCR: Región crítica de Angelman

1.2.10. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

El craneofaringioma, muestra características en común con el PWS, particularmente cuando el craneofaringioma ocurre en edades tempranas.

La hipotonía en la infancia es también vista en las siguientes condiciones:

- Sepsis neonatal
- Depresión del Sistema Nervioso Central
- Distrofia miotónica congénita tipo 1, caracterizada por hipotonía y debilidad muscular severa en forma generalizada, cursan frecuentemente con insuficiencia respiratoria y muerte temprana; el retraso mental es común. Esta patología es causada por la expansión de un microsatélite CTG en el gen DMPK
- Miopatías y neuropatías, en las cuales se incluye la Atrofia Muscular Espinal (SMA), la electromiografía y la conducción de velocidad nerviosa y/o biopsia muscular serán necesarias para diferenciar estas condiciones.

El desarrollo psicomotor/retraso mental, obesidad e hipogonadismo pueden ser vistos en los siguientes padecimientos:

- Síndrome de Prader-Willi-like, ha sido descrito en pacientes con alteración cromosómica 6q15-q21. El gen *SIM1* ha sido localizado en la región 6q16.2-q21 el cuál es expresado en el desarrollo del riñón y del sistema nervioso central y es esencial para la formación de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular. Basado en las evidencias clínica y genética, se sugiere que la obesidad de presentación temprana y la hiperfagia están determinadas por la haploinsuficiencia de *SIM1*, mientras que la hipotonía, el retraso psicomotor, las dismorfias faciales, las manos y pies pequeños están causados por la delección de otros genes localizados en el segmento cromosómico 6q15-q21
- Disomía uniparental materna del cromosoma 14, el cuál incluye problemas de la alimentación y talla baja (Cox y cols., 2004).
- Síndrome de Bardet-Biedl (BBS), caracterizado por distrofia de conos y bastones, obesidad, polidactilia postaxial, alteraciones cognitivas, hipogonadismo hipogonadotrópico, malformaciones genitourinarias del trayecto femenino y disfunción renal.

1.2.11. TRATAMIENTO

Se recomienda un manejo multidisciplinario. El reconocimiento y la intervención temprana sin embargo, mejoran el pronóstico y la evolución (Eiholzar y Whitman 2004; Cassidy 2005).

TRATAMIENTO	BENEFICIOS	ADVERSOS
Técnicas de alimentación especial	Mejoramiento de la nutrición	
Hormona de crecimiento en la niñez	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Velocidad de crecimiento y talla final ↑ Lipólisis ↑ Densidad mineral ósea ↑ Desarrollo cerebral e CI 	Intolerancia a la glucosa
Orquidopexia/ orquidectomía	Prevención del carcinoma testicular	
Modificación de la dieta	Prevención de la obesidad y complicaciones	
Ejercicio	Prevención de obesidad Fuerza muscular	
Inhibidores de la recaptura de serotonina	Compulsividad por el grataje de piel Depresión o comportamiento agresivo	
Antipsicóticos	Comportamiento agresivo	
Esteroides sexuales	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Densidad mineral ósea ↑ Índice de fracturas ↑ Fuerza muscular 	Estrógenos: riesgo de trombosis Testosterona: comportamiento agresivo e hipertrofia prostática
Topiramato	↓ Grataje de piel	Efectos colaterales neurológicos
Análogos de la Somatostatina	↓ Obesidad	Intolerancia a la glucosa Litos vesiculares
Antagonistas de la grelina	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	Efecto incierto
Hormonas intestinales anoréxicas (PYY3-36 y polipéptido pancreático)	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	Efecto incierto
Drogas anoréxicas de origen central	↓ Disminución de la ingesta de alimentos y obesidad	Efecto incierto

Tabla 6: Opciones terapéuticas del PWS

1.2.12. ASESORAMIENTO GENÉTICO

MECANISMO GENÉTICO	RIESGO
Deleción de la región PWS/AS	< 1%
Disomía uniparental materna	< 1%
Defectos en el imprinting con mutación	50%
Defectos en el imprinting sin mutación	< 1%
Translocaciones cromosómicas de novo	< 1%

Tabla 7: Riesgo de recurrencia para hermanos de un paciente con PWS

MECANISMO GENÉTICO	RIESGO
Deleción de la región PWS	< 1%
Disomía uniparental paterna	< 1%
Defectos en el imprinting con mutación	50%
Defectos en el imprinting sin mutación	< 1%
Translocaciones cromosómicas de novo	< 1%
Mutación en UBE3A	50%

Tabla 8: Riesgo de recurrencia para hermanos de un paciente con AS

2.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El PWS es la entidad genética más frecuente que conduce a obesidad en la infancia, es un padecimiento que se observa frecuentemente en las clínicas de Genética, Pediatría y Endocrinología Pediátrica. Debido a la historia natural, las complicaciones que se presentan y la oportunidad de poder realizar un tratamiento oportuno es necesario llegar al diagnóstico preciso. Se conoce que el estándar de oro diagnóstico es el estudio de metilación alelo específica, sin embargo, ningún laboratorio del país lo ofrece. Si se llega a realizar estudio de FISH y éste es negativo, hasta 35% de los casos quedarán sin diagnóstico. La medicina moderna obliga a realizar diagnósticos y abordajes moleculares en las enfermedades Genéticas, esto permitirá conocer cómo se comporta la enfermedad en nuestra población, se realizarán diagnósticos tempranos y mejores manejos multidisciplinarios. La estandarización de este estudio permitirá realizar una prueba rápida y de bajo costo con un rango de detección del 99% en PWS y de 80% en los casos de AS.

3.- HIPÓTESIS

El ensayo PCR secuencia de metilación específica (MSP) permite evaluar el patrón de metilación de las islas CpG del gen SNRPN, detectando 99% de los casos de PWS y el 80% en los casos de AS.

4.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Realizar diagnóstico de certeza en los Síndromes de Prader-Willi/Angelman mediante MS-PCR

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estandarización de la técnica MS-PCR.
- Evaluación del patrón de metilación en controles normales.
- Evaluación del patrón de metilación en pacientes con diagnóstico clínico de PWS/AS
- Conocer la utilidad de los criterios clínicos de Holm en nuestra población comparada con el estudio de MS-PCR

5.- SUJETOS Y MÉTODOS

Se estudiaron 26 pacientes con diagnóstico clínico de PWS. Cuatro de los casos fueron en edad adulta y el resto de los pacientes en edad pediátrica (Tabla 9). Además se contemplaron 5 pacientes en edad pediátrica con diagnóstico clínico de AS (Tabla10). El motivo de la consulta fue obesidad en los pacientes con diagnóstico de PWS y retraso mental severo en los pacientes con diagnóstico de AS.

Los casos de PWS fueron de origen mestizo-mexicano, esporádicos y con historia familiar negativa para enfermedades genéticas. Los pacientes fueron referidos de las siguientes instituciones: Hospital General de México, Instituto Nacional de Pediatría, Hospital Infantil de México, Hospital 20 de Noviembre, Hospital del Niño Poblano y del CRIT, Oaxaca. Esta serie incluyó a 18 hombres y 13 mujeres con edades que abarcaban desde los 1.6 años hasta los 22 años.

En todos los casos el estudio citogenético de alta resolución, no mostró alteraciones numéricas ni rearrreglos estructurales. La valoración de los patrones de metilación por MS-PCR se realizó en DNA modificado por bisulfito de sodio. Se amplificaron las secuencias de islas CpG de los genes: *SNRPN* y como control de la metilación se estudio el gen *ABL*.

5.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Diagnóstico clínico de Síndrome Prader-Willi/AS.
- Diagnóstico de Síndrome Prader- Willi/AS por FISH.
- Material biológico suficiente para estudio. citogenético y molecular.
- Consentimiento informado.

PACIENTE	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO DE INGRESO
1	M	11	PWS
2	M	7	PWS
3	F	10	PWS
4	F	16	PWS
5	M	2.4	PWS
6	M	6	PWS
7	M	2.7	PWS
8	M	1.6	PWS
9	M	3.11	PWS
10	M	8.10	PWS
11	M	22	PWS
12	F	12	PWS
13	M	9	PWS
14	F	5.9	PWS
15	M	5	PWS
16	M	22	PWS
17	F	14	PWS
18	M	7	PWS
19	F	9.8	PWS
20	M	6.5	PWS
21	F	10	PWS
22	M	1.11	PWS
23	M	11.10	PWS
24	M	22	PWS
25	F	20	PWS
26	M	8	PWS

Tabla 9: Sexo, edad y diagnóstico de ingreso en los pacientes con diagnóstico clínico de PWS

PACIENTE	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO DE INGRESO
1	F	5	AS
2	F	8	AS
3	F	6	AS
4	F	5.2	AS
5	F	5	AS

Tabla 10: Sexo, edad y diagnóstico de ingreso en 5 pacientes con diagnóstico clínico de PWS

5.2. ANÁLISIS CITOGENÉTICO CON BANDAS GTG

Se realizó análisis cromosómico con bandas GTG en leucocitos de sangre periférica.

5.3 HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA

La muestra se colocó en un tubo cónico de polipropileno y fue centrifugado a 1000 r.p.m. por 10 min., se eliminó el sobrenadante y se agregaron 3 ml de Tripsina/EDTA (Irvine Scientific) para permitir la permeabilidad de la membrana y se incubó a 37°C por 30 min., se resuspendió y se centrifugó a 1000 r.p.m. cambiar por 10 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 3 ml de solución hipotónica (KCl 75mM Merck) y se incubó a 37°C por 25 min., se hizo fijación agregando 1 ml de fijador Carnoy recién preparado y frío, se centrifugó a 1000 r.p.m. por 10 minutos se eliminó el sobrenadante y se agregó 3 ml de fijador, se centrifugó, dos veces más para obtener un paquete celular limpio. La muestra se colocó por goteo con micropipeta en laminillas salinizadas lavadas en etanol al 70%. Para las muestras en donde se aplicaron los dos Cocteles, se gotearon dos áreas.

Para la eliminación del citoplasma las laminillas con la muestra se colocaron en solución de pepsina al 10% en HCl 0.01 N a 37°C por 10 min, se lavaron en solución salina de fosfatos (**PBS**) por 5 min y deshidrataron en alcoholes al 70, 85 y 100% por 2 min en cada uno.

Posteriormente las preparaciones se incubaron a 37°C en SSC 2X por 30 min. para su maduración, al término de ésta se deshidratan por 2 min en series de etanol al 70%, 85% y 100% y se dejaron secar.

La desnaturalización del material celular se realizó con formamida al 70% en SSC 2X a pH 7.0 previamente calentada a 72°C por 3 minutos, se realizó un control estricto de la temperatura y tiempo de desnaturalización y de la cuál la deshidratación en etanol al 70%, 85% y 100% a -20°C.

5.3.1 PREPARACIÓN Y DESNATURALIZACIÓN DE LA SONDA

Las sondas para los Cocteles 13/21 y 18/X/Y ya venían desnaturalizadas previamente y sólo se colocaron 10 µl sobre la muestra. La sonda de secuencia única para el cromosoma 21 se mezcló con agua bidestilada y buffer, 1µl, 2µl y 7µl, respectivamente (10 µl en total) y se desnaturalizó a 73°C por 5 minutos.

5.3.2 HIBRIDACIÓN

Después de que la sonda se colocó sobre la muestra, se puso un cubreobjetos de 22 x 22 mm y se selló con cemento de goma. Se dejó en cámara húmeda cubierta de la luz y se dejó incubar a 37°C por 16 a 20 horas.

5.3.3 LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN

Al día siguiente, se removió el cubreobjetos y las laminillas fueron lavadas en 50 ml de SSC 0.4X/NP-40 al 0.3% a 73°C por 2 min y posteriormente en 50 ml SSC 2X/NP-40 al 0.1% a temperatura ambiente no más de 1 min, se dejó secar la laminilla y se agregó como contratinción 10 µl de DAPI/Antifade, se colocó cubreobjetos se sellaron con cemento de goma y se guardaron en la oscuridad al menos 15 min para su posterior análisis.

5.3.4 CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS

Por cada tres muestras que se corrieron, al mismo tiempo se utilizó un control negativo que fue una laminilla con amniocitos cultivados de un varón normal de la casa comercial Vysis y uno positivo con amniocitos de un mosaico de la misma casa comercial, de estos controles se analizaron de cada uno 50 células. La preparación de los reactivos para FISH se indica en el Apéndice.

5.3.5 ANÁLISIS

El análisis fue hecho en un microscopio de epifluorescencia (Olympus™), con los filtros (Chroma™) que se indican en la siguiente tabla:

Filtros utilizados para el análisis por FISH

Filtro	Color	Longitud de Onda (nm)
Banda única	Rojo	550-570
Banda única	Verde	491-515
Triple banda	Azul Verde Rojo	350-456 491-515 550-570

5.3.6 CRITERIOS DE ANÁLISIS

Los criterios de análisis fueron establecidos de acuerdo a los propuestos por Hogge y cols (1996):

- Mínimo 50 células examinadas
- Núcleos con bordes nítidos
- Núcleos con señales de intensidad y tamaño similar
- Se descartaron los núcleos que estaban sobrelapados
- Los núcleos con la señal partida en dos con una distancia menor al tamaño de la señal y que éstas fueran del mismo tamaño se tomaron como una señal
- Los núcleos con señal partida que tenían una distancia del tamaño de la misma entre sí se tomaron como dos señales
- Resultado normal: 80% de células con un número de señales normales.
- Resultados anormales: 70% de las células con un consistente número de señales
- Las muestras no informativas serán aquéllas que no cumplan con alguno de estos criterios.

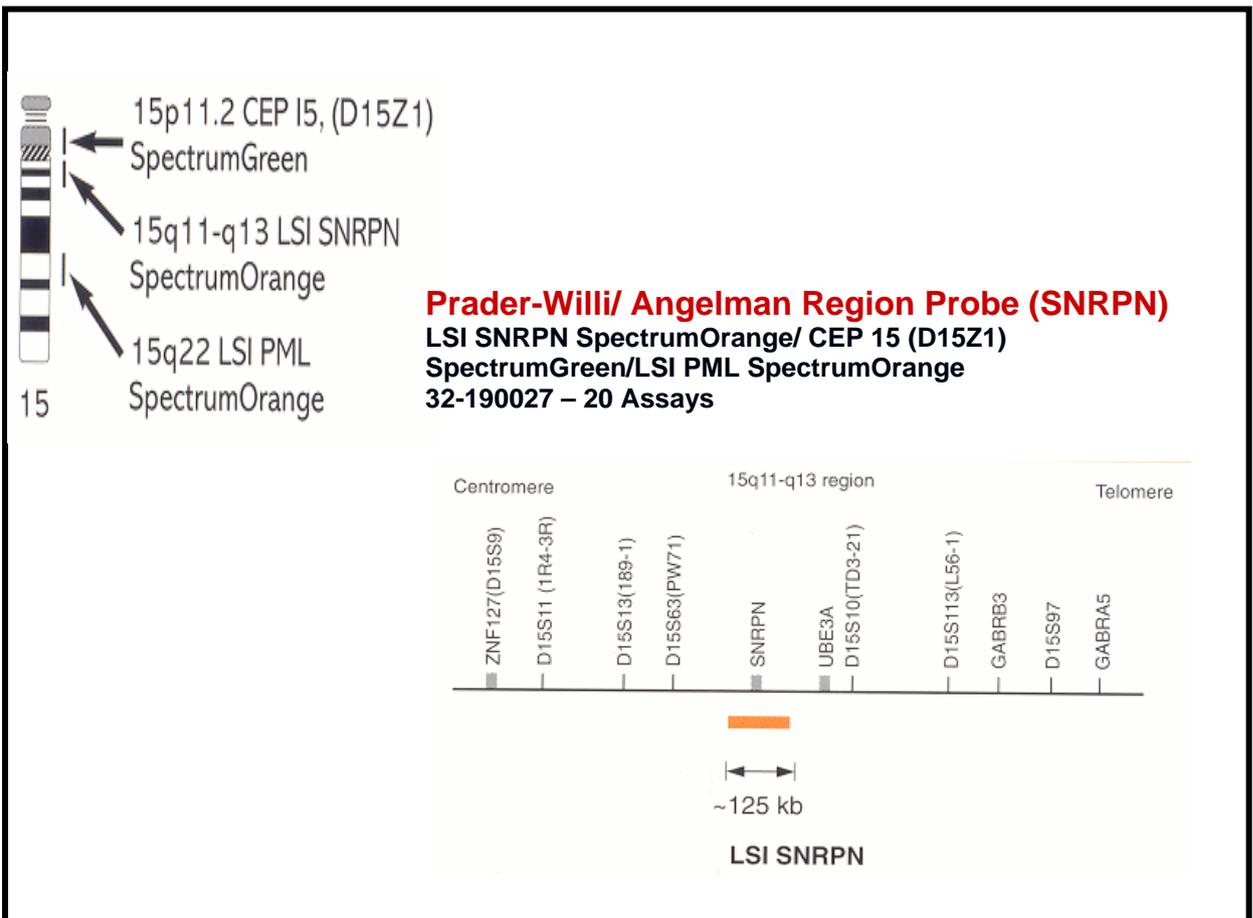


Figura 7. Esquema de la región de 125 kb utilizada como sonda. La línea roja indica localización del gen *SNRPN*. El ideograma muestra las regiones específicas que fueron detectadas con el coctel de sondas para el estudio de FISH.

5.4 EXTRACCIÓN DE ADN

EXTRACCIÓN DE DNA DE SANGRE PERIFÉRICA

- Extraer asépticamente 5 ml de sangre periférica.
- Colocar la sangre en un tubo de ensayo con EDTA.

IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA

- Nombre completo, institución de procedencia

Siguiendo la técnica de Cuevas Covarrubias modificada de Buffone y Darlington.

1. Transferir 3 ml de sangre a un tubo cónico de 15 ml y agregar un volumen igual de amortiguador TTS (Tris 10mM-Tritón 1%-Sacarosa 300mM), el Tris con pH 7.6. Invertir el tubo varias veces.
2. Centrifugar a 3000 rpm / 6 minutos; decantar con cuidado.
3. Agregar al botón 1 ml de amortiguador TTS. Agitar resuspendiendo el botón y pasar a un microtubo de 1.5 ml. Agitar hasta homogeneizar.
4. Centrifugar a 10000 rpm / 2 minutos en microcentrífuga. Decantar, añadir 1 ml de amortiguador TTS, resuspender.
5. Centrifugar a 10000 rpm / 2 minutos en microcentrífuga (repetir de dos a tres veces el paso anterior).
6. Al botón limpio agregar 570 μ l de NaCl 5mM. Agitar 2 minutos y colocar 30 μ l de SDS al 10%. Agitar 5 minutos y agregar 200 μ l de NaCl saturado. Agitar 10 minutos.
7. Centrifugar a 11500 rpm / 30 minutos a 4°C. Decantar el sobrenadante a un tubo de 13 x 100mm estéril.
8. Añadir 2 ml de etanol absoluto a -20°C para precipitar el ADN.
9. Tomar el ADN con una varilla de vidrio, enjuagar el ADN con etanol al 70%, dejar evaporar el etanol en condiciones estériles y posteriormente resuspender el ADN en un microtubo con 250 μ l de agua estéril, colocar en baño maría a 60°C durante 2 horas.

Las alícuotas de ADN se almacenaron a -20°C hasta su uso.

5.4.1 ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO, PARA CUANTIFICACIÓN DE ADN

En cuanto al análisis espectrofotométrico, éste consiste en determinar la absorbancia de una dilución 1:500 de la muestra a dos longitudes de onda (260nm y 280nm).

La lectura de 280 corresponde a las proteínas, y la relación 260/280 nos da la pureza de la muestra. A partir de la lectura a 260nm (correspondiente a los ácidos nucleicos), se calcula la concentración de la muestra:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = A_{260} \times (\text{dilución})^{-1} \times 0.05$$
$$1 \text{ D.O. } 260 = 50 \mu\text{g de ADN} / \text{ml} = 0.05 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

La cantidad total de ADN (en μg) se calcula:

$$\text{Mg totales de ADN} = \text{conc. } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) \times \text{volumen total } (\mu\text{l})$$

5.4.2 TÉCNICA DE ELECTROFORESIS

La electroforesis del ADN es la migración de éste, en base a su carga y al peso al aplicarse un campo eléctrico. Debido a su carga negativa, el ADN migra hacia el polo positivo. Esta técnica permite visualizar la calidad de la muestra (con el uso de tinción con bromuro de etidio), así como la presencia o ausencia de ARN contaminante y para el análisis de productos de PCR por visualización de la banda deseada.

Procedimiento:

Volumen 50ml.

Para calidad de ADN-gel al 1%% con 0.5 g agarosa.

Para productos de PCR-gel al 2% con 1 g de agarosa.

1. En un matraz Erlenmeyer se disuelve la agarosa en 50 ml de TAE 1X (Tris, Ácido acético glacial y EDTA), calentando la mezcla en un horno de microondas (restituir el agua que se pierde por evaporación), dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 50°C, colocar 1 gota de bromuro de etidio (0.625 mg / ml) y vaciar en el porta gel.
2. Dejar solidificar en el portagel colocando el peine.
3. Preparar TAE 1X para llenar la cámara.
4. Retirar el peine cuidadosamente para evitar romper los pozos.
5. Colocar el portagel en la cámara de electroforesis y añadir TAE 1X hasta cubrir el gel aproximadamente un milímetro por encima.
6. Mezclar 10 μ l de producto de PCR con 3 μ l de amortiguador de carga.
7. Colocar la muestra en el pozo y utilizar una escalera de 100pb como referencia.
8. Conectar los electrodos a la cámara y encender la fuente de poder a 70 volts.
9. Dejar correr la muestra durante 1 hora (aproximadamente 2/3 del largo del gel de agarosa).
10. Observar en el transiluminador de luz ultravioleta.

5.5 PCR METILACIÓN ESPECÍFICA (MS- PCR)

2 μg de ADN. Nota: Se prefiere con buen grado de pureza (libre de proteínas y ARN)

5.5.1 TRATAMIENTO CON BISULFITO

- Ajustar los 2 μg a un volumen de 20 μl . Nota. Ajustar la concentración en el menor volumen posible.
- Adicionar NaOH 3N a una concentración final de 0.3 N.
- 50 °C 20 minutos.
- 95 °C 5 minutos.
- Hielo con agua 3 minutos.

- Solución de Bisulfito pH = 5.
Nota. Todas las soluciones deben ser de elaboración reciente. Excepto el acetato de amonio.
 1. NaOH 10 N 400 μl
 2. Hidroxiquinoleína 10mM 500 μl
 3. 5.41 gr de bisulfito de sodio se disuelven en 8 ml de agua, temperatura de 50°C

- Adicionar 280 ml de solución de bisulfito.
- Incubación de 16 horas (+/- 15 minutos) a 50 – 55°C.

5.5.2 DESALINIZACIÓN

- Utilización de QIAEX II. Protocolo de desalinización y concentración de ADN en soluciones.
 - Adicionar 3 volúmenes (reacción de bisulfito) de amortiguador QX1(QIAGEN, 1018326), 2 volúmenes de agua y 5 μl QIAX II (perlas). Homogeneizar.
 - Centrifugar 1 minuto a 10,000 – 12,000.
 - Decantar, centrifugar y eliminar exceso.
 - Lavar 2 veces con 500 μl de amortiguador PE Wash buffer.
 - Centrifugar 1 minuto a 10,000 – 12,000.
 - Decantar, centrifugar y eliminar exceso.
 - Evaporar por 5 minutos a 50 °C o hasta que el botón esté blanco.
 - Eluir con 112 μl de H₂O (50 °C) por 10 minutos.
 - Centrifugar 2 minutos a 10,000 – 12,000.

5.5.3 DESULFONACIÓN

- Recuperar 110 μl del sobrenadante y ajustar a una concentración de 0.3 N de NaOH. Nota: el volumen final de la desalinización debe ser de 111 μl , adicionando 11 μl de NaOH 3 N.
- Incubar a 37 °C por 20 minutos.
- Adicionar 47 μl de Acetato de Amonio 10 M, 1 μg de acarreador y 600 μl de etanol absoluto.

5.5.4 PRECIPITACIÓN

- Precipitar de 1hr a 16 hrs a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Centrifugar por 30 minutos de 10,000 – 12,000, a 4 °C .
- Lavar con solución de etanol al 75%, 500 μl .
- Centrifugar por 15 minutos de 10,000 – 12,000, a 4 °C.
- Decantar y eliminar el exceso.
- Evaporar por 10 minutos a temperatura ambiente.

NOTA: Todos los reactivos y ADN modificado son fotosensibles, por lo que es necesario protegerlos de la luz.

5.5.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Se amplifican reacciones anidadas del gen de interés y de un control interno de metilación (promotor de un gen ubicuo, *ABL*). Cada ensayo de PCR, se realizó con PCR anidado

Cada muestra se realiza por duplicado.

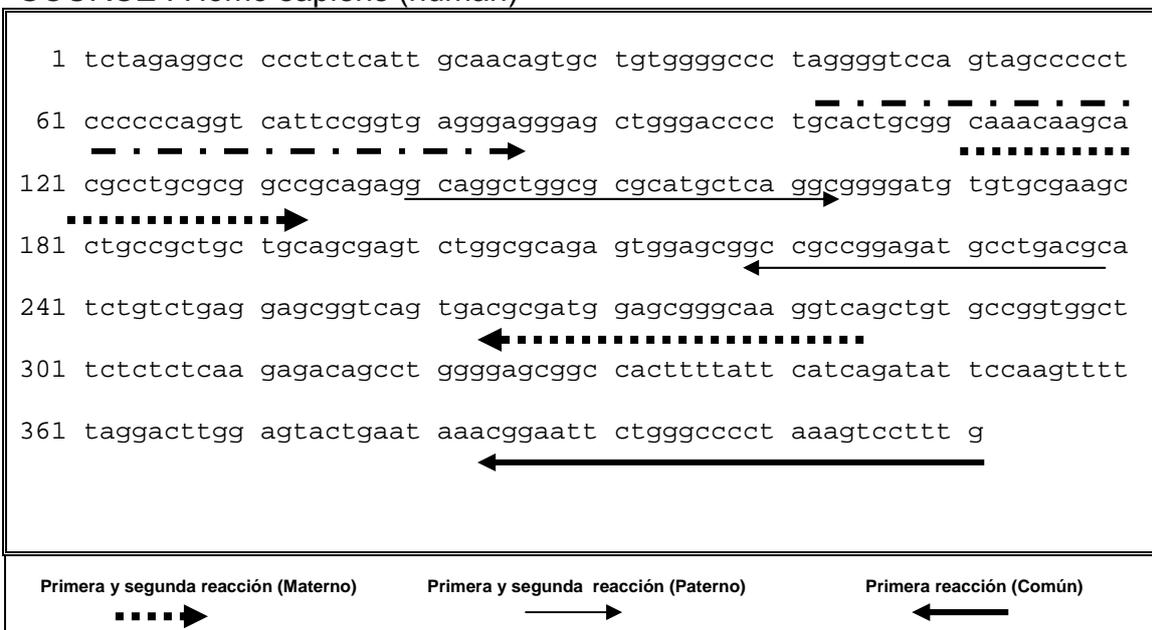
Cada análisis se realiza corriendo:

- Control normal
- Control de ADN metilado
- Control positivo (PW, FISH +)

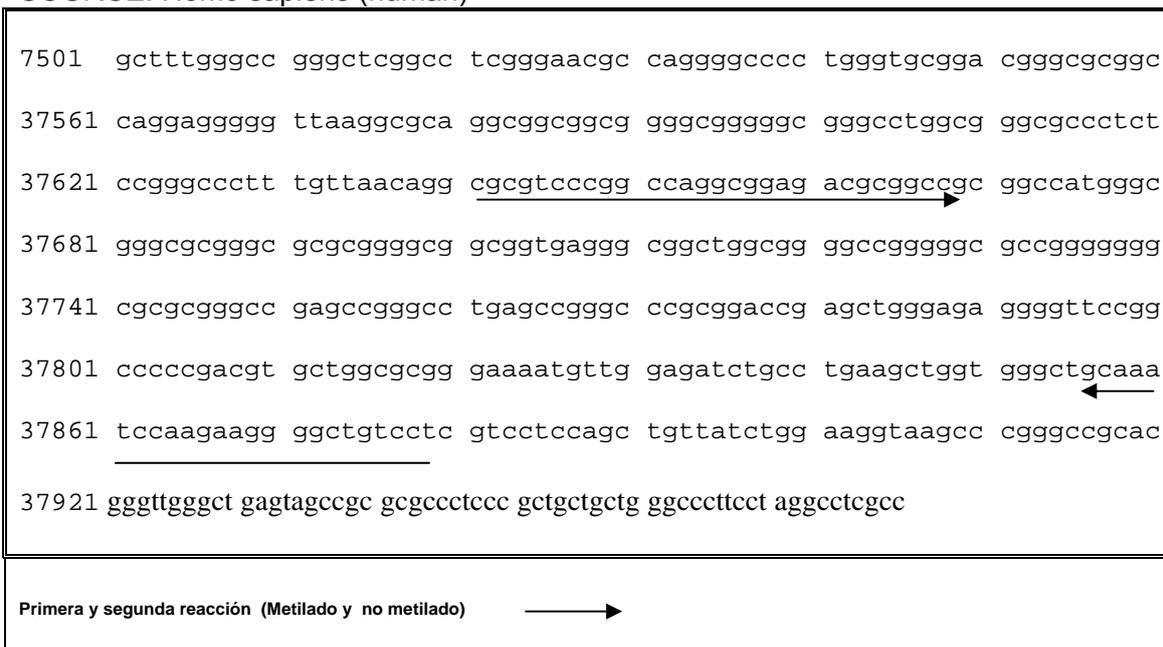
Stock	Concentración final
Buffer PCR 10X	Buffer PCR 1X
MgCl ₂ 25mM	MgCl ₂ 1.5 Mm
dNTPs 0.25 mM	dNTPs 0.2 Mm
Primers 1 mM	Primers 0.08 mM
BSA 2 mg/ml	BSA 0.2 mg/ml
Tritón 1%	Tritón 0.1%
Taq polimerasa Gold 5U/μl	0.02 U/μl
H ₂ O	---- reacción de 25μl

ADN para la 1ª reacción 5μl.
1ª reacción para el anidado 1μl

LOCUS HUMSNRPN 411 bp DNA linear PRI 15-DEC-1995
 DEFINITION Homo sapiens (clone: pX4.2) small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N (*SNRPN*) gene, exon alpha.
 ACCESSION: L32702
 VERSION: L32702.1 GI:530142
 KEYWORDS: small nuclear ribonucleoprotein-associated polypeptide N.
 SOURCE : Homo sapiens (human)



LOCUS: HSABLGR3 84539 bp DNA linear PRI 16-APR-2002
 DEFINITION: Human proto-oncogene tyrosine-protein kinase (*ABL*) gene, exon 1a and exons 2-10, complete cds.
 ACCESSION: U07563
 VERSION: U07563.1 GI:514264
 SOURCE: Homo sapiens (human)



6.- RESULTADOS

Se incluyeron un total de 26 pacientes con diagnóstico clínico de PWS procedentes del Servicio de Genética del HGM así como de diversas instituciones Nacionales (Tabla 9), todos los pacientes fueron evaluados por los Servicios de Genética, Pediatría o Endocrinología Pediátrica. En el servicio de Genética del Hospital General de México se re-evaluaron todos los casos aplicando los criterios y la escala de Holm (Tabla 12).

El grupo de pacientes con AS incluyó a 5 pacientes con criterios clínicos para AS, (Tabla 10).

El grupo control estuvo constituido por 14 individuos sin patología aparente, 8 hombres, 6 mujeres con un rango de edad de 18 -43 años.

PACIENTE	CRITERIOS MAYORES	CRITERIOS MENORES	TOTAL
1	5	1.5	6.5
2	4	2	6
3	7	4	10
4	5	4	9
5	8	2.5	9.5
6	6	3	9
7	5	3	8
8	6	2	7
9	4	2.5	6.5
10	5	2.5	7.5
11	8	4	12
12	5	2	7
13	7	5.5	12.5
14	6	3.5	9.5
15	5	3	8
16	8	5	13
17	5	2.5	7.5
18	4	3	7
19	5	2	7
20	6	2.5	8.5
21	4	3	7
22	6	2.5	8.5
23	6	3	9
24	8	4	12
25	7	3	10
26	3	3	6

Tabla 12: Escala de Holm en 26 pacientes con sospecha clínica de PWS

PWS

Escala diagnóstica de Holm

La distribución por sexo fue de 41.9% mujeres y 58.1% hombres. El diagnóstico clínico se realizó en la edad pediátrica (84.62%). Al analizar el puntaje diagnóstico obtenido con la escala de Holm se observó que: en la suma de criterios, el paciente 16 obtuvo el mayor puntaje (13 puntos, de los cuáles 8 fueron criterios mayores), mientras que los pacientes 2 y 26 obtuvieron el menor puntaje (6 puntos, con 4 y 3 criterios mayores respectivamente).

El promedio de puntos obtenidos fue de 9 puntos



Características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio

Todos los pacientes menores de 3 años estuvieron por arriba de la puntuación mínima: 5 puntos (mínimo 4 criterios mayores) Pacientes 5, 7, 8 y 22. Mientras que los pacientes mayores de 3 años: 8 puntos (mínimo 5 criterios mayores).

Los pacientes menores de 3 años obtuvieron una puntuación arriba de 5 puntos, de los cuales la hipotonía, problemas de alimentación, obesidad de tipo central de inicio temprano, hipogonadismo, retraso psicomotor y defecto molecular, fueron datos constantes. La hipotonía fue un signo constante en 11/26 pacientes, es interesante mencionar que en aquellos pacientes que no cumplieron con 4 criterios mayores al menos para la edad, la hipotonía no estuvo presente.

AS

En cuanto a las pacientes con diagnóstico clínico de AS, fueron evaluadas con los 22 criterios propuestos por Williams.

3 de 5 pacientes (60%), mostraron, un cuadro típico de AS

Dentro de los signos más constantes encontrados fueron:

- Hallazgos consistentes: Retraso mental severo, alteraciones del habla, ataxia, combinación de risa frecuente, aleteo de manos.
- Hallazgos frecuentes: Microcefalia, convulsiones de inicio temprano y EEG anormal
- Asociados: Macrostomía, lengua protruyente, prognatismo, sensibilidad incrementada al calor y atracción por el agua o superficies brillantes

ESTANDARIZACION

Para la estandarización de la técnica, utilizamos un control de metilasa (ADN metilado con M.SssI CpG metilasa, New England Biolabs), un control normal (individuo sano), un blanco (agua), la amplificación de un control de modificación (promotor de un gen ubicuo, *ABL*), amplificación de DNA no modificado con bisulfito de sodio con los primers específicos para la versión modificada, y la secuenciación de los productos modificados de los controles.

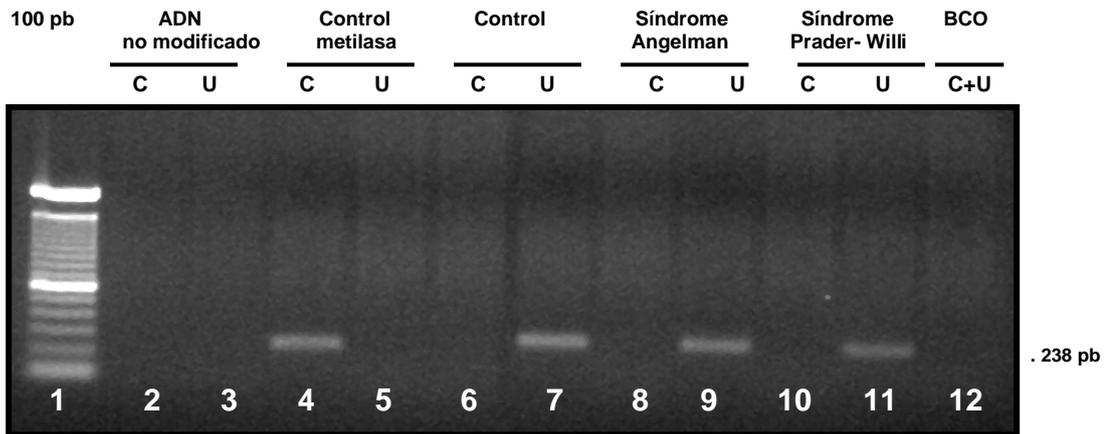


Figura 8: Análisis de metilación por modificación de bisulfito de sodio de la región promotora del gen *ABL*: gel de agarosa al 2%, carril 1 marcador de peso molecular (escalera 100 pb, carriles 2, 4, 6, 8 y 10 producto de amplificación para el promotor metilado del gen *ABL*, carriles 3, 5, 7, 9 y 11, MS-PCR para el promotor no metilado de *ABL*.

PACIENTE	METILACIÓN	FISH
5	Anormal	Negativo
8	Anormal	Positivo
9	Anormal	Positivo
11	Anormal	Positivo
14	Anormal	Positivo
15	Anormal	Positivo
16	Anormal	Positivo
22	Anormal	Positivo
23	Anormal	Positivo
24	Anormal	Negativo

Tabla 13: Resultados de MS-PCR y FISH en 10 pacientes con diagnóstico clínico de PWS

PACIENTE	METILACIÓN	FISH
2	Anormal	Negativo

Tabla 14: Resultados de MS-PCR y FISH en el paciente 2 con diagnóstico clínico de AS

Para corroborar nuestro resultado e identificar el mecanismo etiopatogénico, en todos los casos se realizó estudio de FISH. Se utilizó una sonda de secuencia única para identificar el gen *SNRPN* (~125 kb) y como sondas control, sonda centromérica para el cromosoma 15 (D15Z1) y sonda de secuencia única para la región 15q22 que contiene el gen *PLM*, este coctel de sondas es de la casa comercial Vysis. En 8/10 de los casos se demostró la presencia de una delección en 15q (Tabla 13) (Figura 10).

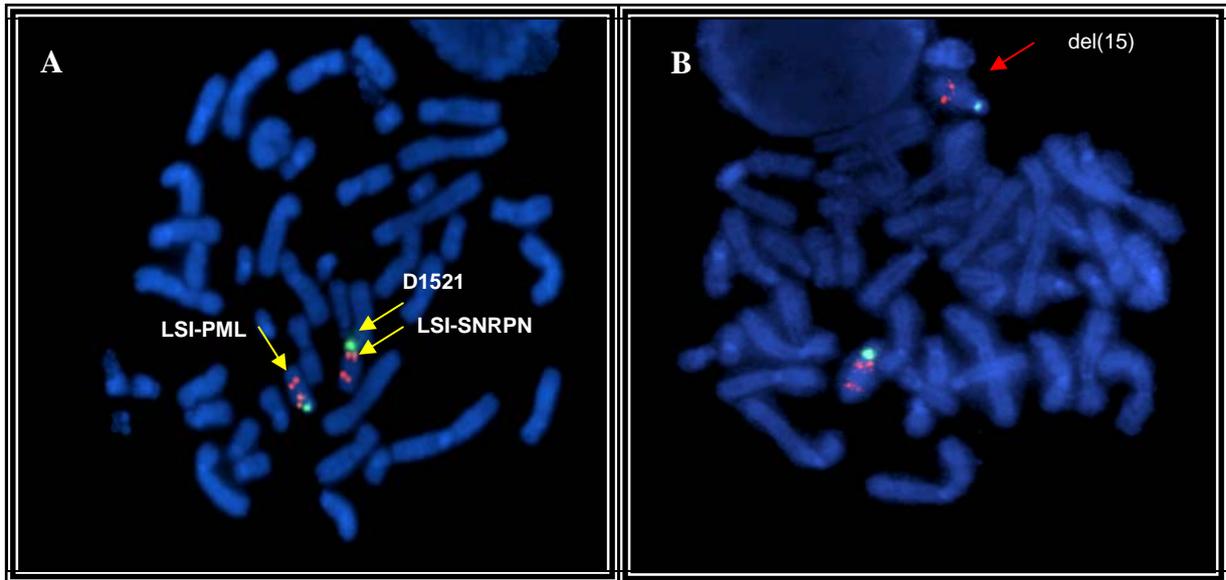


Figura 10: Análisis con FISH del gen *SNRPN*: (A) Metafase donde se muestra la hibridación de la sonda centromérica para el cromosoma 15 (verde), sonda de secuencia única para la región 15q22 *PLM* (naranja) y para la región crítica 15q11.q13. (B) Metafase en la cuál se observa la ausencia en uno de los cromosomas de la sonda para la región crítica, como lo muestra la flecha roja.

7.- DISCUSIÓN

El PWS constituye la causa más frecuente de obesidad de origen genético. Esta compleja patología con frecuencia presenta un diagnóstico clínico difícil y cuyas bases genéticas y moleculares son muy heterogéneas. Esta enfermedad ha servido como un modelo interesante para poder describir y entender varios aspectos moleculares como la UDP y la impronta genómica. Se calcula que a nivel mundial hay 350,000 a 400,000 afectados (Douglas C. Bittel y cols., 2005). El PWS se considera una de las afecciones genéticas y uno de los síndromes de microdelección más frecuentes; fue la primera patología en la que se reconoció la microdelección, la UDP y la impronta genómica en su origen. La participación y la importancia de la impronta y de la UPD se estableció al demostrar que una afección genética con un fenotipo completamente diferente como el Síndrome de Angelman, se producía con la presencia de una microdelección que también comprometía al segmento 15q11-q13, pero en el cromosoma de origen materno o bien cuando existía una UDP paterna (Buiting K y cols., 1994). La citogenética molecular ha permitido realizar el diagnóstico de certeza únicamente en 70% de los casos derivados de una delección, sin embargo, el resto de los pacientes permanece sin diagnóstico (Kuwano A y cols., 1992). La impronta genómica juega un importante papel en varias enfermedades genéticas en las que se incluye PWS/AS. La metilación diferencial del ADN de varios sitios en la región crítica del PWS/AS, nos permite detectar a pacientes con estos síndromes (Li y cols., 1993). Con el conocimiento de las características moleculares de la región y con la caracterización del gen *SNRPN* se ha podido avanzar en el diagnóstico molecular de esta entidad. Se conoce que este gen tiene la característica única de contener una isla CpG en la región promotora y esto genera un sitio metilado de forma diferencial. Por lo tanto un individuo normal tendrá el homólogo materno metilado y un homólogo paterno no metilado el cuál será transcripcionalmente activo. Independientemente del mecanismo etiopatogénico, los pacientes con PWS heredan únicamente el derivado materno (alelo metilado) de la región promotora del gen *SNRPN* y al realizar el ensayo de modificación con bisulfito de sodio, no se modificará el alelo materno. Esto se traduce en un patrón de bandas característico. En los pacientes con AS, el alelo materno no estará presente con excepción de mutaciones en *UBE3B*, por lo que al realizar la modificación con bisulfito de sodio, sólo amplificará en alelo modificado (alelo paterno, no metilado), evidenciándose un patrón paterno (Driscoll y cols., 1992; Glenn y cols., 1993; Glenn y cols., 1996; Takeo Kubota y cols., 1997). Estudios anteriores han mostrado que el estándar de oro en el diagnóstico de PWS es el análisis de metilación alelo específica para el gen *SNRPN*, este ensayo permite diagnosticar 99% de los casos PWS y 80% de AS independientemente del mecanismo etiopatogénico con excepción de mutaciones en el gen *UBE3A*. La propuesta de este trabajo es estandarizar y validar el ensayo de metilación alelo específica del gen *SNRPN* en los pacientes con diagnóstico clínico de PWS de varias instituciones del país y mostrar que este ensayo permite realizar un diagnóstico rápido y certero (American College of Medical Genetics 1997).

La validación de este ensayo se realizó en base a:

- 1.- Los primers utilizados son específicos para la versión modificada de la región del gen *SNRPN*.
- 2.- No existen secuencias polimórficas en los sitios de unión a los primers.
- 3.- Para eliminar los falsos negativos como control de metilación, se amplificaron secuencias del promotor ABL.
- 4.- Los falsos positivos se evitaron con reacciones PCR anidadadas, esto como consecuencia incrementó la sensibilidad y especificidad.

Las ventajas que observamos al implementar este método diagnóstico fueron:

- 1.- Se utilizan únicamente 2 μg de ADN genómico.
- 2.- Los resultados se obtienen en tres días.
- 3.- No se requiere el uso de reactividad.

El tener estandarizada esta prueba diagnóstica, la convierte en una herramienta útil en el diagnóstico de certeza de PWS. Se puede realizar diagnóstico oportuno en edad pediátrica, lo que evitará complicaciones a mediano y largo plazo. Es indispensable en aquellos pacientes que recibirán terapia con hormona de crecimiento y por supuesto de gran utilidad, en la evaluación de recién nacidos hipotónicos quienes podrían ser portadores de este síndrome. (Guillessen-Kaesbach y cols., 1995). Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico del PWS puede ser difícil de establecer a edades tempranas, esto debido a que en muchos casos sólo se observan manifestaciones sutiles y no específicas, como son la hipotonía neonatal, problemas para la alimentación y retraso psicomotor de grado variable. Existen ciertas reservas, al utilizar tan sólo los criterios diagnósticos de Holm, ya que se reporta que más del 17% de los pacientes con una prueba de metilación anormal para PWS, no cumplieron con estos criterios diagnósticos (Gunay-Aygun y cols., 2001). Al analizar el puntaje diagnóstico obtenido con la escala de Holm en nuestra serie de pacientes, se observó que: en la suma de criterios, el paciente 16 obtuvo el mayor puntaje (13 puntos, de los cuales 8 fueron criterios mayores), este caso mostró un patrón de metilación anormal, cuyo mecanismo etiopatogénico fue una delección intersticial. Todos los pacientes menores de 3 años (pacientes 5, 7, 8 y 22) estuvieron por arriba de la puntuación mínima, 5 puntos (mínimo 4 criterios mayores), de estos casos sólo, en los pacientes 5, 8 y 22 se confirmó el diagnóstico por prueba de metilación, mientras que el paciente 7 a pesar de haber obtenido una puntuación con un mínimo de 4 criterios mayores en la escala de Holm, se descartó el diagnóstico. La hipotonía, problemas de alimentación, obesidad de tipo central de inicio temprano, hipogonadismo, y el retraso psicomotor, fueron datos constantes, confirmándose únicamente el defecto molecular en 3/4 (75%) La media de los puntos obtenidos en los pacientes en los que se confirmó PWS fue de 9.5 puntos, por lo que en puntajes por arriba de 9 hay más probabilidad de acertar el diagnóstico, mientras que la media obtenida en pacientes en los cuáles se descartó PWS por estudio de metilación fue de 8.53.

La hipotonía fue un signo constante en 11/26 pacientes, es interesante mencionar que de estos 11 pacientes, en uno se descartó el PWS por prueba de metilación, por lo que observamos que aunque la hipotonía es un dato cardinal, no es un hallazgo característico de este padecimiento (Gillissen-Kaesbach y cols., 1995) .

La diferencia que hay en el total de puntos por la escala de Holm en los pacientes con PWS y en aquellos en los cuáles se descartó, es mínima y no concluyente. Por lo que la evaluación clínica por sí sola no es suficiente para realizar diagnóstico en los pacientes con sospecha clínica. Con los resultados obtenidos consideramos importante contar con un método sensible, rápido y relativamente económico para la evaluación de los pacientes con sospecha clínica de PWS (American College of Medical Genetics 1997). Los resultados obtenidos por MS-PCR en la serie analizada mostró que 10/26 (38%) de los pacientes con diagnóstico de sospecha de PWS mostraron patrones anormales de metilación, mientras que en el resto de los pacientes (62%) el patrón de metilación fue normal, descartándose PWS. Esto sugiere que debe realizarse diagnóstico diferencial con otras patologías. El FISH es el método de elección para la identificación de deleciones intersticiales del cromosoma 15q11-q13, sin embargo este método tiene limitaciones al no detectar UDP, ni alteraciones en el centro improntador (Kuwano A y cols., 1992). En nuestra serie 8/10 pacientes (80%) con diagnóstico por metilación, fueron debidos a una deleción intersticial 15q11-q13. Los 2 casos (paciente 5 y 24) que fueron FISH negativo, se podrían tratar de UDP, este mecanismo representa el 20%, cifra que concuerda con lo reportado en la literatura. En nuestros resultados los pacientes con deleción no tienen un puntaje clínico significativamente mayor con los casos sin deleción, por lo que la importancia en la relación genotipo-fenotipo no queda claramente demostrada en este estudio.

Concluimos que la prueba de metilación es suficiente para establecer el diagnóstico PWS, su alta sensibilidad hace que se considere el estándar de oro en el diagnóstico de esta entidad. Lo ideal es realizar un estudio completo, que incluya cariotipo, FISH y estudio de microsatélites para el diagnóstico de UDP con el fin de determinar el origen exacto de la afección y poder proporcionar un asesoramiento genético adecuado.

En cuanto a las pacientes con AS, se identificó únicamente 1/5 pacientes (20%) con patrón de metilación anormal, el estudio por FISH fue normal lo que descartó una microdeleción lo que nos hace sugerir que el mecanismo etiopatogénico sea: UDP o bien alteraciones en el centro improntador. En cuanto al resto de las pacientes analizadas que obtuvieron patrones de metilación normal, no excluye el AS. La prueba de MS-PCR tiene una sensibilidad del 80% para esta afección y esta prueba no detecta a aquellos pacientes con mutaciones en UBE3A.

8.- REFERENCIAS

Akefeldt A, Gilberg C, Larson C (1991) **Prader Willi syndrome in a Swedish rural country: Epidemiological aspects.** Dev Med Neurol 33: 715-721

Akefeldt A, Tornhage CJ, Gilbert C (1999) **A woman with Prader-Willi syndrome gives birth to a healthy baby girl.** Dev Med Child Neurol 41:789-90

American College of Medical Genetics (1997) **Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes:** Report of the ASHG/ACMG test and technology transfer committee

Arabella Smith, Lisa Robson, Luke Heaps (2002) **Use of two FISH probes provides a cost-effective, simple protocol to exclude an imprinting centre defect in routine laboratory testing for suspected Prader-Willi and Angelman syndrome.** Ann Genet:45;189-191

Aughton DJ and Cassidy SB (1990) **Physical features of Prader-Willi syndrome in neonates.** Am J Dis Child 144:1251-4

Bernhard Horsthemke (2005): **Prader-Willi Syndrome and Angelman Syndrome.** Encyclopedia on life sciences 1-4

Bolton PF, Dennis NR, Browne CE et al, (2001) **The phenotypic manifestations of interstitial duplications of proximal 15q, with special reference to the autistic spectrum disorders.** Am J Med Genet: 105; 675-685

Buckley RH, Dinno N, Weber P (1998) **Angelman syndrome:are the estimates too low?** Am j Med Genet: 80; 385-390

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD et al (1994) **Inherited microdeletions in Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinted center on human chromosome 15.** Nat Genet 1994; 9: 395-400

Burd L, Vesely B, Martsolf J, Kerbeshian J (1990) **Prevalence study of Prader-Willi syndrome in North Dakota.** Am J Med Genet 37:97-99

Butler JV Whittington JE, Holland AJ, Boer H, Clarke D, Webb T (2002) **Prevalencia of, and risk factors for, physical ill-health in people with Prader-Willi syndrome: a population- based study.** Dev Med Child Neurol 44:248-55

Butler MG, Bittel DC, Kibiryeveva N, Talebizadeh Z, Thompson (2004) **Behavioral differences among subjects with Prader-Willi syndrome and type I or type II deletion and maternal disomy.** Pediatrics 113:565-73

Butler MG, Lee PD.K and Whitman, B.Y., eds (2005) **Management of Prader-Willi Syndrome.** Springer-Verlag, New York, NY, USA

Cassidy SB, Forsythe M, Heeger S, etc (1995) **Phenotypic differences between patients with Prader-Willi syndrome due to deletion 15q and uniparental disomy 15.** Am J Hum Genet 57 Suppl:A20

Cassidy SB, Geer JS, Holm VA, Hudgins L (1996) **African-americans with Prader Willi syndrome are phenotypically different.** Am J Hum Genet 1996; 59:A21

Cassidy SB, Schwartz S (2003) **Prader-Willi syndrome.** www.Gene-clinics.org

Christian SL, Robinson WPP, Huang B et al (1995) **Molecular characterization of two proximal deletion breakpoint regions in both Prader-Willi and Angelman syndrome Patients.** Am J Hum Genet:57; 40-48

Chai JH, Locke DP, Greally JM, Knoll JH, Ohta T, Dunai J, Yavor A, Eichler EE, Nicholls RD (2003) **Identification of four highly conserved genes between breakpoint hotspots BP1 and BP2 of the Prader-Willi/Angelman syndromes deletion region that have undergone evolutionary transposition mediated by flanking duplicons.** Am J Hum Genet 73:898-925

Cox H, Bullman H, Temple IK (2004) **Maternal UPD(!4) in the patient with a normal karyotype: clinical report and a systematic search for cases in samples sent for testing for Prader-Willi syndrome.** Am J Med Genet A 127:21-5

Delach JA, Rosengren SS, Kaplan L, Benn PA (1994) **Comparison of high resolution chromosome banding and fluorescence in situ hybridization (FISH) for the laboratory evaluation of Prader-Willi syndrome and Angelman syndrome.** Am J Med Genet:52; 85-91

Dykens EM and Shah B (2003) **Psychiatric disorders in Prader-Willi syndrome: epidemiology and management.** CNS Drug 17: 167-78

Dykens EM, Cassidy SB, King HB (1999) **Maladaptive behavior differences in Prader-Willi syndrome due to paternal deletion versus uniparental maternal disomy.** Am J Ment Retard: 104; (1) 67-77

Douglas C. Bittel and Merlin G. Butler (2005) **Prader-Willi syndrome: Clinical genetics, cytogenetics and molecular biology**. Expertreviews in molecular medicine: 7(14); 1-19

Driscoll DJ, Water MF, Williams CA, Zori RT, Glenn CC (1992) **A DNA methylation imprinting, determined by the sex of the parent, distinguishes the Angelman and Prader-Willi syndromes**. Genomics 13:917-924

Eiholzer U and Whitman BY (2004) **A comprehensive team approach to the management of patients with Prader-Willi syndrome**. J. Pediatr Endocrinol Metab 17:1153-75

Galvan-Manso M, Campistol J, Conill J, Sanmarti Fx (2005) **Analysis of the characteristics of epilepsy in 37 patients with the molecular diagnosis of Angelman syndrome**. Epileptic Disord 7:19-25

Glenn CC, Porter KA, Jong MT, Nicholls RD, Driscoll DJ (1993) **Functional imprinting and epigenetic modification of the human SNRPN gene**. Hum Mol Genet 2:2001-5

Glenn CC, Saitoh S, Jong MTC, Fillibrandt MM. Driscoll DJ (1996) **Gene structure, DNA methylation and imprinted expression of the human SNRPN gene**. Am J Hum Genet 58:335-346

Guillessen-Kaesbach G, Gros S, Kaya-Weterloch S, Passarge E, Horsthemke B (1995) **DNA methylation based testing of 450 patients suspected of having Prader-Willi syndrome**. J Med Genet 32: 88-92

Gunay-Aygun M, Schwartz S, Heeger S, O'Riordon MA, Cassidy SB. (2001) **The changing purpose of Prader-Willi syndrome clinical diagnostic criteria and proposed revised criteria**. Pediatrics; 108:E92

Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswang LR, Whitman BY (1993) **Prader-Willi syndrome: Consensus diagnostic criteria**. Pediatrics 91:398-402

J Clayton-smith, Laan (2003) **Angelman syndrome: a review of the clinical and genetic aspects**. J Med Genet 2003;40:87-95

Keith D. Robertson (2005) **DNA methylation and human disease**. Nat Rev Genet:6; 597-610

Kuwano A, Mutirangura A, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Saitoh S, Niikawa N, Ledbetter SA, Greenberg F, Chinault AC (1992) **Molecular dissection of the Prader-Willi/Angelman syndrome region (15q11-13) by YAC cloning and FISH analysis.** Hum Mol Genet. Sep;1(6):417-25

Ledbetter, D. H.; Riccardi, V. M.; Airhart, S. D.; Strobel, R. J.; Keenan, B. S.; Crawford, J. D. (1981) **Deletions of chromosome 15 as a cause of the Prader-Willi syndrome.** *New Eng. J. Med.* 304: 325-329.

Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) **Role for DNA methylation in genomic imprinting.** Nature 366; 362-365

Ozcelik T, Leff S, Robinson W, Donlon T, Lalande M, Sanjines E, Schinzel A, Francke U (1992) **Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (SNRPN), an expressed gene in the Prader-Willi syndrome critical region.** Nat Genet 2:265-9

Petersen MB, Brondum-Nielsen K, Hansen LK, Wulff K (1995) **Clinical, cytogenetic, and molecular diagnosis of Angelman syndrome: estimated prevalence rate in a Danish country.** Am J Med Genet 60: 261-262

Prader, A.; Labhart, A.; Willi, H. (1956) **Ein Syndrom von Adipositas, Kleinwuchs, Kryptorchismus und Oligophrenie nach Myotonieartigem Zustand im Neugeborenenalter.** *Schweiz. Med. Wschr.* 86: 1260-1261

Mauricio Rodríguez Dorantes, Nelly Téllez Ascencio, et al (2004) **Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica.** Rev invest Clin : 56(1):56-71

Reik W. & Walter J. (2001) **Genomic imprinting: parental influence on the genome.** Nature Revi. Genet. 2 ,21-32

Roof E, Stone W, MacLean W, Feurer ID, Thompson T, Butler MG (2000) **Intellectual characteristics of Prader-Willi syndrome: comparison of genetic subtypes.** J Intellect Disabil Res 44: 25-30

Schrander-Stumpel CT, Curfs L, Sastrowijoto P, Cassidy SB (2004) **Prader-Willi syndrome: Causes of death in an international series of cases.** Am J Med Genet 124A:333-338

Schulze A, Mogensen H, Hamborg-Petersen B, Graem N, Ostergaars JR, Brondum-Nielsen K (2001) **Fertility in Prader-Willi syndrome: a case report with Angelman syndrome in the offspring.** Acta Paediatric 90:455-9

Siân E. Roberts, Nicholas R. Dennis, Caroline E. Browne, Lionel Willant, C Geoffrey Woods, et al. (2002) **Characterization of interstitial duplication and triplications of chromosome 15q-q13**. Hum Genet 110; 227-234

Smith A, Egan J, Ridley G, Haan E, Montgomery P, Williams K, Elliott E (2003) **Birth prevalence of Prader-Willi syndrome in Australia**. Arch Dis Child 88: 263-264

Stevenson DA, Anaya TM, Clayton-Smith J, Hall BD, van Allen MI, Zori RT, Zackai E, Frank G (2004) **Unexpected death and critical illness in**

Prader-Willi syndrome .Report of ten individuals. AmJ Med Genet 124A:158-164

Takeo Kubota, Soma Das, Susan L Christian, Stephen B. Baylin.(1997) **Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis**. Nat Genet: 16; 16-17

Veltman MW, Thompson RJ, Roberts SE, Thomas NS, Whittington J, Colton PF (2004) **Prader-Willi syndrome. A study comparing deletion and uniparental disomy cases with reference to autism spectrum disorders**. Eur Child Adolesc Psychiatry 13:42-50

Whittington JE, Holland AJ, Webb T, Butler J (2001) **Population prevalence and estimated birth incidence and mortality rate for people with Prader-Willi syndrome in one UK Health Region**. J Med Genet 38:792-798

Williams CA, Zori RT, Hendrickson J, Stalker H, Marum T, Whidden E, Driscoll DJ (1995) **Angelman syndrome**. Curr Probl Pediatr 25:216-31

Williams CA, Harry Angelman, Jill Clayton-Smith, Daniel J Driscoll, Jill E, Hendrickson, Robert T Zori (1995) **Angelman syndrome: Consensus for Diagnostic Criteria**. Am J Med Genet 56:237-238

Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B (1997) **A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus**. Eur J Hum Genet: 5; 94-98

Zori RT, Hendrickson J, Woolven EM, Gray B, Williams CA (1992) **Angelman syndrome: clinical profile**. J Child Neurol 7:270-80