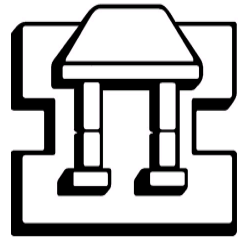




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Expresión de los genes *KCNQ1OT1 (LIT- 1)* y *H19* en pacientes con síndrome Beckwith-Wiedemann”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**BIOLOGA**

**PRESENTA**

**BADILLO SUAREZ PILAR AMELLALI**

**ASESORA:  
DRA. CAROLINA BARRIENTOS SALCEDO**

**Los Reyes Iztacala, 2008**

## **A Dios**

*Porque sin ti nada de esto hubiera sido posible, por ser mi guía, porque siempre encuentro en ti respuestas y tranquilidad, por proporcionarme todo para ser feliz y por permitirme estar aquí.*

## **A mis padres**

*Papá gracias por todo el amor y apoyo que me has brindado, por todas esas intensas jornadas de trabajo que te ocasionaban tanto cansancio pero que sin embargo soportabas con tal de ofrecernos algo mejor, gracias por ser un buen amigo y por permitirme ser una mejor persona.*

*Mamá, mil gracias por estar en todo momento a mi lado, por ser mi mejor amiga, por tratar de comprenderme, por conocerme tan bien y saber cuando necesito un abrazo, un beso o un regaño, porque nunca te has dejado vencer y has permanecido en pie a pesar de las adversidades, por enseñarme a luchar para alcanzar mis ideales, por la paciencia y la confianza que depositaste en mi desde que inicie este proyecto, por brindarme un gran ejemplo de responsabilidad, amabilidad y superación, por mostrarme que en este caótico mundo aún existen seres humanos tan bondadosos como tú. Gracias. Eres lo más hermoso que tengo en la vida te admiro y te amo tanto que me siento privilegiada por ser tu hija.*

*¡Mami lo logramos!*

## **A mi hermanito Giovanni**

*Por todo lo que tenemos en común, por las ilusiones compartidas, por todas las pláticas y las risas, por escucharme y apoyarme, por ser mi compañero de juegos y mi amigo, por todos estos años de convivencia, por enseñarme a ser más fuerte a defender lo que pienso y lo que soy, por cuidarme y preocuparte por mí.*

*¡Te admiro profundamente!*

## **A mis abuelitos**

*Porque en ustedes siempre encuentro un cálido refugio y por que me han permitido crecer en una familia llena de amor cuyos cimientos ustedes levantaron, convirtiéndolos en una construcción inquebrantable.*

## **A mis tías**

*Por ser un plausible ejemplo de trabajo, entrega, perseverancia y lucha*

*Tía Betty, por enseñarme a ser lo mejor que puedo ser en cada proyecto que emprendo, por tu ejemplo de excelencia y compromiso en todos los aspectos de la vida, por darme una muestra tangible de que todas las metas se pueden alcanzar sin dejar de lado nuestras convicciones, por todo el apoyo que has brindado a nuestra familia.*

*Tía Chabe, por tu cariño, por tus consejos, por compartir tus pensamientos, por tu ejemplo de fortaleza y valentía cuando se atraviesan situaciones complicadas, por tu dedicación, por regalarme una oportunidad de recuperar el tiempo perdido*

*Tía Ale, gracias por todo el tiempo que me has dedicado, por entregarme tu vida, por ser parte vital en mi formación, , por escucharme y por ser mi cómplice en la vida y en alguna que otra travesura, por tu ternura, por enseñarme a ser auténtica y a quererme como soy, por transformar las situaciones complicadas en divertidas, pero sobre todo :*

*“ Gracias por ser mi segunda madre ”*

*Tía Mosy, por ser un modelo a seguir, por tu honestidad, por tu disposición para ayudarme, porque siempre has tenido las palabras precisas para hacerme sentir bien, por enseñarme que a pesar de lo difícil que parezcan las cosas siempre hay una solución y hay que dar buena cara, por tu ejemplo de dedicación, éxito, sacrificio y compromiso.*

*Tía Male, por tu cariño, por todo el apoyo que me das, porque siempre me has tomado en cuenta y me has permitido vivir experiencias inolvidables, por escucharme cuando tengo algún problema y regalarme un cálido abrazo, por recordarme que no estoy sola, por hacerme reflexionar cuando es necesario, por confiar en mi, por tu ejemplo de superación y progreso.*

### **A mis tíos**

*Rey, Rodrigo y Adolfo gracias por su cariño y comprensión, por mostrarme que puedo contar con ustedes en cualquier instante, por estar conmigo en las situaciones más trascendentes de mi vida, por ser parte importante de mi familia.*

### **A mi primo Daniel**

*Por ser mi compañero de juegos, por tu cariño, por los sueños compartidos, y por tu ejemplo de fortaleza y superación a pesar de las situaciones difíciles que te ha presentado la vida.*

### **A mis primitas**

*Por ser mi luz en esos días en que todo parece nublado, por ser una de las razones primordiales de mi superación, por ser los angelitos que guían mi camino, por convertir mi vida en algo aún más maravilloso, por todas las risas que han motivado con sus ocurrencias, por hacerme sentir importante y especial, por permitirme ser parte de sus juegos y travesuras, por su cariño y amistad, por ayudarme a redescubrir un mundo lleno de fantasías. Xime y Marianita gracias, por la confianza que en mí han depositado, por tomar en cuenta mis consejos, porque siempre tienen las palabras necesarias para disipar cualquier problema cuando llego a casa agobiada o preocupada. A las bebés de la casa Gaby y Fer, por los abrazos y la alegría con la cual me reciben todos días, por el entusiasmo con el que realizan todas las cosas, por recordarme lo extraordinario que es, el ser niño.*

*¡ Las adoro nenas!*

### **A Paco**

*Por ser amor, mi amigo, mi compañero, mi confidente, mi cómplice, por tu comprensión, paciencia y confianza, por tus consejos, por tu apoyo incondicional, por los sueños compartidos, por que siempre estas a mi lado, por impulsarme a seguir en pie de lucha, por que siempre me cuidas y proteges, por hacerme sentir más plena, por hacer tuyos mis logros y mis problemas, por todo lo que hemos aprendido, , por los momentos de inmensa felicidad que hemos vivido, por hacer que la vida tenga un nuevo sentido, por ser lo más bello que me ha pasado, por despertar en mí las emociones y sentimientos más maravillosos del ser humano.*

### **A Mayra, Ruth e Ismael**

*Gracias por contribuir a que mi estancia en la facultad fuera la etapa más hermosa de mi vida y por enseñarme el verdadero significado de la amistad.*

*Mayrita, te agradezco infinitamente que nunca me hayas dejado sola, y que con esa alegría que te caracteriza me hicieras sonreír cuando las cosas parecían difíciles, por todo lo que de ti aprendí. Nunca te podría olvidar amiga y te estaré eternamente agradecida.*

*Ruth, por las experiencias que compartimos, por tu paciencia, por la comunicación que existió entre nosotras, por haber sido una excelente compañera de trabajo, por tu cariño y afecto, por haber sido una buena amiga.*

*Isma, por haber permanecido a mi lado desde el momento en que nos conocimos, por disipar mis dudas, por esas horas de estudio compartidas, por las pláticas que nos ayudaban a entender al mundo y nos enseñaron a crecer, por tu honestidad y ternura, gracias por permitirme hallar en ti a un extraordinario ser humano al que tengo el gusto de llamar hermano, te quiero.*

### **A mis compañeros y amigos de laboratorio**

*Por el apoyo que me brindaron, por haber hecho más agradable mi estancia en el laboratorio, por todas esas horas de trabajo compartido, por esas largas pláticas que tuvimos mientras salía un PCR.*

*Araceli y Alma por la confianza que en mi pusieron.*

*Silvia gracias por permitirme descubrir que dentro de una gran mujer puede seguir viviendo una niña dispuesta a disfrutar cada instante y hacer feliz a los demás.*

*José, gracias por tu ejemplo, por recordarme que muchos dones y aptitudes pueden converger en una misma persona haciéndola mucho más extraordinaria.*

*José Luis, gracias por el tiempo que dedicaste en la revisión minuciosa de este trabajo, por tus comentarios y recomendaciones, por la confianza que depositaste en mi, por escucharme, por ser un buen amigo.*

***A mis compañeros y amigos de la carrera***

*Rosibel, Erica, Gaby, Nectalí, Led, José Luis y David, por todo el tiempo compartido en clases y fuera de las aulas, por la convivencia, por todos los momentos agradables que disfrutamos en las prácticas de campo, por las pláticas frecuentes, por sus consejos, por su compañía, por contribuir a que estos años de estudio fueran más divertidos.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Respeto a quien me revela sus ideas, estimo a quien me confía sus sueños...

A los miembros de la Comisión Dictaminadora, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, por sus consejos y sugerencias:

Dr. Ricardo Mejía Zepeda.

Dra. M. Elena Hernández Caballero.

M. en C. Irma Elena Dueñas García.

Dr. Diego Julio Arenas Aranda; por haberme dado la oportunidad de introducirme en el complejo pero a la vez espléndido mundo de la “genética” y la “biología molecular”, gracias por su confianza, por su paciencia, por compartir sus conocimientos, por el tiempo dedicado, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo y en especial por darme la oportunidad de conocer y trabajar con una mujer a la que admiro profundamente:

Dra. Carolina Barrientos Salcedo; por su sabia dirección, por el aprendizaje otorgado, por sus consejos tanto profesionales como personales, por su tiempo, por su ejemplo, por brindarme apoyo constante, por su comprensión en todo momento, por su paciencia y confiar en mí, por forjar en mi un carácter más fuerte y analítico, por mostrarme cuán maravilloso es el mundo de la investigación.

¡ Gracias Doctora !

Por la ayuda que me brindaron en repetidas ocasiones, por sus comentarios y recomendaciones en alguna de las fases experimentales de este trabajo, por disipar algunas dudas que surgían:

Dra. Rosenda Peñalosa.

Dr. Normand García.

QFB. J. Antonio Cervantes.

QFB. Mario Flores.

Señor Antonio Rivera.

M en C. Alejandro Monsalvo Cruz.

Dra. Ma. Antonieta Araujo Solís.

Dr. Juan Carlos Huicochea Montiel

Dra. Georgina Arteaga A.

A la U.N.A.M. por abrirme las puertas de este recinto y por permitirme sentir el orgullo de ser universitario, por la formación académica que me otorgo, por permitirme crecer como persona y por ser una parte trascendental de mi vida.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por haber sido mi segundo hogar durante todos estos años y por todas la oportunidades de crecimiento otorgadas.



*“ No debemos escuchar a la gente que nos aconseja renunciar a las cosas inmortales bajo pretexto de que somos mortales. En la medida de lo posible, debemos volvernos inmortales y hacerlo todo para vivir conforme a la parte más excelente de nosotros mismos ”.*

*Aristóteles.*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....  | 4  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 6  |
| SINDROME DE BECKWITH-WIEDEMAN.....  | 7  |
| GENES RELACIONADOS CON EL SBW.....  | 10 |
| EPIGENÉTICA Y CÁNCER.....   | 18 |
| ANTECEDENTES.....   | 23 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 25 |
| HIPÓTESIS.....  | 26 |
| HIPÓTESIS NULA.....   | 26 |
| OBJETIVO GENERAL.....   | 27 |
| OBJETIVOS PARTICULARES.....   | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 28 |
| PACIENTES.....  | 28 |
| Separación de leucocitos a partir de sangre periférica.....               | 28 |
| Extracción de RNA total.....  | 29 |
| Cuantificación de RNA.....  | 29 |
| Transcripción reversa y reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)..... | 30 |
| Visualización de los productos de PCR.....                                | 34 |
| Purificación de los productos de PCR a partir de geles de agarosa.....    | 34 |
| Marcado para secuenciación.....   | 34 |
| Secuenciación automatizada de los productos de PCR.....                   | 34 |
| RESULTADOS.....   | 36 |
| RT-PCR de los genes.....  | 37 |
| Análisis de la expresión de UNAM del gen <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> .....     | 38 |
| Análisis de la expresión de RNAm del transcrito <i>H19</i> .....          | 42 |
| Secuenciación de <i>H19</i> .....   | 46 |
| Secuenciación de <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> .....                             | 48 |
| DISCUSIÓN.....  | 54 |
| CONCLUSIONES.....   | 59 |
| PERSPECTIVAS.....   | 59 |
| GLOSARIO.....   | 60 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 62 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla1.</b> Características clínicas del SBW y su incidencia.....   | 8  |
| <b>Tabla2.</b> Incidencia de los mecanismos etiológicos del Síndrome Beckwith-Wiedemann.....                                     | 17 |
| <b>Tabla3.</b> Iniciadores utilizados.....   | 31 |
| <b>Tabla4.</b> Comparación de los promedios de las concentraciones de RNA.....   | 36 |
| <b>Tabla5.</b> Características fenotípicas relevantes de los pacientes en estudio.....   | 38 |
| <b>Tabla6.</b> Expresión de los genes <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> y <i>H19</i> de los pacientes analizados y su tipo de herencia..... | 44 |
| <b>Tabla7.</b> Análisis de la muestra secuenciada de <i>H19</i> en el BLAST.....   | 47 |
| <b>Tabla8.</b> Análisis de la muestra secuenciada de <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> en el BLAST.....                                     | 49 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura1.</b> Brazo corto del cromosoma 11 de humanos.....  | 10 |
| <b>Figura2.</b> Orientación de transcripción de los genes <i>H19</i> de <i>IGF2</i> en el alelo materno.....                              | 11 |
| <b>Figura3.</b> Orientación de la transcripción de los genes <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> y <i>CDKN1C</i> en la región cromosómica 11p15.5..... | 11 |
| <b>Figura4.</b> Expresión del alelo materno para el gen <i>H19</i> y del alelo paterno para <i>IGF2</i> .....                             | 12 |
| <b>Figura5.</b> Dominios del locus 11p15.....   | 13 |
| <b>Figura6.</b> Genes imprintados en la región cromosómica 11p15.....   | 14 |
| <b>Figura7.</b> Ciclo celular (G1).....   | 15 |
| <b>Figura8.</b> Alteración de patrones de metilación del DNA en la tumorigénesis.....   | 21 |
| <b>Figura9.</b> Separación de leucocitos mediante gradientes de densidad.....   | 28 |
| <b>Figura10.</b> Localización de los iniciadores diseñados para <i>H19</i> en la secuencia del RNA.....                                   | 32 |
| <b>Figura11.</b> Localización de los iniciadores diseñados para <i>KCNQ1OT1 (LIT-1)</i> en la secuencia del RNA.....                      | 33 |
| <b>Figura12.</b> Gel de azarosa al 2% para el análisis cualitativo de RNA con los dos métodos de extracción.....                          | 37 |
| <b>Figura13.</b> Gel de azarosa al 1.5% para observar productos purificados del gen <i>LIT-1</i> y del gen <i>H19</i> .....               | 37 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura14.</b> Corrimiento electroforético en gel de azarosa a1.5% de <i>KCNQ1OT1(LIT-1)</i> ,teñido con bromuro de etidio ;del gen <i>KCNQOT1(LIT-1)</i> de(BW-1)a(BW-3).Amplificación de <i>HPRT</i> de (BW-1)..... | 39 |
| <b>Figura15.</b> Gel de azarosa al 1.5% para observar productos de PCR del gen <i>KCNQOT1(LIT-1)</i> .....  | 40 |
| <b>Figura16.</b> Gel de azarosa al1.5% para observar amplificado de <i>KCNQ1OT1(Lit-1)</i> ;de pacientes(BW-9)y(BW-10).Amplificación de <i>HPRT</i> de(BW-9).....   | 41 |
| <b>Figura17.</b> Corrimiento electroforético en gel de azarosa al 1.5% de <i>H19</i> ,teñido con bromuro de etidio de(BW-1)a(BW-3)y personas sanas.....   | 42 |
| <b>Figura18.</b> Gel de azarosa al 1.5% para observar productos de PCR del gen <i>H19</i> de(BW-4)a(BW-7).Amplificación de <i>HPRT</i> de(BW-7).....  | 43 |

PilarAmellaliBadilloSuárez

## RESUMEN

**Introducción.-** El Síndrome Beckwith Wiedmann (SBW) (OMIN#130650) se caracteriza por sobrecrecimiento asociado con visceromegalia, macroglosia, alteraciones de la pared abdominal, hipoglucemia neonatal. Su forma de herencia es compleja, 15% de los pacientes con SBW presentan un tipo de herencia autosómica dominante, con penetrancia incompleta y expresividad variable, y en 80%, de los casos se presenta de forma esporádica; se relaciona con herencia epigenética. La etiopatología de este síndrome se asocia con mutaciones en los genes *P57 (KIP2)* y *NSD1*; con microdeleciones en el gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* así como en la región diferencialmente metilada de *H19*, lo que da como resultado pérdida de impronta en *IGF2*; todos estos genes se encuentran ubicados en la región cromosómica 11p15.5 y participan en la regulación del ciclo celular y en el control del crecimiento. El gen más frecuentemente alterado se conoce como Transcrito 1 de solapamiento con *KCNQ1 (LIT-1)* que expresa el alelo paterno. Mientras que el gen *H19* se expresa por el alelo materno y actúa como supresor tumoral. Se han registrado dos regiones reguladoras de impronta, diferencialmente metiladas, que controlan la expresión de los genes localizados en 11p15.5. **Objetivo.-** Analizar la expresión del mRNA de los genes *KCNQ1OT1 (LIT-1)* y *H19* en sangre periférica de pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann. **Materiales y métodos.-** Se obtuvieron muestras de sangre periférica de diez pacientes, de sus padres y de dos individuos sanos y se extrajo RNA total mediante columnas de purificación (RNEASY). Se realizó síntesis de cDNA y se amplificaron regiones polimórficas de *KCNQ1OT1 (LIT-1)* y *H19* respectivamente, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando al gen hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (*HPRT*) como control de expresión. **Resultados.-** Se observó expresión normal (monoalélica) del gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* en ocho de los pacientes, en los padres de estos, y en los individuos sanos; mientras que no hubo expresión en dos pacientes con SBW. En el gen *H19* se observó expresión monoalélica en nueve pacientes, observándose ausencia del transcrito en un paciente. **Conclusiones y Discusión.-** Estos resultados sugieren que puede existir hipermetilación de las regiones reguladoras de impronta o bien de la región promotora de ambos genes en los pacientes con SBW. En los dos pacientes en los que se observó alteración en la expresión del gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* y el paciente que presentó falta de expresión de *H19*, de acuerdo a lo informado en la literatura, existe un riesgo incrementado a desarrollar tumores, ya que la

alteración de expresión de los genes estudiados están relacionados con la presencia de hepatoblastoma, rabdomiosarcoma, gonadoblastoma, tumor de Wilms u otros tumores. Por lo anterior se sugiere continuar el estudio y aplicándose otras metodologías para la identificación del origen parental de los alelos.

## INTRODUCCIÓN

Existe un gran número de patologías que son atribuidas a causas genéticas, y se estima que 30% de los ingresos pediátricos a hospitales corresponden a este tipo de padecimientos, que se transmiten a través de los gametos. Dentro de las enfermedades genéticas, se ha determinado que existen entidades que tienen una etiología asociada con alteraciones en el fenómeno conocido como impronta, ésta es una modificación epigenética, en donde se expresan de forma diferencial los alelos de un gen e influyen en el fenotipo del individuo. La impronta genética depende de la herencia de los patrones de expresión de genes que no están determinados por el orden de la secuencia genética; esto se debe, entre otras cosas, a que los genes se expresan o no dependiendo de ciertas modificaciones, como la metilación de citosinas en las regiones promotoras y la modificación de histonas, que incluye acetilación y fosforilación (Mesa *et al.*, 2006).

La impronta genética es modulada por marcadores epigenéticos de las regiones reguladoras de impronta, que conducen a la expresión monoalélica en las células somáticas. Los marcadores de impronta se establecen en la línea germinal. La modificación de histonas marca la metilación materna o paterna de las regiones reguladoras de impronta en diferentes formas en los estadios tempranos de la división y diferenciación celular (Kevin *et al.*, 2007).

La metilación de las citosinas es una modificación del DNA, donde un grupo metilo es transferido desde S- adenosilmetionina a una posición C-5 de citosina por una metiltransferasa. La metilación del DNA ocurre, casi exclusivamente en dinucleótidos CpG teniendo un papel importante en la regulación de la expresión de los genes.

En el genoma humano existen aproximadamente 156 genes distribuidos en diferentes cromosomas que se agrupan en dominios y se regulan por el mecanismo de impronta genómica y de los cuales muchos residen en regiones que se asocian con enfermedades como la diabetes y el cáncer (Luedi *et al.*; 2008).

El cambio en la forma de manifestarse de los genes improntados, se relaciona con su origen parental. Por ejemplo, los alelos de un gen tendrán una impronta materna si la región promotora del alelo de la madre está silenciada por metilación o algún otro evento epigenético y se expresará únicamente el alelo paterno (Reik *et al.*, 2001). De acuerdo a un estudio computacional el 56% de los locis expresados son del alelo materno y el 44% del paterno (Luedi *et al.*; 2008).



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pérdida de heterocigocidad de la región 11p15.5 ocurre en muchos de los tumores esporádicos tales como los neuroblastomas, cáncer de mama y cáncer testicular entre otros, involucrando la retención de los alelos parentales. Esta pérdida está involucrada con la etiología del Síndrome Beckwith-Wiedemann; en la cual existen genes supresores de tumor; como el gen *H19*, así como factores de crecimiento como *IGF2*. Esto condiciona a los pacientes a un riesgo mayor para desarrollar tumores, principalmente embrionarios. Por esta razón es importante el diagnóstico molecular temprano del síndrome. Se ha reportado que los pacientes con SBW tienen del 7 al 22% de riesgo para desarrollar neoplasias (Weksberg *et al.*, 2001).

La situación se agrava debido a que los cánceres en niños presentan una velocidad de progresión tumoral mayor debido a que los mecanismos moleculares de iniciación son diferentes por la edad, como consecuencia de las características metabólicas de los tejidos en crecimiento rápido del neonato (Yong *et al.*, 2004).

El diagnóstico es únicamente clínico ya que es una enfermedad congénita y una vez diagnosticada se le da de alta al paciente, este no tiene seguimiento médico mismo que es indispensable dada la mayor predisposición a cáncer en los primeros cinco años de vida. Debido a las características de crecimiento de los cánceres de la infancia, es importante el conocimiento de las alteraciones en la expresión de los genes involucrados para diferenciar a los pacientes con los genes *H19* y *KCNQ1OT1 (LIT-1)* alterados en su expresión que puede asociarse con mayor probabilidad para desarrollar tumor de Wilms u otras neoplasias asociadas al síndrome.

Por esta razón este trabajo de tesis proporcionará una herramienta pronóstica molecular, útil para justificar el seguimiento clínico de aquellos pacientes con alteraciones en dos genes relacionados con el cáncer.

## SÍNDROME DE BECKWITH-WIEDEMANN

Fue descrito de forma independiente por John Bruce Beckwith y Hans Rudolf Wiedemann en 1963 y 1964 respectivamente. El Síndrome Beckwith Wiedemann (SBW) (OMIN#130650) es una de las enfermedades relacionada con modificaciones epigenéticas que ha cobrado gran importancia en los estudios genéticos; éste se caracteriza por el sobrecrecimiento y mayor predisposición o predisposición aumentada para desarrollar tumores embrionarios (Elliot *et al.*, 1994); siendo el más frecuente el tumor de Wilms, seguido del carcinoma adrenocortical, hepatoblastoma y neuroblastoma. Por esta razón SBW se ha tomado como un modelo humano para el estudio de los factores genéticos de predisposición al cáncer.

El diagnóstico es generalmente clínico y posnatal, aunque algunos casos se pueden diagnosticar por ecografía con base en hallazgos como polihidramnios, y placentomegalia (Elliot *et al.*, 1994).

Por lo que es necesario tomar en cuenta durante el periodo prenatal los datos más característicos de este síndrome: polihidramnios, deterioro de la deglución debido al crecimiento fetal acelerado que se manifiesta principalmente a partir de la semana 25 que no necesariamente rebasa al 90% y finalmente el onfalocele el cual puede ser detectado en el segundo trimestre del embarazo, por el incremento del tamaño de la placenta, generalmente al doble de lo normal (Olivo *et al.* 2002).

Los signos mayores de este síndrome son: macroglosia, macrosomia pre o postnatal, defectos de la pared abdominal (onfalocele, hernia umbilical, diastasis de los rectos abdominales). Mientras que los signos menores son: anomalías renales, hipoglucemia, apéndices preauriculares, *nevus flammeus*, defectos cardíacos congénitos, hepatomegalia, nefromegalia, hemihipertrofia, criptorquidia, desarrollo del ya mencionado tumor de Wilms en la infancia (Tabla 1).

De todos estos signos, la hipoglucemia al nacimiento que se presenta en más del 50% de los pacientes es la que pone en mayor riesgo al neonato, tanto de fallecer como de presentar déficit neurológico posterior como consecuencia de ésta, la macroglosia puede producir dificultad para la alimentación y ser la causa de hipoglucemia, con la edad esta característica se aminora (Badía *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Características clínicas del SBW y su incidencia.

| Características Clínicas       | Porcentaje de Incidencia |
|--------------------------------|--------------------------|
| Macroglosia                    | 99%                      |
| Macrosomia                     | 87%                      |
| Defectos de la pared abdominal | 77%                      |
| Anormalidades renales          | 62%                      |
| Hipoglucemia                   | 59%                      |
| <i>Nevus flameus</i> facial    | 62%                      |
| Hemihipertrofia congénita      | 13%                      |
| Malformaciones Cardiacas       | 9%                       |
| Neoplasias                     | 4%                       |
| Retardo Mental                 | 4%                       |
| Polidactilia                   | 3%                       |
| Paladar hendido                | 3%                       |

La incidencia de este síndrome no ha sido reportada para nuestro país, sin embargo para Estados Unidos se estima que es de 1 en cada 13,700 nacimientos, con aproximadamente un porcentaje similar en varones y en mujeres (Martínez y Martínez, 1996). El promedio de la curva de crecimiento para ambos sexos es paralelo a niños sanos en un 95%, lo cual se asocia con un envejecimiento óseo avanzado hasta el final de la infancia. El aceleramiento de esta curva se hace menos evidente en la juventud. Por lo que la pubertad ocurre en edades normales y se presenta una disminución del sobrecrecimiento generalizado.

No obstante la verdadera incidencia puede ser subestimada a causa de que muchos diagnósticos se pierden o no son realizados, situación que se ha presentado en algunos adultos en los cuales se pasó por alto en el nacimiento o en la infancia debido a que tan solo presentaban una expresión mínima del fenotipo. (Martínez *et al.*, 1996). Esto ocasiona que se pierda el lazo genético familiar cuando se realizan los historiales médicos, poniendo en riesgo a las generaciones posteriores, en caso de que éste se presente de manera dominante.

La asimetría de crecimiento del tipo hemihipertrofia ocurre solamente en el 13% de los casos, la cual es evidente al nacer y llega a ser más notoria cuando el niño crece (DeBaun *et al.*, 1998). El ritmo de crecimiento en el cuerpo puede afectar el cuerpo entero o sólo ciertos órganos y tejidos. Los órganos más frecuentemente afectados, incluyen

riñones, hígado, bazo y páncreas. Las anomalías cardiovasculares como la cardiomegalia, han sido ocasionalmente reportadas en un 15.5%, y constituyen una verdadera complicación.

La genética de este síndrome es compleja y debido a que involucra impronta genómica y predisposición aumentada a cáncer, se ha logrado un mejor entendimiento de la relación de este mecanismo con el cáncer. En el SBW se han descrito tres formas de herencia: I) esporádica, II) familiar y III) asociada a alteraciones cromosómicas (Marcus *et al.*, 2003).

Para la primera forma de herencia no se ha establecido riesgo de recurrencia, para la segunda se ha descrito un patrón autosómico dominante que puede presentar penetrancia incompleta y expresividad variable. En los dos primeros casos no hay alteraciones citogenéticas a diferencia de la última en la que se pueden encontrar duplicaciones del cromosoma 11, inversiones en el 11p distal, o translocaciones balanceadas que rompen esta región (Li *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que de las tres formas de herencia la asociada a alteraciones cromosómicas sólo se presenta en un 5% de los casos, precedida por la autosómica dominante con un 15%, mostrando así que el porcentaje mayor de los casos con SBW se manifiesta de forma esporádica 80%.

La disomía uniparental del cromosoma 11 (UPD, por sus siglas en inglés) consiste en la presencia de ambos cromosomas homólogos heredados de un solo progenitor, generalmente del padre como causa de la no disyunción; se presenta en el 20% de los casos esporádicos al igual que otras alteraciones en la impronta de los genes localizados en este locus y que han sido caracterizados como genes paternos promotores de crecimiento o genes maternos que suprimen el crecimiento, entre los más importantes se encuentran los genes *CDKN1C* o *p57<sup>KIP2</sup>*, *H19*, *IGF2* y *KVLQT1 (KCNQ1)* y *KCNQ1OT1* (Figura 1), para los que se han descrito dos regiones de agrupamiento que regulan la impronta mediante metilación: *BWSCR1* y *BWRCS2* ( Marcus *et al.*, 2003).

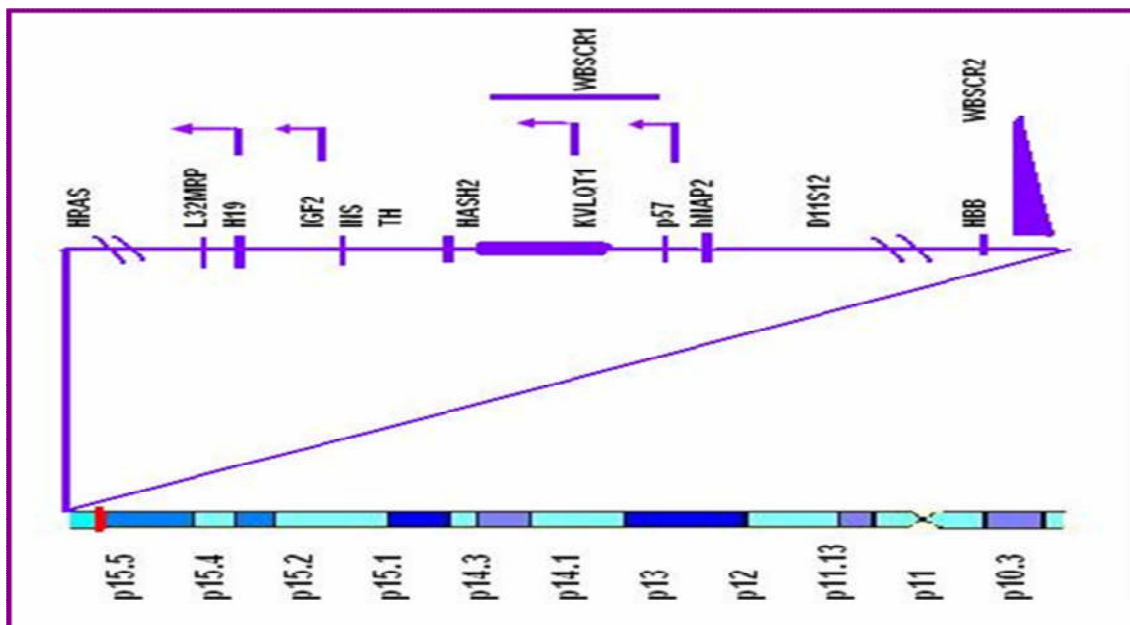
Sin embargo, cuando se da la desregulación de impronta en el dominio telomérico se incrementa la predisposición para desarrollar tumores, mientras que la desregulación del dominio centromérico está involucrada en malformaciones pero no en el desarrollo de neoplasias (Weksberg *et al.*, 2001).

Para poder corroborar el diagnóstico de este síndrome se puede establecer un estudio citogenético, no obstante como se comentó previamente las alteraciones cromosómicas se presentan solo en el 5% de los casos y se requiere de técnicas de alta resolución de citogenética molecular.

Recientemente se ha comenzado aplicar el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de los *loci* polimórficos de 11p15.5 para detectar alteraciones en la expresión de los alelos improntados (Weksberg *et al.*, 2003).

## GENES RELACIONADOS CON EL SBW

En el *locus* 11p15.5 los genes que se expresan solamente en el cromosoma materno son *H19*, *CDKN1C* y *KVLQT1* mientras que en el cromosoma paterno los genes expresados son *IGF2* y *KCNQ10T1* o “*LIT1*” (Transcrito 1 de sobrelapamiento con *KCNQ1*) (Yong *et al.*, 2004).

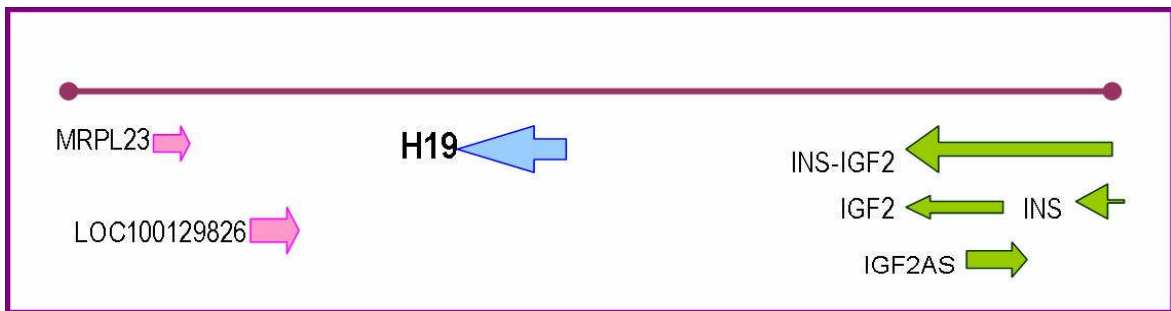


**Figura 1.** Brazo corto del cromosoma 11 de humanos, amplificando región 11p15.5. Las flechas indican la orientación de la transcripción (Tomado y modificado de Li *et al.*, 1998).

Esta región cromosómica (11p15.5) se encuentra dividida en dos dominios regulados por dos centros improntadores (Weksberg *et al.*, 2003). En el primero (dominio

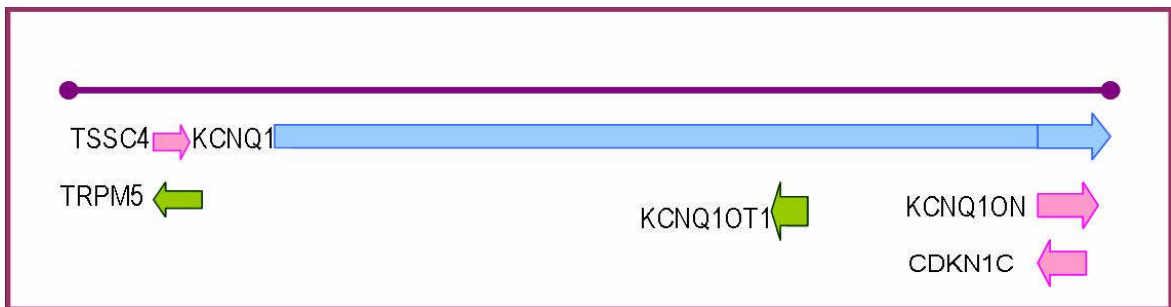
1) se encuentran los genes *H19* e *IGF2*, y la región diferencialmente metilada 1 (DMR), la cual regula la expresión de ambos genes, por la que ha sido postulada como uno de los dos centros imprintadores.

El gen *IGF2* codifica para el factor 2 de crecimiento de tipo insulina que se expresa durante el desarrollo fetal mientras que el gen *H19* codifica para un transcrito no traducido, que funciona como supresor tumoral (Figura 2).



**Figura 2.** Expresión de los genes *H19* e *IGF2* en el alelo materno y orientación de su transcripción (Tomada de Rump et al., 2005).

En el segundo (dominio 2) se localiza *CDKN1C*, de expresión materna y que codifica para un inhibidor de CDK (p57<sup>KIP2</sup>), que regula en forma negativa la proliferación celular, el gen *KVLQT1* y el transcrito *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) (Figura 3).

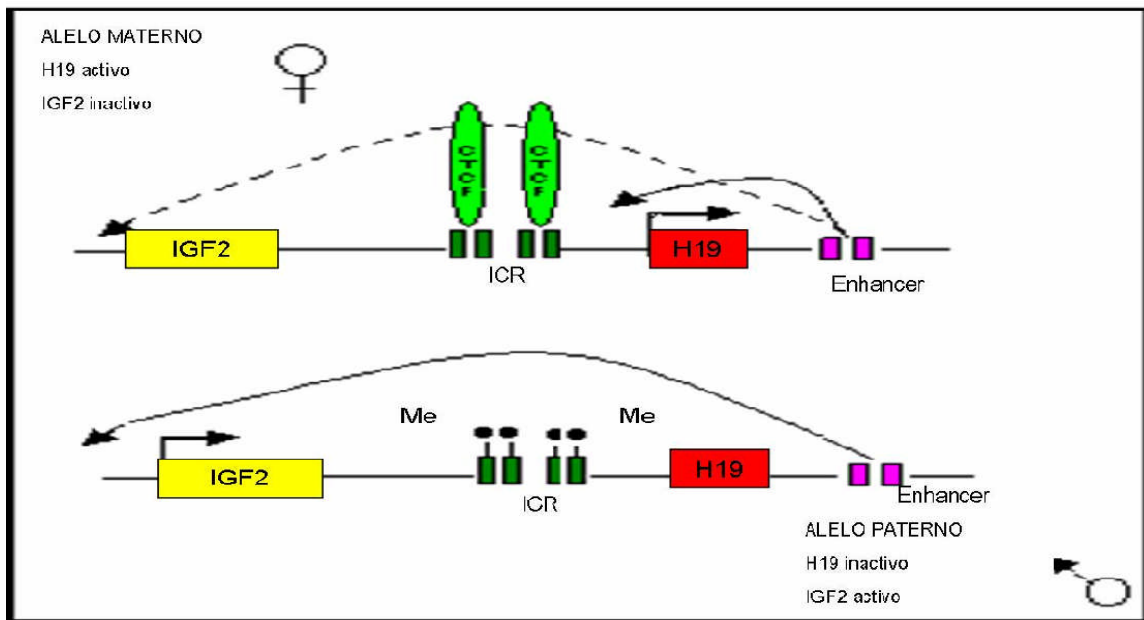


**Figura 3.** Orientación de la transcripción de los genes *KCNQ1OT1* y *CDKN1C* en la región cromosómica 11p15.5 (Tomado de Rump et al., 2005).

La impronta de *IGF2* y *H19* está controlada por la región reguladora de impronta ICR, localizada varias kilobases río arriba del gen *H19*. La actividad de esta región está modulada por la región diferencialmente metilada. En el cromosoma materno ICR (centro regulador de impronta) no está metilado y actúa como aislador reprimiendo la transcripción de *IGF2* (Figura 4) (Weksberg et al., 2003 y Li et al., 1998).

El centro regulador de impronta contiene cuatro sitios conservados de unión para una proteína con dedos de zinc llamada CTCF la cual bloquea el acceso del potenciador al promotor de *IGF2*. De esta forma se activa y se transcribe la copia materna de *H19*. El alelo paterno de la región (DMR)1 al sufrir metilación, no permite la unión a la proteína CTCF y el promotor de *IGF2* puede interactuar con el potenciador, lo que evita la transcripción de *H19* (Horike *et al.*, 2000).

Li *et al.*, 1998 reportaron que del 25 al 50% de los pacientes con SBW sufren pérdida de impronta de *IGF2* ocasionando que el alelo materno que generalmente está silenciado se active; evento que ocurre principalmente en los casos esporádicos.

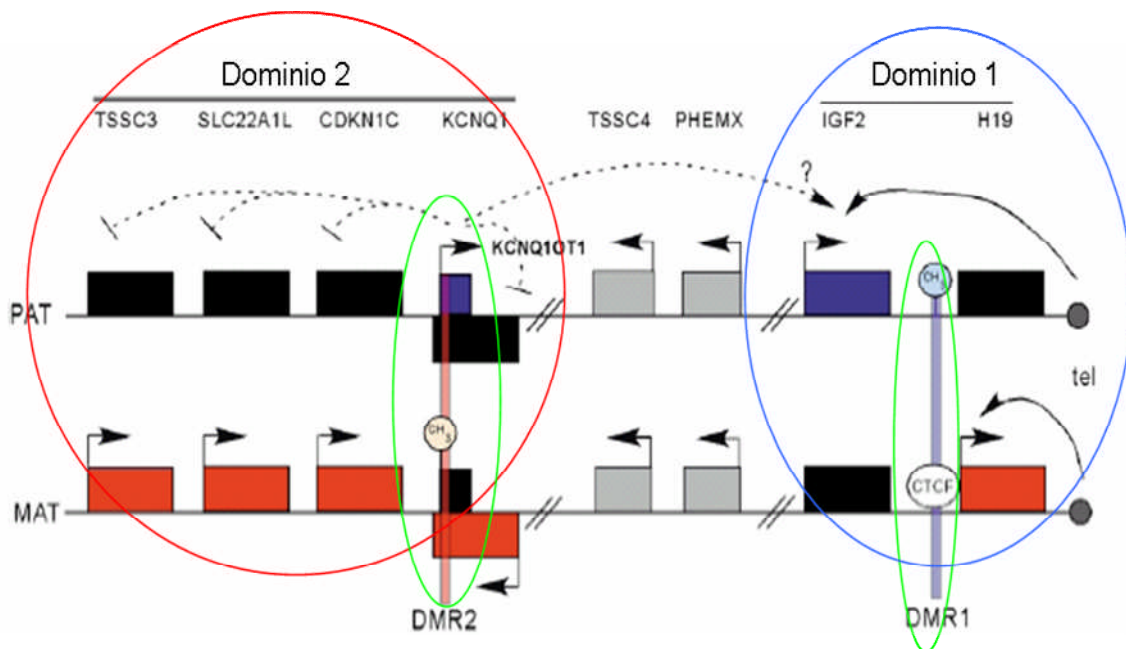


**Figura 4.** La expresión del alelo materno para el gen *H19* y del alelo paterno para *IGF2*; es el resultado de la metilación diferencial del ICR implicado en el silenciamiento de *H19* en el alelo paterno y el materno de *IGF1* (Tomado de Gabellini *et al.*, 2003)

*CDKN1C* codifica para una cinasa dependiente de ciclina. Es importante mencionar que las mutaciones que se presentan en este gen son causantes de SBW, las cuales son frecuentemente asociados con la forma autosómica dominante. En el dominio 2 también se encuentra el gen *KVLQT1* el cual codifica para una molécula que forma parte de los canales de potasio y cuya pérdida de impronta también se relaciona con el síndrome en estudio (Du *et al.*, 2004).

La región (DRM)2 se encuentra en el intrón 10 de *KVLQT1* y el alelo paterno no está metilado lo que permite la expresión de un transcrito largo llamado *KCNQ1OT1*, o *LIT-1*, el cual se transcribe en dirección antisentido a *KVLQT1* (Figura 5) (Horike *et al.*, 2000, Du *et al.*, 2004, Niemitz *et al.*, 2004)

La función de este transcrito antisentido aún no es conocida pero se ha comprobado que la sobreexpresión de éste afecta la expresión de *CDKN1C* contribuyendo de esta manera al fenotipo de SBW. Las islas CpG (*KvDMR*) que se encuentran río arriba de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*), se encuentran específicamente metiladas en el alelo materno que está silenciado (Figura 5) (Gaston *et al.*, 2001)

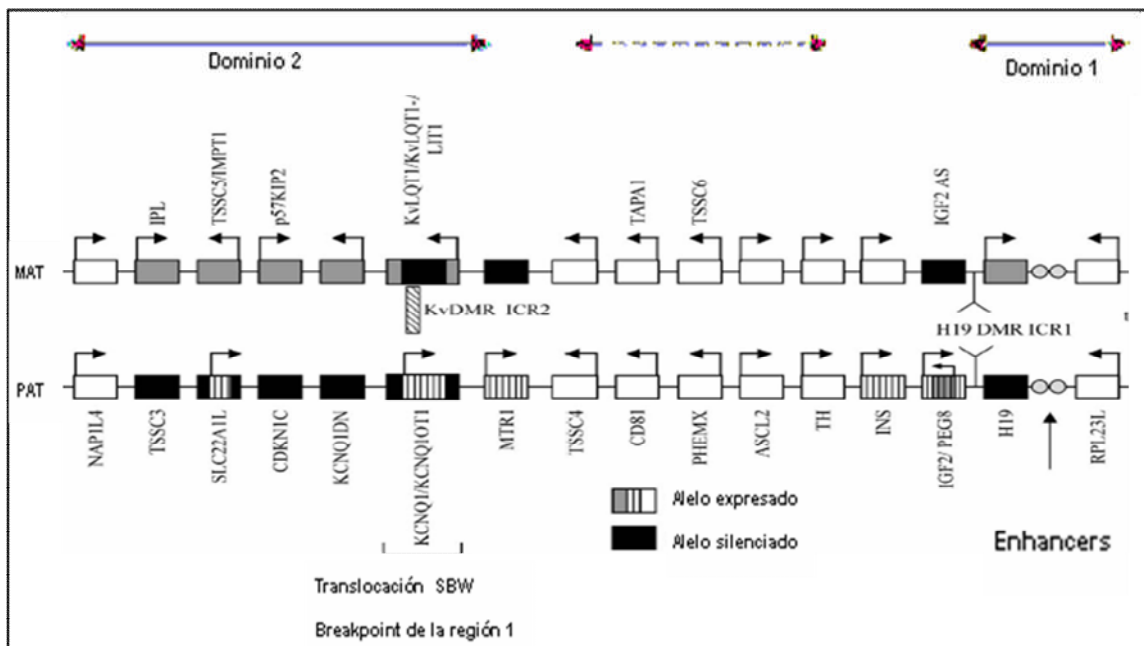


**Figura 5.** Dominios del locus 11p15. El círculo azul agrupa los dos genes pertenecientes al dominio 1 y su DMR1 (verde). Mientras que el rojo muestra los cinco genes ubicados en el dominio 2 y DMR2 (verde). Los genes de color gris que se encuentran en medio de los dos dominios son genes no improntados. (Tomado de Weksberg *et al.*, 2003)

La metilación materna de la región diferencialmente metilada (DMR)2 promueve el silenciamiento de *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) y por lo tanto, la expresión de diversos genes de origen materno incluyendo *CDKN1C* y *KVLQT1* (Cooper *et al.*, 2005). Esto sugiere que este transcrito antisentido regula negativamente en *cis* la expresión de genes cercanos a él. Con base a este evento, se ha descrito que la eliminación de las islas CpG de



*KCNQ1OT1* (*LIT-1*) ocasiona la disminución de la expresión del mismo gen y la activación de la expresión del alelo paterno de *KVLQT1* y *CDKN1C* (Figura 6). Lo cual posibilita a este transcrito, para que regule la expresión de varios genes y, de esta forma, junto con la región (DMR)2, funcionen como reguladores de la impronta en el dominio 2 (Rahmn *et al.*, 2005).



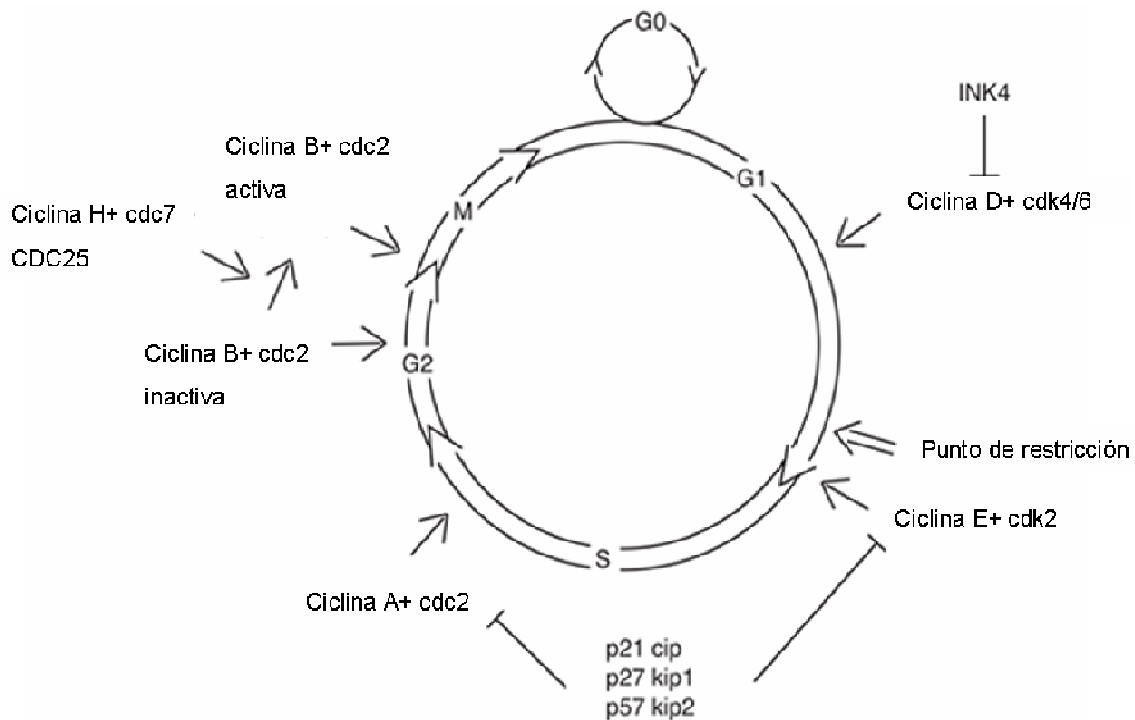
**Figura 6.** Genes improntados en la región cromosómica 11p15. Se muestra la expresión y silenciamiento de los genes en el alelo materno (Mat.) y el paterno (Pat.), las DMR y los transcritos antisentido de expresión exclusivamente paterna. (Tomada de Du *et al.*, 2004).

La pérdida de impronta en *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) se ha relacionado con la presencia de este síndrome en gemelos monocigotos (Weksberg *et al.*, 2002). Por otro lado la desmetilación aislada del transcrito en pacientes con SBW que ha sido reportada en casos familiares, también se ha relacionado con la presencia de tumores embrionarios que presentan menor incidencia que el tumor de Wilms como el rhabdomiocarcinoma, gonadoblastoma y hepatoblastoma (Bliiek *et al.*, 2004).

Se ha reportado que más de la mitad de los pacientes con SBW presentan expresión bialélica de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*), acompañado por la pérdida en la metilación del alelo materno de (DMR)2, convirtiéndose entonces en la alteración epigenética más común en SBW. La pérdida de la impronta (LOI por sus siglas en inglés) en *KCNQ1OT1* (*LIT-1*), involucra hipometilación y activación del alelo materno normalmente silenciado.

Se cree que el blanco de la LOI en *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) es *CDKN1C* reprimiendo la transcripción del gen (Minje *et al.*, 2004). La delección de la región diferencialmente metilada que se encuentra en el dominio 2 lleva a la activación del alelo paterno de *CDKN1C* y *KVLQT1*.

La LOI *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) afecta a *CDKN1C* ya que generalmente funciona como represor transcripcional de este gen al aislarlo de su potenciador (Du M *et al.*, 2004). Sin embargo al no encontrarse expresado *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) pierde su función reguladora, razón por la cual *CDKN1C* (cinasa dependiente de ciclinas) que interviene en el ciclo celular se transcribe constantemente y a su vez codifica para un inhibidor de p57, regulando en forma negativa la proliferación celular, contribuyendo al descontrol en el ciclo celular y a la proliferación celular acelerada. Esto se debe a que este gen pertenece a la familia de inhibidores Cdk, incluyendo a p27<sup>KIP1</sup> Y P21<sup>CIP1</sup> que actúan como inhibidores en toda la fase G1/S del ciclo celular.



**Figura 7.** Ciclo celular (G1) Activación de CDKs e inhibidores de CDKs (S) síntesis de DNA. Una vez que las células entran en la fase S, la ciclina E se degrada y ciclina A entra en complejos con cdk2. INK4 inhiben la actividad de diversas ciclina D-quinasas dependientes. Cip / Kip proteínas inhiben específicamente ciclina E-cdk2 y ciclina A-cdk2. (Tomada de Li *et al.*, 2001)

Recientemente se ha informado que en algunos casos de pacientes con SBW, que tienen pérdida de la impronta en *KCNQ1OT1 (LIT-1)*, también la presentan en *IGF2*, lo que apoya la posibilidad de interacciones reguladoras entre los dos dominios improntados. (Weksberg *et al*, 2003).

La importancia del estudio molecular de los genes involucrados en el síndrome, radica en la posibilidad de establecer correlaciones fenotipo-genotipo. Como la disomía uniparental paterna de la región 11p15.5 la cual se asocia a casos de hemihipertrofia aislados y a tumor de Wilms (Shuman *et al.*, 2002). La pérdida de impronta de *IGF2* se ha relacionado con el sobrecrecimiento y la predisposición a desarrollar tumores embrionarios, riesgo que se incrementa cuando se encuentra involucrada la pérdida de impronta de *H19*. La hipermetilación de *H19* y la disomía uniparental, han sido asociadas con la aparición del tumor de Wilms y en ocasiones con hepatoblastoma (Murrell *et al.*, 2004).

Los neuroblastomas, así como la presencia de onfalocele y paladar hendido se han relacionado con mutaciones del gen *CDKN1C*, a las que se les atribuye el tipo de herencia autosómica dominante en el SBW (Li *et al.*, 2001; y Wayne *et al.*, 1999).

En resumen entre los mecanismos etiológicos del SBW, se encuentran modificaciones en la expresión diferencial de los alelos, disomía uniparental, (mecanismo de herencia no conocida) y en algunos casos alteraciones cromosómicas de origen parental específico. Translocaciones balanceadas heredadas por vía materna que involucran a la región 11p15.5, duplicaciones en el cromosoma 11 de origen paterno y la pérdida de impronta (LOI) la cual provoca la pérdida de expresión alelo-específica (Yong *et al.*, 2004).

**Tabla 2.** Incidencia de los mecanismos etiológicos del Síndrome Becwith- Wiedemann.

| Frecuencia | Tipo de herencia  | Mecanismo Etiológico  |
|------------|---|---|
| 40-50%     | <ul style="list-style-type: none"><li>• Esporádico</li><li>• Familiar</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• LOI de <i>LIT-1</i> o hipometilación de <i>KvDMRI</i></li></ul>   |
| 20-30%     | <ul style="list-style-type: none"><li>• Esporádico</li></ul>                    | <ul style="list-style-type: none"><li>• LOI de <i>IGF2</i></li></ul>  |
| 5-10%      | <ul style="list-style-type: none"><li>• Esporádico</li></ul>                    | <ul style="list-style-type: none"><li>• LOI de <i>H19</i> o hipermetilación de <i>H19 DMR</i>, microdelecciones de <i>H19 DMR</i></li></ul>   |
| 40%        | <ul style="list-style-type: none"><li>• Familiar</li></ul>                      | <ul style="list-style-type: none"><li>• Mutaciones puntuales en <i>CDKN1C</i></li></ul>   |
| 20%        | <ul style="list-style-type: none"><li>• Esporádico</li></ul>                    | <ul style="list-style-type: none"><li>• Disomia uniparental Isodisomia segmentaria paterna o de 11p15.5</li></ul>   |
| 1-3%       | <ul style="list-style-type: none"><li>• Esporádico</li><li>• Familiar</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• Alteraciones cromosómicas que involucren 11p15</li><li>• Duplicaciones del cromosoma 11, por vía paterna</li><li>• Inversiones y translocaciones, por vía materna</li></ul> |

## EPIGENÉTICA Y CÁNCER

Existe un equilibrio particular en cada órgano en lo concerniente a proliferación y muerte celular. A este estado fisiológico se le denomina cinética celular normal y se regula en cada tejido según su función. La ruptura de este equilibrio a favor de la acumulación de células, ya sea por mecanismos genéticos o epigenéticos, es la esencia del origen de las neoplasias. Este proceso durante el cual las mutaciones sucesivas convierten una célula normal en un clon de células neoplásicas se denomina carcinogénesis o tumorogénesis (Ferbeyre *et al.*, 2005)

El cáncer es definido como un conjunto de enfermedades que tienen en común que se originan de una serie de modificaciones en la información genética de las células somáticas lo que conduce a la desregulación de los procesos celulares y a la alteración de la capacidad celular para mantener controlado el crecimiento (Weksberg *et al* 2001). La afectación de cada función celular varía con el tipo de tumor. La gran mayoría requiere de inicio de cuatro a siete mutaciones en genes claves para que se produzca la progresión neoplásica.

El ritmo normal de mutaciones y sus mecanismos de reparación, así como las vías hacia la apoptosis, se ven afectados en el cáncer, ya que de forma habitual las células son capaces de reparar la gran mayoría de sus mutaciones. A esta peculiaridad se le denomina fenotipo mutador y es considerado un elemento crucial en la progresión de una neoplasia (Sarasin, 2003). Las mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores, son de expresión dominante, que causan la pérdida recesiva de la función de cada uno de estos.

Se ha establecido que las mutaciones de los genes supresores de tumor contribuyen al proceso de carcinogénesis, cuando ambos alelos pierden su función. Frecuentemente la mutación inicial ocurre en uno de los alelos, el evento siguiente puede ser una deleción cromosómica o una recombinación mitótica entre el cromosoma que porta el alelo mutante y el cromosoma que tiene un alelo normal (Weksberg *et al.*, 2003)

Las células dañadas que escapan a los mecanismos de apoptosis perpetúan las anomalías en su descendencia. Existen determinados genes cuya expresión conduce en un momento determinado, a la supervivencia o muerte celular, generalmente a través de la síntesis enzimática. Los genes cuya expresión promueven la supervivencia y la proliferación celular se denominan oncogenes, y aquellos que la inhiben e inducen la

apoptosis se les denominan genes supresores. En la actualidad se conocen decenas de genes diferentes, que están asociados a tipos tumorales específicos. Aunque los oncogenes son fundamentales en este proceso, sólo se han detectado en un 15-30% de los tumores humanos. Sin embargo, las alteraciones en los genes supresores son muy frecuentes (Lara *et al.*, 2004).

La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones anormales de los proto-oncogenes y genes supresores de tumor, añadiéndose nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan nuevos atributos biológicos como: invasión, angiogénesis, motilidad celular, adhesividad celular, protección inmunológica y metástasis (Renan *et al.*, 1993).

Los genes supresores inhiben el crecimiento celular en condiciones normales. Cuando se produce una mutación en estos genes, sus proteínas no se expresan o dan lugar a proteínas no funcionales, favoreciendo la aparición del proceso de carcinogénesis o tumorigénesis, al no existir un control de la proliferación celular. Para que estos genes supresores adquieran su capacidad oncogénica, necesitan sufrir mutaciones independientes en ambos alelos, de manera que pierdan completamente su capacidad funcional. Como consecuencia, el crecimiento celular queda sin regulación, produciéndose una proliferación descontrolada que puede conducir a la formación de tumores. Es decir, la alteración se manifiesta con carácter recesivo (Stratton *et al.*, 1996).

También puede ser heredada esta alteración en la línea germinal, lo que explica el carácter hereditario de determinados tumores, cuya frecuencia es elevada en una misma familia. En este caso, uno de los alelos se hereda alterado, por lo que sólo se necesita una mutación en el otro alelo, para que se manifieste la enfermedad. Los mecanismos por los cuales se puede alterar la expresión de los genes supresores son similares a los descritos para los oncogenes. Son numerosos los genes oncosupresores estudiados, entre los más conocidos se encuentran: p53, retinoblastoma (RB), DCC, MCC, APC, NF1, NF2, H19 y WT-1 que está involucrado en el desarrollo de tumor Wilms.

El 90% de los tumores tienen alteraciones epigenéticas similares que impiden que los genes inhiban normalmente el desarrollo de cáncer. Por ello, el conocimiento de la epigenética abre la puerta a nuevas dianas terapéuticas.

La metilación del DNA, la desacetilación/metilación de histonas y los estados de compactación de la cromatina, son mecanismos celulares relacionados con la regulación de la expresión génica, que modulan la arquitectura del sistema con respecto a la accesibilidad de la secuencia de nucleótidos. En su conjunto, son conocidos como factores epigenéticos. En los últimos años ha comenzado el estudio de la relación que existe entre este fenómeno y el desarrollo de cáncer.

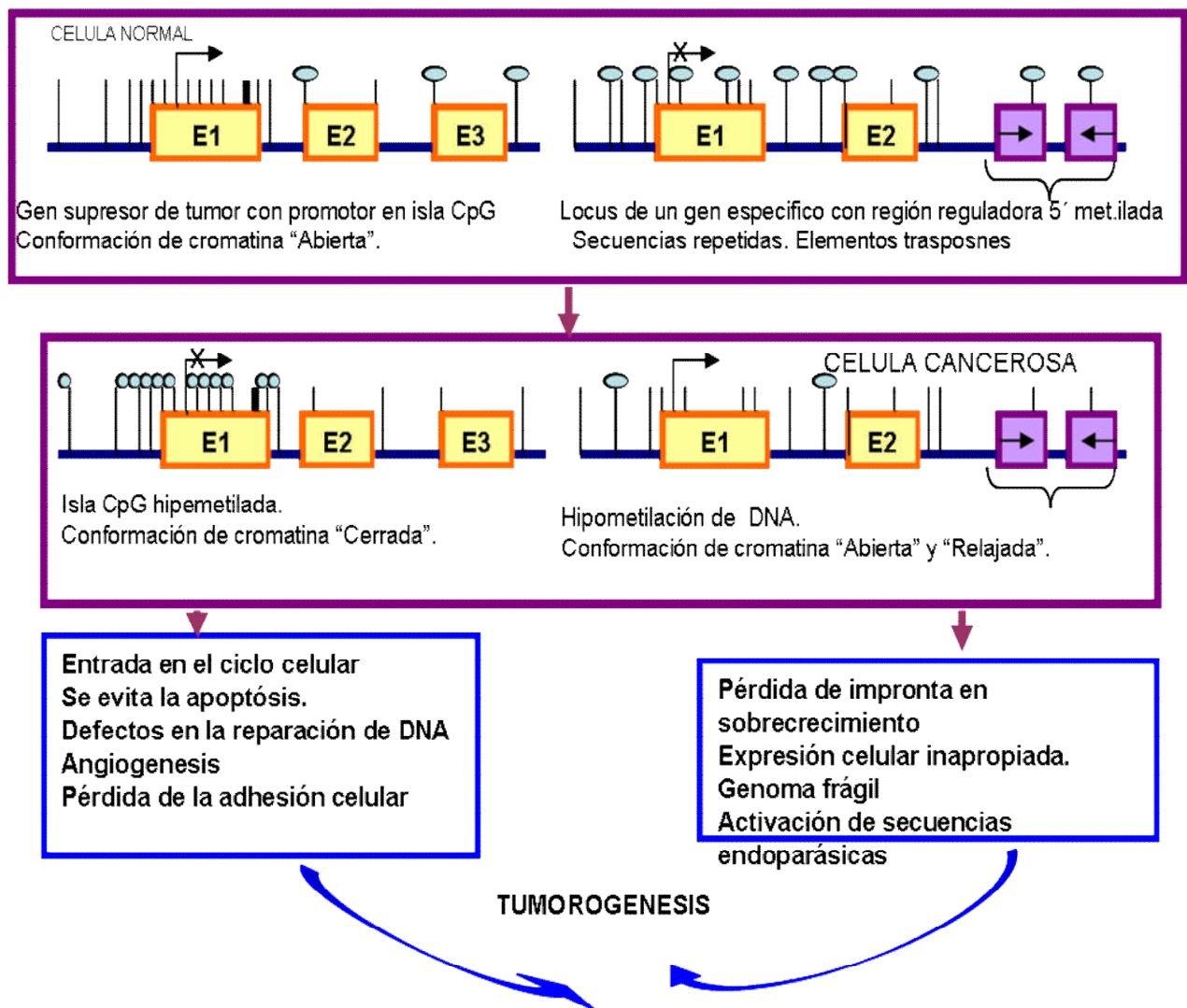
La metilación de residuos de citosina, en el contexto genético CpG, es la modificación epigenética más común en organismos eucariontes (Worm *et al.*, 2002). La metilación *de novo* de islas CpG, en regiones promotoras de genes supresores de tumores pueden llevar a un silenciamiento de la transcripción, al volver la región del gen menos accesible a la maquinaria transcripcional, desencadenando el proceso tumorigénico (Figura 7) (Esteller *et al.*, 2007).

En el genoma humano 70% de todos los dinucleótidos CpG se encuentran metilados. Las citosinas que se encuentran metiladas están ampliamente distribuidas en el genoma. En el humano existen aproximadamente 29,000 islas CpG, las cuales no están distribuidas al azar, localizándose en regiones promotoras o en el primer exón de algunos genes (Bestor *et al.*, 2000).

Mientras la mayoría de los islotes CpG permanecen normalmente metilados, particularmente aquellos que se asocian a "impronta" genética o al cromosoma X inactivo, algunos se encuentran libres de metilación y están asociados a genes transcripcionalmente activos (Bhattacharya *et al.*, 1999).

La impronta genómica requiere de la hipermetilación de DNA de uno de los dos alelos parentales de un gen, para permitir la expresión monoalélica. Los tumores humanos sufren generalmente pérdida de metilación del DNA, adquiriendo patrones específicos de hipermetilación en algunos promotores (ver figura 8). Estos cambios de metilación están vinculados con la modificación de los patrones de histonas (Esteller *et al.*, 2007).

La alteración de la impronta genética tiene un papel importante en la inactivación de los genes supresores de tumor o la sobre expresión de los oncogenes en muchos tipos de cánceres.



**Figura 8.** Alteración de patrones de metilación del DNA en la tumorigénesis. La hipermetilación de las islas CpG de los genes supresores de tumor, es una alteración común en las células cancerosas que conducen a la inactivación transcripcional de estos genes y la pérdida de las funciones celulares normales. Al mismo tiempo el genoma de las células cancerosas sufren hipometilación en secuencias repetitivas, en tejidos específicos y en genes improntados que presentan pérdida de metilación del DNA. En algunos casos esta hipometilación contribuye en el fenotipo de las células cancerosas (Tomado de Esteller, 2007).

Como se ha mencionado en los pacientes pediátricos con SBW se pueden desarrollar algunos tipos de neoplasias embrionarias, como resultado de estas disregulaciones epigenéticas, por lo que es importante el estudio de este mecanismo en dichos niños.



La desregulación de las proteínas que interviene en el ciclo celular y de los factores de crecimiento que se transcriben por genes localizados en 11p15.5, están altamente asociados a sobrecrecimiento y proliferación celular. La presencia de tumores se asocia tanto en forma negativa como positiva a los genes reguladores de crecimiento *CDKN1C* e *IGF2* (Weksberg *et al.*, 2003).

En el alelo paterno del gen *H19*, el promotor se encuentra normalmente metilado, mientras que en el alelo materno no lo están. El grado de metilación representa un marcador específico de impronta en el cromosoma paterno (Walter *et al.*, 2003).

En los tumores con pérdida de impronta del gen *IGF2* se observa una disminución en la expresión de *H19*, la impronta normal de *H19* está asociada con la metilación del alelo paterno. Cuando hay pérdida de impronta de *IGF2*, el promotor de *H19* muestra del 90 al 100% de metilación en los sitios que normalmente no están metilados en el alelo materno heredado por lo que el alelo materno adquiere un patrón de metilación paterno silenciado (Yong *et al.*, 2004).

Esta alteración en la metilación del alelo materno de *H19* se ha observado en pacientes con SBW con pérdida de impronta de *IGF2* por lo que se ha sugerido que existe relación entre la LOI y el desarrollo de tumores malignos. Siguiendo al modelo de apagado y encendido (switch) en un epigenotipo paterno. De acuerdo con este modelo la LOI en el tumor de Wilms involucra un switch del cromosoma materno para un epigenotipo paterno con activación del alelo materno (Vogelstein *et al.*; 1998) ocasionando que *H19* silencie a *IGF2* en el alelo materno y  $p57^{kip2}$  actúe como silenciador del alelo materno dándose así la metilación del alelo materno *H19* como en el cromosoma paterno. Cabe mencionar que la LOI es una alteración común en cánceres humanos (Walter *et al.*, 2003).

La hipermetilación de *H19* está altamente asociada con la tumorigénesis en contexto con la disomía uniparental (UPD por sus siglas en inglés) de la región 11p15 como un evento epigenético aislado (Weksberg *et al.*, 2001)

Con la finalidad de conocer la expresión de dos genes con impronta diferencial, uno paterna y el otro materna, en un síndrome genético con predisposición aumentada a cáncer, se propone la realización del presente trabajo de tesis, que contribuirá al conocimiento de la participación de este tipo de eventos epigenéticos en cáncer.

## ANTECEDENTES

Actualmente se han incrementado los informes de estudios realizados en pacientes con SBW, en muchos países, no obstante la mayoría de estos trabajos están enfocados únicamente al diagnóstico de dicha enfermedad en algunos casos de niños que ingresan a los hospitales, confirmando así las características fenotípicas del SBW. A nivel molecular ha cobrado gran interés debido entre otras cosas a que representa un modelo genético para el estudio del papel del control epigenético en el desarrollo normal, y su relación con los estadios embrionarios tempranos de acuerdo a lo demostrado por Weksberg *et al.*, (2003).

Por su parte Nazneen (2005) investigó los mecanismos de predisposición para el sobrecrecimiento infantil y el cáncer, tomando como eje central el Síndrome Beckwith Wiedemann y el Síndrome de Sotos, al ser estos en los que generalmente se presentan condiciones de sobrecrecimiento y que incrementan la posibilidad de que los pacientes que sufren alguna de estas patologías, desarrollen tumores. Ricardez (2006) estudió la correlación de la expresión de los genes *IGF2*, *H19* y *P57* con el fenotipo en una familia mexicana con SBW, y confirmó la expresividad variable y el patrón autosómico dominante.

Como se mencionó anteriormente, la región cromosómica humana 11p15.5 contiene un número elevado de genes maternos y paternos improntados; en esta región, el locus *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) actúa como centro de impronta en el dominio proximal 11p15.5. La pérdida de impronta (LOI) de este gen y su relación con el estado de metilación de KvDMR1, se investigó en 69 muestras de cáncer de colon. Por lo que, estos resultados sugieren que la LOI de *KCNQ1OT1* (interrupción epigenética) desempeña un papel importante en carcinogénesis coló rectal, pero no se asocia necesariamente a la expresión de *CDKN1C*. Los perfiles de la expresión de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) también se examinaron por hibridación *in situ* fluorescente en 13 líneas celulares de cáncer de colon. En nueve de 17 casos, se observó LOI de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*).

En las diferentes líneas celulares, el estado de metilación en KvDMR1 se correlacionó con los perfiles de expresión de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*). Así, la expresión de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) parece estar controlada por modificaciones epigenéticas en el KvDMR1, aunque la expresión de *CDKN1C*, que se considera controlada por *KCNQ1OT1*

(LIT-1), no se asocia al estado epigenético en el KvDMR1 en algunas variedades de estas células cancerígenas (Nakano *et al.*, 2006).

También se han estudiado los niveles de expresión del gen *CDKN1C* en fibroblastos de individuos sanos, y de pacientes con SBW mediante q-RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR) y ensayo de protección de la ribonucleasa (RPA). También se observó la metilación de la región promotora de *CDKN1C* mediante ensayos de protección de RNAasa. El análisis indicó que la hipometilación de *CDKN1C* en estos pacientes no se asocia a la hipermetilación en el promotor de *CDKN1C*. En la epimutación en *KvDMR1*, la ausencia de metilación materna, provoca el silenciamiento de *CDKN1C*.

Remesar *et al.*, en (1993) sugirieron la presencia de un gen supresor del crecimiento, *H19* el cual puede ser una de las causas de SBW familiar, y es asociado al desarrollo de tumores de estirpe embrionario.

Horike *et al.*, en el (2000) generaron cromosomas humanos modificados teniendo como blanco la delección de las islas de CpG de *KCNQ1OT1 (LIT-1)* de los cromosomas paternos y observaron que no tuvo efecto en la impronta de *H19* que se localiza en la parte distal del telómero.

Bliek *et al.*, (2001) estudiaron la metilación de *H19* y *KCNQ1OT1 (LIT-1)* en pacientes con SBW, observando que en los pacientes con desmetilación en *KCNQ1OT1 (Lit-1)* no se desarrollo cáncer, mientras que en aquellos con hipermetilación de *H19* sí y es importante mencionar que en el 20% de estos pacientes no se detectaron defectos genéticos.

Los estudios anteriormente expuestos, indican que existe una relación del epigenotipo-fenotipo en SBW, en el que la metilación de *H19* y *KCNQ1OT1 (LIT-1)*, así como la disomía uniparental se asocian fuertemente al riesgo de cáncer y a defectos congénitos específicos del síndrome.

## HIPÓTESIS

- En pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann, la expresión del RNAm de los genes *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) y *H19*, será diferente a la observada en individuos sanos.

## HIPÓTESIS NULA

- En pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann, la expresión del RNAm de los genes *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) y *H19*, será igual a la observada en individuos sanos.

## OBJETIVO GENERAL

- ❖ Analizar la expresión del RNAm de los genes *KCNQOT1 (LIT1)* y *H19* en sangre periférica de pacientes con Síndrome de Beckwith-Wiedemann.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer las condiciones adecuadas para el procesamiento de las muestras de sangre, extracción de RNA y productos de amplificación.
2. Analizar la expresión del RNA de una región polimórfica del gen *KCNQ1OT1 (Lit-1)* en sangre periférica de pacientes con Síndrome de Beckwith-Wiedemann mediante RT- PCR.
3. Analizar la expresión de RNA de una región polimórfica del gen *H19* en sangre periférica de pacientes con Síndrome de Beckwith-Wiedemann mediante RT- PCR.
4. Proporcionar una herramienta pronostica molecular para justificar el seguimiento clínico de pacientes SBW con alteración en los niveles de expresión de dos genes relacionados con el aumento en la predisposición a cáncer.

## MATERIALES Y MÉTODOS

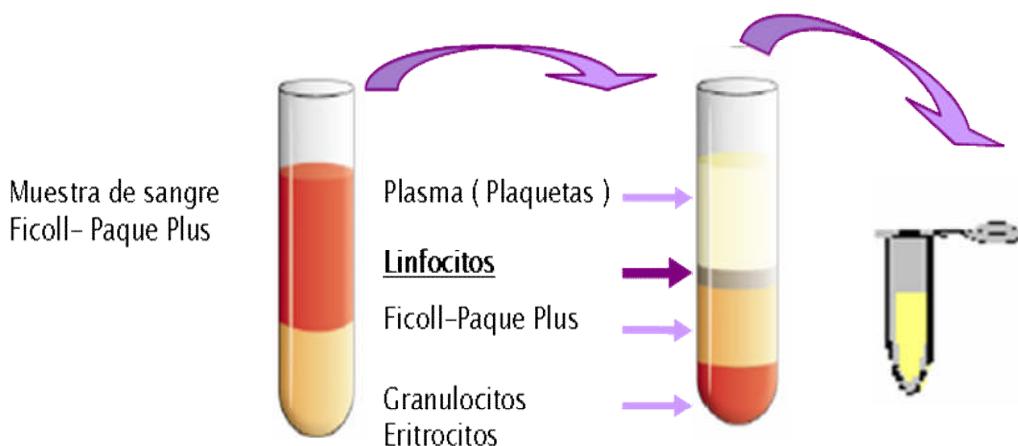
### PACIENTES

Se obtuvieron 5ml de sangre periférica de diez pacientes entre 4 meses y 6 años de edad y de sus respectivos padres. Siete pacientes fueron de sexo femenino y tres de sexo masculino con diagnóstico clínico confirmado de SBW. Los familiares dieron previamente su consentimiento por escrito. Todos los pacientes fueron canalizados al Laboratorio de Genética Humana del Centro Médico Nacional Siglo XXI a través de la consulta externa del Departamento de Genética Médica del Hospital. Siete eran procedentes de la Cd. de México, uno de Jalapa, Veracruz, uno de Oaxaca y uno de la Cd. de Monterrey.

Ocho fueron casos esporádicos y dos familiares y al momento del estudio no habían presentado cáncer

### Separación de leucocitos a partir de sangre periférica

El RNA total se obtuvo a partir de leucocitos de sangre periférica. Para ello se colocaron 2 ml de las muestras de sangre en tubos de ensayo a los que previamente se les habían adicionado 3 ml de Ficoll, (un reactivo que tiene una densidad de 1.077g/ml) lo que permitió la separación mediante gradiente de densidad, de las subpoblaciones celulares sanguíneas. Se centrifugaron a 25,000 rpm, durante 30 minutos. Una subpoblación de leucocitos fue extraída con pipetas Pasteur y colocada en tubos Eppendorf de 1.5 ml como se muestra en la siguiente figura.



**Figura 1.** Separación de leucocitos mediante gradientes de densidad.

## **Extracción de RNA total**

A partir de los leucocitos recuperados de la sangre periférica se obtuvo el RNA total. Con la finalidad de emplear un método con el que se obtuviera mayor concentración y pureza y debido a que los transcritos de los genes en estudio se esperan en copia única ya que se trata de genes improntados, se realizaron pruebas con dos métodos diferentes; una se realizó siguiendo el protocolo de Chomczynski *et al*, (1987) con modificaciones, mediante TRIzol Reagent (Invitrogen).

Se centrifugó durante 10 minutos a 10,000 rpm el botón con los leucocitos en PBS. Después se adicionaron 200µl de TRIzol agitándose y dejándose 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 40µl de cloroformo, se agitó durante 15 segundos y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó nuevamente durante 15 minutos a 13,000 rpm a 4°C. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó isopropanol en relación 1:1; después se llevó a cabo una tercera centrifugación durante 5 minutos a 7,500 rpm a 4°C. Se decantó el isopropanol y se lavó la pastilla con etanol al 70%; esta pastilla se centrifugó durante 10 minutos a 7,500 rpm a 4°C, se decantó el etanol y se secó la pastilla a temperatura ambiente, para finalmente hidratarla con 30 µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

La segunda prueba consistió en una serie de centrifugaciones en columnas de extracción (RNAeasy de Qiagen). Debido a que se obtuvo buena concentración y pureza adecuada, y a la edad de los pacientes que no permitía en algunos casos contar con la cantidad suficiente de sangre, se optó por emplear el método de columnas de extracción.

## **Cuantificación de RNA**

El análisis cualitativo del RNA total en las muestras procesadas, se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, revelado con bromuro de etidio y luz UV (ver figura 12).

Se cuantificó el RNA total en cada muestra con un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer), calibrado a una longitud de onda de ultravioleta a 260 nm; tomando 1 µl de la muestra y 49 µl de agua inyectable para obtener una dilución 1:50. Para calcular el grado de pureza se tomó en cuenta la relación 260 nm /280 nm que es un coeficiente obtenido

al tomar los valores de absorbancia de 260 en la cual se cuantifica material genómico, y 280 nm con la que se cuantifican proteínas. El equipo proporciona los resultados directos en ng/μl.

### **Transcripción reversa y reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR).**

Debido a que los genes en estudio, en individuos sanos, presentan expresión monoalélica se realizaron pruebas para obtener el cDNA mediante la reacción de RT-PCR con 2 transcriptasas reversas diferentes, con la finalidad de obtener mayor rendimiento. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando de 1-2 μg de RNA total, 0.5 μg/μl de oligo dT, Buffer RT (1X), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.50 mM de dNTPs, 25 UI de Inhibidor de RNAsas, y 20 UI de transcriptasa reversa. El programa de amplificación consistió en: 25°C durante 10 minutos, 42°C por 60 minutos y 99°C por 5 minutos. Ya que la transcriptasa reversa trabaja a 42°C.

Durante la estandarización se realizaron gradientes de MgCl<sub>2</sub> con las siguientes concentraciones 1, 1.5, 2, 2.5 mM para cada uno de los genes en estudio (*H19* y *KCNQ10T1*). Posteriormente se procedió a la amplificación en la misma reacción (diplex) del gen hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) como control de expresión constitutiva. De igual manera se realizaron gradientes de temperatura para encontrar los tiempos y la temperatura óptima de alineamiento. Partiendo de la temperatura obtenida a partir de calcular el contenido de AT y GC de acuerdo a la fórmula de Wallace:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de cada uno de los genes seleccionados, se utilizaron los iniciadores diseñados para este estudio como se muestra en la tabla 3. Para el diseño se realizó una búsqueda de la secuencia de RNAm correspondiente a cada uno de los transcritos en la base de datos "Entrez nucleotide" del NCBI, posteriormente se utilizó el programa OLIGO, copiando las secuencias encontradas donde se comenzó a buscar una región polimórfica, que presentara menos de 40% de CG, ya que un contenido mayor eleva la TM (temperatura en que se alinean); ubicando la posición donde la ΔG fuera más negativa ya que esto le confiere mayor estabilidad, flanqueándola con dos secuencias complementarias en los extremos 5´-3´.



Se analizó la formación de dímeros y la auto complementariedad (plegamiento), la longitud del fragmento obtenido y finalmente se calculó el porcentaje de compatibilidad de los iniciadores u oligonucleótidos. La localización de los oligonucleótidos diseñados dentro la secuencia de los genes *H19* y *KCNQ1OT1 (LIT-1)* se muestra en las Figuras 10 y 11, mientras que la secuencia de estos iniciadores se presenta en la tabla 3. El fragmento esperado para el gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* es de 567pb, mientras que el tamaño de fragmento previsto para el transcrito *H19* es de 275pb.

**Tabla 3.** Iniciadores utilizados

| OLIGONUCLEOTIDO SENTIDO   | OLIGONUCLEOTIDO ANTISENTIDO  |
|---|--|
| Gen: <i>KCNQ1OT1, Lit 1</i><br>Lit1- F5'-AAG AAA GTG TTG AGT GGT AA -3' | Gen: <i>KCNQOT1, Lit 1</i><br>Lit1- R5'-GAT GAT CTG AAA ATG GAA AAA-3' |
| Gen: <i>H19</i><br>H19- F5'-GCG GGT CTG TTT CTT CTT TAC TT-3'           | Gen: <i>H19</i><br>H19- R5'-CGA TGG TGT CTT TGA TGT TG-3'              |
| Gen: <i>HPRT</i><br>HPRT- F5'-TTG CTG ACC TGC TGG ATT AC-3'             | Gen: <i>HPRT</i><br>HPRT- R5'-CTG ACC AAG GAA AGC AAA GT-3'            |

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* se realizó con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización a 95°C, durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, a 54°C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

La amplificación del gen *H19* se realizó con el siguiente programa de amplificación: 94°C, durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, a 58.5° por 20 segundos, 72°C por 30 segundos con una extensión final a 72°C por 5 minutos.

```

901 GCTGCAGGGG CTCGGCCTGC GGGCGCCGGT CCCACGAGGC ACTGCGGCC CC AGGGTCTGGT
961 GCGGAGAGGG CCCACAGTGG ACTTGGTGAC GCTGTATGCC CTCACCGCTC AGCCCCTGGG
1021GCTGGCTTGG CAGACAGTAC AGCATCCAGG GGAGTCAAGG GCATGGGGCG AGACCAGACT
1081AGGCAGGGCG GGCGGGGCGG AGTGAATGAG CTCTCAGGAG GGAGGATGGT GCAGGCAGGG
1141GTGAGGAGCG CAGCGGGCGG CGAGCGGGAG GCACTGGCCT CCAGAGCCCG TGGCCAAGGC
1201GGGCCTCGCG GGCGGCGACG GAGCCGGGAT CGGTGCCTCA GCGTTCGGGC TGGAGACGAG
1261GCCAGGTCTC CAGCTGGGGT GGACGTGCC ACCAGCTGCC GAAGGCCAAG ACGCCAGGTC
1321CGGTGGACGT GACAAGCAGG ACATGACATG GTCCGGTGTG ACGGCGAGGA CAGAGGAGGC
1381GCGTCCGGCC TTCCTGAACA CCTTAGGCTG GTGGGGCTGC GGCAAGAAGC GGGTCTGTTT
1441CTTTACTTCC CGCCTGAGGC TGTTTCATATG GCTGCCCTCT GTGCTCCAG AACCCACATC
1501ATGAATGAAA TGGTGCTACC CAGCTCAAGC CTGGGCCTTT GAATCCGGAC ACAAACCCTT
1561CTAGCTTGGA AATGAATATG CTGCACTTTA CAACCACTGC ACTACCTGAC TCAGGAATCG
1621CGGCTCTGGA AGGTGAAGCT AGAGGAACCA GACCTCATCA GCCCAACATC AAAGACACCA
1681TCGGAACAGC AGCGCCCGCA GCACCCACCC CGCACCGGGG ACTCCATCTT CATGGCCACC
1741CCCTGCGGCG GACGGTTGAC CACCAGCCAC CACATCATCC CAGAGCTGAG CTCCTCCAGC
1801GGGATGACGC CGTCCCCACC ACCTCCCTCT TCTTCTTTTT CATCCTTCTG TCTCTTTGTT
1861TCTGAGCTTT CCTGTCTTTC CTTTTTCTG AGAGATTCAA AGCCTCCACG ACTCTGTTTC
1921CCCCGTCCCT TCTGAATTTA ATTTGCACTA AGTCATTTGC ACTGGTTGGA GTTGTGGAGA
1981CGGCCTTGAG TCTCAGTACG AGTGTGCGTG AGTGTGAGCC ACCTTGCAA GTGCCTGTGC
2041AGGGCCCCGGC CGCCCTCCAT CTGGGCCGGG TGA CTGGGGC CCGGCTGTGT GCCCGAGGCC

```

**Figura 2.** Localización de los iniciadores diseñados para H19 en la secuencia del RNAm. El iniciador Forward (sentido) se localiza desde la posición 1429 a la 1449 (marcada con Amarillo), el iniciador Reverse (antisentido) se localiza desde la posición 1661 a la 1884 (marcada con rosa)

```

601 CGCGGCCCTC CCCATCTCTC TGGGAGGGTT TGAACACGGT CAGCACGGAC CTGGGCGGGC
661 GGC GCGGGAC GGGTGATCAC TGGCGTTGCT GAGGTGAGCT GTGTGCCCCG CGGCCGTCCC
721 AGATCACAGG CGTCAGCAGT GCAGCCTGGC CTGGGCAGTG CGCTCCCATC TGCACCTTAT
781 GGACAGCGTG GCCAGGGTCG AGGTCCGAGT TCCTGGCCGC GTCCCAAGGA TCGGATTCCG
841 GGTCTATAGT TCTCATGGTG GTTCAGAGTG GGCTGAATTG GGATTGGAGT CTGGAATCCG
901 CATCGTGGTT CTGAGTCCGC GCTATTGGGA TGGAAAGAAAG TGTTGAGTGG TGAGGTTTTG
961 AGTCAAAGCC CGAATTGGGA CCGGAGTCGG AAATCCACTT AGTGGTTCTG AGTCAGGGCC
1021 GTTGTTTTTT ACCCCTTTTT AGACTCTGAA TTGGTTTTAC CATGTGTGTA AAGACTGTTG
1081 TATGATTTTT GTAGCACAAAC CCTTGANTAC ATAAAGCACG ATTGGCTCCC CGGAAGGCNG
1141 GTGTTGGCCA GGCAGTGAAT GCACGGTAGG GCAGTGTGCA TCCCTGCATG CACTTGCTG
1201 GTATGCCCTG ACTCCCCGCA CACAGTGCTG TGAGTCTCTG GTTCTTGACC CTCTGCGGAA
1261 ATCATGGCTC TGAGTTGAGA TCCAAGGGAG GTCCGAGTTG GCGACTGGAG TCAGGGTCTG
1321 GAGTCTGTCT TTGGGTAGAG GTTCTGAATG GGGGGCTCTG AGTTAAGAGA TTGGGATTGG
1381 GGTTAGAGGT CTCAGTGGGG TATGGGAGTC AGGAATTGAA GTCGAAAGTTC TGCCTCTAGG
1441 TGGGGATTCT GAGTCAGGAA TTAGGGGGCG AAGTAAAGGT TGCAGTCTGA GTTGGGGGT
1501 TTTTCCATTT TCAGATCATC AGGTAGTGGT AGAAGTCTCT TGGTCATATT GGAGATGAGA
1561 GTTGATCAGA TGCAGGTCTC AGTCTGGGTA GTAGGCTTGA AGGGCCACCA CTATGTTTCAG
1621 ATCCCAGTAC CCCACTGTGG TCCCTGAGCA GTCAAATAG CCTTTTATAT AAAATTGAGA
1681 GTAAGAGTGC CTTCCCACAG CACTGTTCTG GTTATGAAAAG AGAATAATTTC ATCCAGGTAG
1741 AATAGTTCTG TCTTAAATTA TCACAAAGTA TAAAACTTT CCTGATAATA TCCACATTTG
1801 ATGTGCATTT ACCAGTTCTT TCTTTACTGT GGTGCCCTT TTGCTAGACC AAAAGCTCCC

```

**Figura 3.** Localización de los iniciadores diseñados para KCNQ10T1 (LIT-1) en la secuencia del RNAm. El iniciador Forward (sentido) se localiza desde la posición 935 a la 957 (marcada con amarillo), el iniciador Reverse (antisentido) se localiza desde la posición 1500 a la 1521 (marcada con rosa).

## **Visualización de los productos de PCR**

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa a 1.5% utilizando Buffer TBE a 0.5%, el corrimiento electroforético se llevó a cabo en cámaras horizontales de 20 x 25 cm. para electroforesis de ácidos nucleicos durante 1 hora aproximadamente a 100V.

## **Purificación de los productos de PCR a partir de geles de agarosa**

Con la finalidad de corroborar que las bandas obtenidas en cada muestra correspondían a los genes en estudio, las muestras fueron preparadas para la secuenciación.

El producto de PCR se analizó cualitativamente en geles de agarosa al 1.5% en el cual se cortaron las bandas correspondientes a cada gen, estos fueron purificados mediante el Kit de Purificación de Electroforesis (Marligen), como se muestra en la Figura 13.

## **Marcado para secuenciación**

Se realizó una segunda reacción de PCR con cada uno de los iniciadores (sentido y antisentido) empleando el "kit" Big Dye Terminator (Applied Biosystems) con el siguiente protocolo: se adicionaron 5 µl de Big Dye (5X), 5 pmol de iniciadores, 50 ng de la muestra y 2µl de agua estéril.

## **Secuenciación automatizada de los productos de PCR**

Para esta reacción fue necesario DNA desnaturalizado el cual se apareo con los iniciadores que sirven como punto de anclaje, en la cual se interrumpió de manera aleatoria la síntesis de DNA en cada uno de los pasos de polimerización. Se efectuaron cuatro reacciones de polimerización que se realiza de manera simultánea en un tubo independiente; al que se añadió los nucleótidos trifosfato (dTTP) y los cuatro didesoxirribonucleótidos (ddATP, ddTTP, ddCTP y ddGTP) marcados con fluoroforos distintos, que son nucleótidos modificados que han perdido el grupo hidroxilo de la posición 3' de la desoxirribosa, que una vez incorporados se termina la síntesis de la cadena de DNA. Estos emitieron cuatro diferentes longitudes de onda.

Los productos fueron separados en un sistema capilar y se sometieron a electroforesis. Una unidad de lectura que se encuentra fija en el punto óptimo de resolución del sistema de electroforesis reveló las cuatro señales fluorescentes por medio del rayo láser que excita los cuatro fluoróforos. Los cuatro fotodetectores con filtros específicos acoplados a la unidad de lectura captaron la luz emitida por cada fluoróforo, lo que permitió conocer el orden en el que aparece la secuencia de fragmentos de elongación, generando los histogramas de cuatro colores, en donde cada color representa una base diferente.

## RESULTADOS

Para el análisis de expresión de los genes fue necesaria la estandarización de técnicas con el fin de obtener resultados precisos. Se realizaron extracciones de RNA mediante TRIzol como se describió en material y métodos. Con este método se obtuvieron valores de pureza de 1 a 1.5 o mayores a 2, lo que sugería contaminación por TRIzol, proteínas o DNA. Por lo que se procedió a utilizar columnas de purificación RNeasy con las cuales se obtuvo RNA de buena calidad y mayor cantidad del mismo.

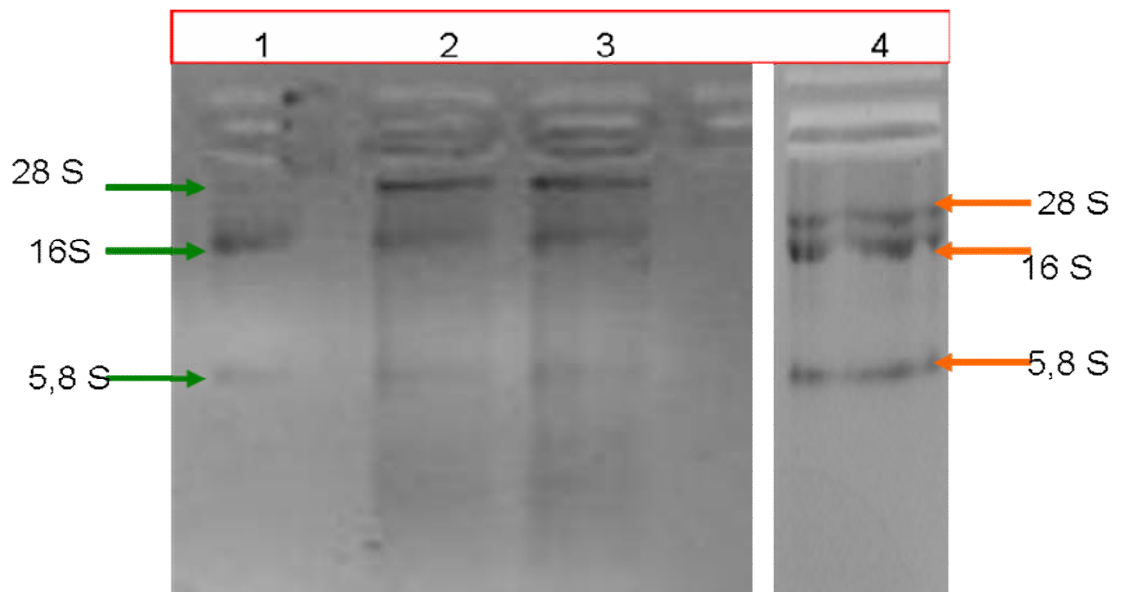
La concentración del RNA expresada en ng/ $\mu$ l, que se obtuvo mediante el método de espectrofotometría; se presenta en la tabla 4.

**Tabla 4.** Comparación de los promedios de las concentraciones de RNA obtenido mediante Columna y TRIzol, en cinco muestras analizadas.

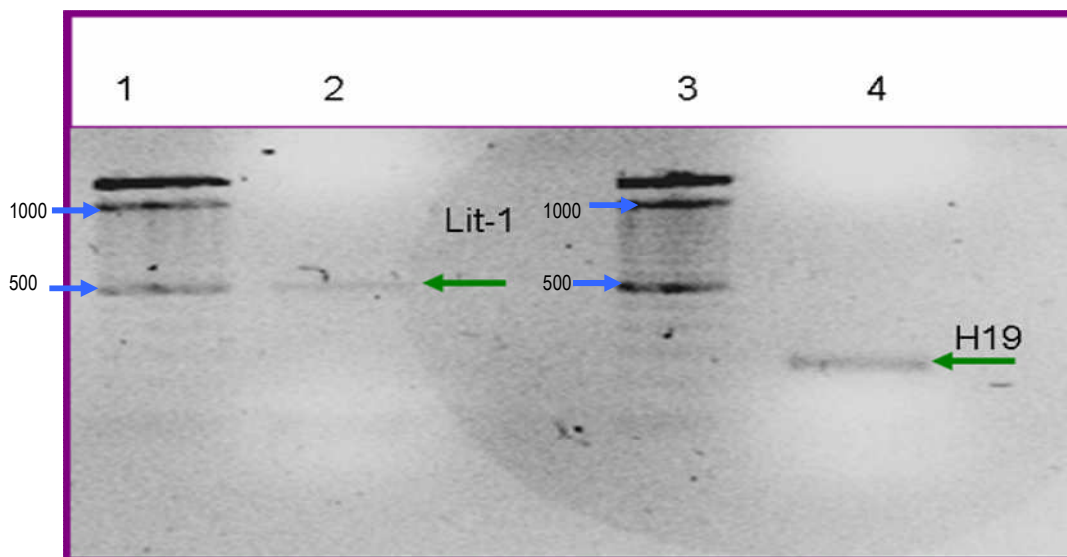
| Muestra | Método de extracción | Concentración en ng/ $\mu$ l | Índice de pureza |
|---------|----------------------|------------------------------|------------------|
| 1       | TRIzol               | 73.04                        | 2.56             |
| 2       | TRIzol               | 119.73                       | 2.2              |
| 3       | Columna              | 204.98                       | 2.1              |
| 4       | Columna              | 1230                         | 1.82             |
| 5       | Columna              | 1400                         | 2.03             |

| Promedios                    | TRIzol | Columna |
|------------------------------|--------|---------|
| Concentración en ng/ $\mu$ l | 96.385 | 944.99  |
| Índice de pureza             | 2.38   | 1.98    |

La presencia de RNA de cuatro muestras procesadas para la estandarización se observan en la Figura 12, donde la primera fue extraída mediante TRIzol realizando variantes después de la separación de leucocitos, las muestra 2, 3 y 4 fueron extraídas mediante columnas (RNeasy).



**Figura 1.** Gel de agarosa al 2% para el análisis cualitativo de RNA con los dos métodos de extracción. (1) y (2) RNA de persona sana, (3) RNA del paciente 1, (4) RNA del paciente 9.



**Figura 2.** Gel de agarosa al 1.5% para observar productos purificados. Carril (1) marcador de peso molecular de 100pb; (2) producto purificado del gen LIT-1; (3) marcador de peso molecular de 100pb; 4 producto purificado del gen H19.

Los signos clínicos de los pacientes analizados fueron proporcionados por los clínicos tomando como referencia su historial médico, estas características se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Características fenotípicas relevantes de los pacientes en estudio

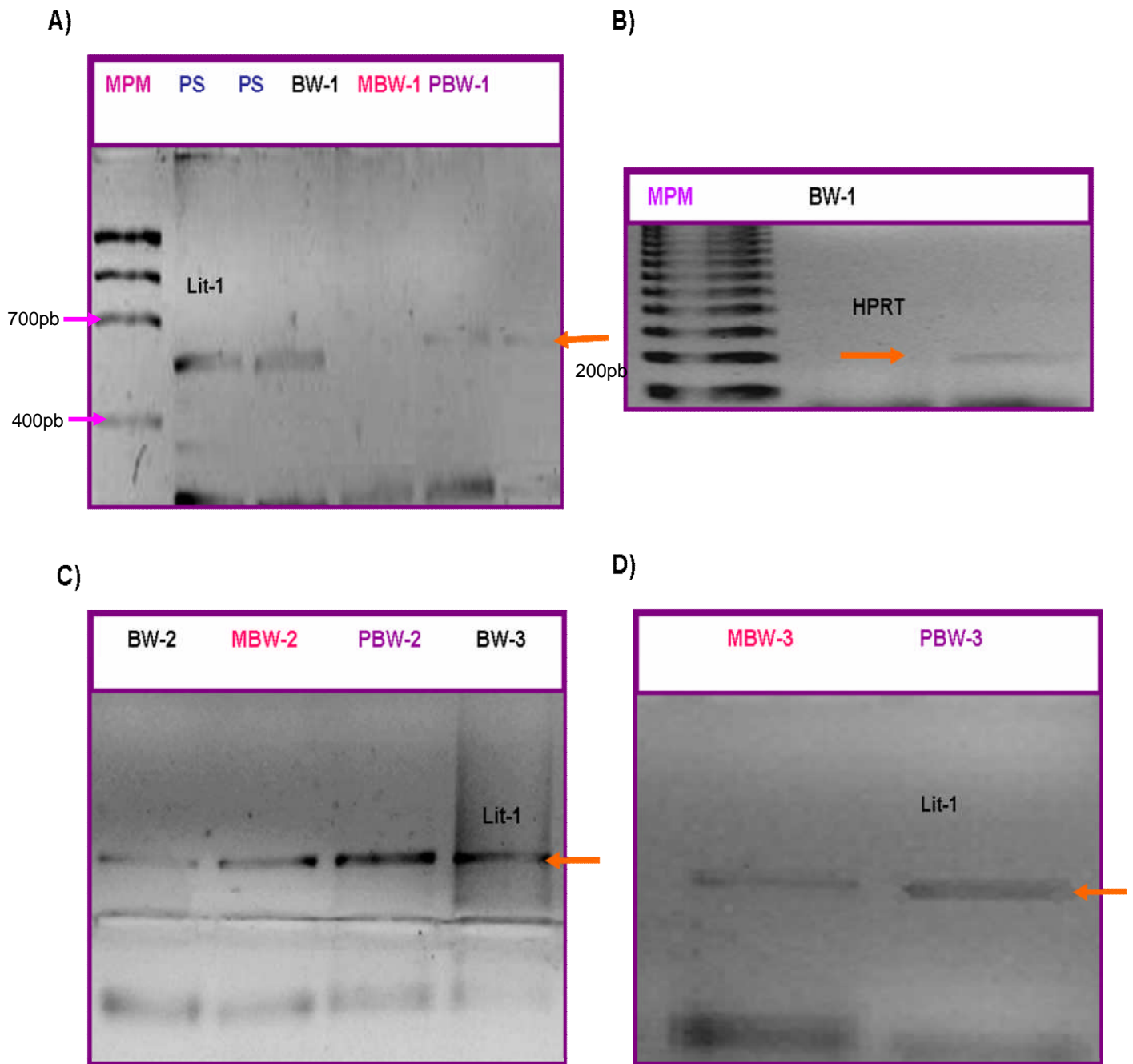
| Signo Clínico        | Macrosomia | Macroglosia | Visceromegalia | Onfalocele | Neoplasia | Hemihipertrofia | Hipoglucemia |
|----------------------|------------|-------------|----------------|------------|-----------|-----------------|--------------|
| Paciente 1<br>BW-1   | X          | X           | X              | -          | -         | -               | -            |
| Paciente 2<br>BW-2   |            | X           | X              | -          | -         | X               | -            |
| Paciente 3<br>BW-3   | s.d.       | s.d.        | s.d.           | s.d.       | s.d.      | s.d.            | s.d.         |
| Paciente 4<br>BW-4   | X          | X           | X              | -          | -         | -               | -            |
| Paciente 5<br>BW-5   | X          | X           | -              | -          | -         | -               | -            |
| Paciente 6<br>BW-6   | -          | X           | X              | X          | -         | X               | X            |
| Paciente 7<br>BW-7   | -          | X           | X              | X          | -         | X               |              |
| Paciente 8<br>BW-8   | -          | X           | -              | X          | -         | X               | X            |
| Paciente 9<br>BW-9   | s.d.       | s.d.        | s.d.           | s.d.       | s.d.      | s.d.            | s.d.         |
| Paciente 10<br>BW-10 | s.d.       | s.d.        | s.d.           | s.d.       | s.d.      | s.d.            | s.d.         |

s.d.= sin datos

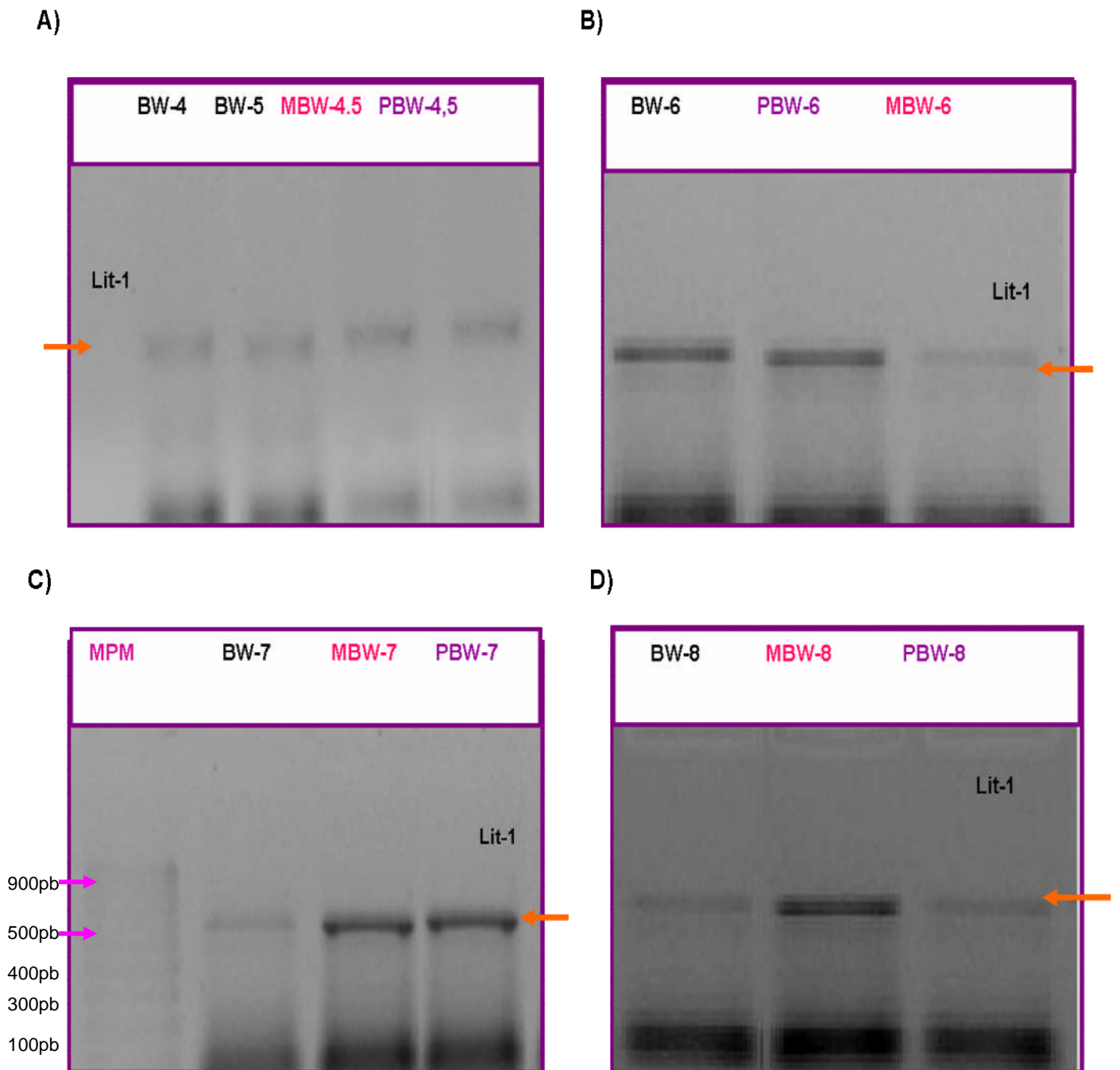
**RT-PCR de los genes:****Análisis de la expresión de RNAm del gen *KCNQ1OT1* (*Lit-1*)**

*KCNQ1OT1* (*LIT-1*) y *H19* son usados en rutinas de investigación y se emplean en el diagnóstico del 71-97% de los síndromes de sobrecrecimiento, que se asocian a la región cromosómica 11p15.5 (Gaston *et al.*, 2001). En este estudio el transcrito *KCNQ1OT1* presentó expresión monoalélica (expresión normal) en ocho de los diez pacientes (Figura 14 C,D, Figura 15 A-D y Figura 16 C) y en dos casos BW-1 y BW-9 se encontró expresión diferencial del transcrito con respecto a sus padres y a los individuos sanos (Figura 14 A y 16 A); no se amplificó la región esperada, amplificando únicamente HPRT (Figura 14 B y 16 B). Donde PS en color azul corresponde a las personas sanas, MBW-# en rosa corresponde a las madres de los pacientes, PBW-# en morado a los padres y finalmente BW-# en color negro hace referencia a los casos índices.

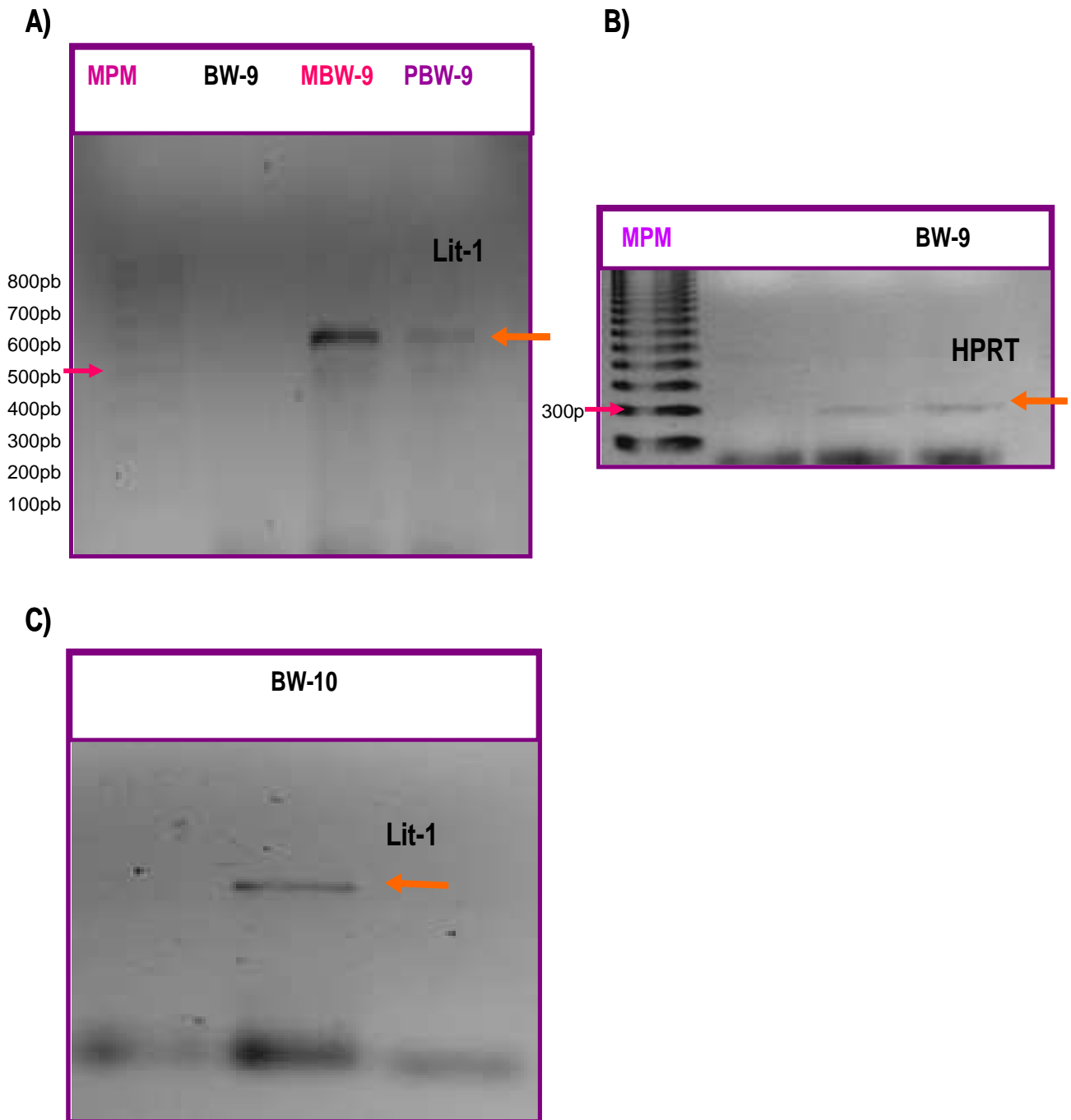




**Figura 3.** **A)** Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio; Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb, Carril 2 y 3: Persona sana, Carril 4: (BW-1) caso índice 1; Carril 5: (MBW-1) madre del caso índice 1; Carril 6: (PBW-1) padre del caso índice 1. **B)** Amplificación de HPRT de (BW-1), fragmento esperado de 175pb. **C)** Carril 1: (BW-2) caso índice 2; Carril 2: (MBW-2) madre del caso índice 2; Carril 3: (PBW-2) padre del caso índice 2; carril 4: (BW-3) caso índice 3. **D)** Carril 1: (MBW-3) madre del caso índice 3; carril 2 (PBW-3) padre del caso índice 3. Tamaño del fragmento esperado 567pb. Flecha naranja señala al fragmento amplificado del gen LIT-1.



**Figura 4.** **A)** Gel de agarosa al 1.5% para observar productos de PCR. Carril 1: (BW-4) caso índice 4; Carril 2: (BW-5) caso índice 5; Carril 3: (MBW-4.5) madre del caso índice 4 y 5; Carril 4: (PBW-4,5) padre del caso índice 4 y 5. **B)** Carril 1: (BW-6) caso índice 6; carril 2: (PBW-6) padre del caso índice 6; carril 3: (MBW-6) madre del caso índice 6. **C)** Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb, carril 2: (BW-7) caso índice 7; carril 3:(MBW-7) madre del caso índice 7; carril 4: (PBW-7) padre del caso índice 7. **D)** Carril 1: (BW-8) caso índice 8; carril 2: (MBW-8) madre del caso índice 8; carril 3: (PBW-8) padre del caso índice 8. Tamaño del fragmento esperado 567pb. Flecha naranja señala al fragmento amplificado del gen LIT-1.



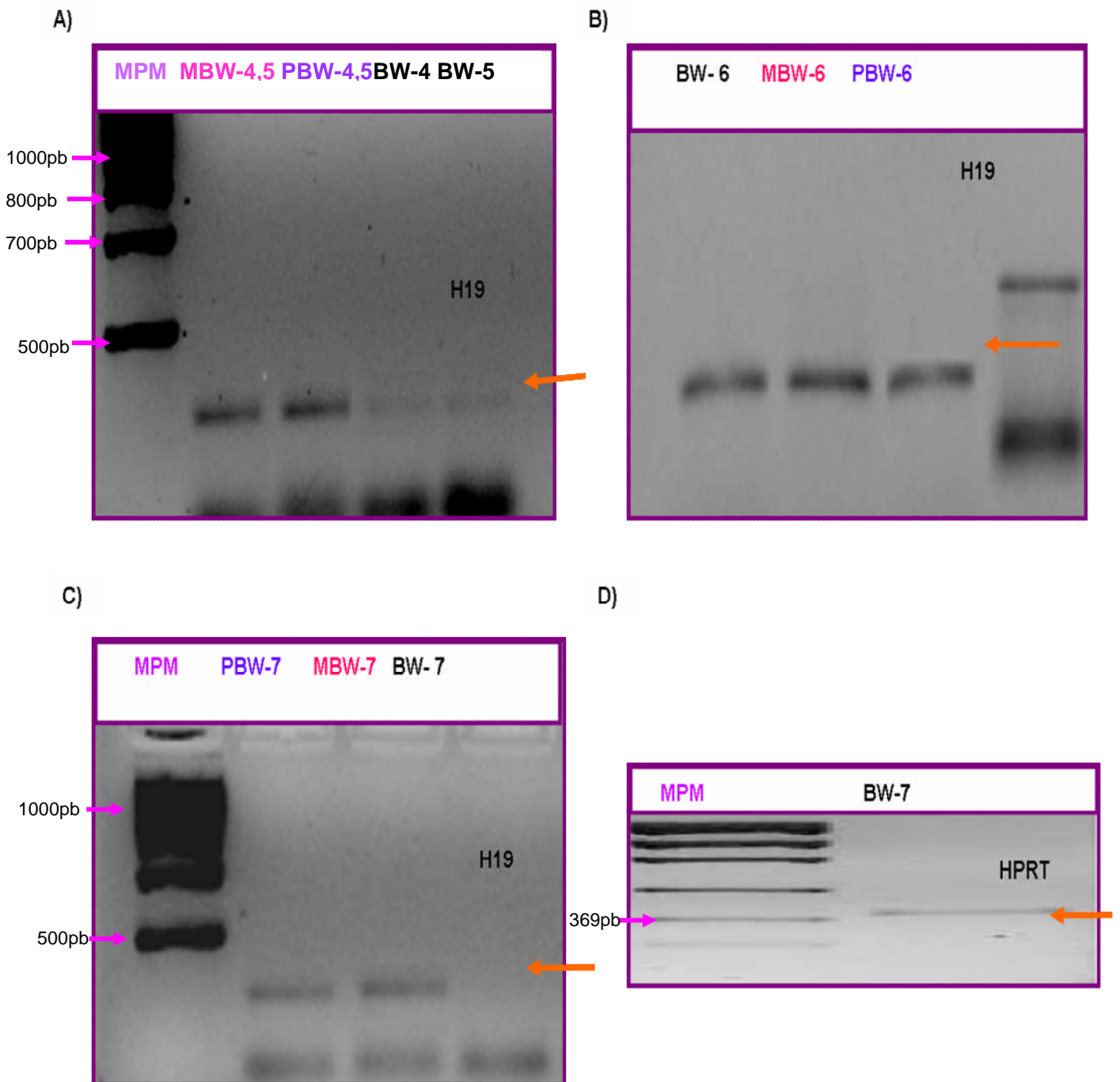
**Figura 5.** **A)** Gel de agarosa al 1.5% para observar amplificado de KCNQ10T1 (Lit-1); Carril 1: Marcador de peso molecular de 100pb, Carril 2: (BW-9) caso índice 9; Carril 3: (MBW-9) madre del caso índice 9; Carril 4: (PBW-9) padre del caso índice 9. **B)** Amplificación de HPRT de BW-9 en el Carril 2; Carril 1: Marcador de peso molecular de 123pb. **C)** Carril 2: (BW-10) caso índice 10. Las bandas inferiores corresponden a los iniciadores. Tamaño del fragmento esperado 567pb. Flecha naranja señala al fragmento amplificado del gen LIT-1.

## Análisis de la expresión de RNAm del transcrito H19

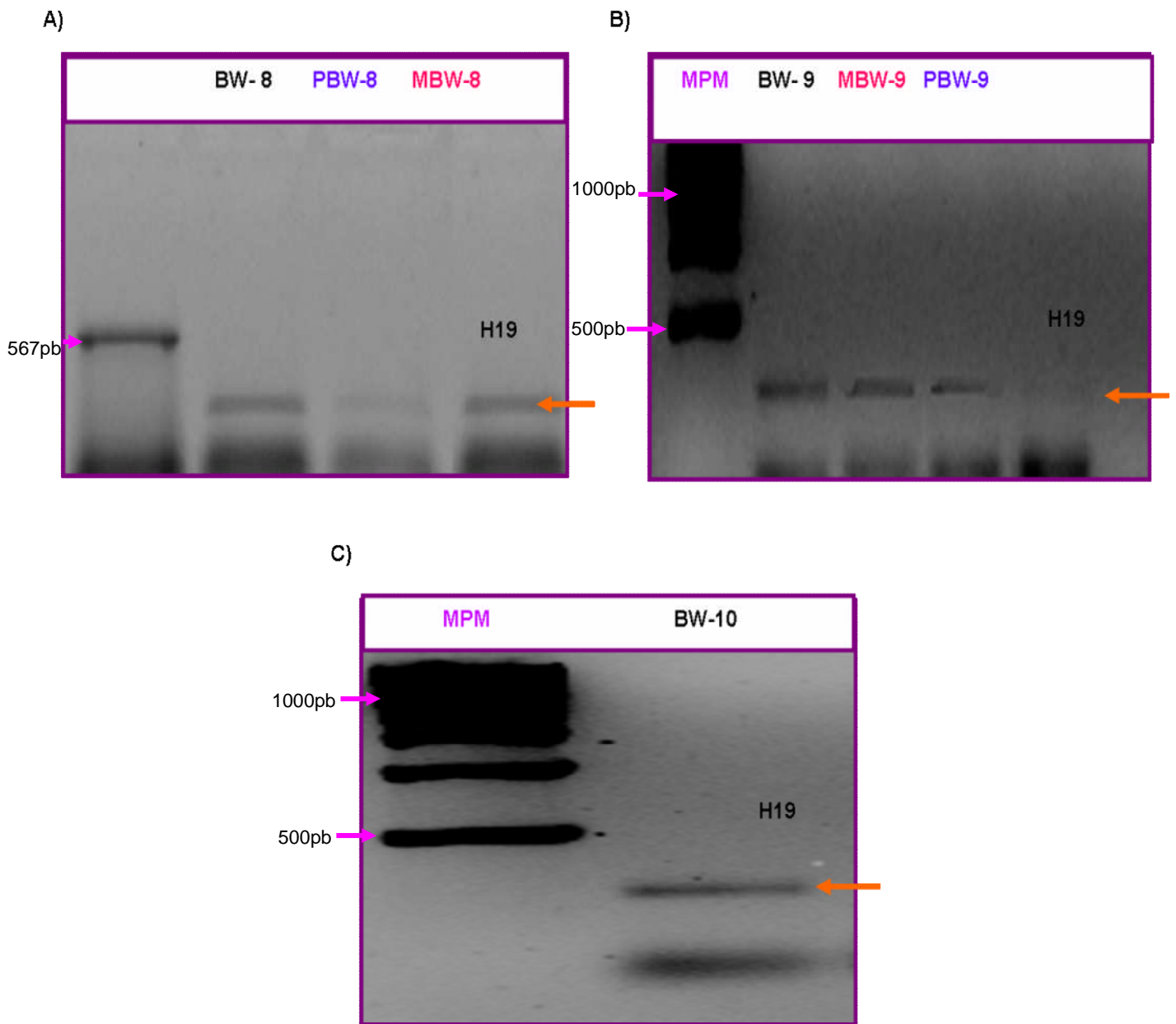
Para el gen H19 se reporta expresión diferencial del transcrito en el paciente BW-7 (figura 18 C) en comparación con los individuos sanos y sus padres, ya que no amplificó este gen, amplificando únicamente el gen constitutivo HPRT (figura 18 D) lo que demuestra que la calidad de la muestra es la requerida para el estudio y descarta la posibilidad de reportar un falso negativo. La expresión de los nueve casos índices restantes fue similar a la de sus padres presentando un solo alelo (monoalélica, expresión normal) sin alteraciones (figuras 17, 18 A y B; finalmente 19 A, B, C). Donde PS en color azul corresponde a las personas sanas, MBW-# en rosa corresponde a las madres de los pacientes, PBW-# en morado a los padres y finalmente BW-# en color negro hace referencia a los casos índices.



**Figura 6.** Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio; carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb, carril 2: (BW-1) caso índice 1; Carril 3: (MBW-1) madre del caso índice 1; carril 4: (PBW-1) padre del caso índice 1; Carril 5: (BW-2) caso índice 2; Carril 6: (MBW-2) madre del caso índice 2; Carril 7: (PBW-2) padre del caso índice 2; Carril 8: (BW-3) caso índice 3; Carril 9: (MBW-3) madre del caso índice 3; Carril 10: (PBW-3) padre del caso índice 3; Carril 11: (PS) Persona sana; carril 12: (PS) Persona sana. Tamaño del fragmento esperado 275pb. Flecha naranja señala al fragmento amplificado del gen H19.



**Figura 7. A)** Gel de agarosa al 1.5% para observar productos de PCR del gen H19; carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb, carril 2: (MBW-4,5) madre del caso índice 4 y 5; carril 3 (PBW-4,5) padre del caso índice 4 y 5. **B)** Carril 1: (BW-6) caso índice 6; carril 2: (MBW-6) madre del caso índice 6; carril 3: (PBW-6) padre del caso índice 6. Fragmento esperado 275pb. **C)** Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb, Carril 2: (PBW-7) padre del caso índice 7; Carril 3: (MBW-7) madre del caso índice 7; Carril 4: (BW-7) caso índice 7. **D)** Amplificación de HPRT de BW-7 en el Carril 2; Carril 1: MPM de 123pb. Flecha naranja señala al fragmento amplificado del gen H19.



**Figura 8.** Gel de agarosa al 1.5% para observar amplificado del gen H19; **A)** Carril 2: (BW-8) caso índice 8; Carril 3: (PBW-8) padre del caso índice 8; Carril 3: (MBW-8) madre del caso índice 8. **B)** Carril 1: Marcador de peso molecular de 1kb; carril 2: (BW-9) caso índice 9; carril 3:(MBW-9) madre del caso índice 9; carril 4: (PBW-9) padre del caso índice 9. **C)** Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb; Carril 2: (BW-10) caso índice 10. Fragmento esperado de 275pb. Flecha naranja señala al gen H19.

El resumen de los resultados de expresión de los dos transcritos analizados en los pacientes y en sus padres se muestra en la tabla 6.

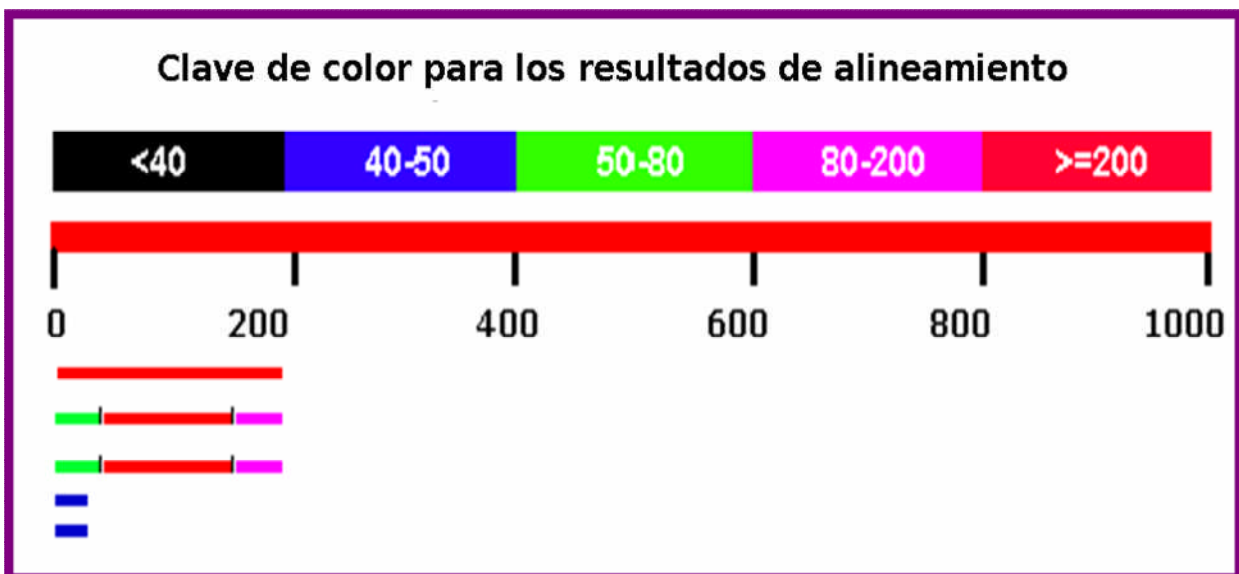
**Tabla 6.** Expresión de los genes *KCNQ10T1* y *H19* de los pacientes analizados y su tipo de herencia.

| Paciente     | Expresión de <i>KCNQ10T1</i> | Expresión de <i>H19</i> | Tipo de herencia |
|--------------|------------------------------|-------------------------|------------------|
| <b>BW-1</b>  | <u>S/E</u>                   | EN                      | Esporádico       |
| MBW-1        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-1        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-2</b>  | EN                           | EN                      | Esporádico       |
| MBW-2        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-2        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-3</b>  | EN                           | EN                      | Esporádico       |
| MBW-3        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-3        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-4</b>  | EN                           | EN                      | Familiar         |
| <b>BW-5</b>  | EN                           | EN                      |                  |
| MBW-4,5      | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-4,5      | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-6</b>  | EN                           | EN                      | Esporádico       |
| MBW-6        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-6        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-7</b>  | EN                           | <u>S/E</u>              | Esporádico       |
| MBW-7        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-7        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-8</b>  | EN                           | EN                      | Esporádico       |
| MBW-8        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-8        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-9</b>  | <u>S/E</u>                   | EN                      | Esporádico       |
| MBW-9        | EN                           | EN                      |                  |
| PBW-9        | EN                           | EN                      |                  |
| <b>BW-10</b> | EN                           | EN                      | Esporádico       |

BW - ( X ) = Caso índice    PBW - ( X ) = Padre    MBW - ( X ) = Madre    EN = Expresión Normal  
S/N = Sin expresión

## Secuenciación de H19

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en dirección 5'-3' con el iniciador H19-F 5' GCG GGT CTG TTT CTT CTT TAC TT3'. Los resultados fueron visualizados como electroferogramas en los programas Finch TV, ChromasPro 2.33 (Figuras 22 y 23) donde fueron analizados con el programa BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), para encontrar la secuencia con mayor homología en esta base de datos. En la Figura 20 se muestran las claves de color asignadas para las secuencias que mostraron alguna homología con la muestra analizada.



**Figura 9.** Claves de color asignadas a los alineamientos obtenidos en la comparación de la muestra secuenciada del gen H19 con el BLAST.

La comparación mostró seis alineamientos con secuencias encontradas en la base de datos, siendo la secuencia del gen H19 de *Homo sapiens* de expresión materna la que presentó mayor homología y la de *Homo sapiens*, del cromosoma 3 menor identidad (Tabla 7).

### ***Homo sapiens* H19, de expresión materna, no traducido.**

-Resultado (Score) = 378 bits (418) -Esperado = 9e-102 -Homologías = 211/215 (98%)

-Gaps = 0/215 (0%) - Strand=Plus/Plus

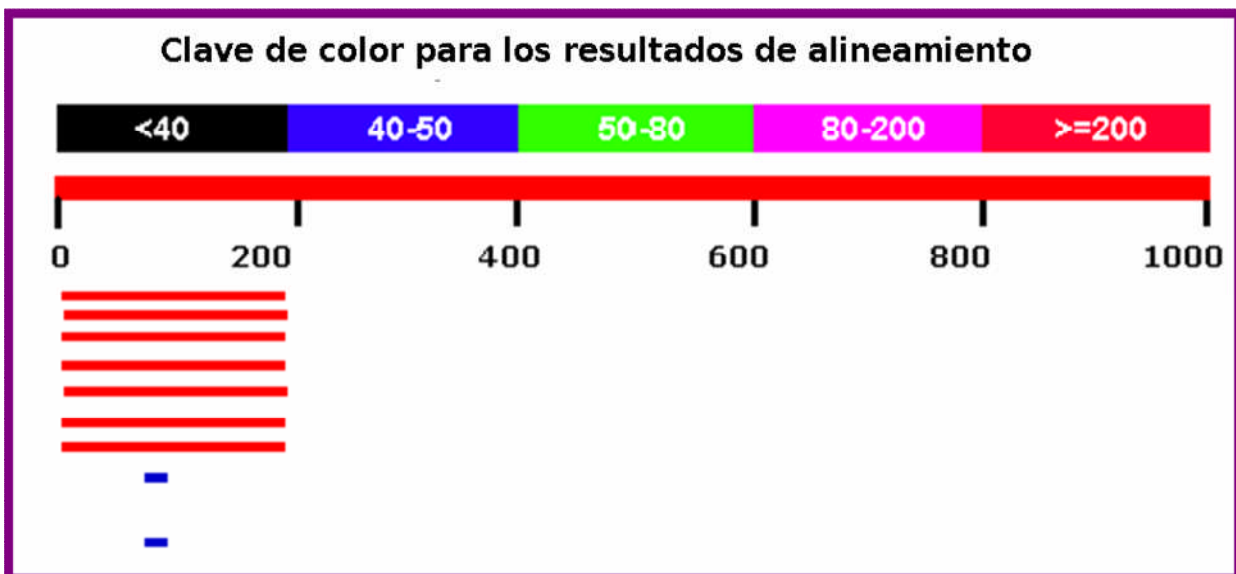


**Tabla 7.** Análisis de la muestra secuenciada de H19 en el BLAST.

| <b>Descripción</b>   | <b>Máxima Puntuación</b> | <b>Resultado Total</b> | <b>Reportes incluidos</b> | <b>Valor E</b> | <b>% de Identidad</b> |
|--|--------------------------|------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Homo sapiens</i> H19, de expresión materna, no traducido                          | <b>378</b>               | <b>378</b>             | <b>19%</b>                | <b>9e-102</b>  | <b>98%</b>            |
| <i>Homo sapiens</i> , cromosoma 11, ensamble alternativo (basado en ensamble Celera) | 228                      | 391                    | 19%                       | 1e-56          | 100%                  |
| <i>Homo sapiens</i> , cromosoma 11 ensamble de referencia                            | 228                      | 391                    | 19%                       | 1e-56          | 100%                  |
| <i>Homo sapiens</i> , cromosoma 3 ensamble alternativo (basado en ensamble Celera)   | 41.0                     | 41.0                   | 2%                        | 3.0            | 87%                   |
| <i>Homo sapiens</i> , cromosoma 3 ensamble de referencia                             | <b>41.0</b>              | <b>41.0</b>            | <b>2%</b>                 | <b>3.0</b>     | <b>87%</b>            |

## Secuenciación de KCNQ1OT1 (Lit-1)

La reacción de secuenciación se llevó a cabo en dirección 5´-3´ con el INICIADOR Lit1-F 5´ AAG AAA GTG TTG AGT GGT AA 3´. Los resultados fueron presentados como electroferogramas en los programas Finch TV y ChromasPro 2.33 (Figuras 24y 25) desde donde se realizó el análisis con el BLAST ("Basic Local Alignment Search Tool"), para encontrar la secuencia que presentaba mayor homología en la base de datos. En la Figura 21 se observan las claves de color asignadas para las secuencias que mostraron homología con la secuencia analizada



**Figura 10.** Claves de color asignadas a los alineamientos obtenidos en la comparación de los resultados de la secuenciación del transcrito KCNQ1OT1 (Lit-1) con el BLAST.

Al comparar la muestra secuenciada de KCNQ1OT1 (Lit-1) se obtuvieron ocho alineamientos con secuencias halladas en la base de datos, ocupando la primera posición en homología la secuencia de *Homo sapiens KCNQ1OT 1*, transcrito de sobrelapamiento y con menor porcentaje de homología la de *DNA de Dario rerio (pez cebra)*, secuencia obtenida de una clona, con sólo un 42% de homologías (Tabla 8).

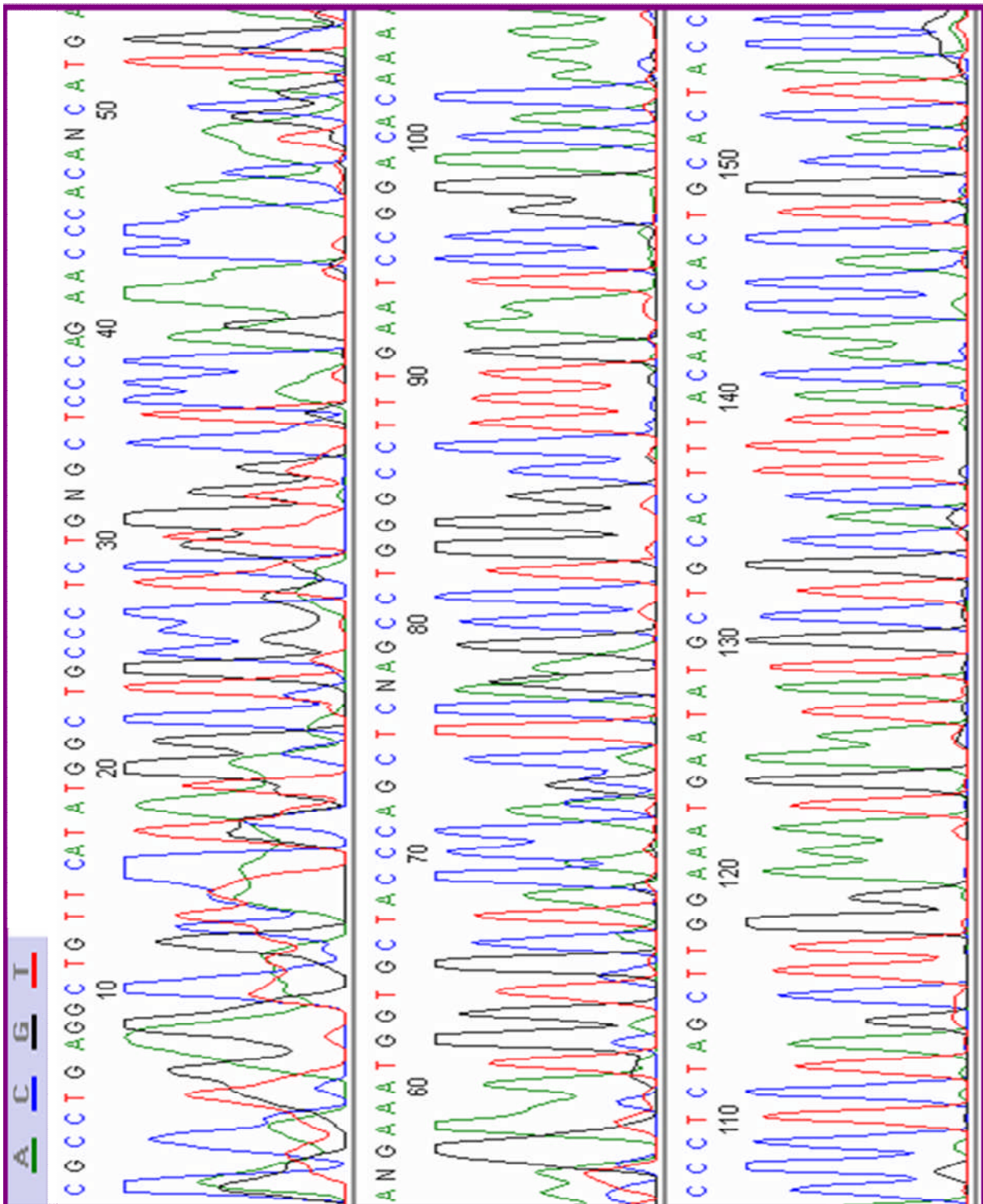
### ***Homo sapiens KCNQ1OT1*, transcrito de sobrelapamiento.**

Resultado (Score) = 327 bits (295) -Esperado = 6e-86 -Homologías = 212/229 (92%)  
-Gaps = 1/229 (0%) - Strand =Plus/Plus

**Tabla 8.** Análisis de la muestra secuenciada de *KCNQ1OT1* en el BLAST.

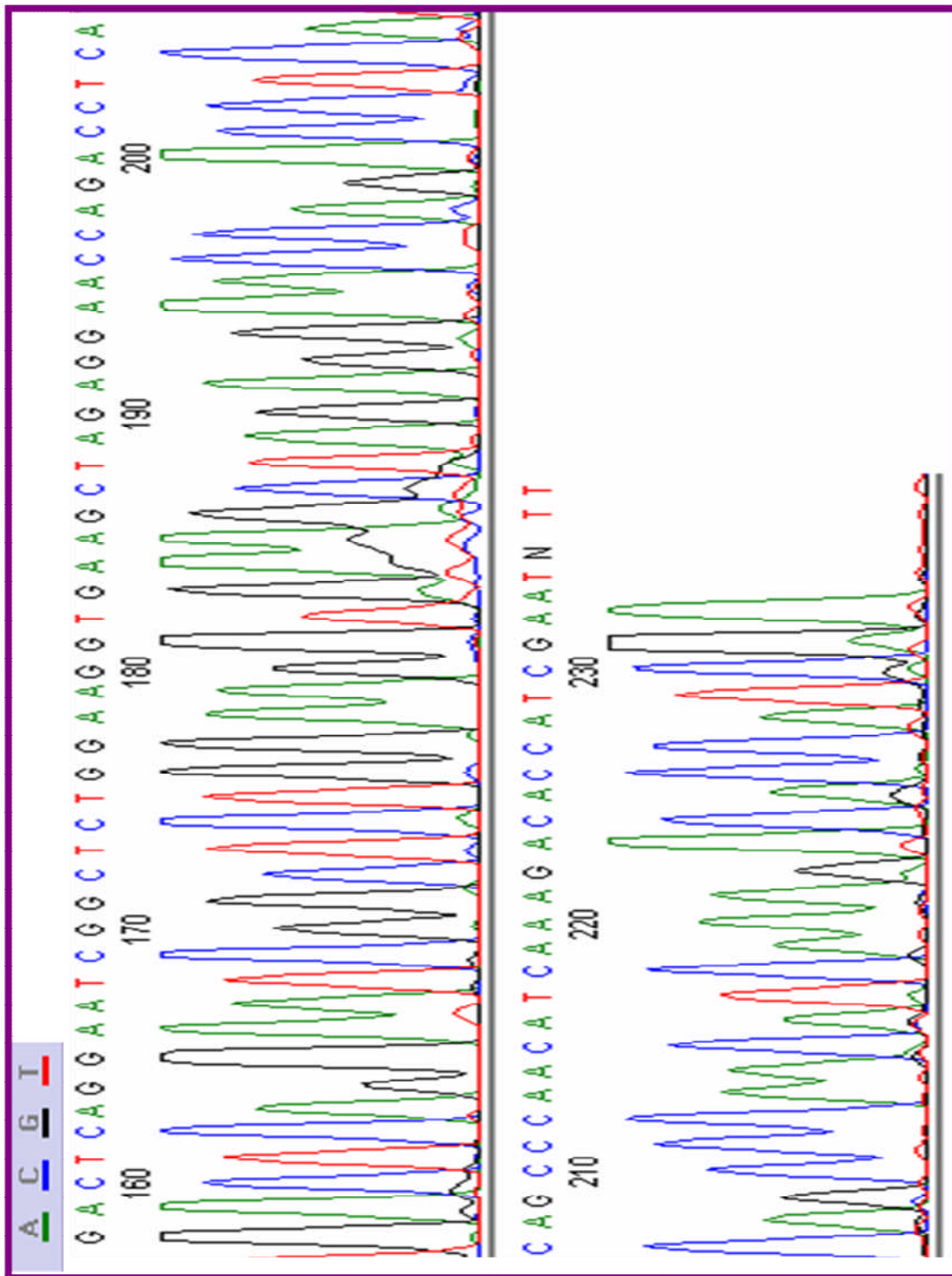
| <b>Descripción</b>  | <b>Máxima Puntuación</b> | <b>Resultado Total</b> | <b>Reportes incluidos</b> | <b>Valor E</b> | <b>% de Identidad</b> |
|---|--------------------------|------------------------|---------------------------|----------------|-----------------------|
| <i>Homo sapiens KCNQ1OT1</i> , transcrito de solapamiento             | <b>352</b>               | <b>378</b>             | <b>19%</b>                | <b>6e-86</b>   | <b>92%</b>            |
| <i>Homo sapiens</i> cromosoma 11, clona RP4-608B4, secuencia completa | 320                      | 391                    | 19%                       | 6e-86          | 92%                   |
| <i>Homo sapiens</i> , cromosoma 11 RP11-38L8, secuencia completa      | 320                      | 391                    | 19%                       | 6e-86          | 92%                   |
| <i>Homo sapiens</i> gen <i>KVLQT1</i>                                 | 320                      | 370                    | 19%                       | 6e-86          | 92%                   |
| Cromosoma 11p15.5 pac pD  | 320                      | 350                    | 19%                       | 6e-86          | 87%                   |
| <i>DNA de Danio rerio</i> secuencia de una clona                      | <b>42.1</b>              | <b>42.0</b>            | <b>2%</b>                 | <b>5.3</b>     | <b>40%</b>            |

## Electroferograma del gen H19



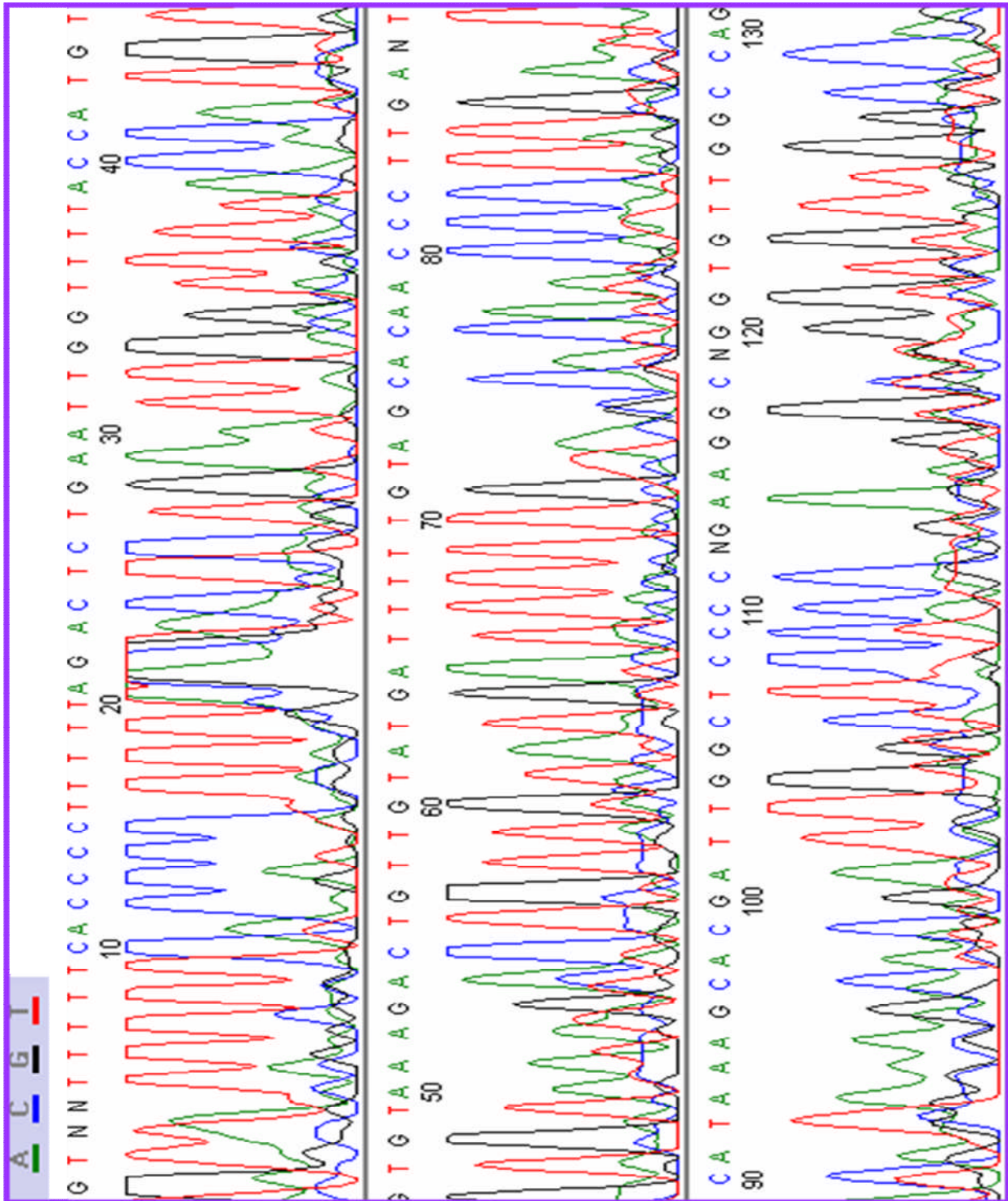
**Figura 11.** Electroferograma de la secuencia de H19 de la base 1 a la 156, en color verde se muestran las adeninas, en azul las citosinas, en negro las guaninas y finalmente en rojo las timinas.

## Electroferograma de H19



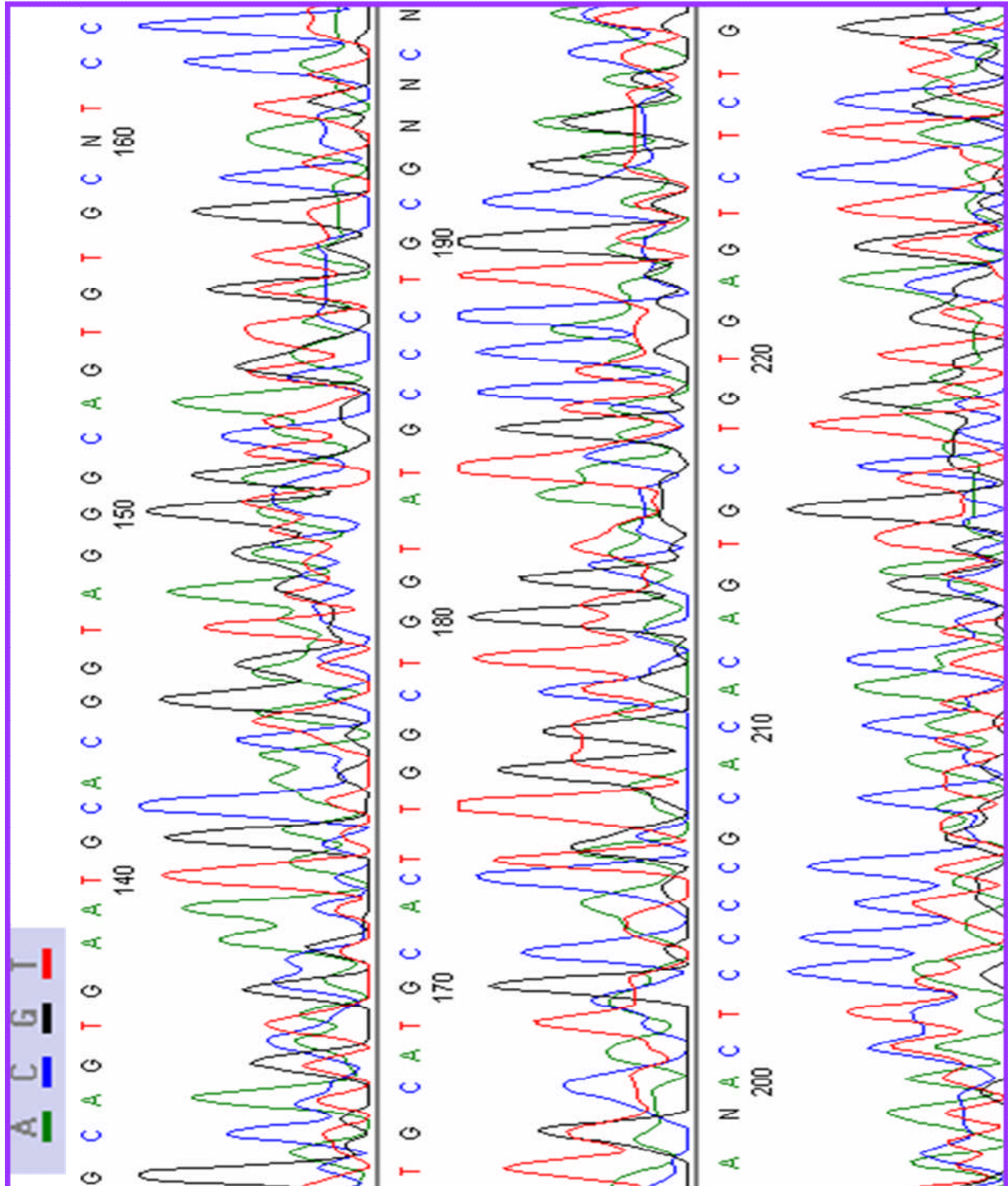
**Figura 12.** Electroferograma de la secuencia de H19 de la base 160 a la 232, en color verde se muestran las adeninas, en azul las citosinas, en negro las guaninas y finalmente en rojo las timinas.

**Electroferograma de KCNQ1OT1 (Lit-1)**



**Figura 13.** Electroferograma de la secuencia de Lit-1 de la base 1 a la 130, en color verde se muestran las adeninas, en azul las citosinas, en negro las guaninas y finalmente en rojo las timinas.

**Electroferograma de KCNQ1OT1 (Lit-1)**



**Figura 14** Electroferograma de la secuencia de Lit-1 de la base 132 a la 229, en color verde se muestran las adeninas, en azul las citosinas, en negro las guaninas y finalmente en rojo las timinas

## DISCUSIÓN

La ausencia de la expresión de los genes *KCNQ1OT1* y *H19* en pacientes con SBW, puede ser ocasionada por alguno de los siguientes procesos: a) pérdida de impronta de estos transcritos, b) hipermetilación de las regiones reguladoras de impronta 1 y 2 y de la región promotora de estos genes en los pacientes con SBW, c) mutaciones o epimutaciones en ICR1 (elemento regulador de impronta) que ocasionan la pérdida de impronta de *IGF2* y por lo tanto el silenciamiento de *H19* (Engel *et al.*, 2000); d) alteraciones en ICR1 están asociadas con la pérdida de *IGF2*, como un mecanismo independiente de *H19* (Weksberg *et al.*, 2003); e) pérdida de impronta de *KCNQ1OT1* la cual afecta o no afecta la expresión de *IGF2*, ya que algunos pacientes que presentan esta LOI muestran expresión monoalélica de *IGF2*, pero en otros si se ha reportado LOI de *IGF2* ; f) expresión bialélica de *IGF2* y silenciamiento de la expresión de *H19* en casos esporádicos; en los que se observa la hipermetilación del alelo materno de *H19*, mostrando un epigenotipo paterno (Engel *et al.*, 2000).

Con base en el ya referido estado de metilación, se han definido cuatro grupos de pacientes con SBW: el grupo 1 (20%) presenta disomía uniparental y alteración en la metilación tanto de *Lit 1* como de *H19*; en los grupos 2 (7%) y 4 (18%) no hay alteraciones en la metilación de *Lit 1* y finalmente en el grupo 3 (55%) existe alteración en el centro regulador de impronta 2, lo que conduce a la desmetilación de *Lit-1* (Bleik *et al.*, 2001). De acuerdo con esta clasificación los pacientes BW-1 y BW-10 que presentaron alteración de la expresión de *KCNQ1OT1* (*Lit-1*) y BW-7 quien presentó expresión diferencial de *H19*, se ubicarían dentro del grupo 1; y los casos restantes dentro de los grupos 2 y 4.

La hipermetilación de *H19* está estrechamente relacionada con la tumorigénesis en contexto con la disomía uniparental de 11p15.5, o como un evento epigenético aislado. Estos descubrimientos son respaldados por el reporte de casos con SBW y tumores asociados con la disomía uniparental del cromosoma 11 y con el epigenotipo de la hipermetilación de *H19*. (Tycko *et al.*, 2000).

DeBaun *et al.*, 2002, reportaron que en el estudio molecular de los genes *H19* y *KCNQ1OT1* de una cohorte de 92 pacientes con SBW quienes mostraban la misma



incidencia de fenotipos clínicos. La frecuencia de alteraciones en la metilación del DNA fue más alta (56%) en pacientes que presentan cáncer, que la frecuencia en pacientes sin cáncer (17%). Por otra parte el cáncer no se asoció con alteraciones en la metilación de *KCNQ1OT1*. Sin embargo la frecuencia de alteraciones de metilación de *KCNQ1OT1* en pacientes con defectos de la pared abdominal y macrosomia fue significativamente más alta (65%) y (60), que en pacientes sin estas características clínicas, (34%) y (18%) respectivamente. Lo que corrobora la relación fenotipo-genotipo en SBW, en el cual la metilación aberrante de *H19* y *KCNQ1OT1*, se asocian fuertemente al riesgo para desarrollar neoplasias y a defectos de nacimiento específicos.

Se han descrito principalmente 2 rutas génicas para el desarrollo de neoplasias en SBW estas son: la expresión bialélica de *IGF2* o pérdida de impronta en algunos pacientes y la presencia de alteraciones en la impronta de *KCNQ1OT1/KvDMR1*. La pérdida de impronta de *IGF2* ocurre en una gran variedad de tumores. El tumor de Wilms relacionado con SBW se asocia con la hipermetilación de *H19* (falta de expresión de ambos alelos). Los casos de SBW con defectos de impronta en *KCNQ1OT1/KvDMR1* pueden mostrar pérdida de impronta o impronta normal de *IGF2*; los defectos de la impronta de *IGF2* pueden formar parte de algunas rutas de carcinogénesis controladas por los dominios centroméricos y teloméricos de impronta de 11p15.5 (Weksberg *et al.*, 2001)

La falta de expresión del gen *H19* en el paciente BW-7, sugiere que alguno de los eventos anteriormente mencionados (hipermetilación de su promotor o de la (ICR)<sub>2</sub>, expresión bialélica de *IGF2*) puede ser el factor etiológico de SBW. o bien que hayan ocurrido alteraciones en la cromatina.

Por otro lado la expresión diferencial de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) es ocasionada por mecanismos distintos. Horike *et al.*, 2000 reportaron que la pérdida de *KvDMR1* silencia la expresión del alelo paterno y activa la expresión de *KCNQ1* y *CDKN1C* no obstante esto no tendría efecto sobre la impronta de *H19*.

La región diferencialmente metilada (*KvDMR1*) regula la metilación del alelo materno y la desmetilación del alelo paterno expresando el RNA antisentido *KCNQ1OT1* (*LIT-1*). *KvDMR1* está cercana al sitio de inicio de transcripción del *KCNQ1OT1* expresado en este alelo. Los pacientes con pérdida de metilación en *KvDMR1* muestran expresión

bialélica de *KCNQ1OT1* (Engel *et al.*, 2000). Por lo que se ha propuesto que KvDMR1 es un elemento regulador que separa a los promotores de *CDKN1C* y *KCNQ1* del “enhancer” que se encuentra río abajo y que está abierto para la metilación. Este modelo puede predecir que la pérdida de metilación (LOM por sus siglas en inglés) puede reducir la expresión de *KCNQ1* y *CDKN1C* (Maher *et al.*, 2000).

No obstante los pacientes con SBW que presentan metilación normal de KvDMR1 y expresión reducida de *CDKN1C*, pueden presentar cambios a nivel de cromatina o modificación de histonas (Díaz-Meyer *et al.*, 2005). Por otro lado se ha propuesto al gen *ZAC*, como regulador de la expresión de *CDKN1C*, a través de *KCNQ1OT1*. Se ha reportado que las mutaciones del gen *ZAC* están asociadas a alteraciones del crecimiento particularmente en pacientes con SBW.

Por lo que se propone, a la delección de KvDMR1 como factor etiológico de SBW en los pacientes BW-1 y BW-9, al ser ésta un mecanismo que silencia la expresión de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) del alelo paterno que normalmente se encuentra expresado, o a la alteración en los patrones de metilación del transcrito. Cabe señalar que los resultados de estos pacientes no concuerdan con lo informado por Weksberg *et al.*, en el 2003 y Engel *et al.*, 2000; ya que la alteración epigenética más frecuente en SBW es la expresión bialélica de este gen, pues se ha descrito en más del 50% de los pacientes con este síndrome.

Las alteraciones en los patrones de impronta en *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) (expresión bialélica o pérdida de expresión) se han relacionado con la presencia de tumores embrionarios como el gonadoblastoma, rabdiomiosarcoma y hepatoblastoma (Bleik *et al.*, 2001). Mientras que la hipermetilación y la pérdida de impronta de *H19* incrementan el riesgo para desarrollar algún tipo de neoplasia, al ser este un supresor tumoral (Engel *et al.*, 2000).

En el caso de *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) su pérdida de impronta afecta a *CDKN1C* porque generalmente funciona como represor transcripcional de este gen al aislarlo de su potenciador (Du *et al.*, 2004). Sin embargo al no encontrarse expresado *KCNQ1OT1* (*LIT-1*) pierde su función reguladora sobre *CDKN1C* (cinasa dependiente de ciclinas) que codifica para un inhibidor de p57 por lo que se desregula la proliferación celular. En muchos de los cánceres humanos este gen se localiza en las regiones que frecuentemente presentan pérdida de heterocigocidad (Li *et al.*, 1998, 2001).

En este estudio no se observó correlación fenotipo-genotipo, en siete de los diez pacientes analizados, sin embargo no se analizaron todos los procesos relacionados con la etiología del síndrome en estudio. Al no estar afectados estos genes y al no hallar evidencia de los cambios epigenéticos más comunes en estos siete pacientes se sugiere que la causa del síndrome puede ser una mutación puntual en *CDKN1C* (Algar et al., 2000) o a cambios de expresión en otros genes afectados en SBW.

Se han descrito múltiples mutaciones puntuales que afectan de diferentes formas a *CDKN1C*, algunas heredadas por vía materna, tal es el caso del cambio de G por T en un tracto de poliG en el extremo 5' del intron 3, lo que altera el mecanismo de "splicing" (corte y empalme) (Lew et al., 2004).

Se han reportado anomalías fenotípicas como factores predictivos para el desarrollo de tumores embrionarios tales como: la visceromegalia, macrosomía, defectos de la pared abdominal, sin embargo en algunos estudios se establece que a pesar de que la hemihiperplasia y la organomegalia no están significativamente relacionadas con la tumorigénesis, la frecuencia de pacientes que desarrollan algún tipo de neoplasia es más alta en pacientes que presentan organomegalia y hemihiperplasia, que en pacientes sin estos signos clínicos (Gastón et al., 2001).

Esto contribuye a la clasificación molecular de los pacientes SBW, lo que le proporciona a los clínicos más elementos pronósticos y les permite proponer el seguimiento médico de los pacientes (BW-1 y BW-9), cuando se presentan características fenotípicas como macrosomía y visceromegalia y la pérdida de expresión de *KCNQ10T1 (LIT-1)*; debido a que estas se relacionan con el desarrollo de tumores.

Para el paciente BW-7 se sugiere seguimiento médico, al encontrar alteraciones en la expresión de *H19* y presentar como características clínicas: macrosomía, visceromegalia, onfalocelo e hemihipertrofia de las cuales dos de ellas son catalogadas como factores predictivos para el desarrollo de tumores embrionarios.

El seguimiento de los pacientes con mayor riesgo para desarrollar tumores (BW-1, BW-7 y BW-9) tiene como objetivo la detección precoz de los tumores asociados al

síndrome, no sólo para reducir las secuelas y complicaciones de un tratamiento demasiado drástico.

Llama la atención que de acuerdo a los datos clínicos, los pacientes analizados en este estudio que presentaron hemihipertrofia, no mostraban macrosomía y a la fecha del estudio no habían presentado tumores.

## CONCLUSIONES

- El género más afectado fue el femenino (70%).
- En siete pacientes no se presentó correlación fenotipo-genotipo a pesar de que dos casos eran familiares.
- La expresión del gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* en dos familias analizadas presentó alteraciones.
- En un caso no se observó expresión del transcrito *H19*.
- En ocho casos analizados la expresión del gen *KCNQ1OT1 (LIT-1)* es monoalélica, mientras que la expresión del gen *H19* fue normal en nueve de los casos estudiados; siguiendo el patrón de expresión reportado.
- Se confirmó la expresividad variable reportada para este síndrome.
- El estudio de la expresión de los genes *KCNQ1OT1 (LIT-1)* y *H19* permitió proponer el seguimiento clínico de tres pacientes.

## PERSPECTIVAS

- Se propone la realización de estudios de metilación del DNA de los genes reportados.
- Analizar la expresión a nivel de mRNA de los genes *IGF2* y *CDKN1C* para comprobar que la etiología no esté basada en los cambios epigenéticos frecuentes del SBW.
- Secuenciación completa del gen *CDKN1C*, para buscar mutaciones puntuales que puedan ser la causa de SBW, en los casos que no se observó alteración de expresión.

## GLOSARIO

- **Alelo.-** Una de las formas variantes de un gen en un locus o de un marcador particular en un cromosoma.
- **Criptorquidia.-** enfermedad testicular. Deriva del griego *kriptos* (oculto) y *orquis* (testículo). El testículo criptorquídico, oculto o no descendido, es aquel que se encuentra espontánea y permanentemente fuera del escroto, pero localizado en un punto de su trayecto normal de descenso, pudiendo palparse o no, y ser unilateral o bilateral.
- **Disomía uniparental.-** Presencia de ambos cromosomas homólogos heredados de un sólo progenitor, generalmente del padre.
- **Esplenomegalia.-** es el agrandamiento del bazo más allá del tamaño normal.
- **Expresión génica.-** Un proceso altamente específico en el cual un gen se "enciende" en un momento determinado y comienza la producción de su proteína.
- **Expresividad variable.-** Misma mutación, pero un individuo puede estar más afectado que otro, ocasionado por cambios epigenéticos o epistasio y por el ambiente ( otros genes de la economía, pueden modificar)
- **Hemihipertrofia.-** agrandamiento anormal o desarrollo excesivo de la mitad del cuerpo o de la mitad de una región corporal.
- **Hemihiperplasia.-** Desarrollo o crecimiento excesivo de la mitad de un determinado órgano o de parte o la totalidad de los órganos de un lado del cuerpo
- **Hepatomegalia.-** agrandamiento del hígado por encima de su tamaño normal. (La hepatoesplenomegalia es el agrandamiento del hígado y del bazo.
- **Heterocigosidad.-** Diversidad genética. Formación de un híbrido a partir de gametos diferentes.

- **Macroglosia.-** Es un trastorno en el que la lengua es más grande de lo normal.
- **Macrosomia.-** El término es usado para describir el desarrollo o tamaño excesivo del cuerpo, como en el caso de un recién nacido con un peso por arriba del normal. La fisiopatología de la macrosomia está relacionada a la condición materna o a la condición del desarrollo fetal.
- **Mosaicismo.-** Coexistencia en un individuo de dos o más líneas celulares con distinta constitución cromosómica pero que proceden del mismo cigoto.
- **Nevus flammeus.-** Mancha facial
- **Onfalocele.-** malformación congénita (existe al nacer) en la cual cantidades variables del contenido abdominal (vísceras) están insertadas en la base del cordón umbilical. A medida que el feto crece durante el embarazo, los intestinos crecen, se alargan y se proyectan desde el abdomen dentro del cordón umbilical.
- **Penetrancia incompleta.-** Mutación donde un individuo puede estar afectado y otro no. Cuando hay una mutación pero no existe expresión fenotípica .
- **Polihidramnios.-** es definido como un excesivo volumen de líquido amniótico relacionado a la edad gestacional, que afecta al 0,5 a 0,7 % del total de los embarazos.
- **RNA<sub>m</sub>.-** Molde para la síntesis de proteínas. La secuencia de una cadena del RNA<sub>m</sub> está basada en la secuencia de una cadena complementaria de ADN.
- **Visceromegalia.-** aumento de tamaño de los órganos internos que se encuentran en el abdomen, tales como hígado, bazo, estómago, riñones o páncreas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Algar E, Brickell S, Deeble G. Analysis of CDKN1C in Beckwith Wiedemann Syndrome. *Human Mutation*. (2000); 15: 497-508.
2. Arman Nazneen. Mechanisms predisposing to childhood overgrowth and cancer. *Current Opinión in Genetics and Development* (2005), 15: 227-233.
3. 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.
4. Beatty L, Weksberg R. Detailed analysis of the methylation patterns of the KvDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. *Genomics*. (2006); 87: 46-56.
5. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals (2000). *Hum. Mol. Genet.* 9:2395-2402.
6. Bhattacharya, S., *et al.* A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*. (1999). 397:579-583.
7. Bliet J.; Mass, S,M; Ruijter J.M; Hennekan R.C.M; Alders M ; Westerveld A; Mannens M.M.A.M. Increased tumor risk for BWS patients correlates with aberrant H19 and not KCNQOT 1 methylation: occurrence of KCNQ1OT 1 hypomethylation in familial cases of BWS. *Hum. Molec. Gente.* (2001)10:467-476.
8. Bliet J, Maas SM, Ruijter JM . Increased tumor risk for SBW correlates with aberrant *H19* and not *KCNQ1OT1 (Lit-1)* methylation: occurrence of *KCNQ1OT1 (Lit-1)* hypomethylation in familiar cases of SBW. *Hum Mol Genet* .(2001); 10:467-476.
9. Bliet 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.
10. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*. (1987).
11. Cooper W, Luharia A, Evans G. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics*. (2005); 13:1025–1032.
12. 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.



13. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP. Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* (2002) Mar;70(3):604-11.
14. 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.
15. 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.
16. Egger G, Liang G, Aparicio A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* (2004); 429: 457- 463.
17. Engel JR, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ. Epigenotype-phenotype correlations in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* (2000); 37:921–926.
18. 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.
19. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone- modification maps. *Nature Publishing Group*. (2007): 8:286-297.
20. Ferbeyre, B. L., Salinas, G. *J Bases genéticas y moleculares del cáncer / 1a. parte*. Gamo (2005) Vol. 4 Núm. 2, Mar-Abr
21. Gabellini D, Tupler R, Green M; Transcriptional derepression as a cause of genetic diseases. *Genetics of diseases. Current Opinion in Genetics and Development* (2003),13:239-245.
22. Gaston V, Le Bourc Y, Sourpe V, Burglen L, Donadieu, Oro Hubert, Audry, Vazquez M, Gicquel C. Análisis of the methylation status of the *KCNQ1OT* and *H19* genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *European Journal of Human Genetics* (2001) 9, 409-418.
23. Horike S; Mitsuya K; Meguro M; Kotobuki N; Kasiwagi A; Notsu T; Schulz T.C. Shirayoshi, Y; Oshimura M. Targeted disruption of the human *LIT* locus defines a putative imprinting control element playing an essential role in Beckwith Wiedemann Syndrome. *Hum. Molec. Gent.* (2000) 9:2075-2083.
24. Lara Jiménez P C; Navarro Bosch Dy Sáez Bravo M. *Genética de Cáncer*. *Biocáncer 1*, Centro de Ciencias de la Salud, Instituto Canario de Investigación del Cáncer. (2004).

25. 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.
26. Li M, Squire J, Shuman C. Imprinting Status of 11p15 Genes in Beckwith-Wiedemann Syndrome Patients with *CDKN1C* Mutations. *Genomics* (2001);74:370-376.
27. Luedi P. P., Hartemink A J., Jirtle R. L. Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* (2005). 15:875-884.
28. Li M, Squire JA, Weksberg R. Molecular Genetics of Wiedemann-Beckwith Syndrome. *Am J Med Genet* (1998); 79:253–259.
29. Madeline Li, Squire JA, Shuman C., Atkin J., Pauli, R., Smith, A., Chitayat, D. Weksberg, R. Imprinting Status of 11p15.5 genes in Beckwith-Wiedemann Syndrome Patients with *CDKN1C* mutations. *Genomics* (2001)74; 370-376
30. Maher ER, Reik W. Beckwith-Wiedemann Syndrome: imprinting in cluster revisited. *Clin Invest* (2000); 105-247-52.
31. Marcus Vinicius de MG, Silveira RE. Beckwith Wiedemann syndrome and isolated hemihyperplasia. *Sao Paulo Med J* (2003); 121:133-138.
32. Martínez y Martínez R. Clinical features in the Wiedemann Beckwith síndrome. *Clin Genet* (1996);50:272-274.
33. Mesa C. V M, Barros N P, Medina L C. Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer *Gac Méd Méx* (2006); 142(1) : 81-82.
34. Minjie Du,a Wenjing Zhou,a Linda G. Beatty,a Rosanna Weksberg,b and Paul D. Sadowskia. The *KCNQ1OT1* promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5 Toronto, ON M5S 1A8, Canada. *Genomics* (2004) 84: 288–300.
35. 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.
36. Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, Kugoh H, Mukai T, Ikeguchi M, Oshimura M. Expression profile of *LIT1/KCNQ1OT1* and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci.* (2006) Nov;97(11):1147-54.
37. Nazneen R. Mechanisms predisposing to childhood overgrowth and cancer. *Current Opinion in Genetics and Development* (2005), 15: 227-233.

38. Niemitz EL, DeBaun MR, Fallon J. Microdeletion of *LIT1* in Familial Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Am J Hum Genet* (2004); 75:844–849.
39. Olivo, Y; Flores C. Síndrome de Beckwith Wiedemann: A propósito de un caso reportado en el Servicio de Neonatología del Hospital de Apoyo San José del Callao. (2002). *Diagnostico Vol 41 Numero 2*.
40. R.Pardo de la Vega, Prieto E.M; Galbe S.; Antuña G.M.J. 2 Síndrome de Beckwith-Wiedemann: Factor de riesgo para el desarrollo de tumores. A propósito de un caso. *Boletín de la Sociedad de Pediatría de Asturias, Cantabria, Castilla y León*. (2001) 41: 41-44.
41. Reik W, Walter J. Genomic imprinting, parental influence on the genome. *Nature Rev Genet* (2001);2:21-32.
42. Renan MJ: How many mutations are required for Tumorigenesis. Implications for human cancer data. *Mol Carcinog* (1993);7:139-146
43. Ricardez M.E.F. Correlación genotipo fenotipo en una Familia mexicana con Síndrome de Beckwith Wiedemann. Tesis para obtener el grado de Médico Genetista. U.N.A.M. Posgrado en ciencias médicas. (2006).
44. 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.
45. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. (2003) Nov;544(2-3):99-106.
46. Schneid H, Vazquez M, Vacher C. The Beckwith-Wiedemann Syndrome Phenotype and the Risk of Cancer. *Medical and Pediatric Oncology* (1997); 28:411–415.
47. 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.
48. Stratton M. Mechanisms of activation and inactivation of dominant oncogenes and tumour suppressor genes, capítulo 2, pp16-26. *Molecular Biology for Oncologists*. 2ª edición. Editado por Yarnold JR, Stratton M y McMillan TJ. Chapman and Hall, (1996).
49. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J. Clin Invest.*, (2000), 105, 401-407.
50. 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.

51. Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol.* (2003); 14:101-110.
52. Weksberg R; Nishikawa J; Caluseriu; Yan-Ling Fei; Shuman C; Wei C; Cameron J; Smith A.C; Ambus I; Madeline L; N. Ray P; Sadowski P; Squire. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *J.Human Molecular Genetics* (2001) Vol 10 No. 26 2989-3000.
53. Weksberg R; Shuman C; Caluseriu O. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith – Wiedemann syndrome. *Hum Mol. Genet.* (2002); 11:1317-1325.
54. Weksberg R; Smith A.C; Squire J; Sadowski P. Beckwith Wiedemann Syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum. Molec. Genet.* (2003). Vol. 12, Review Issue.
55. Worm, J. and Guldborg, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J. Oral. Pathol. Med.* (2002). 31:443-449.
56. Yong HJ, Bressler J, Beaudet A. Epigenetics and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2004); 5:479-510.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=103280>