



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**ANÁLISIS DEL PATRÓN DE METILACIÓN DEL DNA EN LOS CENTROS DE
CONTROL DE IMPRONTA 1 Y 2 DE LA REGIÓN 11p15.5 EN PACIENTES CON
HEMIHIPERPLASIA AISLADA**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

LUIS ENRIQUE MARTÍNEZ BARRERA

TUTORA: DRA. VERÓNICA FABIOLA MORÁN BARROSO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD**

MÉXICO D.F., MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue desarrollado mediante el protocolo autorizado número HIM/2012/007, titulado “Implicaciones del patrón de metilación en la región 11p15.5 como mecanismo etiológico de la Hemihiperplasia aislada”, contando con el apoyo de Fondos Federales para su realización.

Agradecimiento especial a todos aquellos que contribuyeron con su conocimiento y dedicaron su valioso tiempo para la realización del presente trabajo.

RESUMEN.....	4
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1. Estructura de la cromatina.....	5
1.2. Regulación de la cromatina.....	10
1.3. Regulación epigenética de la expresión génica.....	12
1.3.1. Metilación del DNA.....	13
1.3.1.1. Distribución del DNA metilado.....	14
1.3.1.2. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación del DNA.....	17
1.3.1.3. Mecanismo de la desmetilación del DNA.....	19
1.3.1.4. Consecuencias funcionales de la metilación del DNA.....	20
1.3.2. Modificaciones postraduccionales de histonas.....	21
1.3.3. Comunicación entre los mecanismos epigenéticos.....	26
1.3.4. Impronta genómica.....	27
1.4. La región 11p15.5.....	30
1.5. Implicaciones de la región 11p15.5 en la presentación de enfermedades.....	33
1.5.1. Síndrome de Beckwith-Wiedemann.....	35
1.5.1.1. Descripción clínica del SBW.....	35
1.5.1.2. Etiología del SBW.....	37
1.5.1.3. Correlación epigenotipo fenotipo del SBW.....	38
1.5.1.4. Diagnóstico del SBW.....	39
1.5.2. Síndrome de Silver-Russell.....	40
1.5.2.1. Descripción clínica del SSR.....	40
1.5.2.2. Etiología del SSR.....	41
1.5.2.3. Correlación epigenotipo fenotipo del SSR.....	42
1.5.2.4. Diagnóstico del SSR.....	42
1.5.3. Hemihiperplasia aislada.....	43
1.5.3.1. Descripción clínica de la HA.....	44
1.5.3.2. Etiología de la HA.....	45
1.5.3.3. Correlación epigenotipo fenotipo de la HA.....	46
1.5.3.4. Diagnóstico de la HA.....	46
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	47
3. JUSTIFICACIÓN.....	47
4. HIPÓTESIS.....	48
5. OBJETIVOS.....	48
5.1. Objetivo general.....	48
5.2. Objetivos específicos.....	48
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
6.1. Población de estudio.....	49
6.2. Criterios de selección.....	50
6.3. Evaluación clínica de los pacientes con hemihiperplasia aislada.....	51
6.4. Determinación del patrón de metilación del DNA en los CI y número de copias de la región 11p15.5 mediante MLPA.....	52
6.5. Análisis de resultados clínicos.....	56
6.6. Análisis de resultados moleculares.....	56
7. RESULTADOS.....	59
7.1. Resultados clínicos de los pacientes con HA.....	59
7.2. Resultados del patrón de metilación del DNA en los CI y número de copias de la región 11p15.5.....	68
8. DISCUSIÓN.....	80
9. CONCLUSIONES.....	87
10. REFERENCIAS.....	88
ANEXOS.....	102

RESUMEN

El campo de la epigenética incluye el estudio de los cambios heredables en la expresión génica que no se deben a ninguna alteración en la secuencia del DNA. Entre los mecanismos epigenéticos se encuentra la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de histonas, fenómenos críticos en la conformación de la cromatina y regulación de la expresión génica. Otro factor que influye en la expresión génica es la impronta genómica, la cual genera una expresión diferencial dependiendo del origen parental. La regulación adecuada de la expresión génica asegura un desarrollo y crecimiento normal, por lo que su alteración ha emergido como una vía fundamental en la patogénesis de numerosas enfermedades y en particular de patrones anormales del crecimiento como en el síndrome de Beckwith-Wiedemann, el síndrome de Silver-Russell y la hemihiperplasia aislada. Esta última condición se caracteriza por sobrecrecimiento corporal asimétrico y un aumento en el riesgo de neoplasias de tipo embrionario. La etiología asociada a la hemihiperplasia aislada presenta una alteración en el patrón de metilación del DNA en los centros de control de impronta 1 y 2 de la región 11p15.5, la cual incluye genes críticos en la regulación del crecimiento y proliferación celular como son *H19*, *IGF2* y *CDKN1C*. Se ha estudiado escasamente el patrón de metilación del DNA de la región 11p15.5 en pacientes con HA y en la mayoría de ellos no se ha detectado alteraciones, además de que la frecuencia de las alteraciones moleculares puede variar en diferentes poblaciones. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el patrón de metilación del DNA en los centros de control de la impronta 1 y 2 de la región 11p15.5 en sangre periférica de pacientes mestizos mexicanos con hemihiperplasia aislada. Se realizó el estudio clínico y determinación del patrón de metilación en 9 pacientes mediante la prueba de amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple sensible a metilación. Nuestros resultados mostraron un predominio de diagnóstico en la etapa de lactante (56%) con una relación 2:1 del sexo femenino sobre el masculino. La presentación de hemihiperplasia izquierda fue ligeramente más frecuente que la derecha, el 67% presentó hemihiperplasia compleja y se presentaron otros hallazgos asociados en el 67% de los pacientes. Únicamente un caso presentó asimetría renal izquierda. Todos los pacientes presentaron un número de copias normal para la región 11p15.5, mientras que los patrones de metilación resultaron normales en el 78%. Se observó la hipermetilación de *CI1* en el 22% de los pacientes, quienes presentaron hemihiperplasia compleja izquierda y una diferencia mayor a 2 cm en relación a la asimetría de extremidades. Los resultados demuestran que esta alteración en el patrón de metilación es una causa poco frecuente de hemihiperplasia en pacientes mexicanos y no se descarta la asociación con formas frustradas de síndrome de Beckwith-Wiedemann causadas por sobreexpresión del gen *IGF2*.

1. ANTECEDENTES

1.1. Estructura de la cromatina

La información genética de una célula está constituida por aproximadamente 2 m de DNA genómico dentro de su núcleo celular, de manera que resulta interesante entender como un DNA de gran longitud esta contenido en un diámetro de tan solo 10 μm (Figura 1). Al respecto, fue en el siglo XIX cuando se describió una sustancia nuclear denominada cromatina, la cual era claramente visible después de su tinción con un colorante básico [Ollins y Ollins 2003; Maeshima et al., 2008].

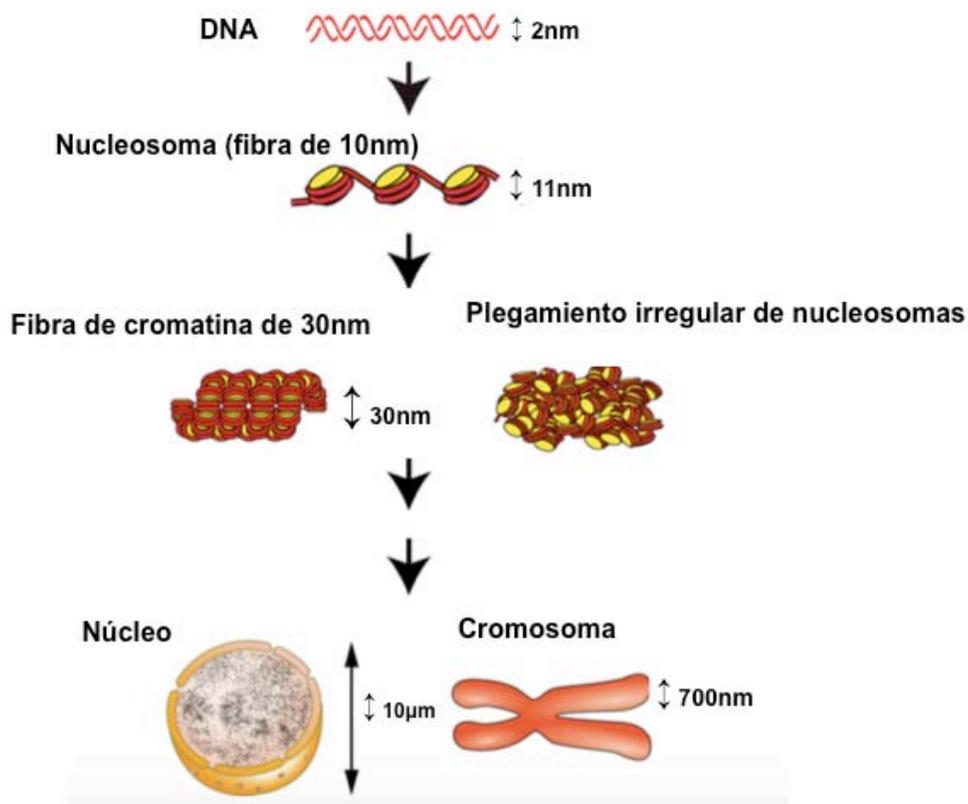


Figura 1. Empaquetamiento de la cromatina. Modelo que muestra algunos de los niveles de compactación de la cromatina. Modificada de Maeshima et al., 2008 [104].

La mayor parte de la cromatina está en forma de fibra con diámetro aproximado de 30nm. Si se induce mayor desplegamiento, se observa la fibra de 10nm en forma de “collar de perlas”, donde el collar corresponde al DNA y cada perla es un nucleosoma (Figura 2), el cual es la unidad fundamental de la cromatina [Olins y Olins, 2003].

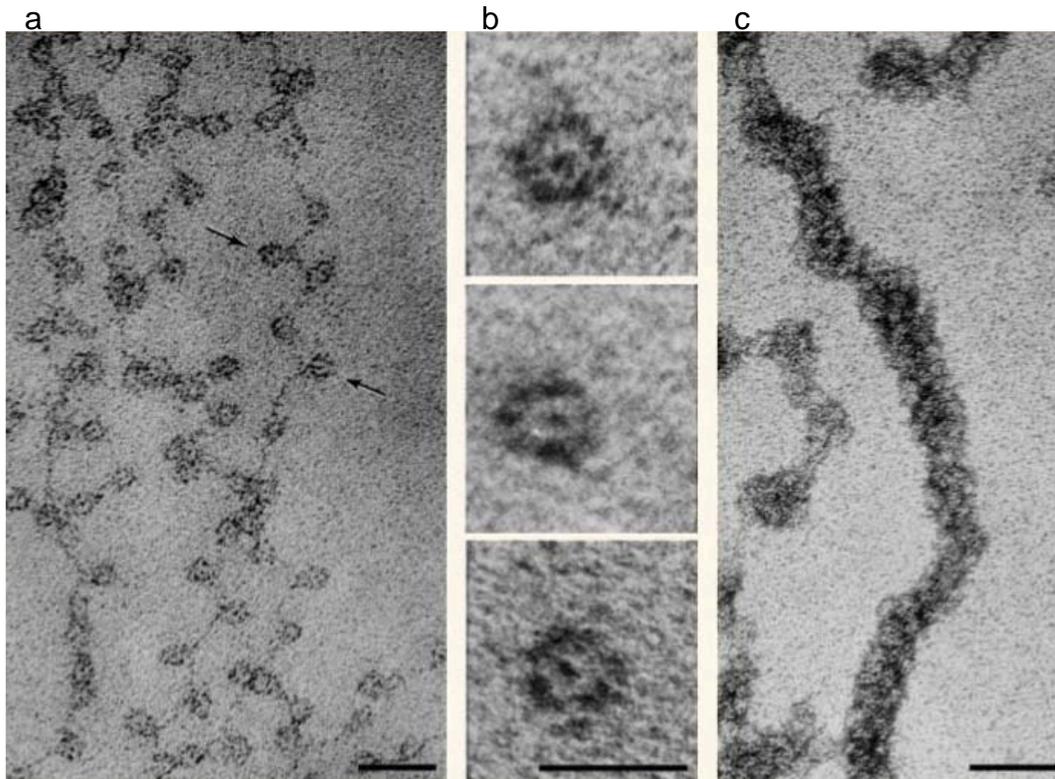


Figura 2. Estructura de la cromatina mediante micrografía electrónica. a) Una visión extendida de la cromatina, se observa el “collar de perlas” (flechas). b) Nucleosomas aislados. c) Cromatina extendida, fibra de orden superior de 30nm. Escala (barra negra inferior): 30nm, 10nm y 50nm, respectivamente. Tomada de Olins y Olins, 2003 [116].

Cada región central del nucleosoma tiene una forma cilíndrica con un diámetro de 11nm y una altura de 5.7nm (Figura 3) [Ollins y Ollins, 2003]. Consiste en un complejo globular de 8 histonas constituido por dos moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4, y el DNA de doble cadena de 147 nucleótidos de longitud [Davey et al., 2002; Razin et al., 2007]. El octámero de histonas forma un centro de proteínas alrededor del cual el DNA es enrollado 1.65 veces en forma de espiral hacia la izquierda [Luger, 2001; Kouzarides, 2007; Alberts et al., 2007].

La región central del nucleosoma tiene alrededor de 220 lisinas y argininas cargadas positivamente, y 74 residuos con carga negativa correspondientes al ácido aspártico y ácido glutámico [Razin et al., 2007]; la neutralización de las cargas en estos aminoácidos es fundamental para el plegamiento de la cromatina. La separación entre nucleosomas se mantiene a intervalos de 200 pares de nucleótidos aproximadamente, esto incluye a la distancia entre cada región central del nucleosoma, una región llamada DNA de unión [Alberts et al., 2007].

La histona H1, también llamada histona de unión, está asociada con el DNA de unión y la región central del nucleosoma (Figura 3). Tiene una mayor longitud que la región central de histonas y generalmente se presenta en una relación 1:1 con el nucleosoma. La H1 desempeña diversas funciones entre las que se encuentran: 1) la compactación del DNA, ya que la unión de una sola molécula de H1 a cada nucleosoma, cambia la trayectoria del DNA conforme sale del mismo facilitando su empaquetamiento; 2) la protección contra la digestión por parte de nucleasas y 3) la estabilización del nucleosoma al reducir el deslizamiento del octámero de histonas, de manera que funciona activamente en la movilidad del nucleosoma para el control de la expresión génica tanto negativa como positivamente [Luger, 2001].

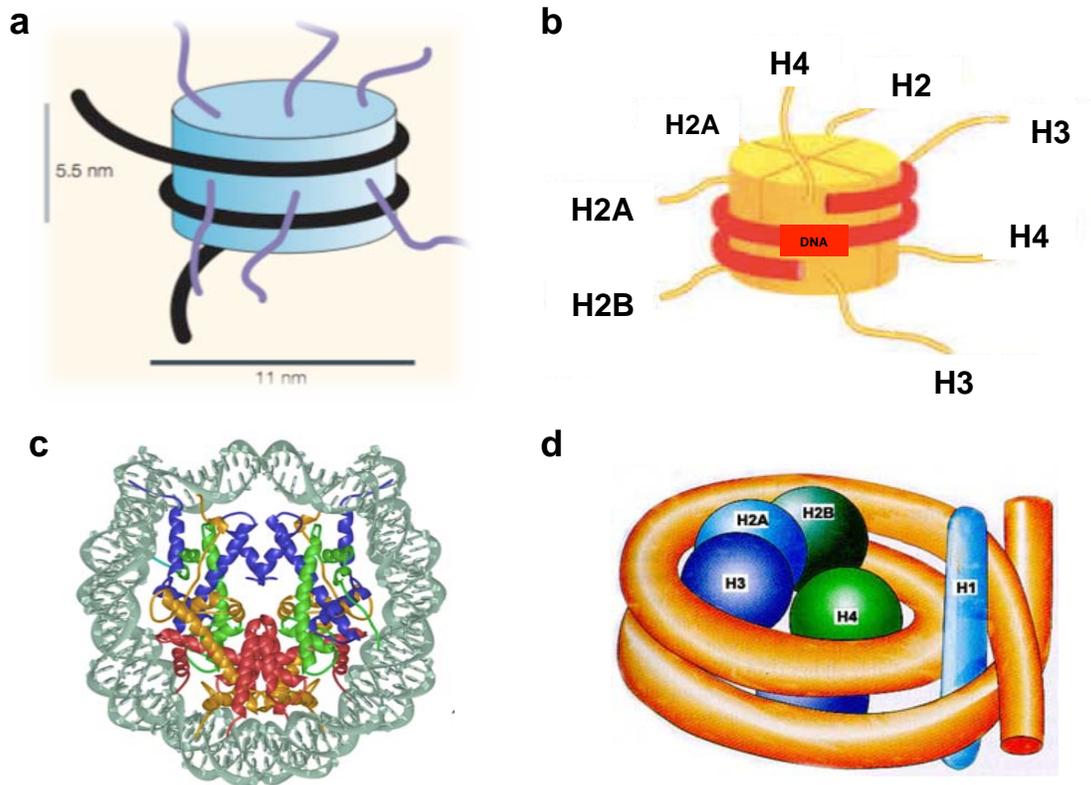


Figura 3. Estructura del nucleosoma. a) Se muestra la región central del nucleosoma con forma cilíndrica. b) Un nucleosoma integrado por el octámero de histonas (H2A, H2B, H3 y H4) y sus residuos N-terminales que sobresalen. c) Estructura cristalográfica de la región central del nucleosoma: H2A en amarillo, H2B en rojo, H3 en azul y H4 en verde; el DNA enrollado en gris. d) Se muestra la histona H1 asociada al DNA de unión y región central. Adaptada de Luger, 2001 [102]; Olins y Olins, 2003 [116]; Alberts et al., 2007 [2].

Se han propuesto algunos modelos estructurales para la fibra de cromatina de 30nm que incluyen el modelo del solenoide, constituido por nucleosomas consecutivos conectados por DNA de unión en una trayectoria helicoidal de 6 a 8 nucleosomas por vuelta; por otra parte, el modelo de “hélice de dos inicios” donde los nucleosomas están dispuestos en una conformación de zigzag. [Tee y Reinberg, 2014; Li y Reinberg, 2011].

El descubrimiento del nucleosoma se ha convertido en la parte medular de la estructura de cromatina y unidad fundamental para la modulación de su función; mientras que el empaquetamiento de orden superior de la cromatina ha permitido ampliar la visión en procesos fundamentales tales como la replicación, la transcripción y la reparación. [Ollins y Ollins, 2003].

1.2. Regulación de la cromatina

El estado de la cromatina que determina patrones específicos de expresión génica tiene una naturaleza reversible que provee la base para la reprogramación epigenética [Apostolou y Hochedlinger, 2013; Li et al., 2007].

Se distinguen dos tipos de cromatina dentro del núcleo en interfase de células eucariontes: la eucromatina y la heterocromatina (Tabla 1). La eucromatina es el material cromosómico descondensado y disperso en el núcleo celular, contiene la mayoría de los genes con transcripción activa y cuya replicación es al inicio de la fase S del ciclo celular. La heterocromatina es la forma altamente condensada de la cromatina y más del 10% del genoma en mamíferos está empaquetado en esta forma. El DNA en este tipo de cromatina tiene una replicación tardía, es escaso en genes y altamente resistente a la expresión génica para la mayoría de ellos [Eissenberg y Elgin, 2005]. Una característica de la heterocromatina es su capacidad para expandirse y alterar la expresión génica en una manera independiente de la secuencia y específica de la región. Generalmente, cuando la heterocromatina se expande causa represión génica de las secuencias cercanas en un proceso conocido como silenciamiento transcripcional [Grewal y Jia, 2007].

Hay dos tipos de heterocromatina: constitutiva y facultativa. La heterocromatina constitutiva incluye principalmente al DNA satélite altamente repetitivo localizado en los telómeros y regiones centroméricas, así como en las regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y región distal del cromosoma Y. Por el contrario, la heterocromatina facultativa es encontrada en *loci* regulados durante el desarrollo en las células de mamíferos donde el estado de la cromatina puede cambiar en respuesta a señales celulares y actividad génica. La heterocromatina facultativa asegura el silenciamiento de genes en ciertos tipos celulares o tejidos, tal y como se presenta en la inactivación aleatoria del cromosoma X. [Rando, 2006; Saha et al., 2006].

Tabla 1. Diferencias entre eucromatina y heterocromatina

Característica	Eucromatina	Heterocromatina
Apariencia en interfase	Descondensada (tinción clara)	Condensada (tinción densa)
Localización cromosómica	Brazos distales	Pericentromérica, telomérica
Momento de la replicación	A lo largo de la fase S	Fase S tardía
Composición	DNA único, secuencias dispersas levemente repetitivas	DNA repetitivo: satélite
Densidad génica	Variable	Baja
Localización nuclear	Dispersa	A menudo aglomerada (perinuclear, perinucleolar)
Recombinación meiótica	Significativa	No detectable
Metilación del DNA (vertebrados y plantas)	Islas CpG hipometiladas cerca de los genes transcritos	Extensamente metilado
Acetilación de histonas	Elevada	Baja
Espaciamiento entre nucleosomas	Irregular	Regular
Accesibilidad a nucleasa	Variable	Baja

Adaptada de Eissenberg y Elgin, 2005 [45].

El nucleosoma representa la unidad básica de la cromatina y las múltiples interacciones dentro del nucleosoma lo convierten en un complejo muy estable para su función de compactación, sin embargo no es una simple unidad estática ya que posee un elevado grado de dinámica local regulado por complejos proteícos [Soutoglou y Misteli, 2007].

La célula eucarionte contiene una gran variedad de complejos remodeladores de cromatina que por lo regular son dependientes de ATP, los cuales tienen la capacidad de cambiar temporalmente la estructura de la cromatina. Los complejos dependientes de ATP que remodelan la cromatina permiten su fluidez al inducir el recambio de histonas, así como permitir la movilización del nucleosoma. Los complejos remodeladores de cromatina dependientes de ATP incluyen a las familias SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable), CHD (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein) e ISWI (Imitation SWI), entre otros. La remodelación de la cromatina es esencial para los procesos celulares, tales como la transcripción y la reparación del DNA particularmente en el desarrollo embrionario [Saha et al., 2006; Ho y Crabtree, 2010].

1.3. Regulación epigenética de la expresión génica

En mamíferos, las diferentes células que forman un organismo generalmente contienen el mismo DNA aunque su morfología y función celular pueda variar enormemente. Esto es en gran parte el resultado de la expresión génica diferencial, la cual es regulada de forma estricta durante el desarrollo y en etapa adulta puede ser mantenida después de divisiones celulares repetidas. [Daxinger y Whitelaw, 2012; Greer y Shi, 2012].

El término epigenética fue acuñado hace 70 años por Sir Conrad Waddington, quien propuso la existencia de un nivel de complejidad molecular más allá del genoma, responsable de producir fenotipos celulares distintos y variables a partir de un genoma único [Goldberg et al., 2007; Hirts y Marra, 2008]. Clásicamente, la epigenética estudia las modificaciones químicas del DNA o histonas que cambian la estructura de la cromatina y modulan la expresión génica, pero no involucran alteraciones en la secuencia del DNA [Esteller, 2008; Feil y Fraga, 2012; Szulwach y Jin, 2013].

Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del DNA y las modificaciones postraduccionales de histonas [Szyf, 2005; Brunner et al., 2014]. A pesar del auge actual sobre las nuevas funciones de los RNA no codificantes (ncRNA) en múltiples mecanismos, su efecto sobre la regulación génica se ha demostrado desde hace una década. [Pritchard et al., 2012; Kanai y Arai, 2014; Katsushima y Kondo, 2014].

Las modificaciones epigenéticas desempeñan tres principales funciones en las células de mamíferos: 1) contribuyen a la arquitectura cromosómica asegurando la estabilidad y segregación apropiada de los cromosomas durante la mitosis; 2) regulan el silenciamiento génico y la inaccesibilidad de elementos repetitivos y retroelementos endógenos; 3) participan en el inicio y mantenimiento de la actividad y represión de genes individuales o agrupamientos génicos; y 4) Participan en los procesos de replicación y reparación del genoma [Cheedipudi et al., 2014; Kang et al., 2014].

1.3.1. Metilación del DNA

La metilación del DNA es el proceso donde un grupo metilo (CH_3) es incorporado a una citosina, generalmente en los dinucleótidos CpG (Figura 4). La metilación del DNA desempeña un papel importante en la regulación de la expresión génica y su participación es fundamental en el desarrollo embrionario, la transcripción, la inactivación del cromosoma X y la impronta genómica [Szyf, 2005].

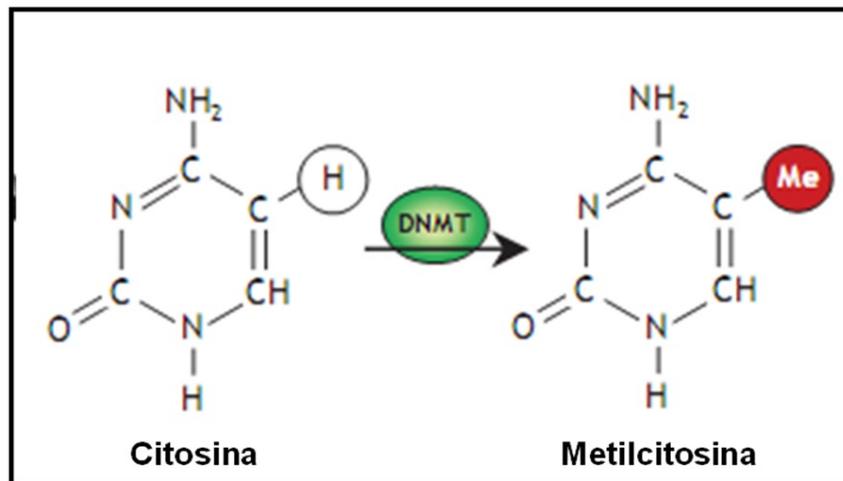


Figura 4. Metilación del DNA. Se muestra la adición enzimática de un grupo metilo al carbono 5 de la citosina. DNMT: metiltransferasa de DNA, Me: grupo metilo. Modificada de Rodenhiser y Mann, 2006 [129].

1.3.1.1. Distribución del DNA metilado

En el genoma de mamíferos, la metilación en la posición del carbono 5 de las citosinas resulta en la formación de 5-metilcitosinas (5mC), siendo ésta la principal modificación química del DNA en mamíferos. La cantidad de 5mC varía ampliamente entre organismos y se estima que en plantas es mayor al 50%, en *Drosophila melanogaster* es de 0.1% y en los seres humanos están metiladas del 1 al 6% de todas las citosinas presentes en el DNA de una célula normal [Esteller, 2007; Tammen et al., 2013].

La metilación del DNA generalmente ocurre en los dinucleótidos CpG de las células de mamíferos, aunque un pequeño porcentaje de metilación en secuencias CHG y CHH (donde H es A, C o T) ha sido observado en células madre embrionarias [Lister et al., 2009; Yan et al., 2011]. El contenido de dinucleótidos CpG en el genoma humano se aproxima a 30 millones [Cocozza et al., 2011].

Las secuencias de aproximadamente 1 kb de longitud, con un contenido de ~65% de citosinas-guaninas y una frecuencia de un dinucleótido CpG por cada 10 pares de bases, son conocidas como islas CpG [Antequera, 2005]. El genoma humano contiene alrededor de 30,000 islas CpG distribuidas a lo largo de diferentes regiones en el genoma, en niveles de 48%, 27% y 25% en la región promotora, intergénica e intragénica, respectivamente. Otros estudios han reportado que las islas CpG están asociadas con la región promotora del 70% de todos los genes humanos; estos incluyen a los genes “*housekeeping*”, generalmente involucrados en la regulación del ciclo celular y la reparación del DNA, y aproximadamente a la mitad de los genes con un patrón de expresión específico de tejido. [Shenker y Flanagan, 2011; Papageorgiou et al., 2014]

En las células humanas del 4 al 6% del genoma se encuentra metilado. Globalmente, los niveles de metilación son superiores en células madre embrionarias a diferencia de las células somáticas [Deaton y Bird, 2011]. Por otro lado, la metilación del DNA ocurre en una forma inversa entre la metilación de citosinas y la densidad de dinucleótidos CpG

(Figura 5); la mayoría de estos últimos se encuentra disperso en el genoma y tienen niveles elevados de metilación hasta en un 80%, mientras que las islas CpG permanecen extensamente desmetilados con una frecuencia aproximada del 90% [Gao y Das, 2014].

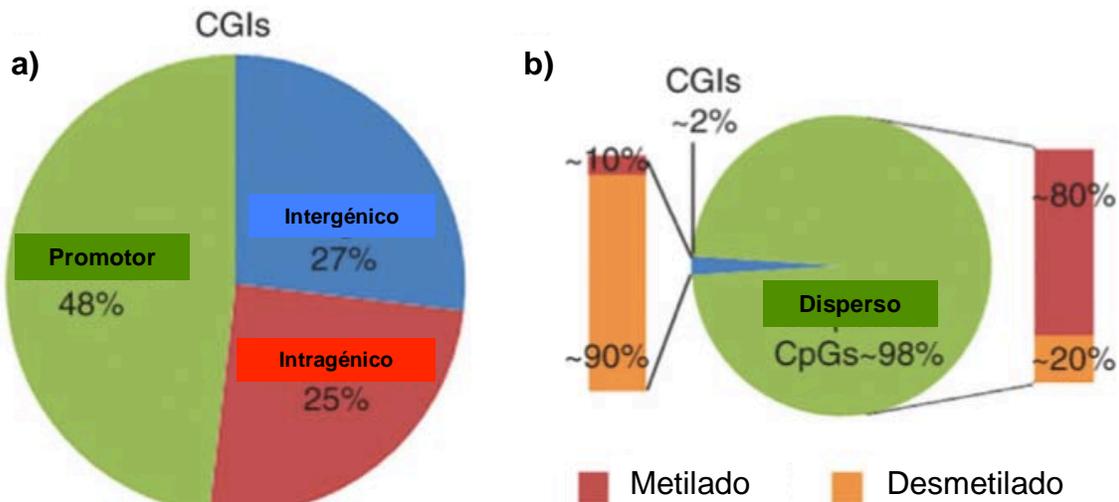


Figura 5. Distribución genómica de las islas CpG y patrón de metilación de los dinucleótidos CpGs. a) Porcentajes de distribución en el genoma completo para las islas CpG en el promotor, región intergénica e intragénica. b) Porcentajes de distribución en el genoma completo para el estado de metilación de los dinucleótidos CpG dispersos y dinucleótidos CpG en las islas CpG. Modificada de Gao y Das, 2014 [56].

La metilación de las islas CpG se ha observado durante la inactivación del cromosoma X, en la impronta genómica y raramente en las regiones promotoras. La metilación de los dinucleótidos CpG intragénicos tiene una correlación negativa con la transcripción génica y sirve de protección contra la iniciación de la transcripción en sitios erróneos, entre otras funciones [Laurent et al., 2010; Adalsteinsson y Ferguson-Smith, 2014].

La secuencia del DNA por sí misma puede determinar el estado de metilación local, situación que demuestra la relación entre la información genética y la regulación epigenética. Existen algunos determinantes de la metilación del DNA en cuanto a su localización, entre éstos se ha propuesto que la secuencia de un promotor determina la metilación de las citosinas circundantes sobre la misma cadena de DNA mediante un mecanismo en *cis*. Otro factor lo representan los sitios de unión a factores de transcripción, ya que mutaciones dentro de estas regiones limitan el mantenimiento del patrón de metilación en las citosinas circundantes [Lienert et al., 2011]. También se ha reportado una asociación entre los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y los cambios en el patrón de metilación del DNA que rodea a dicho SNP [Bell et al., 2011].

1.3.1.2. Establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación del DNA

El sustrato para llevar a cabo la metilación del DNA proviene del ciclo de los folatos y metabolismo del ácido fólico, específicamente del donador *S*-adenosil-*L*-metionina (AdoMet). Los responsables del establecimiento y mantenimiento de los patrones de metilación del DNA en mamíferos son los miembros de la familia de metiltransferasas de DNA (DNMTs): DNMT1, DNMT3A y DNMT3B [Edwards y Ferguson-Smith, 2007; Zhang y Pradhan, 2014].

En el desarrollo embrionario se presenta un fenómeno conocido como “memoria epigenética”, por medio del cual se generan un gran número de tipos celulares especializados a partir de un único cigoto totipotencial. Los factores de transcripción específicos para cada tejido interactúan con modificadores epigenéticos para establecer la identidad celular y contribuir al mantenimiento de distintos estados de la cromatina y patrones de expresión génica específica de tejido [Vaskova et al., 2013].

Durante la etapa de postfertilización en el desarrollo embrionario, el embrión se somete a procesos de desmetilación para que posteriormente DNMT3A y DNMT3B establezcan la metilación *de novo* del DNA. DNMT3B prevalece en etapas tempranas durante el desarrollo embrionario para lograr la supresión de genes expresados en línea germinal durante la transición del blastocisto al epiblasto postimplantación. DNMT3A principalmente participa en etapas tardías sobre las células de línea germinal para establecer la impronta parental y en la diferenciación de las células somáticas a patrones de metilación del DNA específicos de linaje [Hajkova et al., 2002; Reese y Bartolomei, 2006; Gao y Das, 2014].

Después de la etapa de 8 células, la DNMT1 es responsable del mantenimiento de la metilación del DNA heredada de las células parentales. DNMT1 tiene una preferencia por la unión a DNA hemimetilado durante la fase S del ciclo celular. El PCNA (proliferating

cell nuclear antigen) forma un complejo con DNMT1 en el DNA recientemente replicado para copiar el patrón de metilación de la cadena molde [Song et al., 2011].

La DNMTL es esencial para el establecimiento de impronta en la línea germinal, pero carece de dominios de metiltransferasa y es considerado un factor acoplado a DNMT3A y DNMT3B [Ballestar y Esteller, 2005; Gao y Das, 2014].

Los patrones de metilación del DNA son específicos del linaje celular, se establecen durante el desarrollo embrionario y son mantenidos a lo largo de la vida adulta. Una variedad de patrones de metilación puedan establecerse debido a la gran cantidad de metilación diferencial. La información contenida en dichos patrones puede cambiar o ser reversible sin alterar la secuencia de nucleótidos y es heredable a través de las divisiones celulares por mecanismos de mantenimiento que metilan la cadena recién sintetizada durante la replicación del DNA [Ehrlich y Lacey, 2013; Kumar et al., 2013].

1.3.1.3. Mecanismos de desmetilación del DNA

La dilución pasiva y remoción activa de 5mC son reportadas en mamíferos. En la desmetilación pasiva, las DNMTs son inhibidas para generar una pérdida gradual de 5mC durante las divisiones celulares sucesivas. Por otro lado, el ciclo de metilación-desmetilación activa del DNA ha ganado terreno por el descubrimiento de las deoxigenasas TET (ten-eleven translocation), ya que se ha descrito que estas enzimas catalizan la oxidación de las 5mC a 5-hidroximetilcitosina (5hmC) y otros intermediarios, proponiéndose que esta conversión inhibe la señal de metilación y por lo tanto su efecto sobre la represión transcripcional [Page-Lariviere y Sirard, 2014]. Otro mecanismo propone que TET1 previene la unión de DNMT, interfiriendo con la adición de grupos metilo [Dawlaty et al., 2011; Ficz et al., 2011; Branco et al., 2012;], y de esta forma promover la desmetilación.

Por otra parte, entre los mecanismos involucrados en la desmetilación activa se encuentran: la reparación por escisión de base, la remoción de 5mC por TDG (thymine DNA glycosylase) y la desaminación de 5mC por AID (activation-induced deaminase)/APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme complex); dichos mecanismos son seguidos por la reparación de bases mal apareadas [Zhang y Pradhan, 2014].

La desmetilación del DNA ocurre en algunas circunstancias durante el desarrollo de mamíferos. La desmetilación es observada en la copia paterna del genoma después de que el espermatozoide se introduce en el ovocito, previo a la fusión de sus núcleos. De manera similar, las células germinales primordiales se someten a una desmetilación del genoma completo para mantener la totipotencialidad [Guo et al., 2011].

1.3.1.4. Consecuencias funcionales de la metilación del DNA

La metilación del DNA puede afectar la transcripción génica, por lo general provocando represión en la expresión de los genes, mediante tres formas: 1) interferir por impedimento estérico la unión de los factores de transcripción a los promotores; 2) reclutando proteínas de unión a DNA metilado en promotores o regiones intragénicas; 3) alterando la estructura de cromatina y accesibilidad espacial de factores de transcripción y/o proteínas de unión a DNA [Jones, 2012]. La correlación entre la metilación del DNA y la expresión génica ha demostrado que las regiones hipometiladas están asociadas con actividad génica y las regiones hipermetiladas son resistentes a la transcripción [Trowbridge y Orkin, 2010]. Recientes reportes sobre los factores de transcripción Kaiso y ZFP57 sugieren la posibilidad de que la metilación del DNA puede promover la iniciación de la transcripción, situación que deja abierta la posibilidad de que en algunos casos la metilación del DNA puede tener un efecto positivo sobre la expresión génica [Buck-koehtop y Defossez, 2013].

El papel funcional de la metilación del DNA en la represión de la expresión génica es evidente ya que la pérdida de DNMTs da como resultado la desregulación de múltiples genes, con tendencia a la activación génica; además de que el tratamiento de células con el inhibidor de DNMTs, 5-azacitidina, genera la pérdida de metilación del DNA y concomitantemente la activación génica [Trowbridge y Orkin, 2010].

Se reconocen dos mecanismos mediante los cuales se explica como la metilación del DNA induce represión génica. Primero, la metilación del DNA puede atraer a proteínas que llevan a la represión génica a través del reclutamiento de modificadores de la cromatina. Se ha caracterizado un grupo de proteínas, conocidas como MBPs (methyl binding proteins) que muestran especificidad para unirse al DNA metilado. Las MBPs interactúan con modificadores de histonas para condensar la cromatina generando represión génica. Segundo, ciertas proteínas pueden interactuar con el DNA en una manera dependiente de metilación. En este caso, la metilación del DNA rechaza la unión de proteínas, tal y como son los factores de transcripción [Robertson, 2005; Adalsteinsson y Ferguson-Smith, 2014].

1.3.2. Modificaciones postraduccionales de histonas

Las modificaciones postraduccionales covalentes de las histonas pueden alterar la arquitectura de los nucleosomas dentro de la cromatina e influir en su función [Li y Reinberg, 2011]. El repertorio completo de estas modificaciones es complejo ya que algunos residuos de aminoácidos específicos influyen en la capacidad de otros para ser modificados y algunos sitios tienen el potencial de ser modificados en diversas formas. Los residuos N-terminales de las histonas, así como también algunas posiciones en los dominios globulares, pueden ser blanco de diversas modificaciones postraduccionales que incluyen metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitilación, sumoilación, biotilación y ribosilación (Figura 6). Tales modificaciones pueden alterar las interacciones entre el DNA y las histonas dentro y entre los nucleosomas, afectando la estructura de orden superior de la cromatina [Kouzaridez , 2007].

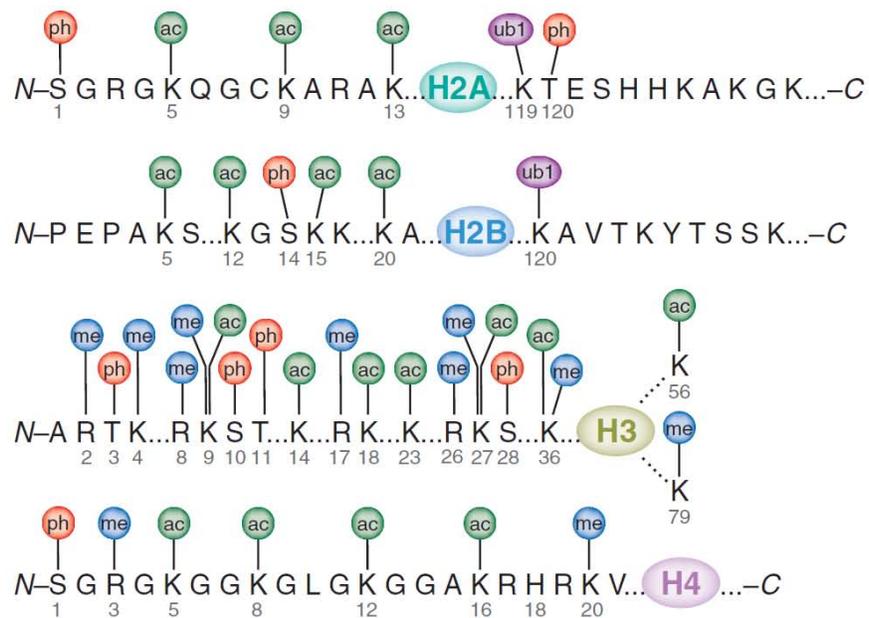


Figura 6. Modificaciones postraduccionales de histonas. Los dominios globulares de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4) corresponden a los óvalos de colores y los aminoácidos se representan en código de una letra. Círculos de colores: ac-acetilación, me-metilación, ph-fosforilación y ub1-ubiquitilación. Tomada de Bhaumik et al. 2007 [14].

La metilación de histonas se produce principalmente sobre las argininas (R) y lisinas (K). Diferentes patrones de metilación incluyendo: mono- (me1), di (me2) o trimetilación (me3) se presentan sobre las histonas H2, H3 y H4. Estas modificaciones son realizadas enzimáticamente por acetiltransferasas de histonas (HAT), desacetilasas de histonas (HDAC), metiltransferasas de histonas (HMT) y desmetilasas de histonas (HDM), entre otras [Cedar y Bergman, 2009; Feng y Shen, 2014].

La metilación de histonas se asocia con varias funciones celulares como la transcripción, replicación del DNA, respuesta al daño del DNA, formación de heterocromatina y reprogramación celular somática; sin duda, la represión y activación transcripcional representan las funciones más estudiadas (Tabla 2). La marca H3K4me3 está vinculada con la transcripción activa al reclutar el complejo de RNA polimerasa II y otros coactivadores. Por el contrario, la H3K27me3 se considera una marca de represión transcripcional, cuya extensión es impedida por la metilación H3K36 confinada a la región central de los genes. Otras marcas asociadas con activación de la expresión génica incluyen H3K9me1 y H4K20me1, mientras que H3K9me2 y H3K9me3 son un signo de represión génica. H4K20me2 y H4K20me3 participan en otros procesos que incluyen la respuesta al daño del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica [Li et al., 2007].

Tabla 2. Modificaciones de histonas asociadas con la regulación de la transcripción

Modificación	Histona/residuos modificados		Domínio de reconocimiento	Función en transcripción
Metilación	H3	K4	PHD, Cromo, WD-40	Activación
		K9	Cromo HP1*	Activación/Represión
		K27	Ezh2, G9a	Represión
		K36	Cromo, JMJD	Represión
	H4	K79	Tudor	Activación
	H4	K20	Tudor	Represión
Metilación de argininas	H3	R2	ND	Activación
		R17	ND	Activación
		R26	ND	Activación
	H4	R3	p300*	Activación
Fosforilación	H3	S10	Gcn5*	Activación
Ubicuitilación	H2B	K120/123	COMPASS	Activación
	H2A	K119	ND	Represión
Acetilación	H3	K56	Swi/Snf*	Activación
	H4	K16	Bromodominio	Activación
	Htz1	K14	ND	Activación
Sumoilación	H2AH2B H4	K	ND	Represión
ADP- ribosilación	H2BE2ar1	ND	ND	Activación
Desaminación	H3	R2 R8 R17 R26	ND	Represión
Isomerización	H3	P30-38	ND	Activación, represión

* Los dominios específicos en estas proteínas aún no están determinados. H: histona, K: lisina, R: arginina, S: serina, P: prolina, ADP: difosfato de adenosina, ND: no determinado. Adaptada de Kouzarides 2007 [90], Li et al., 2007 [95] y Zhang y Pradhan, 2014 [165].

Las variantes de histonas no solo aportan la diversidad en la composición del nucleosoma, sino que además permiten a la célula ampliar sus mecanismos para modificar la cromatina (Tabla 3). Se han identificado diversas variantes en H2A, H2B y H3 con funciones biológicas específicas como la activación transcripcional, el silenciamiento génico, la reparación del DNA y el mantenimiento de la integridad genómica. Las histonas convencionales son codificadas por múltiples genes (por ejemplo, H2B por 17 genes); en contraste, las variantes de histonas son a menudo codificadas por genes únicos y pueden ser clasificadas en 3 subtipos principales con base en el patrón de expresión y la organización genómica: 1) dependientes de replicación, 2) independientes de replicación y ciclo celular, y 3) específicas de tejido [Berstein y Hake, 2006].

Los diferentes tipos de modificaciones de histonas funcionan de manera combinada para coordinar e integrar las diferentes vías de señalización celular a nivel de la cromatina [Huang et al., 2010]. Derivado de investigaciones recientes, se ha podido dividir al genoma en varios estados de la cromatina. Por ejemplo, la marca H3K4me2/3 y H3K9/27ac representa un promotor fuerte para activación transcripcional, mientras que los promotores débiles se caracterizan por una reducción en la acetilación de H3K9/K27 y la represión de promotores se caracteriza por la reducción de H3K9/27ac y el incremento de H3K27me3 [Siggens y Ekwall, 2014].

Tabla 3. Características de las histonas y sus variantes

Histona/ Variante	Genes humanos	Tipo	Función	Localización	Características estructurales
H2A	15	DR	Región central del nucleosoma	Genómica	-
macroH2A	1	ND	Inactivación del cromosoma X	Cromosoma X inactivo	Dominio tipo no histona en extremo carboxilo
H2AZ	1	IR	Activación/ represión	Promotor, heterocromatina	Diferencia en asa 1 y α -hélice en extremo carboxilo para reconocimiento
H2ABbd	1	ND	Activación	Cromosoma X activo y autosomas	Carece de extremo carboxilo
H2A.X	1	IR	Represión, reparación del DNA, integridad genómica	Genómica	Dominio SQ(E/D) en extremo carboxilo es fosforilado después de daño celular
H2B	17	DR	Región central del nucleosoma	Genómica	-
spH2B	ND	TE	ND	Telómero	ND
H2BFWT	1	TE	ND	Telómero	ND
hTSH2B	1	TE	ND	ND	ND
H3	10	DR	Región central del nucleosoma	ND	-
H3.2	1	DR	ND	ND	ND
H3.3	2	IR	Activación	Eucromatina	Diferencia de H3 en 4 aminoácidos
H3.1t	1	DR, TE	ND	ND	ND

ND: no determinado, DR: dependientes de replicación, IR: independientes de replicación y ciclo celular, ET: específicas de tejido. Modificada de Bernstein y Hake, 2006 [12] y Li et al. 2007 [95].

1.3.4. Comunicación entre los mecanismos epigenéticos

Existe una relación funcional entre la metilación del DNA y las modificaciones de histonas, ya que la adquisición de una puede depender o ser mutuamente excluyente de la otra. La metilación del DNA y las modificaciones de histonas están ampliamente relacionadas y depende de cada una el mantenimiento del estado epigenético en la célula. La metilación en sitios CpG puede servir como una señal para las modificaciones de histonas. Además las proteínas de unión a DNA metilado, MeCP2 y MBD se unen a desacetilasas de histonas y metiltransferasas de lisinas en histonas. La DNMT3a y DNMT3b son reclutadas por la histona H3K9 metilada mediante la interacción directa de la proteína HP1. Se ha reportado que las DNMTs y desmetilasas del DNA son blanco de algunos miRNAs, lo cual afecta directamente el estado de metilación del DNA [Zhang y Pradhan, 2014].

1.3.4. Impronta genómica

El término impronta se utilizó por primera vez para describir la eliminación programada del cromosoma X paterno en un tipo particular de insectos [Ferguson-Smith, 2011]. La impronta genómica es un fenómeno en el cual los alelos de un gen son expresados diferencialmente dependiendo de su origen parental, es decir constituye una forma de regulación de expresión génica restringida al origen parental de un alelo [Wrzeska y Rejduch, 2004].

La mayoría de los genes autosómicos presentan una expresión bialélica, es decir, son expresados tanto del alelo materno como del alelo paterno. El mecanismo de impronta genómica ocasiona que un gen o grupo de genes sean expresados de forma específica a partir de un solo alelo [Sha, 2008]. La expresión monoalélica ejerce fuertes ventajas selectivas para la evolución y mantenimiento de la impronta genómica, al respecto y en un debate activo, se han desarrollado la teoría de parentesco y la teoría de coadaptación. En la primera, también conocida como hipótesis del conflicto parental, se propone la existencia de un conflicto entre los intereses de genes maternos y paternos en la descendencia durante el momento de dependencia materna para la nutrición. Por otra parte, en la teoría de coadaptación se plantea que los genes improntados actúan de manera coadaptativa para optimizar el desarrollo fetal, así como también para la provisión materna y la crianza [Peters, 2014].

Se han reportado cerca de 150 genes improntados en el ratón y la mayoría de ellos están conservados en otras especies incluyendo al ser humano, en el cual se han encontrado aproximadamente la mitad de estos genes [Peters, 2014]. En los mamíferos, el 80% de los genes improntados conocidos hasta ahora, están organizados en grupos a lo largo del genoma y son regulados por regiones de control de la impronta (CI) [Edwards y Ferguson-Smith, 2007]. Se han descrito agrupamientos de genes improntados principalmente en los cromosomas 6, 7, 11, 14, 15 y 20 [Kacem y Feil, 2009], algunos de ellos se presentan en la Figura 7.

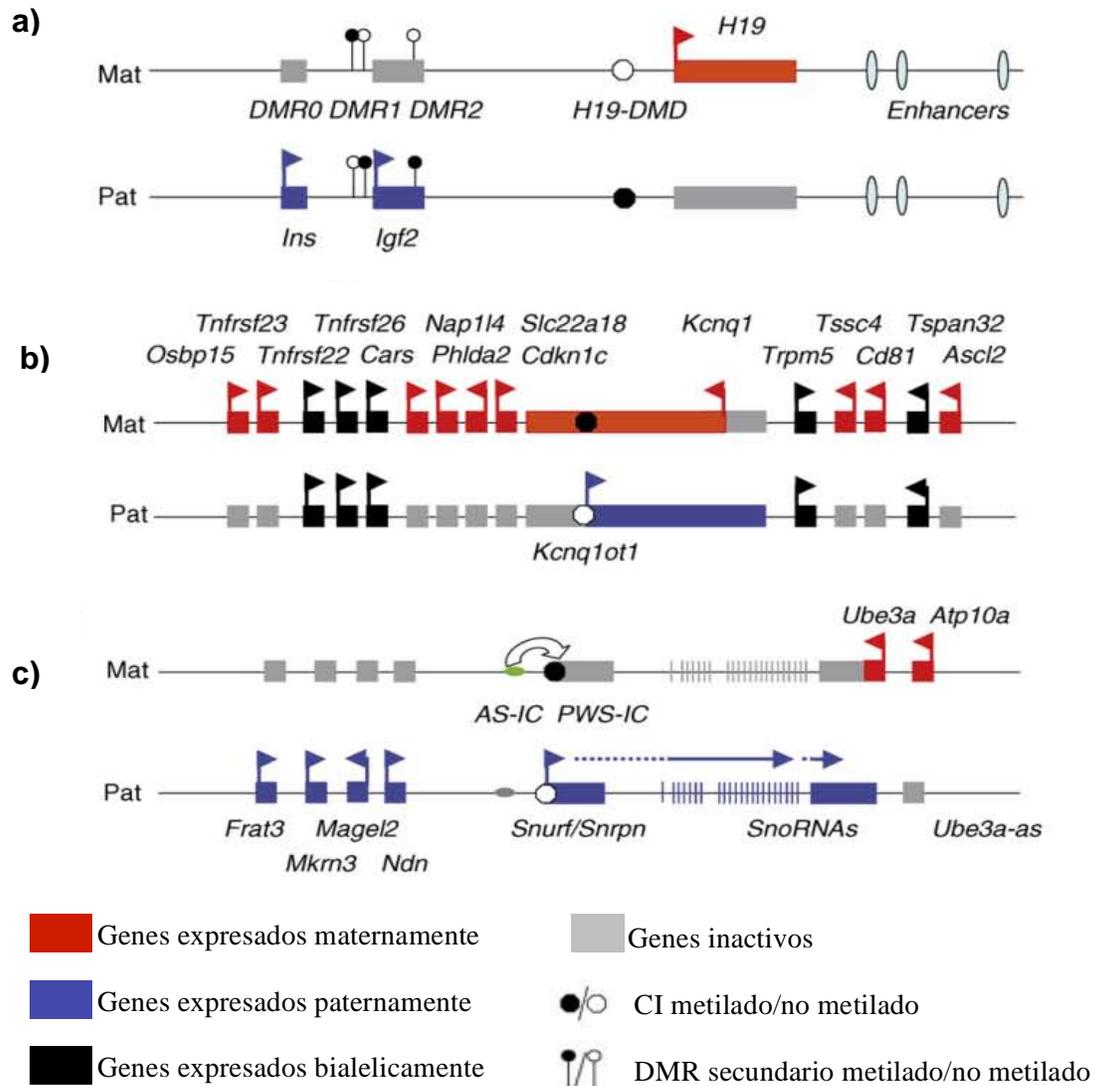


Figura 7. Agrupamientos de genes improntados. a) En el CI del *locus Igf2/H19* el alelo paterno está metilado y los ncRNA son expresados a partir del cromosoma no metilado. En el alelo materno: b) *CI2/Kcnq1* y c) *PWS/AS*, el CI actúa como promotor para un ncRNA expresado paternamente y antisentido para al menos uno de los genes en el agrupamiento. Las interacciones entre los potenciadores y las regiones diferencialmente metiladas (DMR) en la *locus Igf2/H19* controlan la expresión improntada dentro de la región. Las flechas indican el sentido del transcrito. Modificada de Edwards y Ferguson-Smith, 2007 [42].

El descubrimiento de las diferencias en la metilación del DNA en regiones improntadas, sugiere la importancia de los mecanismos epigenéticos en la regulación de la impronta. La identificación de los CI y su participación como elementos funcionales en la impronta de múltiples genes en *cis*, permitieron dilucidar los mecanismos de regulación de la impronta genómica. De hecho, la pérdida de la impronta después de la delección dirigida de DNMT1, demostró que la metilación es esencial para la impronta genómica. Ante la ausencia de DNMT1, algunos genes improntados son activados, lo cual resalta la importancia de la metilación en la impronta [Adalsteinsson y Ferguson-Smith, 2014]

La metilación en los CI se presenta *de novo* en la línea germinal por la acción de DNMT3A y DNMT3L. Un número pequeño de CI paternos se encuentran metilados en los espermatozoides y la mayoría de CI maternos metilados en los ovocitos. Es interesante que los CI paternos están siempre localizados en regiones intergénicas, mientras que los CI maternos se localizan principalmente en secuencias promotoras. El pérdida de la impronta se presenta durante los eventos de desmetilación que ocurre en las células germinales primordiales. Sin embargo, con la finalidad de retener la memoria del origen parental que será establecida subsecuentemente a esta reprogramación, la impronta genómica debe permanecer durante la fase de reprogramación epigenética postfertilización [Adalsteinsson y Ferguson-Smith, 2014].

Además de los CI, las DMR están localizadas en algunos agrupamientos improntados, pero una notable diferencia entre ellas es que la metilación diferencial de estas últimas no se establece de manera germinal y por el contrario es adquirida postfertilización [Kelsey y Feil, 2013].

1.4. La región 11p15.5

La región 11p15.5 contiene al menos 12 genes improntados y se ha dividido en dos dominios, cada uno regulado por un CI y separados por una región no improntada (Figura 7 y 8) [Bell y Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000].

El dominio 1 telomérico/distal contiene dos genes improntados: *IGF2* (insulin-like growth factor 2, MIM 147470) y *H19* (imprinted maternally expressed noncoding transcript, MIM 103280). La distancia entre ellos es de alrededor de 80kb y comparten un elemento potenciador situado corriente abajo. El gen *H19* es expresado del alelo materno como un RNA no codificante cuya función es de gen supresor de crecimiento tumoral y ha sido implicado en la restricción del crecimiento, en el SSR y en una gran variedad de tumores esporádicos [Choufani et al., 2010].

Una región exclusivamente metilada en el alelo paterno de 2.4kb corriente arriba de *H19* corresponde al CI1 [Bell y Felsenfeld, 2000; Hark et al., 2000]. El CI1 está constituido por 67 CpG, metilados en los espermatozoides y desmetilados en los ovocitos; de manera que el cigoto tiene una copia paterna metilada y una copia materna desmetilada. La diferencia de origen parental en la metilación del CI1 se mantiene a través del desarrollo en todos los tipos celulares, excepto en las células germinales primordiales [Kacem y Feil, 2009].

La metilación diferencial en el CI1 normalmente se establece durante la gametogénesis, sin embargo se ha reportado en modelos animales que el patrón de metilación puede establecerse aún después de la fertilización [Okamura et al., 2013]. La impronta postfertilización es conferida específicamente sobre el alelo paterno en un fragmento de DNA de 1.7kb en el CI1 [Okamura et al., 2013].

EL CI1 incluye 7 módulos repetidos de secuencias altamente conservadas que conforman sitios blanco para el factor de unión a CCCTC (CTCF), con gran afinidad principalmente sobre el módulo 6. Los diferentes arreglos de las secuencias blanco de CTCF, debido a

deleciones o duplicaciones, tienen asociación con una actividad distinta del CI1 y el efecto final es la variabilidad en el fenotipo [Ulaner et al., 2003; Beygo et al., 2013].

En el *locus* improntado H19/Igf2, el gen codificante *Igf2* es expresado a partir del alelo heredado paternamente. Este patrón de expresión es dependiente de la metilación diferencial en el CI1, así como de la proteína aislante CTCF. El CTCF puede unirse sobre el alelo materno no metilado, mientras que su unión es inhibida sobre el alelo paterno; de manera que la unión de CTCF al DNA es sensible a metilación. Corriente debajo de *Igf2* se encuentra *H19*, un gen ncRNA, ambos genes comparten potenciadores localizados en el extremo 3' de este último y su interacción determina la expresión específica parental. Sobre el cromosoma heredado paternamente, la interacción *Igf2*-potenciador es posible y el gen es expresado. Por otro lado, sobre el alelo materno, este contacto es bloqueado por la unión de CTCF al CI1, de manera que facilita la interacción del potenciador con el ahora activo *H19* y también resulta en la represión del *Igf2*. [Holwerda y de Laat, 2003; Wallace y Felsenfeld, 2007; Ghirlando et al., 2012].

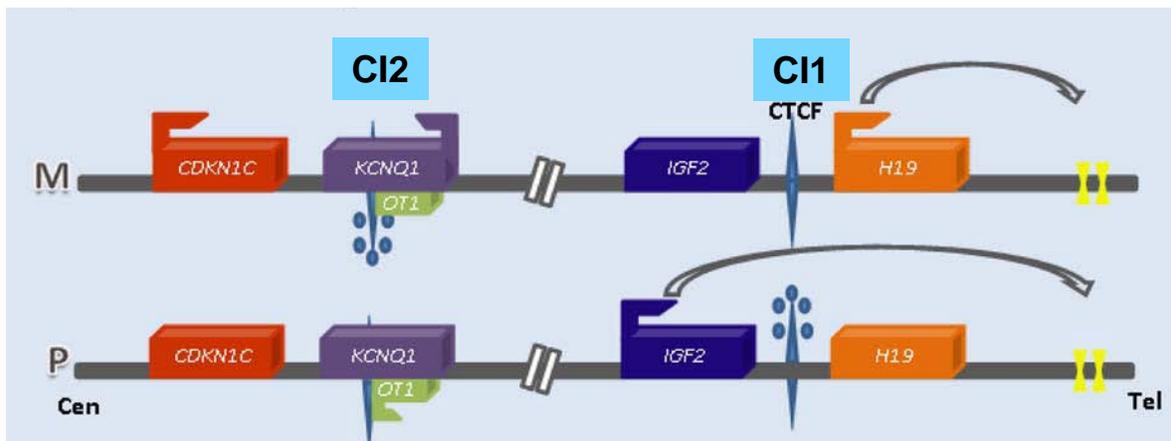


Figura 8. Representación esquemática de la región improntada en la región 11p15.5. CI1: centro de control de la impronta 1, CI2: centro de control de la impronta 2, M: alelo materno, P: alelo paterno, Cen: centrómero, Tel: telómero, CTCF: factor de unión a CCCTC, potenciadores: líneas amarillas, grupos metilo: círculos rellenos azules y flechas: expresión génica. Modificada de Choufani et al., 2010 [25].

El modelo actual sobre el mecanismo de la actividad aislante de CTCF sugiere que en el *locus H19/Igf2*, la formación de un asa de cromatina sobre el alelo materno inhibe espacialmente la interacción del potenciador con el *Igf2*. El proceso parece depender de la unión de CTCF a más de una región y del contacto físico entre estos sitios vecinos vía interacción CTCF. El modelo sugiere que sobre el cromosoma heredado maternamente no metilado, CTCF se une al CI1 y también a un DMR somático localizado en el extremo 5' de *Igf2*. Sobre el alelo materno el contacto CI1-DMR es posible por la dimerización de CTCF con estos dos *loci*. Sobre el alelo paterno, donde el CTCF no puede unirse, estas interacciones están ausentes dentro del *locus*, permitiendo la interacción a 90kb de distancia entre el potenciador y el *Igf2* [Bell y Felsenfeld, 2000; Adalsteinsson y Ferguson-Smith, 2014]

En el dominio 2 centromérico/proximal el conjunto de genes improntados corresponde a una región de 1Mb y contiene aproximadamente 10 genes. El CI2, también llamado DMR2 o KvDMR1, abarca aproximadamente 300pb y se localiza en una isla CpG en el intrón 10 del gen *KCNQ1* (potassium channel, voltage-gated, KQT-like subfamily, member 1, MIM 607542), y a su vez también en el promotor de *KCNQ1OT1* (*KCNQ1*-overlapping transcript 1, MIM 604115) o *LIT1* (long QT intronic transcript 1) [Geuns et al., 2007]. Este último gen codifica un transcrito no traducido expresado paternamente y con una dirección antisentido con respecto al gen *KCNQ1* [Du et al., 2004; Nakano et al., 2006].

El CI2 regula la impronta de más de 6 genes vecinos expresados maternamente entre los que se encuentran: *KCNQ1*, *CDKN1C* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, MIM 600856), *ASCL2* (achaete-scute complex 2, homolog of drosophila, MIM 601886) y *TSSC4* (tumor-suppressing subchromosomal transferable fragment candidate gene 4, MIM 603852). De particular interés es el gen *CDKN1C* que codifica a p57(KIP2), un regulador negativo de la proliferación celular, cuya expresión es débil en el alelo paterno en la mayoría de los tejidos humanos. La expresión de *CDKN1C* es ampliamente regulada por *KCNQ1* y *KCNQ1OT1* además de otros mecanismos que incluyen ncRNA y proteínas de remodelamiento de la cromatina [Beatty et al., 2006; Pateras et al., 2009].

1.5. Implicaciones de la región 11p15.5 en la presentación de enfermedades

Las alteraciones epigenéticas y de la impronta genómica se manifiestan en diversas condiciones que incluyen: el envejecimiento [Moskalev et al., 2014; Rang y Boonstra, 2014], enfermedades multisistémicas [Rodenhiser y Mann, 2006; Huang et al., 2012; Girardot et al., 2013], patrones anormales del desarrollo y crecimiento [Pidsley et al., 2012; St-Pierre et al., 2012; Bouwland-Both et al., 2013; Nguyen y Slim, 2014; Jang y Serra, 2014], varios tipos de cáncer [Dimopoulos et al., 2014; Dong et al., 2014; Jiang et al., 2014; Ma et al., 2014], procesos neurodegenerativos [Court et al., 2014], enfermedades alérgicas [Kuo et al., 2014], alteraciones oculares [Liu et al., 2013], la enfermedad inflamatoria intestinal [Karatzas et al. 2014] y enfermedades cardiovasculares [Loscalzo y Handy, 2014], entre otras (Tabla 4).

De particular interés para este trabajo, las alteraciones en la metilación del DNA en la región 11p15.5 se han descrito en el síndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW, MIM 130650), síndrome de Silver-Russell (SSR, MIM 180860) y la hemihiperplasia aislada (HA, MIM 235000) [Alders, et al., 2009; Butler, 2009; Horsthemke, 2010; Chofauni, 2010; Peters, 2014].

Tabla 4. Alteraciones epigenéticas y de la impronta en enfermedades y condiciones humanas

Enfermedad	Gen/locus	Mecanismo epigenético
síndrome de Prader-Willi (MIM 176270)	15q11-q13	Pérdida de expresión de más de 11 genes del alelo paterno, DUPmat15
síndrome de Angelman (MIM 105830)	15q11-q13	Pérdida de expresión de <i>UBE3A</i> en el alelo materno, DUPpat15
síndrome de Beckwith-Wiedemann (MIM 130650)	11p15.5	Expresión bialélica de <i>IGF2</i> y silenciamiento de <i>H19</i> , DUPpat11, silenciamiento de <i>CDKN1C</i>
síndrome de Silver-Russell (MIM 180860)	11p15.5 Cromosoma 7	Expresión bialélica de <i>H19</i> y silenciamiento de <i>IGF2</i> , DUPmat7
Hemihiperplasia aislada (MIM 23500)	11p15.5	Expresión bialélica de <i>IGF2</i> y silenciamiento de <i>H19</i> , DUPpat11
Diabetes mellitus tipo 1 neonatal transitoria (MIM 601410)	6q24	Sobreexpresión de <i>PLAG1</i> y <i>HYMAI</i>
Pseudohipoparatiroidismo tipo 1a (MIM 103580)	20q13.3	Mutaciones inactivantes maternas en <i>GNAS</i> , pérdida de impronta de <i>GNAS</i>
síndrome DUPmat14	14q32	Pérdida de expresión paterna de <i>DLK1</i> y <i>RTL1</i>
síndrome de X frágil (MIM 300624)	<i>FRAXA</i>	Hipermetilación
Degeneración macular relacionada con la edad (MIM 603075)	<i>IL17RC</i> , <i>GSTM1</i>	Hipermetilación de región promotora
Cáncer de mama (MIM 113705)	<i>BRCA1</i>	Hipermetilación
Glioblastoma	<i>MGMT</i>	Hipermetilación
Cáncer de ovario	<i>Sat2</i>	Hipometilación
Cáncer de timo	<i>POMC</i>	Hipometilación
Leucemia	<i>p15</i>	Hipermetilación
Esquizofrenia (MIM 181500)	<i>RELN</i>	Hipermetilación
Aterosclerosis	Varios genes	Hipometilación, hipermetilación
síndrome ICF (MIM 242860)	<i>DNMT3b</i>	Hipometilación
Envejecimiento	Varios genes	Hipometilación, hipermetilación

DUPmat: disomía uniparental materna, DUPpat: disomía uniparental paterna, ICF: inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica y anomalías faciales. Adaptada de Rodenhiser y Mann, 2006 [129], Liu et al. 2013 [100] y Peters, 2014 [120].

1.5.1. Síndrome de Beckwith-Wiedemann (MIM 130650)

El síndrome de Beckwith-Wiedemann representa la condición de sobrecrecimiento más común en los seres humanos con una incidencia reportada de 1 en 13,700 nacidos vivos, siendo un síndrome panétnico y de presentación tanto en mujeres como en hombres. La designación original para este síndrome fue EMG, basándose en las manifestaciones clínicas de exonfalos u onfalocele, macrogllosia y gigantismo (macrosomía) [Choufani, 2010].

1.5.1.1. Descripción clínica del SBW

La presentación clínica es heterogénea pero se considera que los hallazgos mayores son aquellos que se asocian con la presentación de SBW y son infrecuentes en la población general, mientras que los hallazgos menores están asociados a SBW pero son comunes en la población general (Figura 9 y Tabla 5) [Choufani, 2010; Moreno-Salgado et al., 2013].

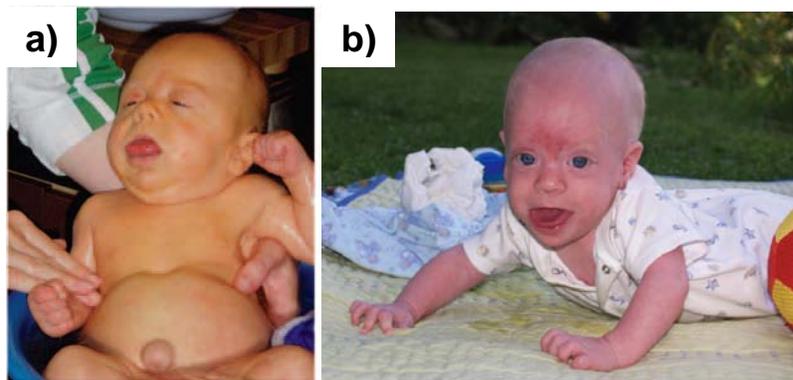


Figura 9. Fenotipo de pacientes con SBW. a) Recién nacido masculino con presencia de macrogllosia y hernia umbilical. b) Lactante masculino con Mancha vino de Oporto, ojos prominentes con pliegues infraorbitarios y macrogllosia. Modificada de Weksberg et al., 2010 [156].

Tabla 5. Criterios diagnósticos para SBW

Criterios mayores
Defectos de pared abdominal: onfalocelo (exonfalos) o hernia umbilical
Macroglosia
Macrosomía (peso y talla >p97)
Pliegues anteriores auriculares y muescas en la parte posterior del hélix
Visceromegalia de órganos intraabdominales
Tumores embrionarios en la infancia (tumor de Wilms, hepatoblastoma, neuroblastoma)
Hemihiperplasia
Citomegalia de la corteza adrenal fetal (difusa y bilateral)
Anormalidades renales (nefrocalcinosis, desarrollo tardío de riñón esponjoso medular)
Historia familiar positiva de SBW
Displasia mesenquimatosa placentaria
Paladar hendido
Criterios menores
Eventos relacionados con el embarazo (polihidramnios, hipertrofia placentaria, cordón umbilical adelgazado, prematurez)
Hipoglucemia neonatal
Mancha vino de Oporto o nevus flammeus
Cardiomegalia, anomalías cardíacas estructurales, cardiomiopatía
Facies característica: hipoplasia del tercio medio facial y ojos prominentes con pliegues infraorbitarios
Diástasis de rectos
Edad ósea avanzada

Adaptada de Weksberg et al. 2010 [156].

Una proporción de casos de hemihiperplasia aislada y casos de tumor de Wilms aislado pueden representar una forma “frustrada” o mínima de SBW. Los pacientes con SBW presentan un incremento en el riesgo para desarrollar neoplasias de tipo embrionarias, comúnmente tumor de Wilms y hepatoblastoma, pero también pueden presentar una variedad de otros tumores como neuroblastoma, rhabdomyosarcoma y carcinoma adrenocortical. El riesgo estimado para el desarrollo de tumores es 4 a 21% con una elevada presentación antes de los 5 años [Choufani, 2010].

1.5.1.2. Etiología del SBW

El SBW es causado por diversas alteraciones genéticas y epigenéticas las cuales incluyen: 1) pérdida de metilación en CI2 del alelo materno (50% de los casos); 2) 20 % disomía uniparental paterna (DUPpat); 3) ganancia de metilación en CI1 del alelo materno (5%); 4) mutaciones en *CDKN1C* materno (5%); 5) rearrreglos cromosómicos (<1%) y 6) en 20% de los casos no se detecta una alteración [Weksberg et al, 2003; Cooper et al., 2005; Cerrato et al., 2008]. También han sido asociadas las microdeleciones en sitios blanco para CTCF en el CI1 [Sparago, 2007] y deleciones en el CI 2 [Algar et al., 2011].

Se han reportado pacientes con SBW y múltiples pérdidas de metilación en los centros de control de impronta de los genes *PLAGL1* (MIM 603044), *MEST* (MIM 601029) e *IGF2R* (MIM 147280), así como su asociación con el uso de tecnologías de reproducción asistida [DeBaun et al., 2002]

La disomía uniparental o DUP, fue descrita en seres humanos a partir del hallazgo de alteraciones meióticas que originaban gametos con pérdida (nulisomía) o ganancia (disomía) de ciertos cromosomas. La DUP es un fenómeno celular en el cual los cromosomas homólogos o segmentos cromosómicos son derivados de un solo origen parental (ya sea de la madre o del padre). La DUP incluye: a) isodisomía, en la cual se heredan dos copias de un solo homólogo parental y b) heterodisomía, que se refiere a la herencia de ambos homólogos a partir de solamente uno de los padres [Engel, 2006; Yamazawa et al., 2010]. Se estima una incidencia de DUP para cualquier cromosoma de 1 en 3,500 nacidos vivos. Cuando la DUP se presenta en una región de genes improntados las células pueden heredar ambos alelos activos y expresarlos o pueden heredar ambos alelos inactivos y reprimir la expresión, eventos que ocasionan una dosis génica anormal con repercusión fenotípica dependiendo de la región implicada [Ferguson-Smith et al., 2003; Yamazawa et al., 2010]. Una característica de la DUP es que puede presentarse en forma de mosaicismo, fenómeno que implica la presencia de más de una línea celular genéticamente distinta en un organismo derivado de un solo cigoto. Este mecanismo está asociado con la expresividad variable de ciertas condiciones, es decir con la extensión en la cual cierto

órgano o tejido es afectado por un genotipo particular, implicando que una alteración sea específica de tejido [Youssoufian y Pyeritz, 2002].

En el SBW todos los pacientes que presentan DUPpat, además de tratarse de una isodisomía, son mosaicos para células con DUPpat y células biparentales normales, hallazgo que indica la presencia de recombinación somática postfertilización. Este evento está relacionado con el grado de metilación, de manera que la hipermetilación y la hipometilación dependen del porcentaje de mosaicismo [Soejima e Higashimoto, 2013].

1.5.1.3. Correlación epigenotipo fenotipo en el SBW

Existe una gran correlación entre las alteraciones moleculares y el fenotipo en pacientes con SBW. Se ha reportado la presencia de un fenotipo grave cuando los niveles de DUPpat son elevados. La hemihiperplasia, una de las características principales del SBW, se presenta con mayor frecuencia en casos de DUPpat que en otros mecanismos moleculares. El riesgo de neoplasias es variable dependiendo de la etiología molecular, por ejemplo el tumor de Wilms o hepatoblastoma se presenta con mayor frecuencia en los casos de DUPpat y ganancia de metilación en CI1, por otra parte, la pérdida de metilación en CI2 se correlaciona con otros tumores diferentes a tumor de Wilms; los casos de mutaciones en *CDKN1C* tienen gran asociación con la presencia de neuroblastoma. Existen dos defectos moleculares de mayor asociación con la presencia de onfalocele, estos incluyen las mutaciones en *CDKN1C* y la pérdida de metilación en el CI2. Una de las manifestaciones poco frecuentes en SBW es el retraso del desarrollo, situación presente en las duplicaciones de 11p15.5 [Choufani, 2010].

1.5.1.4. Diagnóstico de SBW

El diagnóstico clínico de SBW se basa en la presencia de criterios clínicos, generalmente tres mayores o dos mayores y uno menor. Los estudios moleculares utilizados en su abordaje incluyen: análisis de metilación de los CI1 y CI2, secuenciación de *CDKN1C* y análisis de disomía uniparental. Otros estudios son el cariotipo con bandas GTG, el análisis de deleción/duplicación y en una proporción de casos se ha realizado FISH (hibridación *in situ* fluorescente) para confirmar o descartar alteraciones cromosómicas. Lo anterior tiene importantes implicaciones también para el asesoramiento genético.

1.5.2. Síndrome de Silver-Russell (MIM 180860)

La contraparte del SBW en relación al patrón anormal de crecimiento está representada por el síndrome de Silver-Russell, una condición clínica y genéticamente heterogénea caracterizada principalmente por retraso grave en el crecimiento intrauterino y postnatal. La prevalencia estimada es de 1 en 100,000 [Christoforidis et al., 2005].

1.5.2.1. Descripción clínica del SSR

Entre las características descritas en el SSR se encuentran el retraso en el crecimiento intrauterino (RCIU), restricción del crecimiento postnatal (RCPN), macrocefalia relativa, frente prominente, cara triangular, comisuras labiales descendentes, micrognatia, asimetría corporal o de extremidades, clinodactilia del quinto dedo, retraso del desarrollo y manchas café con leche. (Tabla 6 y Figura 10) [Eggerman, 2010; Galaz-Montoya et al., 2014].

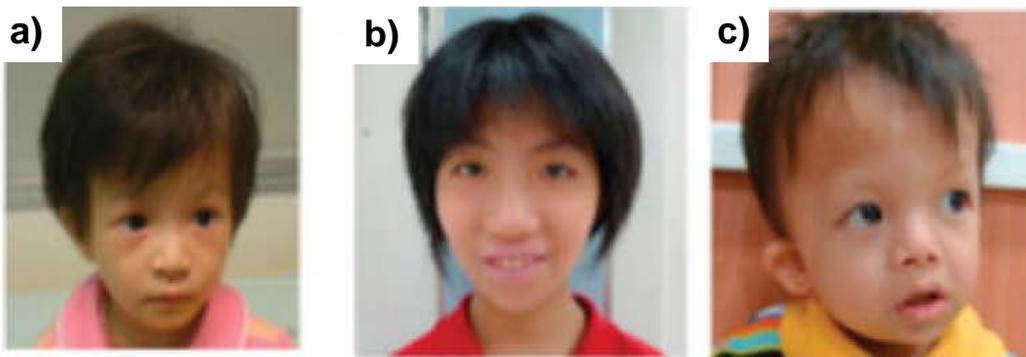


Figura 10. Fenotipo de pacientes con SSR. a) y b) Se observa macrocefalia relativa y cara triangular. c) macrocefalia relativa, frente prominente y comisuras labiales hacia abajo. Modificada de Lin et al., 2010 [98].

Tabla 6. Criterios diagnósticos para pacientes con SSR

Criterios mayores
Retraso en el crecimiento intrauterino/menor para edad gestacional ($p < 10$)
Crecimiento postnatal con talla en percentil < 3
Perímetro cefálico normal (p3-97)
Asimetría de extremidades, corporal y/o facial
Criterios menores
Cara triangular
Abombamiento frontal/frente prominente
Clinodactilia del quinto dedo
Brazada corta con índice normal del segmento superior-inferior
Criterios de apoyo
Manchas café con leche o cambios de pigmentación en la piel
Anormalidades genitourinarias (hipospadias/criptorquidia)
Retraso motor, del lenguaje y/o cognitivo
Dificultad para alimentarse
Hipoglucemia

Modificada de Eggermann, 2010 [43].

1.5.2.2. Etiología del SSR

Aproximadamente 35 a 50% de los casos de SSR presenta pérdida de metilación paterna en CI1, el 7 a 10% de los casos se asocia a disomía uniparental materna del cromosoma 7 (DUPmat7), en el 1 a 2% de los casos se ha demostrado duplicación 11p15 materna, en 1% se han identificado otras aberraciones cromosómicas y casos únicos de DUPmat11 [Kim et al., 2005; Bruce et al, 2009; Kannenberg et al., 2012]. La hipometilación del CI1 en SSR tiene la característica de ser específica de tejido, ya que se ha encontrado una mayor pérdida de metilación en leucocitos de sangre periférica y células de mucosa oral que en fibroblastos. Este hecho establece una correlación débil y no estricta entre la asimetría corporal y la expresión de *IGF2* con el patrón de metilación observado [Wakeling et al., 2010].

1.5.2.3. Correlación epigenotipo fenotipo en el SSR

Se ha reportado que los casos de SSR con hipometilación extrema de H19 (<9% de metilación) tienen manifestaciones esqueléticas como dislocación radio-humeral, sindactilia, mayor asimetría de extremidades y escoliosis, que aquellos casos con hipometilación moderada o DUPmat7 [Bruce et al, 2009]. Otros autores han encontrado mayor frecuencia de clinodactilia y anomalías congénitas en pacientes con hipometilación del CI1 en comparación con casos que presentan DUPmat7, mientras que los trastornos de lenguaje y aprendizaje fueron más frecuentes en estos últimos casos. Además, existe un bajo riesgo de malignidad ya que solo algunos casos de pacientes con SSR se han asociado a tumor de Wilms, hepatoblastoma y otros tumores abdominales [Wakeling et al., 2010].

1.5.2.4. Diagnóstico del SSR

La información derivada de varios reportes clínicos indica que el diagnóstico de SSR y los estudios de laboratorio de apoyo deben ser considerados en individuos que presentan 3 criterios mayores o 2 mayores y 1 menor [Netchine et al., 2007; Bartholdi et al., 2009; Eggerman, 2010; Wakeling et al., 2010].

Aunque se han propuesto los sistemas de calificación para asistencia en el diagnóstico clínico, la precisión de éste es a menudo influenciada por la experiencia del médico que examina. Recientemente se desarrolló un sistema de calificación que sitúa los datos clínicos dentro de 5 grupos: parámetros al nacimiento, curso postnatal, asimetría, características faciales y otras características. Utilizando este sistema se logró diagnosticar al 63% de pacientes con RCIU/RCPN [Bartholdi et al., 2009]. Los estudios moleculares de apoyo para el diagnóstico de SSR incluyen los análisis de metilación para el CI1, delección/duplicación, DUP y citogenético.

1.5.3. Hemihiperplasia aislada (MIM 235000)

En la mayoría de las ocasiones el sobrecrecimiento en un organismo resulta de: 1) hemihiperplasia, anormalidad en la proliferación con incremento en el número celular; 2) hemihipertrofia o incremento en el tamaño de las células; 3) incremento en el espacio intersticial, principalmente por exceso de fluido y 4) la combinación de estos factores [Cohen, 1998].

La hemihiperplasia se define clínicamente como un sobrecrecimiento asimétrico de una o más regiones del cuerpo con o sin compromiso visceral. El sobrecrecimiento puede involucrar la mitad del cuerpo, una sola extremidad, un lado de la cara o su combinación y se ha propuesto una clasificación basada en el sitio anatómico involucrado (Tabla 7). La hemihiperplasia es una característica de algunos síndromes de malformaciones múltiples, en particular el SBW, sin embargo puede presentarse de manera aislada [Hoyme et al., 1998].

Tabla 7. Clasificación anatómica de la hemihiperplasia

Extensión del sobrecrecimiento	Sitio anatómico implicado
Hemihiperplasia simple	Una sola extremidad
Hemihiperplasia compleja	La mitad del cuerpo (al menos una extremidad torácica y una extremidad pélvica); las partes afectadas pueden ser contralaterales o ipsilaterales
Hiperplasia hemifacial	Un lado de la cara

Modificada de Hoyme et al. 1998 [75].

La hemihiperplasia aislada (HA) se define como un sobrecrecimiento corporal asimétrico causado por una alteración en la proliferación celular en individuos sin ningún otro diagnóstico subyacente [Clericuzio y Martin, 2009]. Estudios epidemiológicos han demostrado que la HA tiene una incidencia de 1:86,000 recién nacidos vivos [Hoyme et al., 1998; Tomooka, 1988].

1.5.3.1. Descripción clínica de la HA

El principal hallazgo de la HA es el sobrecrecimiento corporal asimétrico que puede ser debido a diferencias en el crecimiento del hueso, de tejidos suaves o de ambos y puede acompañarse de visceromegalia asimétrica (Figura 11) [Hoyme et al., 1998; Heilstedt y Bacino, 2004].

En términos generales, los pacientes con HA reportados en la literatura no presentan la hemihiperplasia como entidad aislada. Dentro de los fenotipos asociados a HA se han descrito: obesidad, escoliosis, defecto del pigmento, anomalía de Poland, sindactilia, macrodactilia, retraso mental, occipucio prominente, plagiocefalia, manchas café con leche, hiperlaxitud articular, feocromocitoma, elevación de alfafetoproteína y hepatomegalia [Dalal et al., 2006; Demir et al., 2008; Zarate et al., 2009; Mutafoglu et al., 2010; Dempsey-Robertson et al., 2012; Kalish et al., 2013]. En otros casos, los pacientes con HA presentan uno o más signos que sugieren SBW, pero sin reunir criterios clínicos del mismo. Las características adicionales en HA incluyen: macrosomía, macroglosia, muescas y pliegues en pabellones auriculares, defectos de pared abdominal, nefromegalia, mancha vino de Oporto o nevus flammeus, hipoglucemia y tumor de Wilms [Dalal et al., 2006; Bliet et al., 2008].

La historia natural de la HA presenta una variabilidad marcada y usualmente la esperanza de vida es normal, sin embargo algunas anomalías como la discrepancia en la longitud de las extremidades pélvicas puede causar escoliosis modificando el pronóstico a largo plazo. El riesgo incrementado de neoplasias embrionarias en individuos con HA está bien documentado y usualmente los tumores son diagnosticados antes de los 10 años con una incidencia estimada en 5.9%. La presentación más frecuente es el tumor de Wilms y en menor proporción hepatoblastoma, carcinoma adrenal, leiomiomas intestinal y tumores extraabdominales que involucran el cerebro, testículos, pulmón, útero y médula ósea [Hoyme et al., 1998; Lapunzina, 2005].

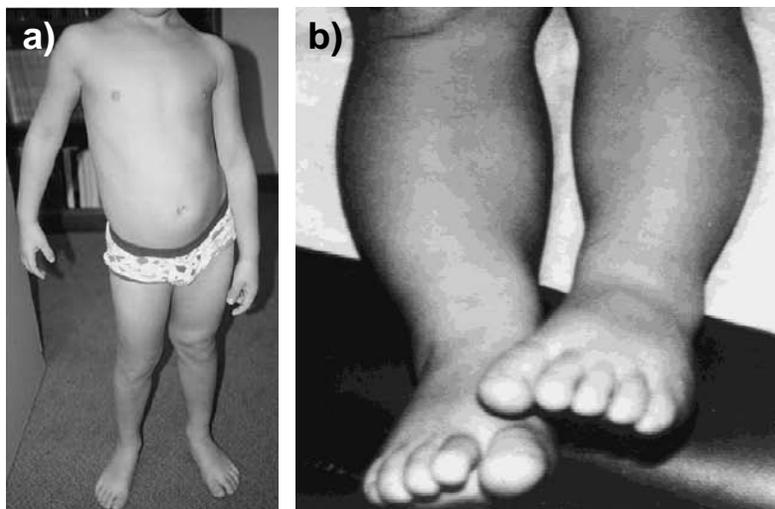


Figura 11. Fenotipo en pacientes con HA. a) Se muestra paciente con hemihiperplasia que involucra la extremidad torácica y pélvica derechas. b) Hemihiperplasia de la extremidad pélvica derecha, se aprecia mayor grosor y longitud de la pierna afectada. Modificada de Heilstedt y Bacino, 2004 [70] y Hoyme et al. 1998 [75].

1.5.3.2. Etiología de la HA

Debido a que la hemihiperplasia constituye una característica clínica del SBW y a que los pacientes con HA podrían representar la forma leve o frustrada del SBW, así como a la asociación con neoplasias de tipo embrionario para ambas condiciones, se ha investigado la superposición molecular que involucra genes improntados en la región 11p15.5. Se ha encontrado que pacientes con HA tienen uno de los tres epigenotipos más comunes presentes en SBW: 14% con disomía uniparental paterna 11p15.5 (DUPpat11p15.5), 8% con pérdida de metilación materna en el CI2 y 3% con ganancia de metilación materna en el CI1 [Gaston et al., 2001; Martin et al., 2005; Niemetz et al., 2005; Shuman et al., 2006; Bliet et al., 2008]. Otros estudios han reportado la presentación de DUPpat11p15.5 en un paciente con HA y TW [Grundy, 1991] y en un gemelo monocigoto con HA [West et al., 2003].

1.5.3.3. Correlación epigenotipo fenotipo en la HA

Los pacientes con hemihiperplasia y la presencia de una o más características del SBW tienen mayores índices de metilación en *H19* que en *KCNQ1OT1* [Bliek et al., 2008]. En pacientes con HA y defectos en la metilación del DNA en la región 11p15.5, es más frecuente la alteración del lado izquierdo cuando se presenta hipometilación en CI2 y DUPpat11p15.5, mientras que la hemihiperplasia que involucra el lado derecho no se presenta en este último defecto [Martin et al., 2005]. La distribución del género en los pacientes con hemihiperplasia aislada y alteración epigenética muestra algunas diferencias; el género femenino es más afectado (62.5%) cuando se presenta la DUPpat11p15.5 en comparación con la hipometilación en CI2 donde el 67% de los afectados es del género masculino [Shuman et al., 2006]. Se estima una frecuencia de tumor del 20% en pacientes con HA y alteración en el patrón de metilación del DNA en la región 11p15.5, dicha presentación es hasta del 50% específicamente cuando se detecta DUPpat11p15.5 a diferencia de los pacientes cuyo defecto molecular es la hipometilación en el CI2 [Shuman et al., 2006].

1.5.3.4. Diagnóstico de la HA

No existe un acuerdo en el establecimiento de criterios diagnósticos para HA, sin embargo cuando el médico se enfrenta con la evaluación de un paciente con hemihiperplasia es muy importante diferenciar las formas aisladas de aquellas sindrómicas, ya que los riesgos en la morbilidad y los protocolos de seguimiento pueden tener diferencias significativas. El diagnóstico diferencial debe incluir: hemimelia tibial (MIM 275220), atrofia hemifacial (MIM 141300), SBW, síndrome de Sotos (MIM 117550), síndrome de Proteus (MIM 176920), síndrome Simpson-Golabi-Behmel (MIM 312870), síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba (MIM 153480), sobrecrecimiento lipomatoso congénito-malformaciones vasculares-nevos epidérmicos (MIM 612918), Neurofibromatosis tipo 1 (MIM 162200), síndrome de McCune-Albright (MIM 174800), exostosis múltiple (MIM 133700), síndrome de Maffucci (MIM 614569), enfermedad de Ollier (MIM 166000) y Klippel-Trenaunay-Weber (MIM 149000), deben ser excluidos [Clericuzio y Martin, 2009].

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La HA aislada representa una condición de sobrecrecimiento corporal asimétrico, cuya etiología heterogénea no ha sido completamente estudiada. Entre los mecanismos causantes propuestos para HA se encuentran las alteraciones en los patrones de metilación en regiones improntadas; diversos genes en estos *loci*, intervienen en procesos normales de crecimiento y desarrollo por lo que sus alteraciones podrían causar HA. Una de las regiones mejor descritas que contiene genes improntados con efecto importante en la regulación del crecimiento es la región 11p15.5, como ha sido demostrado por ejemplo en la etiología del SSR y SBW. Se ha estudiado escasamente el patrón de metilación del DNA de la región 11p15.5 en pacientes con HA y en la mayoría de ellos no se ha detectado alteraciones, por lo que en este trabajo se estudiaron los patrones de metilación de los centros de control de impronta 1 y 2 en la región 11p15.5 en pacientes con HA para responder a la pregunta de investigación: ¿existen alteraciones de los patrones de metilación de los centros de control de impronta 1 y 2 en 11p15.5 en pacientes mestizos mexicanos con HA?.

3. JUSTIFICACIÓN

No se conocen con precisión los mecanismos causantes de HA y si bien la frecuencia de las alteraciones moleculares puede variar en diferentes poblaciones, determinar el mecanismo epigenético relacionado con esta condición en pacientes mestizos mexicanos, permitirá aportar conocimiento que explique su fisiopatología. El diagnóstico molecular mediante la determinación del patrón de metilación del DNA permitirá identificar las alteraciones en esta región que a su vez podrían relacionarse con el aumento en el riesgo de desarrollar neoplasias de tipo embrionario como el tumor de Wilms o el hepatoblastoma, por lo que el diagnóstico molecular temprano permitiría una mejor vigilancia de los pacientes con HA.

4. HIPÓTESIS

Los pacientes con HA presentarán alteraciones en el patrón de metilación de los centros de control de impronta 1 o 2 en la región 11p15.5 en sangre periférica.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Caracterizar el patrón de metilación del DNA en los centros de control de impronta 1 y 2 de la región 11p15.5 en sangre periférica de pacientes con hemihiperplasia aislada.

5.1 Objetivos específicos

- Establecer la frecuencia de las alteraciones en el patrón de metilación de pacientes con hemihiperplasia aislada.
- Identificar el tipo de alteración en el patrón de metilación de pacientes con hemihiperplasia aislada.
- Analizar la relación del patrón de metilación y el fenotipo de los pacientes con hemihiperplasia aislada.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio

La población de estudio incluyó a todos aquellos pacientes con diagnóstico registrado de HA, quienes fueron identificados a través de tres fuentes principales:

- Departamento de Estadística y Archivo Clínico del HIMFG mediante la clave de enfermedad Q18.8 de acuerdo con la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), correspondiente al diagnóstico de hemihipertrofia faciocorporal.
- Registro de pacientes del Departamento de Genética del HIMFG.
- Consulta de Genética del HIMFG.

Los individuos participantes en este estudio se integraron mediante una muestra de conveniencia, eligiendo de forma consecutiva a cada individuo accesible con diagnóstico clínico validado de HA.

6.2. Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Diagnóstico clínico de HA
- Género femenino o masculino
- Edad desde recién nacido hasta adolescente
- Cariotipo con técnica de bandas GTG normal
- Con o sin presencia de neoplasias asociadas

Criterios de exclusión

- Hemihiperplasia y criterios para diagnóstico de SBW
- Hemihiperplasia y malformaciones vasculares
- Otros síndromes que incluyan hemihiperplasia

Criterios de eliminación

- Pacientes y/o familiares que decidieron retirarse del estudio
- Muestras sanguíneas o de DNA insuficientes en calidad o cantidad para el análisis molecular

6.3. Evaluación clínica de los pacientes con hemihiperplasia aislada

La evaluación clínica de los pacientes identificados con diagnóstico clínico de HA incluyó el interrogatorio y la exploración física. De manera particular se tuvo especial cuidado en la evaluación de la circunferencia de las extremidades, la cual fue tomada con el paciente de pie y en decúbito dorsal, sobre el diámetro más amplio de ambas extremidades o a partir de un punto óseo fijo. Para la medida de las extremidades torácicas se tomó como referencia la mitad del bíceps, justo por debajo de la inserción del deltoides. En las extremidades pélvicas la medición se efectuó sobre la región femoral justo debajo del pliegue glúteo [Hall et al., 1995].

Los estudios paraclínicos incluyeron el estudio citogenético, ultrasonido abdominal y ultrasonido renal para todos los pacientes con HA, mientras que el estudio de rayos X y otros estudios adicionales de imagen requeridos en el seguimiento ortopédico, fueron aprovechados para su análisis de manera específica en algunos pacientes.

En todos los pacientes se evaluaron los criterios para excluir el diagnóstico de SBW mediante la hoja de recolección de datos para pacientes con HA desarrollada para este fin (Anexo 1). Todos los pacientes que aceptaron participar en el estudio lo hicieron mediante firma de carta de consentimiento/asentimiento informado y autorización para toma de fotografías clínicas.

El presente estudio fue parte del protocolo HIM/2012/007 “Implicaciones del patrón de metilación en la región 11p15.5 como mecanismo etiológico de la Hemihiperplasia aislada”, el cual fue aprobado por la Dirección de Investigación y los Comités de Investigación, Ética y Bioseguridad del HIMFG, contando con el apoyo económico de Fondos Federales para su realización.

6.4. Determinación del patrón de metilación del DNA en los CI y número de copias de la región 11p15.5 mediante MS-MLPA

Las muestras de DNA obtenidas a partir de sangre periférica de los pacientes incluidos fueron analizadas mediante la prueba de MS-MLPA o amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple sensible a metilación. Los estudios anteriores se realizaron en el Laboratorio Genos Médica, Centro Especializado en Genética, México, D.F.

Inicialmente se obtuvieron las muestras de sangre periférica (Anexo 2) y posteriormente se realizó la extracción de DNA genómico mediante el método de lisis celular con detergentes aniónicos, utilizando el producto Gentra Puregene Blood de QIAGEN, Hilden/Alemania (Anexo 3).

La prueba de MS-MLPA se realizó con el producto SALSA MS-MLPA ME030-C3 BWS/RSS (MRC-Holland, Amsterdam/Holanda), siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante (Anexo 4). La técnica de MS-MLPA permite la detección tanto de cambios en el número de copias como de alteraciones en los niveles de metilación de múltiples secuencias diferentes en una sola reacción; una característica de las sondas de MS-MLPA es que contienen la secuencia GCGC, sitio de reconocimiento por la enzima de restricción *HhaI*. Las sondas utilizadas se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Características de las sondas empleadas para análisis por MS-MLPA.

Longitud (nt)	Sonda MLPA	Posición cromosómica Referencia 11p15.5	Sitio <i>HhaI</i>
64-70-76-82	Fragmentos Q [#]	-	No
88-92-96	Fragmentos D [~]	-	No
100	Fragmento X [^]	-	No
105	Fragmento Y [*]	-	No
130	-	10q25	No
135	H19	CI1 H19DMR	Si
141	KCNQ1OT1	CI2 KvDMR	Si
148	-	14q24	No
154	-	7q31	No
160	H19	Región 5'	No
166	KCNQ1OT1	CI2 KvDMR	Si
171	IGF2	5'DMR0	Si
178	-	9q21	No
184	H19	CI1 H19DMR	Si
190	H19	Región 5'	No
196	CDKN1C	Exón 1b	No
202	-	22q11	No
208	-	12q13	No
214	H19	Región 5'	No
221	KCNQ1	Exón 3	No
228	H19	Exón 5	No
238	H19	CI1 H19DMR	Si
256	-	17p12	No
266	KCNQ1	Exón 13	No
274	KCNQ1OT1	CI2 KvDMR	Si
284	IGF2	Exón 7	No
292	-	3q29	No
301	H19	CI1 H19DMR	Si
310	-	2q24	No
319	NSD1	5q35 NSD1 exón 24	No
328	KCNQ1	Exón 7	No
337	-	16q22	No
346	CDKN1C	Exón 1b	Si
355	09153-L09311 [¥]	8p21	Si

Longitud (nt)	Sonda MLPA	Posición cromosómica Referencia 11p15.5	Sitio <i>HhaI</i>
364	KCNQ1	Exón 8	No
373	KCNQ1	Exón 15	No
383	-	10q21	No
393	KCNQ1OT1	CI2 KvDMR	Si
400	KCNQ1	Exón 9	No
411	KCNQ1	Exón 17	No
418	NSD1	Exón 22	No
427	-	18q21	No
436	KCNQ1	Exón 2	No
445	CDKN1C	Exón 3a	No
454	H19	Región 5'	No
463	-	2p25	No

Cantidad de DNA, solo visibles con muestras de <100ng

~ Las señales bajas indican desnaturalización incompleta

^ Específico para el cromosoma X

* Específico para el cromosoma Y

¥ Control de la digestión

La descripción de las sondas específicas para los centros de control de impronta 1 y 2, así como los resultados esperados del patrón de metilación normal se presentan en las Tablas 9 y 10.

Tabla 9. Sondas SALSA MS-MLPA ME030-C3 BWS/RSS específicas para el análisis del centro de control de impronta 1 y del gen *IGF2*.

Sonda	Longitud (nt)	Gen/ Posición	Metilación normal en DNA (%)	Reducción de señal después de la digestión con <i>HhaI</i> (%)	Número de copias
H19 08743-L20532	135	<i>H19</i> Corriente arriba	50	50	1
IGF2 06269-L20841	171	<i>IGF2</i> Exón 4	0	100	1
H19 14063-L08764	184	<i>H19</i> Corriente arriba	50	50	1
H19 14792-L16503	238	<i>H19</i> Exón 1	50	50	1
H19 06266-L05772	301	<i>H19</i> Exón 1	50	50	1

Tabla 10. Sondas SALSA MS-MLPA ME030-C3 BWS/RSS específicas para el análisis del centro de control de impronta 2 y del gen *CDKN1C*.

Sonda	Longitud (nt)	Gen/ Posición	Metilación normal en DNA (%)	Reducción de señal después de la digestión con <i>HhaI</i> (%)	Número de copias
KCNQ1OT1 07173-L19191	141	<i>KCNQ1OT1</i> Exón 1	50	50	1
KCNQ1OT1 06276-L05782	166	<i>KCNQ1OT1</i> Exón 1	50	50	1
KCNQ1OT1 16654-L19204	274	<i>KCNQ1OT1</i> Exón 1	50	50	1
CDKN1C 15054-L18042	346	<i>CDKN1C</i> Exón 1b	10	90	1
KCNQ1OT1 16654-L19204	393	<i>KCNQ1OT1</i> Exón 1	50	50	1

6.5. Análisis de resultados clínicos

El análisis clínico de los pacientes incluyendo las variables de edad, género, así como el tipo y lateralidad de la hemihiperplasia se realizó mediante estadística descriptiva con el programa IBM SPSS Statistics 19.

6.6. Análisis de resultados moleculares

Determinación del número de copias

El análisis de los resultados de MS-MLPA se realizó mediante el programa Coffalyzer.NET (MRC-Holland, Amsterdam/Holanda) incluyendo dos pasos de normalización:

- *Normalización intramuestra:* dentro de cada muestra (digerida y no digerida), se compararon los picos de las sondas para los genes diana contra los picos de las sondas de referencia (sondas que detectan secuencias esperadas para tener un número de copias normal en todas las muestras). Se dividió la señal de cada sonda entre la señal de cada sonda de referencia en la muestra, lo que generó tantos índices por sonda como el número de sondas de referencia. Posteriormente, la media de todos los índices se tomó como el valor de la constante de normalización (CN).
- *Normalización intermuestra:* Se comparó el patrón de picos de la muestra de DNA de interés contra las muestras de DNA de referencia (muestras derivadas de individuos sanos esperadas para tener un número de copias y estado de metilación normal para las regiones de interés). De esta forma, el índice final para una sonda o coeficiente de dosis (CD) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{CD} = \frac{\text{CN para la sonda } n \text{ en una muestra de estudio no digerida } A}{\text{CN promedio para la sonda } n \text{ en las muestras de referencia no digeridas } X, Y \text{ y } Z}$$

Un CD anormal puede indicar una delección o duplicación de la sonda diana MLPA. Para un análisis confiable, el CD para las muestras de referencia y de estudio debe ser entre 0.85 y 1.15 con una desviación estándar de todas las sondas y de las sondas de referencia <0.10. Cuando se reúnen estos criterios, los CD son utilizados como un indicador para identificar anomalías en el número de copias.

Determinación del patrón de metilación

Para determinar el patrón de metilación de cada sonda MS-MLPA se comparó el patrón de picos de cada muestra de DNA digerida contra la muestra no digerida correspondiente. El porcentaje de metilación por sonda fue calculado como sigue:

$$\% \text{ de metilación} = \frac{\text{CN para la sonda } n \text{ MS-MLPA en una muestra de estudio digerida } A}{\text{CN para la sonda } n \text{ MS-MLPA en una muestra de estudio no digerida } A} \times 100$$

El patrón de metilación de una muestra de estudio fue determinado al comparar los porcentajes de metilación de la sonda en la muestra de estudio contra los porcentajes de las muestras de referencia (muestras derivadas de individuos sanos esperadas para tener un número de copias y estado de metilación normal para las regiones de interés). De esta forma, se identificaron las diferencias en el patrón de metilación entre la muestra de interés y las muestras de referencia.

La metodología descrita se presenta en la Figura 12.

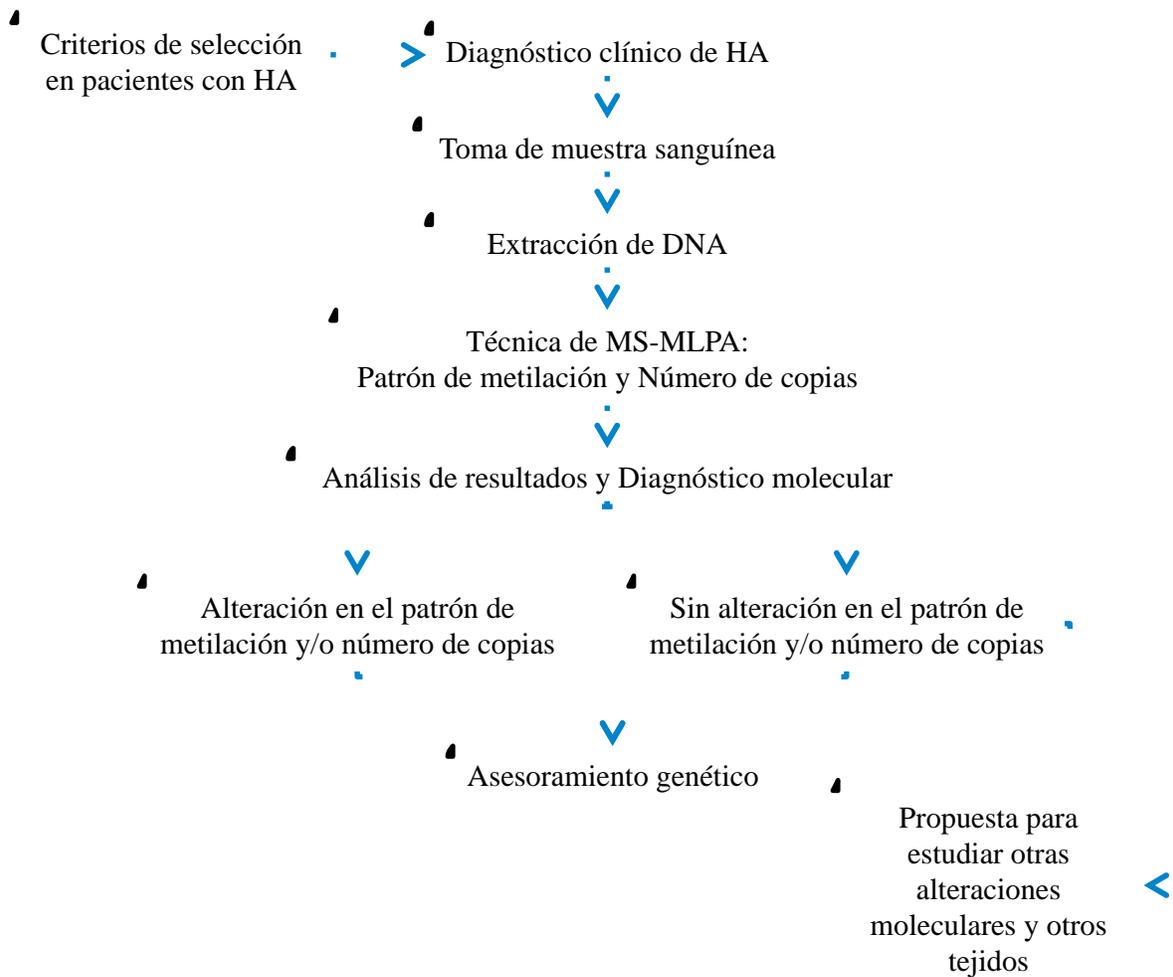


Figura 12. Diagrama de flujo de material y métodos para el análisis de alteraciones en el patrón de metilación de pacientes con HA.

7. RESULTADOS

7.1. Resultados clínicos de los pacientes con HA

Se identificaron 26 pacientes con diagnóstico de HA quienes cumplían con los criterios de selección para el estudio en los registros hospitalarios. Sólo fue posible realizar el estudio molecular a 9 pacientes cuyas características clínicas se describen a continuación:

En relación a los antecedentes heredofamiliares, al interrogatorio no se encontraron antecedentes de HA o condiciones asociadas a ésta y todos los pacientes se presentaron como casos esporádicos en la familia.

Paciente H1

Preescolar masculino de 3 años 8 meses de edad con peso 13.5kg (p10) y talla 95cm (p10). El fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja derecha y mancha café con leche en tórax. Antecedente de prematurez, nació vía abdominal a las 36.5 semanas de gestación (sdg) por cesárea iterativa, Apgar 8/9, peso 2,250g (p10-50) y talla 47cm (p50).

Paciente H2

Adolescente femenino de 12 años 11 meses de edad, peso 44.1kg (p25-50), talla 150cm (p25), con fenotipo caracterizado por hemihiperplasia simple que afectaba la extremidad torácica derecha, con hipertrofia de grupos musculares en mano derecha y antecedente de pie plano durante la infancia. Nació vía abdominal a las 40sdg secundario a posición transversa, peso 3kg (p10-25), talla 50cm (p50) y Apgar 8/9.

Paciente H3

Lactante mayor masculino de 1 año 5 meses de edad con peso 10kg (p10) y talla 78cm (p25). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia simple que afectaba la extremidad torácica derecha. Nacimiento a las 40sdg vía abdominal por sufrimiento fetal agudo, Apgar 5/8, peso 2,460g (p<5), talla 49cm (p25-50) y egreso sin complicaciones.

Paciente H4

Lactante mayor femenino de 1 año 3 meses de edad, peso 10kg (p25-50) y talla 77cm (p50). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja y asimetría renal izquierda, ambas afectando el lado izquierdo. Antecedente de parto eutócico a las 40sdg, Apgar 8/9, peso 3,589g (p50) y talla 53cm (p75).

Paciente H5

Preescolar femenino de 4 años 2 meses de edad, peso 18kg (p75) y talla 112cm (p50). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja izquierda, mancha café con leche en extremidad pélvica izquierda y antecedente de tratamiento para displasia del desarrollo de la cadera bilateral sin complicaciones. Nació por parto eutócico a las 39sdg, Apgar 8/9, peso 3,650g (p50-75) y talla 48cm (p25).

Paciente H6

Adolescente femenino de 17 años 10 meses de edad, peso 50.3kg (p25) y talla 159cm (p25). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja izquierda y antecedente de tratamiento para displasia del desarrollo de la cadera bilateral sin complicaciones. Antecedente de parto eutócico a las 38sdg, peso 2,500g (p5), se desconocía Apgar y talla, pero se refería sin complicaciones al nacimiento.

Paciente H7

Lactante mayor femenino de 1 año 2 meses de edad, peso 10.3kg (p50) y talla 79cm (p75-90). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja derecha y mancha café con leche en extremidad pélvica izquierda, sin otras características asociadas. Nacimiento vía cesárea a las 38sdg por sangrado transvaginal, lloró y respiro al nacer, Apgar 8/9, peso 2,720g (p5-10) y talla 49cm (p50).

Paciente H8

Lactante menor masculino de 10 meses de edad, peso 9.6kg (p50) y talla 72cm (p25-50). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia simple que afectaba la extremidad pélvica izquierda y dolicocefalia como característica asociada. Antecedente de nacimiento vía abdominal por falta de progresión en trabajo de parto a las 40sdg, Apgar 7/8, peso 3,800g (p50-75) y talla 50cm (p50).

Paciente H9

Lactante mayor femenino de 1 año 1 mes de edad, peso 9.8kg (p50) y talla 75cm (p50). Fenotipo caracterizado por hemihiperplasia compleja izquierda, sin otras características asociadas. Antecedente de nacimiento vía abdominal por falta de progresión en trabajo de parto a las 39sdg, Apgar 8/9, peso 3,200g (p50) y talla 50cm (p50-75).

El resumen de las características clínicas se presenta en la Tabla 11 y Figura 13.

Tabla 11. Fenotipo de los pacientes con HA analizados molecularmente.

Paciente	Sexo	Edad	Tipo (región)	Lado	ETD/ETI [Asimetría]* (cm)	EPD/EPI [Asimetría]* (cm)	Otros hallazgos
H1	M	3a 8m	C	D	15.4/14 [1.4]	26.2/25 [1.2]	Prematurez, mancha café con leche en tórax
H2	F	12a 11m	S (ET)	D	24.5/23 [1.5]	47.5/47.5 [0]	Pie plano, hipertrofia de grupos musculares en mano derecha
H3	M	1a 5m	S (ET)	D	15.5/14 [1.5]	23/23 [0]	N
H4	F	1a 3m	C	I	13/15.3 [2.3]	23/25 [2]	Asimetría renal izquierda
H5	F	4a 2m	C	I	16.5/17.5 [1]	29.5/33 [3.5]	DDC bilateral, Mancha café con leche en EPI
H6	F	17a 10m	C	I	14.6/15.6 [1]	40.4/41.5 [1.1]	DDC izquierda
H7	F	1a 2m	C	D	15/14 [1]	24/23 [1]	Mancha café con leche en EPI
H8	M	10m	S (EP)	I	14.5/14.5 [0]	24/25 [1]	Dolicocefalia
H9	F	1a 1m	C	I	14/15 [1]	23/28 [5]	N

F: femenino, M: masculino, a: años, m: meses, C: compleja, S: simple, ET: extremidad torácica, EP: extremidad pélvica, D: derecha, I: izquierda, *Asimetría: diámetro comparativo entre extremidades, cm: centímetros, DDC: displasia del desarrollo de la cadera, N: ninguno.



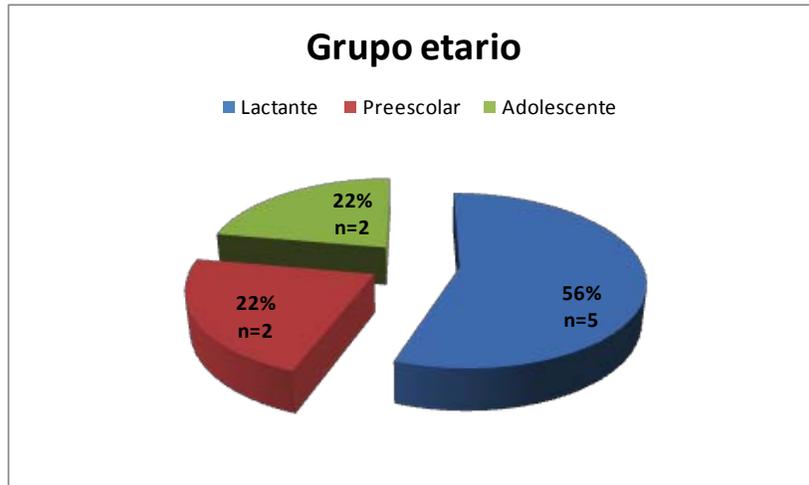
Figura 13. Fenotipo de los pacientes con hemihiperplasia aislada. Se indica con flechas la región afectada. a) H1: facial derecha, b) H3: extremidad torácica derecha, c) H4: extremidad pélvica izquierda, d) H5: extremidad pélvica izquierda, e) H7: extremidad pélvica derecha y f) H8: extremidad pélvica derecha.

Antecedentes Perinatales. Todos los pacientes estudiados tuvieron control perinatal adecuado y un embarazo con evolución normal. No se detectaron complicaciones al nacimiento y solo el paciente H1 tuvo el antecedente de prematuridad. La macrosomía no se presentó y dos pacientes, H3 y H6, mostraron peso bajo al nacimiento (Tabla 12).

Tabla 12. Peso al nacimiento de los pacientes con HA analizados molecularmente.

Paciente	Peso (g)	Percentil	Sexo	Nacimiento
H1	2,250	10-50	M	Prematuro
H2	3,000	10-25	F	De término
H3	2,460	<5	M	De término
H4	3,589	50	F	De término
H5	3,650	50-75	F	De término
H6	2,500	<5	F	De término
H7	2,720	5-10	F	De término
H8	3,800	50-75	M	De término
H9	3,200	50	F	De término

Edad. El rango de edad en los pacientes fue entre 10 meses y 17 años con una media de 2 años 2 meses. La edad al diagnóstico se presentó en la etapa de lactante en 5 pacientes, seguido de preescolares y adolescentes en igual proporción (Gráfica 1 y Tabla 10).

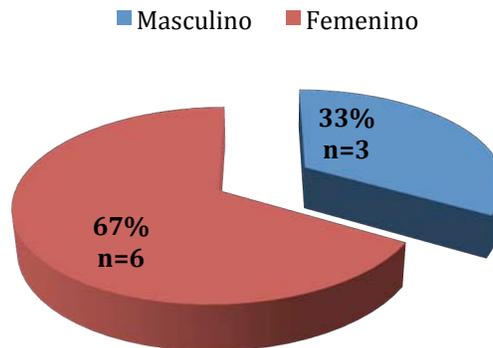


Gráfica 1. Grupo etario de los pacientes con HA.

Género. Se incluyeron a 6 pacientes femeninos (67%) y 3 pacientes masculinos (33%) (Gráfica 2 y Tabla 10).

□

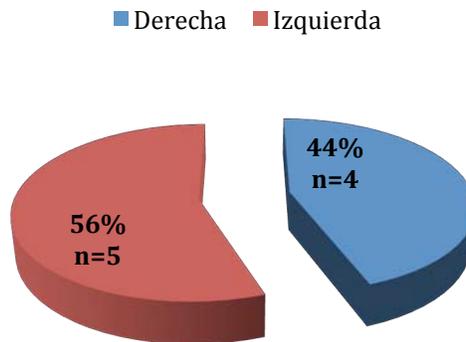
Distribución por género



Gráfica 2. Distribución por género de los pacientes con HA.

Lateralidad. En relación a la presentación del fenotipo y el lado afectado, se presentaron 5 casos de hemihiperplasia izquierda y 4 casos con lateralidad derecha (Gráfica 3 y Tabla 10).

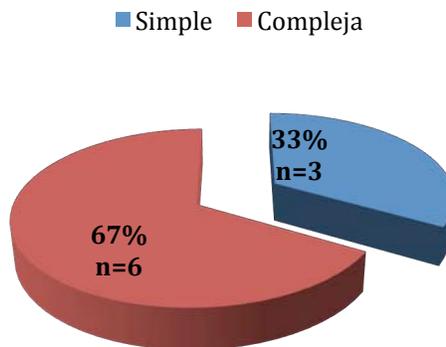
Lateralidad de la hemihiperplasia



Gráfica 3. Presentación fenotípica según lateralidad.

Clasificación. El 67% (n=6) de los pacientes presentó hemihiperplasia en su forma compleja y 3 pacientes (33%) tuvieron HA simple (Gráfica 4 y Tabla 10).

Clasificación de la HA



Gráfica 4. Clasificación de la hemihiperplasia en los pacientes con HA.

Otros hallazgos clínicos. Se presentaron otros datos clínicos asociados a la hemihiperplasia en 67% de los pacientes. La característica más frecuente fue la presencia de una sola mancha café con leche en 3 pacientes. El antecedente de displasia del desarrollo de la cadera se presentó en dos pacientes, pie plano en una adolescente y dolicocefalia en un paciente lactante (Tabla 11).

Estudios de laboratorio y gabinete. Dentro de los estudios realizados a los pacientes con HA, el estudio citogenético con bandas GTG en sangre periférica fue normal en todos los pacientes, mientras que en el ultrasonido abdominal y renal solo el paciente H4 presentó asimetría renal izquierda. El paciente H1 presentó una diferencia de longitud radiológica de 23mm en extremidad pélvica derecha respecto a la izquierda. Mediante el estudio de resonancia magnética se detectó hipertrofia de grupos musculares de mano derecha en el paciente H2. Un aumento de longitud de 15mm en la extremidad torácica izquierda y acortamiento radiológico de 5mm en la extremidad pélvica derecha fueron detectados en H4 y H9, respectivamente.

7.2. Resultados del patrón de metilación del DNA en los CI y número de copias de la región 11p15.5

Un total de 9 muestras provenientes de pacientes con HA y 2 muestras de controles sanos (femenino y masculino no afectados con HA) fueron analizadas por MS-MLPA para la identificación del número de copias y patrón de metilación del DNA en la región 11p15.5.

Se utilizó una muestra de control tanto masculino como femenino, cuyos resultados en relación al número de copias y el patrón de metilación se muestran como referencia para el análisis de los estudios en los pacientes incluidos. En estos controles se observa un número de copias normal y la reducción esperada en las señales de las sondas: 135, 141, 166, 184, 238, 274, 301, 346 y 393, compatible con patrón de metilación normal. La señal de la sonda 171 se mantuvo constantemente baja debido al estado normal no metilado del gen *IGF2*, mientras que la ausencia de señal en la sonda 355 aseguró una adecuada reacción de digestión mediante *HhaI* (Figura 14).

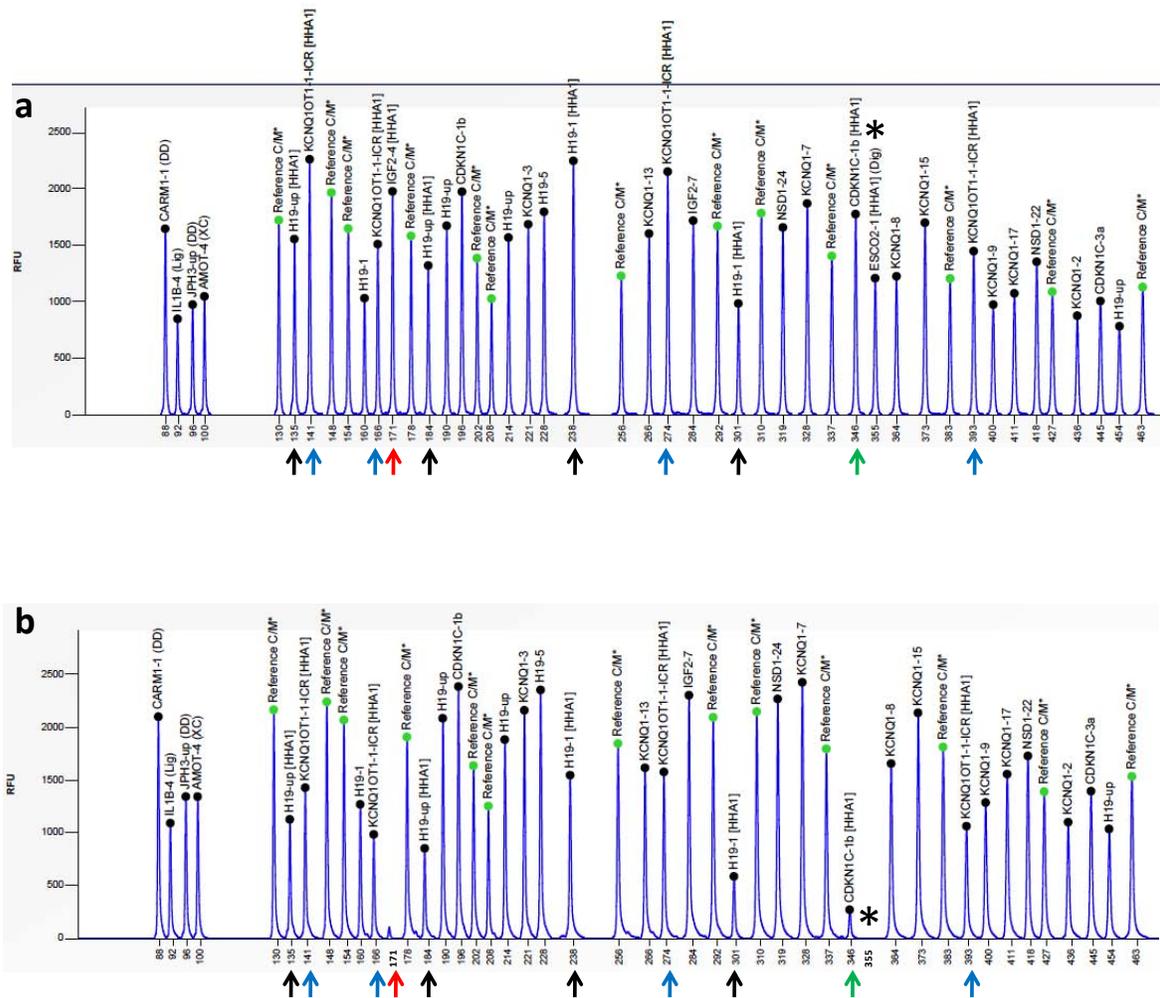


Figura 14. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en una muestra control sin HA. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*. Flechas negras: sondas para CI1, flechas azules: sondas para CI2, flecha roja: *IGF2*, flecha verde: *CDKN1C*, asterisco: control de digestión.

Los resultados del análisis molecular de cada paciente se describen en la Tabla 13 y Figuras 15-23. Todos los pacientes estudiados mostraron un número de copias normal. El patrón de metilación del DNA en CI1 y CI2 resultó normal en el 78% (n=7) de los pacientes y se encontraron defectos en la metilación en 2 pacientes (22%). Los pacientes H1, H2, H3, H6, H7, H8 y H9 presentaron un patrón de metilación normal (Figuras 15-17 y 20-23), mientras que en los pacientes H4 y H5 se detectó un patrón de metilación alterado que correspondió a ganancia de metilación del DNA en el CI1 de la región 11p15.5. Lo anterior se demostró con la ausencia en la disminución de la señal para las sondas 135, 184, 248 y 301 (Figuras 18 y 19).

Tabla 13. Patrón de metilación del DNA en la región 11p15.5 y número de copias en pacientes con hemihiperplasia aislada.

Paciente	Patrón de metilación del DNA en CI 1	Patrón de metilación del DNA en CI 2	Número de copias
H1	N	N	N
H2	N	N	N
H3	N	N	N
H4	Ganancia de metilación	N	N
H5	Ganancia de metilación	N	N
H6	N	N	N
H7	N	N	N
H8	N	N	N
H9	N	N	N

CI1: centro de control de impronta 1, CI2: centro de control de impronta 2, N: Normal.

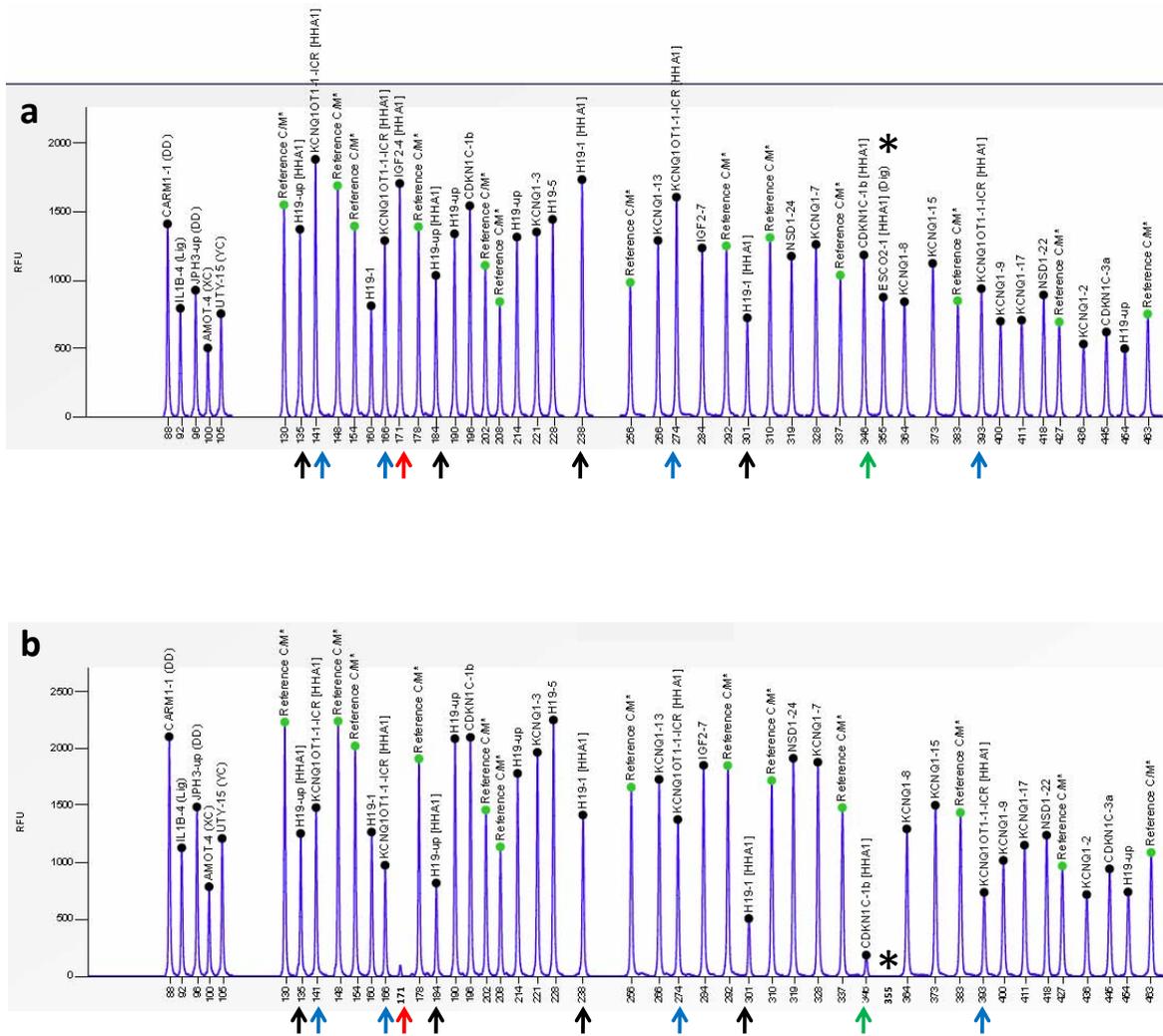


Figura 15. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H1. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

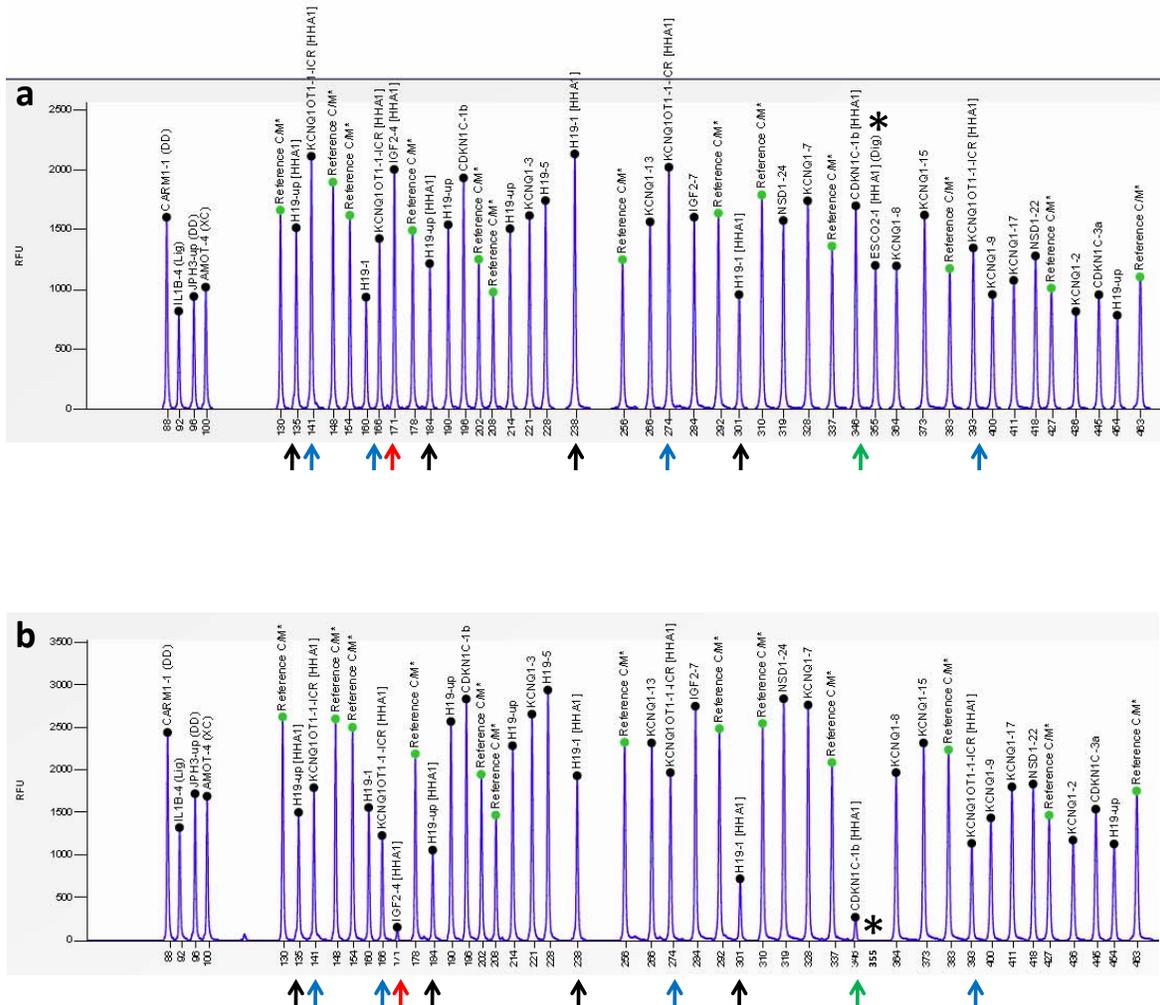


Figura 16. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H2. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

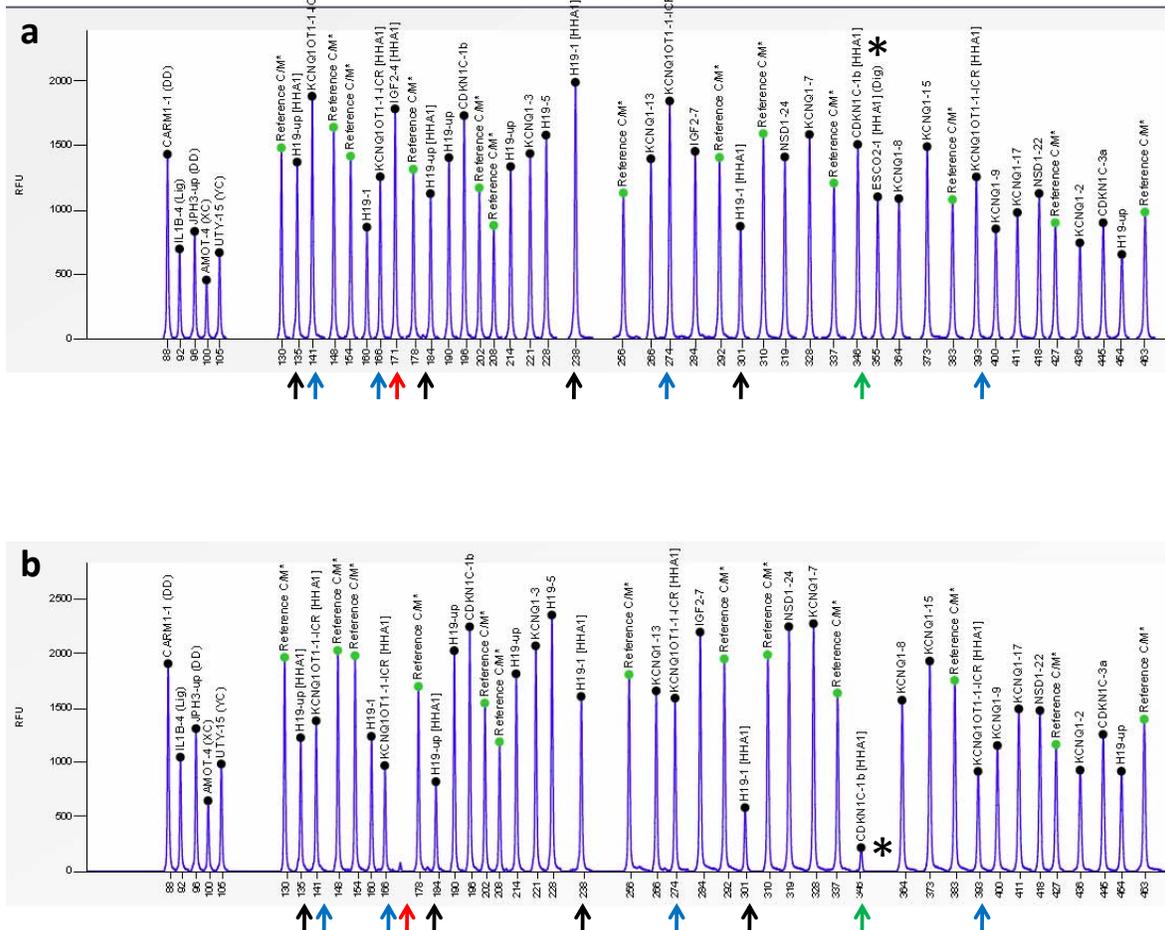


Figura 17. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H3. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

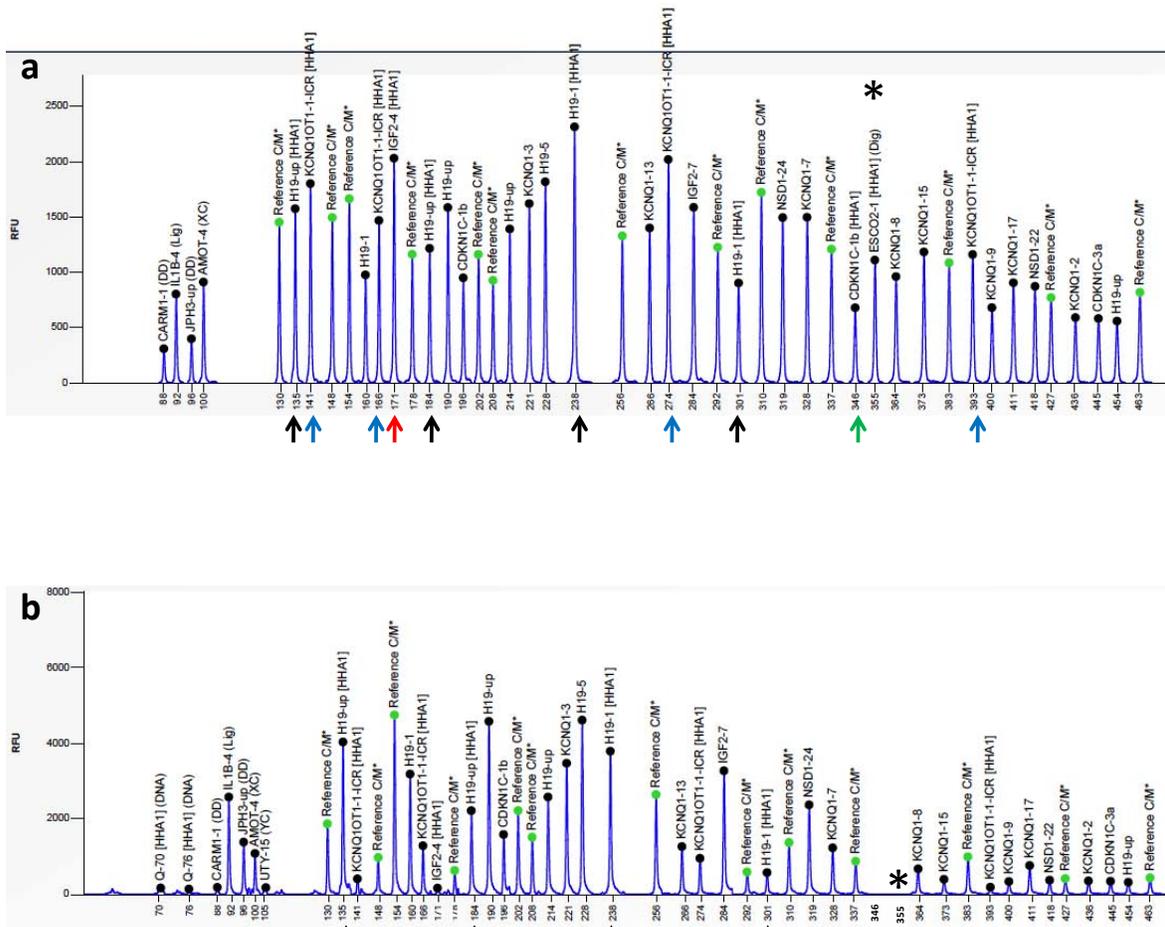


Figura 18. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H4. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, ausencia de la reducción normal en las señales esperadas de las sondas 135, 184, 238 y 301 (flechas negras), compatible con ganancia de metilación en CI1.

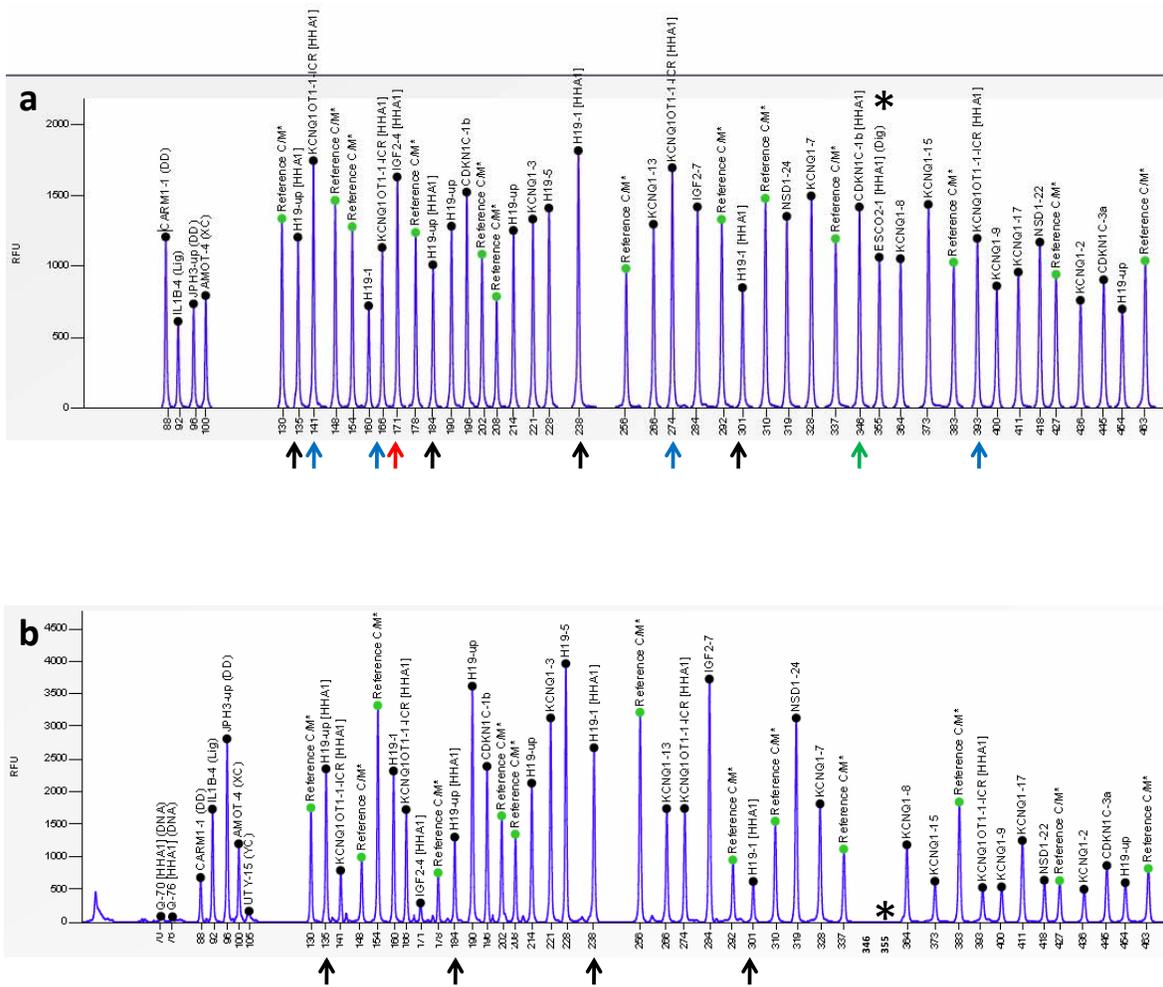


Figura 19. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H5. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, ausencia de la reducción normal en las señales esperadas de las sondas 135, 184, 238 y 301 (flechas negras), compatible con ganancia de metilación en CI1.

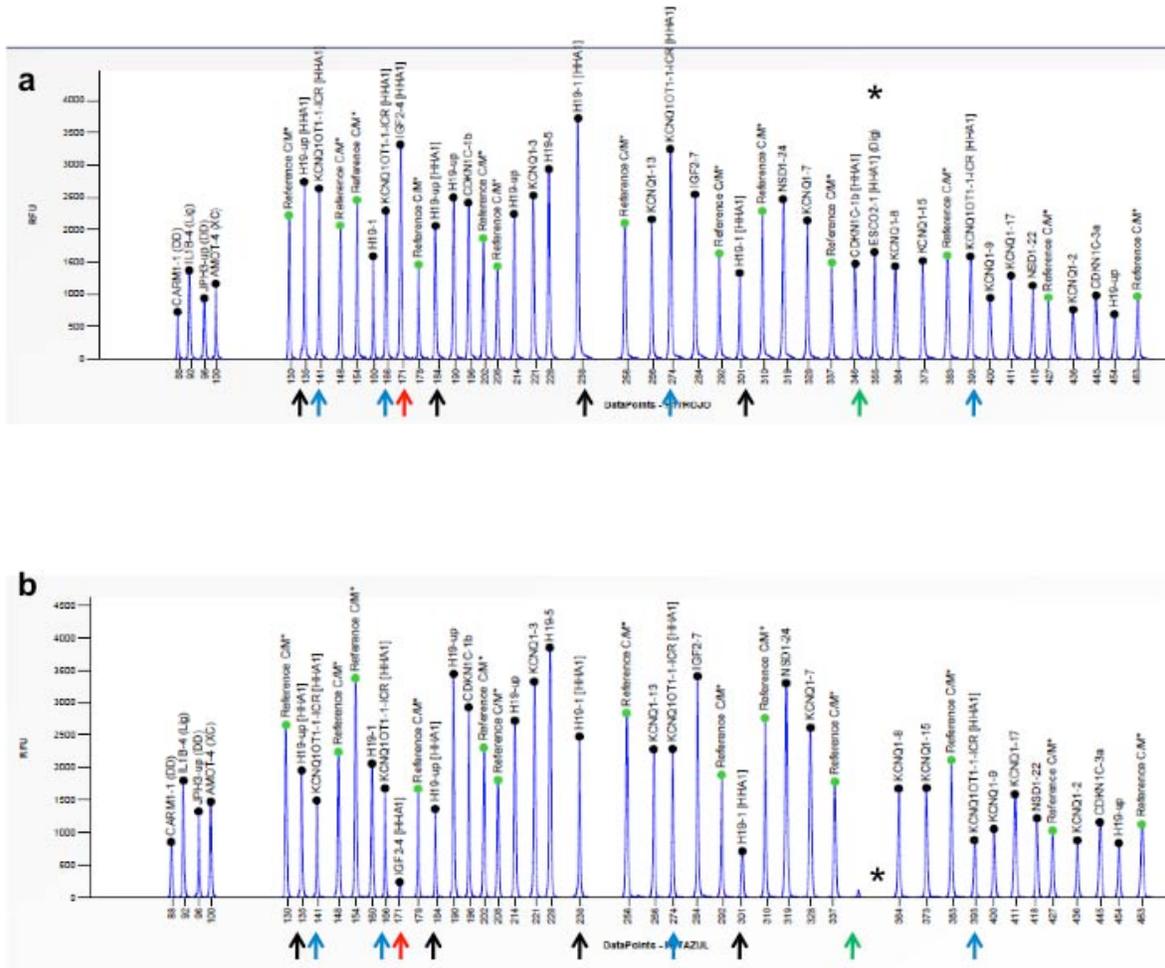


Figura 20. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H6. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

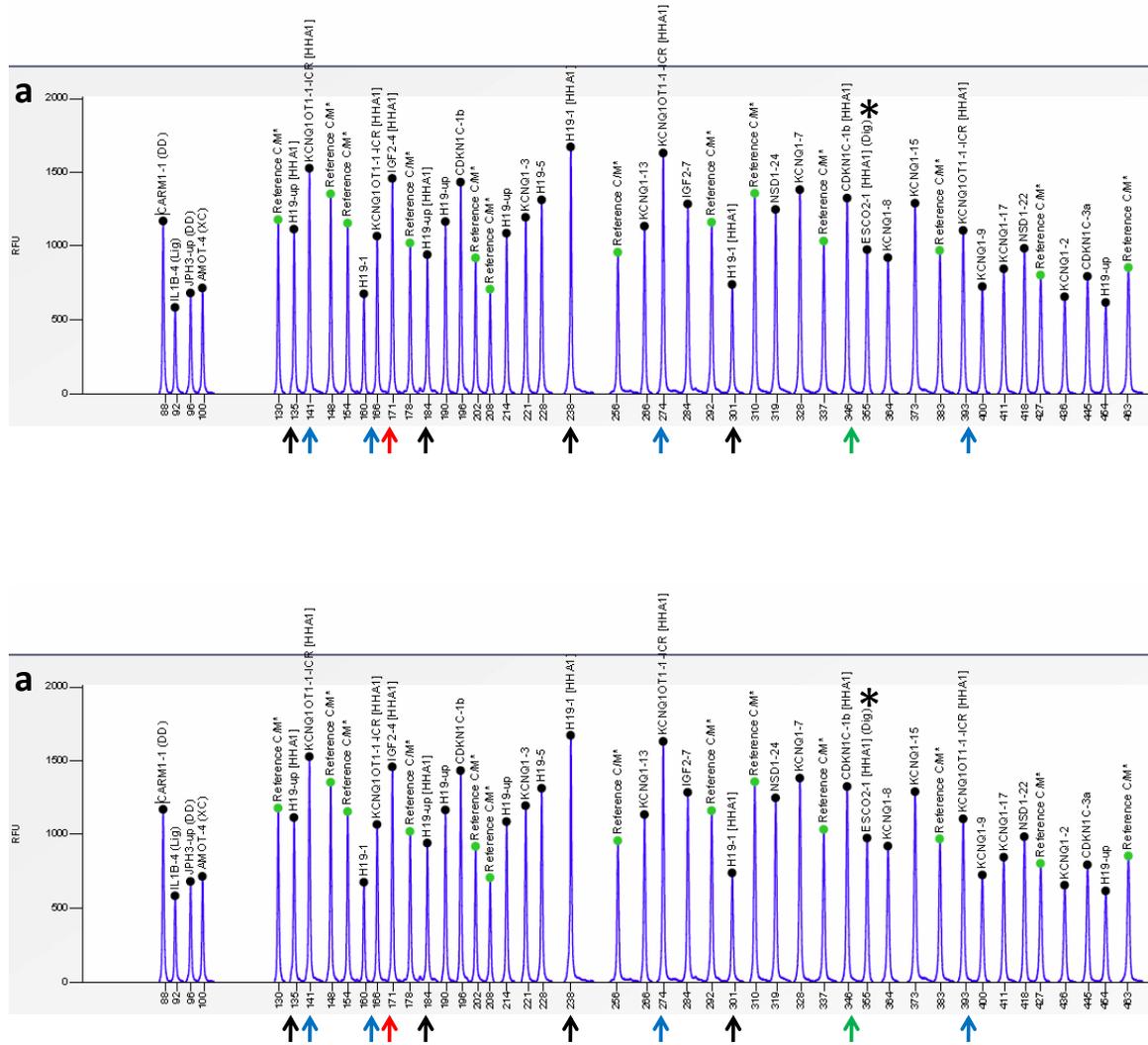


Figura 21. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H7. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

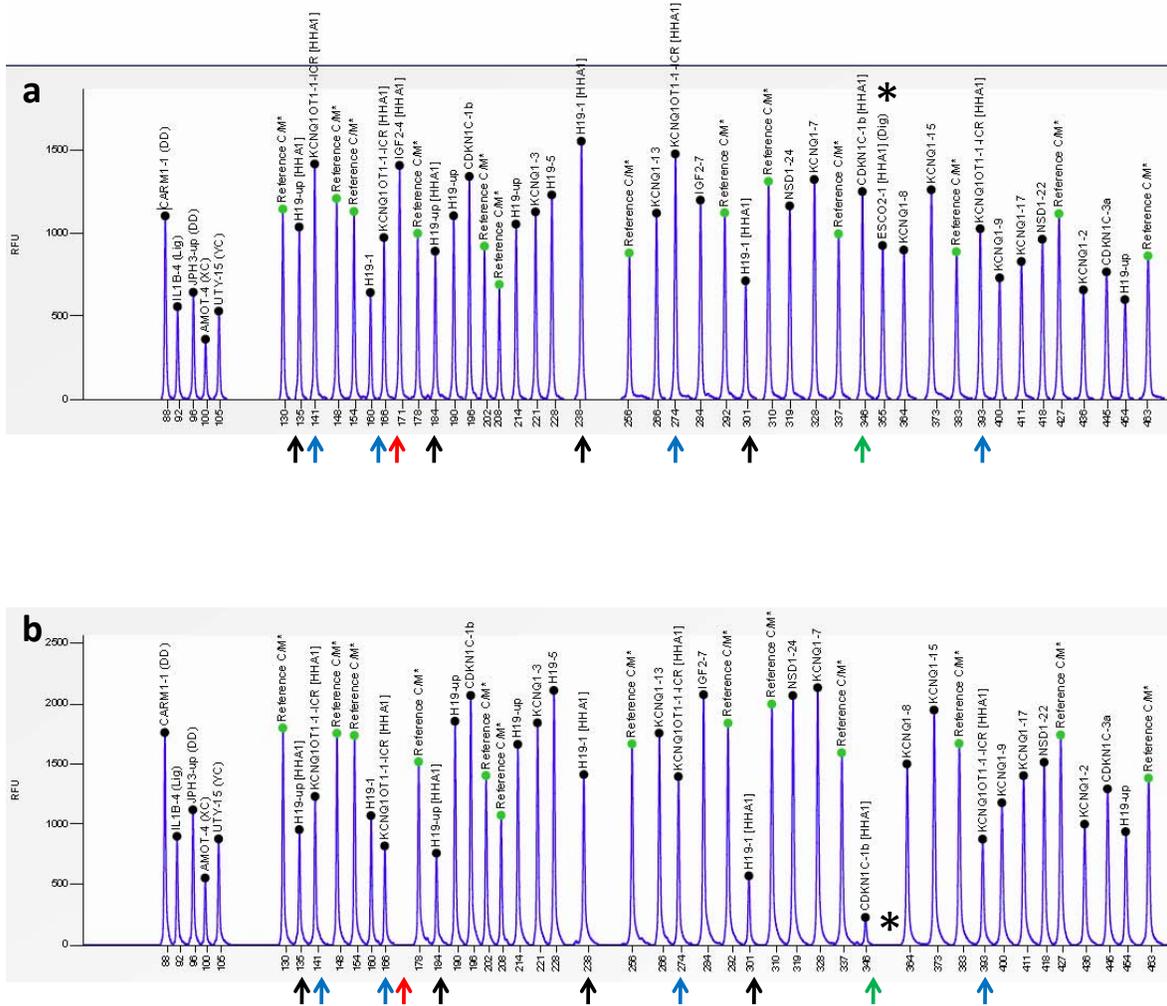


Figura 22. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H8. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

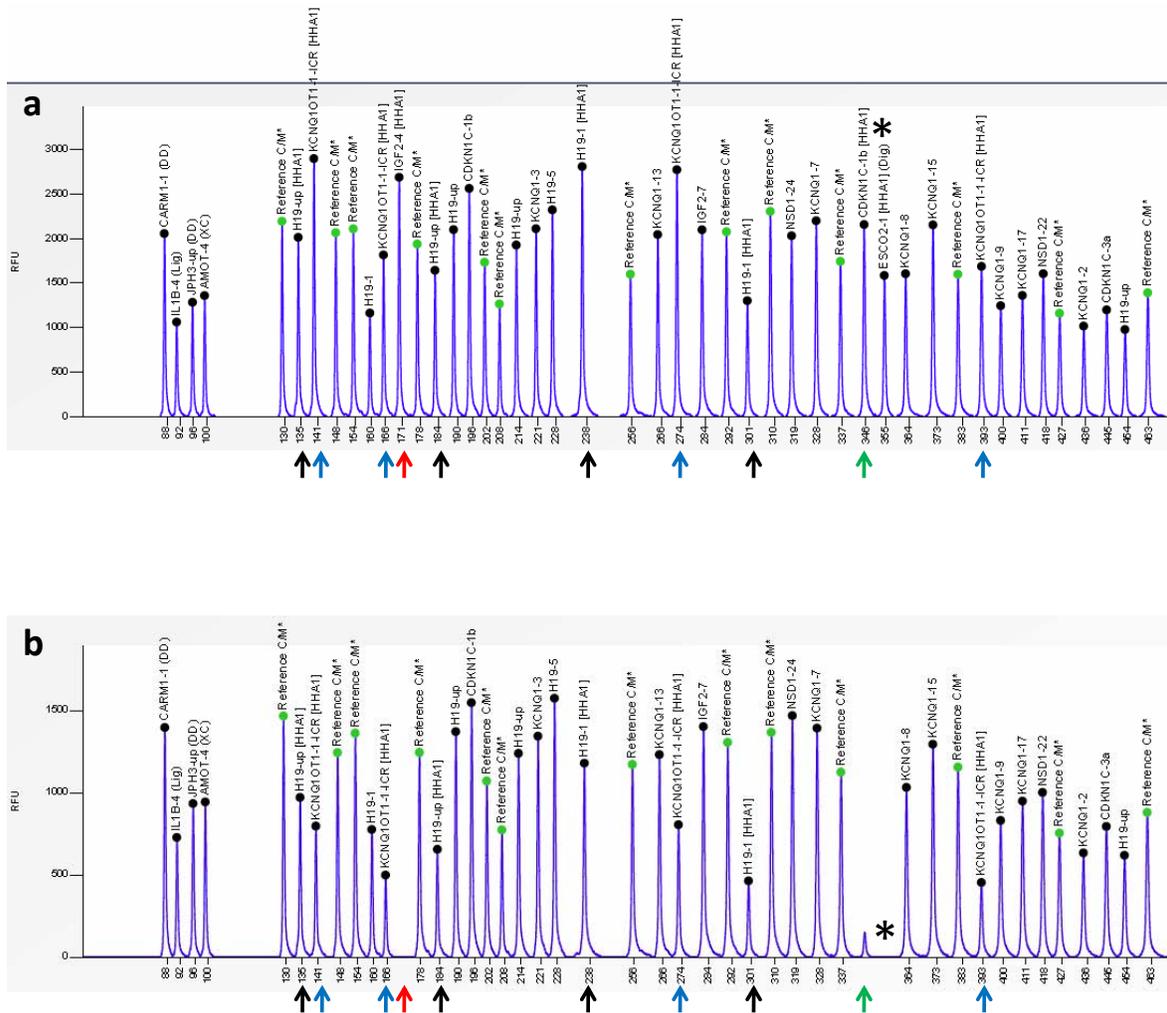


Figura 23. Patrón de señales MS-MLPA para región 11p15.5 en muestra de paciente H9. a) Reacción de ligación, se observa un número de copias normal. b) Reacción de ligación-digestión con *HhaI*, se observa la reducción normal en las señales esperadas, compatible con patrón de metilación normal.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron un total de 26 pacientes con diagnóstico de hemihiperplasia aislada, lo que representa un 0.4% de la solicitud de consulta para el departamento de Genética del HIMFG y del 0.08% para el HIMFG. En relación a esta frecuencia, estudios epidemiológicos han demostrado que la HA tiene una incidencia de 1:86,000 recién nacidos vivos [Tomooka, 1988]. Los datos anteriores reflejan una frecuencia baja de la enfermedad que puede explicarse por ser una condición rara o probablemente ser atribuida al subdiagnóstico. Entre los factores para este último se incluye la hemihiperplasia leve, situación que resulta difícil en su valoración clínica; la edad temprana que no permite la valoración clínica adecuada; la ausencia de complicaciones clínicas o limitación en la función y el desconocimiento de la enfermedad, entre otros.

La presentación de HA usualmente es esporádica, pero se han descrito algunos casos de presentación familiar incluyendo 6 casos de generaciones sucesivas afectadas [Fraumeni et al., 1967], una familia de tres hijos con tumor de Wilms y madre con hemihiperplasia [Meadows et al., 1974], un caso de gemelos monocigóticos discordantes para el fenotipo de hemihiperplasia [West et al., 2003] y una familia en la cual el propósito presentaba hemihiperplasia en tórax izquierdo y su madre con sobrecrecimiento en extremidad pélvica izquierda [Slavotinek et al., 2003]. De particular interés es el caso de tres primos maternos afectados, sus madres no afectadas y su abuelo materno afectado [Heilstedt y Bacino, 2004], sugiriendo una patrón de herencia similar al presentado en los mecanismos de impronta.

En nuestros casos no se identificaron antecedentes heredofamiliares relevantes ni relacionados con HA. La ausencia de antecedentes heredofamiliares puede explicarse tanto por la presencia de alteraciones genéticas y/o epigenéticas *de novo*, así como por la falta del reconocimiento diagnóstico en generaciones anteriores. En relación a esta última situación, durante la evaluación clínica de los pacientes estudiados, se descartó el diagnóstico de HA en aquellos padres que acudían a la consulta, sin embargo no fue posible establecerlo en la totalidad de ambos padres o en miembros de otras generaciones.

En relación a la edad, la mayoría de los pacientes con HA se encontraban en la etapa de lactante representando el 56%, seguido por preescolares y adolescentes en igual proporción. La edad a la cual se realizó el diagnóstico fue entre las etapas de lactante y preescolar para todos los casos. Realizar el diagnóstico precoz de la HA es de suma importancia debido al riesgo incrementado de la presentación de tumores de tipo embrionario, ya que de esta manera se realiza una mejor vigilancia y seguimiento de los casos.

El presente trabajo incluyó el estudio clínico de 9 pacientes con HA determinándose que la presentación en el género femenino tiene cierto predominio, ya que el 67% de los afectados fueron mujeres, lo que representa una relación 2:1. Lo anterior es similar a lo reportado en la literatura con relaciones hasta de 6:1 entre mujeres y hombres afectados [Shuman et al., 2006; Bliet et al., 2008].

La hemihiperplasia afectó el lado izquierdo con una frecuencia ligeramente superior al presentarse en 5 de los 9 pacientes. En un estudio previo en el que se incluyeron 8 pacientes con HA, el lado izquierdo fue el más afectado con frecuencia del 75% [Martin et al., 2005]. También se reportó que 8 de 11 individuos no relacionados con hemihipertrofia idiopática congénita tenían afectado el lado izquierdo [Viljoen et al., 1984]. En otro reporte, esta proporción permaneció en igualdad para 40 pacientes [Bliet et al., 2008]. A pesar de la clasificación de hemihiperplasia, en los reportes de pacientes con HA no se detalla la proporción de la misma, pero en nuestro estudio la mayoría de los casos presentó la forma compleja de HA (78%). Se ha propuesto que la extensión de la hemihiperplasia (simple y compleja) y el lado afectado (derecho e izquierdo) en los patrones anormales de crecimiento pueden ser considerados como el significado clínico del mosaicismo genético [Hall, 2005].

Las diferencias en la asimetría corporal reportadas para algunos pacientes tienen un rango de 0.5 a 4cm [Blik et al., 2008] y de 1 a 6cm en otros reportes [Stoll et al., 1993]. En este estudio, la asimetría encontrada en los pacientes con HA fue de 0.5 a 5cm. El grado de hemihiperplasia es difícil establecerlo debido a la asimetría corporal relativa en los seres humanos y también a que las diferencias entre las regiones corporales normales e hiperplásicas en pacientes con HA varían a lo largo de la vida.

Como hallazgos asociados a la hemihiperplasia en los pacientes incluidos en nuestro estudio, se encontraron manchas café con leche únicas, dolicocefalia, displasia del desarrollo de la cadera (DDC) y pie plano. En relación a lo anterior, cabe mencionar que los pacientes con HA reportados en la literatura no presentan la hemihiperplasia estrictamente aislada, ya que se ha reportado una amplia heterogeneidad clínica que sin embargo no da alteraciones de tipo sindrómico identificable [Dalal et al., 2006; Shuman et al., 2006; Blik et al., 2008; Demir et al., 2008; Zarate et al., 2009; Motafoglu et al., 2010; Dempsey et al., 2012; Kalish et al., 2013].

Por otra parte, de manera estricta ningún paciente en el estudio reunió criterios clínicos para el diagnóstico de SBW, los cuales establecen la presencia de tres criterios mayores o dos mayores y uno menor [Weksberg et al., 2010]. El paciente H4 adicionalmente presentó asimetría renal izquierda, caso que algunos han considerado una “forma frustrada” o “microforma” del SBW, debido a la presentación de hemiperplasia asociada a otra característica del síndrome, pero sin que se reunan los criterios para el mismo [Sotelo-Avila et al., 1980; Choufani et al., 2010]. Uno de los criterios menores en el SBW relacionado con el embarazo se trata de la prematuridad [Weksberg et al., 2010], dato que se presentó en el paciente H1 acompañado de peso y talla normal para la edad gestacional, una sola mancha café con leche y talla postnatal normal limítrofe. Entre los principales criterios mayores para SBW se encuentra la macrosomía [Weksberg et al., 2010], antecedente ausente en todos los pacientes y que por el contrario los pacientes H3 y H6 presentaron peso bajo al nacimiento. Este último se utiliza como criterio mayor para el SSR [Eggermann, 2010], sin embargo en los pacientes mencionados el crecimiento postnatal fue

normal y no se presentaron criterios adicionales a la asimetría corporal y de extremidades para establecer un diagnóstico de SSR.

Es bien conocido que la HA se puede acompañar de asimetría visceral a expensas de crecimiento de un órgano intraabdominal principalmente [Hoyme et al., 1998]. Solamente en un paciente se detectó asimetría renal izquierda consistente con la lateralidad de la hemihiperplasia faciocorporal que presentó. En relación al estudio citogenético, no se presentaron alteraciones en el cariotipo y solo un polimorfismo del cromosoma Y fue observado en un paciente. Esta situación es similar a la reportada en la literatura ya que no se han encontrado alteraciones citogenéticas en los pacientes con HA [Niemitz et al., 2005; Shuman et al., 2006; Bliet et al., 2008]

En relación al estudio del número de copias en la región 11p15.5, todos los pacientes analizados presentaron un número de copias normal, situación que descarta como mecanismo etiológico a las deleciones/duplicaciones exclusivamente dentro de la región 11p15.5, así como de las secuencias diana. El estudio de número de copias no ha sido realizado en pacientes con HA, sin embargo su resultado ha sido normal al estudiar la región 11p15.5 en SBW, una condición que incluye hemihiperplasia en su fenotipo [Priolo et al., 2008].

El estudio del patrón de metilación del DNA en los centros del control de impronta 1 y 2 en la región 11p15.5 analizado mediante MS-MLPA en este trabajo, demostró que el 22% (n=2) de los pacientes con HA tenía alteraciones del estado de metilación. La frecuencia anterior es mayor a la que se reporta en estudios previos del 10% (Tabla 14). [Gaston et al., 2001; Martin et al., 2005; Niemitz et al., 2005; Shuman et al., 2006; Bliet et al., 2008]. Además, los dos casos con defecto en la metilación del DNA se caracterizaron por ganancia de metilación materna en CI1, alteración con menor frecuencia de presentación reportada en la literatura (3%) [Martin et al., 2005; Niemitz et al., 2005; Bliet et al., 2008]. Estas observaciones podrían ser explicadas en parte por el número reducido de pacientes estudiados.

Tabla 14. Frecuencia y tipo de alteraciones moleculares descritas en la región 11p15.5 de pacientes con hemihiperplasia aislada

Número de pacientes	Tejido de estudio	Resultados Número de pacientes (%)				Referencia
		DUPpat	GMM CI1	PMM CI2	Sin defecto	
9	Sangre	0	0	1 (11)	8 (89)	[57]
15	Sangre	2 (13)	1 (7)	0	12 (80)	[113]
27	Sangre	3 (11)	1 (4)	7 (26)	16 (60)	[105]
51	Sangre, fibroblastos, tumor	8 (16)	0	3 (6)	40 (78)	[133]
47	Sangre	8 (17)	3 (6)	1 (2)	35 (75)	[15]
9	Sangre	0	2 (22)	0	7 (78)	Presente estudio

DUPpat: disomía uniparental paterna, PMM: pérdida de metilación materna, GMM: ganancia de metilación materna, CI1: centro de control de impronta 1, CI2: centro de control de impronta 2.

La correlación epigenotipo fenotipo resultó interesante tanto para pacientes con defecto en el patrón de metilación, así como para aquellos con metilación normal. Por una parte, la distribución entre mujeres y hombres afectados con hemihiperplasia aislada y alteración molecular muestra diferencias, ya que el género femenino es más frecuentemente afectado cuando se presenta la DUPpat11p15.5 en comparación con la hipometilación en CI2 donde el 67% de los afectados son hombres [Shuman et al., 2006].

La mayoría de los 7 pacientes con HA y patrón de metilación normal tuvo una diferencia en asimetría de extremidades <2 cm, excepto el paciente H9 quién presentó la mayor asimetría (5cm) en la forma compleja de HA, sin embargo no se encontró alteración en el patrón de metilación. Esta situación podría explicarse por el fenómeno de mosaicismo, tal y como se ha reportado en algunos casos de HA sin defecto molecular en sangre periférica, pero con la

presencia de DUP en el tejido hiperplásico [Shuman et al., 2006]. Otra explicación podría ser la presencia de un mecanismo genético o epigenético no detectado mediante este estudio. En el análisis de tejidos mediante MLPA, existe la posibilidad de que la presencia de mosaicismo no pueda ser detectada, ya que la cantidad de células normales puede ser mayor a la proporción de células anormales [Stuppia et al., 2012].

Los pacientes H4 y H5 con ganancia de metilación materna en CI1 presentaron HA compleja izquierda y asimetría considerable de hasta 3.5cm. Esto difiere de lo reportado, ya que el lado izquierdo fue el más frecuentemente afectado al presentarse hipometilación en CI2 y DUPpat11p15.5 [Martin et al., 2005].

Adicionalmente, en el paciente H4 se detectó asimetría renal izquierda, dato que concuerda con lo reportado ya que los pacientes con hemihiperplasia y presencia de una o más características del SBW tienen mayores índices de metilación en el CI1 comparado con el CI2 [Bliek et al., 2008]. Al respecto, hasta un 11% de los pacientes con HA y defectos en el patrón de metilación en la región 11p15.5 presentan alteraciones a nivel renal, principalmente nefromegalia [Bliek et al., 2008]. Este hallazgo es de suma importancia en el presente caso debido al riesgo elevado de tumor de Wilms y edad del paciente (1 año 3 meses), motivo por el cual la vigilancia estrecha en el mismo se estableció como prioritaria.

La proliferación celular anormal en pacientes con HA probablemente sea la causa del incremento en el riesgo de tumores de tipo embrionario como tumor de Wilms o hepatoblastoma, ya que se ha estimado una incidencia de 5.9% comparado con 0.17% en población general [Hoyme et al., 1998]. Durante la realización del estudio y el seguimiento por 2 años no se presentó ningún caso de neoplasia en los pacientes, sin embargo la mayoría se encontraba entre la etapa de lactante y preescolar, considerando que con mayor frecuencia los tumores se presentan antes de los 10 años de edad [Hoyme et al., 1998] e incluso se ha reportado la detección de feocromocitoma asociado a HA en la etapa adolescente (Van den Akker et al., 2002).

Al realizar la correlación epigenotipo fenotipo, se ha estimado una frecuencia de tumor del 20% en pacientes con HA y alteración en el patrón de metilación del DNA en la región 11p15.5, lo cual se incrementa hasta el 50% específicamente cuando se detecta DUPpat11p15.5 a diferencia de los pacientes cuyo defecto molecular es la hipometilación en el CI2 [Shuman et al., 2006]. Los dos pacientes con ganancia de metilación del DNA en el CI1 no presentaron neoplasia, sin embargo no se excluye este riesgo ya que en SBW, condición que comparte características clínicas y moleculares con HA, el tumor de Wilms y hepatoblastoma se presenta con mayor frecuencia en los casos de ganancia de metilación en CI1 y DUPpat11p15.5, además de que la penetrancia varía con la edad de los pacientes [Choufani et al., 2010].

Dada la distribución en mosaico para la DUP11p15.5, se han analizado otros tejidos como fibroblastos y tejido tumoral; el rango de mosaicismo reportado fue de 28 a 89% [Shuman et al., 2006]. Además, en pacientes con HA sin defecto molecular identificado se han presentado neoplasias de tipo embrionario principalmente tumor de Wilms [Shuman et al., 2006]. Bajo estas circunstancias, el no detectar alteración de metilación del DNA en sangre periférica, obliga al estudio de otros tejidos y la vigilancia del paciente por el riesgo potencial de neoplasias.

Se ha propuesto un protocolo de vigilancia de neoplasias incluyendo la revisión médica cada 6 a 12 meses y ultrasonido cada 3 meses hasta los 6 años y cada 6 meses hasta la pubertad [Hoyme et al., 1998]. Esta situación es una información fundamental para el asesoramiento genético en casos de HA, pero además se debe considerar que la evaluación clínica específica para cada paciente es imprescindible en la atención integral del paciente.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se caracterizó el patrón de metilación del DNA en los centros de control de la impronta 1 y 2 de la región 11p15.5 en sangre periférica de 9 pacientes mestizos mexicanos con hemihiperplasia aislada mediante la técnica de MS-MLPA.

Este análisis demostró que no hay variaciones en el número de copias de la región bajo estudio en este grupo de pacientes.

En dos pacientes con hemihiperplasia compleja se identificó la ganancia de metilación en el CI1 en 11p15.5. Al estar hipermetilada dicha región, se deduce una sobre expresión de *IGF2* lo que a su vez puede explicar el sobrecrecimiento corporal asimétrico en ambas pacientes.

La baja frecuencia reportada en la literatura de alteraciones en el patrón de metilación es similar a la encontrada en este estudio, lo cual hace suponer la existencia de mecanismos moleculares alternos u otros tejidos afectados para explicar en los demás pacientes la presencia de hemihiperplasia aislada.

El porcentaje identificado de hipermetilación de CI1 en este estudio indica que esta alteración es una causa poco frecuente en hemihiperplasia en pacientes mexicanos. No puede descartarse la asociación de hemihiperplasia aislada con formas frustradas de síndrome de Beckwith-Wiedemann causada por sobreexpresión del gen *IGF2*.

10. REFERENCIAS

1. Adalsteinsson BT, Ferguson-Smith AC. Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes*. 2014;5:635-655.
2. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Cap. 4 DNA, Chromosome and Genomes. En *Molecular Biology of the cell*. 5th ed. London: Garland Press, Taylor and Francis; 2007.
3. Alders M, Blik J, vd Lip K, vd Bogaard R, Mannens M. Determination of KCNQ1OT1 and H19 methylation levels in BWS and SRS patients using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:467-473.
4. Algar E, Dagar V, Sebah M, Pachter N. An 11p15 imprinting centre region 2 deletion in a family with Beckwith Wiedemann syndrome provides insights into imprinting control at *CDKN1C*. *PLoS One*. 2011;6:e29034.
5. Antequera F. CpG Islands and Methylation. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2005. <http://www.els.net>.
6. Apostolou E, Hochedlinger K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*. 2013;502:462-471.
7. Ballestar E, Esteller M. DNA methylation and histone acetylation. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2005. <http://www.els.net>.
8. Bartholdi D, Krajewska-Walasek M, Ounap K, Gaspar H, Chrzanowska KH, Ilyana H, et al. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver–Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. *J Med Genet*. 2009;46:192-197.
9. Beatty L, Weksberg R, Sadowski PD. Detailed analysis of the methylation patterns of the KVDMR1 imprinting control region of human chromosome 11. *Genomics*. 2006; 87: 46-56.
10. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *IGF2* gene. *Nature*. 2000;405:482-485.

11. Bell JT, Pai AA, Pickrell JK, Gaffney DJ, Pique-Regi R, Degner JF, et al. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol.* 2011;12:R10.
12. Bernstein E, Hake SB. The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem Cell Biol.* 2006;84:505-517.
13. Beygo J, Citro V, Sparago A, De Crescenzo A, Cerrato F, Heitmann M, et al. The molecular function and clinical phenotype of partial deletions of the IGF2/H19 imprinting control region depends on the spatial arrangement of the remaining CTCF-binding sites. *Hum Mol Genet.* 2013;22:544-557.
14. Bhaumik SR, Smith E, Shilatifard A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nat Struct Mol Biol.* 2007;14:1008-1016.
15. Blik J, Maas S, Alders M, Merks JHM, Mannens M. Epigenotype, phenotype, and tumors in patients with isolated hemihyperplasia. *J Pediatr.* 2008;153:95-100.
16. Bouwland-Both MI, van Mil NH, Stolk L, Eilers PHC, Verbiest MM, Heijmans BT, et al. DNA methylation of IGF2DMR and H19 is associated with fetal and infant growth: The Generation R Study. *PLoS One.* 2013;8:e81731.
17. Branco MR, Ficz G, Reik W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2012;13:7-13.
18. Bruce S, Hannula-Jouppi K, Peltonen J, Kere J, Lipsanen-Nyman M. Clinically distinct epigenetic subgroups in Silver-Russell syndrome: the degree of *H19* hypomethylation associates with phenotype severity and genital and skeletal anomalies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:579-587.
19. Brunner AM, Nanni P, Mansuy IM. Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines. *Epigenetics Chromatin.* 2014;7:1-12.
20. Buck-Koehntop BA, Defossez PA. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA. *Epigenetics.* 2013;8:131-137.
21. Butler M. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:477-486.
22. Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet.* 2009;10:295-302.

23. Cerrato F, Sparago A, Verde G, De Crescenzo A, Citro V, Cubellis MA, et al. Different mechanisms cause imprinting defects at the IGF2/H19 locus in Beckwith-Wiedemann syndrome and Wilms' tumour. *Hum Mol Genet.* 2008;17:1427-1435.
24. Cheedipudi S, Genolet O, Dobрева G. Epigenetic inheritance of cell fates during embryonic development. *Front Genet.* 2014;5:1-7.
25. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith–Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet Part C.* 2010;154C:343-354.
26. Christoforidis A, Maniadaki I, Stanhope R. Managing children with Russell-Silver syndrome: more than just growth hormone treatment?. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2005;18:651-652.
27. Clericuzio CL, Martin RA. Diagnostic criteria and tumor screening for individuals with isolated hemihyperplasia. *Genet Med.* 2009;11:220-222.
28. Cocozza S, Akhtar MM, Miele G, Monticelli A. CpG islands undermethylation in human genomic regions under selective pressure. *PLoS One.* 2011;6:e23156.
29. Cohen MM Jr. Perspectives on overgrowth syndromes. *Am J Med Genet.* 1998;79:234-237.
30. Cooper WN, Luharia A, Evans GA, Raza H, Haire AC, Grundy R, et al. Molecular subtypes and phenotypic expression of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2005;13:1025-1032.
31. Court F, Camprubi C, Vicente Garcia C, Guillaumet-Adkins A, Sparago A, Seruggia D, et al. The PEG13-DMR and brain-specific enhancers dictate imprinted expression within the 8q24 intellectual disability risk locus. *Epigenetics Chromatin.* 2014;7:1-13.
32. Dalal AB, Phadke SR, Pradhan M, Sharda S. Hemihyperplasia syndromes. *Indian J Pediatr.* 2006;73:609-615.
33. Dawlaty MM, Ganz K, Powell BE, Hu YC, Markoulaki S, Cheng AW, et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. *Cell Stem Cell.* 2011;9:166-175.
34. Daxinger L, Whitelaw E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. *Nat Rev Genet.* 2012;13:153-162.

35. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011; 25:1010-22.
36. DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, Brandenburg SA, Lee MP, Feinberg AP, et al. Epigenetic alterations of *H19* and *LIT1* distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet.* 2002;70:604-611.
37. Demir HA, Varan A, Akçören Z, Haliloglu M, Büyükpamukcu M. Focal nodular hyperplasia of the liver and elevated alpha fetoprotein level in an infant with isolated hemihyperplasia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2008;30:775-777.
38. Dempsey-Robertson M, Wilkes D, Stall A, Bush P. Incidence of abdominal tumors in syndromic and idiopathic hemihypertrophy/isolated hemihyperplasia. *J Pediatr Orthop.* 2012;32:322-326.
39. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2014;4:e207.
40. Dong Y, Zhao H, Li H, Li X, Yang S. DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer. *Biomed Rep.* 2014;2:326-330.
41. Du M, Zhou W, Beatty LG, Weksberg R, Sadowskia PD. The *KCNQ1OT1* promoter, a key regulator of genomic imprinting in human chromosome 11p15.5. *Genomics.* 2004;84:288-300.
42. Edwards CA, Ferguson-Smith AC. Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:281-289.
43. Eggermann, T. Russell-Silver syndrome. *Am J Med Genet Part C.* 2010;154C:355-364.
44. Ehrlich M, Lacey M. DNA methylation and differentiation: silencing, upregulation and modulation of gene expression. *Epigenomics.* 2013;5:1-23.
45. Eissenberg JC, Elgin SC. Heterochromatin and Euchromatin. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2005. <http://www.els.net>.
46. Engel E. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet.* 2006;14:1158-1169.

47. Esteller M. Cancer Epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007;8:286-297.
48. Esteller M. Epigenetics in Cancer. *N Engl J Med.* 2008;358:1148-1159.
49. Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet.* 2012;13:97-109.
50. Feng J, Shen WH. Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Front Plant Sci.* 2014;5:1-9.
51. Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet.* 2011;12:565-575.
52. Ferguson-Smith AC, Lin SP, Tsai CE, Youngson N, Tevendale M. Genomic imprinting-insights from studies in mice. *Sem Cell Dev Biol.* 2003;14:43-49.
53. Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature.* 2011;473:398-402.
54. Fraumeni JF, Geiser CF, Manning MD. Wilms' tumor and congenital hemihypertrophy: report of five new cases and review of literature. *Pediatrics.* 1967;40:886-899.
55. Galaz-Montoya CI, García-Delgado C, Cervantes-Peredo A, García-Morales L, Morán-Barroso VF. Perfil clínico de una cohorte de pacientes con síndrome de Silver-Russell atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de 1998 a 2012. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2014;71:218-226.
56. Gao F, Das S. Epigenetic regulations through DNA methylation and hydroxymethylation: clues for early pregnancy in decidualization. *Biomol Concepts.* 2014;5:95-107.
57. Gaston V, Le Bouc Y, Soupre V, Burglen L, Donadieu J, Oro H, et al. Analysis of the methylation status of the *KCNQ1OT* and *H19* genes in leukocyte DNA for the diagnosis and prognosis of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2001;9:409-418.
58. Geuns E, Hilven P, van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of KvDMR1 in human oocytes. *J Med Genet.* 2007;44:144-147.

59. Ghirlando R, Giles K, Gowher H, Xiao T, Xu Z, Yao H, Felsenfeld G. Chromatin domains, insulators, and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819:644-651.
60. Girardot M, Feil R, Llères D. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in humans: causal mechanisms and clinical implications. *Epigenomics*. 2013;5:715-728.
61. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128:635-638.
62. Greer EL, Shi Y. Histone methylation: a dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nat Rev Genet*. 2012;13:343-357.
63. Grewal SIS, Jia S. Heterochromatin revisited. *Nat Rev Genet*. 2007;8:35-46.
64. Grundy P. Chromosome 11 uniparental isodisomy predisposing to embryonal neoplasms. *Lancet*. 1991;338:1079-1080.
65. Guo J, Su Y, Zhong C, Ming GL, Song H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell*. 2011;145:423-434.
66. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*. 2002;117:15-23.
67. Hall JG. Mosaicism. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2005. <http://www.els.net>.
68. Hall JG, Froster-Iskenius UG, Allanson JE. (1995). Cap. 8 Limbs. En *Handbook of normal physical measurements (271-277)*. Gran Bretaña: Oxford University Press.
69. Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM, et al. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/IGF2 locus. *Nature*. 2000;405:486-489.
70. Heilstedt HA, Bacino CA. A case of familial isolated hemihiperplasia. *BMC Med Genet*. 2004;5:1-6.
71. Hirst M, Marra MA. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:136-146.

72. Ho L, Crabtree1 GR. Chromatin remodelling during development. *Nature*. 2010;463:474-484.
73. Holwerda SJ, de Laat W. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Phil Trans R Soc B*. 2003;368:1-8.
74. Horsthemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet Part C*. 2010;154C:321-328.
75. Hoyme HE, Seaver LH, Jones KL, Procopio F, Crooks W, Feingold M. et al. Isolated hemihyperplasia (hemihypertrophy): Report of a prospective multicenter study of the incidence of neoplasia and review. *Am J Med Genet*. 1998;79:274-748.
76. Huang C, Xiang Y, Wang Y, Li X, Xu L., et al. Dual-specificity histone demethylase KIAA1718 (KDM7A) regulates neural differentiation through FGF4. *Cell Res*. 2010;20:154-165.
77. Huang RC, Galati JC, Burrows S, Beilin LJ, Li X, Pennell CE. DNA methylation of the IGF2/H19 imprinting control region and adiposity distribution in young adults. *Clin Epigenetics*. 2012;4:1-11.
78. Jang H, Serra C. Nutrition, epigenetics, and diseases. *Clin Nutr Res*. 2014;3:1-8.
79. Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, et al. The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9:e96822.
80. Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*. 2012;13:484–92.
81. Kacem S, Feil R. Chromatin mechanisms in genomic imprinting. *Mamm Genome*. 2009;20:544-556.
82. Kalish JM, Conlin LK, Mostoufi-Moab S, Wilkens AB, Mulchandani S, Zelle K, et al. Bilateral pheochromocytomas, hemihyperplasia and subtle somatic mosaicism: the importance of detecting low-level uniparental disomy. *Am J Med Genet A*. 2013 161A:993-1001.
83. Kanai Y, Arai E. Multilayer-omics analyses of human cancers: exploration of biomarkers and drug targets based on the activities of the International Human Epigenome Consortium. *Front Genet*. 2014;5:1-7.

84. Kang C, Song JJ, Lee J, Kim MY. Epigenetics: An emerging player in gastric cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20:6433-6447.
85. Kannenberg K, Weber K, Binder C, Urban C, Kirschner HJ, Binder G. IGF2/H19 hypomethylation is tissue, cell, and CpG site dependent and not correlated with body asymmetry in adolescents with Silver-Russell syndrome. *Clin Epigenetics*. 2012;4:1-12.
86. Karatzas PS, Gazouli M, Safioleas M, Mantzaris GJ. DNA methylation changes in inflammatory bowel disease. *Ann Gastroenterol*. 2014;27:125-132.
87. Katsushima K, Kondo Y. Non-coding RNAs as epigenetic regulator of glioma stem-like cell differentiation. *Front Genet*. 2014;5:1-8.
88. Kelsey G, Feil R. New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Phil Trans R Soc B*. 2013;368:1-16.
89. Kim Y, Kim SS, Kim G, Park S, Park IS, Yoo HW. Detection of maternal uniparental disomy at the two imprinted genes on chromosome 7, *GRB10* and *PEG1/MEST*, in a Silver-Russell syndrome patient using methylation-specific PCR assays. *Clin Genet*. 2005;67:267-269.
90. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128:693-705.
91. Kumar S, Kumari R, Sharma V, Sharma V. Roles, and establishment, maintenance and erasing of the epigenetic cytosine methylation marks in plants. *J Genet*. 2013; 92: 629-666.
92. Kuo CH, Hsieh CC, Lee MS, Chang KT, Kuo HF, Hung CH. Epigenetic regulation in allergic diseases and related studies. *Asia Pac Allergy* 2014;4:14-18.
93. Lapunzina P. Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. *Am J Med Genet Part C*. 2005;137C:53-71.
94. Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsirigos A, Ong CT, et al. Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*. 2010; 20:320-331.
95. Li B, Carey M, Workman JL. The role of chromatin during transcription. *Cell*. 2007;128:707-719.

96. Li G y Reinberg D. Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr Opin Genet Dev.* 2011; 21:175-186.
97. Lienert F, Wirbelauer C, Som I, Dean A, Mohn F, Schübeler D. Identification of genetic elements that autonomously determine DNA methylation states. *Nat Genet.* 2011;43:1091-1097.
98. Lin SY, Lee CN, Hung CC, Tsai WY, Lin SP, Li NC, et al. Epigenetic profiling of the H19 differentially methylated region and comprehensive whole genome array-based analysis in Silver–Russell syndrome. *Am J Med Genet Part A.* 2010;152A:2521-2528.
99. Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462:315-322.
100. Liu MM, Chan CC, Tuo J. Epigenetics in Ocular Diseases. *Curr Genomics.* 2013;14:166-172.
101. Loscalzo J, Handy DE. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ* 2014;4:169-174.
102. Luger K. Nucleosomes: structure and function. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2001. <http://www.els.net>.
103. Ma L, Chua MS, Andrisani O, So S. Epigenetics in hepatocellular carcinoma: An update and future therapy perspectives. *World J Gastroenterol.* 2014;20:333-345.
104. Maeshima K, Imai R, Tamura S, Nozaki T. Chromatin as dynamic 10-nm fibers. *Chromosoma.* 2014;123:225-237.
105. Martin RA, Grange DK, Zehnbauser B, DeBaun MR. *LIT1* and *H19* methylation defects in isolated hemihyperplasia. *Am J Med Genet A.* 2005;134:129-131.
106. Meadows AT, Lichtenfeld JL, Koop CE. Wilms' tumor in three children of a woman with congenital hemihypertrophy. *N Engl J Med.* 1974;291:23-24.
107. Moreno-Salgado R, García-Delgado C, Cervantes-Peredo A, García-Morales L, Martínez Barrera LE, Peñaloza-Espinoza R, Morán Barroso VF. Perfil clínico de

- una cohorte de pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez de 2007 a 2012. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2013;70:166-173.
108. Moskalev AA, Aliper AM, Smit-McBride Z, Buzdin A, Zhavoronkov A. Genetics and epigenetics of aging and longevity. *Cell Cycle.* 2014;13:1063-1077.
 109. Mutafoglu K, Cecen E, Cakmakci H. Isolated hemihyperplasia in an infant: an overlooked sign for Wilms tumor development. *Iran J Pediatr.* 2010;20:113-117.
 110. Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, Urano T, et al. Expression profile of *LIT1/KCNQ1OT1* and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. *Cancer Sci.* 2006;97:1147-1154.
 111. Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, Azzi S, Rousseau A, Perin L, et al. 11p15 ICR1 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russel-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:3148-3154.
 112. Nguyen NM, Slim R. Genetics and epigenetics of recurrent hydatidiform moles: basic science and genetic counselling. *Curr Obstet Gynecol Rep.* 2014;3:55-64.
 113. Niemitz EL, Feinberg AP, Brandenburg SA, Grundy PE, DeBaun MR. Children with idiopathic hemihypertrophy and Beckwith-Wiedemann syndrome have different constitutional epigenotypes associated with Wilms tumor. *Am J Hum Genet.* 2005;77:887-891.
 114. Okamura E, Matsuzaki H, Fukamizu A, Tanimoto K. The chicken HS4 insulator element does not protect the H19 ICR from differential DNA methylation in yeast artificial chromosome transgenic mouse. *PLoS One.* 2013;8:e73925.
 115. Okamura E, Matsuzaki H, Sakaguchi R, Takahashi T, Fukamizu A, Tanimoto K. The H19 imprinting control region mediates preimplantation imprinted methylation of nearby sequences in yeast artificial chromosome transgenic mice. *Mol Cell Biol.* 2013;33:858-871.
 116. Olins DE, Olins AL. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat Rev.* 2003;4:809-814.

117. Pagé-Larivière F, Sirard MA. Spatiotemporal expression of DNA demethylation enzymes and histone demethylases in bovine embryos. *Cell Reprogram.* 2014;16:40-53.
118. Papageorgiou EA, Koumbaris G, Kypri E, Hadjidaniel M, Patsalis PC. The epigenome view: an effort towards non-invasive prenatal diagnosis. *Genes.* 2014;5:310-329.
119. Pateras IS, Apostolopoulou K, Niforou K, Kotsinas A, Gorgoulis VG. p57KIP2: “Kip”ing the cell under control. *Mol Cancer Res* 2009;7:1902-1919.
120. Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet.* 2014;15:517-530.
121. Pidsley R, Dempster E, Troakes C, Al-Sarraj S, Mill J. Epigenetic and genetic variation at the IGF2/H19 imprinting control region on 11p15.5 is associated with cerebellum weight. *Epigenetics.* 2012;7:155-163.
122. Priolo M, Sparago A, Mammi C, Cerrato F, Laganà C, Riccio A. MS-MLPA is a specific and sensitive technique for detecting all chromosome 11p15.5 imprinting defects of BWS and SRS in a single-tube experiment. *Eur J Hum Genet.* 2008;16:565-571.
123. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Genetics.* 2012;13:358-369.
124. Rando OJ. Chromatin structure in the genomics era. *Trends Genet.* 2006;23:67-73.
125. Rang FJ, Boonstra J. Causes and consequences of age-related changes in DNA methylation: a role for ROS?. *Biology.* 2014;3:403-425.
126. Razin S, Iarovaia O, Sjakste N, Sjakste T, Bagdoniene L, Rynditch A, et al. Chromatin domains and regulation of transcription. *J Mol Biol.* 2007;369:597-607.
127. Reese KJ, Bartolomei MS. Establishment and maintenance of H19 imprinting in the germline and preimplantation embryo. *Cytogenet Genome Res.* 2006;113:153-158.
128. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005;6:597-610.

129. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174:341-348.
130. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:437-447.
131. Sha KA. Mechanistic view of genomic imprinting. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2008;9:197-216.
132. Shenker N, Flanagan J. Intragenic DNA methylation: implications of this epigenetic mechanism for cancer research. *Br J Cancer.* 2011;106:248-253.
133. Shuman C, Smith AC, Steele L, Ray PN, Clericuzio C, Zackai E. et al. Constitutional UPD for chromosome 11p15 in individuals with isolated hemihyperplasia is associated with high tumor risk and occurs following assisted reproductive technologies. *Am J Med Genet A.* 2006;140:1497-1503.
134. Siggens L, Ekwall K. Epigenetics, chromatin and genome organization: Recent advances from the ENCODE project. *J Intern Med* 2014; 276: 201–214.
135. Slavotinek AM, Collins MT, Muenke M. Non-syndromic hemihyperplasia in a male and his mother. *Am J Med Genet.* 2003;121A:47-51.
136. Soejima H, Higashimoto K. Epigenetic and genetic alterations of the imprinting disorder Beckwith–Wiedemann syndrome and related disorders. *J Hum Genet.* 2013;58:402-409.
137. Song J, Rechkoblit O, Bestor TH, Patel DJ. Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *Science.* 2011;331:1036-1040.
138. Sotelo-Avila C, Gonzalez-Crussi F, Fowler JW. Complete and incomplete forms of Wiedemann-Beckwith syndrome: Their oncogenic potential. *J Pediatr.* 1980;96:47-50.
139. Soutoglou E, Misteli T. Mobility and immobility of chromatin in transcription and genome stability. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:435-442.
140. Sparago A. Mechanisms causing imprinting defects in familial Beckwith-Wiedemann syndrome with Wilms' tumour. *Hum Mol Genet.* 2007;16:254-264.

141. Stoll C, Alembik Y, Steib JP, De Saint-Martin A. Twelve cases with hemihypertrophy: etiology and follow-up. *Genet Counsel.* 1993;4:119-126.
142. St-Pierre J, Hivert MF, Perron P, Poirier P, Guay SP, Brisson D, Bouchard L. IGF2 DNA methylation is a modulator of newborn's fetal growth and development. *Epigenetics.* 2012;7:1125-1132.
143. Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. *Int J Mol Sci.* 2012;13:3245-3276.
144. Szulwach KE, Jin P. Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *Bioessays.* 2013;36:107-117.
145. Szyf M. DNA Methylation: Enzymology. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. 2005. <http://www.els.net>.
146. Tammen SA, Friso S, Choi SW. Epigenetics: the link between nature and nurture. *Mol Aspects Med.* 2013;34:753-764.
147. Tee W, Reinberg D. Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs . *Development.* 2014;141:2376-2390.
148. Tomooka Y. Congenital hemihypertrophy and medullary sponge kidney. *Br J Radiol.* 1988;61:851-853.
149. Trowbridge JJ, Orkin SH. DNA methylation in adult stem cells. *Epigenetics.* 2010;5:189-193.
150. Ulaner GA, Yang Y, Hu JF, Li T, Vu TH, Hoffman AR. CTCF binding at the insulin-like growth factor-II (IGF2)/H19 imprinting control region is insufficient to regulate IGF2/H19 expression in human tissues. *Endocrinology.* 2003;144:4420-4426.
151. Van den Akker EL, de Krijger RR, de Herder WW, Drop SL. Congenital hemihypertrophy and pheochromocytoma, not a coincidental combination? *Eur J Pediat.* 2002;161:157-160.
152. Vaskova EA, Stekleneva AE, Medvedev SP, Zakian SM. "Epigenetic Memory" phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae.* 2013;5:15-21.

153. Viljoen D, Pearn J, Beighton P. Manifestations and natural history of idiopathic hemihypertrophy: a review of eleven cases. *Clin Genet.* 1984;26:81-86.
154. Wakeling EL, Amero A, Alders M, Bliet J, Forsythe E, Kumar S, et al. Epigenotype-phenotype correlations in Silver-Russell syndrome. *J Med Genet.* 2010;47:760-768.
155. Wallace JA, Felsenfeld G. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:400-407.
156. Weksberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010;18:8-14.
157. Weksberg R, Shuman C, Caluseriu O, Smith AC, Fei YL, Nishikawa J, et al. Discordant KCNQ1OT1 imprinting in sets of monozygotic twins discordant for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet.* 2002;11:1317-1325.
158. Weksberg R, Smith AC, Squire J, Sadowski P. Beckwith-Wiedemann syndrome demonstrates a role for epigenetic control of normal development. *Hum Mol Genet.* 2003;12:61-68
159. West PM, Love DR, Stapleton PM, Winship IM. Paternal uniparental disomy in monozygotic twins discordant for hemihypertrophy. *J Med Genet.* 2003;40:223-226.
160. Wrzeska M, Rejduch B. Genomic imprinting in mammals. *J Appl Genet.* 2004;45:427-443.
161. Yamazawa K, Oogata T, Ferguson-Smith A. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet Part C.* 2010;154C:329-334.
162. Yan J, Zierath JR, Barrès R. Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Exp Cell Res.* 2011;317:2551-2561.
163. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet.* 2002;3:748-758.
164. Zarate YA, Mena R, Martin LJ, Steele P, Tinkle BT, Hopkin RJ. Experience with hemihyperplasia and Beckwith-Wiedemann syndrome surveillance protocol. *Am J Med Genet A.* 2009;149A:1691-1697.
165. Zhang G, Pradhan S. Mammalian epigenetic mechanisms. *IUBMB Life.* 2014;66:240-256.

ANEXOS

Anexo 1. Hoja de datos para pacientes con Hemihiperplasia aislada

Nombre.

Registro.

___ Historia familiar positiva con diagnóstico de Hemihiperplasia aislada

Grado de parentesco:

Antecedentes perinatales:

___ Inicio prematuro de trabajo de parto

___ Hipoglucemia neonatal

___ Displasia mesenquimatosa placentaria

___ Cordón umbilical engrosado

___ Prematurez

___ Polihidramnios

___ Macrosomía

___ Peso al nacimiento

Datos clínicos:

___ Nevus flammeus

___ Pliegues infraorbitarios

___ Pliegues anteriores en pabellones auriculares

___ Muecas en la parte posterior del hélix

___ Hernia umbilical

___ Hipoplasia medio-facial

___ Macroglosia

___ Paladar hendido

___ Diástasis de rectos

___ Onfalocele

Hemihiperplasia

Región anatómica/lateralidad	Lado derecho	Lado izquierdo
Cara		
Corporal		
Extremidades torácicas		
Extremidades pélvicas		

Anormalidades estructurales internas:

___ Visceromegalia intraabdominal

___ Citomegalia de la corteza adrenal fetal

___ Cardiomegalia

___ Cardiomiopatía

___ Anormalidades cardíacas estructurales:

___ Anormalidades renales:

Neoplasia:

___ Tumor de Wilms

Dx. de inicio:

___ Otro tumor:

Estudios paraclínicos y otras observaciones:

___ Edad ósea avanzada

Observaciones _____

Anexo 2. Obtención de la muestra sanguínea periférica

- Se explicó detalladamente el procedimiento de toma de muestra sanguínea al paciente y familiar.
- Previa asepsia y antisepsia se colocó el brazo en hiperextensión y se seleccionó la vena por palpación en el área antecubital (antebrazo).
- Mediante tubo S-Monovette® y dispositivo Multifly®-Set para toma de muestra sanguínea se extrajo 1ml de la misma.
- La muestra sanguínea fue almacenada a 4 °C hasta su procesamiento.

Anexo 3. Extracción de DNA genómico de sangre periférica

- Se colocaron 300 µl de sangre periférica en un tubo con 900 µl de solución de lisis para glóbulos rojos, se mezcló e incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Se centrifugó durante 20 segundos a 13,000rpm, posteriormente se retiró el sobrenadante y se agitó en vórtex para resuspender el botón.
- Se agregó 300 µl de solución de lisis celular y se resuspendió mediante pipeta hasta obtener una solución homogénea.
- Se agregó 100 µl de solución de precipitación de proteínas, se agitó en vórtex a máxima velocidad durante 30 segundos y se centrifugó a 13,000rpm durante 1 minuto.
- El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo con 300 µl de isopropanol, se mezcló por inversión durante 50 segundos y posteriormente se centrifugo durante 1 minuto a 13,000rpm.
- Se decantó el isopropanol, se agregaron 300 µl de etanol al 70%, se centrifugó a 13,000rpm durante 1 minuto y se decantó el etanol.
- Posteriormente se colocaron los tubos en un desecador a velocidad media durante 15 minutos.
- El DNA obtenido se resuspendió en 50 µl de solución de hidratación y se incubó durante 1 hora a 60°C.
- Finalmente se cuantificó mediante espectrofotometría y se evaluó la integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Anexo 4. Amplificación de sondas dependiente de ligación múltiple sensible a metilación (MS-MLPA)

1. Desnaturalización del ADN

- Se agregaron 5 μ l de la muestra de DNA (aproximadamente 100ng) a tubos de 200 μ l.
- Se colocaron los tubos en el termociclador durante 5min. a 98 °C.
- Posteriormente se enfrían los tubos a 25 °C antes de retirarlos del termociclador.

2. Reacción de hibridación

- Se preparó la mezcla para hibridación constituida por 1.5 μ l del amortiguador MLPA (tapa amarilla) y 1.5 μ l de la mezcla de sondas (tapa negra). Se agitó gentilmente.
- Se agregaron 3 μ l de esta mezcla de hibridación a cada uno de los tubos del paso 1. Se mezcló mediante movimientos arriba y abajo con la pipeta.
- Enseguida se colocaron los tubos en el termociclador a 95°C por 1min. y después 20hrs. a 60°C.

3. Reacción de ligación y ligación-digestión

- Se preparó la mezcla de Ligasa-65. Para cada reacción se mezclaron gentilmente: 8.25 μ l de agua destilada, 1.5 μ l de amortiguador B de Ligasa (tapa blanca) y 0.25 μ l de enzima Ligasa-65 (tapa verde).
- Posteriormente, se preparó la mezcla de Ligasa-Digestión. Para cada reacción se mezclaron gentilmente: 7.75 μ l de agua destilada y 1.5 μ l de amortiguador B de Ligasa (tapa blanca). Enseguida se agregó 0.25 μ l de la enzima Ligasa-65 (tapa verde) y 0.5 μ l de la enzima *HhaI*.
- Los tubos del paso 2 se mantuvieron a 20°C en el termociclador y después se retiraron. Se agregó 3 μ l de amortiguador A de Ligasa y 10 μ l de agua a cada tubo. Después de mezclarlo, se transfirieron 10 μ l de la mezcla total a un segundo tubo.
- Se colocaron los tubos en el termociclador a 48°C y se agregó 10 μ l de la mezcla de Ligasa-65 a los primeros tubos (prueba de número de copias).
- Se agregaron 10 μ l de la mezcla de Ligasa-Digestión a los segundos tubos (prueba de metilación).

- Se continuo con el programa de termociclador: 30 minutos a 48°C (para ligación y digestión *HhaI*), 5 min. a 98°C para la inactivación térmica de las enzimas y se pauso en 20°C para retirar los tubos del termociclador.

4. Reacción de PCR

- Se agitó la mezcla de oligonucleótidos SALSA PCR.
- Se preparó la mezcla de polimerasa. Para cada reacción se mezclaron: 3.75µl de agua destilada, 1µl de la mezcla de oligonucleótidos SALSA PCR (tapa café) y 0.25µl polimerasa (tapa naranja).
- A temperatura ambiente, se agregaron 5µl de la mezcla de polimerasa a cada tubo.
- Se colocaron los tubos en el termociclador con el siguiente programa: 35 ciclos de 30seg. a 95°C, 30seg. a 60°C y 60seg. a 72°C. Finalizando con 20min. de incubación a 72°C y se pauso a 15°C para retirar los tubos con productos de PCR.

5. Separación de fragmentos por electroforesis capilar en secuenciador ABI® 310 de Applied Biosystems

6. Análisis de los datos mediante el software Coffalyser V 1.0.